

Aus der Klinik für Geflügel
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Blutchemische Diagnostik der Organophosphat- und Carbamat-
Vergiftungen einschließlich Cholinesterase-Reaktivierung bei
Haustauben (*Columba livia v. domestica*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Axel Zinke
aus Saarlouis

Hannover 2000

Wissenschaftliche Betreuung: Univ. Prof. Dr. U. Neumann

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. U. Neumann

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. Dr. h. c. H.-P. Sallmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2000

Meinen Eltern und meiner Großmutter

Inhaltsverzeichnis

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	4
2.1	Geschichte der Cholinesterasen und Cholinesterase-Inhibitoren.....	4
2.2	Enzymterminologie.....	5
2.3	Übersicht über die Cholinesterasen.....	6
2.3.1	Physiologische und biochemische Charakterisierung der Acetylcholinesterase (Acetylcholin-Hydrolase, E.C. 3.1.1.7).....	8
2.3.2	Physiologische und biochemische Charakterisierung der Butyrylcholinesterase (Acylcholin-Acyl-Hydrolase, E.C. 3.1.1.8).....	9
2.4	Einflußfaktoren auf die Höhe der ChE-Aktivität.....	11
2.4.1	Einfluß der Spezieszugehörigkeit und der artspezifischen Plasma- Aktivitäten der AChE und BChE.....	11
2.4.2	Einfluß von Alter, Geschlecht und Reproduktionszyklus.....	12
2.4.3	Circadianer und circannualer Rhythmus.....	14
2.4.4	Einfluß der Meßmethodik.....	15
2.4.5	Einfluß der Probenaufbewahrung.....	17
2.5	Erstellung von Referenzintervallen.....	18
2.6	Methoden der ChE-Aktivitäts-Bestimmung.....	18
2.7	Präzision und Richtigkeit des Trockenchemiesystems Vitros DT 60 II [®] für die Bestimmung der ChE-Aktivität beim Vogel.....	19
2.8	Inhibitoren der Cholinesterasen.....	20
2.8.1	Organophosphate (OP).....	20
2.8.2	Carbamate (CA).....	22
2.9	Quellen der OP- und CA-Vergiftungen bei Vögeln mit besonderer Berücksichtigung von Parathion und Carbofuran.....	23
2.10	Inhibition der Cholinesterasen durch OP oder CA.....	27
2.11	Reaktionswege OP- oder CA-inhibierter Cholinesterasen.....	30

2.11.1	Alterung phosphorylierter Cholinesterasen.....	30
2.11.2	Spontane Reaktivierung	31
2.11.3	Oxim-induzierte Reaktivierung	34
2.12	Neusynthese der Cholinesterasen.....	36
2.13	Metabolischer Abbau der OP und CA	37
2.14	Auswirkung der Applikationsform und der Pestizidformulierung auf die Toxizität von OP und CA.....	38
2.15	Einfluß biologischer Faktoren auf die Pestizidsensibilität der Vögel.....	39
2.16	Pathophysiologie und klinische Symptomatik der OP- und CA-Intoxikationen bei Vögeln.....	41
2.17	Nervenassoziierte AChE-Inhibitions-unabhängige toxische Effekte	44
2.18	Dosis und Verlauf der experimentellen Parathion- und Carbofuranintoxikationen bei der Taube.....	45
2.19	Diagnostik der OP- und CA-Vergiftungen bei Vögeln.....	46
2.19.1	Diagnostische Reaktivierung	49
2.20	Therapie der OP- und CA-Vergiftungen bei Vögeln.....	51
2.20.1	Atropintherapie.....	51
2.20.2	Oximtherapie	52
2.20.2.1	Probleme der Oximtherapie	54
2.20.3	Palliative und sonstige Therapiemaßnahmen.....	56
3.	Material und Methoden	57
3.1	Tiermaterial.....	57
3.2	Gewinnung, Aufbereitung und Lagerung der Proben.....	58
3.3	Meßmethoden	59
3.3.1	Naßchemische Messung	59
3.3.2	Trockenchemische Messung	61
3.4	Anteile der AChE und BChE an der ChE-Aktivität	61
3.5	Einfluß der Meßtemperatur (25 °C /37 °C) auf die ChE-Aktivität.....	62
3.6	Referenzwerte und weitere Einflußfaktoren auf die ChE-Aktivität.....	62
3.7	<i>In vitro</i> -Hemmung der ChE mit Parathion und Carbofuran.....	63

3.8	Spontane und Oxim-induzierte Hydrolyse der Meßsubstrate.....	64
3.9	Diagnostische Reaktivierung	64
3.9.1	Voruntersuchungen zu den Belastungsversuchen.....	64
3.9.2	Belastungsversuche	65
3.10	Chemikalienlagerung und Laborkontrolle	67
3.11	Statistische Auswertung	67
4.	Ergebnisse	69
4.1	Vorversuche.....	69
4.1.1	Aktivitätskurven der ChE bei steigenden Substratkonzentrationen von BThChI, AThChI und dem spezifischen BChE-Inhibitor iso-Ompa	69
4.1.2	Spontanhydrolyse der Meßsubstrate in der naßchemischen Messung.....	71
4.1.3	Oxim-induzierter Zerfall von Thiocholinestern.....	72
4.2	AChE/BChE-Verhältnis im Blutplasma von Tauben.....	74
4.3	Korrelation der Meßtemperaturen 25 °C und 37 °C.....	75
4.4	Einflußfaktoren auf die ChE-Aktivität.....	77
4.4.1	Einfluß des Geschlechts, der Jahreszeit und Haltungsform auf die ChE-Aktivität adulter Tauben.....	77
4.4.2	Einfluß des Alters auf die ChE-Aktivität	84
4.5	Referenzwerte	87
4.6	Diagnostische Reaktivierung	88
4.6.1	Diagnostische Reaktivierung nach ChE-Hemmung <i>in vitro</i> durch Parathion und Carbofuran.....	88
4.6.1.1	Hemmkonzentrationen von Parathion und Carbofuran.....	88
4.6.1.2	Einfluß von Inkubationszeit und –temperatur auf die spontane Reaktivierung.....	90
4.6.1.3	Oxim-induzierte Reaktivierung nach <i>in vitro</i> -Hemmung	94
4.6.2	Diagnostische <i>in vitro</i> - Reaktivierung <i>in vivo</i> gehemmter ChE	99
4.6.2.1	<i>In vivo</i> Verlauf der ChE-Aktivität nach oraler Applikation von Parathion bzw. Carbofuran.....	100
4.6.2.2	Thermische Reaktivierung.....	103

4.6.2.3	Oxim-induzierte Reaktivierung nach <i>in vivo</i> -Hemmung	106
5.	Diskussion	111
5.1	Methodik und Vorversuche	111
5.2	Korrelation der Meßtemperaturen der ChE-Aktivitätsbestimmung 25 °C und 37 °C	113
5.3	Einflußfaktoren und Referenzwerte der ChE	113
5.3.1	Einfluß des Geschlechts, der Jahreszeit, des Reproduktionszyklus und der Haltungsform auf die ChE-Aktivität adulter Tauben.....	113
5.3.2	Einfluß des Alters auf die ChE-Aktivität und das AChE/BChE- Verhältnis	118
5.4	Referenzwerte der ChE-Aktivität.....	119
5.5	Auswirkungen von Einflußfaktoren auf die klinisch-blutchemische Diagnostik der ChE-Aktivität bei Tauben.....	120
5.6	Diagnostische Reaktivierung	121
5.6.1	Diagnostische Reaktivierung nach <i>in vitro</i> -Inhibition der ChE	121
5.6.1.1	Methodik und Vorversuche	122
5.6.1.2	Thermische Reaktivierung der ChE nach <i>in vitro</i> -Inhibition.....	123
5.6.1.3	Oxim-induzierte Reaktivierung nach <i>in vitro</i> -Inhibition.....	125
5.6.2	Diagnostische Reaktivierung nach <i>in vivo</i> -Inhibition der ChE	126
5.6.2.1	Bemerkungen zur Methodik.....	126
5.6.2.2	Verlauf der ChE-Inhibition <i>in vivo</i>	128
5.6.2.3	Thermische Reaktivierung nach <i>in vivo</i> -Inhibition.....	129
5.6.2.4	Oxim-induzierte Reaktivierung nach <i>in vivo</i> -Inhibition.....	130
5.7	Blutchemische Diagnostik einer Intoxikation mit OP oder CA.....	132
5.8	Differenzierung von OP- und CA-Vergiftungen durch Einsatz der diagnostischen Reaktivierung	135
5.9	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere OP- und CA-Vergiftungen...	136
5.10	Klinische und blutchemische Diagnostik von OP- und CA-Vergif- tungen unter Einsatz des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II®	137

5.11	Vergleich der Hemm- und Reaktivierungsergebnisse durch ChE-Inhibition <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	139
6.	Zusammenfassung	141
7.	Summary	144
8.	Literaturverzeichnis	147
9.	Anhang	173

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Stichprobengruppe der Stadttauben
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
AThChI	Acetylthiocholiniodid
B	Stichprobengruppe der Brieftauben
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig
BChE	Butyrylcholinesterase
BThChI	Butyrylthiocholiniodid
CA	Carbamat
CbE	Carboxylesterase
ChE	Plasma-Cholinesterase
DTNB	Dithiodinitrobenzoesäure (Ellman's Reagenz)
E.C.	bezeichnet eine von der Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie (IUB) definierte spezifische Kennziffer eines Enzyms
F-Wert	F-Testquotient, Prüfgröße der statistischen Berechnung
h	Stunde
ID ₅₀	inhibitorische Dosis 50: Dosis bei der 50% eines Enzyms gehemmt wird
i.m.	intramuskulär
K	Konstante der Oxim-induzierten Substrathydrolyse
Kap.	Kapitel
LD ₅₀	Letale Dosis 50: Dosis bei der 50% der Tiere sterben
M	Mol
mg/kg KM	Dosierung in Milligramm pro Kilogramm Körpermasse
mM	Millimol

min	Minute
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NTE	neuropathy target enzyme
OP	Organophosphat
OPIDN	OP induced delayed neurotoxicity
p-Wert, p=	Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Prüfgröße (z. B. F-Wert) in der Statistik
<i>p. appl.</i>	<i>post applicationem</i>
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
s	Standardabweichung
sec	Sekunde
t	Tonne
Tab.	Tabelle
U/l	Units pro Liter/ Einheit der ChE-Aktivität
\bar{x}	Mittelwert
VA	Varianzanalyse
Var.koeff.	Variationskoeffizient
VITROS	trockenchemisches Analysensystem VITROS DT 60 II®
ZNS-AChE	Im Zentralen Nervensystem lokalisierte Acetylcholinesterase
μl	Mikroliter
%A	ChE-Aktivität in Prozent des Ausgangswerts
%R	ChE-Aktivität, ausgedrückt als prozentuale Reaktivierung nach HOBBIGER (1957)
2-PAM	Pralidoxim

1. Einleitung

Intoxikationen mit Cholinesterase-hemmenden Substanzen aus der Gruppe der Organophosphate (OP) oder Carbamate (CA) gehören zu den häufigsten Vergiftungsursachen bei Vögeln. Ein Großteil der weltweit eingesetzten Pestizide in Forst-, Landwirtschaft und Gartenbau gehören ebenso zu diesen Stoffklassen wie in Privathaushalten verwendete Insektizide und Akarizide. Sie besitzen selbst bei fachgerechter Anwendung ein großes Gefährdungspotential für Wildvögel, Nutzgeflügel und Ziervögel und werden auch bei der Mehrzahl von vorsätzlichen Vergiftungen nachgewiesen (JOERMANN u. GEMMEKE 1994, HILL 1995, FAIRBROTHER 1996). Vögel zeigen eine erheblich höhere Sensibilität gegenüber diesen Substanzen als Säugetiere, was insbesondere auf relativ niedrigere Aktivitäten von OP- und CA-abbauenden Enzymen zurückgeführt wird (RATTNER u. FAIRBROTHER 1991).

Die primäre toxische Wirkung beider Stoffklassen ist die Hemmung der nerven-assoziierten Cholinesterasen, die zu einer endogenen Acetylcholin-Vergiftung führt. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer Inhibition der Plasmacholinesterase (ChE), deren Aktivität blutchemisch gemessen werden kann.

Intoxikationen mit Cholinesterasehemmern erzeugen beim Vogel keine pathognomonischen Symptome. Fehlt ein vorberichtlicher Hinweis auf eine Pestizidexposition des Patienten, so ist in der Differentialdiagnostik die Detektion eines hochgradigen Aktivitätsabfalls der ChE durch blutchemische Messung der Enzymaktivität das Mittel der Wahl (LUDKE et al. 1975, MOHAN 1990).

Die diagnostische Interpretation der Höhe der Enzymaktivität setzt allerdings die Kenntnis der physiologischen Werte voraus, die dem Einfluß verschiedener exogener und endogener Faktoren unterliegen. Sie sind spezies- und meßmethodikspezifisch und erst für einen Bruchteil der Vogelarten bekannt (THOMPSON 1993, MARDEN et al. 1994).

Die Reaktivierung der gehemmten Cholinesterasen *in vitro* bietet die Möglichkeit einer sicheren Diagnose von OP- und CA-Intoxikationen auch ohne Kenntnis der spezifischen Referenzbereiche. Ein Wiederanstieg der Cholinesteraseaktivität kann

dabei durch spontane oder chemisch-induzierte Spaltung der Enzym-Inhibitor-Bindung (Reaktivierung) hervorgerufen werden. Zur chemischen Reaktivierung finden Pharmaka aus der Gruppe der Oxime Verwendung, die auch therapeutisch als Antidote der OP- und CA-Vergiftungen eingesetzt werden (MARTIN et al. 1981, HOOPER 1988, ROTENBERG et al. 1995).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der blutchemischen Diagnose von OP- und CA-Vergiftungen von Vögeln am Beispiel der Taube (*Columba livia dom.*). Zunächst wurde dabei der physiologische Einfluß der Faktoren Alter, Geschlecht, Jahreszeit und Haltungsform auf die ChE-Aktivität der Tauben untersucht. Zu diesem Zweck wurden im Abstand von drei Monaten über ein Jahr lang in zwei unterschiedlichen Taubenbeständen Plasmaproben gewonnen und die spezifischen Referenzwerte der ChE und die Bedeutung der Einflußfaktoren ermittelt. Die Enzymaktivitätsmessungen erfolgten mit einem trockenchemischen Analysensystem und der naßchemischen Referenzmethode.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der diagnostischen Reaktivierung von mit dem OP Parathion bzw. dem CA Carbofuran gehemmter ChE unter Einsatz eines trockenchemischen Analysensystems und der naßchemischen Referenzmethode. Die Inhibition des Plasmaenzym erfolgte durch perorale Verabreichung subletaler Dosen von Parathion und Carbofuran an Tauben. In einem Vorversuch mit *in vitro*-Zugabe beider Enzymhemmer zu Plasmaproben wurde das Hemm- und Reaktivierungsverhalten der ChE der Taube beschrieben und die geeigneten Obidoxim-Konzentrationen sowie Inkubationszeiten und –temperaturen für die diagnostische Reaktivierung ermittelt.

Trockenchemische Meßsysteme, die in vielen veterinärmedizinischen Praxen und Kliniken vorhanden sind, erlauben eine exakte und gut vergleichbare ChE-Bestimmung unter minimalem Laboraufwand. In der vorliegenden Arbeit wurde eine diagnostische Reaktivierung OP- oder CA-gehemmter Plasmaproben anhand der Meßergebnisse des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II® entwickelt. Diese Methode ermöglicht eine unmittelbare Vergiftungsdiagnose ohne Lagerung und Transport inhibierter Proben.

Die Hemm- und Reaktivierungsreaktionen der Cholinesterasen gleichen sich

qualitativ tierart- und enzymtypübergreifend. In der folgenden Literaturübersicht wird deshalb auch auf Untersuchungen verwiesen, die nicht an aviären Cholinesterasen vorgenommen wurden.

2. Literaturübersicht

2.1 Geschichte der Cholinesterasen und Cholinesterase-Inhibitoren

Im Jahr 1932 isolierten STEDMAN et al. ein Acetylcholin (ACh)-hydrolysierendes Enzym aus Pferdeserum, für das erstmals die Bezeichnung „Cholinesterase“ verwandt wurde. Acht Jahre später waren es ALLES und HAWES (1940), die im Blut des Menschen zwei Cholinester-spaltende Enzyme unterschieden. Als Bezeichnung der beiden differenzierbaren Blutenzyme, die innerhalb weniger Jahre bei einer Vielzahl von Tierarten nachgewiesen werden konnten, schlugen MENDEL und RUDNEY (1943) „true cholinesterase“ und „pseudo-cholinesterase“ vor.

Phosphorsäureverbindungen treten in der Natur ausschließlich als ein- oder zweifach substituierte Phosphate auf. Seit Mitte des 19. Jahrhunderts besteht jedoch die Möglichkeit der synthetischen Herstellung von Organophosphaten (OP) mit drei oder mehr Substituenten (DE CLERMONT 1854). Die toxischen Eigenschaften dieser Verbindungen wurden erstmals von LANGE und KRÜGER (1932) erkannt. Gerhard Schrader synthetisierte daraufhin im Auftrag der I.G. Farbenindustrie bis zum Ende des Zweiten Weltkriegs rund 2000 organische Phosphorverbindungen, darunter 1944 das Parathion (E 605) und patentierte im März 1937 die allgemeine chemische Formel für Kontaktinsektizide diesen Typs (SCHRADER 1952). Die Entdeckung der inhibitorischen Wirkung der OP auf die Cholinesterasen wird GREMELS von der Militärärztlichen Akademie in Berlin im Jahr 1940 zugeschrieben (HAHN 1970). Obwohl die insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen bereits bekannt waren, fanden zunächst vor allem Phosphorsäureester mit hoher akuter Toxizität wie Tabun oder Sarin militärische Beachtung als chemische Kampfmittel.

Erst in den Nachkriegsjahren setzte erneut die Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten von OP in der Schädlingsbekämpfung ein. 1950 gelang in den Vereinigten Staaten die Synthese des Malathion, welches aufgrund seiner relativ geringen Säugetiertoxizität bei erhaltener insektizider Wirkung als Pestizid genutzt wurde und weltweit wesentlich zur Zurückdrängung der Malaria beitrug. Die leichter

abbaubaren und somit weder im Organismus noch in der Umwelt akkumulierenden OP lösten in der Folgezeit die damals verbreiteten Organochlorverbindungen in der Schädlingsbekämpfung ab.

Die chemische Struktur des Physostigmins, eines Alkaloids der Kalabarbohne (*Physostigma venosum*), analysierten STEDMAN und BARGER im Jahr 1925. Kurze Zeit später beschrieben LOEWI und NAVRATIL (1926) die Cholinesterase-hemmende Eigenschaft dieses Alkaloids. Physostigmin und die bereits in den frühen 30-er Jahren entdeckten synthetischen Derivate dieser Verbindung werden als Carbamate (CA) bezeichnet. Ein Einsatz der CA in der Landwirtschaft folgte jedoch erst in den 50-er Jahren. Zu dieser Zeit kamen erstmals Verbindungen wie das Carbaryl (Sevin®) auf den Markt, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften als Kontaktinsektizide eingesetzt werden konnten.

Parallel zur Ausbreitung der OP und CA als insektizide Pflanzenschutzmittel wuchs das Interesse an der Diagnose und Therapie von OP- und CA-Intoxikationen bei Mensch und Tier. WILSON (1951) berichtete erstmals von der Möglichkeit einer Reaktivierung OP-gehemmter Cholinesterasen mit Hilfe nucleophiler Agentien. ENGELHARD und ERDMANN (1963) synthetisierten das Obidoximchlorid (1,1'-Oxydimethyl-bis-[4-hydroxy-iminomethyl-pyridiniumhydroxyd]), das heute als Toxogonin® (Merck, Darmstadt) in Deutschland und einigen anderen Ländern als Antidot akuter OP-Vergiftungen eingesetzt wird.

2.2 Enzymterminologie

Der Sammelbegriff der Cholinesterasen umfaßt eine Vielzahl von biochemisch spezifizierbaren Enzymen, die in verschiedenen Körperkompartimenten unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen. Zur unmißverständlichen Abgrenzung werden in der vorliegenden Arbeit folgend definierte Termini bzw. Abkürzungen benutzt:

Cholinesterase:	Gesamtheit der Cholinesterasen;
BChE:	Plasma-Butyrylcholinesterase (Acylcholin-Acyl-Hydrolase, 3.1.1.8), Bestimmung mit Hilfe des Substrats Butyrylthiocholin-Iodid (BThChI);
AChE:	Plasma-Acetylcholinesterase (Acetylcholin-Hydrolase, E.C. 3.1.1.7), Messung mit Hilfe des Substrats Acetylthiocholin-Iodid (AThChI) nach Inkubation der Plasmaprobe mit dem spezifischen BChE-Inhibitor iso-OMPA;
ZNS-AChE:	Acetylcholinesterase (Acetylcholin-Hydrolase, E.C. 3.1.1.7) des ZNS, Bestimmung aus Gewebehomogenisat mit Hilfe des Substrats AThChI;
Acetylcholinesterase:	Keine Differenzierung zwischen Plasma-, Erythrozyten und nervenassoziiertes Acetylcholinesterase;
ChE:	Plasma-Cholinesterase, geläufige Abkürzung in der blutchemischen Diagnostik, die nicht zwischen AChE und BChE differenziert. Hier dann eingesetzt, wenn die Gesamtheit der Plasmacholinesterasen gemeint ist bzw. in konkreten Beispielen bei Einsatz des Substrats AThChI zur gemeinsamen Messung der AChE und der BChE.

2.3 Übersicht über die Cholinesterasen

Im Organismus von Säugetieren und Vögeln sind eine große Anzahl Ester-spaltender Enzyme nachweisbar, die nach ALDRIDGE (1953a) in zwei Gruppen unterschieden werden. Unter „A-Esterasen“ faßt man Enzyme wie die Arylesterasen zusammen, die an dem hydrolytischen Abbau der OP beteiligt sind. Als

„B-Esterasen“ werden dagegen die mit OP und CA inhibierbaren Enzyme bezeichnet.

Die Cholinesterasen gehören zu den B-Esterasen. Sie weisen eine hohe hydrolytische Kapazität für Cholinester auf und enthalten ein anionisches Zentrum, an dem das Substrat anlagert, sowie ein aktives Zentrum, an dem das Substrat gespalten wird (MENDEL u. RUDNEY 1943, MYERS 1953). Von allen bekannten Enzymen gehören die Cholinesterasen zu der Gruppe mit dem schnellsten Substratumsatz. Im Falle der Acetylcholinesterase nähert sich die Hydrolyse des ACh dem theoretischen Geschwindigkeitsmaximum $k_{\text{cat}} = 1,6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (ROSENBERRY 1975), welches durch die molekulare Diffusion des Substrats bestimmt wird (QUINN 1987).

In verschiedenen Lokalisationen des Organismus sind Aktivitäten von unterschiedlichen Cholinesterasen nachweisbar, deren spezifische Funktionen nur zum Teil bekannt sind. Eine biochemische Differenzierung dieser Esterasen wird durch variierende Substratspezifitäten und Enzymhemmungen mit Hilfe selektiver Inhibitoren ermöglicht.

Im Serum der Vögel sind auf diese Weise die Aktivitäten der in der Diagnostik einsetzbaren Enzyme Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE), die in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben werden, voneinander abgrenzbar. Während das BChE-Molekül (340 Kilodalton [KD]) ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten darstellt, liegt das deutlich kleinere AChE-Molekül als Monomer vor (80 KD). Mit Hilfe der Sucrose-Dichtegradientensedimentation, Ionenaustauscherchromatographie und Gen-Sequenzierung konnten verschiedene globuläre bzw. asymmetrische Formen der ChE bei Hühnern (*Gallus gallus dom.*) und Greifvögeln isoliert werden (ZECH u. ENGELHARD 1965, SKETELJ et al. 1978, BON et al. 1979, LYLES et al. 1979 u. 1980, ALLEMAND et al. 1981, MASSOULIE u. BON 1982, HOOPER 1988).

Eine große Bedeutung wird den Cholinesterasen in der Ontogenese eingeräumt. In jedem embryologischen Blastem sind unabhängig von vorhandenem Nervengewebe Aktivitäten dieses Enzymtyps nachweisbar. Eine spezifische Hemmung der Cholinesterasen von Hühnerembryonen ruft teratogene Effekte hervor (KITOS et al.

1981, MISAWA et al. 1981). Es wird daher angenommen, daß die Aktivitäten dieser Enzyme mit embryonalen Entwicklungsschritten, z. B. der Regulation von morphogenetischen Zellbewegungen zusammenhängen (DREWS 1975, BUZNIKOV 1984). Vor und nach Abschluß der Embryonalentwicklung liegt bei Vögeln eine unterschiedliche Verteilung der Cholinesterasen in den verschiedenen Körperkompartimenten vor. Im Blut und dem gesamten Muskelgewebe der Hühnerembryos sind eine hohe Acetyl-, aber keine Butyrylcholinesterase-Aktivität nachweisbar. Nach dem Schlupf findet eine Konzentration der Acetylcholinesterase-Aktivität auf die Bereiche der motorischen Endplatten statt, und die zuvor nicht nachweisbare BChE -Aktivität im Serum steigt an (WILSON et al. 1973, MASSOULIE u. BON 1982, SMUCKER u. WILSON 1990).

2.3.1 Physiologische und biochemische Charakterisierung der Acetylcholinesterase (Acetylcholin-Hydrolase, E.C. 3.1.1.7)

Die Acetylcholinesterase trägt laut Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie (IUB) den Namen „Acetylcholin-Hydrolase“, wird aber auch als spezifische, wahre, E-Typ oder Erythrozyten-Cholinesterase bezeichnet.

Die wichtigste physiologische Funktion dieses Enzyms ist die Inaktivierung der Neurotransmittersubstanz ACh in den Synapsen der Neurone und motorischen Endplatten. ACh wird in den Nervenzellen gebildet, in synaptischen Vesikeln gespeichert und bei Nervenimpuls-induzierter Membrandepolarisation freigesetzt. Nach Diffusion des ACh durch den synaptischen Spalt und Bindung an die spezifischen Rezeptoren der postsynaptischen Membran erfolgt eine Depolarisierung, die bei genügender Höhe ein Aktionspotential auslöst oder eine Hyperpolarisierung, welche die Entstehung eines Aktionspotentials hemmt. Cholinesterasen katalysieren die hydrolytische Spaltung des ACh und beenden dadurch die Reizübertragung innerhalb weniger Millisekunden. Dabei bindet das ACh an das anionische Zentrum der Esterase, welches unter Abspaltung des Cholin-Moleküls acetyliert wird. In einem zweiten Reaktionsschritt verläuft die Hydrolyse des

so entstandenen Acetyl-Enzym-Komplexes. Unter Abspaltung des Acetats erfolgt dabei die Wiederherstellung des Ausgangszustands des Enzyms. Die inaktiven Neurotransmitter-Bruchstücke Acetat und Cholin werden von der Nervenzelle aufgenommen, zu ACh verknüpft und erneut in Vesikeln gespeichert.

Eine Acetylcholinesterase-Aktivität ist in Bereichen des Nervensystems und der Muskulatur auch außerhalb der Synapsen und motorischen Endplatten sowie in den Erythrozyten der Säugetiere nachweisbar (ALLES u. HAWES 1940, NACHMANSOHN u. ROTHENBERG 1945). Bei Vögeln tritt keine Erythrozyten-AChE auf, in artspezifischer Höhe existiert jedoch eine Plasmaaktivität der AChE (Kap. 2.3.2) (LYLES et al. 1980, HOOPER 1988, FAIRBROTHER et. al. 1990). Die physiologische Funktion der Acetylcholinesterasen außerhalb der Synapsen und motorischen Endplatten ist unbekannt (STEDMAN u. STEDMAN 1935, LYLES et al. 1980, WILSON et al. 1992).

Die Acetylcholinesterase zeichnet sich durch eine ausgeprägte Substratspezifität für Acetyl- β -methylcholin, Acetylthiocholin und ACh sowie Substrathemmung bei ansteigenden Substrat-Konzentrationen aus (ALLES u. HAWES 1940, MENDEL u. RUDNEY 1943, NACHMANSOHN u. ROTHENBERG 1945, AUGUSTINSSON 1949). Selektive Inhibitoren sind das Prostigmin-Analogon Nu-1250 (*N-p*-chlorophenyl-*N*-methylcarbamat von *m*-hydroxyphenyl-trimethyl-ammoniumbromid) (HAWKINS u. MENDEL 1949) und das Phenylketon BW 248c51 (1,5-bis-(4-allyldimethylammoniumphenyl)-pentan-3-etonbromid) (AUSTIN u. BERRY 1953). Als kompetitiver Inhibitor der Acetylcholinesterase wurde das Butyrylthiocholin beschrieben (ZECH et al. 1969).

2.3.2 Physiologische und biochemische Charakterisierung der Butyrylcholinesterase (Acylcholin-Acyl-Hydrolase, E.C. 3.1.1.8)

Die BChE trägt laut IUB den Namen Acylcholin-Acyl-Hydrolase, wird aber auch unspezifische, S-Typ, Pseudo- oder Serum-Cholinesterase genannt.

Dieses in den Hepatozyten synthetisierte Enzym (SVENSMARK 1963, KUTTY 1980)

kann bei Vertebraten hauptsächlich im Plasma nachgewiesen werden. Geringere Aktivitäten existieren aber auch in Organen wie der weißen Substanz des Zentralen Nervensystems (ZNS), der Leber, dem Herz, der Muskulatur oder im Fettgewebe (MYERS 1953, KUTTY 1980). Zwar wurde eine Synthese der BChE auch außerhalb der Leber beschrieben, eine erwähnenswerte Serumaktivität dieser extrahepatischen Enzyme ist jedoch nicht anzunehmen (McQUEEN 1995).

Die physiologischen Aufgaben der Serumenzyme BChE und AChE konnten bis heute nicht geklärt werden. Mögliche Funktionen sind der Abbau des aus dem Nervensystem in die Blutbahn gelangten ACh oder anderer beim Fettsäuren- und Lipoprotein-Stoffwechsel anfallender Choline (CLITHEROW et al. 1963, FUNNEL u. OLIVER 1965). Nach Applikation eines Hyperlipidämie erzeugenden Therapeutikums bei Ratten erfolgt ein Anstieg der ChE-Aktivität, der auf eine Änderung der Fettsäuren-Oxidationsrate zurückgeführt wird (KUREC-VAJIC et al. 1992). Einen Zusammenhang zwischen der ChE-Aktivität und dem Cholesterol- bzw. Lipoprotein-Metabolismus wird auch bei KUTTY (1980), VAN LITH et al. (1992) und KUTTY und PAYNE (1994) diskutiert. BON et al. (1987) vermuten dagegen eine enzymatische Detoxifizierung von alimentär aufgenommenen pflanzlichen Estern.

Bei Menschen mit kongenitalem ChE-Mangel konnten keine klinischen oder pathomorphologischen Veränderungen festgestellt werden. Aufgrund dieser Beobachtung stellt LOCKRIDGE (1990) die Hypothese auf, daß der ChE-Aktivität entweder keine wichtige physiologische Funktion oder aber eine derart bedeutende zuzuordnen ist, daß ein zweites, bisher unbekanntes und Störungen der ChE-Funktion kompensierendes Esterasesystem existiert.

In der Labordiagnostik kann die ChE-Messung zur Überprüfung der hepatischen Proteinsyntheseleistung verwendet werden (McQUEEN 1995, ZINKE et al. 1999a).

Die BChE hydrolysiert neben ACh auch die Substrate Benzoylcholin, Butyrylcholin, Propionylcholin (STEDMAN et al. 1932, MYERS 1953) sowie weitere Cholin- und Nicht-Cholinester (MENDEL u. RUDNEY 1943) und zeigt bei ansteigender Substratkonzentration keine Substrathemmung (AUGUSTINSSON 1949). Zur kinetischen Messung der BChE kommen die Substrate AThChI (ELLMAN et al. 1961) und BThChI (KNEDEL u. BÖTTGER 1967) zum Einsatz. Als selektive

Inhibitoren gelten u.a. das Prostigmin-Analog Nu-683 (HAWKINS u. GUNTER 1946), DFP (0,0-Diisopropyl-phosphorsäure-fluorid, HAWKINS u. MENDEL 1947) sowie Iso-OMPA (Tetraisopropyl-pyrophosphoramid, ALDRIDGE 1953b).

2.4 Einflußfaktoren auf die Höhe der ChE-Aktivität

Bei der Interpretation von Meßwerten der ChE ist die Beeinflussung der Enzymaktivität durch eine Reihe biologischer und methodischer Faktoren zu berücksichtigen (RATTNER u. FAIRBROTHER 1991, THOMPSON 1993), die in den folgenden Kapiteln ausführlich dargestellt werden.

Eine Erniedrigung der ChE-Aktivität kann aber auch in Folge von Einschränkungen der hepatischen Proteinsynthese auftreten, die bei Lebererkrankungen oder katabolen Stoffwechsellagen beobachtet wurden (McQUEEN 1995, KIESAU 1997, ZINKE et al. 1999b).

2.4.1 Einfluß der Spezieszugehörigkeit und der artspezifischen Plasma-Aktivitäten der AChE und BChE

Verschiedene Vogelarten weisen z.T. deutlich differierende Referenzbereiche der ChE auf. Signifikante Wechselwirkungen zwischen der Höhe der ChE-Aktivität und der taxonomischen Einordnung oder des Nahrungsspektrums konnten dabei nicht nachgewiesen werden (WESTLAKE et al. 1983, THOMPSON 1993, KIESAU 1997). Im Serum von Greifvögeln sind jedoch weitaus weniger durch Elektrofokussierung auftrennbare BChE-Formen enthalten als bei omnivoren oder herbivoren Arten (THOMPSON et al. 1991a).

Eine Ursache der zwischen verschiedenen Spezies variierenden Referenzbereiche der ChE-Aktivität ist das Verhältnis der Aktivitäten der AChE und BChE im Serum (HOOPER 1988, THOMPSON 1993, KIESAU 1997). Während bei Hühnern (*Gallus gallus dom.*) und Haustauben (*Columba livia dom.*) fast ausschließlich BChE-

Aktivitäten gemessen wurden (LYLES et al. 1980, THOMPSON 1993, HENDERSON et al. 1994), wiesen Virginiawachteln (*Colinus virginianus*) und Kaninchenkäuze (*Athene cunicularia*) einen Anteil der AChE von 16% und Stockenten (*Anas platyrhynchos*) und Schleiereulen (*Tyto alba*) von 26% an der ChE-Aktivität auf (BENNETT u. FAIRBROTHER 1991). Bei einigen Greif- (HOOPER u. WILSON 1987, HOOPER 1988, KIESAU 1997) und Singvogelarten (HOOPER 1991) beträgt der Anteil der AChE an der ChE-Aktivität sogar 40 – 95%.

Die Messung der ChE-Aktivität beinhaltet bei Verwendung des Meßsubstrats AThChI die Aktivitäten beider Enzyme. Setzt man aber das BThChI als Meßsubstrat ein, so wird ausschließlich die Aktivität der BChE gemessen (Kap. 2.3.1, 2.3.2, 2.4.4), so daß bei Vögeln mit niedrigem BChE-Anteil auch nur eine niedrige Gesamtaktivität erfaßt werden kann (KNEDEL u. BÖTTGER 1967, KIESAU 1997, ZINKE et al. 1999b).

2.4.2 Einfluß von Alter, Geschlecht und Reproduktionszyklus

Alter

Umfassende Enzymverschiebungen konnten in den ersten Tagen nach dem Schlupf und während der Jungvogelentwicklung nachgewiesen werden. Dabei beeinflusst neben den absoluten Veränderungen der ChE-Aktivität auch das unterschiedliche Verhältnis der Serumenzyme AChE und BChE die Höhe der gemessenen Enzymaktivitäten (Kap. 2.4.1).

Bei Nesthockern wie Star (*Sturnus vulgaris*), Rotkehl-Hüttensänger (*Sialia sialis*) oder Rotschulterstärling (*Agelaius phoeniceus*) gehen über 80 % der ChE-Aktivität am Schlupftag auf die AChE zurück, deren Anteil innerhalb von 2 - 5 Tagen auf unter 15 % abfällt. Während die Aktivität dieses Enzyms nach dem Ausflug weiter abnimmt, steigt die BChE-Aktivität zur Geschlechtsreife hin an (GRUE et al. 1981, GARD u. HOOPER 1993, McINNIS et al. 1996). Auch bei Hühnerküken (*Gallus gallus dom.*) besteht nach dem Schlupf ein initialer Abfall der AChE- bei gleichzeitigem Anstieg der BChE-Aktivität (LYLES et al. 1980). Messungen nach

dem 7. Lebenstag ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen mehr (BENNETT u. BENNETT 1991). Als Ursache der ChE-Verschiebungen ex ovo vermuteten LYLES et al. (1980) eine Freisetzung der AChE aus reifenden Skelettmuskelfasern.

In der Jungvogelentwicklung der Stockenten (*Anas platyrhynchos*) sinkt sowohl die AChE- als auch die BChE-Aktivität ab (FAIRBROTHER et al. 1990, BENNETT u. BENNETT 1991). Der in diesen Untersuchungen belegte, signifikante Abfall der ChE-Aktivität bei Stockenten wird ebenso wie die analogen Enzymverschiebungen bei Hühnern (SMUCKER u. WILSON 1990, FARAGE-ELAWAR 1991) hauptsächlich auf den rapiden Aktivitätsabfall der AChE zurückgeführt (GARD u. HOOPER 1993).

Bei Singvögeln der Spezies Rotkehl-Hüttensänger und Star existiert in der Nestlingszeit ein Anstieg der BChE- bei parallelem Abfall der AChE-Aktivität. Die absolute ChE-Aktivität zeigte bei diesen Vögeln dabei einen signifikanten Anstieg (GARD u. HOOPER 1993).

Eine im Vergleich zu Jungvögeln signifikant höhere ChE-Aktivität adulter Vögel wurde bei Star und Rabenkrähe (*Corvus corone*), nicht aber beim Rotkehl-Hüttensänger beobachtet (GARD u. HOOPER 1993, KIESAU 1997).

Geschlecht

Ein signifikanter Einfluß des Geschlechts auf die ChE-Aktivität war weder bei Felsentauben (*Columba livia*) noch bei Stockenten oder Fasanen (*Phasianus colchicus*) festzustellen (BUNYAN et al. 1968, HILL u. MURRAY 1987, FAIRBROTHER et al. 1990). Auch bei einer Studie an 114 Tauben (*Columba livia dom.*) konnten keine geschlechtsspezifischen BChE-Aktivitätsunterschiede festgestellt werden (BARTKOWIAK u. WILSON 1995).

Männliche Japanwachteln (*Coturnix japonica*) besitzen dagegen signifikant höhere ChE-Aktivitäten als ihre weiblichen Artgenossen (HILL 1989a, LUDKE et al. 1975).

Reproduktionszyklus

Mehrere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einfluß des Reproduktionszyklus auf die ChE-Aktivität. Eine 25-%ige Depression konnte bei

weiblichen Virginiawachteln (*Colinus virginianus*) im Frühjahr parallel zur Gonadenvergrößerung festgestellt werden (HILL u. MURRAY 1987). Zu Beginn der Eiablage setzt bei der gleichen Art ein 20-%iger Aktivitätsanstieg ein (BENNETT et al. 1991). FAIRBROTHER et. al. (1990) beobachteten in der Reproduktionszeit eine signifikant höhere ChE-Aktivität geschlechtsaktiver Stockenten mit maximalen Enzymaktivitäten während und vor der Eiablage gegenüber in dieser Hinsicht inaktiven Artgenossen. Diese erhöhte ChE-Aktivität zeigte sich ausgeprägter bei weiblichen als bei männlichen Enten.

Auch bei Säugetieren wurde diese Fragestellung untersucht. Reproduktionsaktive Rattenweibchen zeigten einen 3-5-fachen Anstieg der ChE-Aktivität, der durch die suppressive Wirkung der Androgene sowie die ChE-stimulierende Wirkung der Östrogene erklärt wurde (ILLSLEY u. LAMARTINIERE 1981).

2.4.3 Circadianer und circannualer Rhythmus

Nur wenige Untersuchungen haben sich mit dem Einfluß der Tages- und Jahreszeit auf die ChE-Aktivität beschäftigt (RATTNER u. FAIRBROTHER 1991).

Als Zeitgeber der circadianen Enzymaktivitätsveränderungen werden bei Tieren vor allem der Hell-Dunkel-Rhythmus und das Wechselspiel zwischen Futteraufnahme und Inaktivität angesehen (MOORE-EDE 1986). Während bei Staren (*Sturnus vulgaris*) und Uhus (*Bubo bubo*) keine signifikante circadiane Variation der ChE-Aktivität festgestellt wurden, bestand bei Mäusebussarden zwischen 6.00 und 10.00 Uhr ein relativ niedrigeres Aktivitätsniveau als zu anderen Tages- oder Nachtzeiten (GARCIA-RODRIGUEZ et al. 1987, THOMPSON et al. 1988). Eine signifikant niedrigere Aktivitätsphase zwischen 12.00 und 20.00 Uhr (ChE-Aktivität ca. 1400 U/l) konnte gegenüber ca. 1600 U/l zwischen 24.00 und 8.00 Uhr (Blutentnahme im 4-h-Rhythmus) bei Virginiawachtel-Hennen (*Colinus virginianus*) beobachtet werden (RATTNER et al. 1982).

Der Einfluß der Jahreszeiten auf die ChE-Aktivität kann auf eine Reihe von Faktoren wie Tageslichtlänge, Klima, Futterangebot oder Reproduktionszyklus (Kap. 2.4.2)

zurückgeführt werden. Circannuale Unterschiede der ChE-Aktivität traten bei Star (*Sturnus vulgaris*) und Virginiawachtel, nicht aber bei Purpurgrackel (*Quiscalus quiscula*) und Rotschulterstärling (*Agelaius phoeniceus*) auf (HILL u. MURRAY 1987). Die Virginiawachteln zeigten als einzige der untersuchten Vogelarten Brutaktivität. Bei dieser Vogelart bestanden im Winter eine signifikant höhere sowie bei den weiblichen Tieren zusätzlich im Frühjahr eine signifikant niedrigere ChE-Aktivität. Die ChE-Aktivität bei den Staren war im Frühjahr wiederum signifikant niedriger als zu den übrigen Jahreszeiten.

2.4.4 Einfluß der Meßmethodik

Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten photometrischen ChE-Bestimmung nach ELLMAN et al. (1961) und modifiziert von HILL und FLEMING (1982) werden 20 µl einer Plasma- oder ZNS-Gewebehomogenisat-Probe mit 100 µl Meßsubstrat-Lösung und 3 ml einer Puffer-Farbstofflösung vermischt. Die in der Probe enthaltenen Cholinesterasen hydrolysieren den als Meßsubstrat eingesetzten Thiocholinester. Das freigesetzte Thiocholin reagiert mit dem Farbstoff 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) zu der gelben Verbindung Thionitrobenzoesäure. Der Enzymumsatz ist dem gelben Farbumschlag, der photometrisch zwischen den Meßwellenlängen 405 und 420nm gemessen werden kann, proportional (FAIRBROTHER et al. 1991).

MARDEN et al. (1994) verglichen die Meßergebnisse von 12 umwelttoxikologischen Laboratorien in den USA, welche die Meßmethode nach ELLMAN et al. (1961) routinemäßig durchführten. Zu diesem Zweck erhielten die Laboratorien kommerziell erwerbbarer Acetylcholinesterase (Sigma Chem. Co. St. Louis. MO) und identische ZNS-Gewebehomogenisate von Virginiawachteln (*Colinus virginianus*), um sie mit der etablierten Methode zu messen. Bei 50% der ZNS-Proben lag zusätzlich eine Enzyminhibition durch Methylparathion vor.

Die Meßergebnisse der Laboratorien unterschieden sich deutlich. So variierten die Aktivitäten der ZNS-AChE der unbehandelten Wachteln zwischen 2,6 und 28,0 µmol

AThChI /min /mg Feuchtgewicht, der behandelten Wachteln zwischen 1,5 und 15,3 μmol sowie der kommerziellen Acetylcholinesterase zwischen 45,7 und 514 μmol . Eine größere Übereinstimmung zeigten dagegen die prozentualen Hemmungen der OP-inhibierten ZNS-AChE, die in Relation zu den ungehemmten Vergleichsproben zwischen 37 und 49 % betragen. Die Hauptursachen der hohen Variabilität der Meßergebnisse sahen die Verfasser in der Unterschiedlichkeit der Meßtemperaturen (22 °C bis 37 °C) und Meßdauern (0.15 – 5.30 min). Unterschiedliche Handhabungen mit möglichem Einfluß auf die bestimmte Enzymaktivität bestanden aber auch bei den Konzentrationen des Meßsubstrats AThChI (ca. 0,4 bzw. ca. 5 mM/l i.d. Endkonz.) und des Farbstoffs DTNB (0,19 bis 0,32 nM/l in der Endkonz.) sowie bei der Wellenlänge (405 bis 480 nm), der Äquilibrationszeit (0 bis 10 min) und der Anzahl der Einzelmessungen (1 bis 114).

Die katalytische Aktivität der Cholinesterasen ist temperaturabhängig. Der optimale Temperaturbereich für Cholinesterasen der Säugetiere wird mit 37 °C bis 40 °C angegeben (SILVER 1974). Bei Temperaturen außerhalb dieses Bereichs sinkt die Esteraseaktivität. Werden Temperaturen von 60 °C bis 70 °C überschritten, so bedingt die Proteindenaturierung einen Aktivitätsverlust.

Als Meßsubstrat kommen verschiedene Thiocholinester, vor allem AThChI, BThChI und Propionylthiocholin-Iodid zum Einsatz. Die hochspezifische AChE setzt lediglich das AThChI um, während die BChE alle drei Substrate hydrolysiert. Zudem bestehen tierartspezifische Substrataffinitäten beider Enzyme. Allgemein weist die AChE eine höhere Substrataffinität als die BChE auf und zeigt dadurch bei niedrigen Substratkonzentrationen einen effektiveren Stoffumsatz (MYERS 1953, AUGUSTINSSON 1949).

Das Meßsubstrat AThChI besitzt im Vergleich zu anderen Thiocholinestern eine relativ hohe spontane Hydrolyserate. Das BThChI zeichnet sich dagegen durch eine höhere Stabilität in Lösung und einen schnelleren Substratumsatz aus. Somit sind mit unterschiedlichen Thiocholinestern gemessene Enzymaktivitäten nicht unmittelbar vergleichbar (FAIRBROTHER et al. 1991, RATTNER u. FAIRBROTHER 1991).

Oxime, die sich gegenüber ACh inert verhalten, können bei der photometrischen

Messung durch Spaltung der Thiocholinester zu falsch erhöhten Meßwerten führen (BERGMANN u. GOVRIN 1973). Bei Einsatz von Oximen zur *in vitro*-Reaktivierung (Kap. 2.11.3) sollte daher eine spezifische Konstante der 2-PAM-induzierten Hydrolyse des Meßsubstrats berechnet und von den Meßergebnissen subtrahiert werden (HOOPER 1988).

2.4.5 Einfluß der Probenaufbewahrung

Plasma - oder Serumproben zur ChE-Messung können bei Zimmertemperatur über maximal 48 h, bei 0 °C bis 4 °C maximal fünf Tagen aufbewahrt werden. Die empfohlene Temperatur für längerfristige Lagerung beträgt –20 °C bis –70 °C (WITTER 1963, FAIRBROTHER et al. 1991). KIESAU (1997) beschrieb einen gattungsspezifischen Einfluß einer einmaligen Tiefkühlung auf –18 °C. Während bei Graupapageien (*Psittacus erithacus*) ein hochsignifikanter Aktivitätsverlust von 11% auftrat, zeigten Plasmaproben von *Amazona spec.* lediglich einen schwach signifikanten Aktivitätsverlust von ca. 2,5%. Einmaliges Tieffrieren auf -18 °C von *Ara spec.*-Plasma (KIESAU 1997), 72 h Lagerung bei –20 °C von Plasma des Stars (*Sturnus vulgaris*) (THOMPSON 1991) oder über 28 Tage von Plasma männlicher Japanwachteln (*Coturnix japonica*) (HILL 1989b) bewirken keinen Aktivitätsverlust. HILL (1989b) beschrieb eine Erhöhung der ChE-Aktivität weiblicher Stare nach Lagerung bei 4 °C bzw. –25 °C. Als Ursache dieses Effekts wurden unidentifizierte Substanzen im Blut brütender, weiblicher Tiere vermutet, die schwache Inhibitoren der ChE darstellen.

Bei der Lagerung OP- bzw. CA-gehemmten Plasmas kann in Abhängigkeit von Inhibitor, Temperatur und Aufbewahrungsdauer eine spontane Hydrolyse des Enzym-Inhibitor-Komplexes auftreten (Kap. 2.11.2) (HILL 1989b, FAIRBROTHER et al. 1991).

2.5 Erstellung von Referenzintervallen

Ein Referenzintervall wird anhand einer definierten Gruppe von Tierindividuen erstellt und ergibt so eine Vergleichsgröße zur Bewertung aktueller Meßergebnisse. Je mehr sich Probengewinnungs- und Meßbedingungen gleichen und je deutlicher die Probanden die definierte Tiergruppe repräsentieren, desto höher ist dabei die Vergleichszuverlässigkeit (KRAFT et al. 1995).

Aufgrund der in Kap. 2.4 beschriebenen Variabilität der Enzymaktivität wird die Erstellung von nach Vogelart, Meßmethode oder gar Labor spezifizierten Referenzbereichen der ChE-Aktivität empfohlen (FAIRBROTHER et. al. 1989, MARDEN et al. 1994, KIESAU 1997). In Abhängigkeit von der Verteilung der Meßwerte ist eine unterschiedliche Berechnung der Referenzintervalle möglich. Liegt eine Normalverteilung vor, so ist das „klassische“ Berechnungsverfahren einsetzbar, bei dem das Referenzintervall innerhalb der doppelten Standardabweichungen des mathematischen Mittelwerts $[(x-2s) \text{ bis } (x+2s)]$ liegt.

Zeigen die Meßwerte dagegen die Tendenz einer schiefen Kurve mit Links- oder Rechtssteilheit, so sollte eine sogenannte nichtparametrische Berechnung durchgeführt werden. Im allgemeinen wird dabei das 95%-Perzentil-Intervall bevorzugt, bei dem an beiden Bereichsgrenzen die äußeren 2,5% der Werte eliminiert werden. Die Anwendung dieses statistischen Verfahrens setzt allerdings ein Minimum von 40, besser aber 120 gemessenen Proben voraus (INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY 1984, KRAFT et al. 1995).

2.6 Methoden der ChE-Aktivitäts-Bestimmung

Zur Bestimmung der Höhe der Cholinesterase-Aktivität in Blut und Gewebe wird das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse von ACh oder eines ACh-Analogons unter Freisetzung von Acetat gemessen. Dabei kamen bisher verschiedene Techniken einschließlich Manometrie, Elektrometrie, Titrimetrie, Radiometrie und

Gaschromatographie zum Einsatz (EVANS 1986, FAIRBROTHER et al. 1991). Gegenwärtig wird neben der elektrometrischen Messung der freigesetzten Essigsäure nach MICHEL (1949) hauptsächlich die spektrophotometrische Bestimmung nach ELLMAN et al. (1961) verwendet. Die Vorteile dieser mit Thiocholinestern als Substrat arbeitenden Methode sind eine einfache Automatisierung und schnelle Reaktionszeiten (wenige Minuten gegenüber 1 – 1,5 h bei elektrometrischer Messung). Sie ist einfach zu handhaben und deshalb gut in Feld und Labor einzusetzen. Die bereits bei kurzen Meßzeiten erreichte lineare Reaktionskinetik bedingt eine gute Präzision (Kap. 2.7) der Meßwerte (FAIRBROTHER et al. 1991, MUNRO et al. 1991). In annähernd allen Studien der letzten Jahre, die sich mit OP/CA-Vergiftungen bei Vögeln beschäftigen, wurde das Verfahren nach ELLMAN et al. (1961) angewendet, in der Regel in der Modifikation nach HILL und FLEMING (1982).

2.7 Präzision und Richtigkeit des Trockenchemiesystems VITROS DT 60 II® für die Bestimmung der ChE-Aktivität beim Vogel

Die Messung der ChE-Aktivität kann auch mit Hilfe von automatisierten Trockenchemiesystemen durchgeführt werden, die in den tierärztlichen Praxen zur klinischen Routinediagnostik eingesetzt werden. Bei diesen Geräten entfällt das Vorbereiten der Reagenzien, die auf industriell hergestellten Einmal-Trockenreagenzträgern vorliegen. Die Einhaltung der Inkubationszeiten, der Meßwellenlänge und Meßintervalle sowie die Ergebnisberechnung und Linearitätsprüfung findet automatisch statt.

Die Präzision und Richtigkeit des Analysensystems VITROS DT 60 II® (Meßsubstrat BThChI) in Bezug auf die Meßgröße BChE wurde von KIESAU (1997) untersucht. Die Präzision beschreibt die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse bei wiederholten Messungen derselben Probe in der Serie sowie von Tag zu Tag. Sie liegt mit 6% weit unterhalb der von der BUNDESTIERÄRZTEKAMMER (1988) definierten Grenze für Enzymbestimmungen von 10%.

Richtigkeit bedeutet hier die Übereinstimmung des gemessenen Werts mit der tatsächlich in der Probe vorhandenen Enzymaktivität, was durch parallele Messung mit einer Referenzmethode überprüft wird. Als Referenzmethode der Wahl wird die in Kap. 2.4.4 u. 2.6 beschriebene naßchemische Messung nach ELLMAN et al. (1961) eingesetzt. Bei den meisten von KIESAU (1997) untersuchten Vogelarten wie Haus- (*Columba livia dom.*) bzw. Ringeltaube (*Columba palumbus*) sowie Spezies der Familien *Psittacidae* und *Corvidae* wie auch der Ordnung *Strigiformes* zeigten sich dann hohe bis sehr hohe Korrelationskoeffizienten ($r > 0,925$) und gute Übereinstimmungen (mittige Regressionsgerade) mit der Referenzmethode, wenn analog zum trockenchemischen Verfahren BThChI als Meßsubstrat eingesetzt wurde. Eine schlechte Korrelation des trocken- und naßchemischen Verfahrens war in dieser Studie jedoch dann erkennbar, wenn Plasma einer Vogelart untersucht wurde, die einen hohen Anteil der AChE an der gesamten ChE-Aktivität aufweist (z. B. beim Turmfalke [*Falco tinnunculus*]), Korrelationskoeffizient $r = 0,87$).

2.8 Inhibitoren der Cholinesterasen

2.8.1 Organophosphate (OP)

Die OP, die auch als Alkylphosphate oder Phosphorsäureester bezeichnet werden, bilden eine umfangreiche Stoffgruppe in der organischen Chemie. Neben ihrem hauptsächlichen Einsatzgebiet als Pestizid (u.a. Insektizid und Akarizid) in Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft finden sie auch Verwendung als Therapeutika, z. B. als Antiparasitikum, in der Glaukomtherapie oder zur Behandlung der Demenz vom Alzheimer-Typ. Die derzeit wichtigsten Insektenbekämpfungsmittel in Deutschland gehören chemisch zu den OP- und CA-Verbindungen (2.8.2) (JOERMANN 1992a).

Triorthocresylphosphat (TOCP), ein dreifach phenylsubstituiertes OP, welches vor allem durch entsprechende Lebensmittelintoxikationen bekannt geworden ist, und

Derivate cyclischer OP kommen zudem als Schmiermittelzusatz und Weichmacher in der Kunststoffindustrie zum Einsatz.

Die Triebfeder vieler toxikologischer und pharmakologischer Untersuchungen ist aber der Einsatz dieser Stoffgruppe als chemischer Kampfstoff in Form der sogenannten Nervengase wie Sarin, Tabun, Soman oder VX.

Cholinesterasehemmer vom Organophosphattyp existieren in einer großen Variabilität von molekularen Strukturen, die alle der abgebildeten allgemeinen Strukturformel entsprechen (Abb. 1).

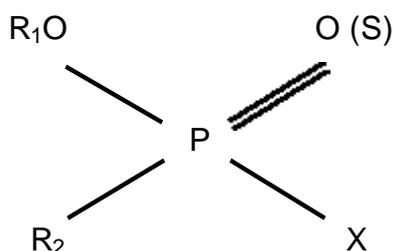


Abbildung 1: Allgemeine Struktur der Organophosphate. R₁ und R₂ stellen organische Reste, X die Abgangsgruppe dar. Durch eine Doppelbindung kann ein Sauerstoff- oder Schwefelatom an das zentrale Phosphoratom gebunden sein.

OP bestehen aus einem pentavalenten Phosphor-Atom mit polarisierter Doppelbindung zu einem Sauerstoff- oder Schwefelatom und drei zusätzlichen Substituenten. Einer dieser Substituenten, der die weitaus größte Variationsbreite aufweist und bei Reaktionen des Moleküls abgespalten wird (Kap. 2.10, 2.11), trägt die Bezeichnung Abgangsgruppe (leaving group). Es handelt sich dabei um einen organischen oder anorganischen Rest mit Säurecharakter. Die übrigen Reste können gleiche oder verschiedene Alkoxy-, Alkyl- oder Aminreste sein.

Neben den eigentlichen Phosphaten (z. B. Mevinphos) werden gegenwärtig vor allem Phosphorsäureesterderivate hergestellt, bei denen ein oder mehrere Sauerstoffatome durch Schwefel, Stickstoff und/oder Kohlenstoffatome ersetzt sind. Wegen ihrer unterschiedlichen Molekülstruktur werden die OP in eine Vielzahl von Gruppen eingeteilt. Eine Auflistung der in der vorliegenden Arbeit erwähnten insektiziden OP enthält Tabelle 1. Die vier mit dem zentralen Phosphoratom der OP verbundenen Atome werden dabei als Summenformel in der Klammer hinter der

Bezeichnung der OP-Gruppe angegeben. Die Bezeichnung der OP-Gruppen orientiert sich an der anglo-amerikanischen Nomenklatur.

Tabelle 1: In der vorliegenden Arbeit erwähnte insektizide OP. Angabe der jeweiligen OP-Gruppe (Summenformel der fünf zentralen Atome in Klammern).

Phosphorothionate (PSO ₃)	Orthophosphate (PO ₄)
Chlorpyrifos Diazinon Fenthion Methylparathion Parathion Triazophos	Dichlorvos Mevinphos Paraoxon
	Phosphorothionothiolate (PS ₂ O ₂)
	Malathion Methidation
Phosphonate (PO ₃ C)	Phosphoramidothionate (PNSO ₂)
Trichlorphon	Isofenphos

2.8.2 Carbamate (CA)

Die Stoffgruppe der CA umfaßt die Ester der Carbaminsäure sowie die N-substituierten Derivate dieser Ester. Sie ist damit wesentlich weniger umfangreich als die der OP. CA finden als Insektizide und Akarizide, aber auch therapeutisch als Ektoparasitika oder indirekte Parasympathomimetika Verwendung.

Das älteste existente toxische CA ist das natürliche Alkaloid der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*), welches als Physostigmin bzw. Eserin bezeichnet wird, und das die Cuticula von Insekten nicht zu penetrieren vermag. Als Pestizide kommen deshalb nur die lipophilen synthetischen Analoga dieses Alkaloids in Frage.

Die CA werden nach ihrer Molekülstruktur in drei Klassen eingeteilt, von denen auf die Thio- und Dithio-CA, die nicht als Pestizide einsetzbar sind, hier nicht näher eingegangen wird.

Im Fall der insektiziden CA ist das zentrale Kohlenstoffatom kovalent mit einem Sauerstoffatom verbunden und durch ein Stickstoffatom substituiert, welches ein oder zwei Alkylgruppen trägt (Abb. 2). In Esterbindung befindet sich der zweite

Substituent, eine carbocyclische (z. B. Carbaryl) oder heterocyclische Gruppe (z. B. Carbofuran, Carbosulfan) oder ein Oximderivat (z. B. Aldicarb).

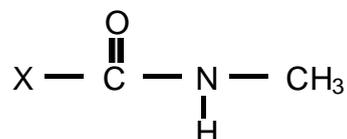


Abbildung 2: Allgemeine Struktur der insektiziden Methylcarbamate. X stellt einen carbocyclischen oder heterocyclischen Rest in Esterbindung oder ein Oximderivat dar.

2.9 Quellen der OP- und CA-Vergiftungen bei Vögeln mit besonderer Berücksichtigung von Parathion und Carbofuran

Pestizidintoxikationen von Wildvögeln werden einmal durch böswillige Ausbringung, aber auch durch bestimmungsgemäße Anwendung von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln hervorgerufen. Obwohl für die zeitlich begrenzte Zulassung von Pflanzenschutzmitteln die Durchführung zahlreicher Testverfahren zur Einschätzung der Auswirkungen auf den Naturhaushalt vorausgesetzt wird, sind in Einzelfällen auch bei regelgerechter Anwendung Wildtierverschärfungen möglich. Weitere Verschärfungsursachen sind gravierende Überdosierung, unsachgemäße Lagerung oder Mißachtung der Sicherheits- und Ausbringungshinweise (JOERMANN u. GEMMEKE 1994).

Im Zeitraum von 1988 bis 1993 gingen in der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig (BBA) 30 Schadensmeldungen ein, bei denen jeweils 1 bis 150 Tierindividuen betroffen waren, darunter in 28 Fällen Vögel. Bei neun Vorfällen mit Vogelsterben (Singvögel, Greifvögel, Rabenvögel, Wassergeflügel) konnten Parathionintoxikationen nachgewiesen werden, in der Mehrzahl durch vorsätzliche Verschärfung (JOERMANN u. GEMMEKE 1994). Auch nach Einschätzung des Tierhygienischen Instituts Freiburg ist Parathion das bevorzugte Mittel bei böswilligen Verschärfungen von Tieren und konnte in diesem

Institut bei 35,6 % der 213 untersuchten Vergiftungsfälle im Zeitraum zwischen 1978 und 1985 nachgewiesen werden (BAUM 1986).

Schätzungsweise 90 % der vergifteten Vögel suchen jedoch bei Auftreten erster Symptome umgehend Deckung auf und sterben ohne bemerkt zu werden (PORTER 1992, HAWKES et al. 1996). In der Bundesrepublik Deutschland (BRD) fehlt zudem ein organisiertes Meldesystem zur lückenlosen Auffindung, Aufklärung und Erfassung von Wildtierintoxikationen. Es ist daher anzunehmen, daß die in der BBA zentral gesammelten Vergiftungsfälle nur einen Bruchteil des tatsächlichen Geschehens repräsentieren (BAUM 1986, JOERMANN u. GEMMEKE 1994).

Das Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien berichtet von 16 Fällen von Vogelkadavern mit nachgewiesener letaler Carbofuranintoxikation zwischen Dezember 1993 und Februar 1997. In einzelnen Fällen waren Vögel dabei Opfer von offensichtlich zur Bekämpfung von „Raubwild“ ausgelegten und mit Carbofurangranulaten präparierten Ködern. Beobachtet wurde aber beispielsweise auch die letale Parathionaufnahme von sechs Graugänsen (*Anser anser*) in einem sachgemäß bestellten Winterweizenschlag (TATARUCH et al. 1998). Rapssaat wird üblicherweise mit Carbosulfan oder Isofenphos als Auflaufschutz und zur Abwehr des Rapserrdflohkäfers (Fam. *Chrysomelidae*) ummantelt (HÄNISCH u. GEMMEKE 1992). Nach Angaben des NATURSCHUTZBUNDS DEUTSCHLAND (NABU) (1995) bot der Handel ausschließlich gebeiztes Rapssaatgut an, das in Deutschland auf einer Fläche von 800.000 Hektar ausgebracht wurde. Bei der Einarbeitung inkrustierten Rapssaatguts in feinkrümeligen Boden bleiben jedoch selbst bei großer Sorgfalt immer einzelne Körner auf der Oberfläche liegen (HÄNISCH u. GEMMEKE 1992). In den Jahren 1986 – 1990 traten im Südwesten Deutschlands drei Fälle von Massenvergiftungen von Singvögeln und Wildgeflügel auf, die im Zusammenhang mit der Aufnahme von gebeizter Winterrapssaat standen (ROßBACH 1992).

Aus anderen Ländern liegen ebenfalls eine große Anzahl dokumentierter Pestizidvergiftungen von Vögeln vor, die z.T. mit Massensterben einhergingen (SHLOSBERG 1976, MENDELSSOHN u. PAZ 1977, REECE 1982, FORGET 1991). Häufig konnten dabei ebenfalls Carbofuran- (BALCOMB et al. 1984, STANSLEY

1993, HUNT et al. 1995, AUGSPURGER et al. 1996) oder Parathion-Intoxikationen nachgewiesen werden (WHITE et al. 1982, FLICKINGER et al. 1991, MORTENSEN et al. 1998).

Eine Gesamtzahl von 67 Millionen getöteter Vögel pro Jahr werden auf dem Gebiet der USA in Folge der Exposition mit zumeist legal ausgebrachten Pestiziden vermutet (WILLIAMS 1997). PORTER (1992) zitiert einen Bericht der amerikanischen Environmental Protection Agency, in der die jährliche Anzahl vergifteter Vögel, die in den Vereinigten Staaten allein auf Carbofuranvergiftungen zurückgeführt werden, auf bis zu 2 Millionen Individuen geschätzt wird.

Über 50 % aller OP und über 90 % aller CA sind für Vögel extrem toxisch ($LD_{50} < 40$ mg/kg) (SMITH 1987). Eine Exposition mit mehreren Umweltgiften führt in der Regel zu einem additiven Effekt. Es gibt jedoch Fälle, bei denen durch parallele Aufnahme mehrerer Giftstoffe eine Potenzierung oder aber sogar eine Abschwächung der toxischen Wirkung auftritt (JOHNSTON u. BAYLIS 1995).

Die geschätzte weltweit eingesetzte Insektizidmenge beträgt $1,1 \times 10^6$ t pro Jahr (MORLEY 1992). In der BRD wurden im Jahr 1989 allein 1338 t insektizider und akarizider Wirkstoffe in den Handel gebracht. Die Anwendung von Pestiziden erfolgt überwiegend als Spritzmittel; daneben sind auch Saatgutbeizung und Granulate von Bedeutung. OP und CA machen dabei 78 % des Insektizidabsatzes aus (JOERMANN 1992b).

Eine aktuelle Auflistung der in Deutschland zugelassenen Pflanzenschutzmittel kann über die BBA bezogen werden (www.bba.de). Hierin werden 1999 beispielsweise Carbofuran als Suspensionskonzentrat zur Rübenpillierung (BAY 13 180 [®]) sowie als Granulat (Carbosip[®], Curaterr Granulat[®]) und daneben Parathion als emulgierbares Konzentrat (E 605 forte[®], E Combi[®]) geführt.

Wenn auch eine allgemeine Gefährdungsabschätzung nicht möglich ist, besteht das größte Risiko für Kleinvögel durch nicht in den Boden eingearbeitetes Granulat und dasjenige für Wassergeflügel in der Spritzmittelanwendung in Grünland und Getreidefeldern. Sämereien aufnehmende Vögel, zu denen auch Wild-, Stadt- und im Freiflug befindliche Brieftauben gehören, vergiften sich vor allem an zugänglichem, mit Pflanzenschutzmitteln gebeiztem Saatgut. Intoxikationen der am Ende der

Nahrungskette stehenden Greifvögel treten dagegen in der Regel sekundär durch Atzung von mit Pestiziden belasteten Beutetieren auf. (HILL u. MENDENHALL 1980, BUNYAN et al. 1981, BALCOMB 1983, BAUM 1986, WEISSFEDER 1990, PORTER u. SNEAD 1990, PORTER 1992, JOERMANN 1992b, KUMMERFELD 1998b, HAWKES et al. 1996, ELLIOTT et al. 1996).

Carbofuran findet seit Jahrzehnten weltweit Einsatz als Insektizid und Nematizid. Das in granulärer Formulierung vertriebene Handelspräparat Curaterr[®] wird zum Schutz des Saatgutes, z. B. vor Drahtwürmern und Engerlingen, gemeinsam mit diesem in die Erde eingebracht. Ein Verschütten kleinerer Granulatmengen ist dabei insbesondere an den Feldrändern zu beobachten, wo die Einarbeitungsmaschine aus dem Boden gehoben wird (BALCOMB et al. 1984, BEST u. FISCHER 1992). Bereits die Aufnahme von weniger als 5 Granula Carbofuran (Warenname: Furadan[®] 10G) kann jedoch für sperlingsgroße Vögel tödlich sein (HILL u. CARMASESE 1984). Pestizidgranula gleichen zudem in Form und Größe dem Magengrit von Vögeln und werden deshalb bereitwillig aufgenommen (BEST 1992).

Der Carbofuranabbau durch Hydrolyse in der Umwelt ist abhängig von Trägersubstanz, Bodentyp, pH, Feuchtigkeit, mikrobieller Fauna und Temperatur. Er kann bei alkalischem Boden-pH eine Halbwertszeit von bis zu 35 Tagen aufweisen (BEST u. FISCHER 1992). Nach Einarbeitung in den Boden nehmen Wurzeln und Stamm der Pflanzen den Wirkstoff schnell auf. Eine signifikante insektizide Aktivität kann in den Blättern sogar noch zwischen zwei und vier Monaten nach Ausbringung gemessen werden (TURNER u. CARO 1973, BUNYAN et al. 1981). Bei granivoren Vögeln wird aus diesem Grund ein erhöhtes Vergiftungsrisiko vermutet. Zusätzlich kann der pflanzliche Metabolismus eine Potenzierung der Toxizität einiger Substanzen bewirken (HILL 1995). BEST und FISCHER (1992) gehen allerdings davon aus, daß die Gefahr einer Intoxikation hauptsächlich bei Aufnahme keimender Pflanzen besteht. Pestizidrückstände sind überdies in der lokalen Vertebratenfauna bis zu 90 Tage nach der Applikation nachweisbar (BUNYAN et al. 1981).

Neben Intoxikationen durch Abschlucken der giftigen Substanzen bei der Nahrungsaufnahme kommen Vergiftungen durch Wasseraufnahme aus kontaminierten Oberflächengewässern, beim Putzen des topisch mit Pestiziden

benetzten Gefieders sowie durch dermalen Kontakt und Aerosolinhalation vor (DRIVER et al. 1991, HILL 1992).

Intoxikationen von Ziervögeln, Zier- und Brieftauben sowie Zier- und Wirtschaftsgeflügel können außer nach böswilliger Vergiftung vor allem durch Pestizidanwendung in Haus, Hof und Garten oder nicht regelgerechtem Medikamenteneinsatz durch Umwidmung oder unsachgemäßer Dosierung bzw. Applikation von Antiparasitika auftreten. Vergiftungen von Ziervögeln einschließlich Papageienartigen treten dabei z. B. nach Inhalation von Wirkstoffdämpfen, Beknabbern von Flohhalsbändern oder besprühten Pflanzenteilen, unsachgemäßer akarizider Therapie bzw. Stall-, Volieren- oder Käfigdesinfektion sowie Aufnahme kontaminierten Futters oder Trinkwassers auf (RITCHIE 1987, KAMPHUES et al. 1990, KUMMERFELD u. KIETZMANN 1990, MOHAN 1990, DUMONCEAUX u. HARRISON 1994, GYLSTORFF u. GRIMM 1998).

2.10 Inhibition der Cholinesterasen durch OP oder CA

Organophosphate

Die Hemmung der Cholinesterasen durch OP ist ein irreversibler Prozess, der als Transphosphorylierung bezeichnet wird. „Irreversibel“ bedeutet in diesem Zusammenhang, daß nach einer Enzymreaktivierung kein intaktes OP-Molekül mehr vorliegt (WILSON et al. 1992). Aufgrund der strukturellen Übereinstimmungen von OP und ACh verläuft die Transphosphorylierung analog zum Substratumsatz des Enzyms über die Bildung eines reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes (Abb. 3). Statt einer Acetylierung des elektronegativen katalytischen Zentrums der Esterase mit umgehender Hydrolyse erfolgt jedoch eine Phosphorylierung durch das elektrophile Phosphorzentralatom des OP. Dabei kommt es zur Abspaltung der Abgangsgruppe des Phosphoratoms. Das OP-Molekül ist nun kovalent an das Enzym gebunden und verhindert dessen katalytische Aktivität (ALDRIDGE 1953c). Das inhibierende Potential eines OP und die Stabilität des phosphorylierten Enzyms werden vor allem von den Substituenten des zentralen P-Atoms, deren Ladung,

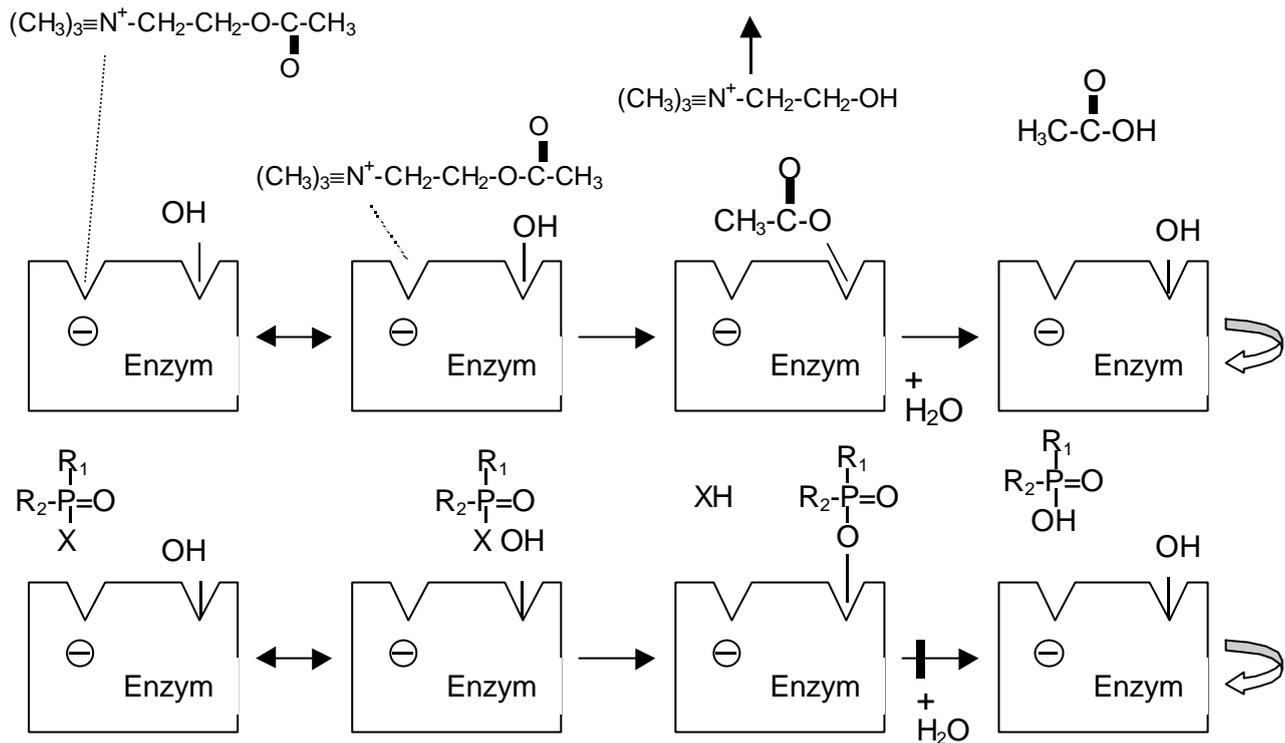


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Analogie der Mechanismen der ACh-Hydrolyse (obere Reihe) und der OP-Hemmung (untere Reihe).

sterischen Anordnung und Chiralität bestimmt. Je stärker die Elektrophilie des Phosphoratoms ausgeprägt ist, desto höher ist die Reaktionsgeschwindigkeit. Dementsprechend verringern Elektronendonatoren unter den Substituenten die Reaktionszeit (z. B. das Schwefelatom der Phosphorthionate Parathion und Malathion), während Elektronenakzeptoren diese verlängern (ALDRIDGE u. REINER 1972).

Im Unterschied zu den sogenannten direkten ChE-Inhibitoren wie Dichlorvos oder Trichlorphosphon durchlaufen viele OP im Organismus zunächst eine als Giftung bezeichnete metabolische Alteration bevor sie ihre inhibitorische Wirkung entfalten.

So erhalten die *in vitro* geringgradig toxischen Thiophosphate ihre hohe Reaktivität *in vivo* erst durch eine oxidative Desulfurierung durch mikrosomale Monooxygenasen. Aus dem *in vitro* relativ schwachen ChE-Inhibitor Parathion entsteht auf diese Weise der potente Enzymhemmer Paraoxon und aus Malathion das hochtoxische Malaoxon (ALDRIDGE u. BARNES 1952, MURPHY 1966). Die Giftung umfaßt allerdings nur einen geringen Prozentsatz der mannigfaltigen Reaktionen des

2.11 Reaktionswege OP- oder CA-inhibierter Cholinesterasen

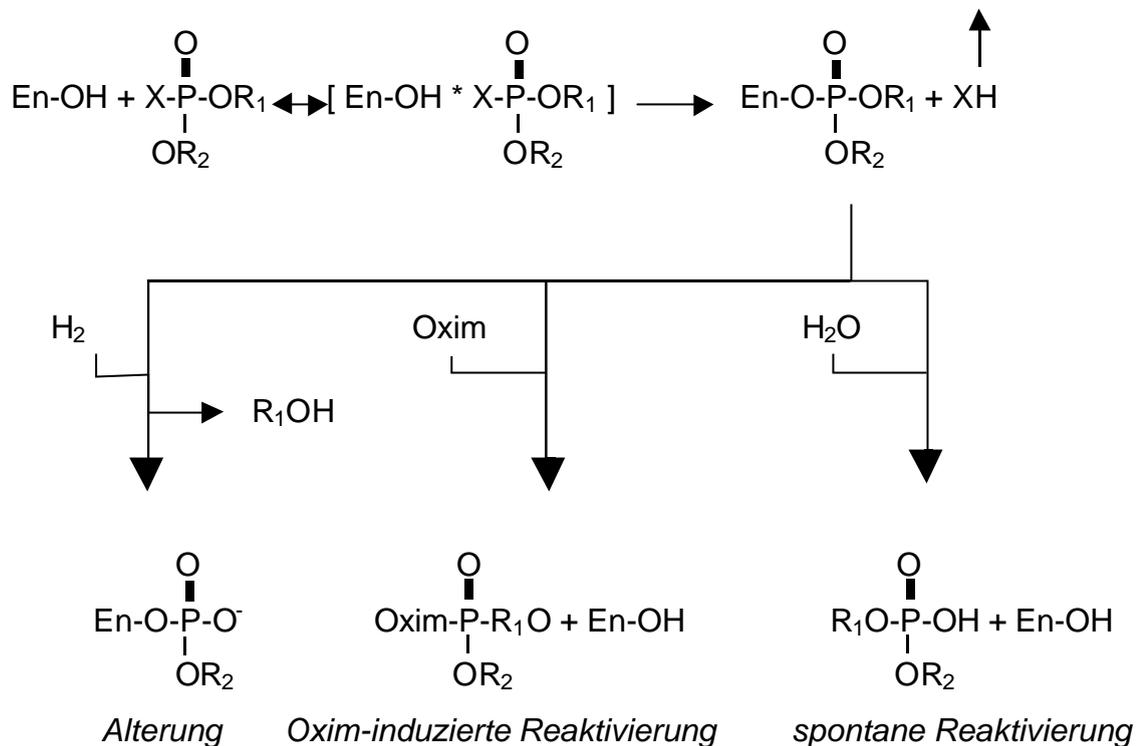


Abbildung 5: Alterung und Reaktivierung OP- gehemmter Cholinesterase. En= Enzym.

2.11.1 Alterung phosphorylierter Cholinesterasen

Bei OP-inhibierten Cholinesterasen gibt es das Phänomen einer progressiv sinkenden Reaktivierbarkeit (HOBBIGER 1956, BLABER u. CREASEY 1960). Dieser sogenannten „Alterung“ liegt, wie in Abb. 5 gezeigt, die Bildung einer sehr stabilen Phosphorylcholinesterase-Verbindung unter Abspaltung einer sekundären Alkylgruppe des zentralen Phosphoratoms zugrunde (FLEISHER u. HARRIS 1965, ETO 1974, SUN et al. 1979, SCHMIDT u. ZECH 1988). Die resultierende Monoalkyl-Phosphoryl-Cholinesterase ist refraktär gegen spontane oder induzierte Reaktivierungen, so daß ein Wiederanstieg der Enzymaktivität lediglich durch Totalabbau und Enzymneusynthese erfolgen kann (CHAMBERS 1992). Ein scheinbares Fehlen von Enzymreaktivierung kann jedoch auch bei hoher

Gewebekonzentration des Inhibitors auftreten, die zu einer sofortigen Reinhinhibition freier Enzyme führt (THOMPSON et al. 1991b). Die Geschwindigkeit der Alterungsreaktion phosphorylierter Cholinesterasen hängt von pH und Temperatur, in erster Linie aber von der Konfiguration der Alkylreste ab (BERRY u. DAVIES 1966). Während die in der Landwirtschaft eingesetzten OP Alterungsraten mit Halbwertszeiten von einigen Stunden oder länger aufweisen, sinkt die Reaktivierbarkeit der als chemische Kampfstoffe eingesetzten Substanzen innerhalb weniger Minuten (SCHMIDT u. ZECH 1988, WILSON et al. 1992). Mit Diethyl-OP (z. B. Parathion) phosphorylierte Cholinesterasen altern deutlich langsamer als mit Dimethyl- oder den hochtoxischen Diisopropyl-OP gehemmte Enzyme (MARTIN et al. 1981, SCHMIDT u. ZECH 1988, STANSLEY 1993, WOREK et al. 1997). Bei subletal vergifteten Chukarhühnern (*Alectoris chukar*) konnte eine Alterung der ZNS-AChE nach Dimethyl-OP-Exposition innerhalb weniger Stunden, nach Diethyl-OP-Verabreichung jedoch erst etwa 24 h später beobachtet werden. Eine Reaktivierbarkeit der ChE bei mit Parathion vergifteten Chukarhühner war dagegen 6 h, aber nicht mehr 24 h *p. appl.* möglich, so daß von einer Alterung des phosphorylierten Plasmaenzym zwischen beiden Zeitpunkten ausgegangen wurde (HOOPER 1988). Bei Vergiftung von Japanwachteln (*Coturnix japonica*) mit Isofenphos, welches eine Ethoxy- und eine Isopropylgruppe am zentralen P-Atom aufweist, konnte in derselben Studie kein Absinken der Reaktivierbarkeit der ZNS-AChE nach 7-tägiger Lagerung bei 20 °C festgestellt werden.

In vivo vollzieht sich die Enzymalterung generell langsamer als *in vitro*, da das an den Synapsen akkumulierte ACh mit dem OP um das aktive Zentrum der AChE konkurriert (WOREK et al. 1997).

Bei carbamylierten Enzymen tritt keine Alterung auf (WESTLAKE et al. 1981a).

2.11.2 Spontane Reaktivierung

Die Transphosphorylierungs- und Carbamylierungs-Reaktionen verlaufen in zwei Reaktionsschritten unter Bildung eines intermediären Enzym-Inhibitor-Komplexes.

Ein Wiederanstieg der Enzymaktivität kann dabei *in vitro* und *in vivo* ohne Einwirkung von reaktivierenden Oximen durch die sogenannte „spontane Reaktivierung“ erfolgen. Dabei kommt es zu einer Dissoziation des reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes oder einer Hydrolyse der kovalent gehemmten Esterase (Abb. 4 u. 5) (FAIRBROTHER et al. 1991).

In vivo ist davon auszugehen, daß sich die Prozesse der Alterung, Reaktivierung und Neusynthese parallel vollziehen (HOOPER 1988).

Organophosphate

Phosphorylierte Enzyme gleichen in Molekülstruktur und Stabilität den solitären OP, wobei die Esterase die Rolle der Abgangsgruppe einnimmt (ETO 1974). Ähnlich der metabolischen Zersetzung der OP kann auch die OP-Enzym-Verbindung durch eine nucleophile Verdrängungsreaktion gespalten werden. Bei der spontanen Hydrolyse ist der nucleophile Reagent Wasser.

Die spontane Reaktivierung phosphorylierter Cholinesterasen wird durch die Molekülstrukturen des OP und des Enzyms sowie von der Umgebungstemperatur beeinflusst (REINER u. ALDRIDGE 1967, LIESKE et al. 1990). Dabei dephosphorylieren Verbindungen mit Dimethyl-substituierten OP, wie dem Malathion, aufgrund der größeren Elektronegativität der Methylgruppen signifikant schneller als Verbindungen mit Diethyl- (z. B. Parathion) oder Diisopropyl-substituierten OP. Die größere Elektronegativität der Methylgruppen bedingt dabei eine höhere Elektropositivität des zentralen Phosphoratoms und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit einer hydrolytischen Reaktion (ETO 1974, CHAMBERS 1992).

Die Halbwertszeiten der spontanen Dephosphorylierung inhibierter Cholinesterasen liegen zwischen über 10 Minuten und 30 Tagen (ETO 1974, WILSON et al. 1992). Die ZNS-AChE von Japanwachteln (*Coturnix japonica*), die oral mit Parathion vergiftet worden waren, zeigten bei 20 °C Lagerung post mortem einen täglichen Aktivitätsanstieg von ca. 6% des Ausgangswertes. Bei Hühnern (*Gallus gallus dom.*) mit Paraoxonintoxikation lag sogar bereits nach dreistündiger Lagerung, bei Fasanen (*Phasianus colchicus*) mit Diazinonintoxikation nach zwölf tägiger Lagerung bei 20 °C eine signifikante Reaktivierung der ZNS-AChE vor (BUNYAN et al. 1968, HOOPER

1988). Chlorpyrifos-inhibierte ZNS-AChE und ChE von Staren (*Sturnus vulgaris*) wiesen nach 48 bzw 72 h Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ signifikante Aktivitätsanstiege auf (THOMPSON et al. 1991b).

Carbamate

Carbamylierte Cholinesterasen zeichnen sich im Vergleich zu phosphorylierten Enzymen generell durch eine geringere Stabilität und erheblich höherer Wahrscheinlichkeit einer hydrolytischen Spaltung aus. Die Geschwindigkeit der spontanen Decarbamylierung wird dabei von der Molekülstruktur des Inhibitors beeinflusst (HILL 1989a, FUKUTO 1990). So tritt bei Dimethyl-substituierten CA die spontane Reaktivierung im Vergleich zu den Monomethyl-substituierten signifikant später ein (MARTIN et al. 1981, DAWSON u. PORETSKI 1985, ROTENBERG et al. 1995).

Eine Verdünnung oder eine Temperaturerhöhung der Gewebe- oder Plasmaprobe *in vitro* beschleunigt den Wiederanstieg der Enzymaktivität. Der Verdünnungseffekt wird auf eine Verringerung der Wahrscheinlichkeit einer Inhibition oder Reinhhibition der Esterasen durch freie CA zurückgeführt (REINER u. ALDRIDGE 1967, HILL 1989a, STANSLEY 1993). Das gleiche Resultat kann auch durch Entfernung freier Inhibitormoleküle mit Hilfe laborintensiver Methoden wie Gelfiltration (REED u. FUKUTO 1973, MARTIN et al. 1981) erreicht werden. Bei sehr hohen Konzentrationen an freien CA-Molekülen kann eine spontane Reaktivierung vollständig ausbleiben (ALDRIDGE u. REINER 1972, MARTIN et al. 1981).

Bei dem photometrischen Meßvorgang zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität ist das Verdünnen und Erwärmen der Plasma- oder Gewebeproben notwendig. Die hohe Wahrscheinlichkeit einer spontanen Decarbamylierung schränkt dabei die Aussagefähigkeit der Meßergebnisse ein. HUNT u. HOOPER (1993) raten deshalb zum sorgsamem Umgang mit den zu messenden Proben. Dazu gehören eine Tiefgefrierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei längerfristiger Aufbewahrung der Probe, eine minimale Verdünnung vor der Messung, Zwischenlagerung auf Eis und Gebrauch von eiskaltem Puffer während der Probenvorbereitung.

Das Meßsubstrat, das mit dem Inhibitor um das aktive Zentrum des Enzyms

konkurriert, sowie eventuell noch weitere Komponenten des photometrischen Meßansatzes beeinflussen zusätzlich die Dissoziation von Inhibitor und Enzym (WINTERINGHAM u. FOWLER 1966, McQUEEN 1995, ROTENBERG et al. 1995). FAIRBROTHER et al. (1991) stellten fest, daß eine Unterscheidung von spontaner Reaktivierung und Reaktivierung durch Einfluß des Substrats im Meßansatz oftmals nur schwer möglich ist.

2.11.3 Oxim-induzierte Reaktivierung

Oxime und Organophosphate

Das Reaktionsprinzip einer Oxim-induzierten Reaktivierung phosphorylierter Cholinesterasen entspricht der in Kap. 2.11.2 beschriebenen spontanen Reaktivierung. Allerdings werden dazu nucleophile Reagentien wie Cholin, Imidazol, Hydroxylamin und vor allem Oxime eingesetzt, die allesamt diesbezüglich wesentlich stärker als Wasser wirken (Abb. 5) (WILSON 1952).

Die Oxim-induzierte Reaktivierung verläuft als basische Verdrängung des Phosphorylrests an dem anionischen Zentrum der Esterase. Das Enzym wird unter Bildung eines reversiblen Oximphosphats in seinem Ausgangszustand wiederhergestellt. Die Detoxifizierung des OP findet in einem zweiten Reaktionsschritt statt. Der OP-Rest wird von dem Oxim auf Wasser übertragen, wobei eine inaktive Alkylphosphorsäure entsteht (HEILBRONN 1965, ZECH et al. 1967).

Die Geschwindigkeit der Oxim-induzierten Reaktivierung differiert zwischen verschiedenen Inhibitormolekülen beträchtlich. Dimethyl-phosphorylierte Esterasen hydrolysieren signifikant langsamer als Diethyl-OP-inhibierte Enzyme (MARTIN et al. 1981, ROTENBERG et al. 1995). Enzyminhibitionen durch das Diethyl-OP Parathion zeigen mit Obidoxim eine leichtere Reaktivierbarkeit als bei mit Diazinon, Trichlorphon oder Malathion gehemmten Esterasen (ZECH et al. 1967, SCHMIDT u. ZECH 1988). Die Höhe der Enzymreaktivierung ist aber auch von der Oximkonzentration abhängig. Der Zeitbedarf für eine 50-prozentige Reaktivierung

menschlicher ZNS-AChE bei 37 °C beträgt bei einer Obidoximkonzentration von 10^{-6} mol/l 60 min, bei einer Konzentration von 10^{-3} mol/l jedoch nur 4 sec, bei der BChE entsprechend 130 Tage bzw. 3 h (SCHMIDT u. ZECH 1988).

Eine Reaktion zwischen Oximen und solitären OP konnte ebenso beschrieben werden (HACKLEY et al. 1959). In welchem Ausmaß diese Verbindungen *in vivo* auftreten, ist jedoch nicht bekannt (WILSON et al. 1992). Oximphosphate, die durch direkte Reaktion mit OP oder durch den ersten Reaktionsschritt der induzierten Reaktivierung auftreten können, weisen häufig eine höhere toxische Potenz als die ursprünglichen Phosphate auf. Das Oxim nimmt in diesen Verbindungen die Rolle der Abgangsgruppe ein. Oximphosphate sind jedoch instabil und zerfallen schnell in nicht toxische Verbindungen (WILSON u. GINSBURG 1955, HACKLEY et al. 1959, ERDMANN et al. 1966, ZECH et al. 1966, SCHOENE 1972, ETO 1974). Das Produkt aus Paraoxon und Obidoxim wirkt z. B. um ein 10-faches stärker anticholinerg als Paraoxon selbst (SCHOENE 1972).

Die alternativen Wirkungsweisen von Obidoxim, nämlich Reaktivierung oder zusätzliche Hemmung, hängen sowohl von der Oxim- als auch von der OP-Konzentration im Gewebe ab (ZECH et al. 1967).

Oxime und Carbamate

Auch CA-Enzym-Verbindungen sind durch Oxim-Einwirkung reaktivierbar (Kap. 2.16.3). Der Reaktionsverlauf ist jedoch unbekannt. Im Analogieschluß zur OP-Vergiftung wird vermutet, daß das nucleophile Oxim den Inhibitor am aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt. Daneben wird eine allosterische Beeinflussung des Enzyms durch die Oxime diskutiert, da auch Oxim-ähnliche Moleküle ohne nucleophile Gruppe die Decarbamylierung beschleunigen können (DAWSON u. PORETSKI 1985).

Eine Oximeinwirkung auf Carbaryl-inhibierte Cholinesterase führt zu einer Toxizitätsverstärkung, wobei der zugrunde liegende Mechanismus ungeklärt ist (Kap. 2.20.2.1). Sicher ist jedoch, daß sich hier kein carbamyliertes Oxim bildet. Vermutlich besteht eine allosterische Beeinflussung der Enzym-Carbaryl-Verbindung (HARRIS et al. 1989, LIESKE et al. 1992).

Eigenhemmung der Oxime

In hohen Konzentrationen bewirken alle Oxime eine Inhibierung des Substratumsatzes der Cholinesterasen. Dieser Vorgang wird als "Eigenhemmung der Oxime" bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine reversible, nicht kovalente Enzymhemmung, die *in vitro* durch Verdünnung des Hemmansatzes aufgehoben werden kann (HOBBIGER 1960, ZECH et al. 1967, ZECH et al. 1969).

2.12 Neusynthese der Cholinesterasen

Bei gezielter Hemmung der AChE in Embryo-Muskelzellkulturen der Japanwachtel (*Coturnix japonica*) durch kurzzeitige Exposition mit einem OP konnte innerhalb von Stunden intrazellulär und wenige Stunden später auch extrazellulär ein Wiederanstieg der Enzymaktivität beobachtet werden, der jedoch bei spezifischer Hemmung der zellulären Proteinsynthese ausblieb (WILSON u. NIEBERG 1983). Die *in vivo* AChE-Neusynthese läuft gleichartig ab, nimmt allerdings Tage bis Wochen in Anspruch (SUNG u. RUFF 1987, WILSON et al. 1992). Reaktivierungsraten der ZNS-AChE zeigen in der ersten Woche nach der Exposition mit OP einen biphasischen Verlauf, der auf eine gleichzeitig verlaufende Neusynthese und Reaktivierung hindeutet (BLABER u. CREASEY 1960).

Für intrazelluläre AChE-Moleküle konnte mit Hilfe von Zellkulturstudien eine Halbwertszeit von 2 bis 3 h festgestellt werden. An der Oberfläche der Zellen lokalisierte AChE, die außerhalb des Einflusses von zellulären Proteasen ist, beträgt die Halbwertszeit mehrere Tagen (BULGER et al. 1982, WILSON u. NIEBERG 1983).

Vergleichbare Studien existieren für die Serumenzyme nicht. BChE und ZNS-AChE zeigen aber *in vivo* zeitversetzte Aktivitätsanstiege nach OP-Intoxikationen. Die Wiederherstellung der Ausgangsaktivität des Plasmaenzyms dauert wenige, die der ZNS-AChE dagegen bis zu 100 Tagen und mehr (LUDKE et al. 1975, FLEMING 1981, HOLMES u. BOAG 1990, HENDERSON et al. 1994). Eine BChE-Neusynthese innerhalb weniger Tage konnte auch in klinisch-blutchemischen Untersuchungen an

Großpapageien nachgewiesen werden. Das in den Hepatozyten synthetisierte Plasmaenzym gilt beim Vogel als Parameter für die Lebersyntheseleistung. Eine irreversible Erniedrigung der BChE-Aktivität tritt bei hochgradigen Hepatopathien und ein nur temporärer Aktivitätsabfall bei katabolen Stoffwechsellagen auf. Im letzteren Fall kann durch kausale und palliative Therapie eine Verbesserung des Allgemeinzustands und damit der hepatischen Proteinsyntheseleistung erreicht werden, die dann zu einem Aktivitätsanstieg der BChE innerhalb weniger Tage führt (ZINKE et al. 1999b).

2.13 Metabolischer Abbau der OP und CA

Der metabolische Abbau anticholinergischer Substanzen geschieht hauptsächlich in Leber und Niere und ist bei Vögeln und Säugetieren gleichartig. Die dafür notwendigen Biotransformationsprozesse sind primär oxidative, reduktive und hydrolytische Reaktionen, an denen das Cytochrom P 450-abhängige Monooxygenase-System, Glutathion-Transferase-Enzyme, A-Esterasen (z. B. Paraoxonase) und B-Esterasen (z. B. Carboxylesterase [CbE]) beteiligt sind (ETO 1974, FUKUTO 1990, CHAMBERS 1992).

Die Entgiftungsmechanismen des Organismus bedingen *in vivo* eine niedrigere toxische Potenz der OP als nach Versuchen mit isolierten Cholinesterasen *in vitro* eigentlich anzunehmen wäre (REINER et al. 1989, CHAMBERS 1992). Verschiedene Spezies weisen jedoch eine unterschiedliche Anzahl OP-spaltender Enzyme auf. Bei omnivoren und herbivoren konnte so eine wesentlich höhere CbE-Aktivität nachgewiesen werden als bei carnivoren Vogelarten (THOMPSON et al. 1991a).

Ein Absinken der Gewebe-OP-Konzentrationen durch enzymatischen Abbau, Bindung an Zielproteine und Exkretion ist stoff- und artspezifisch (ZECH u. ZÜRCHER 1974). HENDERSON et al. (1994) vermuten bei Vögeln eine Elimination der OP innerhalb von Stunden. Bei insektiziden CA wird generell von einer kurzen Halbwertszeit und einer schnellen Exkretion aus dem Organismus ausgegangen

(KUHR u. DOROUGH 1976).

2.14 Auswirkung der Applikationsform und der Pestizidformulierung auf die Toxizität von OP und CA

Die Aufnahme von OP und CA in den Körper ist abhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Hemmstoffe und der Art der Exposition.

Für Wildvögel wird vornehmlich die orale Pestizidaufnahme mit kontaminiertem Futter oder Wasser angenommen (GRUE et al. 1983). In der Mehrzahl der wissenschaftlichen Studien und den Risikoanalysen der staatlichen Zulassungsverfahren werden deshalb diese Applikationsform eingesetzt. Das Ausmaß einer oralen Vergiftung hängt auch von der Pestizidformulierung ab. Eine relativ hohe Toxizität weisen z. B. emulsionsfähige Konzentrate auf (HILL 1992).

Die Aufnahme von Pestiziden oder Ektoparasitika ist aber auch dermal, aerogen oder sekundär oral bei der Gefiederpflege möglich (DRIVER et al. 1991). Auch eine primär perkutane Intoxikation konnte als Vergiftungsursache bei Vögeln in der freien Wildbahn nachgewiesen werden (HUDSON et al. 1979, FOWLE 1972, SMITH et al. 1986). OP wie Parathion oder Fenthion fanden zudem über viele Jahre Anwendung als dermale Avizide (POPE u. WARD 1972). Diese zumeist stark lipophilen Substanzen können die oberflächlichen Zellschichten der äußeren Haut und der Schleimhäute schnell penetrieren. Über das Ausmaß der perkutanen Pestizidaufnahme beim Vogel ist allerdings wenig bekannt (CISSON u. WILSON 1983, DRIVER et al. 1991, HENDERSON et al. 1994). Verschiedene Untersuchungen lassen aber vermuten, daß die äußere Haut eine weitaus effektivere Barriere bei CA- als bei OP-Vergiftungen darstellt (SCHAFER et al. 1973, HUDSON et al. 1979, HILL 1995).

Perkutane OP/CA-Intoxikationen stehen im Verdacht hauptsächlich chronisch-protrahierte Vergiftungen herbeizuführen. Als Ursache der verzögerten, aber langanhaltenden OP-Wirkung nach dermalen Applikation wird ein Persistieren der lipophilen Chemikalien auf der äußeren Haut oder in körpereigenen Fettdepots

diskutiert (DRIVER et al. 1991, HENDERSON et al. 1994).

HENDERSON et al. (1994) verglichen den Verlauf von Inhibition und Reaktivierung der ChE bei Tauben (*Columba livia dom.*) nach dermalen und oraler Verabreichung von Parathion, Diazinon und Methidation. Die perkutane Vergiftung führte im Unterschied zur oralen Intoxikation erst nach einer deutlichen zeitlichen Verzögerung zu ersten klinischen Symptomen (ca. 1 bis 2 Tage *p. appl.*) und nach weiterer Verzögerung von 3 bis 4 Tagen und ca. 100-facher Dosiserhöhung zu Todesfällen.

Die ChE-Aktivität erreichte bei dermalen Exposition erst 24 h *p. appl.* ihren tiefsten Wert (< 10% der Ausgangsaktivität), der allerdings dosisabhängig bis zu 14 Tagen anhielt und sich erst nach 5 bis 42 Tagen normalisierte.

DRIVER et al. (1991) zeigten in Untersuchungen an Virginiawachteln (*Colinus virginianus*), daß eine orale Intoxikation durch das Putzen Pestizid-benetzen Gefieders der Belastung durch Aufnahme von vergiftetem Futter oder Wasser gleichzusetzen ist. Die Verfasser vermuten, daß das Lösen der lipophilen toxischen Substanzen im Bürzeldrüsensekret eine zusätzliche Erhöhung die Giftaufnahme bedingt.

Die von DRIVER et al. (1991) beobachtete aerogene Pestizidaufnahme beträgt quantitativ nur ca. 1:300 der perkutanen Belastung. Wegen der sehr schnellen Absorption in der Lunge und der Möglichkeit von toxizitätssteigernden photochemischen Reaktionen der Aerosole in der Luft ist aber auch diese Form der Pestizidaufnahme von Bedeutung (SEIBER u. WOODROW 1984).

Das Gefährdungspotential von Agrochemikalien für Wildvögel ist zusätzlich abhängig von der Formulierung und der Wirkstoffkonzentration der ausgebrachten Pestizidpartikel sowie Umweltfaktoren wie Witterung oder Bodenfeuchte (HILL u. CARMASESE 1984, BEST u. FISCHER 1992, STAFFORD u. BEST 1997).

2.15 Einfluß biologischer Faktoren auf die Pestizidsensibilität der Vögel

CA und OP weisen für Vögel eine hohe bis sehr hohe Toxizität auf. Die LD₅₀-Werte liegen bei den meisten Wirkstoffen zwischen 1 und 100 mg/kg KM und übersteigen

damit die letalen Dosen für Säugetiere um ein vielfaches (SCHAFER et al. 1983, SMITH 1987). Die Ursache der erheblich höheren Pestizidsensibilität der Vögel liegt vermutlich in einer um das 10- bis 100-fache geringeren Aktivität der OP- und CA-hydrolysierenden A-Esterasen und einer relativ niedrigen OP-Affinität dieser Enzymklasse (MACKNESS et al. 1987, RATTNER u. FAIRBROTHER 1991, WALKER u. THOMPSON 1991).

In Vergleichstudien konnten außerdem erhebliche artspezifische Differenzen der Pestizid-Sensibilitäten der Vögel festgestellt werden, bei denen bis zu 60-fache LD₅₀-Unterschiede auftraten (TUCKER u. HAEGELE 1971, SCHAFER et al. 1983, HILL 1995). Interspezifisch variierende Aktivitäten der metabolisierenden Enzyme und deren unterschiedliche Pestizid-Affinitäten werden hierfür verantwortlich gemacht (THOMPSON 1993). Die relative Toxizität, also die Reihenfolge der LD₅₀-Werte der einzelnen Substanzen, gleicht sich dagegen Vogelart übergreifend (HILL 1995).

Altersabhängige Unterschiede der Pestizidsensibilität konnten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen adulten und wenige Tage alten Singvögeln zeigte sich eine 2- bis 100-fach erhöhte Sensibilität in der Juvenilität (GRUE u. HUNTER 1984, FARAGE-ELAWAR et al. 1988). Man führt das darauf zurück, daß in den ersten Lebenstagen noch keine vollständig entwickelten organischen Entgiftungsmechanismen und vermutlich auch geringere relative Mengen von ZNS-AChE sowie eine schwächer ausgeprägte Blut-Hirn-Schranke als bei adulten Vögeln existieren (BOLTON 1976, HILL 1995).

Die hepatischen Enzymsysteme, die für die endogene Giftung der meisten OP und die Detoxifizierung aller anticholinergischer Substanzen zuständig sind, entwickeln sich erst im Verlauf der Nestlingsperiode. Die LD₅₀-Werte der einer metabolischen Giftung unterliegenden OP sinken dementsprechend von den ersten Lebenstagen zu den folgenden Wochen ab und steigen ca. 6 Monaten später wieder an. Bei den direkt wirkenden OP und CA steigen dagegen die LD₅₀-Werte im Verlauf der Nestlingsentwicklung an (HUDSON et al. 1972, FARAGE-ELAWAR et al. 1988, HILL 1995).

Ein Geschlechtsunterschied in Bezug auf die LD₅₀ von Pestiziden besteht vermutlich

ausschließlich während der Brutsaison, in der bei weiblichen Tieren eine erhöhte Sensibilität beobachtet wurde (HUDSON et al. 1972, HILL 1995).

RATTNER und GRUE (1990) untersuchten den Effekt der Jahreszeiten auf die akute Toxizität von Parathion für Stare (*Sturnus vulgaris*) und fanden dabei keine signifikanten Unterschiede der LD₅₀ und der Krankheitsbilder. Einen signifikanten Einfluß der Jahreszeit und der Außentemperatur konnten dagegen für andere Wildvögel wie Graugänse (*Anser Anser*) oder Beifußhühner (*Centrocercus urophasianus*) und Labornager gezeigt werden. Als Ursachen der erhöhten Toxizität von OP bei extremen Klimabedingungen werden dabei Veränderungen der Pestizidabsorption und -metabolisierung, individuelle Kondition sowie Beeinträchtigung der Thermoregulation diskutiert.

2.16 Pathophysiologie und klinische Symptomatik der OP- und CA-Intoxikationen bei Vögeln

Bei Vögeln und Säugetieren gleichen sich die pathophysiologischen Vorgänge und Symptomkomplexe artübergreifend (HILL 1995).

Aus der Inhibition der nervenassoziierten Cholinesterasen resultiert eine Einschränkung der ACh-Spaltung mit unphysiologischer Persistenz und Akkumulation des Neurotransmitters in den Synapsen und neuromuskulären Endplatten. Ein einzelnes präsynaptisches Signal führt dann zu einer anhaltenden De- oder Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. Bei sehr hohen ACh-Konzentrationen tritt hingegen ein entgegengesetzter Effekt mit Depolarisationsblockade und damit Unterbrechung der Impulsfortleitung der Nervenzellen auf. Die muscarinergen Rezeptoren, die u.a. in den postsynaptischen parasympathischen Synapsen lokalisiert sind, reagieren auf die Anwesenheit von ACh wesentlich empfindlicher als die nikotinartigen Rezeptoren des Nervensystems. Deshalb werden erste klinische Symptome zumeist durch Störungen des ZNS und der parasympathisch innervierten Organe bedingt, z. B. durch gesteigerte Tätigkeit der sekretorischen Drüsen und der glatten Muskulatur.

Die primäre zentrale anticholinerge Wirkung ist eine Depression der Kreislauf- und Atmung kontrollierenden Hirnareale. Die Auswirkungen auf das autonome Nervensystem sind dagegen bedeutend komplexer, da sowohl sympathische als auch parasympathische Anteile der ganglionären Synapsen betroffen sind. So können beispielsweise sowohl Tachykardie wie Bradykardie, Fibrillation oder Herzstillstand beobachtet werden (CHAMBERS 1992).

Bei den OP-Vergiftungen der Vögel treten in der Regel ausgeprägtere und länger anhaltende Symptomenkomplexe auf als bei CA-Intoxikationen (HILL u. CARMADSE 1984). Akute Verläufe führen zu deutlicheren Ausprägungen als bei subakuten Intoxikationen (HILL 1995).

In einer Reihe von Untersuchungen wurden z.T unterschiedliche klinische Bilder bei mit OP oder CA vergifteten Vögeln berichtet (SHLOSBERG 1976, MENDELSSOHN u. PAZ 1977, REECE 1982, RITCHIE 1987, HOOPER et al. 1989, MOHAN 1990, PORTER 1992, LA BONDE 1992). Die Verschiedenheiten ergaben sich aus der unterschiedlichen Dosis, Aufnahme route, Resorption und Verteilung der ChE-Hemmstoffe in den Körperkompartimenten einerseits sowie aus Tierartspezifität und Komplexität des Nervensystems andererseits.

Als Symptome einer akuten anticholinergen Vergiftung können neben Anorexie, allgemeiner Schwäche, Ataxie und Salivation auch Unruhe, gestäubtes Gefieder, Diarrhoe, Vomitus, Kropfstase, spastischer Prolaps membranae nictitans, Flügelzucken, Opisthotonus und herabhängende oder gespreizte Flügel auftreten. In fortgeschrittenen Stadien konnten überdies Dyspnoe mit rasselnden Atemgeräuschen und Bradykardie, in hochgradigen Fällen auch eine ausgeprägte Beteiligung des motorischen Nervensystems mit tonisch-klonischen Krämpfen, tetanischen oder schlaffen Paresen beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Säugetieren stellt die Miosis jedoch kein vordringliches Symptom dar (LA BONDE 1988 u. 1991, WERNER 1992, DUMONCEAUX u. HARRISON 1994, KUMMERFELD 1998b).

Bei Greifvögeln treten als Leitsymptom einer OP- oder CA-Vergiftung neben Ataxie, Nickhautvorfall und Flugunfähigkeit häufig eine starre Lähmung mit fest geschlossenen Klauen, hoher Atemfrequenz und Hypersalivation bei meist gutem

Ernährungszustand auf; nur gelegentlich beobachtet man Konvulsionen. Durch häufig zusätzlich bestehende traumatische Schäden besteht dabei die Gefahr der Vernachlässigung einer eingehenden Vergiftungsdiagnostik (PORTER u. SNEAD 1990).

Nach experimenteller oraler und perkutaner Parathion-Vergiftung von Tauben (*Columba livia dom.*) in verschiedenen Dosierungen beschrieben HENDERSON et al. (1994) dosisabhängige und innerhalb von 30 min nach oraler Applikation auftretende Symptome. Sie reichten von Symptomlosigkeit, geringgradigen Veränderungen wie Somnolenz, Trägheit und Beinschwäche bis hin zu Dyspnoe, Hypersalivation und Konvulsionen. Bei dermalen Applikation zeigten die Tauben trotz eines über mehrere Tage anhaltend niedrigen BChE-Aktivitätslevels (<10% der Ausgangsaktivität) nur eine milde Symptomatik.

Verlaufen akute OP-Vergiftungen tödlich, so ist der Exitus letalis bei Dosierungen über dem spezifischen LD₅₀-Wert zwischen 10 und 30 min *p. appl.* bzw. bei niedrigerer Toxinmenge zwischen 30 min und 6 h *p. appl.* zu erwarten. Verlaufen CA-Intoxikationen letal, so tritt der Tod bereits nach 5 bis 30 min ein (HILL u. CARMADSE 1984).

Aus der Humanmedizin ist bekannt, daß das Auftreten von Symptomen nicht von der absoluten Aktivität des inhibierten Enzyms, sondern von der Geschwindigkeit des Aktivitätsabfalls abhängt (TRUNDLE u. MARCIAL 1988). Eine chronische Verabreichung von OP in niedrigen Dosen kann trotz annäherndem Erlöschen der ChE-Aktivität ohne tödlichen Ausgang bleiben, während eine akute Intoxikation mit rapidem, aber nicht vollständigem Abfall der Enzymaktivität zu einem schnellen Exitus letalis führt (ELLIN 1981).

Die toxische Wirkung von OP bei chronischen Vergiftungen ist sehr unterschiedlich. In 30-tägigen Versuchen mit Stockenten (*Anas platyrhynchos*) und Fasanen (*Phasianus colchicus*) waren einige Verbindungen bereits letal, wenn die tägliche Dosis nur 1/20 – 1/30 der LD₅₀ entsprach, während bei anderen Wirkstoffen die ca. 1½-fache LD₅₀ erforderlich war (HUDSON et al. 1984).

Die primäre Todesursache bei OP und CA-Vergiftungen ist Atemstillstand und Herz-Kreislauf-Versagen aufgrund einer Lähmung des Atemzentrums und der

Interkostalmuskulatur sowie hochgradiger muköser Sekretion, Bronchokonstriktion und Lungenödem (HOOPER 1988, PORTER u. SNEAD 1990, MOHAN 1990, LA BONDE 1992).

Da trotz einer deutlichen Reaktivierung oder nur mäßigen Inhibition der Cholinesterasen häufig verzögert der Tod eintritt, vermuten HOLMES und BOAG (1990) jedoch noch andere letale Mechanismen der Vergiftung. Als weitere Todesursachen werden Verhungern trotz Futterangebot (POPE u. WARD 1972) und Erniedrigung der Körpertemperatur durch insuffiziente Thermoregulation (HOLMES u. BOAG 1990, HILL 1995) diskutiert. In einer Untersuchung von RATTNER und FRANSON (1984) zeigten Vögel mit einer Inhibition der ChE- und ZNS-AChE-Aktivität von über 50 % einen zur Höhe der Enzymhemmung proportional abfallende Körperkerntemperatur. Bei Wildvögeln können überdies als Folgen subletaler Vergiftungen veränderte Aktivitätsmuster mit z. B. Verlust der Fluchtreaktionen oder mangelhafter Versorgung der Brut auftreten und damit zu sekundären Tierverlusten führen (BUERGER et al. 1985, GRUE et al. 1991, HART 1993).

2.17 Nervenassoziierte AChE-Inhibitions-unabhängige toxische Effekte

Einige OP können einen neurologischen Symptomkomplex bei Säugetieren und Vögeln auslösen, der im anglo-amerikanischen Schrifttum „OP induced delayed neurotoxicity“ [OPIDN] genannt wird. Im Vordergrund steht dabei 6 bis 14 Tage nach der Giftaufnahme die schlaffe Lähmung der hinteren Extremitäten. Histopathologisch zeigen sich irreversible Nervenschädigungen in Form von symmetrischen, primären, axonalen Degenerationen mit nachfolgender Demyelinisierung vor allem im Bereich der Medulla oblongata, des Rückenmarks und des Nervus ischiadicus (ABOU-DONIA 1981, CISSON u. WILSON 1983, FARAGE-ELAWAR u. FRANCIS 1987).

Als zentraler pathogenetischer Mechanismus wird die irreversible Hemmung eines NTE (neuropathy target enzyme) genannten Proteins angesehen. Das verzögerte neurotoxische Syndrom kann nur durch solche OP ausgelöst werden, die eine der

Alterung unterliegenden Komplexbildung mit dem NTE zeigen. Dieses Protein kann verschiedene Ester hydrolysieren, wird aber nicht zu den Esterasen gezählt. Die Bedeutung des NTE für den Organismus ist allerdings noch nicht vollständig bekannt (CHEMNITIUS et al. 1983, SCHMIDT u. ZECH 1988).

Es besteht eine unterschiedliche Sensitivität verschiedener Tierarten und Altersstufen gegenüber OPIDN auslösende OP. Als prädisponierender Faktor für die Entwicklung dieses Krankheitsbilds wird eine perkutane Giftaufnahme diskutiert (ABOU-DONIA u. NORMEIR 1986).

Das klassische Versuchstiermodell für Untersuchungen der OPIDN ist die Vergiftung des Huhns (*Gallus gallus dom.*). Nach einer einmaligen Applikation einer neurotoxischen OP-Verbindung tritt mit 10- bis 14-tägiger Latenz regelmäßig und reproduzierbar ein Vergiftungsbild auf, das durch Ataxien mit Standschwäche und Gangunsicherheit gekennzeichnet ist (CHEMNITIUS et al. 1983).

Als weiteren toxischen Effekt der OP wird Kanzerogenität diskutiert. Verschiedene Tierversuche ergaben Hinweise auf eine Modulierung der AChE-Gen-Expression bei OP-Intoxikationen (McQUEEN 1995).

Außerdem existiert eine durch Hühnereibeimpfung reproduzierbare, vermutlich durch ChE-Hemmung induzierte Teratogenität vieler OP. Diese kann u.a zu einer erhöhten Sterblichkeit bei verminderter Körpergröße und Skelettdeformationen der Nestlinge führen (KITOS et al. 1981, MISAWA et al. 1981, MOHAN 1990, OLSEN et al. 1990).

2.18 Dosis und Verlauf der experimentellen Parathion- und Carbofuranintoxikationen bei der Taube.

Die akute letale Dosis (LD_{50}) beträgt für die Parathionvergiftung der Tauben unabhängig vom Geschlecht 2,52 mg/kg KM (HUDSON et al. 1984) bzw. 1,33 mg/kg KM (SCHAFER et al. 1983). Die inhibitorische Dosis (ID_{50}) beträgt 0,6 mg/kg KM (HENDERSON et al. 1994).

Für Carbofuran wurde eine akute LD_{50} von 1.33 mg/kg KM ermittelt (SCHAFER et al. 1983).

2.19 Diagnostik der OP- und CA-Vergiftungen bei Vögeln

Bei Vergiftungen von Vögeln mit OP oder CA basiert die Diagnostik auf der Anamnese, der klinischen Untersuchung und dem Nachweis der toxischen Substanz bzw. der spezifischen Enzyminhibition.

Vorbericht und Symptomatik können zu einer Verdachtsdiagnose führen, die eine umgehende und u.U. lebenserhaltende Atropintherapie (Kap. 2.20.1) rechtfertigt (LA BONDE 1991, DUMONCEAUX u. HARRISON 1994). Aufgrund des unspezifischen klinischen Bildes einer OP- oder CA-Vergiftung bei Ziervögeln gilt jedoch die allein auf der klinischen Untersuchung basierende Diagnosestellung als problematisch (MOHAN 1990). Als weiterführende Untersuchung bietet sich aber die Messung der Cholinesteraseaktivität in ZNS-Gewebehomogenisat- oder Plasmaproben an.

Zum postmortalen Vergiftungsnachweis wird die photometrische Messung der ZNS-AChE-Aktivität routinemäßig eingesetzt. Der allgemein anerkannte diagnostische Schwellenwert für eine Vergiftung mit OP oder CA liegt bei einer Aktivität unter 50 % des spezifischen Vergleichswerts der ZNS-AChE (BUNYAN u. TAYLOR 1966, BUNYAN et al. 1968, LUDKE et al. 1975, BUNYAN u. JENNINGS 1976, HILL u. FLEMING 1982, STANLEY 1993, FAIRBROTHER 1996). Wegen der hohen individuellen Enzymaktivitätsschwankungen und beim Fehlen geeigneter Referenzwerte kamen als Grenzwerte aber auch die zweifachen Standardabweichungen parallel gemessener Kontrollwerte gesunder Artgenossen zum Einsatz. Bei autolytischer und/oder bakterieller Zersetzung der ZNS-AChE können allerdings falsch positive Enzyminhibitionen diagnostiziert werden (LUDKE et al. 1975, ZINKL et al. 1980, McINNIS et al. 1996).

Obwohl eine direkte Beziehung zwischen der Hemmung der nervenassoziierten Cholinesterasen und der Letalität angenommen wird, variieren die absoluten ZNS-AChE-Inhibitionen der nach OP- oder CA-Intoxikationen verendeten Vögel erheblich (HILL 1995). Bei Zebrafinken (*Poephila guttata*), die nach oraler Fenitrothion-Belastung verendeten, wurde z. B. ZNS-AChE-Hemmungen zwischen 3 und 84 % der Ausgangsaktivität gemessen (HOLMES u. BOAG 1990). Das Überleben einer ZNS-AChE-Hemmung von über 50 % der Ausgangsaktivität, wie es bei Labortieren

häufig der Fall ist, wird bei Wildvögeln bezweifelt (GRUE et al. 1991).

Die Plasmaenzym-Messung eignet sich zum schnellen, sensitiven und intra vitam einsetzbaren Vergiftungsnachweis. Die Inhibition der ChE vollzieht sich schneller und stärker als bei der ZNS-AChE (LUDKE et al. 1975, HOOPER et al. 1989, SOLER-RODRIGUEZ et al. 1998). So kann eine 75-prozentige Hemmung der ChE bereits bei einer Toxindosis erfolgen, die lediglich eine 10- bis 20-prozentige Inhibition der ZNS-AChE bewirkt (WESTLAKE et al. 1981a,b). Eine Unterschreitung der ChE-Aktivität parallel gemessener Kontrollwerte gesunder Artgenossen um die doppelte Standardabweichung gilt auch hier als positiver Nachweis (HILL u. FLEMING 1982, WILSON et al. 1992, McINNES et al. 1996).

Bei oraler Giftaufnahme konnte eine lineare Beziehung zwischen der OP-Konzentration und der ChE-Hemmung gezeigt werden (DIETER 1974, WESTLAKE et al. 1981b). Nach einmaliger Inhibitorapplikation findet dabei innerhalb von wenigen Tagen eine Wiederherstellung der Ausgangsaktivität der ChE statt, während eine Inhibition der ZNS-AChE über Wochen persistieren kann (FLEMING u. GRUE 1981, WESTLAKE et al. 1981a,b, HENDERSON et al. 1994, SOLER-RODRIGUEZ et al. 1998). Die sichere Erkennung einer subletalen, z. B. durch chronische Pestizidbelastung hervorgerufenen Intoxikation ist jedoch aufgrund der schnellen Metabolisierung der Giftstoffe und der biologischen Variabilität der ChE-Aktivität nur selten möglich (LUDKE et al. 1975, FAIRBROTHER et al. 1989, HOLMES u. BOAG 1990).

Als Nachteil der diagnostischen Enzymmessung wird der Bedarf an zumindest art- und methodikspezifischen Orientierungswerten angesehen. Nur für wenige Vogelspezies wurden bisher spezifische Referenzbereiche erstellt. In KIESAU (1997) und KIESAU und KUMMERFELD (1998) sind z. B. Referenzwerte der ZNS-AChE und ChE von einigen Großpapageien und europäischen Wildvögeln aufgeführt. Die parallele Messung von Vergleichsproben ist vor allem bei seltenen und geschützten Arten problematisch (LA BONDE 1991, MARDEN et al. 1994). Zusätzlich besteht bei Enzymmessungen nach CA-Intoxikationen wegen der geringen Stabilität der carbamylierten Cholinesterasen generell die Gefahr falsch negativer Diagnosen (HILL 1989a, HUNT et al. 1995).

Hochgradig erniedrigte ChE-Aktivitäten treten zudem nicht nur bei Vergiftungen mit Cholinesterasehemmstoffen auf, sondern auch bei Leberinsuffizienz mit Einschränkung der Enzymsynthese (RATTNER u. FAIRBROTHER 1991, ZINKE et al. 1999a).

Eine von spezifischen Referenzwerten unabhängige Nachweismethode einer OP- oder CA-Vergiftung ist jedoch die physikalische oder chemische Reaktivierung des inhibierten Enzyms *in vitro*, die in Kapitel 2.19.1 näher besprochen wird.

Eine hohe Aussagekraft ohne artspezifische Vergleichswerte bietet auch die Bestimmung des Verhältnisses der ZNS-AChE-Aktivität zu der Dichte der muscarinergen Rezeptoren im Gehirn. Mit Hilfe dieser Methode konnte bei der Chlorpyrifos-Vergiftungen von Vögeln eine Sensitivität von 98 % und eine Spezifität von 99 % erreicht werden (BURN u. LEIGHTON 1996).

Eine Verifizierung der enzymologischen Vergiftungsdiagnose kann durch chemische Giftanalyse aus Futter, Inhalt von Kropf- und unterem Verdauungstrakt, Haut, Federn oder Körperfett erreicht werden. Eine solche, z. B. mit Hilfe der Gaschromatographie oder Spektrophotometrie durchführbare Messung ist jedoch zeit- und kostenaufwendig, so daß eine vorherige Cholinesterase-Aktivitätsmessung zur Eingrenzung der möglichen Substanzen anzuraten ist (MARTIN et al. 1981, STANSLEY 1993, SMITH et al. 1995). Die aufgrund der schnellen Metabolisierung und Ausscheidung geringe Akkumulation der OP oder CA im Organismus bedingt jedoch häufig falsch negative Ergebnisse (LUDKE et al. 1975, HILL u. FLEMING 1982). Bei hohen Pestizidkonzentrationen, z. B. in Ködern, ist dieser Nachweis dagegen Erfolg versprechend (BAUM 1986). Eine Detektion und Identifikation toxischer Substanzen und deren Metaboliten in Blut, Urin oder Cerebrospinal-Flüssigkeit ist möglich, aber schwierig und zeitaufwendig (ROTENBERG et al. 1995).

Bei der makroskopischen und histologischen, pathomorphologischen Untersuchung der an OP- oder CA-Vergiftungen gestorbenen Tiere sind keine charakteristischen Befunde zu erheben (REECE 1982, MOHAN 1990, SOLER-RODRIGUEZ 1998). Hilfreich kann allerdings die Begutachtung des Kropf- oder Mageninhalts, z. B. bei Aufnahme von farbig gebeiztem Saatgut oder ausgelegten Ködern sein (TATARUCH et al. 1998).

2.19.1 Diagnostische Reaktivierung

Die Diagnose von OP- oder CA-Vergiftungen kann *in vitro* durch Verlaufsmessungen der Cholinesterase-Aktivität in einer Plasma- oder ZNS-Gewebe-Probe gestellt werden. Ein dabei infolge spontaner oder Oxim-induzierter Hydrolyse nachgewiesener, signifikanter Anstieg der Enzymaktivität gilt als Beweis einer Vergiftung mit Cholinesteraseinhibitoren. Diese Methode ist unabhängig von vogelart- und laborspezifischen Referenzwerten und kann selbst dann aussagekräftig sein, wenn aus einer geringgradigen ChE-Inhibition keine absolute Unterschreitung des spezifischen Referenzbereichs resultiert (KUCERA 1987, HOOPER 1988, McINNIS et al. 1996).

Zur Oxim-induzierten Reaktivierung können die als Therapeutika kommerziell erhältlichen Präparate Obidoxim (Toxogonin[®], Merck, Deutschland, Darmstadt) oder Pralidoxim (Protopam[®], Wyeth-Ayerst, USA, Philadelphia) *in vitro* der Plasma- oder ZNS-Homogenisat-Probe zugegeben werden (MARTIN et al. 1981, ROTENBERG et al. 1995).

Zur Unterstützung der spontanen Enzymreaktivierung dienen Wärmezufuhr, Verdünnung und/oder Entfernung der überschüssigen Inhibitormoleküle. Eine diagnostische Verdünnung ist bei Plasmaproben jedoch aufgrund der im Vergleich zu der ZNS-AChE geringeren intrinsischen Aktivität der ChE nur begrenzt einsetzbar (HUNT u. HOOPER 1993). Mit Hilfe der Gelfiltration konnten dagegen gute Reaktivierungsraten carbamylierter ChE und ZNS-AChE bei Virginiawachteln (*Colinus virginianus*) erreicht werden (HUNT u. HOOPER 1993, MORTENSEN et al. 1998).

Eine vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Enzymaktivität wird in der Regel nicht erreicht. Als Ursache dafür wird eine begrenzte Haltbarkeit des Plasmaenzyms in Lösung (SCHMIDT u. ZECH 1988, HUNT u. HOOPER 1993) oder die Alterung phosphorylierter Enzyme angesehen (STANSLEY 1993). Die Inhibitor-abhängige Halbwertszeit der Alterung bestimmt auch die Zeitspanne, in der die Reaktivierung der phosphorylierten Cholinesterasen möglich ist. Ein paralleles Vorkommen irreversibel inhibierter und reaktivierbarer ChE beim Vogel wird dabei als

Hinweis auf eine OP-Vergiftung innerhalb der letzten 24 h angesehen (HOOPER 1988). Eine scheinbar irreversible Enzymhemmung tritt allerdings auch bei übermäßig hohen OP- oder CA-Gewebkonzentrationen auf, die zu einer permanenten Enzym-Reinhibition führen (ALDRIDGE u. REINER 1972, HOOPER 1988, THOMPSON et al. 1991b, SMITH et al. 1995).

Differenzierung zwischen OP- und CA-Vergiftungen

Mit Hilfe der diagnostischen Reaktivierung ist auch eine Differenzierung zwischen OP- und CA-Vergiftungen möglich (MARTIN et al. 1981, STANSLEY 1993, SMITH et al. 1995). Carbamylierte Cholinesterasen weisen eine weitaus höhere Tendenz der spontanen Reaktivierung auf als die phosphorylierten Esterasen. Letztere werden deshalb häufig als irreversibel gehemmt bezeichnet (Kap. 2.10 u. 2.11). In einer Reihe von Untersuchungen wurde infolgedessen das Auftreten einer thermischen und/oder Verdünnungs-induzierten Reaktivierung bei Messung der ZNS-AChE- (HILL 1989a, HUNT et al. 1995, SMITH et al. 1995) oder ChE-Aktivität (RAINWATER et al. 1995) als Indiz für das Vorliegen einer CA-Intoxikation interpretiert.

Die Signifikanz der diagnostischen Aussage kann durch gleichzeitige thermische und Oxim-induzierte Reaktivierung gesteigert werden. Dabei wird der Umstand genutzt, daß carbamylierte Esterasen signifikant höhere spontane und niedrigere Oxim-induzierte Reaktivierungsraten zeigen als phosphorylierte Enzyme (HOOPER 1988, HILL 1989a, SMITH et al. 1995). Tritt bei paralleler Inkubation ausschließlich in der Oxim-versetzten Probe ein signifikanter Aktivitätsanstieg auf, so ist eine OP-Vergiftung anzunehmen. Kommt es jedoch nach Erwärmung, Verdünnung und/oder Gelfiltration zu einem gleichen oder höheren Aktivitätsanstieg als nach Oximzugabe, so liegt eine CA-Intoxikation vor (MARTIN et al. 1981, STANSLEY 1993). Die schwächere und progressivere Oxim-induzierte Reaktivierung der carbamylierten Enzyme scheint sogar häufig eher auf eine spontane Reaktivierung als auf eine direkte Oximwirkung zurückzuführen sein (MARTIN et al. 1981).

Die Reaktivierbarkeiten inhibierter ZNS-AChE und ChE unterscheiden sich signifikant in Ausmaß und zeitlichem Verlauf. In Studien von SCHMIDT und ZECH (1988) an Paraoxon-inhibierten Cholinesterasen des Menschen war das Serumenzym

4000-fach langsamer mit Obidoxim reaktivierbar als die ZNS-AChE. Eine gleichfalls signifikant schwächere Reaktivierung der ChE bei Vögeln belegen LUDKE et al. (1975), FLEMING (1981) und McINNES et al. (1996).

Eine alternative Möglichkeit der Differenzierung zwischen CA- und OP-inhibierten Cholinesterasen bietet die Untersuchung der Verlaufsform des Enzymaktivitätsanstiegs (ROTENBERG et al. 1995). Nach einstündiger kontinuierlicher Messung zeigte die Aktivität der carbamylierten BChE des Menschen bei gleichzeitiger Wärmezufuhr einen exponentiellen Verlauf. Der Oxim-induzierte Aktivitätsanstieg der phosphorylierten BChE verlief dagegen linear.

2.20 Therapie der OP- und CA-Vergiftungen bei Vögeln

2.20.1 Atropintherapie

Bei begründetem Verdacht auf das Vorliegen einer OP- oder CA-Vergiftung ist bei Vögeln wie Säugetieren die kontrollierte Verabreichung des Parasympathomimetikums Atropin die wichtigste Sofortmaßnahme. Der therapeutische Effekt dieses symptomatischen Antidots besteht in der Aufhebung der peripheren muskarinartigen Wirkungen des Neurotransmitters ACh durch kompetitive Inhibition der ACh-Rezeptoren. In hohen Dosen blockiert es zudem die nikotinartigen Rezeptoren der vegetativen Ganglien und die neuromuskulären Endplatten (LÖSCHER 1994).

Die Dosierungsempfehlungen für eine Atropinbehandlung durch intramuskuläre Injektion beim Vogel sind in der Literatur sehr unterschiedlich. So werden artübergreifend zu Dosierungsintervallen von 0,2 bis 0,5 mg/kg KM (LA BONDE 1988 u. 1992, RITCHIE 1987, GYLSTORFF u. GRIMM 1998) oder 1 bis 4 mg/kg KM geraten (KUMMERFELD u. KIETZMANN 1991). Bei Singvögeln und Geflügel wird eine Dosis von 0,5 bis 1 mg/kg KM (DORRESTEIN u. KUMMERFELD 1998, KUMMERFELD 1998a), bei Tauben von 1 bis 2 mg/kg KM angegeben

(KUMMERFELD 1998b). In Einzelfällen waren bei Wildvögeln nach WILSON (pers. Mitt. in FAIRBROTHER 1996) sogar bis zu 20 mg/kg KM nötig. Atropininjektionen sollten dabei in Intervallen von 3 bis 4 h solange wiederholt werden, bis eine Verbesserung der klinischen Symptomatik eintritt. Zudem besteht die Möglichkeit einer intravenösen Therapieeinleitung mit einem Viertel der Gesamtdosis (LA BONDE 1988 u. 1992).

In einer Therapiestudie nach experimenteller Diazinon (OP)- bzw. Methomyl (CA)-Vergiftung von Hühnerküken (*Gallus gallus dom.*) konnten SHLOSBERG et al. (1997) zeigen, daß sich bei ausschließlicher Atropingabe der maximale Behandlungserfolg bei einer Dosis von 50 mg/kg KM i.m. einstellt. In einer Kombinationstherapie mit Pralidoxim erwiesen sich dagegen 25 mg/kg KM Atropin i.m. als günstig (Kap.2.20.2). Weder bei Hühnerküken noch bei Japanwachteln (*Coturnix japonica*) erwiesen sich intramuskuläre Atropin-Applikationen von 50 mg/kg als toxisch. Bei 100 mg/kg starben dagegen 25% der behandelten Wachteln (SHLOSBERG et al. 1995 u. 1997).

Aus humanmedizinischen Untersuchungen ist bekannt, daß der ChE-Aktivitätslevel weder eine Korrelation zu der therapeutisch nötigen Gesamtdosis Atropin noch eine prognostische Relevanz besitzt (NOUIRA et al. 1994).

2.20.2 Oximtherapie

Pralidoxim

Therapeutika aus der Gruppe der Oxime können als direktes Antidot bei OP- und eingeschränkt auch bei CA-Vergiftungen verwendet werden (Kap. 2.20.2.1). In den USA und verschiedenen anderen Ländern ist das Pralidoxim (2-PAM [1-methylpyridinium-2-aldoxim-Iodid]) in Gebrauch. Dieses Pyridinium-Monooxim konnte bereits erfolgreich zur Therapie von akzidentellen OP-Vergiftungen von Vögeln eingesetzt werden (RITCHIE 1987, PORTER u. SNEAD 1990, SHLOSBERG et al. 1997). Parallel zu einer Atropingabe wird beim Vogel die intramuskuläre Injektion von Pralidoxim in der Dosis von 10 bis 20 mg/kg KM empfohlen (RITCHIE

1987, LA BONDE 1992). Bei einer Anwendung dieses Therapeutikums am nicht atropinisierten Vogel werden dagegen bis zu 100 mg/kg KM als geeignet angesehen. Eine Oximapplikation kann alle 6 bis 12 h wiederholt werden. Eine mehrfache Verabreichung ist jedoch zu vermeiden, wenn 30 min nach 2-PAM-Gabe keine klinische Besserung eintritt (SHLOSBERG 1976, RITCHIE 1987, LA BONDE 1988 u. 1992). Als ideales Behandlungsschema einer akuten, experimentellen OP (Diazinon)- oder CA (Methomyl)-Vergiftung von Hühnerküken erwies sich eine Kombination aus 25 mg/kg KM Atropin und 50 mg/kg KM 2-PAM. Als Antidot der Diazinonvergiftung war dabei sogar die ausschließliche Anwendung von 100 mg/kg KM Pralidoxim der Kombinationstherapie geringgradig überlegen (SHLOSBERG et al. 1997).

Obidoxim

In vielen europäischen Ländern einschließlich der BRD, aber auch in Kanada und Israel wird das Pyridinium-Dioxim Obidoxim (Toxogonin®) eingesetzt. Dieses Therapeutikum wird im allgemeinen dem 2-PAM in seiner klinischen Anwendung und Dosierung gleichgesetzt (HAPKE 1988). Bei *in vitro*-Studien an phosphorylierter humaner Erythrozyten-AChE konnte gezeigt werden, daß aus der Gruppe der Oxime kein Wirkstoff als universeller Reaktivator aller OP angesehen werden kann, Obidoxim jedoch als das potenteste und effizienteste Therapeutikum anzusehen ist (THIERMANN et al. 1997, WOREK et al. 1997). Am atropinisierten Vogel wird die Verabreichung von Obidoxim in einer Dosierung zwischen 20 und 50 mg/kg KM i.m. empfohlen (KUMMERFELD u. KIETZMANN 1991). Die therapeutische Wirksamkeit von Obidoxim und Pralidoxim bei Vögeln wurde von SHLOSBERG et al. (1976) durch intramuskuläre Injektion der Antidote 25 bis 45 min nach oraler Diazinon-Vergiftung juveniler Gänse (*Anser anser dom.*) verglichen. Durch Behandlung mit 100 mg/kg Pralidoxim konnte in dieser Studie ein 100-prozentiger Behandlungserfolg erreicht werden. Selbst hohe Toxogonin®-Applikation von 50 oder 100 mg/kg führten dagegen nur zu einer Verzögerung der Exitus letalis.

Therapiekontrolle

Die Messung der ChE-Aktivität ist zur Kontrolle des Therapieerfolgs nach Oxim Applikation nicht geeignet, da das Serumenzym im Gegensatz zur ZNS-AChE bei therapeutisch erreichbaren Blut-Oximkonzentrationen kaum reaktiviert wird (SCHMIDT u. ZECH 1988, BESSER et al. 1995, SOLER-RODRIGUEZ et al. 1998). In humanmedizinischen Studien wurde untersucht, ob die Effizienz der Obidoximtherapie elektrophysiologisch durch neuromuskuläre Transmissionsstudien kontrolliert werden kann. Dabei zeigte sich, daß ein Rückschluß von der Verbesserung der Muskelfunktion auf den Zustand des Patienten nicht möglich ist. Die unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen und therapeutischen Potenzen der Oxime an den verschiedenen Lokalisationen des zentralen und peripheren Nervensystems wurden hierfür verantwortlich gemacht (BESSER et al. 1995).

Untersuchungen der pharmakologischen Wirkmechanismen der Oxime deuten darauf hin, daß die Enzymreaktivierung nicht der alleinige therapeutische Effekt dieser Stoffgruppe ist. So wurde bei Oximbehandlung von OP-Vergiftungen der Ratte eine Reaktivierung der Muskelfunktion in Abwesenheit eines meßbaren Anstiegs der AChE-Aktivität beobachtet (REDDY et al. 1987). Dieser Effekt wurde auf eine Beeinflussung des postsynaptischen ACh-Rezeptoren, insbesondere der dort lokalisierten Ionen-Kanäle zurückgeführt (ALBUQUERQUE et al. 1988, ALKONDON et al. 1988).

2.20.2.1 Probleme der Oximtherapie

Nach der Entwicklung des 2-PAM vor ca. 40 Jahren entstanden optimistische Berichte über die klinische Wirksamkeit der neuen Stoffklasse. So schrieben NAMBA und HIRAKI (1958) enthusiastisch: „Hithero, alkylphosphate poisoning has been treated mainly by atropine, but now atropine is replaced by 2-PAM“. Doch bereits in den folgenden Jahren wurde der therapeutische Fortschritt in Frage gestellt. Der Nutzen einer Oximtherapie ist weiterhin umstritten und die therapeutischen Erfolge widersprüchlich.

Bei einigen *in vitro* effektiven Reaktivatoren ist *in vivo* keine Wirksamkeit nachweisbar (ELLIN 1981). Eine Oxim-induzierte Reaktivierung phosphorylierter Cholinesterasen ist zudem abhängig von dem Inhibitortyp und nur vor der als „Alterung“ bezeichneten, irreversiblen Dealkylierung des gehemmten Enzyms möglich. Aus diesem Grund sieht LA BONDE (1988 u. 1992) bei vergifteten Vögeln nur in den ersten 24 h post expositionem eine therapeutische Erfolgsaussicht. Eine Oximtherapie wird aber auch dann als ineffektiv angesehen, wenn die optimale Plasmawirkstoffkonzentration nur kurzfristig anhält oder wenn durch Aufnahme großer Mengen von OP eine so hohe Inhibitorkonzentration im Gewebe erreicht wird, daß die Enzymreihinhibition schneller verläuft als die Reaktivierung (WOREK et al. 1997).

Eine anhaltende therapeutische Wirkung nach einmaliger Reaktivatorapplikation erscheint zweifelhaft. SOLER-RODRIGUEZ et al. (1998) behandelten Wachteln (*Coturnix coturnix*) 16 h nach subletaler Chlorpyrifos-Intoxikation mit Pralidoxim (20 mg/kg intraperitoneal). Die ZNS-AChE zeigte 8 h nach Oximapplikation einen Anstieg der Aktivität auf 77 % des Ausgangswerts (%A) im Vergleich zu 37 %A bei der unbehandelten Kontrollgruppe. Bereits am Folgetag waren jedoch keine Unterschiede mehr zwischen beiden Tiergruppen vorhanden. Auch der zeitliche Ablauf der Enzymreaktivierung innerhalb der nächsten acht Tage unterschied sich nicht. Beim Menschen wird deshalb als optimales Behandlungsschema eine kontinuierliche Oximinfusion nach initialem Bolus angesehen (WOREK et al. 1997).

Der Einsatz von Oximen als Antidot in der Therapie von CA-Intoxikationen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (NATOFF u. REIFF 1973, HARRIS et al. 1989, LIESKE et al. 1992, DAWSON 1994, ROTENBERG et al. 1995). Während bei vielen CA-Vergiftungen Enzymreaktivierungen durch Oxime gezeigt werden konnten, verstärken sie die toxischen Folgen einer Vergiftung mit dem N-Methylcarbamat Carbaryl (MARTIN et al. 1981, DAWSON u. PORETSKI 1985, HARRIS et al. 1986 u. 1989). DUMONCEAUX u. HARRISON (1994) sehen daher auch bei Vögeln eine 2-PAM-Therapie als kontraindiziert an, wenn der Verdacht auf das Vorliegen einer CA-Vergiftungen besteht. An Mäusen, Ratten und der BChE des Menschen konnte gleichermaßen für das Obidoxim eine Potenzierung der toxischen Wirkung des

Carbaryls nachgewiesen werden (NATOFF u. REIFF 1973, BOSKOVIC et al. 1976, STERRI et al. 1979, LIESKE et al. 1992).

Therapeutische Studien an Ratten, die nach Applikation von verschiedenen CA mit Atropin behandelt worden waren, zeigten, daß Oxime den therapeutischen Erfolg des Parasympathomimetikums mit Ausnahme der Carbarylvergiftung zwar verbessern können, der zusätzliche Effekt der Enzymreaktivateuren aber als relativ gering einzuschätzen ist (NATOFF u. REIFF 1973).

Bei Mensch und Hunden (KLEMM et al. 1968) konnte zudem eine Hepato- und Nephrotoxizität der Oxime nachgewiesen werden. Eine transiente Vergiftungssymptomatik wurde bei Hühnerküken (*Gallus gallus dom.*) nach intramuskulärer Injektion von 200 mg/kg KM Pralidoxim[®], bei Gösseln (*Anser anser dom.*) nach 100 mg/kg KM Toxogonin[®] beobachtet (SHLOSBERG et al. 1976 u. 1997).

2.20.3 Palliative und sonstige Therapiemaßnahmen

Um eine fortgesetzte Giftaufnahme zu verhindern, sollte bei Verdacht einer topischen Pestizidbenetzung eine gründliche Reinigung des Gefieders und der verschmutzten Hautbereiche vorgenommen werden. Bei Verdacht auf orale Intoxikation können Verabreichung von Medizinalkohle, Spülungen und operative Kropfentleerung nützlich sein. Weitere palliative Maßnahmen sind Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, Rehydratation und ggf. Zwangsfütterung (LA BONDE 1992, PORTER 1992, ELLIOTT et al. 1996, KUMMERFELD 1998b).

Diphenhydramin (1 bis 4 mg/kg KM i.m. alle 8 h), das zur Behandlung einiger nikotinerger Effekte von OP-Vergiftungen geeignet ist, wird im Hinblick auf Nutzen und Risiko kontrovers diskutiert (LA BONDE 1992, FAIRBROTHER 1996).

3. Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

Die Plasmaproben zur Bestimmung der spezifischen ChE-Referenzwerte sowie der Einflußfaktoren auf die ChE-Aktivität stammen von 106 adulten und 29 halbjährigen Tauben zweier verschiedenen Haltungssysteme.

In einem Stadttaubenschlag der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) waren davon 44 adulte und 10 halbjährige Tiere ansässig. Dieser Schlag beheimatete eine Teilpopulation der auf dem Hochschulgelände ansässigen Stadttauben und entflohenen Brieftauben, an denen ein Screening zu Erregern vermuteter Zooanthroponosen durchgeführt wurde. Der Schlag wurde sporadisch mit handelsüblichem Taubenfutter und Wasser versorgt. Tierärztliche Behandlungen oder Prophylaxemaßnahmen fanden nicht statt, um eine Verfälschung des Infektionsstatus durch Konstitutionverbesserung zu vermeiden. Eigene Blutentnahmen wurden ausschließlich bei solchen Tieren vorgenommen, die ein ungestörtes Allgemeinbefinden aufwiesen.

In einem norddeutschen Brieftaubenbestand wurden Blutentnahmen zur Untersuchung der ChE- Aktivität bei 62 geschlechtsreifen und 19 halbjährigen Tauben vorgenommen. Eine permanente tierärztliche Betreuung und konsequente züchterische Selektion garantierte die Gesundheit und Homogenität dieses Bestandes.

Zusätzlich fanden ChE-Messungen bei 11 Nestlingstauben statt, die im Stadttaubenschlag der MHH (n=7) oder in der Klinik für Zier- und Wildvögel (Klinik für Geflügel) der Tierärztlichen Hochschule Hannover geschlüpft waren (n=4).

Durch bakterielle Untersuchungen von Sammelkotproben ließen sich in keiner Taubenhaltung eine Infektion mit *Salmonella spec.* nachweisen.

Zur Untersuchung der diagnostischen Reaktivierung OP- und CA-inhibierter ChE nach oraler Pestizidapplikation wurden 12 Tauben des Brieftaubenbestands für 6 Wochen in die Klinik für Zier- und Wildvögel eingestallt und mit handelsüblichem

Taubenfutter versorgt. Als Kontrolltiere dienten dabei in der Klinik für Zier- und Wildvögel gehaltene Tauben.

Im gesamten Untersuchungszeitraum konnte an den in der Klinik für Zier- und Wildvögel untergebrachten Tauben keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung festgestellt werden, die nicht im Zusammenhang mit der experimentellen Intoxikation standen.

3.2 Gewinnung, Aufbereitung und Lagerung der Proben

Die Blutentnahmen erfolgten bei allen Tauben zwischen Oktober 1997 und November 1998. Sie fanden ausschließlich zwischen 10.00 Uhr und 16.00 Uhr statt, um einen möglichen Einfluß tageszeitlicher Enzymaktivitätsschwankungen zu minimieren.

Die Entnahme von maximal 1,5 ml Blut erfolgte mittels Einmalkanüle (Nr.12, 0.7 x 30 mm) aus der Vena cutanea ulnaris durch Auffangen des frei abfließenden Blutes in einem Lithium-Heparin-Probengefäß (Micro-Probengefäß, LH/1.3 ml, Heiland) oder mittels einer 0,4 x 19 mm starken Einmalkanüle (Nr. 20) unter Aspiration in eine 2 ml-Spritze und umgehendem Transfer in ein Lithium-Heparin-Probengefäß. Das Plasma wurde zur Vermeidung von Hämolyse nach sofortiger Zentrifugation (95 sec bei 15800 U/min; Stat Spin[®] MP Multi-Purpose Centrifuge, Idexx) abpipettiert.

Die im Stadtaubenschlag der MHH entnommenen Plasmaproben wurden bei +4 °C aufbewahrt und die Aktivität der ChE innerhalb von 6 h nach der Blutentnahme trockenchemisch gemessen. Die trockenchemische Bestimmung der ChE-Aktivität der klinikeigenen Jungvögel geschah dagegen im direkten Anschluß an die Blutentnahme. Bis zur naßchemischen Messung und/oder den *in vitro*-Hemm- und Reaktivierungsversuchen, die innerhalb von sechs Wochen erfolgten, fand in beiden Fällen eine Lagerung bei -18 °C statt.

Die im externen Brieftaubenschlag entnommenen Plasmaproben unterlagen vor und während des Transports nach Hannover einer maximal 8-stündigen Kühlung bei

+4 °C und wurden bis zur Enzym-Aktivitätsmessungen bei -18 °C für maximal 6 Wochen aufbewahrt.

Die trocken- und naßchemischen photometrischen Bestimmungen der ChE-Aktivität während der Belastungsversuche geschahen maximal 5 min nach Blutentnahme und Zentrifugation.

Alle Plasmaproben wurden vor den Messungen sorgfältig durchmischt.

3.3 Meßmethoden

Die Bestimmung der ChE-Aktivität fand in unbehandelten oder durch Cholinesteraseinhibitoren gehemmten Plasmaproben statt. Enzymhemmungen wurden dabei sowohl *in vivo* durch orale Verabreichung von Carbofuran oder Parathion, als auch durch Zugabe dieser Substanzen zu Plasmaproben *in vitro* vorgenommen. Bei der Bestimmung der ChE-Aktivität kamen die naßchemische spektrophotometrische Messung und das ebenfalls photometrisch arbeitende, trockenchemisches Analysensystem VITROS DT 60 II® zum Einsatz. Unter Verwendung des Meßsubstrats BThChI gilt die naßchemische Messung als Referenzmethode der trockenchemischen ChE-Bestimmung (Kap. 2.7).

Aufgrund der Artspezifität des Plasmaverhältnisses von AChE und BChE und deren Substrat- und Inhibitoraffinitäten waren vorab die bei der Taube geeigneten Konzentrationen der zur Messung und Probenvorbereitung einzusetzenden Substanzen zu ermitteln (HOOPER 1988, FAIRBROTHER et al. 1991). Untersucht wurden die Konzentrationskurven der Substrate BThChI (0,01 bis 10 mM, n=10) und AThChI (0,01 bis 50 mM, n=10) sowie des BChE-Hemmstoffs iso-OMPA (n=11) anhand Plasmaproben der Stadttauben.

3.3.1 Naßchemische Messung

Zur naßchemischen ChE-Aktivitätsbestimmung kam die von HILL u. FLEMING

(1982) modifizierte Methode nach ELLMAN et al. (1961) zum Einsatz. Sie nutzt als Enzymsubstrat einen Thiocholinester, der enzymatisch in Thiocholin und die jeweilige Estergruppe gespalten wird. Das freigesetzte Thiocholin reagiert mit Dithiodinitrobenzoesäure (DTNB), das auch Ellman's Reagenz genannt wird, zu der gelben Verbindung Thionitrobenzoesäure. Die Stärke der Farbentwicklung ist proportional der ChE-Aktivität und kann bei einer Wellenlänge von 405 nm spektrophotometrisch gemessen werden.

In der vorliegenden Studie diente zur naßchemischen Analyse das Photometer Eppendorf 1101M mit angeschlossenem zirkulierendem Wasserbad (JULABO U3) bei konstanter Meßtemperatur von 37 °C. In eine Standard-Glas-Küvette mit 1 cm Lichtweg wurden 3.0 ml DTNB-Puffer (0.05 M Tris-Puffer [Tris-hydroxymethylaminomethan], pH 7,4; $2,5 \times 10^{-4}$ M DTNB) und 20 µl Plasma pipettiert. Die Reaktion wurde nach 10-minütiger Erwärmung des Ansatzes im Wasserbad auf 37 °C durch Hinzufügen des Plasmas und 100 µl eines Thiocholinesters gestartet. Als Meßsubstrat kamen dabei zwei verschiedene Thiocholinester zum Einsatz. Das Acetylthiocholiniodid (AThChI) in einer 0,156 molaren Lösung (45,1 g/l *Aqua dest.*) mit einer Konzentration von 5 mM in der Endverdünnung (Inhalt der Glasküvette). Das Butyrylthiocholiniodid (BThChI) in einer 0,0312 molaren Lösung (9,9 g/l *Aqua dest.*), die eine Konzentration von 1 mM in der Endverdünnung aufwies. Der Meßansatz wurde sodann 15 sec mit einem Rührspatel sorgfältig durchmischt und in den Lichtweg des Spektrophotometers plaziert, wo nach weiteren 15 sec bei 37 °C zur Stabilisierung der Lösung gepaarte Messungen über jeweils drei Minuten erfolgten. Alle Reagenzien wurden bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen.

Zur Berechnung der ChE-Aktivität aus der durchschnittlichen Extinktionsänderung (ΔA) diente die folgende Formel (ELLMAN et al. 1961; HILL u. FLEMING 1982):

$$\text{ChE [U/l]} = \Delta A/\text{min} \times 11700$$

3.3.2 Trockenchemische Messung

Die trockenchemische Bestimmung der ChE-Aktivität erfolgte mit Hilfe des DTSC II-Moduls des Analysensystems VITROS DT 60 II[®] (Johnson & Johnson; vormals Ektachem DT 60 II[®], Kodak) bei einer Meßtemperatur von 37 °C.

Dieses Gerät mißt die BChE-Aktivität nach Auftropfung einer definierten Menge Plasmas (10 µl) auf ein mehrschichtig aufgebautes Einmal-Analyseplättchen. Neben dem Substrat BThChI ist darin der Farbstoff Kaliumferricyanid enthalten, der durch das Spaltprodukt Thiocholin zu Kaliumferrocyanid reduziert wird. Der dabei entstandene Farbverlust ist der ChE-Aktivität proportional und wird nach einer 5-minütigen Inkubation des Plättchens bei 37 °C in periodischen Abständen reflexionsphotometrisch bei 400 nm gemessen. Mit diesem Analysensystem, bei dem für die ChE ein Meßbereich von 200 bis 12500 U/l angegeben wird, kann jedoch nur die Aktivität von Esterasen wie der BChE nachgewiesen werden, die das Substrat BThChI umsetzen. Die AChE-Aktivität im Plasma ist dagegen nicht meßbar.

Gepaarte Messungen wurden im Fall der im Rahmen der Belastungsversuche bestimmten Ausgangs- und Intoxikationswerte durchgeführt, die als Berechnungsgrundlage der prozentualen Reaktivierung dienen (Kap. 4.7).

3.4 Anteile der AChE und BChE an der ChE-Aktivität

Bei zwölf juvenilen Tauben im Alter von einer bis vier Wochen und 40 adulten Tieren wurde durch spezifische Hemmung der BChE und Messung mit dem Substrat AThChI die Aktivität der AChE bestimmt und ihr prozentualer Anteil an der ChE-Aktivität berechnet. Zur selektiven BChE-Inhibition kam eine 5-minütige Präinkubation der Plasmaprobe bei Zimmertemperatur mit einem Aliquot iso-OMPA zum Einsatz. Die Erhöhung des Meßvolumens um 20 µl auf 3140 µl konnte dabei vernachlässigt werden. Die bei der Taube geeignete iso-OMPA-Konzentration von 0,1 mM (34,24 mg/l *Aqua dest.*) in der Ausgangslösung (entspricht $6,36 \times 10^{-7}$ M in der Endverdünnung) wurde zuvor durch Zugabe verschiedener iso-OMPA-Konzentration

zu Stadttauben-Plasmaproben (n= 11) ermittelt.

3.5 Einfluß der Meßtemperatur (25 °C /37 °C) auf die ChE-Aktivität

Unter Einsatz der Substrate BThChI (n=52) und AThChI (n=54) fanden parallele, gepaarte, naßchemische Messungen der ChE-Aktivität bei den häufig zur ChE-Messung eingesetzten Meßtemperaturen 25 °C und 37 °C statt (MARDEN et al. 1994). Es wurden die Korrelationen und die spezifischen Regressionsgeraden der Parallelmessungen für beide Meßsubstrate berechnet.

3.6 Referenzwerte und weitere Einflußfaktoren auf die ChE-Aktivität

Spezifische Referenzwerte der ChE-Aktivität wurden für die Gesamtstichprobengruppe sowie nach Haltungsform und Jahreshälfte (Herbst/Winter bzw. Frühjahr/Sommer) getrennt berechnet. Zur Angabe des Referenzbereichs diente dabei das 95%-Fraktil. Die Bestimmung der Einflüsse der Faktoren Geschlecht, Haltungsform und Jahreszeit auf die mittlere ChE-Aktivität erfolgte anhand von Plasmaproben der 106 adulten Tauben, die Ende Oktober/Anfang November, Ende Januar/Anfang Februar, Ende Mai/Anfang Juni und Ende August entnommen worden waren. Diese Proben wurden trockenchemischen und naßchemischen Messungen mit den Meßsubstraten AThChI und BThChI unterzogen. Eine für die statistischen Auswertungen notwendige Aufteilung der Stichprobengrößen der untersuchten Tauben nach Haltungsform und Geschlecht sowie verbundenen und unabhängigen Werten ist in Tab. 5 (Kap. 4.4) aufgeführt.

Zur Bestimmung des Einflusses des Faktors Alter auf die mittlere ChE-Aktivität wurden zusätzlich Plasmaproben von 29 halbjährigen Tieren und elf Nestlingen untersucht. Die Blutentnahmen fanden bei den Nestlingstauben wöchentlich zwischen dem siebten und 42. Lebenstag statt. Bei allen Proben erfolgte eine trockenchemische und naßchemische Messung der ChE-Aktivität. Für beide

Altersstufen wurden Referenzbereiche formuliert.

3.7 *In vitro*-Hemmung der ChE mit Parathion und Carbofuran

Plasmaproben von Stadtauben wurden zu gleichen Teilen mit Parathion (5×10^{-8} bis 4×10^{-7} M Ausgangslösung) oder Carbofuran (1×10^{-6} bis 1×10^{-4} M Ausgangslösung) versetzt und die Höhe und der zeitlichen Verlauf der BChE-Inhibition untersucht. Um die geeigneten Konzentrationen beider Inhibitoren zur Erzeugung annähernd vollständiger BChE-Hemmungen herauszufinden, wie sie auch bei akuten subletalen Pestizidintoxikationen der Taube auftreten (HENDERSON et al. 1994), wurde die Hemmwirkung verschiedener Verdünnungen des OP auf 13, sowie des CA auf 12 Plasmaproben nach einstündiger Inkubation bei Zimmertemperatur protokolliert. Die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Inhibition der ChE-Aktivität erfolgte durch mehrmalige Messung innerhalb 2 h nach Zugabe verschiedener Inhibitorkonzentrationen an 5 Plasmaproben.

Parathion (0,0-Diethyl-0-4-nitrophenyl-thiophosphat), das auch als Ethyl-Parathion bezeichnet wird, weist bei 20 °C eine Löslichkeit von 1,1 mg in 100 g Wasser bzw. >20 g in 100 g 2-Propanol auf und wurde zur *in vitro*-Hemmung der ChE als 0,1-prozentige Ethanollösung eingesetzt. Eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch den Alkohol wurde zuvor in einer Meßreihe mit paralleler Bestimmung der ChE mit und ohne Beigabe eines Aliquots 0,1-prozentiger Ethanollösung ausgeschlossen. Carbofuran (2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl-N-methylcarbammat) zeigt bei 20 °C eine Löslichkeit in Wasser von 40 mg/ 100 g und konnte somit in *Aqua dest.* gelöst verwendet werden.

Parathion und Carbofuran wurden von der Firma Bayer AG, Analytisches Laboratorium Dormagen bzw. Landwirtschaftszentrum Monheim in technischer Formulierung freundlicherweise bereitgestellt. Iso-OMPA konnte von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, bezogen werden.

3.8 Spontane und Oxim-induzierte Hydrolyse der Meßsubstrate

Eine Hydrolyse der Thiocholinester kann außer durch Esteraseaktivität auch spontan oder aufgrund der esterolytischen Wirkung zugesetzter Oxime eintreten.

Eine Quantifizierung des spontanen Substratzerfalls von AThChI erfolgte an 10, des von BThChI an 5 Plasmaproben unter Einsatz der unter Kap. 3.3.1 beschriebenen Substratkonzentrationen. Die spontane Hydrolyse des BThChI wurde zusätzlich für eine höhere Konzentrationsstufe (0,156 M, entspricht 5×10^{-3} M in der Endverdünnung) an 5 Proben bestimmt.

Zur Untersuchung der Reaktivierbarkeit OP- und CA-gehemmter ChE wurden zwischen den Studien mit Enzymhemmung *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Konzentrationen des Oximpräparats Obidoxim (Toxogonin[®], Merck, Darmstadt) verwendet (Kap. 3.9). Für diese Untersuchungen kamen das naß- und das trockenchemische Analysenverfahren zum Einsatz. Die Bestimmung der Oxim-induzierten Substrathydrolyse diente der Quantifizierung des methodikspezifischen Substratzerfalls für die eingesetzten Obidoximkonzentrationen und wurde durch Messung entsprechender Oxim-Verdünnungen mit und ohne Zugabe von Plasma ermittelt. Die dabei bestimmten Werte wurden später als Korrekturfaktoren der Oxim-induzierte Hydrolyse bei Messung der ChE-Aktivitäten in Obidoxim-versetzten Plasmaproben verwendet.

3.9 Diagnostische Reaktivierung

3.9.1 Voruntersuchungen zu den Belastungsversuchen

In vitro wurden mit Parathion oder Carbofuran verschiedener Konzentrationsstufen inhibierte Plasmaproben parallel bei 4 °C, 18 °C und 37 °C inkubiert. Zwischen 1 h und 24 h fand in regelmäßigen Abständen eine Messung der ChE-Aktivität zur Untersuchung der temperaturabhängigen thermischen Reaktivierung statt.

Auf dieselbe Weise *in vitro* gehemmte Plasmaproben wurden mit Obidoxim verschiedener Verdünnungsstufen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Zimmertemperatur erfolgten ChE-Aktivitätsmessungen zur Bestimmung der Oxim-induzierten Reaktivierung. Es kamen dabei Obidoxim-Verdünnungen mit physiologischer NaCl-Lösung von 0,1, 1,0 und 10 mM zum Einsatz.

In vitro Carbofuran- oder Parathion-inhibierte Plasmaproben dienten nach 1-stündiger Inkubation im Kühlschrank und Zugabe von 0,01 molarer Obidoxim-Lösung zusätzlich der Untersuchung des Einflusses der Inkubationstemperatur auf die Oxim-induzierte Reaktivierung. Dazu erfolgten ChE-Messungen nach 1- bis 24-stündiger Inkubation bei 4 °C, 18 °C und 37 °C. Die Stichprobengrößen der einzelnen Meßreihen umfassten Plasmaproben von 5 bis 10 Stadttauben. Die Oxim-induzierte Substrathydrolyse wurde durch Subtraktion der zuvor ermittelten Konstanten korrigiert. Die Erhöhungen des Meßansatzvolumens auf 3140 bzw. 3160 µl fanden wegen des sehr geringen Einflusses auf die Meßwerte keine Berücksichtigung.

Zur Quantifizierung der gehemmten Enzymaktivität kann der prozentuale Anteil der Restaktivität am Ausgangswert berechnet werden. Dieser Wert wird als %A (% der Ausgangsaktivität) bezeichnet. Die Höhe der Enzymreaktivierung wird nach Hobbiger (1957) als Prozentzahl angegeben und prozentuale Reaktivierung (%R) genannt. Die in Prozentwerten ausgedrückten Enzymaktivitäten lassen einen Vergleich verschiedener Tauben unabhängig von der individuellen Höhe der ChE-Aktivität zu.

Die Formel der prozentuale Reaktivierung lautet:

$$\frac{(\text{ChE-Aktivität nach Reaktivierung in \%A} - \text{Hemmwert in \%A}) \times 100}{(100 - \text{Hemmwert in \%A})}$$

3.9.2 Belastungsversuche

Bei 6 Brieftauben wurde jeweils um 9.00 Uhr die ChE-Aktivität gemessen, um einen physiologischen Vergleichswert zu ermitteln. Dieser wird im Folgenden als „Ausgangswert“ bezeichnet. Den gleichen Tieren wurde nach 12-stündiger

Karenzzeit am nächsten Morgen 0,5 mg/kg in *Aqua dest.* gelöstes Carbofuran in technischer Formulierung mit einer Knopfkanüle in den Kropf eingegeben. Nach 2, 8, 12 und 24 h *p. appl.* wurde ca. 1,2 ml Blut entnommen und Plasma durch sofortiges Abzentrifugieren gewonnen. Die ChE-Aktivität, die unverzüglich in diesen Proben bestimmt wurde, erhält im Folgenden die Bezeichnung „Hemmwert“.

Eine andere Gruppe von 6 Brieftauben erhielt oral nach Bestimmung der Ausgangswerte und 12-stündiger Karenzzeit mit einer Knopfkanüle 0,6 mg/kg KM in 1-2-Propandiol gelöstes Parathion in technischer Formulierung. Das Parathion wurde als 0,5 g/l-Lösung vorbereitet und entsprechend dem Gewicht der Taube portioniert, wobei 500g KM einem Volumen von 0,6 ml Lösung entsprechen. Bei diesen Tieren fanden 1, 2, 6, 8, 12, 24, 48 und 72 h *p. appl.* Blutentnahmen mit unmittelbarer Bestimmung der Hemmwerte statt.

Den 4 Kontrolltieren wurde in entsprechender Verdünnung 0,5 ml 1-2-Propandiol verabreicht.

An den Plasmaproben fand neben der Messung der Hemmwerte auch eine diagnostische Reaktivierung *in vitro* statt. Zur thermischen Reaktivierung wurden die Plasmaproben zwischen 1 h und 72 h bei 4 °C und 37 °C, zur Oxim-induzierten Reaktivierung mit Obidoxim für 1 h und 6 h bei 4 °C inkubiert. Dabei kamen drei Ausgangslösungen des Obidoxims mit 1/10, 1/100 oder 1/1000 Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung zum Einsatz. 100 µl Plasma wurden mit 10 µl dieser Obidoximlösung versetzt. Die daraus resultierende Plasmaverdünnung wurde durch Multiplikation des Meßwertes mit 1,1 ausgeglichen.

Zur Bestimmung der Hemmwerte und der ChE-Aktivitäten nach thermaler Reaktivierung kam das trockenchemische Analysensystem zum Einsatz. Die Ausgangsaktivitäten und die Werte der Enzymaktivität nach Oxim-induzierter Reaktivierung wurden trocken- und naßchemisch gemessen. Die Oxim-induzierte Substrathydrolyse wurde durch Subtraktion der zuvor ermittelten Konstanten K korrigiert.

3.10 Chemikalienlagerung und Laborkontrolle

Zur Laborkontrolle diente Plasma, welches von Stadtauben mit polytraumatischen Geschehen vor der Euthanasie in der Klinik für Zier- und Wildvögel gewonnen wurde. Von diesen Proben erfolgten trocken- und naßchemische ChE-Aktivitäts-Messungen unter Einsatz von BThChI und AThChI. Es wurden 50 µl-Aliquote portioniert und bei -18 °C gelagert. Zu Beginn jeder Meßreihe und bei Neuansmischung eines Puffers oder Substrats wurde die ChE-Aktivität in der Kontrolle gemessen. Wichen die Meßergebnisse über 10 % von den initial gemessenen ChE-Aktivität in der Kontrolle ab, fand eine Überprüfung des Meßansatzes und der -methodik statt.

Nach Empfehlung des Herstellers erfolgte die Kalibration des trockenchemischen Analysensystems im Abstand von maximal sechs Monaten.

3.11 Statistische Auswertung

Zur Untersuchung auf Homogenität der Substratkonzentrationsstufen der Vorversuche diente der einseitige t-Test für verbundene Stichproben nach Student. Die absoluten Werte der ChE-Aktivitäten (U/l) der adulten und juvenilen Tauben waren normalverteilt. Für die statistischen Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die mittlere Enzymaktivität wurden Varianzanalysen oder t-Tests eingesetzt. Zum Vergleich des Anteils der AChE an der ChE von juvenilen und adulten Tauben wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon verwendet.

Bei der Beschreibung der Referenzwerte wird neben Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s) auch der Variationskoeffizient angegeben.

Die Wechselbeziehungen zwischen den mit 25 °C und 37 °C gemessenen ChE-Aktivitäten sowie der zeitliche Verlauf der Enzymaktivitäten *in vivo* nach Inhibitorapplikation wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson beschrieben. Diese Berechnung fand auch für den zeitlichen Verlauf der thermischer Reaktivierung nach Carbofuran-Intoxikation *in vivo* sowie den Vergleich der naß- und trockenchemischen Messung der Oxim-induzierten Reaktivierung Anwendung.

Zur statistischen Berechnung diente das Programm SAS (Statistisches Auswertungssystem Version 6.12) des Rechenzentrums der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die graphische Darstellung der Korrelationen, die Berechnung der Korrelationskoeffizienten und die t-Tests wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel 1997 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Aktivitätskurven der ChE bei steigenden Substratkonzentrationen von BThChI, AThChI und dem spezifischen BChE-Inhibitor iso-OMPA

In Vorversuchen waren zunächst die für die ChE-Aktivitäts-Messung im Plasma der Taube geeigneten Konzentrationen der Meßsubstrate und des spezifischen BChE-Inhibitors iso-OMPA zu ermitteln.

Bei Steigerung der BThChI-Konzentrationen konnte eine Erhöhung der gemessenen

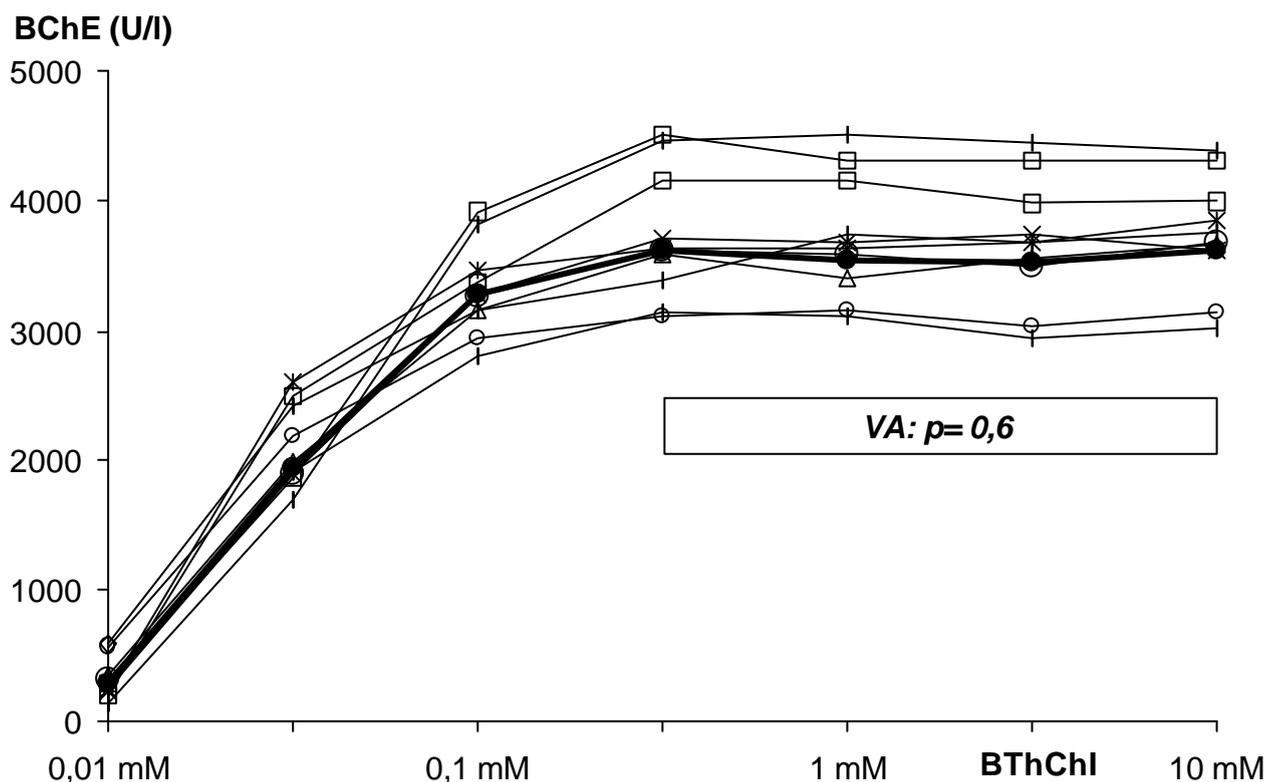


Abbildung 6: Konzentration des Substrats BThChI (Stadttauben, $n=10$). Angabe der Substratkonzentration in der Endverdünnung (mM). Die hervorgehobene Linie stellt den Mittelwert dar. Der p-Wert zum adjustierten F-Wert der Varianzanalyse (VA) mit verbundenen Stichproben (repeated measures) der Konzentrationsstufen 0,5 mM – 10 mM ist in dem Textfeld angegeben.

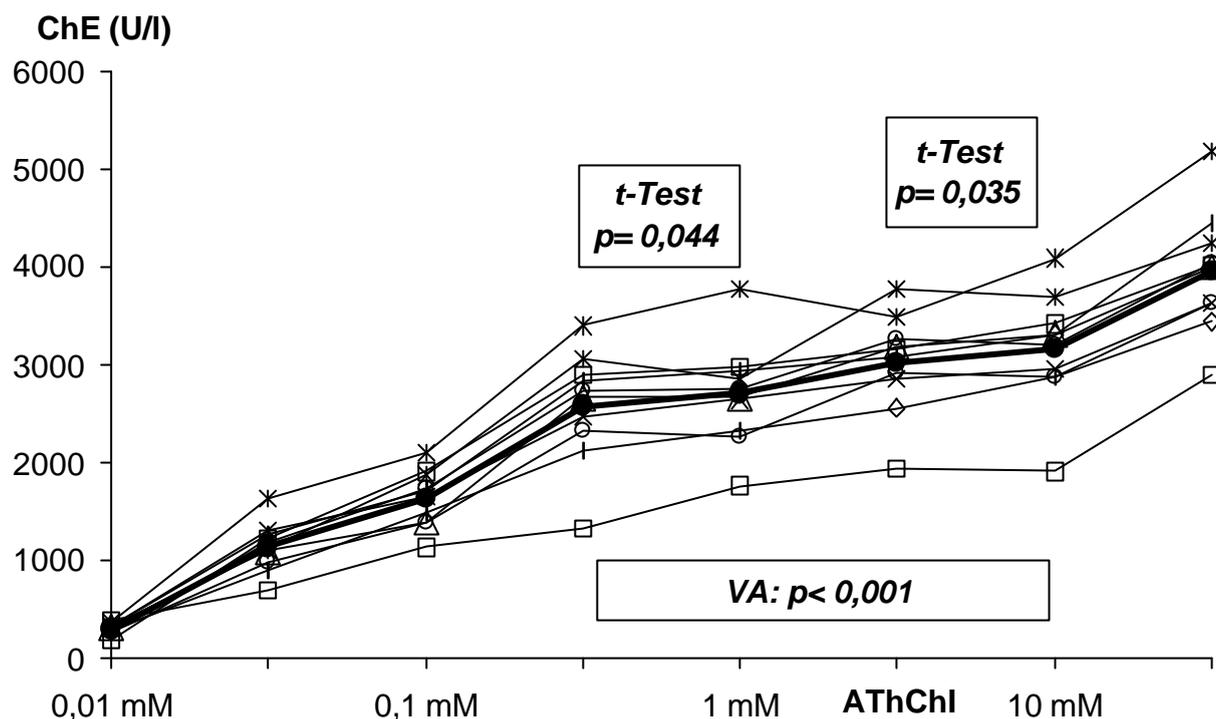


Abbildung 7: Konzentration des Substrats AThChI (Stadttauben, n=10). Angabe der Substratkonzentration in der Endverdünnung (mM). Die hervorgehobene Linie stellt den Mittelwert dar. Der p-Wert zum adjustierten F-Wert der einfaktoriellen VA mit verbundenen Stichproben (repeated measures) des Konzentrationsbereichs 0,5 mM – 10 mM sowie die gepaarten, einseitigen t-Tests der Konzentrationsstufen 0,5/1 mM und 5/10 mM sind in Textfeldern angegeben.

ChE-Aktivität festgestellt werden. Zwischen den BThChI-Konzentrationen in den Endverdünnungen 0,5 mM und 10 mM besteht jedoch eine konstante Höhe der ChE-Aktivität (Abb. 6).

Bei dem Meßsubstrat AThChI wurde bei ansteigenden Konzentrationen im Meßansatz eine anhaltende Erhöhung der ChE-Aktivität beobachtet. Zwischen den Konzentrationen in den Endverdünnungen 0,5 mM und 10 mM ist ein statistisch hochsignifikanter Anstieg der mittleren Enzymaktivität ($p < 0,001$) vorhanden. Zwischen den AThChI-Konzentrationen 0,5 mM und 1 mM sowie 5 mM und 10 mM ergeben sich unter Verwendung des t-Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 7).

Eine Aktivität der BChE in Taubenplasma ist bei Konzentrationen des spezifischen Inhibitors iso-OMPA von mindestens 0,01 mM in der Ausgangslösung nicht mehr meßbar (Abb. 8).

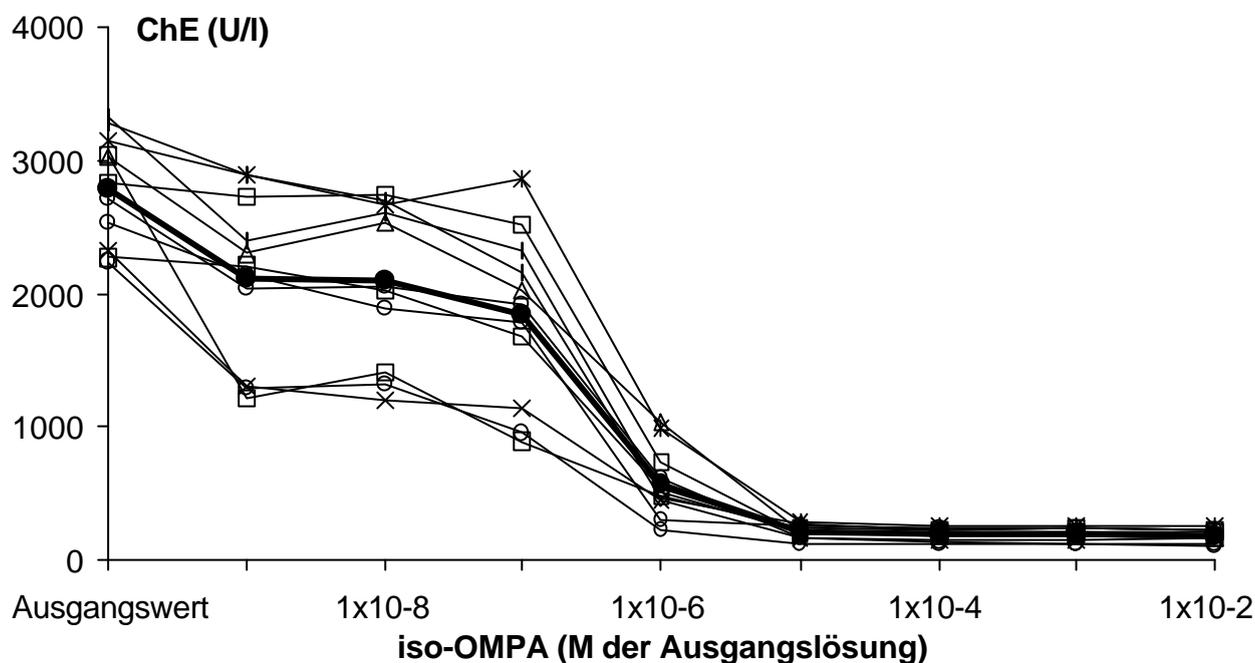


Abbildung 8: Konzentration des BChE-spezifischen Inhibitors iso-OMPA (Substrat AThChI, Stadttauben, n=11). Die hervorgehobene Linie stellt den Mittelwert dar.

4.1.2 Spontanhydrolyse der Meßsubstrate in der naßchemischen Messung

Tabelle 2: Spontane Hydrolyse der Meßsubstrate AThChI und BThChI.

Meß-substrate	Konzentration in der Endverdünung	n	\bar{x} (U/l)	s (U/l)
AThChI	$5 \times 10^{-3} \text{M}$	10	81	8
BThChI	$1 \times 10^{-3} \text{M}$	5	0,9	0,3
	$5 \times 10^{-3} \text{M}$	5	4,2	0,9

Angabe von Anzahl (n), arithmetischem Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s)

Die Ergebnisse der Quantifizierung des durch den Autozerfalls der Substrate während der naßchemischen Messung hervorgerufenen Farbumschlags, umgerechnet in ChE-Aktivität (U/l), werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

4.1.3 Oxim-induzierter Zerfall von Thiocholinestern

Der Obidoxim-induzierte Zerfall des BThChI wird in Abb. 9 dargestellt. Es wurden die Auswirkungen von Obidoxim-Konzentrationen zwischen 1 mM und 1M in der Ausgangslösung auf die Konzentrationen des Meßsubstrats 1 mM und 5 mM in der Endverdünnung bei naßchemischer Messung überprüft. Der Farbumschlag wird dabei als ChE-Aktivität (U/l) dargestellt.

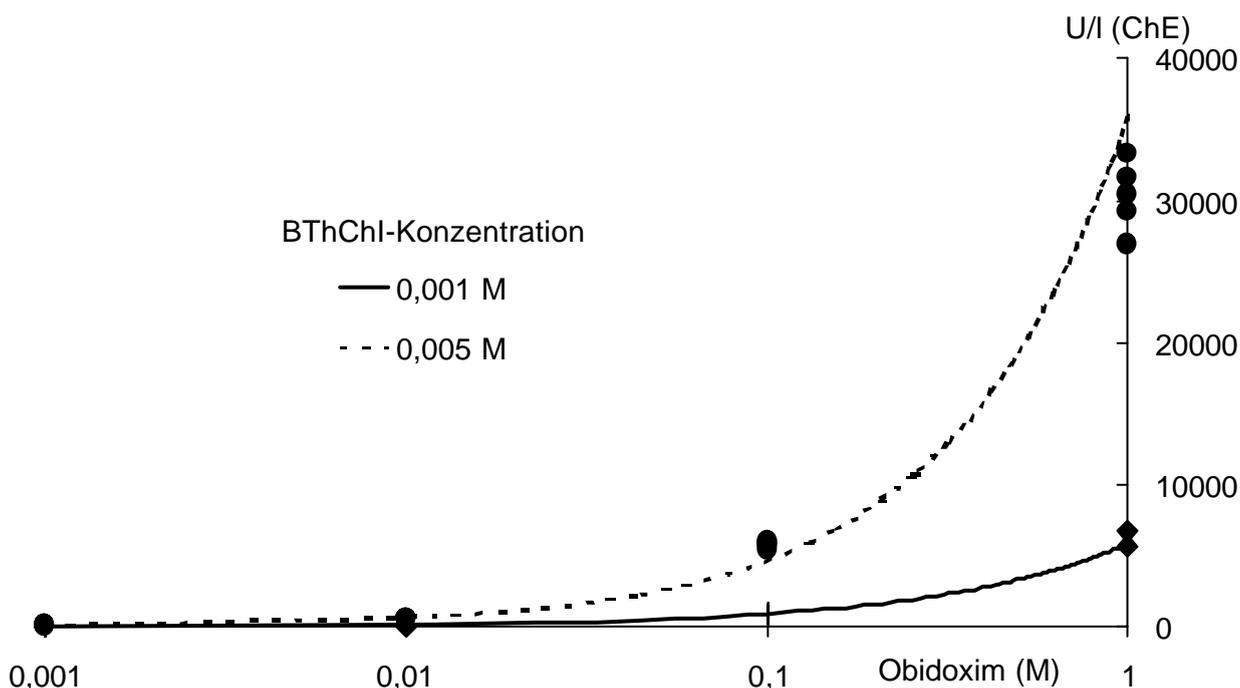


Abbildung 9: Obidoxim-induzierter Zerfall des BThChI zweier Konzentrationsstufen (jeweils n=5, M in der Endverdünnung). Naßchemische Messung. Angabe der Obidoxim-Konzentration in Mol in der Ausgangslösung.

Tabelle 3: Obidoxim-induzierte Hydrolyse des Meßsubstrats BThChI. Messung des durch unterschiedlich konzentrierte Obidoximlösungen bedingten Farbumschlags ohne und mit Zugabe von Plasma (grau unterlegt). Angabe der in den Kap. 4.6 und 4.7 eingesetzten Korrektur-Konstanten (K).

Meßmethodik		Obidoxim		n	ChE (%A)	Substrat-hydrolyse (ChE, U/l)	K (U/l)
		Ausgangs-lösung	Meßansatz (M)				
Vorversuch: Zugabe von 20 µl Obidoxim- Ausgangslösung zum naßchemischen Meßansatz	BThChI	1 M	6,4x10 ⁻³	5		5985 (424)	
		1 M	6,4x10 ⁻³	5	285 (72)	8638 (2902)	
		0,1 M	6,4x10 ⁻⁴	5		920 (45)	
		0,1 M	6,4x10 ⁻⁴	5	129 (12)	1395 (644)	
		10 mM	6,4x10 ⁻⁵	5		143 (42)	100
		10 mM	6,4x10 ⁻⁵	5	100 (3)	-29 (153)	
		1 mM	6,4x10 ⁻⁶	5		27 (11)	30
		1 mM	6,4x10 ⁻⁶	5	99 (4)	-30 (136)	
		0,1 mM	6,4x10 ⁻⁷	5		6 (13)	
		0,1 mM	6,4x10 ⁻⁷	5	98 (3)	-111 (178)	
Methodik entspricht Belastungsversuch (Kap. 3.9 u. 4.6.2)	BThChI	1/10 ^a	4,1x10 ⁻⁵	5		29 (5)	
		1/10	4,1x10 ⁻⁵	10	99 (4)	-26 (215)	
		1/100	4,1x10 ⁻⁶	10	97 (3)	-152 (106)	
		1/1000	4,1x10 ⁻⁷	10	97 (3)	-138 (128)	
	VITROS	1/10	6,4x10 ⁻³	5		2713 (30)	2750
		1/10	6,4x10 ⁻³	10	177 (33)	2788 (289)	
		1/100	6,4x10 ⁻⁴	5		259 (14)	293
		1/100	6,4x10 ⁻⁴	10	107 (4)	327 (152)	
	1/1000	6,4x10 ⁻⁵	5		<200		
	1/1000	6,4x10 ⁻⁵	10	99 (3)	-29 (148)		

VITROS: trockenchemische Meßmethode; BThChI: naßchemische Meßmethode; %A: ChE-Aktivität in % des Ausgangswerts

^a: 1/10 bis 1/1000 Verdünnung des Obidoxim (Toxogonin[®]) mit physiologischer NaCl-Lösung.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Höhe des Obidoxim-induzierten Substratzerfalls, umgerechnet in U/l der ChE, u.a. bei den verschiedenen, im Rahmen dieser Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen.

Diese Obidoxim-bedingte Substrathydrolyse wurde mit und ohne Zugabe von Plasma zum Meßansatz untersucht. Die Obidoxim-Konzentration in der Ausgangslösung wird entweder in Mol, oder entsprechend den Konzentrationsangaben bei den Belastungsversuchen als Verdünnungsstufe einer physiologischen Kochsalzlösung angegeben. Die entsprechende Konzentration im Meßansatz wird immer in Mol aufgeführt.

Für die zur diagnostischen, Oxim-induzierten Reaktivierung eingesetzten Konzentrationsstufen (Kap. 4.6.1.3 u. 4.6.2.3) wurden aus Mittelwerten der mit und ohne Zugabe von Plasma gemessenen Oxim-induzierten Substrathydrolyse Korrekturfaktoren (K) errechnet.

4.2 AChE/BChE-Verhältnis im Blutplasma von Tauben

Der Anteil der AChE an der ChE-Aktivität wurde bei adulten Tauben und Jungtauben vom siebten zum 28. Lebenstag durch Aktivitätsmessungen mit und ohne 5-minütige Präinkubation der Plasmaproben mit dem spezifischen BChE-Inhibitor iso-OMPA ermittelt und in Tab. 4 zusammengefaßt. Zwischen den wöchentlichen Messungen innerhalb der ersten vier Lebenswochen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der AChE-Aktivitäten (VA für verbundene Stichproben, $p=0,12$). Die mit Hilfe des Rangsummentests nach Wilcoxon überprüften Unterschiede der prozentualen Anteile der AChE an der ChE zwischen Jungtauben und adulten Tieren sind hochsignifikant ($p < 0,001$). Die angegebenen und bei der Berechnung verwendeten AChE-Aktivitäten der Jungtauben sind die über die ersten vier Lebenswochen gemittelten Enzymwerte. Bei den adulten Tauben handelt es sich um Einzelmessungen.

Die BChE kann durch die Subtraktion der AChE-Aktivität von dem ChE-Wert errechnet werden. Bei juvenilen Tieren gehen somit im Mittel 90 %, bei adulten Tauben 94% der ChE-Aktivität auf BChE-Aktivität zurück.

Tabelle 4: Aktivität der AChE und ihr prozentualer Anteil an der ChE-Aktivität (%ChE) bei Nestlingstauben (erste bis vierte Lebenswoche) und bei adulten Tauben (> 6 Monate).

Alter		n	\bar{x}	s	Bereich
1-4 Wo ^a	AChE (U/l)	12	214	42	117-395 ^b
	% ChE		10	2	5-18 ^b
adult	AChE (U/l)	40	166	50	98-293
	% ChE		6	2	3-12

Angabe von Anzahl (n), arithmetischem Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s)

^a: AChE-Aktivitäten werden als Mittelwert der 1 bis 4 Wochen-Messung angegeben

^b: bei dem ChE-Bereich werden die Einzelmessungen der 1. bis 4. Woche berücksichtigt

4.3 Korrelation der Meßtemperaturen 25 °C und 37 °C

Parallel wurden naßchemische Messungen der ChE-Aktivität von Tauben bei 25 °C und 37 °C mit den Substraten BThChI (n=52, Abb. 10) und AThChI (n=54, Abb. 11) durchgeführt.

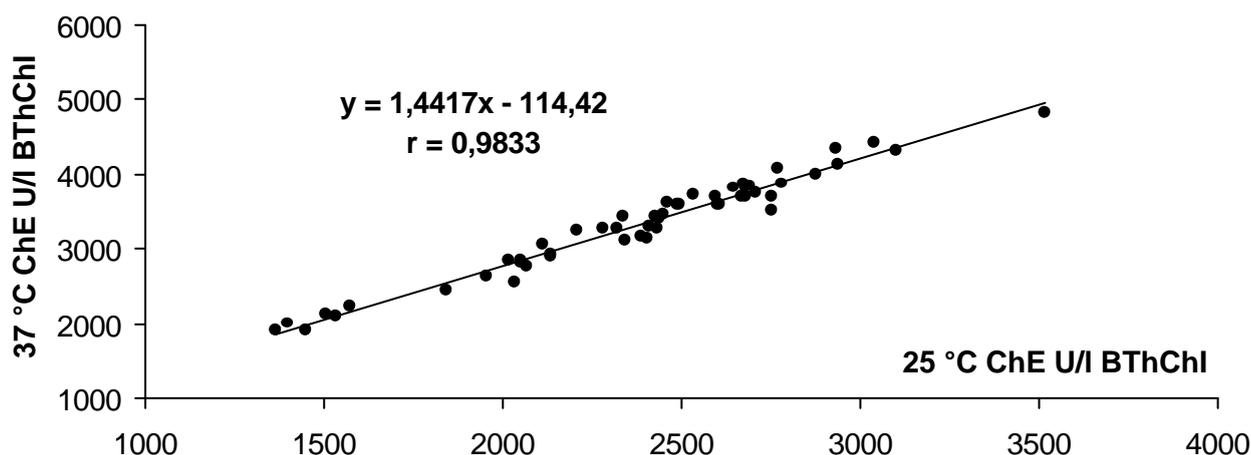


Abbildung 10: Korrelation der Meßtemperaturen 25°/37°C bei der Messung der BChE-Aktivität unter Benutzung von dem Substrat BThChI.

Es erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die Formel der Regressionsgeraden. Beide Werte sind in die graphischen Darstellungen eingefügt (Abb. 10 u. 11).

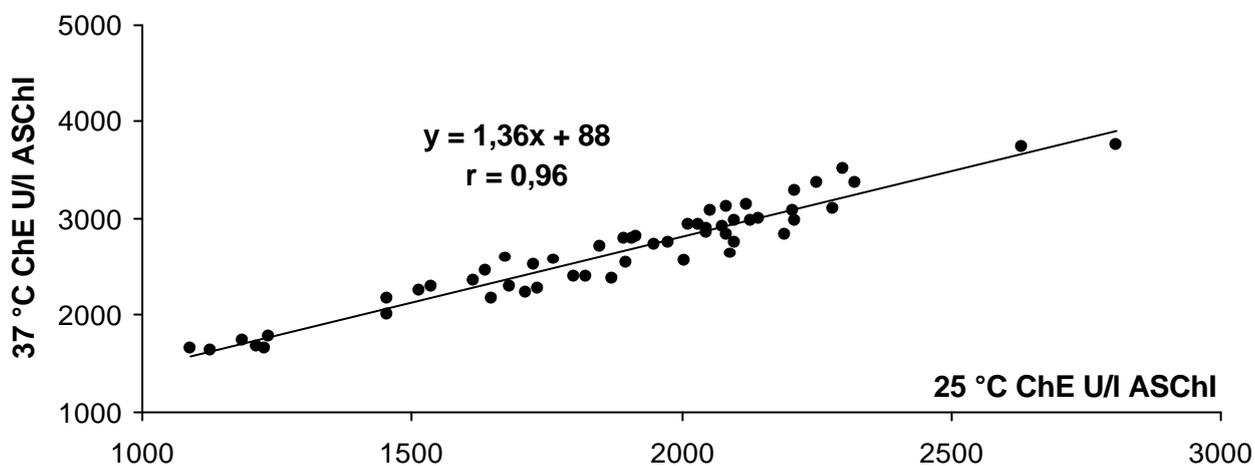


Abbildung 11: Korrelation der Meßtemperaturen 25°/37°C bei der Messung der ChE-Aktivität unter Benutzung von dem Substrat AThChI.

4.4 Einflußfaktoren auf die ChE-Aktivität

4.4.1 Einfluß des Geschlechts, der Jahreszeit und Haltungsform auf die ChE-Aktivität adulter Tauben

ChE-Aktivitätsmessungen fanden vierteljährlich in einem Brief- und einem Stadtaubenschlag statt. Die Enzymaktivitäten wurden sowohl trockenchemisch als auch naßchemisch unter Verwendung der Substrate BThChI und AThChI gemessen (Tab. 6). Die mit dem VITROS DT 60 II[®] Analysensystem erstellten Werte werden graphisch in Abbildung 12 und 13, die Gesamtheit der Ergebnisse und die statistischen Berechnungen zur Bedeutung der verschiedenen Einflußfaktoren in den Tabellen 5 bis 14 zusammengefaßt. Abbildung 12 zeigt den jahreszeitlichen Verlauf der mittleren ChE-Aktivität der männlichen und weiblichen Brieftauben beider Haltungssysteme. Werden im Folgenden die Gesamtstichprobengruppe nach

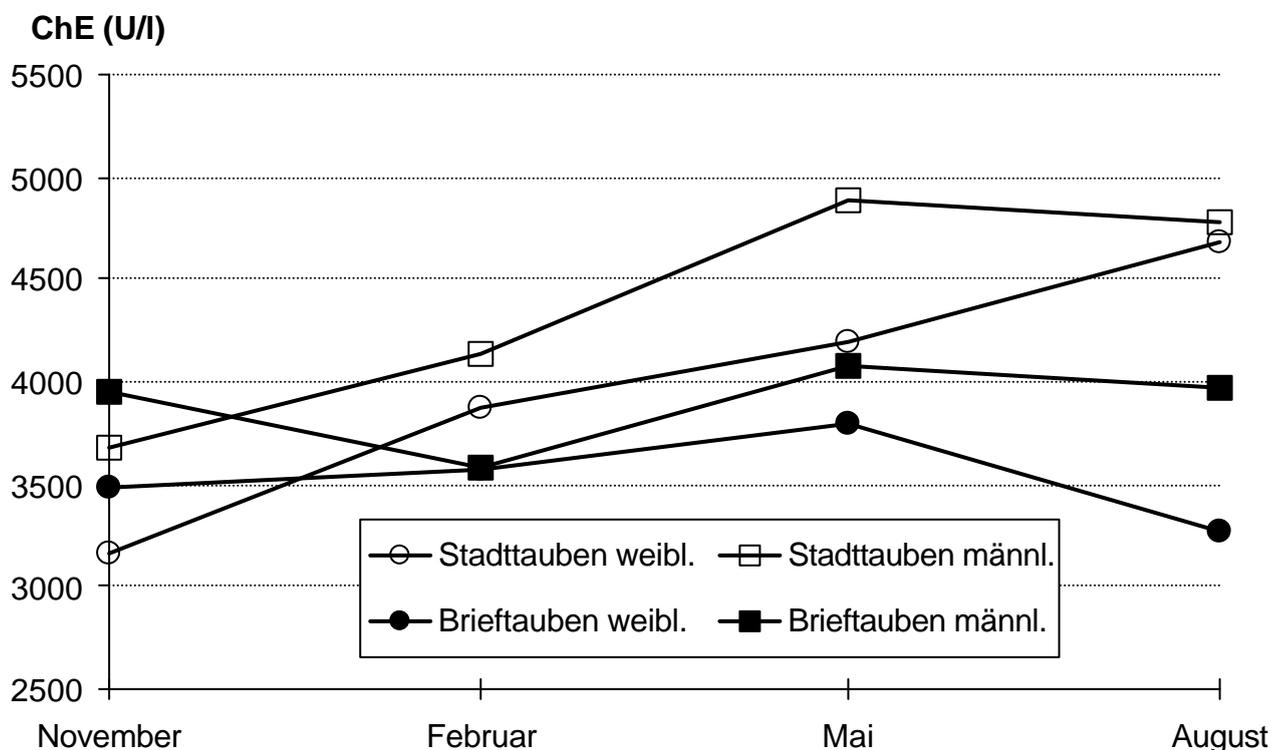


Abbildung 12: Vergleich der mittleren ChE-Aktivitäten (trockenchemische Messung, VITROS DT 60II[®], verbundene Stichproben) der adulten männlichen und weiblichen Tauben zweier Schläge.

Haltungsform und Geschlecht in 4 Kollektive unterteilt, so wird von „Taubengruppen“ gesprochen.

Die statistische Auswertung untersucht den Einfluß der Faktoren Geschlecht, Haltungsform und Jahreszeit auf die ChE-Aktivität adulter Tauben. Sie wurden für die trockenchemischen sowie die unter Verwendung des Substrats BThChI naßchemisch gemessenen ChE-Aktivitäten berechnet.

Die Faktoren Geschlecht und Haltungsform stellen in der statistischen Berechnung voneinander unabhängige Ereignisse dar. Die Meßwerte für den Faktor Jahreszeit gelten dann als verbundene Stichproben, wenn die ChE-Aktivitäten eines Individuums über vier Jahreszeiten bekannt sind. Tabelle 5 gibt eine Übersicht der verbundenen und unabhängigen Stichprobengrößen beider Taubenpopulationen.

In Text und Tabellen werden schwach signifikante* ($p < 0,05$), signifikante** ($p < 0,01$) und hoch signifikante*** ($p < 0,001$) Ergebnisse durch die entsprechende Anzahl an Sternchen kenntlich gemacht.

Tabelle 5: Unterteilung der Taubengruppen zur statistischen Berechnung. Die Summe der über vier Jahreszeiten untersuchten Individuen (verbundene Stichproben) und die Gesamtzahl der je Jahreszeit gemessenen Plasmaproben (nicht verbundene Stichproben) werden nach Haltungsform und Geschlecht differenziert.

Stichproben- gruppen		männlich		weiblich	
		Verbun- den	Nicht verbunden H – W – F – S ^a	Verbun- den	Nicht verbunden H – W – F – S ^a
Stadt- tauben	VITROS	12	14 – 12 – 14 - 12	13	14 – 14 – 16 - 15
	BThChI	10	14 – 11 – 14 - 11	10	14 – 11 – 16 - 15
Brief- tauben	VITROS	16	19 – 20 – 18 - 20	8	20 – 20 – 21 - 21
	BThChI	15	19 – 19 – 18 - 20	8	20 – 20 – 21 - 21

^a: H= Herbst, W= Winter, F= Frühling, S= Sommer; VITROS= VITROS DT 60 II®

Tabelle 6: ChE-Aktivität männlicher und weiblicher adulter Tauben (A=Stadttauben, B=Brieftauben), gemessen in jeder Jahreszeit mit dem trockenchemischen Analysensystem VITROS DT 60 II® (VITROS) und naßchemisch unter Verwendung der Substrate BThChI und AThChI.

			VITROS				BThChI				AThChI			
			n	Median	\bar{x}	s	n	Median	\bar{x}	s	n	Median	\bar{x}	s
HERBST	männl.	A	14	3448	3661	752	14	3357	3415	708	14	2719	2860	425
		B	19	3841	3948	700	19	3605	3585	503	18	2907	2860	407
	Weibl.	A	14	3216	3335	794	14	3171	3244	813	14	2560	2605	636
		B	20	3407	3488	768	20	3117	3041	656	17	2574	2558	536
WINTER	männl.	A	12	4110	4061	554	11	3708	3649	609	12	3128	3095	380
		B	20	3364	3587	623	19	3111	3230	589	19	2490	2616	421
	Weibl.	A	14	4132	4086	827	11	3823	3824	449	14	3086	3045	517
		B	20	3511	3577	763	20	3052	3208	775	20	2638	2569	615
FRÜHJAHR	männl.	A	14	4875	4923	844	14	4812	4766	741	11	3883	4067	535
		B	18	4171	4080	545	18	3962	3934	431	16	3189	3182	366
	Weibl.	A	16	4410	4382	1092	16	4210	4189	994	15	3422	3478	711
		B	21	3636	3796	889	21	3198	3351	431	21	2642	2640	634
SOMMER	männl.	A	12	4709	4872	1126	11	4256	4476	866	11	3459	3673	698
		B	20	3963	3968	472	20	3827	3868	410	18	3105	3120	323
	Weibl.	A	15	4801	4683	1571	15	4543	4463	1386	14	3620	3571	1095
		B	21	3210	3272	857	21	3276	3265	768	20	2633	2467	743

Angabe von Anzahl (n), arithmetischem Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s).

Signifikante Wechselwirkungen zwischen den Einflußfaktoren Geschlecht, Haltungsform und Jahreszeit traten nur für einen Fall auf. Für beide Meßmethoden liegt eine signifikante Jahreszeitenabhängigkeit des Einflusses der Haltungsform auf die ChE-Aktivität vor (Tab. 7).

Tabelle 7: Wechselwirkungen zwischen den Einflußfaktoren. p-Werte der zwei- und dreifaktoriellen Varianzanalysen mit verbundenen oder unverbundenen Stichproben, approximativer F-Test mit Greenhouse-Geisser-Korrektur (Univariate tests of hypotheses for within/ between subjects effects).

	VITROS	BThChI
Haltungsform x Jahreszeit	<0,001***	0,003**
Haltungsform x Geschlecht	0,68	0,8
Geschlecht x Jahreszeit	0,51	0,08
Geschlecht x Jahreszeit x Haltungsform	0,37	0,41

schwach signifikant*: $p < 0,05$; signifikant**: $p < 0,01$; hochsignifikant***: $p < 0,001$

Die in Tab. 8 dargelegte 2-faktorielle Varianzanalyse vergleicht die mittleren Verlaufskurvenhöhen und errechnet so die Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Einflusses der Faktoren Geschlecht und Haltungsform auf die Höhe der ChE-Aktivität. Ein solcher besteht im Fall der Haltungsform bei statistischer Berechnung mit und ohne Berücksichtigung des Faktors Geschlecht.

Tabelle 8: Einfluß der Faktoren Taubengruppe, Haltungsform und Geschlecht auf die ChE-Aktivität. p-Werte der 1- oder 2-faktoriellen Varianzanalysen für verbundenen Stichproben mit Greenhouse-Geissner-Korrektur (Test of hypotheses for between subjects effects).

Faktoren	VITROS	BThChI
Geschlecht	0,71	0,51
Taubengruppen	0,11	0,08
Haltungsform ^a (geschlechtsübergreifend)	0,02* (0,015*)	0,01* (0,01*)

schwach signifikant*: $p < 0,05$; signifikant**: $p < 0,01$; hochsignifikant***: $p < 0,001$

^a: Berechnung des Einflusses der Haltungsform mit und ohne Berücksichtigung des Faktors Geschlecht

Mit Hilfe der 1-faktoriellen Varianzanalyse wurde die Bedeutung der unabhängigen Faktoren Haltungform und Geschlecht zu jeder Jahreszeit untersucht (Tab. 9).

Bei dieser Berechnung ergeben sich für den Faktor Geschlecht weder bei der Gesamtheit der verbundenen Stichproben noch bei der nach Haltungformen aufgeschlüsselten Berechnung signifikante Unterschiede. Bezüglich des Faktors Haltungform bestehen dagegen ausschließlich im Herbst keine Signifikanzen.

Tabelle 9: Einfluß der Faktoren Haltungform und Geschlecht auf die ChE-Aktivität. 1-faktorielle Varianzanalysen für unabhängige Stichproben zu jeder Jahreszeit; p-Werte zum F-Test (General linear models procedure). Wechselwirkungen der Faktoren Haltungform und Geschlecht zu jeder Jahreszeit.

		Herbst	Winter	Frühjahr	Sommer
Haltungform ^a (geschlechts- übergreifend)	VITROS	0,18 (0,16)	0,044* (0,02*)	0,007** (0,004**)	0,001** (0,008**)
	BThChI	0,82 (0,69)	0,022* (0,012*)	0,001** (0,002**)	0,008** (0,008**)
Geschlecht	VITROS	0,36	0,51	0,73	0,64
	BThChI	0,11	0,36	0,17	0,98

Wechselwirkungen der Faktoren Haltungform und Geschlecht

VITROS	0,31	0,59	0,51	0,57
BThChI	0,59	0,94	0,76	0,36

schwach signifikant*: $p < 0,05$; signifikant**: $p < 0,01$; hochsignifikant***: $p < 0,001$

^a: Berechnung des Einflusses der Haltungform mit und ohne Berücksichtigung des Faktors Geschlecht

Tabelle 10 zeigt die Wahrscheinlichkeiten eines Einflusses der Jahreszeiten auf die Höhe der ChE-Aktivität. In der Gesamtstichprobe adulter Tauben sowie bei den Stadtauben und bei den einzeln betrachteten Geschlechtergruppen dieser Haltungform bestehen signifikante bis hochsignifikante jahreszeitliche Unterschiede. Nur für die weiblichen Brieftauben wurden keine Signifikanzen festgestellt.

Eine detaillierte Betrachtung der jahreszeitlichen Schwankungen erfolgte mit Hilfe des 1-Stichproben-t-Tests. Dabei wurden die ChE-Aktivitäten der verschiedenen Jahreszeiten innerhalb der vier Taubengruppen verglichen (Tab. 11). Die

statistischen Berechnungen wurden mit und ohne Berücksichtigung des Einflußfaktors „Geschlecht“ durchgeführt. Signifikante Unterschiede der mittleren

Tabelle 10: Einfluß des Jahreszeitenverlaufs auf die ChE-Aktivität. Differenzierung der Gesamtstichprobengruppe nach Haltungssystem und Geschlecht. Zweifaktorielle Varianzanalyse für verbundene Stichproben mit approximativem F-Test und adjustierten p-Werten nach Greenhouse und Geissner (Univariate tests of hypotheses for within subjects effects).

Faktoren		VITROS	BThChI
Tauben		<0,001 ^{***}	<0,001 ^{***}
Stadttauben		<0,001 ^{***}	<0,001 ^{***}
Brieftauben		0,02 [*]	<0,001 ^{***}
Brieftauben ^a		0,16	0,02 [*]
Stadttauben	männlich	0,002 ^{**}	<0,001 ^{***}
	weiblich	<0,001 ^{***}	0,006 ^{**}
Brieftauben	männlich	0,01 [*]	<0,001 ^{***}
	weiblich	0,16	0,29
Brieftauben ^a	männlich	0,06	<0,001 ^{***}
	weiblich	0,23	0,59

schwach signifikant^{*}: $p < 0,05$; signifikant^{**}: $p < 0,01$; hochsignifikant^{***}: $p < 0,001$

^a: Ergebnisse der einfaktorielle Varianzanalyse für unabhängige Stichproben, General Linear Models Procedure (graue Schattierung)

ChE-Aktivität zwischen den Herbst- und Wintermessungen existieren bei weiblichen Stadttauben sowie bei der gleichen Haltungsform ohne Berücksichtigung des Geschlechtsunterschiedes.

Die mittleren ChE-Aktivitäten in Frühjahr und Sommer unterscheiden sich unter Verwendung der trockenchemischen Meßmethode signifikant bei weiblichen Brieftauben sowie schwach signifikant in dieser Population bei beiden Geschlechtern. Zwischen den kalten (Herbst, Winter) und warmen Jahreszeiten (Frühjahr, Sommer) traten in der Mehrzahl der Berechnungen Signifikanzen auf. Bei Berechnung des t-Tests für unabhängige Merkmale (LS Means-Gesamtmittelwertvergleich) bestehen zwischen Herbst und Winter bei weiblichen

(VITROS DT 60 II[®], $p= 0,042^*$) und männlichen Brieftauben (BThChI, $p= 0,028^*$) sowie bei der Stadtaubenpopulation geschlechtsübergreifend (BThChI, $p= 0,014^*$)

Tabelle 11: Saisonale Unterschiede der ChE-Aktivitäten. Berechnung nach Taubengruppen getrennt. 1-Stichproben-t-Test der Differenzen gepaarter Beobachtungen gegen Null (Proc means).

VITROS BThChI	Gruppen	Winter		Frühjahr		Sommer	
Herbst	Stadtauben männlich	0,11 ^a 0,68 ^b	<0,001 ^{***}	0,005 ^{**} <0,001 ^{***}	<0,001 ^{***}	0,007 ^{**} 0,005 ^{**}	<0,001 ^{***}
	Stadtauben weiblich	0,001 ^{**} 0,008 ^{**}		<0,001 ^{***} <0,001 ^{***}		<0,001 ^{***} <0,001 ^{***}	
	Brieftauben männlich	0,13 0,09	0,08 0,18	0,23 0,003 ^{**}	0,007 ^{**}	0,24 0,003 ^{**}	0,98 <0,001 ^{**}
	Brieftauben weiblich	0,22 0,71		0,002 ^{**} 0,006 ^{**}		<0,001 ^{***}	
Winter	Stadtauben männlich			0,007 ^{**} 0,001 ^{**}	0,002 ^{**}	0,03 [*] 0,04 [*]	0,004 ^{**} 0,01 [*]
	Stadtauben weiblich			0,12 0,18		0,001 ^{**}	
	Brieftauben männlich			0,001 ^{**} <0,001 ^{***}	<0,001 ^{***}	0,03 [*] <0,001 ^{***}	0,1 <0,001 ^{***}
	Brieftauben weiblich			0,001 ^{**} 0,024 [*]		0,66 0,24	
Frühjahr	Stadtauben männlich					0,96 0,61	0,55 0,72
	Stadtauben weiblich					0,49 0,48	
	Brieftauben männlich					0,60 0,78	0,014 [*] 0,75
	Brieftauben weiblich					0,007 ^{**} 0,86	
t-Test ^c				Frühjahr + Sommer			
Herbst + Winter	Stadtauben (Anzahl, n= 26)			<0,001 ^{***} <0,001 ^{***}			
	Brieftauben (Anzahl, n= 40)			<0,001 ^{***} <0,001 ^{***}			

schwach signifikant^{*}: $p < 0,05$; signifikant^{**}: $p < 0,01$; hochsignifikant^{***}: $p < 0,001$

a: trockenchemische Messung

b: naßchemische Messung (Substrat BThChI)

c: t-Test für gepaarte Beobachtungen (einseitig). ChE-Aktivität gemittelt über Frühjahr und Sommer bzw. Herbst und Winter.

schwach signifikante, zwischen Frühjahr und Sommer dagegen keine ChE-Aktivitätsunterschiede.

Mit Hilfe des einseitigen t-Tests für verbundene Stichproben konnten, für beide Haltungssysteme getrennt, hochsignifikante Differenzen der mittleren ChE-Aktivitäten in der kalten und warmen Jahreszeit festgestellt werden. Die Berechnungen wurden mit gemittelten Werten der ChE-Aktivitäten aus den „kalten“ Monaten November und Februar und aus den „warmen“ Monaten Mai und August durchgeführt. Es wurden dabei auch solche Individuen erfaßt, von denen pro Jahreshälfte nur ein Meßwert vorlag. Die Meßwerte der ChE-Aktivitäten in den Jahreshälften sind in Kap. 4.5. aufgeführt.

4.4.2 Einfluß des Alters auf die ChE-Aktivität

ChE-Aktivitätsbestimmungen erfolgten wöchentlich bei Nestlingstauben zwischen der ersten und sechsten Lebenswoche und einmalig im Herbst bei halbjährigen Tauben. Zur Messung kam sowohl die trocken- als auch die naßchemische Analyse mit den Substraten BThChI und AThChI zum Einsatz. In Abbildung 13 werden die

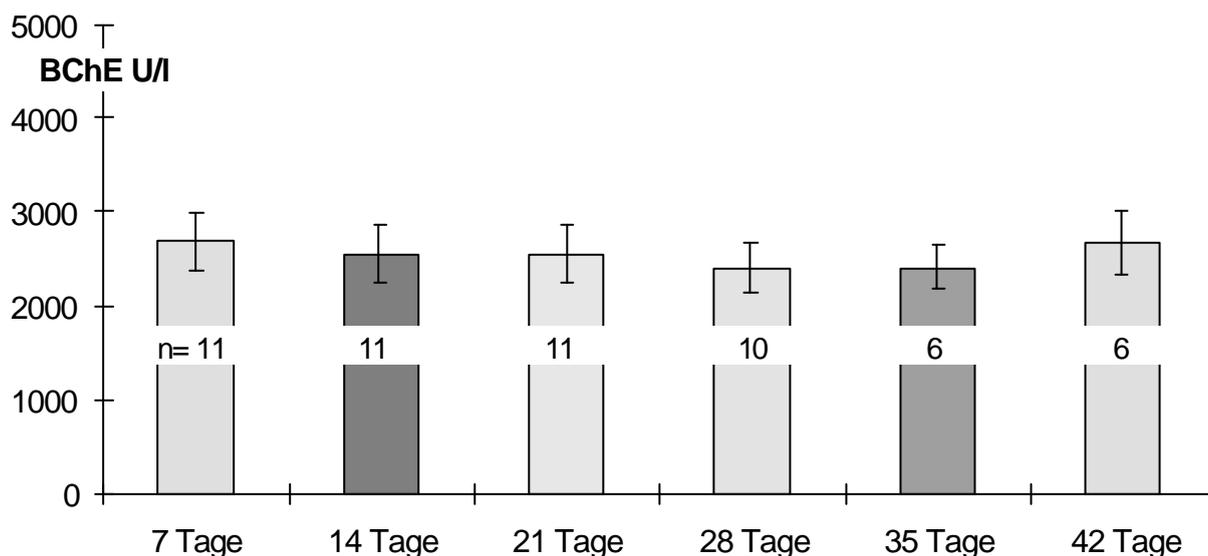


Abbildung 13: Mittlere BChE-Aktivität von Jungtauben im Alter von 7 bis 42 Tagen. In den Säulen Angabe der Stichprobengröße (VITROS DT 60 II®).

trockenchemisch bei den 1- bis 6-wöchigen Tauben gemessenen Werte graphisch dargestellt und die Stichprobengrößen angegeben. In Tabelle 12 werden die Meßergebnisse bei Anwendung der verschiedenen Analyseverfahren dargelegt.

Tabelle 12: ChE-Aktivität von Jungtauben im Alter von 1 bis 6 Wochen bzw. 6 Monaten

		JUNGTAUBEN (Alter in Wochen)						6 Monate	
		1	2	3	4	5	6	A	B
VITROS	n	11	11	11	10	6	6	10	19
	\bar{x}	2692	2544	2557	2412	2414	2682	3554	3547
	s	296	311	315	274	233	330	688	675
	MEDIAN	2741	2478	2430	2427	2445	2658	3687	3503
BThChI	n	11	11	10	10	6	6	10	19
	\bar{x}	2517	2437	2454	2333	2320	2509	3386	3150
	s	303	416	513	347	382	548	624	633
	MEDIAN	2486	2461	2454	2282	2511	2412	3518	3281
AThChI	n	11	11	10	8	6	6	10	19
	\bar{x}	2090	2170	2149	2028	1917	2088	2780	2488
	s	237	312	492	450	260	449	624	633
	MEDIAN	2136	2297	2155	2028	1990	1991	2830	2522

A= Stadttauben, B= Brieftauben. Angabe von Anzahl (n), Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s).

Die statistischen Berechnungen des Einflusses des Alters auf die ChE-Aktivität in der Zeit zwischen dem 7. und 28. Lebenstag (n=10) bzw. 7. und 42. Lebenstag (n=5) mit Hilfe der VA für verbundene Stichproben werden in Tabelle 13 aufgeführt. Signifikante Unterschiede der ChE-Aktivität traten bei der Berechnung des Enzymaktivitätsverlaufes über die ersten 4 Lebenswochen auf (VITROS DT 60 II[®], schwach signifikant). Vergleicht man die einzelnen Meßtage untereinander mit dem t-Test für gepaarte Stichproben (zweiseitig), so bestehen bei trockenchemischer Messung zwischen Tag 7 und 28 (p= 0,015*) sowie Tag 28 und 42 (p=0,029*), bei naßchemischer Messung mit dem Substrat BThChI zwischen Tag 7 und 42 (p= 0,025*) schwach signifikante Unterschiede. Ein Einfluß der Haltungsform auf die

ChE-Aktivität halbjähriger Tauben des Brieftauben- bzw. Stadtaubenbestandes wird statistisch verneint (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, VITROS DT 60 II®: $p=0,98$; BThChI: $p=0,08$; AThChI: $p=0,35$).

Tabelle 13: Einfluß des Alters auf die ChE-Aktivität innerhalb der ersten sechs Lebenswochen. Zweifaktoriellen Varianzanalyse für verbundene Stichproben.

Zeitspanne nach Schlupf	n	VITROS	BThChI	AThChI
7 – 28 Tage ^a	10	0,027*	0,20	0,22
7 – 42 Tage ^a	5	0,16	0,24	0,49

schwach signifikant*: $p < 0,05$; signifikant**: $p < 0,01$; hochsignifikant***: $p < 0,001$

^a: Aproximativer F-Test mit Greenhouse-Geisser-Korrektur für 4 bzw. 6 Untersuchungen im Abstand von 7 Tagen (Univariate tests of hypotheses for within subjects effects)

In Tabelle 14 werden die statistischen Berechnungen des Einflusses des Alters auf die ChE-Aktivitäten zusammengefaßt. Dabei wird zwischen juvenilen, halbjährigen und adulten Tieren unterschieden. Signifikante bis hochsignifikante Unterschiede der ChE-Aktivität bestehen unabhängig von der Meßmethodik-zwischen adulten und juvenilen sowie zwischen halbjährigen und juvenilen Tauben. Die ChE-Aktivitäten der halbjährige und adulten Tiere differieren dagegen nicht.

Tabelle 14: Einfluß des Alters auf die ChE-Aktivität. p-Werte der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit verbundenen Stichproben sowie einseitiger t-Test für unabhängige Stichproben.

	VITROS	BThChI	AThChI
2-faktorielle VA^b			
Alter	<0,001***	<0,001***	0,003**
t-Test^c			
1–6 Wochen / adult ^a	<0,001***	<0,001***	<0,001***
1–6 Wochen / 6 Mon	<0,001***	0,002**	0,011**
6 Monate / adult ^a	0,74	0,46	0,35

schwach signifikant*: $p < 0,05$; signifikant**: $p < 0,01$; hochsignifikant***: $p < 0,001$

^a: ChE-Aktivität im Herbst

^b: Aproximativer F-Test mit Greenhouse-Geisser-Korrektur (Univariate tests of hypotheses for within subjects effects)

^c: LS Means

4.5 Referenzwerte

Tabelle 15: Referenzwerte der ChE-Aktivität der Taube (U/I), unterteilt nach Meßmethode, Alter, Haltungsform sowie warmer und kalter Jahreszeit.

U/I	Alter, Haltung, Jahreszeit		n	Var. Koeff.	\bar{x} (s)	Referenzbereich (95% Fraktile)	
VITROS	adult	gesamt	106	20	3854 (754)	2377 - 5332	
		A	gesamt	44	18	4153 (764)	2656 - 5651
		A	W	35	22	4635 (1033)	2610 - 6660
		A	K	39	17	3792 (645)	2527 - 5056
		B	gesamt	62	19	3642 (675)	2318 - 4966
		B	W	48	19	3706 (720)	2294 - 5118
		B	K	54	19	3633 (688)	2284 - 4981
		6 Monate	29	19	3549 (667)	2241 - 4857	
		Nestling	11	9	2573 (225)	2132 - 3014	
	BThChI	adult	gesamt	106	20	3604 (720)	2193 - 5015
A			gesamt	44	18	3949 (725)	2528 - 5370
A			W	35	21	4433 (929)	2612 - 6253
A			K	35	17	3558 (595)	2391 - 4725
B			gesamt	62	18	3358 (612)	2159 - 4558
B			W	48	19	3540 (655)	2256 - 4824
B			K	54	19	3245 (624)	2022 - 4468
		6 Monate	29	19	3231 (629)	1998 - 4465	
		Nestling	11	14	2467 (351)	1779 - 3156	
AThChI			adult	104	19	2911 (564)	1807 - 4016
		6 Monate	28	17	2599 (452)	1713 - 3484	
		Nestling	11	15	2134 (312)	1522 - 2745	

Haltungsform: A= Stadtauben, B= Brieftauben; Jahreszeit: W= Frühjahr u. Sommer, K= Herbst u. Winter. Angabe der Stichprobengrößen (n), von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s) und dem Variationskoeffizienten (Var. Koeff.).

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die mit den verschiedenen Meßmethoden erstellten Referenzbereiche der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tauben.

Die Gesamtstichprobengruppe wird in die Untergruppen der adulten Tauben, adulten Brief- bzw. Stadtauben sowie beiden Haltungsformen in warmer (Frühjahr- und Sommermessung) und kalter Jahreszeit (Herbst- und Wintermessung) aufgeteilt.

Die mittleren ChE-Aktivitäten der juvenilen und halbjährigen Tauben werden separat aufgeführt. Referenzbereiche, welche unter Verwendung des Meßsubstrats AThChI erstellt wurden, werden ausschließlich für die Gesamtstichprobengruppen der drei Altersstufen dargestellt.

Neben der Stichprobengröße, dem arithmetischen Mittelwert, der Standardabweichung und dem Korrelationskoeffizienten sind die Referenzbereiche als 95% Fraktile aufgeführt.

4.6 Diagnostische Reaktivierung

4.6.1 Diagnostische Reaktivierung nach ChE-Hemmung *in vitro* durch Parathion und Carbofuran

4.6.1.1 Hemmkonzentrationen von Parathion und Carbofuran

Die ChE-Hemmung *in vitro* sollte zu einem hochgradigen Aktivitätsabfall ohne Akkumulation überschüssiger Inhibitormoleküle führen. Zur Bestimmung hierfür geeigneter Pestizidkonzentrationen wurde die BChE-Aktivität in mit ansteigenden Konzentrationen von Parathion oder Carbofuran inhibierten Plasmaproben bestimmt (Abb. 14 u. 15). Der zeitliche Verlauf der ChE-Hemmung innerhalb der ersten 2h nach Zugabe des Inhibitors bei Zimmertemperatur wird in Abb. 16 dargestellt.

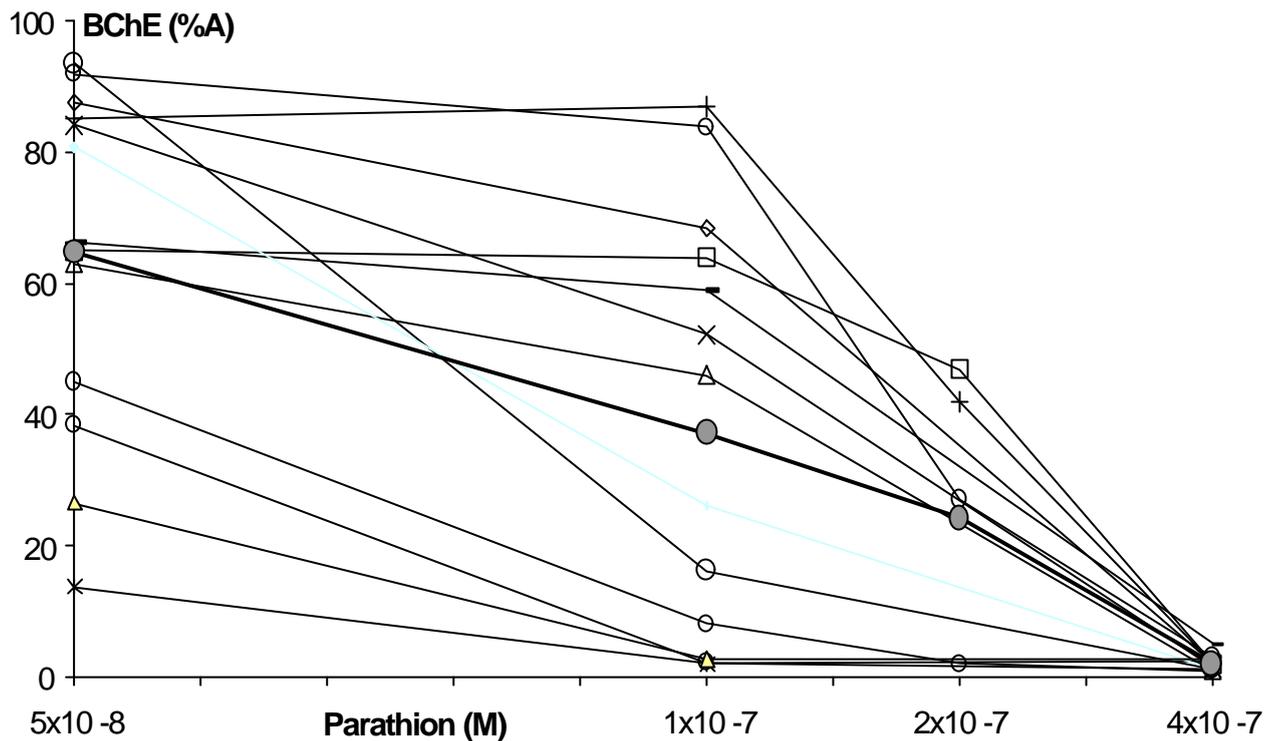


Abbildung 14: Parathion-Verdünnungsreihe. BChE-Aktivität in % des Ausgangswerts (%A). Parathionkonzentration in Mol in der Ausgangslösung. Substrat BThChI (n=13). Der Mittelwert ist hervorgehoben.

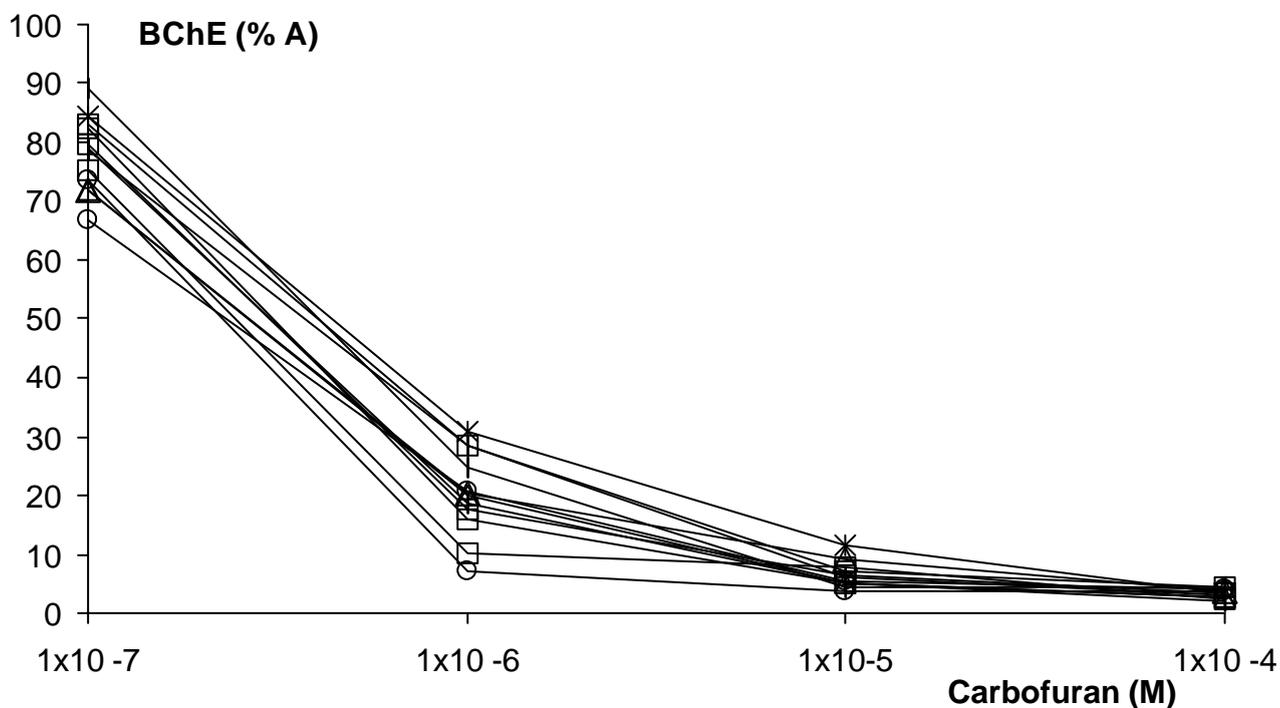


Abbildung 15: Carbofuran-Verdünnungsreihe. Enzymaktivität in % des Ausgangswertes (%A). Carbofurankonzentration in Mol in der Ausgangslösung. Substrat BThChI, n=12.

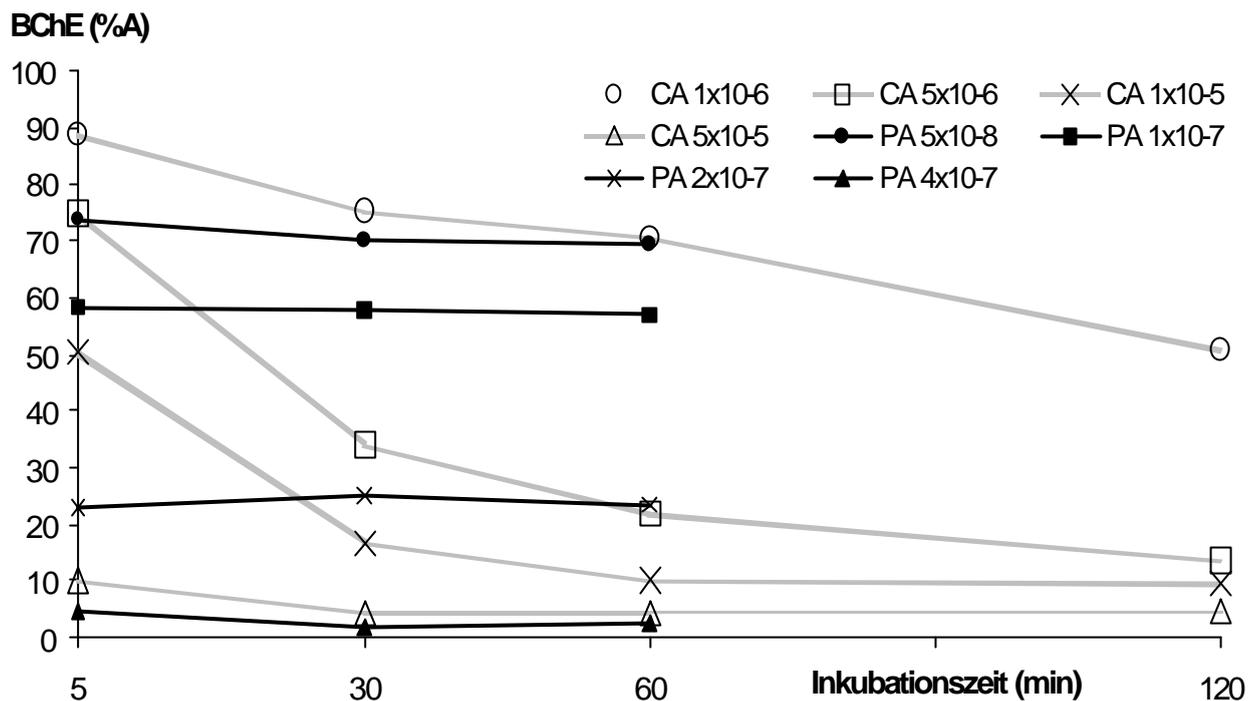


Abbildung 16: ChE-Inhibitionsverlauf durch *in vitro*-Inkubation mit Parathion (schwarze Linien) bzw. Carbofuran (graue Linien) in verschiedenen Konzentrationen (Carbofuran 1×10^{-6} bis 5×10^{-5} , Parathion 5×10^{-8} bis 4×10^{-7} M/l in der Ausgangslösung), Zimmertemperatur, $n=5$.

4.6.1.2 Einfluß von Inkubationszeit und -temperatur auf die spontane Reaktivierung

In den Tabellen 16 und 17 werden die Ergebnisse der thermischen Reaktivierung von durch zwei Konzentrationsstufen des Parathions und Carbofurans gehemmten Plasmaproben zusammengefaßt. Die Proben wurden maximal 24 h bei drei verschiedenen Temperaturen inkubiert, die BChE-Aktivität dabei in regelmäßigen Abständen protokolliert.

Die prozentuale Angabe der Reaktivierung (%R) bezieht sich auf den jeweils 1 h nach Inhibitorzusatz gemessenen Hemmwert. Ergeben sich nach einer Stunde Inkubation höhere ChE-Aktivitäten bei 18 °C oder 37 °C als bei Kühlschranktemperatur, so wird zusätzlich die prozentuale Hemmung in Bezug zur 1h/4 °C-Aktivität berechnet (%R 4 °C). Die Ergebnisse der Enzymmessungen der

Carbofuran-inhibierten Proben werden nach der Inhibitorkonzentration im Hemmansatz in zwei Gruppen unterteilt, die sich durch die Höhe der initialen Aktivitätshemmung unterscheiden. Wie in Kap. 4.6.1.1. (Abb. 14) gezeigt werden konnte, schwankt bei den verschiedenen Parathionkonzentrationen die Höhe der ChE-Inhibition dagegen erheblich. Die in den Parathion-gehemmten Plasmaproben bestimmten ChE-Aktivitäten werden deshalb zur besseren Vergleichbarkeit nach der prozentualen Hemmung des 1h/4 °C-Werts in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich solche, die nach 1 h Inkubation bei 4 °C einen Hemmwert <5 %A oder von 5 bis 50 %A aufwiesen.

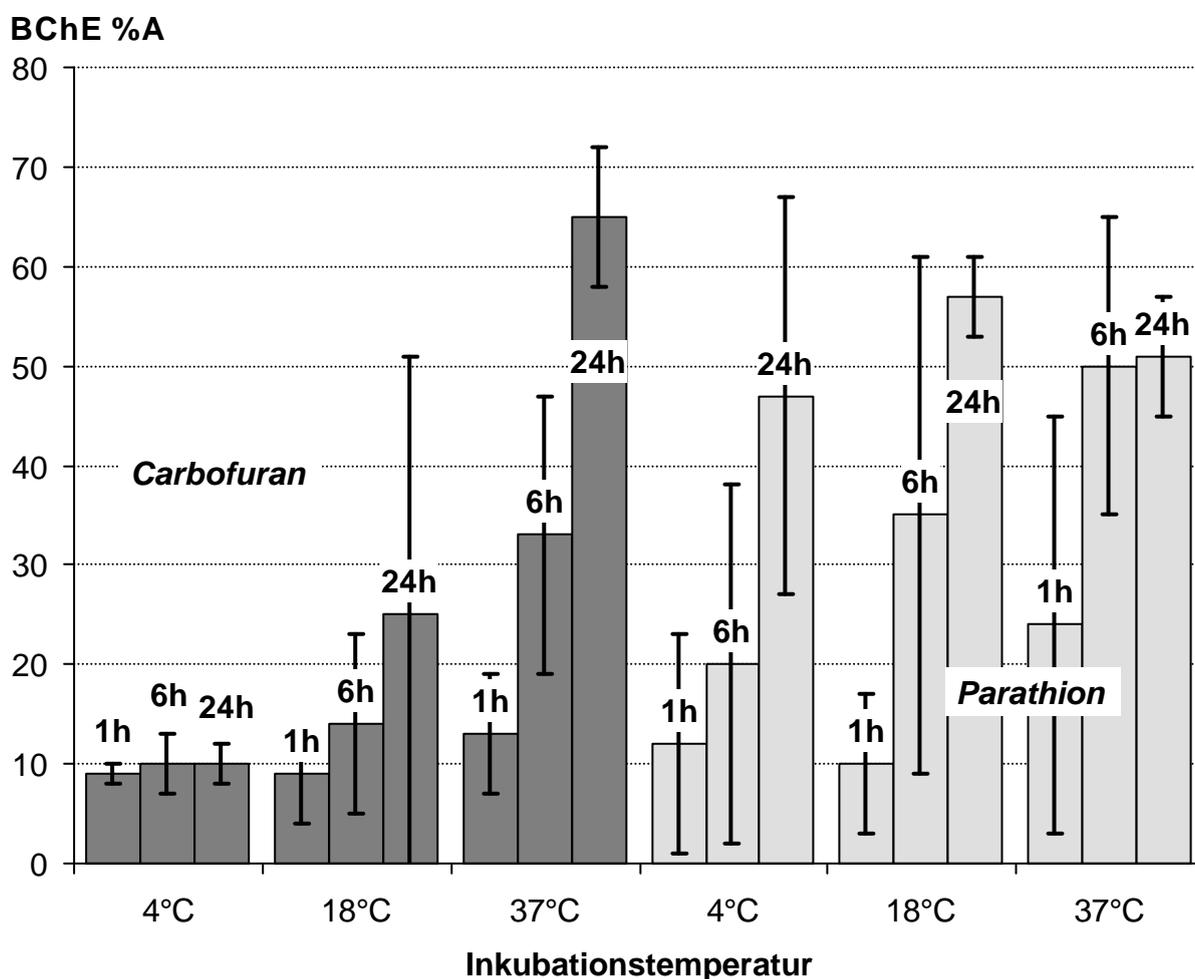


Abbildung 17: Gegenüberstellung der thermischen Reaktivierung von carbamylierten [dunkle Schraffierung] (1×10^{-5} M Carbofuran, $n=5$) und phosphorylierten Plasmaproben [helle Schraffierung]. Darstellung derjenigen Parathion-inhibierten Proben (1 bzw. 2×10^{-7} M), bei denen die ChE-Aktivität des Hemmansatzes nach 1h Lagerung bei 4°C um 9% des Ausgangswerts betrug ($n=6$). Die Inkubationszeit in Stunden und die Standardabweichung ist über den Säulen angegeben.

Abbildung 17 stellt die ChE-Reaktivierung der *in vitro* mit Carbofuran und Parathion versetzten Plasmaproben gegenüber. Bei den Carbofuran (1×10^{-5} M)-inhibierten Plasmaproben besteht nach 1h Inkubation bei 4 °C eine mittlere ChE-Aktivität von 9 %A. Ihnen werden in dieser Graphik zur besseren Vergleichbarkeit diejenigen Parathion (1 oder 2×10^{-7} M)-inhibierten Proben gegenübergestellt, die eine ähnliche Enzymhemmung nach dieser Inkubationszeit aufweisen.

Tabelle 16: Thermische Reaktivierung von *in vitro* mit Parathion verschiedener Konzentrationsstufen inhibierten Plasmaproben. ChE-Aktivitätsmessung nach 1, 6, 12 und 24 h. Angabe der Enzymaktivität in %A, %R und in Bezug zum 1h/4 °C-Meßwert (%R 4 °C).

4 °C \bar{x} (s) ^a				18 °C \bar{x} (s)				37 °C \bar{x} (s)			
	n=	%A	%R	n=	%A	% R	% R 4 °C	n=	%A	% R	%R 4 °C
PARATHION %A < 5%^b											
1h	8	2 (1)		5	2 (1)			8	2 (0)		
6h	8	3 (2)	1 (2)	5	6 (6)	4 (5)		8	12 (16)	11 (16)	
12h	5	5 (5)	3 (4)	5	12 (11)	9 (11)		5	27 (19)	26 (19)	
24h	8	17 (24)	16 (24)	5	35 (28)	34 (29)		8	21 (19)	20 (19)	
PARATHION %A 5 – 50%^c											
1h	7	30 (18)		5	40 (20)		4 (19)	7	45 (19)		20 (17)
6h	7	45 (26)	25 (21)	5	65 (12)	39 (16)	42 (18)	7	64 (7)	31 (13)	46 (8)
12h	5	54 (20)	21 (10)	5	71 (6)	48 (8)	52 (5)	5	65 (8)	27 (14)	42 (12)
24h	7	58 (20)	42 (17)	5	72 (14)	55 (9)	56 (15)	7	60 (8)	44 (55)	41 (10)

^a: Jeweils Angabe der Stichprobengröße, des Mittelwerts (\bar{x}) und der Standardabweichung (s) in Klammern.

^b: zu dieser Gruppe zählen Plasmaproben, die 1 h nach Parathionzugabe bei einer Inkubations-temperatur von 4 °C eine ChE-Aktivität < 5% des Ausgangswerts aufwiesen.

^c: zu dieser Gruppe zählen Plasmaproben, die bei gleichen Bedingungen wie „^a“ eine ChE-Aktivität von 5 bis 50 % des Ausgangswerts aufwiesen.

Tabelle 17: Thermische Reaktivierung von *in vitro* mit Carbofuran zweier Konzentrationsstufen inhibierten Plasmaproben. ChE-Aktivitätsmessung nach 1, 3, 6, 12 und 24 h. Angabe der Enzymaktivität in %A, %R und in Bezug zum 1h/4 °C-Meßwert.

4 °C \bar{x} (s) ^a				18 °C \bar{x} (s)						37 °C \bar{x} (s)					
	n	%A	%R	n	%A	n	%R	n	%R 4 °C	n	%A	n	%R	n	%R 4 °C
CARBOFURAN 1x10⁻⁵ M %A 9% (1h- 4 °C Wert)															
1h	5	9 (1)		10	9 (5)	10		5	4 (3)	10	13 (6)	10		5	10 (3)
3h	5	8 (2)	0 (1)	10	9 (4)	10	0 (1)	5	4 (2)	10	20 (10)	10	8 (7)	5	22 (7)
6h	5	10 (3)	1 (3)	10	14 (9)	10	6 (6)	5	15 (3)	10	33 (14)	10	23 (14)	5	40 (13)
12h	5	11 (3)	3 (3)	10	14 (9)	10	6 (6)	5	13 (9)	10	54 (13)	10	47 (12)	5	59 (13)
24h	5	10 (2)	1 (3)	10	25 (26)	10	19 (26)	5	38 (29)	10	65 (7)	10	59 (8)	5	61 (9)
CARBOFURAN 1x10⁻⁶ M %A > 50% (1h- 4 °C Wert)															
1h	5	66 (14)		10	42 (21)	10				10	54 (14)	10			
3h	5	53 (10)	-52 (49)	10	49 (18)	10	9 (15)			10	68 (12)	10	31 (12)		
6h	5	51 (4)	-62 (60)	10	65 (21)	10	44 (20)			10	69 (8)	10	26 (34)		
12h	5	59 (16)	-25 (55)	10	78 (20)	10	67 (23)			10	63 (8)	10	15 (26)		
24h	5	57 (7)	-40 (40)	10	88 (15)	10	82 (19)			10	59 (10)	10	2 (37)		

^a: Jeweils Angabe der Stichprobengröße, des Mittelwerts (\bar{x}) und der Standardabweichung (s) in Klammern.

4.6.1.3 Oxim-induzierte Reaktivierung nach *in vitro*-Hemmung

Die reaktivierende Potenz verschiedener Obidoxim-Verdünnungen sowie der Einfluß der Inkubationszeit und -temperatur auf diese Oxim-induzierte Reaktivierung wurden untersucht.

In Tabelle 18 werden die Ergebnisse der Untersuchung zur Reaktivierbarkeit von mit drei Konzentrationsstufen des Parathions oder Carbofurans gehemmten Plasmaproben durch Inkubation mit verschiedenen Obidoxim-Konzentrationen zusammengefaßt.

Tabelle 18: Oxim-induzierte Reaktivierung der *in vitro* mit Parathion bzw. Carbofuran dreier Konzentrationsstufen (M in der Ausgangslösung) inhibierten ChE: Vergleich der reaktivierenden Potenz dreier Verdünnungsstufen des Obidoxim.

\bar{x} (s) ^a		Parathion (M)			Carbofuran (M)		
		5×10^{-8}	1×10^{-7}	4×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}
Anzahl (n)		6	6	6	5	5	5
Hemmansatz %A		61 (28)	21 (26)	2 (1)	78 (5)	19 (3)	5 (1)
%R ^b (nach 1 h Inkubation mit Obidoxim)	10 mM ^c	83 (13)	69 (23)	5 (2)	56 (22)	30 (4)	7 (2)
	1 mM ^c	45 (20)	29 (26)	1 (3)	6(15)	6 (2)	0 (1)
	0,1 mM ^c	12 (14)	10 (16)	0 (1)	5 (25)	4 (3)	0 (1)

a: Angabe von Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s)

b: %R: prozentuale Reaktivierung nach HOBBIKER (1957)

c: Inkubation mit Inhibitor und Obidoxim jeweils 1 h bei Zimmertemperatur. Verdünnung des Obidoxims mit physiologischer NaCl-Lösung auf 0,1 mM bis 10 mM.

Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Oxim-induzierte Reaktivierung. Spontane (thermische) und Oxim-induzierte Reaktivierung können in einer Probe parallel verlaufen. Um ausschließlich die Oxim-induzierte Reaktivierung vergleichen zu können, wird in Tabelle 19 zusätzlich die Differenz der beiden Reaktivierungen aufgeführt.

Tabelle 19: Ergebnisse der Oxim-induzierten Reaktivierung von *in vitro* mit Parathion oder Carbofuran inhibierten Plasmaproben: Einfluß der Inkubationszeit und -temperatur.

\bar{x} (s)	4 °C		18 °C		37 °C	
	Oxim %R ^a	Differenz ^b %R Oxim/ thermisch	Oxim %R	Differenz %R Oxim/ thermisch	Oxim %R	Differenz %R Oxim/ thermisch
PARATHION^c, n=10						
1h	32 (28)		42 (33)	47 (40)	47 (36)	39 (29)
6h	46 (32)	41 (28)	57 (25)	39 (20)	48 (37)	26 (19)
12h	58 (31)	52 (25)	52 (34)	28 (14)	51 (27)	24 (19)
24h	49 (34)	26 (24)	59 (29)	33 (14)	42 (31)	18 (13)
CARBOFURAN 1×10^{-5} M^d, n=5						
1h	7 (2)		6 (3)	7 (3)	11 (1)	7 (2)
3h	5 (4)	7 (2)	7 (2)	7 (2)	14 (3)	6 (4)
6h	1 (7)	3 (3)	9 (3)	8 (2)	23 (8)	4 (10)
12h	3 (5)	4 (8)	7 (3)	4 (2)	46 (14)	3 (15)
24h	6 (4)	7 (2)	10 (2)	7 (1)	86 (17)	22 (16)
CARBOFURAN 1×10^{-6} M^e, n=5						
1h	21 (13)		34 (2)	29 (4)	46 (18)	22 (16)
3h	28 (9)	21 (7)	50 (7)	43 (10)	65 (27)	19 (22)
6h	35 (2)	40 (3)	61 (10)	44 (9)	91 (4)	32 (6)
12h	47 (4)	46 (6)	72 (17)	23 (18)	83 (11)	37 (9)
24h	80 (17)	39 (9)	87 (10)	16 (23)	87 (14)	44 (10)

^a: Berechnung der Reaktivierung der ChE-Aktivität als %R in Bezug zur 1h/4 °C-Aktivität

^b: Differenz der prozentualen Oxim-induzierten (Oxim %R) und thermischen Reaktivierungen

^c: Parathionkonzentration in der Ausgangslösung: 1 oder 2×10^{-7} M. Nach 1h Inkubation bei 4 °C lag eine ChE-Aktivität von 8 %A (s=11) vor

^d: Nach 1h Inkubation bei 4 °C lag eine ChE-Aktivität von 12 %A (s=3) vor

^e: Nach 1h Inkubation bei 4 °C lag eine ChE-Aktivität von 22 %A (s=2) vor

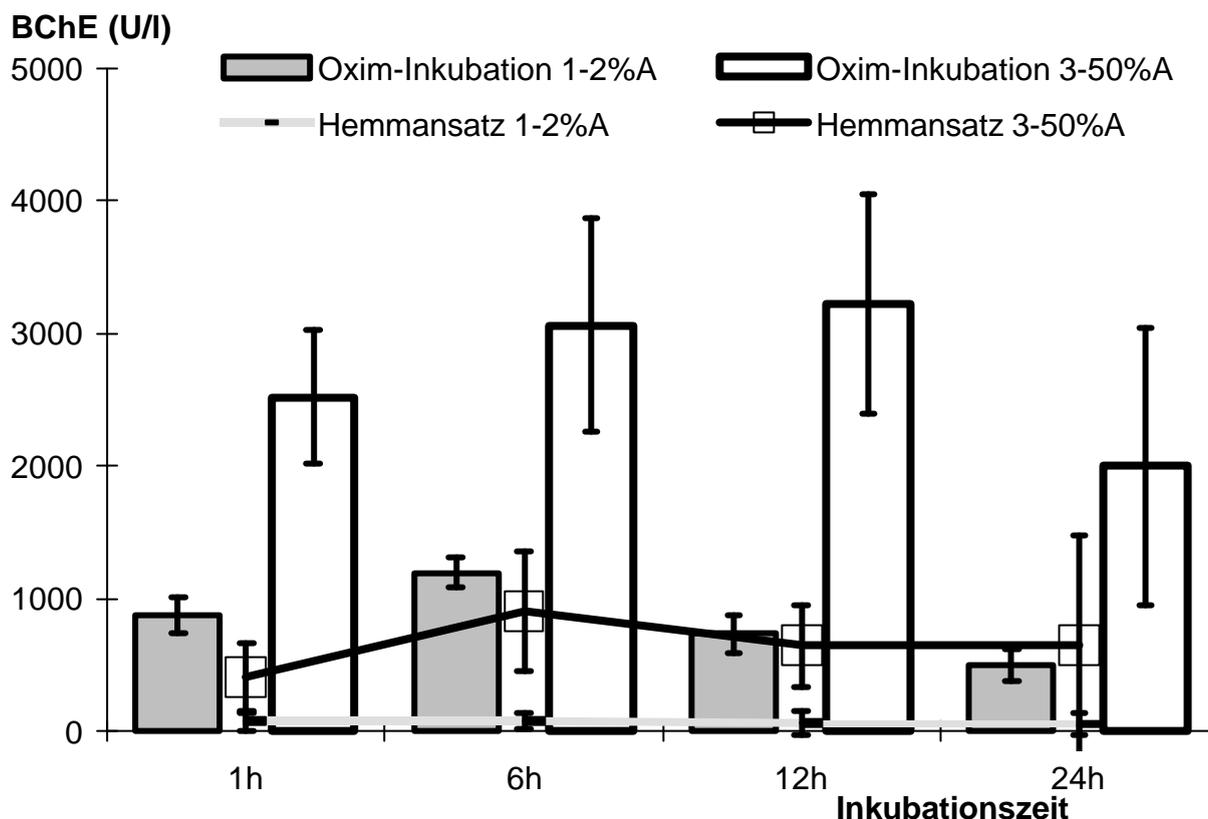


Abbildung 18: Oxim-induzierte Reaktivierung von Parathion- (1, 2 bzw. 4×10^{-7} M; 1h Inkubation) gehemmten Plasmaproben 1, 6, 12 und 24 h nach Oximgabe (Obidoxim-Konzentration in der Ausgangslösung: 10 mM), Inkubation bei $+4^{\circ}\text{C}$. Die Linien stellen die mittleren ChE-Aktivitäten der Hemmansätze, die Säulen die der Obidoxim-versetzten Proben dar. Zur besseren Übersicht wurden die Plasmaproben unterteilt und in zwei Gruppen zusammengefaßt. Diese umfassen Proben, deren 1 h-Hemmwert entweder bei 1 bis 2% ($n=8$) oder bei 3 bis 50% ($n=5$) des Ausgangswerts lagen. Die senkrechten Linien stellen die Ergebnisbereiche, nicht die Standardabweichungen dar.

Der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Oxim-induzierter Reaktivierung (10 mM Obidoxim-Ausgangslösung) bei einer Inkubationstemperatur von 4°C wird in den Abbildungen 18 (Parathion) und 19 (Carbofuran) veranschaulicht. Nach 1 h Inkubation ist in beiden Gruppen eine deutliche Oxim-induzierte Reaktivierung festzustellen. Bei den mit Parathion nach 1 h bei 4°C auf 1 bis 2 %A gehemmten Plasmaproben zeigt sich nach 6-stündiger Inkubation mit Obidoxim ein weiterer Anstieg der Reaktivierung. Dieser besteht auch in der Gruppe der schwächer mit Parathion gehemmten Plasmaproben. Bei diesen ist zusätzlich parallel ein Anstieg

der thermischen Reaktivierung festzustellen. Nach 12- oder 24-stündiger Inkubation mit Obidoxim ist kein weiterer Anstieg der Reaktivierung zu beobachten.

Bei den hochgradig mit Carbofuran (1×10^{-5} M) gehemmten Plasmaproben unterscheidet sich die Oxim-induzierte Reaktivierung zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten nicht. In der Gruppe der mit 1×10^{-6} M Carbofuran inhibierten Plasmaproben steigen bei fortschreitender Inkubationszeit sowohl die Oxim-induzierte, als auch die spontane Reaktivierung stetig an.

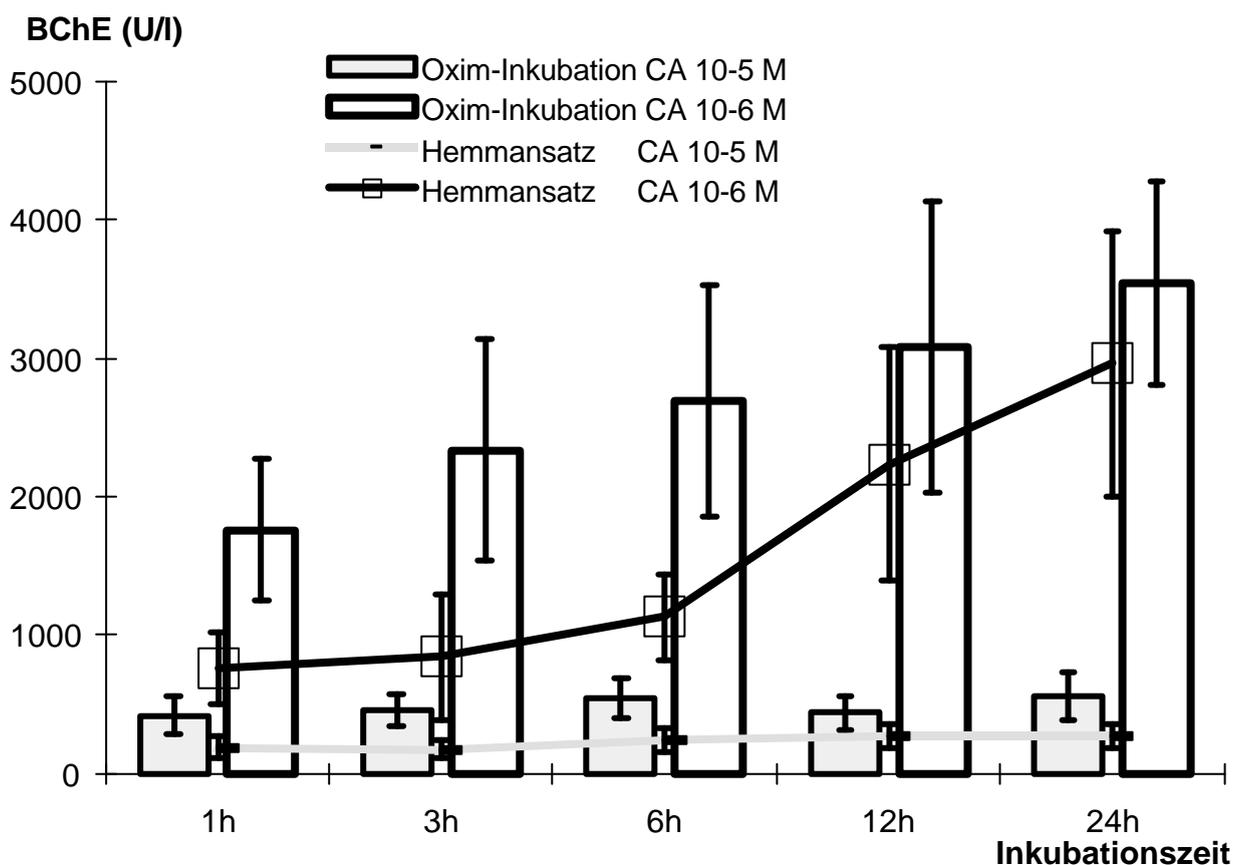


Abbildung 19: Oxim-induzierte Reaktivierung von jeweils 5 *in vitro* mit Carbofuran (1×10^{-5} bzw. 1×10^{-6} M; 1 h Inkubation) gehemmten Plasmaproben 1, 3, 6, 12 und 24 h nach Oximgabe (Obidoxim-Konzentration in der Ausgangslösung: 10 mM) und Lagerung bei $+4^\circ\text{C}$. Die Linien stellen die mittleren ChE-Aktivitäten in den Hemmansätzen, die Säulen die in den mit Obidoxim behandelten Plasmaproben nach unterschiedlicher Inkubationszeit gemessenen Aktivitäten dar.

Die Abbildungen 20 (Parathion) und 21 (Carbofuran) zeigen die Reaktivierbarkeit von phosphorylierter und carbamylierter ChE in Anschluß an eine maximal dreitägige Lagerung der gehemmten Proben bei 4°C durch eine 0,01 molare Obidoxim-

Ausgangslösung. Bei der Meßreihe von $n=10$ mit Parathion gehemmten Plasmaproben zeigen drei Ansätze sehr hohe spontane Reaktivierungen, die nicht in Abbildung 19 berücksichtigt werden. Nach maximal 72 h Lagerung der inhibierten Plasmaproben bei 4 °C ist in keinem Fall ein Rückgang der Reaktivierbarkeit festzustellen.

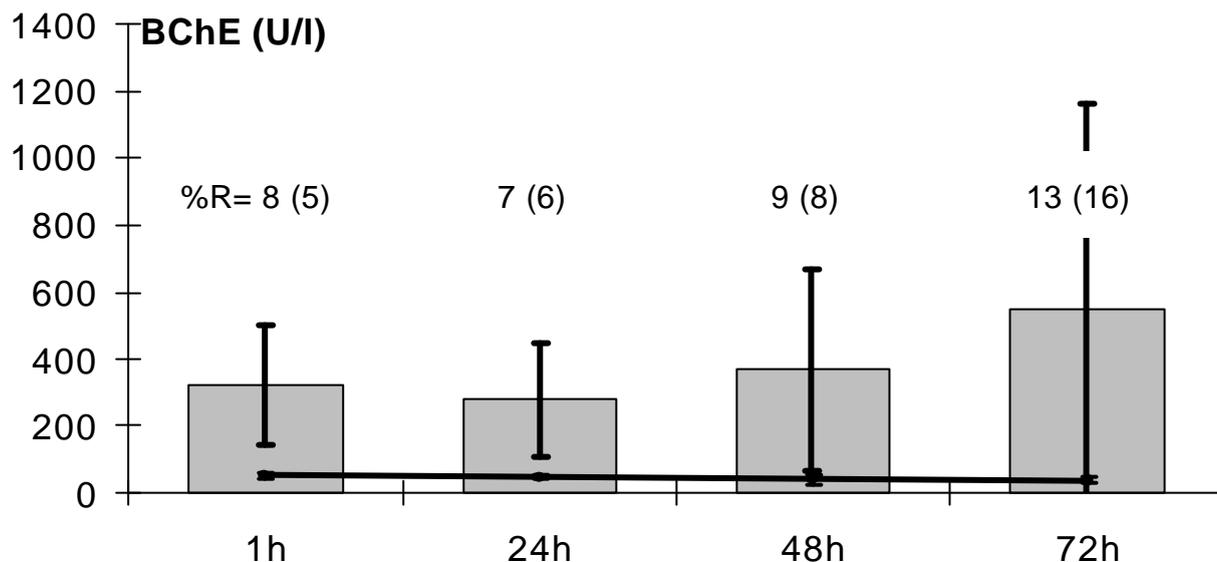


Abbildung 20: Chemische Reaktivierung von $n=7$ *in vitro* mit Parathion (2 bzw. 4×10^{-7} M) inhibierten Plasmaproben. Nach einer Inkubation der gehemmten Proben über eine Zeitspanne von 1, 24, 48 und 72 h bei $+4^\circ\text{C}$ erfolgte eine sechsstündige Inkubation mit Obidoxim (10 mM i. d. Ausgangslösung) bei $+4^\circ\text{C}$. Die Linie zeigt die mittlere ChE-Aktivitäten der Hemmansätze, die Höhe der Balken die Aktivität nach Obidoximeinwirkung in U/l. Als Zahlenwert ist die prozentuale Reaktivierung im Bezug zum 1 h-Wert als Mittelwert (Standardabweichung) abgebildet.

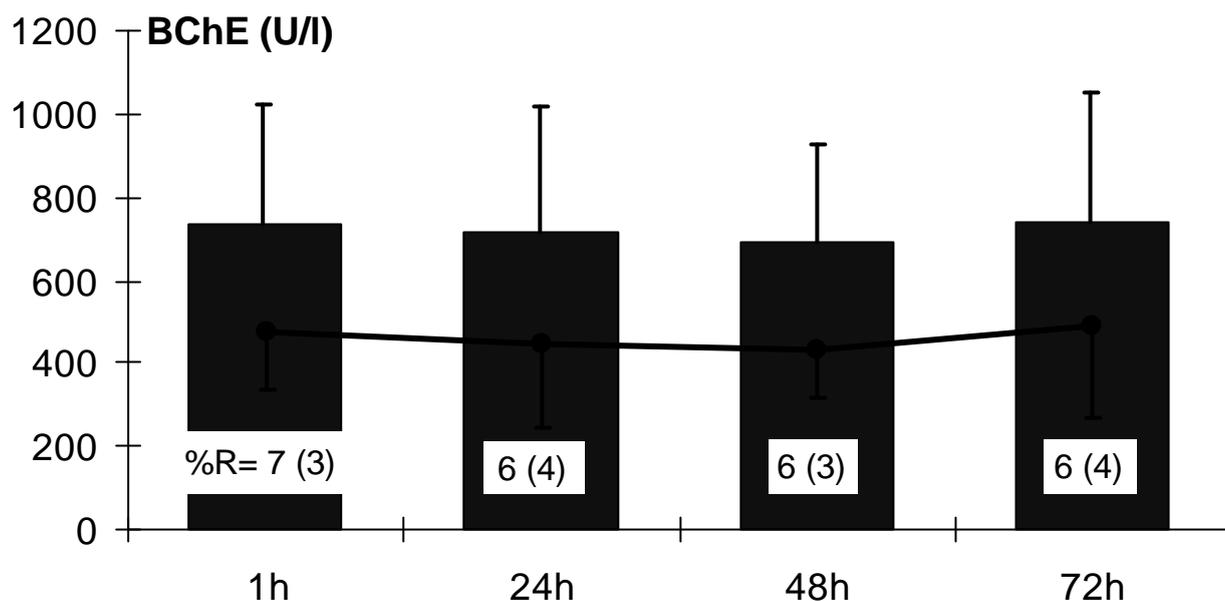


Abbildung 21: Chemische Reaktivierung von $n=5$ *in vitro* mit Carbofuran (1×10^{-5} M) inhibierten Plasmaproben. Nach einer Inkubation des inhibierten Plasmas über eine Zeitspanne von 1, 24, 48 und 72 h bei $+4^\circ\text{C}$ erfolgte eine sechsstündige Inkubation mit Obidoxim bei $+4^\circ\text{C}$. Die Linie zeigt die mittlere ChE-Aktivitäten der Hemmansätze, die Höhe der Balken die Aktivität nach Obidoximeinwirkung (10 mM i. d. Ausgangslösung) in U/l. Als Zahlenwert ist die prozentuale Reaktivierung im Bezug zum 1 h-Wert (mit Standardabweichung) abgebildet.

4.6.2 Diagnostische *in vitro*-Reaktivierung *in vivo* gehemmter ChE

Nüchternen Tauben wurde oral Parathion ($n=6$) und Carbofuran ($n=6$) verabreicht. Nach Applikation von Carbofuran konnte bei keiner Taube eine Vergiftungssymptomatik beobachtet werden. Nach Parathiongabe zeigten zwei Tauben über einen Zeitraum von 1 bis 2 h Apathie und Hypersalivation. Zwei weitere Tiere waren ausschließlich apathisch.

In bestimmten Abständen *p. appl.* erfolgten Blutentnahmen mit unmittelbarer Messung der ChE-Aktivität im Plasma (Hemmwert). Aliquote der Plasmaproben wurden zur thermischen Reaktivierung bei 4° und 37°C sowie zur Oxim-induzierten Reaktivierung nach Zugabe von Obidoxim dreier Verdünnungsstufen bei 4°C inkubiert. Es erfolgten in regelmäßigen Abständen Messungen der ChE-Aktivität in den inkubierten Proben. Die ChE-Aktivitäten werden als prozentualer Anteil am

Ausgangswert (%A) oder Hemmwert (%R) quantifiziert. Die Tabellen 20 bis 22 enthalten den Mittelwert (\bar{x}) und in Klammern die Standardabweichung (s) der jeweils in einer Taubengruppe (n= 6) bestimmten Werte.

Die ChE-Aktivität in den Obidoxim-versetzten Proben wurden sowohl trocken- als auch naßchemisch bestimmt. Bei den beiden höher konzentrierten Obidoxim-Verdünnungen wurde die in den Vorversuchen bestimmte, Oxim-induzierte Substrathydrolyse (Kap. 4.1.3) durch Korrektur des Meßwerts berücksichtigt.

4.6.2.1 *In vivo* Verlauf der ChE-Aktivität nach oraler Applikation von Parathion bzw. Carbofuran

Die ChE-Aktivitätsverläufe *in vivo* 1 bis 72 h nach der oralen Verabreichung von Parathion (0,5 mg/kg) sowie 2 bis 24 h nach oraler Applikation von Carbofuran (0,6 mg/kg), die mit dem trockenchemischen Analysensystem gemessen wurden, werden in den Abbildungen 22 und 24 dargestellt.

Die Abbildungen 23 und 25 zeigen die Korrelationen zwischen dem zeitlichen Abstand von der Pestizidaufnahme (Parathion 1 bis 12 h, Carbofuran 2 bis 24 h *p. appl.*) und der Enzymaktivität in %A.

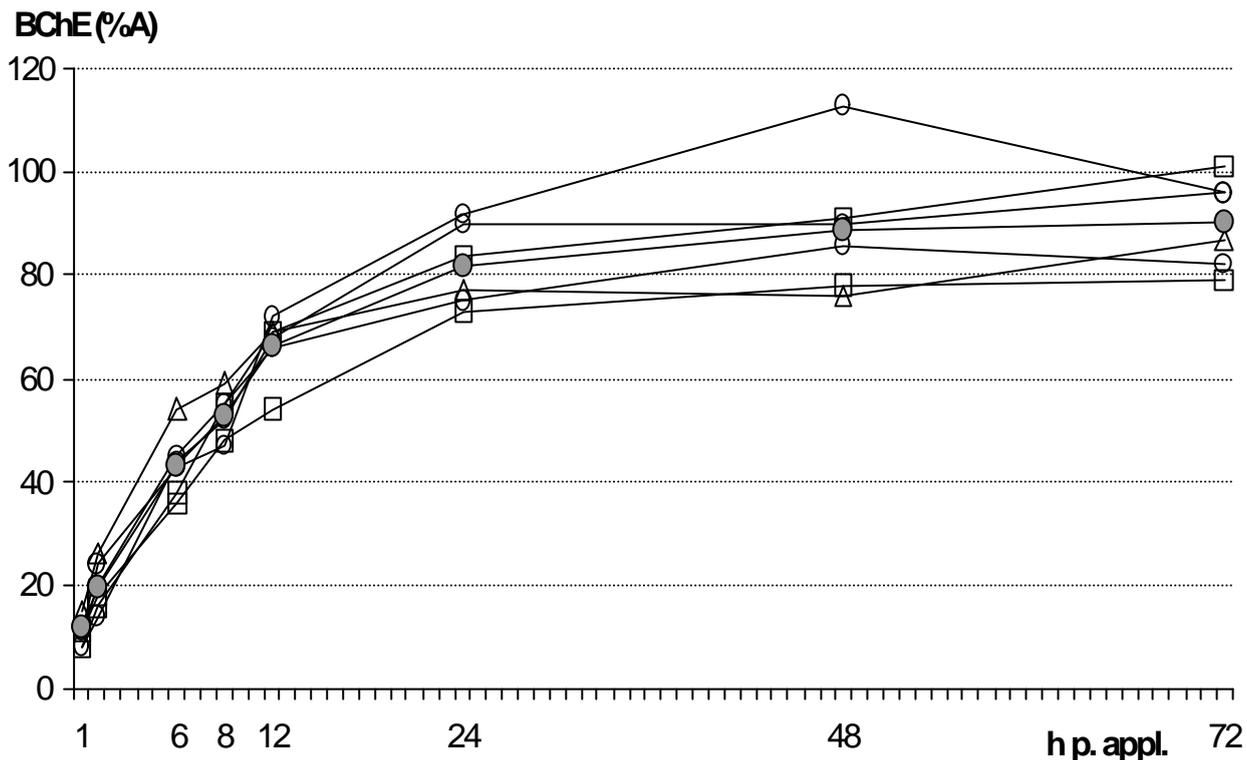


Abbildung 22: ChE-Aktivität (%A) im Plasma von 6 Tauben nach peroraler Gabe von Parathion (0,5 mg/kg). Kontrolle nach 1, 6, 8 12, 24, 48 und 72 h. Die hervorgehobene Linie stellt den Mittelwert dar.

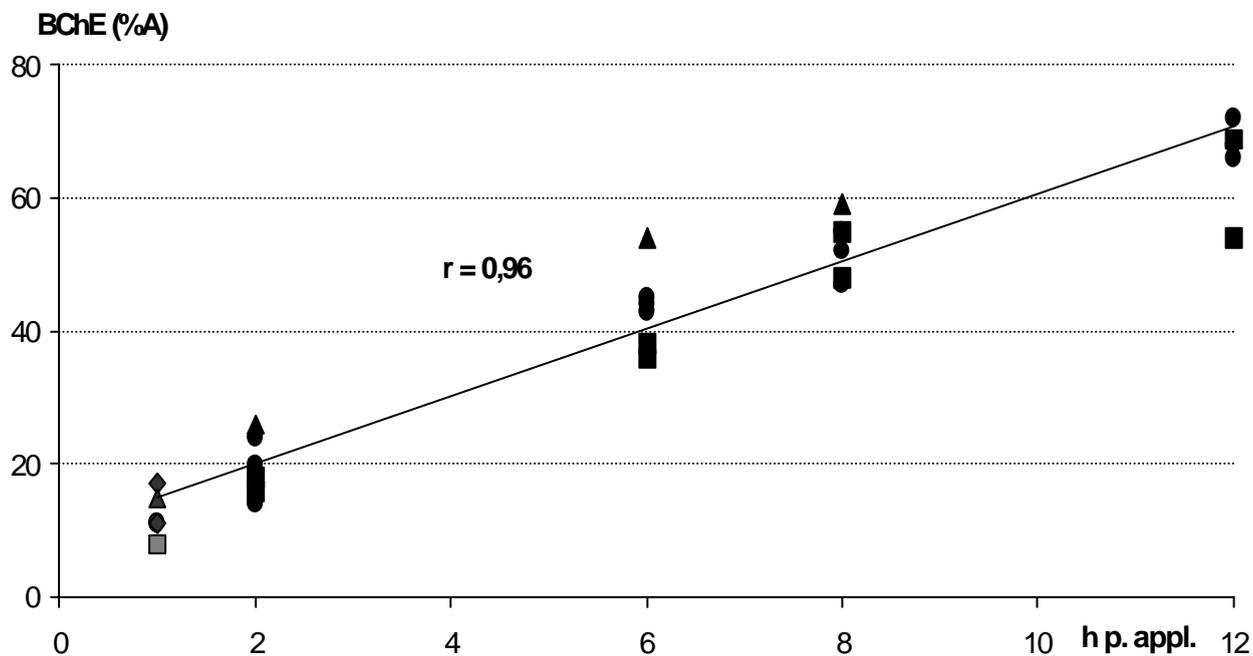


Abbildung 23: Korrelation des ChE-Aktivitäts-Verlaufs (%A) im Plasma von 6 Tauben nach peroraler Gabe von Parathion mit dem zeitlichen Abstand zur Applikation (1 bis 12 h p. appl.). r= Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

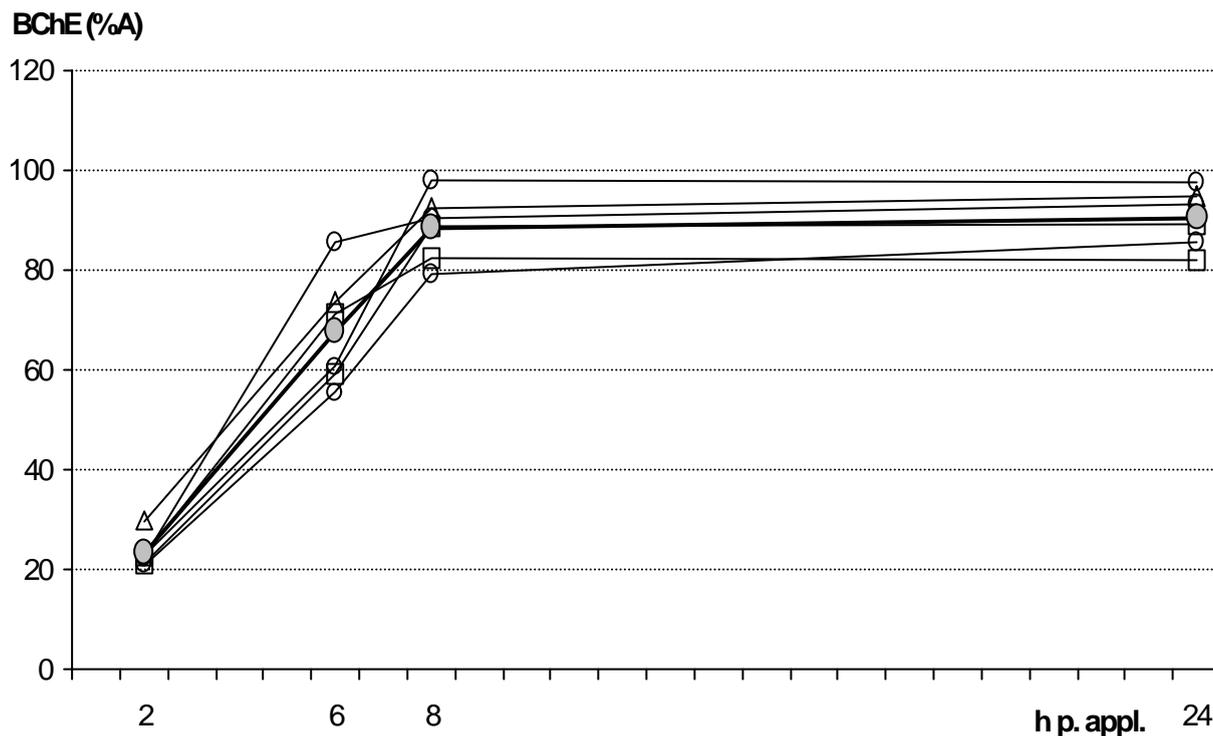


Abbildung 24: ChE-Aktivität (%A) im Plasma von 6 Tauben nach peroraler Gabe von Carbofuran (0,6 mg/kg). Kontrolle nach 2, 6, 8 und 24 h. Die hervorgehobene Linie stellt den Mittelwert dar.

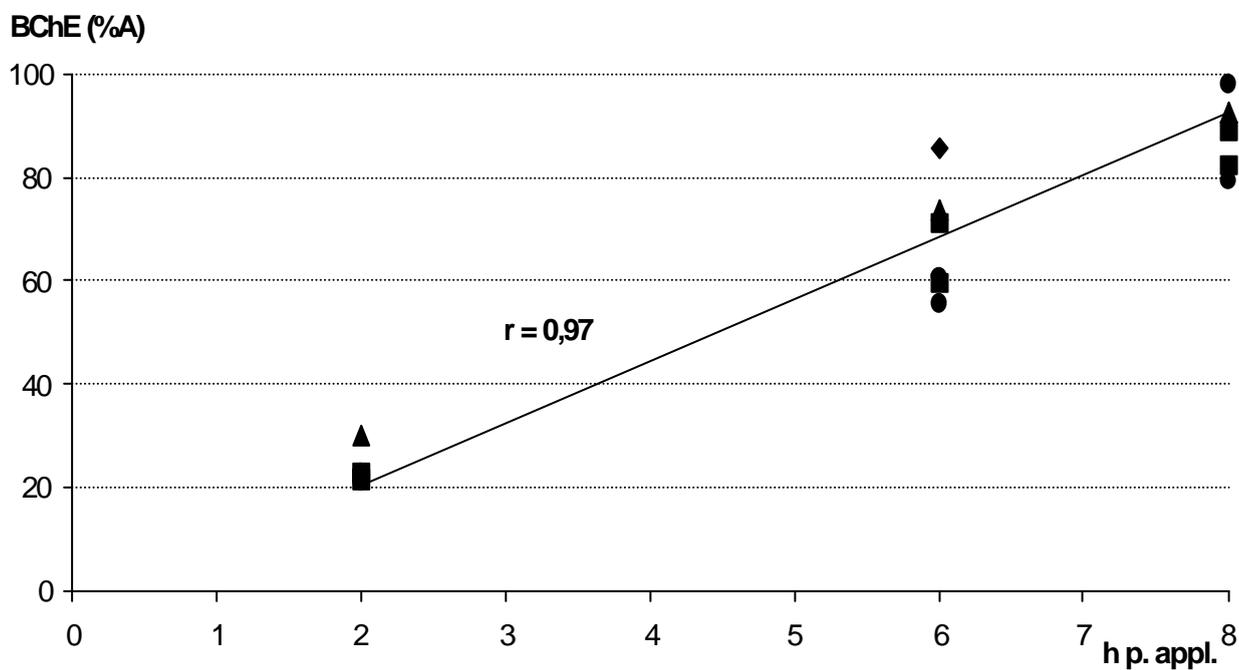


Abbildung 25: Korrelation des ChE-Aktivitäts-Verlaufs (%A) im Plasma von 6 Tauben nach peroraler Gabe von Carbofuran (0,6 mg/kg) mit dem zeitlichen Abstand zur Applikation (1 bis 8h *p. appl.*). r : Korrelationskoeffizient nach Pearson.

4.6.2.2 Thermische Reaktivierung

Die zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Verabreichung von Parathion oder Carbofuran entnommenen Plasmaproben wurden bei 4 °C oder 37 °C inkubiert. Eine Bestimmung der ChE-Aktivität fand in regelmäßigen Abständen mit dem trockenchemischen Analysensystem statt. In Abbildung 26 werden die ChE-Aktivitätsverläufe in %A der bei Kühlschranktemperatur (+4 °C), in Abbildung 27 der bei 37 °C inkubierten Proben dargestellt.

Die Standardabweichungen der ChE-Aktivitäten in %A werden in den Graphiken der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht mit abgebildet. Sie liegen bei beiden Enzymhemmern und zu allen Zeitpunkten zwischen 3 und 10. Höhere Werte traten beim Nullwert der Carbofuranvergiftung 6 h *p. appl.* ($s=11$) auf.

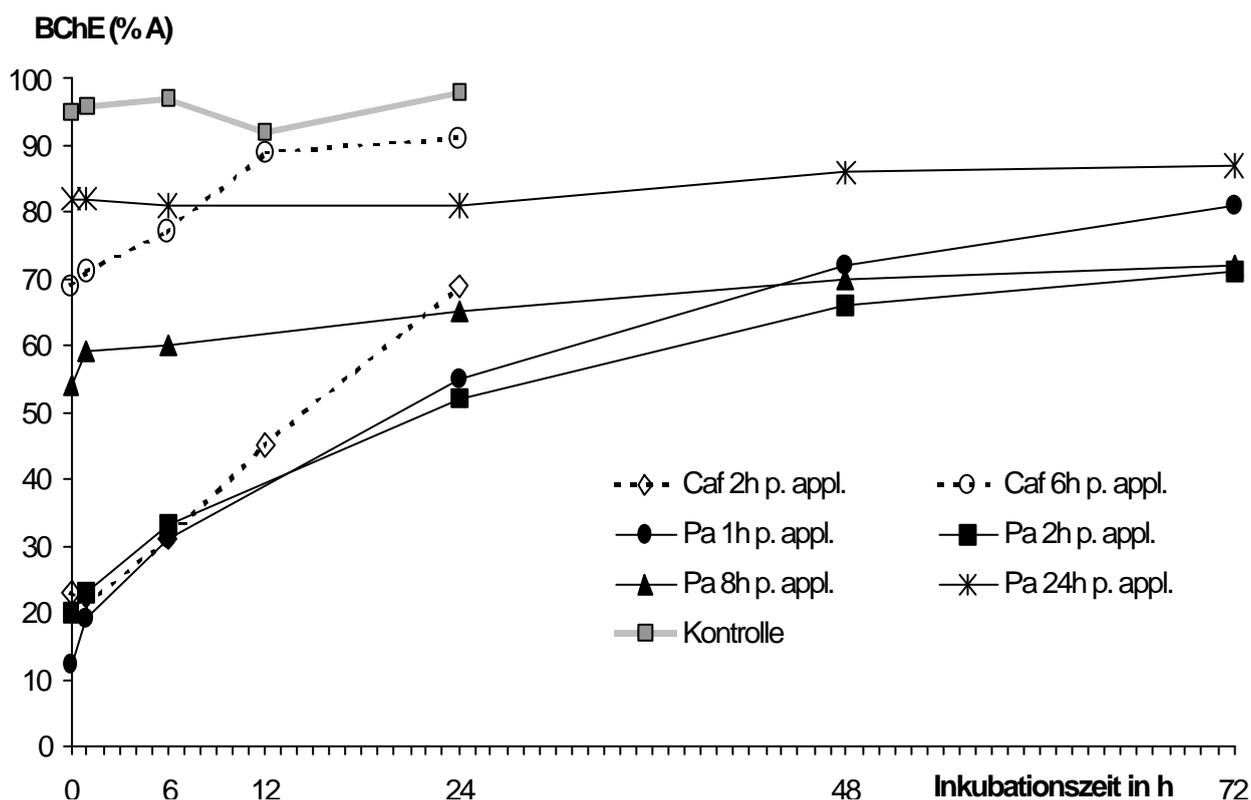


Abbildung 26: ChE-Aktivität (%A) von 1 bis 72 h *in vitro* bei +4 °C inkubierten Plasmaproben, die 1, 2, 8 und 24 h nach oraler Verabreichung von 0,5 mg/kg Parathion (Pa) bzw. 2 und 6 h nach oraler Eingabe von 0,6 mg/kg Carbofuran (Caf) entnommen wurden (jeweils \bar{x} , $n=6$). Messung mit dem Vitros DT 60® Analysensystem.

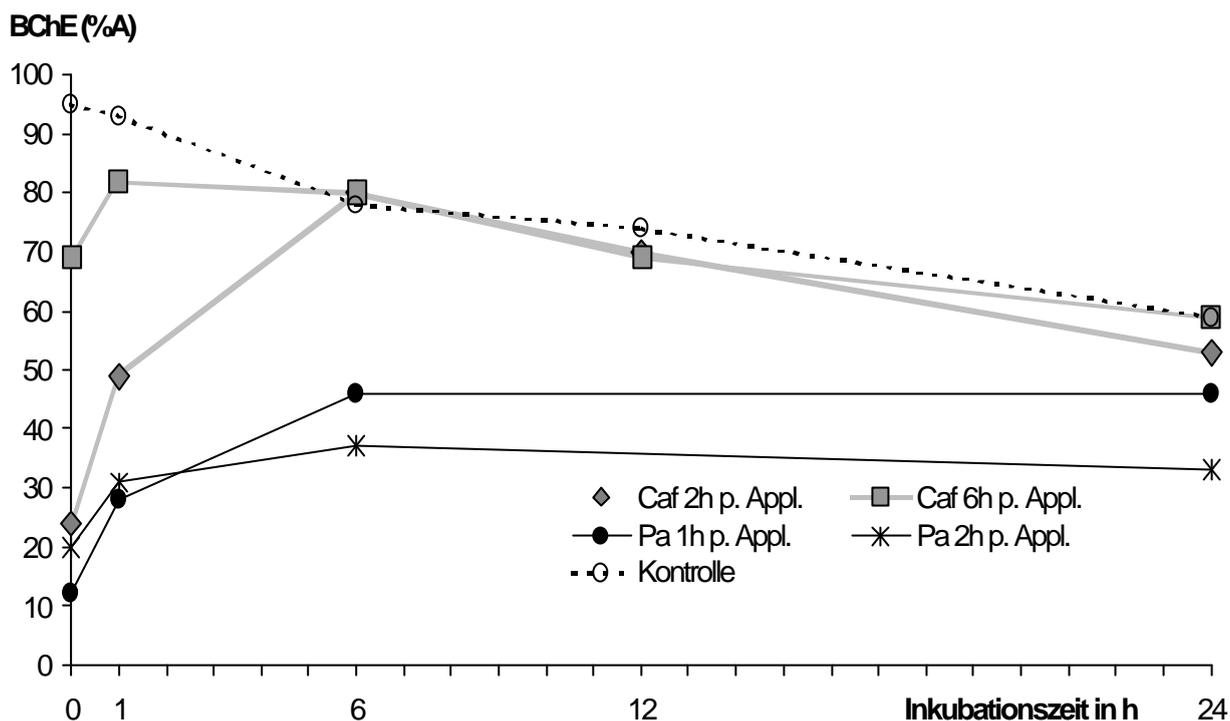


Abbildung 27: ChE-Aktivität in %A von 1 bis 24 h bei +37 °C inkubierten Plasmaproben, die 1 und 2 h nach oraler Verabreichung von 0,5 mg/kg Parathion (Pa) bzw 2 und 6 h nach oraler Eingabe von 0,6 mg/kg Carbofuran (Caf) entnommen wurden (jeweils \bar{x} , n=6). Messung mit dem Vitros DT 60® Analysensystem.

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die berechneten prozentualen Reaktivierungen. Bei Werten mit nur geringer Enzymhemmung ergibt die Berechnung der prozentualen Reaktivierung allerdings mißverständliche Ergebnisse, da bereits geringe Enzymaktivitätsschwankungen zu scheinbar hohen Reaktivierungswerten führen. Die Meßergebnisse der Kontrollproben und der Plasmaproben mit thermischer Reaktivierung 24 h nach Parathion-Applikation werden deshalb in %A angegeben. Signifikante Anstiege der ChE-Aktivität nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden mit Hilfe des einseitigen t-Tests für verbundene Stichproben untersucht. Die Meßzeitpunkte, die **keine** signifikanten Unterschiede aufweisen ($p>0,05$), sind durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

In Abbildung 28 wird die Korrelation zwischen den Inkubationszeiten der thermischen Reaktivierungen und der Höhe der ChE-Aktivität für die 2 h *p. appl.* von Carbofuran entnommenen Plasmaproben dargestellt. Die Ergebnisse der thermischen

Reaktivierung der 1 h oder 2 h *p. appl.* von Parathion entnommenen Proben zeigten weder eine lineare noch eine logarithmische Regression.

Tabelle 20: Thermische Reaktivierung bei 4 °C und 37 °C von Plasmaproben, die zwischen 1 und 24 h nach oraler Verabreichung von Parathion bzw. Carbofuran entnommen wurden.

Parathion (0,5 mg/kg) (%R, %A) n=6							
\bar{x} (s)	p.appl.	Hemmwert %A	Inkubationszeit				
			1 h	6 h	24 h	48 h	72 h
4 °C	1 h	12 (4)	8 (3)	21 (5)	49 (4)	68 (5)	79 (4)
	2 h	20 (4)	4 (2)	16 (4)	40 (6)	57 (6) ^a	63 (8) ^a
	8h	54 (4)	10 (7) ^a	12 (5) ^a	25 (6)	35 (12) ^b	39 (14) ^b
	24h	82 (8) ^a	82 (8) ^a	81 (9) ^a	81 (7) ^a	85 (8) ^b	86 (10) ^{ab}
37 °C	1 h	12 (4)	19 (4)	38 (5) ^{ab}	38 (9) ^a	33 (11) ^{bc}	30 (14) ^c
	2 h	20 (4) ^a	14 (5) ^b	21 (9) ^c	19 (10) ^{abc}		
Carbofuran (0,6 mg/kg) (%R, %A) n=6							
	p. appl.	Hemmwert %A	Inkubationszeit				
			1 h	6 h	12 h	24 h	
4 °C	2 h	23 (3)	-3 (2)	10 (4)	28 (9)	50 (10)	
	6 h	69 (11) ^a	6 (13) ^a	26 (15)	62 (17)	70 (13)	
37 °C	2 h	23 (3)	33 (11) ^a	73 (6)	61 (10)	38 (14) ^a	
	6 h	69 (11) ^{ab}	39 (13) ^c	28 (34) ^c	-16 (52) ^a	-49 (70) ^b	
Kontrolle (%A) n=4							
		Nullwert	1 h	6 h	12 h	24 h	
4 °C		98 (5) ^{ab}	98 (7) ^{ab}	101 (3) ^a	97 (9) ^{ab}	90 (3) ^b	
37 °C		98 (5) ^a	96 (6) ^a	81 (9)			

^{abc}: einseitiger t-Test für verbundene Stichproben unter Verwendung der absoluten Enzymwerte. Meßzeitpunkte, an denen sich die ChE-Aktivitätswerte nicht signifikant unterscheiden ($p > 0,05$), werden durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

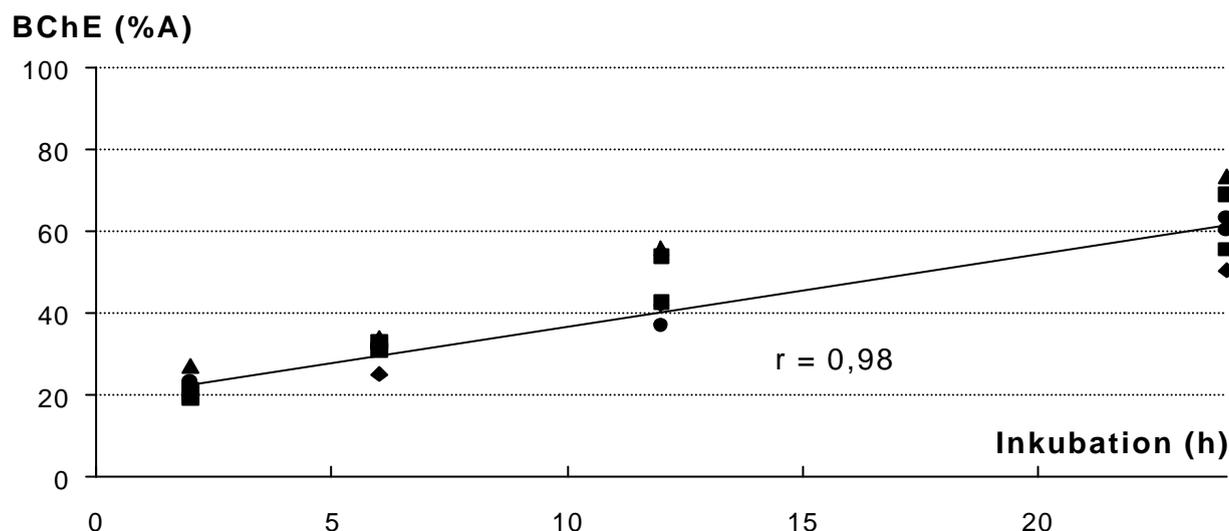


Abbildung 28: Korrelation des ChE-Aktivitätsverlaufes mit der Inkubationszeit nach thermaler Reaktivierung bei 4°C (%A) von 6 Plasmaproben, die 2 h nach oraler Verabreichung von Carbofuran entnommen wurden. r = Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

4.6.2.3 Oxim-induzierte Reaktivierung nach *in vivo*-Hemmung

An Plasmaproben der mit Parathion oder Carbofuran oral vergifteten Tauben erfolgte eine 1- und 6-stündige, Oxim-induzierte Reaktivierung bei 4 °C. Dabei kam das handelsübliche Präparat Toxogonin[®] (Obidoxim) in 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zum Einsatz. Die ChE-Aktivitätswerte wurden um den Faktor der konzentrationspezifischen, Oxim-induzierten Substrathydrolyse korrigiert (Kap. 4.1.3).

Abbildung 29 stellt die thermische und Obidoxim-induzierte Reaktivierung von *in vivo* phosphorylierter und carbaymylierter ChE nach 1-stündiger Inkubation gegenüber.

Alle Ergebnisse der Oxim-induzierten Reaktivierung werden in den Tabellen 21 (%R) und 22 (%A) zusammengefaßt. Die im vorangegangenen Kapitel aufgeführte, gleichzeitig gemessene thermische Reaktivierung wird zum direkten Vergleich mit aufgeführt. Signifikante Anstiege der ChE-Aktivität nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden mit Hilfe des einseitigen t-Tests für verbundene

Stichproben untersucht. Die Meßzeitpunkte, die **keine** signifikanten Unterschiede aufweisen ($p > 0,05$), sind durch gleichen Buchstaben gekennzeichnet.

Abbildung 30 zeigt die Reaktivierung phosphorylierter oder carbamylierter ChE durch Obidoxim zweier Konzentrationsstufen.

Die Richtigkeit der mit dem trockenchemischen Analysensystem gemessenen ChE-Aktivitäten nach Versetzung der Plasmaprobe mit Obidoxim in drei Verdünnungsstufen und Subtraktion des vorher bestimmten spezifischen Korrekturfaktors der Oxim-induzierten Substrathydrolyse wird in Abbildung 31 dargestellt.

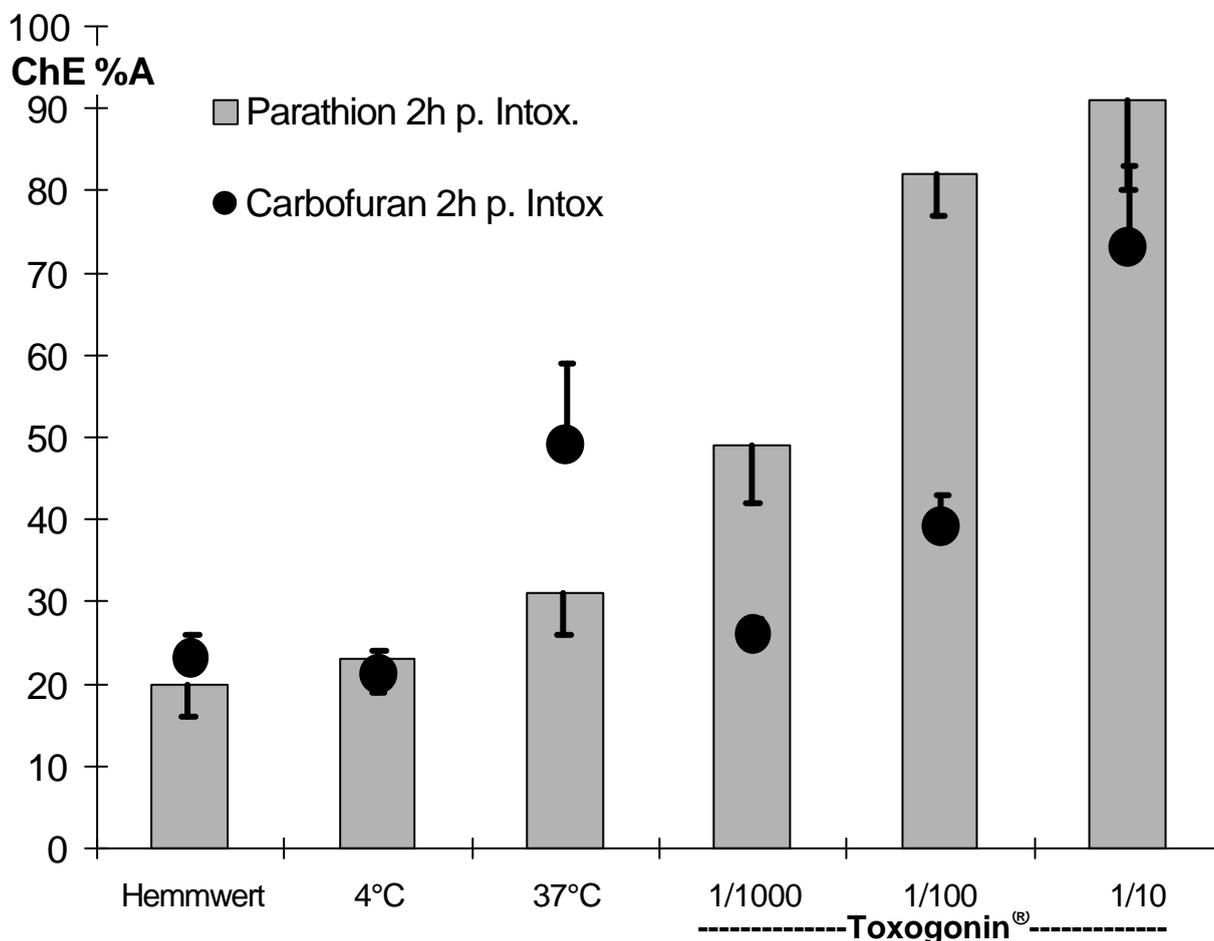


Abbildung 29: *In vitro*-Reaktivierung von *in vivo* mit Parathion (Säulen) oder Carbofuran (Kugeln) inhibiertem Taubenplasma durch einstündige Inkubation bei 37°C und bei 4°C mit und ohne Obidoxim in drei Verdünnungsstufen der Ausgangslösung. Messung mit dem trockenchemischen Analysensystem VITROS DT 60 II®.

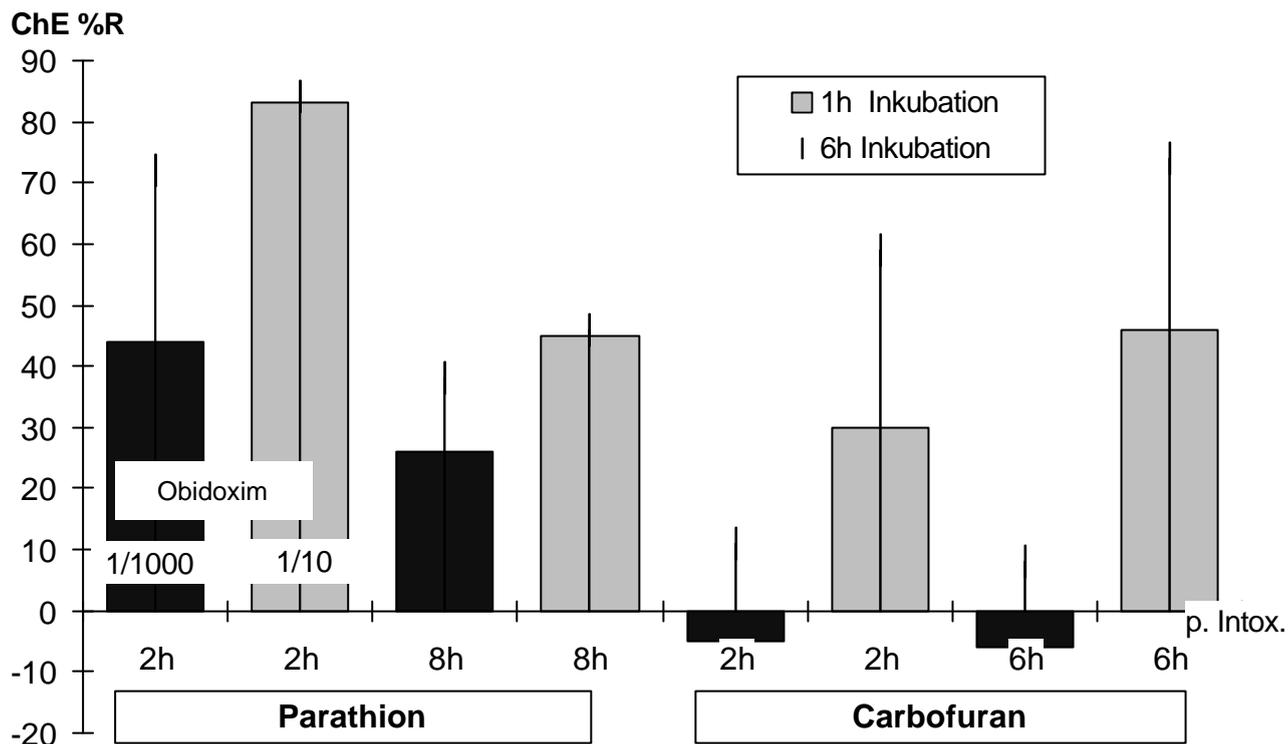


Abbildung 30: ChE-Aktivität in %R von *in vivo* mit Parathion oder Carbofuran inhibiertem Plasma durch 1-stündige (Säulen) und 6-stündige Inkubation (schwarze Rauten) mit Obidoxim zweier Verdünnungsstufen (1:10 grau, 1:10³ schwarz schraffiert) bei 4°C. Naßchemische Messung, Substrat BThChl.

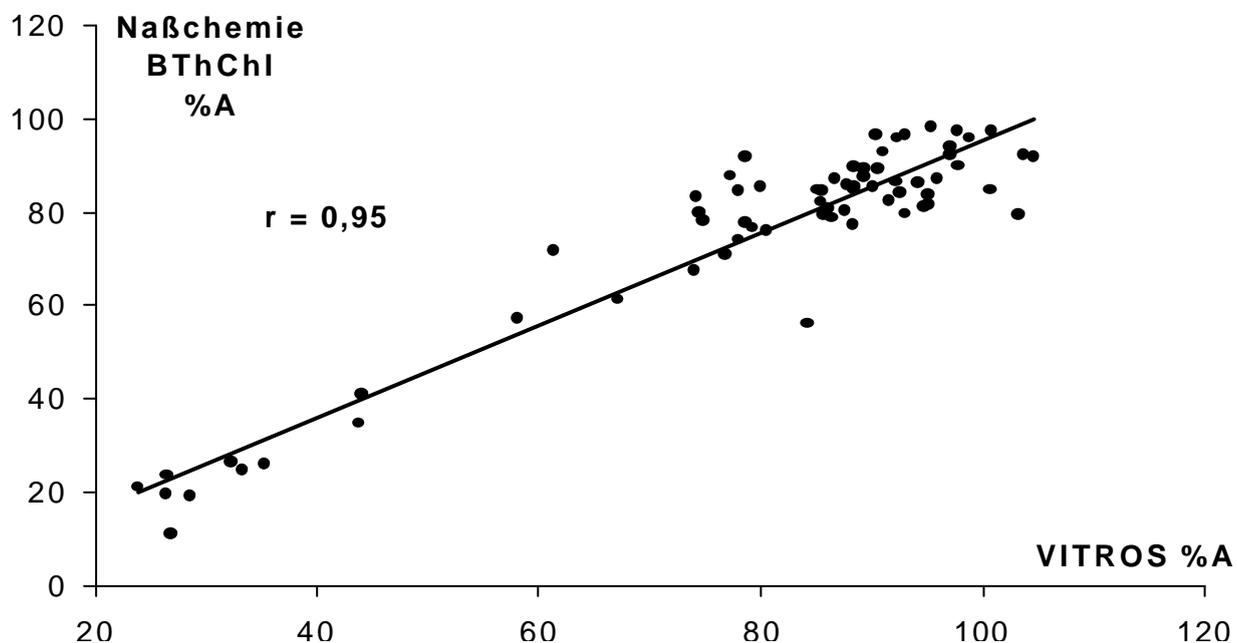


Abbildung 31: Korrelation der mit der naßchemischen (Substrat BThChl) und trockenchemischen Meßmethode (VITROS) bestimmten ChE-Aktivitäten in %A nach 1- oder 6-stündiger Inkubation mit Obidoxim dreier Verdünnungsstufen. r = Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Tabelle 21: Oxim-induzierte Reaktivierung von Plasmaproben der oral mit Parathion oder Carbofuran belasteten Tauben.

	<i>p. appl.</i>	Hemmwert %A	%R ^a \bar{x} (s)					
			Obidoxim-Verdünnung i. d. Ausgangslösung					
			1x10 ⁻⁴		1x10 ⁻³		1x10 ⁻²	
			1h	6h	1h	6h	1h	6h
Parathion 0,5 mg/kg	1h	12 (4) ^b	47 (7)	77 (6)	88 (4)	88 (3)	96 (8)	94 (4)
		9 (2) ^c	44 (5)	80 (1)	83 (4)	81 (4)	94 (5)	93 (4)
	2h	20 (4)	36 (8)	70 (6)	83 (8)	87 (10)	88 (14)	85 (12)
		20 (4)	44 (8)	72 (4)	74 (16)	80 (7)	83 (6)	84 (4)
	8h	54 (4)	23 (10)	38 (13)				
		55 (6)	26 (9)	38 (14)			45 (12)	46 (10)
Carbofuran 0,6 mg/kg	2h	23 (3)	3 (5)	18 (6)	20 (2)	31 (7)	64 (12)	83 (14)
		22 (4)	-5 (12)	11 (4)	10 (2)	26 (9)	30 (5)	59 (12)
	6h	69 (11)	7 (6)	39 (9)	36 (14)	50 (10)	81 (28)	98 (25)
		69 (10)	-6 (38)	8 (28)	12 (13)	44 (19)	46 (13)	74 (23)

^a: ChE-Aktivität in %R in Bezug zum jeweiligen Hemmwert. Angabe von Mittelwert und Standardabweichung (in Klammern)

^b: Trockenchemische ChE-Aktivitätsmessung mit dem Analysensystem VITROS DT 60 II®

^c: Naßchemische ChE-Aktivitätsbestimmung mit dem Meßsubstrat BThChI (grau unterlegte Felder)

Tabelle 22: Thermische und Oxim-induzierte Reaktivierung von Plasmaproben der oral mit Parathion oder Carbofuran belasteten Tauben bei 4 °C und 37 °C sowie bei 4 °C unter Zugabe von Obidoxim in drei Verdünnungsstufen.

	<i>p. appl.</i>	Hemmwert %A	%A ^c \bar{x} (s)										
			37 °C		4 °C		Obidoxim-Verdünnung i. d. Ausgangslösung						
			1h	6h	1h	6h	1/10 ⁻³		1/100		1/10		
						1h	6h	1h	6h	1h	6h		
Parathion 0,5 mg/kg	1h	12 (4) ^d	28 (5)	46 (4)	19 (4)	30 (5)	53 (6)	80 (5)	89 (3)	89 (3)	96 (7)	94 (4)	
		9 (2) ^d					49 (5)	81 (1)	84 (3)	82 (3)	94 (4)	94 (3)	
	2h	20 (4)	31 (5)	37 (7)	23 (4)	33 (4)	49 (7)	76 (6)	86 (7)	90 (8)	91 (11)	95 (11)	
		20 (4)					55 (8)	77 (4)	79 (13)	84 (6)	86 (5)	87 (4)	
	8h	54 (4)			59 (6)	59 (5)	64 (7)	71 (8)					
		55 (6)					67 (6)	72 (8)			75 (7)	76 (6)	
	24h	82 (8)			82 (9) ^a	81 (9)	84 (9)	83 (8) ^a					
		83 (8)					84 (7)	84 (4)			84 (7)	86 (5)	
	Carbofuran 0,6 mg/kg	2h	23 (3)	49 (10)	80 (5)	21 (3)	31 (3)	26 (2)	38 (6)	39 (4)	47 (7)	73 (10)	87 (11)
			22 (4)					19 (5)	31 (7)	30 (4)	42 (9)	45 (4)	68 (10)
6h		69 (11)	82 (6)	80 (6)	71 (10) ^a	77 (10) ^b	70 (11) ^{ab}	80 (7) ^b	79 (10)	85 (6)	96 (14)	101 (12)	
		69 (10)					72 (11)	76 (6)	75 (8)	84 (8)	84 (9)	91 (9)	

^{ab}: einseitiger t-Test für verbundene Stichproben unter Verwendung der absoluten Enzymwerte. Meßzeitpunkte, an denen sich die ChE-Aktivitätswerte nicht signifikant unterscheiden ($p > 0,05$), werden durch gleiche Buchstaben gekennzeichnet.

^c: Angabe der mittleren ChE-Aktivität in %A (Standardabweichung in Klammern).

^d: in transparenten Feldern werden die trockenchemischen, in grau unterlegten Feldern die naßchemischen Meßergebnisse dargestellt.

5. Diskussion

5.1 Methodik und Vorversuche

Die Vorversuche dienten der Ermittlung des geeigneten Meßansatzes zur photometrischen ChE-Aktivitätsbestimmung in Taubenplasma. Während die Konzentrationen der Reagenzien bei Einsatz des trockenchemischen Analysensystems auf den industriell gefertigten Einmal-Reagenzträgern vorgegeben sind, ermöglicht die naßchemische Messung eine spezifische Anpassung der Art und Konzentration der Meßsubstrate und spezifischen Enzyminhibitoren.

Meßsubstrate

Zur Bestimmung der Aktivität der aviären ChE kommen in der Regel die Substrate BThChI oder AThChI zum Einsatz (FAIRBROTHER et al. 1991). In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß bei der Messung der ChE-Aktivität der Taube eine BThChI-Konzentration zwischen 0,5 mM und 10 mM eingesetzt werden kann. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches besteht keine statistisch signifikante Beeinflussung der BChE-Aktivität durch die Substratkonzentration. Ein solcher, die zur ChE-Messung geeigneten Substratkonzentrationen umfassender Plateaubereich konnte für AThChI als Meßsubstrat nicht definiert werden. Die mit AThChI-Konzentrationen zwischen 0,5 mM und 10 mM in der Endverdünnung gemessenen Enzymaktivitäten zeigen vielmehr schwach- bis hochsignifikant einen positiv korrelierten Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und ChE-Aktivität.

Das BThChI ist das spezifische Substrat der BChE und kann von der AChE nicht verstoffwechselt werden. Analog den Beobachtungen bei anderen Tierarten weist es bei der Taube eine höhere Stabilität in Lösung mit geringerer spontaner Hydrolyserate (Tab. 2) und einen schnelleren Substratumsatz als das AThChI auf (FAIRBROTHER et al. 1991, RATTNER u. FAIRBROTHER 1991). Der schnellere Substratumsatz spiegelt sich in den generell höheren ChE-Aktivitätswerten unter Einsatz des BThChI wider und weist auf einen relativ hohen Anteil der BChE an der

ChE-Aktivität hin (KIESAU 1997). Durch spezifische Hemmung der BChE mit iso-OMPA konnte diese Vermutung bestätigt werden. Bei adulten Tauben gehen nur ca. 6 %, bei Nestlingen ca. 10 % der ChE-Aktivität auf AChE zurück (Tab. 4). Das BThChI, das auch von dem Analysensystem VITROS DT 60 II[®] verwendet wird, ist somit im Konzentrationsbereich 0,5 bis 10 mM als ideales Meßsubstrat für die ChE der Taube anzusehen. Der durch spontane Hydrolyse hervorgerufene Farbumschlag beträgt bei der hier verwendeten Substratkonzentration von 1 mM bei Umrechnung in ChE-Aktivität lediglich ca. 0,9 U/l und kann vernachlässigt werden.

Aufgrund der niedrigen Aktivität der AChE ist das AThChI bei der Taube weitaus weniger zur ChE-Bestimmung geeignet. Es findet jedoch in vielen Laboratorien routinemäßig Verwendung, so daß in der vorliegenden Studie auch für dieses Substrat Referenzwerte ermittelt wurden. Als AThChI-Konzentration kam mit 5 mM eine auch von anderen Untersuchern verwendete Konzentration zum Einsatz (HILL u. FLEMING 1982, KIESAU 1997).

Oxim-induzierte Substrathydrolyse

Oxime können eine Hydrolyse der Thiocholinester und somit eine Verfälschung der photometrischen Esterase-Aktivitätsbestimmung verursachen (BERGMANN u. GOVRIN 1973). Eine Konzentrationserhöhung des Meßsubstrats potenziert dabei die Oxim-induzierte BThChI-Spaltung (Abb. 9). Um eine Verfälschung des photometrischen Meßergebnisses zu vermeiden, sind deshalb möglichst niedrige Substratkonzentration anzustreben. Der durch Oxim-induzierte Hydrolyse der Meßsubstrate induzierte Fehler kann jedoch auch durch Subtraktion einer zuvor für die eingesetzten Substrat- und Oxim-Konzentrationen bestimmten Konstanten korrigiert werden (Tab. 3) (HOOPER 1988).

5.2 Korrelation der Meßtemperaturen der ChE-Aktivitätsbestimmung 25 °C und 37 °C

Zwischen den häufig bei der Bestimmung der ChE-Aktivität eingesetzten Meßtemperaturen 25 ° und 37 °C besteht bei der naßchemischen Messung unter Einsatz der Meßsubstrate BThChI oder AThChI ein linearer Zusammenhang.

Für das BThChI, bei dem ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,98 auf eine sehr gute Korrelation hinweist, können die naßchemisch mit einer der beiden Meßtemperaturen bestimmten Enzymaktivitäten mit Hilfe der Regressionsgleichung in das zu erwartende Meßergebnis der anderen Temperatur umgerechnet werden:

$$[\text{BChE (U/l) } 37 \text{ °C}] = 1,44 \times [\text{BChE (U/l) } 25 \text{ °C}] - 114$$

Auch für das AThChI konnte bei einem Pearson'schen Korrelationskoeffizient von 0,96 eine gute Korrelation festgestellt werden. Die Regressionsgleichung lautet hier wie folgt:

$$[\text{ChE (U/l) } 37 \text{ °C}] = 1,36 \times [\text{ChE (U/l) } 25 \text{ °C}] + 88$$

5.3 Einflußfaktoren und Referenzwerte der ChE

5.3.1 Einfluß des Geschlechts, der Jahreszeit, des Reproduktionszyklus und der Haltungform auf die ChE-Aktivität adulter Tauben

Charakterisierung der Haltungssysteme

In der vorliegenden Arbeit fanden zu jeder der vier Jahreszeiten Messungen der ChE-Aktivitäten von adulten Tauben beider Geschlechter und in zwei unterschiedlichen Haltungssystemen statt.

An der MHH wurden sogenannte Stadtauben extensiv in einem mobilen Taubenschlag betreut. Diesen Tieren stand ein zum Taubenschlag umgebauter Bauwagen mit unregelmäßiger Versorgung mit handelsüblichem Taubenfutter und Tränke zur Verfügung. Der Schlag wurde lediglich vor der Entnahme von

Untersuchungsmaterial geschlossen. Hiervon abgesehen befanden sich die Stadttauben im Freiflug und nutzten vor allem das Nahrungsangebot auf dem im näheren Umfeld befindlichen Gelände der Medizinischen Hochschule und einer ausgedehnten Kleingartenkolonie. Es kam ganzjährig zu Balz, Brut und Jungenaufzucht mit hoher Jungtiersterblichkeit, die z.T auf die hohe, aber aufgrund der Zooanthroponosenforschung unbehandelten Parasitenbürde mit hoher Inzidenz an Trichomoniasis zurückzuführen war.

Der norddeutsche Brieftaubenschlag zeichnete sich dagegen durch intensive Betreuung und ständige veterinärmedizinische Kontrolle aus. Die Brutperiode lag zwischen Februar/März und September. Während dieser Zeit wurden die Taubenpaare in Nistvolieren gehalten. Adulte Tauben außerhalb der Brutzeit, nichtbrütende und halbjährigen Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt gehalten. Eine regelmäßige Nahrungsaufnahme aus der Umwelt fand nicht statt.

Statistische Auswertung

Statistische Berechnungen auf Grundlage verbundener Stichproben weisen eine höhere statistische Teststärke und damit eine größere Aussagekraft auf als auf unabhängigen Beobachtungen basierende Signifikanzen. Verbundene Stichproben liegen aber nur von den Tauben vor, bei denen zu jeder Jahreszeit Blut entnommen werden konnte. Tabelle 6 stellt die verbundenen und unabhängigen Stichprobenzahlen der einzelnen Taubengruppen gegenüber. Ausschließlich bei den weiblichen Brieftauben liegt eine deutlich höhere Anzahl unabhängiger ($n= 20$ bis 21) als verbundener Stichproben ($n= 8$) vor. Bei dieser Taubengruppe ist somit auch die statistische Berechnung der nicht verbundenen Stichproben von Interesse. Weicht deren Testaussage von der aus abhängigen Stichproben erstellten Signifikanzen ab, so finden sie in Text oder Tabelle Erwähnung.

Einfluß des Faktors Geschlecht

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tauben konnten weder in der Gesamtstichprobe, noch bei einem spezifischen Vergleich der Schläge und der Meßzeitpunkte (Jahreszeiten) statistisch gesicherte Unterschiede in der Höhe der

ChE-Aktivität zwischen den Geschlechtern festgestellt werden. Zu dem gleichen Ergebnis waren bei Haus- und Felsentauben (*Columba livia*) auch BARTKOWIAK und WILSON (1995) sowie BUNYAN et al. (1968) gelangt. Von Stockenten (*Anas platyrhynchos*) und Fasanen (*Phasianus colchicus*) wurden analoge Ergebnisse berichtet (HILL u. MURRAY 1987, FAIRBROTHER et al. 1990). Bei Japanwachteln (*Coturnix japonica*) bestand dagegen eine signifikant höhere BChE-Aktivität bei den Hähnen (HILL 1989b, LUDKE et al. 1975).

Einfluß des Faktors Jahreszeit

Als Ursachen der bei einigen Spezies zu beobachtenden saisonalen Schwankungen der ChE-Aktivitäten werden die Faktoren Tageslichtlänge, Klima, Futterangebot und Brutzyklus diskutiert (RATTNER u. FAIRBROTHER 1991, THOMPSON 1993). HILL u. MURRAY (1987) setzten vier verschiedene Vogelarten in Außenvolieren dem jährlichen Wechsel der Tageslichtlänge und Witterung aus. Aber lediglich bei der Virginiewachtel (*Colinus virginianus*), die als einzige Vogelart in dieser Studie einen Brutzyklus zeigte, traten signifikante jahreszeitliche Unterschiede der ChE-Aktivität mit höheren Werten bei beiden Geschlechtern im Winter sowie bei den männlichen Tieren zusätzlich im Frühjahr auf. Bei Star (*Sturnus vulgaris*), Purpurgrackel (*Quiscalus quiscula*) und Rotschulterstärling (*Agelaius phoeniceus*) konnten dagegen keine circannualen Schwankungen der ChE-Werte festgestellt werden. Die jahreszeitlichen ChE-Aktivitäten der Virginiewachteln werden den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Tabelle 23 gegenübergestellt.

In der vorliegenden Studie lag ein hochsignifikanter Einfluß des Jahreszeitenverlaufes auf die ChE-Aktivität der Tauben vor. Dieser zeigte sich in höheren Enzymaktivitäten in Frühjahr und Sommer als in Herbst und Winter. Der Unterschied war bei der Population der Stadtauben deutlicher ausgeprägt als bei den Brieftauben (Tab. 15 u. 23). Die Unterschiedlichkeit der beiden Haltungformen wurde auch durch die hochsignifikanten Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Haltungform und Jahreszeit (Tab. 7) und dem Fehlen eines signifikanten Einflusses der Jahreszeiten bei weiblichen Brieftauben belegt (2-faktorielle Varianzanalyse,

Tab. 10). Bei den Stadtauben bestand dagegen auch von der Herbst- zur Wintermessung ein signifikanter bis hochsignifikanter Anstieg der ChE-Aktivität.

Tabelle 23: Saisonaler Verlauf der mittleren BChE-Aktivität (U/l, Meßtemperatur 25 °C, Substrat BThChI) bei Virginiawachteln nach HILL u. MURRAY (1987). Zum Vergleich, in kursiver Schrift, die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit (naßchemische Analyse, 37 °C, BThChI).

\bar{x}		n	Herbst	n	Winter	n	Frühjahr	n	Sommer
Virginia- wachtel	M	17	1287 ^a	20	2472 ^b	10	2085 ^b	14	1425 ^a
	W					10	1514		
Stadt- taube		28	3330 ^{ab}	26	3737 ^{ab}	30	4458 ^a	27	4469 ^b
Brief- taube		39	3306 ^{ab}	40	3219 ^{cd}	39	3620 ^{ac}	41	3559 ^{bd}

Angabe beider Geschlechter (M= männlich, W= weiblich), wenn signifikante Geschlechtsunterschiede ($p>0,05$) auftraten, des Mittelwerts (\bar{x}) und der Stichprobengröße (n). Signifikante Unterschiede zwischen den Jahreszeiten werden durch hochgestellte Buchstaben dargestellt.

Faßt man bei beiden Haltungformen die mittleren ChE-Aktivitäten der warmen und kalten Jahreszeit zusammen, so ergeben sich unter Einsatz beider Meßmethoden hochsignifikante Unterschiede (Tab. 11), die sich durch Anstieg der oberen Meßbereichsgrenzen von der kalten zur warmen Jahreszeit zeigen (Tab. 15 u. 23).

Einfluß des Faktors Reproduktionszyklus

Während in der Studie von HILL u. MURRAY (1987) weibliche Virginiawachteln im Frühjahr, parallel zur Gonadenvergrößerung, eine 25-prozentige Depression der ChE-Aktivität zeigten, beobachteten BENNETT et al. (1991) bei der gleichen Spezies einen ca. 20-prozentigen Aktivitätsanstieg zu Beginn der Eiablage. Auch bei vergleichenden Untersuchungen geschlechtsaktiver und -inaktiver Stockenten konnte in der Reproduktionszeit eine 30-prozentige (Erpel) bis 60-prozentige (Weibchen) Erhöhung der ChE-Aktivität festgestellt werden. Nach Verlassen des Nests trat ein signifikanter Abfall der ChE-Aktivität auf (FAIRBROTHER et al. 1990). Die Erhöhung der ChE-Aktivität in der Zeit der Eiablage ist möglicherweise auf eine ChE-stimulierende Wirkung von Östrogenen zurückzuführen, wie sie bei Ratten

gezeigt werden konnte (ILLSLEY u. LAMARTINIERE 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der vierteljährlichen Intervalle der Blutentnahmen die z. B. durch Eiablage ausgelösten kurzzeitigen Enzymschwankungen nicht erfasst. Wie Tabelle 23 zeigt, lag jedoch insbesondere bei den Stadtauben ein erheblicher Anstieg der mittleren ChE-Aktivitäten in Frühjahr und Sommer vor, der mit einer Erhöhung der oberen Referenzbereichsgrenze einherging (Tab. 15). Während bei den Brieftauben aufgrund gezielter jahreszeitlicher Trennung und Zusammenführung eine deutliche Teilung des Jahres in Brut- (Frühjahrs- und Sommermessungen) und Nichtbrutsaison (Herbst- und Wintermessungen) bestand, zeigten die Stadtauben während des gesamte Jahres Brutaktivität mit Schwerpunkt in den warmen Monaten. Eine deutliche Beeinflussung der ChE-Aktivität durch den Reproduktionszyklus müßte demnach vor allem bei den Brieftauben ersichtlich sein. Da jedoch das Gegenteil der Fall ist, sind die festgestellten Anstiege der ChE-Aktivität im Frühjahr nicht durch einen Einfluß des Reproduktionszyklus zu begründen.

Einfluß des Faktors Haltungform

Über die Ursachen der hochsignifikanten Unterschiede der ChE-Aktivität zwischen den adulten Tieren des Stadtauben- und Brieftaubenbestands können nur Vermutungen angestellt werden. Diese Differenzen sind hochsignifikant in Frühjahr und Sommer, schwach signifikant im Winter und statistisch nicht signifikant im Herbst. Man kann demnach bei gleichbleibender Methodik von einer allenfalls geringgradigen Unterschiedlichkeit in der kalten und einer hochgradigen Divergenz der mittleren ChE-Aktivitäten in beiden Haltungformen in der warmen Jahreszeit sprechen. Da der Reproduktionszyklus sowie die auf beide Haltungformen gleichermaßen einwirkenden äußeren Faktoren Tageslichtlänge und Außentemperatur nicht als ursächlich in Frage kommen können, sind als Einflußfaktoren ein differierender Biorhythmus oder eine unterschiedliche Ernährung zu bedenken. Als physiologische Funktion der ChE werden neben einer Beteiligung am Fettsäuren- und Lipoproteinstoffwechsel auch eine enzymatische Detoxifizierung von alimentär aufgenommenen pflanzlichen Estern diskutiert (BON et al. 1987, VAN

LITH et al. 1992, KUTTY u. PAYNE 1994). Während die Brieftauben ganzjährig mit kommerziellem Taubenfutter versorgt werden und eine Nahrungsaufnahme in der Umwelt in der Regel nicht stattfindet, ist die Zusammensetzung des Futters bei den Stadtauben sehr heterogen. Ein direkter Zusammenhang zwischen den im Sommerhalbjahr aufgenommenen Nahrungbestandteilen und erhöhten ChE-Werten ist möglich. Ein nicht objektivierbarer Faktor der Nahrungsaufnahme in besiedelten Flächen ist zusätzlich eine mögliche Kontamination mit Pestiziden oder anderen Schadstoffen.

Ein Einfluß der Haltungsform auf die ChE-Aktivität der halbjährigen Tauben konnte nicht festgestellt werden.

5.3.2 Einfluß des Alters auf die ChE-Aktivität und das AChE/BChE-Verhältnis

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tauben weisen in der Nestlingszeit eine signifikant bis hochsignifikant niedrigere ChE-Aktivität auf als halbjährige oder adulte Tiere. Die beiden zuletzt genannten Altersstufen, die im Unterschied zu den nesthockenden Jungtauben eine intensive Flugtätigkeit aufweisen, unterscheiden sich dagegen in diesem Merkmal nicht.

Signifikante Unterschiede zwischen der ChE-Aktivität juveniler und adulter Vögel wurde auch von Rabenkrähen (*Corvus corone corone*) und Staren (*Sturnus vulgaris*) berichtet, während ein solcher Zusammenhang bei Rotkehl-Hüttensängern (*Sialia sialis*) nicht bestand (GARD u. HOOPER 1993, KIESAU 1997).

Bei verschiedenen Vogelarten variiert die altersabhängige Relation der Plasmaenzyme AChE und BChE (THOMPSON 1993). Bei Rotkehl-Hüttensängern, Rotschulterstärlingen (*Agelaius phoeniceus*) und Staren konnte in unterschiedlichem Ausmaß ein stetiger Anstieg der BChE- bei parallelem Abfall der AChE-Aktivität im Verlauf der Nestlingszeit festgestellt werden (GRUE et al. 1981, GARD u. HOOPER 1993, McINNES et al. 1996). Innerhalb der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nestlingstauben zeigten sich bei wöchentlichen Kontrollmessung zwischen dem 7. und 42. Lebenstag keine Aktivitätsanstiegs- oder Abfallstendenzen der BChE oder

AChE. Bei statistischen Untersuchungen auf unterschiedliche Höhe der ChE-Aktivitäten zu verschiedenen Tagen mit dem t-Test und der 2-faktoriellen Varianzanalyse traten allerdings z.T. schwache Signifikanzen auf (Kap. 4.4.2, Tab. 13). Diese scheinbaren ChE-Aktivitätsschwankungen können aber auf die relativ niedrige Stichprobengröße zurückgeführt werden.

Der prozentuale Anteil der AChE an der ChE differiert dagegen hochsignifikant zwischen Nestlingen (\bar{x} = 10%) und adulten Tauben (\bar{x} = 6%). Aufgrund der generell höheren ChE-Aktivitäten geschlechtsreifer Tauben zeigt sich diese Unterschiedlichkeit in den absoluten AChE-Aktivitäten weniger deutlich (\bar{x} = 214 bzw. 166 U/l).

5.4 Referenzwerte der ChE-Aktivität

Da Alter, Jahreszeit und Haltungsform einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der ChE-Aktivität haben können, wurden unterschiedliche Referenzbereiche für warme und kalte Jahreszeit sowie Stadt- und Brieftaubenhaltung erstellt (Tab. 15).

In Tabelle 24 werden die für die Gesamtstichprobe der adulten Tauben erstellten Vergleichswerte mit den in der Literatur angegebenen Referenzbereichen für adulte Tauben verglichen. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte und die unter Verwendung der gleichen Methodik von KIESAU (1997) gemessenen ChE-Aktivitäten zeigen dabei keine relevanten Unterschiede.

Tabelle 24: Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Referenzwerte der ChE-Aktivität adulter Tauben mit Ergebnissen vorheriger Studien.

Untersucher	Methode	n	\bar{x} (s) (U/l)	Var. Koeff.	Bereich (U/l)
Eigene Untersuchungsergebnisse	V, 37 °C	106	3854 (754)	19	2377 - 5332
	B, 37 °C	106	3604 (720)	20	2193 - 5015
	A, 37 °C	104	2911 (564)	20	1807 - 4016
KIESAU 1997	V, 37 °C	29	3354 (766)	23	2170 - 5895
	B, 37 °C	23	3171 (655)	21	2106 – 5382
	A, 37 °C	27	2896 (566)	20	2018 – 4680
LUMEIJ u. WOLFS-WINKEL 1988	B, 30 °C	27			2172 - 3357

V= VITROS DT 60 II®, B= BThChI, A= AThChI als Meßsubstrate bei den naßchemischen Messungen. Angabe der Meßtemperatur und der ChE-Aktivität als Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s), Variationskoeffizient (Var.) und Referenzbereich.

5.5 Auswirkungen von Einflußfaktoren auf die klinisch-blutchemische Diagnostik der ChE-Aktivität bei Tauben

Die Bestimmung der ChE-Werte dient in der klinischen Diagnostik beim Vogel der Erkennung von Vergiftungen mit Cholinesterase-Inhibitoren oder der Bewertung der Lebersyntheseleistung (ZINKE et al. 1999b). In beiden Fällen gelten Unterschreitungen der spezifischen Referenzbereiche als Hinweis auf das Vorliegen klinisch-pathologischer Veränderungen.

Die Unterschiede der mittleren ChE-Aktivitäten zwischen Brief- und Stadtauben sowie Sommer- und Winter-Halbjahr manifestieren sich jedoch vor allem in den deutlich differierenden Mittelwerten und oberen Referenzbereichsgrenzen. So treten bei den Stadtauben in der kalten Jahreszeit ChE-Werte von 2527 bis 5056 U/l, in der warmen Jahreszeit dagegen von 2610 bis 6660 U/l (jeweils VITROS DT 60 II®) auf. Die klinisch bewertbare untere Begrenzung der Referenzbereiche der Brieftauben liegt jedoch lediglich um ca. 300 U/l unterhalb derjenigen der Stadtauben und kann

damit im Individualfall vernachlässigt werden. Die oberen Bereichsbegrenzungen differieren dagegen um bis zu 1500 U/l.

Bei Nestlingen zeigt sich dieser Zusammenhang noch deutlicher. Die untere Referenzbereichsgrenze liegt in dieser Altersklasse bei naßchemischer Messung mit dem Substrat BThChI bis zu 600 U/l unterhalb der für die adulten Stadtauben definierten Referenzwerte. Die obere Begrenzung der Referenzbereiche zeigt aber mit 3014 (VITROS DT 60 II®) bzw. 3156 U/l (BThChI) eine Differenz von bis zu 3600 U/l gegenüber den bei adulten Tieren bestimmten Referenzbereich.

In der klinischen Bewertung von Meßergebnissen müssen demnach bei geringgradigen Unterschreitungen der spezifischen Referenzbereiche physiologische Schwankung bedacht werden. Hochgradige Unterschreitungen der Referenzbereiche, die auf eine manifeste Vergiftung oder Lebersynthesestörung hindeuten, können allerdings von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Einflußfaktoren Alter, Geschlecht, Jahreszeit und Haltungsform nicht hervorgerufen werden.

5.6 Diagnostische Reaktivierung

5.6.1 Diagnostische Reaktivierung nach *in vitro*-Inhibition der ChE

Die Messungen der thermischen und Oxim-induzierten Reaktivierungen nach *in vitro*-Inhibition mit Parathion oder Carbofuran dienten der Vorbereitung des Belastungsversuches. Es sollten die geeigneten Inkubationszeiten und -temperaturen sowie Obidoxim-Konzentrationen für die diagnostische Reaktivierung der ChE nach oraler Applikation von Parathion oder Carbofuran bei Tauben ermittelt werden.

5.6.1.1 Methodik und Vorversuche

Carbofuran ist als CA ein direkt wirkender Cholinesteraseinhibitor. Das *in vitro* gebildete carbamylierte Enzym entspricht dem Reaktionsprodukt *in vivo*. Die ChE-Aktivität *in vitro* fällt zwischen den Inhibitorkonzentrationen in den Ausgangslösungen 1×10^{-7} M (80 %A) und 1×10^{-5} M (6 %A) langsam und gleichförmig ab. Die relativ geringen individuellen Schwankungen äußern sich in einem maximalen Variationskoeffizienten der ChE-Aktivität von 37 (1×10^{-6} M Carbofuran).

Das OP Parathion stellt dagegen einen indirekten Enzymhemmer dar, der erst nach metabolischer Transformation zu dem hochtoxischen Oxo-Derivat Paraoxon seine vollständige inhibitorische Potenz entfaltet. Allerdings weist das Parathion in technischer Formulierung, wie es hier eingesetzt wurde, aufgrund von Verunreinigungen mit hochwirksamen Isomeren auch ohne die endogene metabolische Alteration eine hohe esteratische Hemmwirkung auf (PARLAR u. ANGERHÖFER 1995).

Dementsprechend zeigen sich bei Zugabe eines Aliquots einer 5×10^{-8} M Parathionlösung zur Plasmaprobe eine Inhibition zwischen 8 und 86 %A. Bei einer Erhöhung der Parathionkonzentration von 4×10^{-7} M war bei allen 13 gemessenen Plasmaproben eine Hemmung von 95 bis 99 % der Ausgangsaktivität erreicht. Unterhalb der Parathionkonzentration von 4×10^{-7} M ist die Esterasehemmung durch einen heterogenen Verlauf gekennzeichnet. Der maximale Variationskoeffizient der prozentualen ChE-Aktivitäten beträgt nach Zugabe von 1×10^{-7} M Parathion 86. Als Ursache dieser hochgradigen Meßwertstreuung ist die Inhomogenität des Parathions in technischer Formulierung anzusehen. Bereits nach Zutritt von wenig Luft in das Vorratsgefäß kann eine oxidative Desulfurierung des Parathions zu Paraoxon einsetzen (ACKERMANN 1969, HAHN 1970).

Auch die zeitlichen Verläufe der Enzyminhibition unterscheiden sich zwischen den beiden Inhibitoren. Bei Zimmertemperatur führt die Zugabe des Parathions bereits nach fünf Minuten zu einer maximalen Enzymhemmung, die durch das Carbofuran erst nach mindestens zwei Stunden erreicht wird.

Da sich in Abhängigkeit von der Temperatur die chemischen Reaktionen die zu

Inhibition, spontaner Reaktivierung, und im Fall der phosphorylierten Esterasen zur Alterung der ChE führen parallel auftreten (HOOPER 1988), existiert zu keiner Zeit eine reaktionslose, vollständige Enzymhemmung. In den hier durchgeführten Versuchen erfolgte zur Untersuchungen der Oxim-induzierten Reaktivierung eine Obidoxim-Zugabe nach einstündiger Einwirkungszeit des *in vitro* zugegebenen Inhibitors. Zu diesem Zeitpunkt, kurz vor der Obidoxim-Zugabe, wurde der Hemmwert gemessen. Alle zeitlichen Angaben der Inkubationsdauer beziehen sich auf diesen Zeitpunkt.

5.6.1.2 Thermische Reaktivierung der ChE nach *in vitro*-Inhibition der ChE

Aliquote der *in vitro* mit Carbofuran oder Parathion inhibierten Proben wurden parallel im Kühlschrank bei 4 °C, bei Zimmertemperatur (18 °C) und in einem 37 °C warmem Wasserbad zwischen 1 und 24 h sowie bei 4 °C zwischen 1 und 72 h inkubiert. Messungen der ChE-Aktivitäten nach verschiedenen Inkubationszeiten zeigten die Lagertemperatur- und Inhibitor-abhängige Höhe der spontanen Reaktivierung der ChE.

Carbofuran

Bei einer Konzentration des Carbofurans von 1×10^{-6} M und 1×10^{-5} M konnte nach Inkubation von 1 bis 24 h bei 4 °C nur eine geringgradige spontane Reaktivierung festgestellt werden. In den mit 1×10^{-6} M Carbofuran inhibierten Plasmaproben fiel die ChE-Aktivität sogar bis zum 6 h- Inkubationswert weiter ab. Dabei lag eine starke Variation zwischen den verschiedenen Plasmaproben vor, die in einer hohen Standardabweichung resultierte. In Analogie zu den in den Vorversuchen festgestellten Hemmverläufen ist dieser Aktivitätsabfall auf eine protrahierte Inhibition des Carbofurans zurückzuführen.

Ein Anstieg der ChE-Aktivität in den CA-inhibierten Plasmaproben wurde nach Inkubation bei Zimmertemperatur festgestellt. Auch in diesem Fall traten jedoch hohe individuelle Schwankung auf. In den mit den niedrigeren Carbofurankonzentrationen

vermischten Proben waren allerdings bereits nach 6 h in allen Fällen Enzymaktivitätsreaktivierungen von >10 %R festzustellen.

Die stärksten Aktivitätsanstiege bestanden jedoch nach Inkubation der Proben bei 37 °C. Bereits nach einer Stunde wurden bei der höheren Carbofurankonzentration in Relation zur 4 °C-Messung zum gleichen Zeitpunkt Reaktivierungen von 10 %R, nach 3 h sogar bis 22 %R festgestellt. Bei den Proben mit Zugabe der niedrigeren Carbofuranlösung war ebenfalls nach 3-stündiger Inkubation eine deutliche Enzymreaktivierung zu verzeichnen. In dieser Gruppe trat jedoch bereits nach 6 h Inkubation bei einigen Proben ein Abfall der ChE-Aktivität auf, der sich bei längeren Inkubationszeiten weiter fortsetzte.

Dies ist vermutlich auf eine begrenzte Haltbarkeit des Plasmaenzyms in Lösung zurückzuführen, was auch von SCHMIDT und ZECH (1988) sowie HUNT und HOOPER (1993) berichtet wird. Im vorliegenden Versuch setzte eine Proteindegeneration früher bei der niedrigen als bei der hohen Carbofurankonzentration ein. Biochemisch ist diese Diskrepanz durch den schützenden Effekt der reversiblen Carbamylierung auf die Enzymaktivität zu erklären. Im militärischen Bereich werden CA bei Gefahr einer Intoxikation mit OP prophylaktisch verabreicht. Die carbamylierten Enzyme bilden dann eine körpereigene Cholinesterasen-Reserve, die nach Eliminierung der OP durch die langsame, spontane Reaktivierung freigesetzt wird (DAWSON 1994).

Parathion

Auch bei den Parathion-inhibierten Plasmaproben traten spontane Reaktivierungen mit hoher individueller Variabilität auf. Im Gegensatz zu den carbamylierten ChE kam es jedoch schon bei Kühlschranktemperatur zu einem Anstieg der Enzymaktivität. Höhere Inkubationstemperaturen führten allerdings auch in dieser Gruppe zu einer stärkeren thermischen Reaktivierungen (Abb. 17).

Nach 24 h Aufbewahrung der Plasmaproben bei 37 °C zeigte sich ein Rückgang der mittleren ChE-Aktivität, der entweder auf eine Enzymdegeneration oder einer Alterung der phosphorylierten Enzyme zurückgeführt werden kann.

5.6.1.3 Oxim-induzierte Reaktivierung nach *in vitro*-Inhibition der ChE

Einfluß der Obidoxim-Konzentration

Zur Untersuchung der reaktivierenden Potenz von Obidoxim wurde das Oximpräparat in verschiedenen Konzentrationen zu Plasmaproben gegeben, die mit verschiedenen Konzentrationen von Carbofuran oder Parathion inhibiert waren. Die Messungen der ChE-Aktivitäten erfolgten nach 1 h. Hochgradig durch Carbofuran oder Parathion gehemmte Proben waren nur durch die höchste Obidoxim-Konzentration und nur um maximal 9 %R zu reaktivieren.

Bei den niedrigeren Parathion- und Carbofurankonzentrationen zeigten sich für beide Inhibitortypen unterschiedliche Ausprägungen der Oxim-induzierten Reaktivierung. Es konnten Reaktivierungsraten von über 10 %R bei den carbamylierten Enzymen nur unter Einsatz der höchsten, bei den phosphorylierten Cholinesterasen jedoch durch alle drei Obidoximkonzentration erreicht werden. Höhere Oxim-Konzentrationen führten zu erheblich höheren Aktivitätsanstiegen bei den Parathion-gehemmten Enzymen.

Einfluß von Inkubationstemperatur und –zeit auf die Oxim-induzierte Reaktivierung

Unter Verwendung der höchsten Obidoxim-Konzentration wurde der Einfluß verschiedener Inkubationstemperaturen auf die Oxim-induzierte Reaktivierung untersucht. Bei den Parathion-inhibierten Proben bestanden keine Zusammenhänge zwischen Reaktivierungsrate und Inkubationstemperatur. Zwar ließen sich für höhere Lagertemperaturen auch höhere spontane Reaktivierungsraten zeigen, jedoch konnte für die Obidoxim-versetzten Proben durch höhere Inkubationstemperaturen kein additiver Effekt dieser beiden Reaktionen auf die ChE-Reaktivierung nachgewiesen werden (Abb. 18).

In der Gruppe der carbamylierten Enzyme traten bei höheren Inkubationstemperaturen und längeren Inkubationszeiten bei gleichzeitiger thermischer und Oxim-induzierten Reaktivierung parallele Anstiege der ChE-Aktivität auf. Diese Verstärkung der Reaktivierung ist somit hauptsächlich auf die spontane Reaktivierung zurückzuführen (Abb. 21).

In einer weiteren Meßreihe wurde die Beeinflussung der Oxim-induzierten Reaktivierung von hochgradig mit Parathion oder Carbofuran gehemmten Plasmaproben nach einer bis zu 72 h dauernden Lagerung bei 4 °C untersucht. Die unveränderte Reaktivierbarkeit der phosphorylierten Proben über diese Zeit läßt vermuten, daß keine Alterung der inhibierten ChE stattfand. Bei zwei Proben konnte sogar nach 72 h erstmals eine deutliche Oxim-induzierte Reaktivierung beobachtet werden (Abb. 19, siehe auch Kap. 5.6.2.3). Auch bei den carbamylierten Enzymen blieb eine Veränderung der Reaktivierbarkeit durch die mehrtägige Lagerung aus (Abb. 20).

5.6.2 Diagnostische Reaktivierung nach *in vivo*-Inhibition der ChE

5.6.2.1 Bemerkungen zur Methodik

Ziel des Belastungsversuchs war die Entwicklung einer einfachen Methode der diagnostischen Reaktivierung OP- oder CA-gehemmter ChE unter Einsatz des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II[®]. Die trockenchemische Meßmethode bietet den Vorteil einer hohen Präzision und Richtigkeit bei Verbrauch geringer Plasmavolumina (KIESAU 1997). Aus diesem Grund konnten mit nur einer Plasmaprobe von ca. 600 µl verschiedene Inkubationstemperaturen und -zeiten der thermischen sowie der Oxim-induzierten Reaktivierung mit drei Verdünnungsstufen des in der BRD und anderen europäischen Ländern kommerziell erwerbbaaren Obidoxim-Präparats Toxogonin[®] untersucht werden. Das dabei eingesetzte Reaktivierungsprotokoll basierte auf den Ergebnissen der Vorversuche zur Reaktivierung *in vitro* inhibierter Plasmaproben. Die thermische Reaktivierung wurde ausschließlich zwischen den Inkubationstemperaturen 4 °C und 37 °C verglichen, da durch Inkubation bei Zimmertemperatur keine weiteren Informationen zu erwarten waren. Die Inkubationsdauer der Oxim-induzierten Reaktivierung wurde aus dem gleichen Grund auf 1 und 6 h beschränkt.

Die naßchemische ChE-Messung unter Einsatz des Meßsubstrats BThChI ist die Referenzmethode zur trockenchemischen Analyse (KIESAU 1997). Sie wurde aufgrund des Bedarfs an höheren Plasmavolumina nur bei den Ausgangs- und Hemmwerten, auf denen die weiteren Prozentrechnungen basieren, sowie den Oxim-induzierten Reaktivierungen eingesetzt. Im zweiten Fall diente die Naßchemie der Kontrolle der Richtigkeit der durch Subtraktion einer Konstanten der Oxim-induzierten Substrathydrolyse korrigierten, trockenchemischen Messung der ChE-Aktivität.

Durch die orale Inhibitorapplikation sollte eine subletale Vergiftung der Tauben bei hochgradiger Hemmung der ChE erreicht werden. Die Parathiondosierung orientierte sich dabei an der Studie über orale Applikation von 0,5 bis 1,0 mg/kg KM Parathion an Tauben von HENDERSON et al. (1994), in der bei einer Dosis $\leq 0,5$ mg/kg KM bei hoher ChE-Inhibition keine Todesfälle auftraten. Die klinischen Beobachtungen dieser Studie konnten in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Trotz hochgradiger ChE-Hemmung traten nur geringgradige, transiente Vergiftungssymptome auf. Einige Tiere waren zwischen 30 min und 2 h *p. appl.* apathisch und/oder zeigten vermehrten Speichelfluß. Hochgradige Einschränkungen des Allgemeinbefindens oder Spätfolgen konnten nicht beobachtet werden.

Da das lipophile Parathion eine schlechte Löslichkeit in Wasser aufweist, mußte zur oralen Applikation ein unpolares Lösungsmittel gewählt werden. Während HENDERSON et al. (1994) zu diesem Zweck das auch bei Vögeln toxische Polyethylenglycol einsetzten (LUMEIJ et al. 1988), wurde hier das 1,2-Propylenglykol verwendet, dessen Verträglichkeit bereits bei anderen Anwendungen am Vogel nachgewiesen war (KUMMERFELD u. HINZ 1982).

In der Literatur wird eine akute LD₅₀ des Carbofurans bei Tauben von 1.33 mg/kg KM angegeben (SCHAFER et al. 1983). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis von 0,6 mg/kg KM löste daher trotz kurzfristiger hochgradiger ChE-Inhibition keine Vergiftungssymptomatik aus.

5.6.2.2 Verlauf der ChE-Inhibition *in vivo*

Beide ChE-Hemmer führten nach oraler Applikation zu einer hochgradigen ChE-Inhibition und einem subklinischen Vergiftungsverlauf. Das Carbofuran erreichte 2 h *p. appl.* eine mittlere Inhibition von 77 % der ChE-Aktivität. Den Tieren wurde zu drei Zeitpunkten Blut entnommen und die mögliche thermische und Oxim-induzierte Reaktivierung der unterschiedlich stark gehemmten ChE untersucht. Die Aussagekraft der anhand der 8 h *p. appl.* entnommenen Plasmaproben wurde allerdings bei einer Enzymhemmung von lediglich 11 % durch die fragliche Abgrenzung von Reaktivierung und Enzymaktivitätsschwankung eingeschränkt.

Die Verabreichung von Parathion führte 1 h *p. appl.* zu einer mittleren Hemmung von 88 % und 2 h *p. appl.* von 80 % der ChE-Aktivität, die bereits nach 24 h *p. appl.* auf 8 % abgesunken war. Innerhalb von 72 h *p. appl.* wurde lediglich bei 2 von 6 Tauben ein Wiederanstieg auf 100 %A oder mehr gemessen. Da die Enzymhemmung im Vergleich zur Carbofuran-induzierten Inhibition länger anhielt, konnte zu vier Zeitpunkten Plasma entnommen werden. Der in der vorliegenden Arbeit festgestellte Inhibitionsverlauf ähnelt den nach oraler Verabreichung von Parathion an Tauben von BARTKOWIAK und WILSON (1995) (0,4 ml/kg KM) sowie HENDERSON et al. (1994) (0,5 ml/kg KM) beobachteten Enzymaktivitäten. Bei der ersten Studie, die mit einer um 1/5 niedrigeren Dosierung durchgeführt wurde, verläuft die ChE-Aktivitätskurve nur geringgradig steiler mit einer Unterschreitung der 50%-igen Hemmung nach 6 h und einem vollständigem Erreichen der Ausgangsaktivität nach 54 h. HENDERSON et al. (1994) berichten dagegen von einem ChE-Aktivitätsverlauf, der bis 4 h *p. appl.* dem in der vorliegenden Arbeit erstellten gleicht, danach aber deutlich flacher ansteigt. So wurde selbst nach 48 h noch eine Esterasehemmung von 45 %A und 120 h *p. appl.* von unter 80 %A beobachtet.

Bei der Carbofuran- ($r=0,97$) und Parathion-Intoxikation ($r=0,96$) konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der ChE-Hemmung und dem zeitlichen Abstand zur Applikation über 8 bzw. 12 h gezeigt werden.

5.6.2.3 Thermische Reaktivierung nach *in vivo*-Inhibition der ChE

Sowohl phosphorylierte als auch carbamylierte ChE zeigten nach Inkubationen bei 4 °C und 37 °C einen hochgradigen Anstieg der Enzymaktivität.

Carbofuran-Inhibition

Bereits nach einer Stunde Aufbewahrung der Carbofuran-inhibierten Plasmaproben bei 37 °C konnte eine deutliche Reaktivierung von 20 bis 59 %R festgestellt werden. Bei den 2 h *p. appl.* gewonnenen Plasmaproben erhöhte sich der Aktivitätsanstieg nach 6-stündiger Inkubation auf 65 bis 83 %R. Dieser fiel aber bei über 12-stündiger Inkubation wieder langsam ab. Dieser Rückgang der reaktivierten ChE-Aktivität trat bei den 6 h *p. appl.* gewonnenen Plasmaproben, die eine schwächere Inhibition des Ausgangswerts aufwiesen, bereits nach 6 h Inkubation bei 37 °C auf.

Ursache dieser sinkenden ChE-Aktivitäten, die in den schwächer gehemmten Proben sogar zu hochgradigen Unterschreitungen des Ausgangswerts führten, sind vermutlich Enzymdegenerationen (Kap. 5.4.1.2). Anscheinend liegt in den hochgradig inhibierten Proben ein Enzym-protektiver Effekt der Carbamylierung vor. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, daß ausschließlich bei den ungehemmten Kontrollproben ein Abfall der ChE-Aktivität bereits nach 24-stündiger Inkubation bei Kühlschranktemperatur auftrat.

Die thermische Reaktivierung der Carbofuran-versetzten Proben bei 4 °C vollzog sich langsamer und erreichte in den 2 h *p. appl.* gewonnenen Proben erst nach 6-stündiger Inkubation eine Reaktivierung von 10 % R. Die ChE-Aktivität in diesen Proben zeigte allerdings zwischen 2 h und 24 h Inkubation bei 4 °C einen linearen Anstieg mit sehr guter Korrelation zwischen der Höhe der Enzymaktivität und der Inkubationszeit ($r=0,98$). HUNT und HOOPER (1993) konnten bei ihren Versuchen an, mit dem CA Aldicarb inhibierter ZNS-AChE von Virginia wachsteln (*Colinus virginianus*) zeigen, daß sogar bei einer Inkubationstemperatur von 0 °C eine signifikante spontane Reaktivierung auftritt.

Parathion-Inhibition

Auch bei den Parathion-inhibierten Plasmaproben konnte durch Inkubation bei 37 °C eine höhere Reaktivierung festgestellt werden als bei 4 °C. Ein Abfall der ChE-Aktivität setzte bei 4 °C nicht, bei 37 °C erst nach 24 h ein.

Im Unterschied zu den carbamylierten Enzymen fiel bei der phosphorylierten ChE ein bei steigendem zeitlichem Abstand der Blutentnahme zur Parathion-Applikation sinkendes Ausmaß der Reaktivierbarkeit auf. Als Ursache dafür ist eine Alterung der OP-gebundenen ChE *in vivo* zu vermuten. Eine sukzessive sinkende Reaktivierbarkeit OP-inhibierter ChE mit vollständig bzw. annähernd vollständig refraktären Enzymen 24 h *p. appl.* wurde bei Virginawachteln nach Gabe von Chlorpyrifos oder Triazophos (THOMPSON et al. 1991b) und bei Chukarhühnern (*Alectoris chukar*) beobachtet (HOOPER 1988).

Wie die anhaltende Reaktivierbarkeit der 1 h *p. appl.* gewonnenen Plasmaproben selbst nach 48-stündiger Inkubation bei 4 °C belegt, existiert keine Analogie zwischen der Alterung der ChE *in vivo* und *in vitro*. Auch HOOPER (1988) berichtet von erfolgreicher ChE-Reaktivierung selbst nach 4-tägiger Lagerung der Plasmaproben von Parathion-belasteten Chukarhühnern, nur unter der Bedingung, daß diese spätestens 6 h *p. appl.* entnommen worden waren. Eine biochemische Erklärung der unterschiedlichen ChE-Alterung *in vivo* und *in vitro* ist nicht bekannt. WOREK et al. (1997) vermuten sogar entgegengesetzt eine generell langsamere Enzymalterung *in vivo* als *in vitro*, da das an den Synapsen akkumulierte ACh mit dem OP um das aktive Zentrum der AChE konkurriert.

5.6.2.4 Oxim-induzierte Reaktivierung nach *in vivo*-Inhibition der ChE

McINNIS et al. (1996) setzten zur Reaktivierung der ChE verschiedener Vögel Pralidoxim in der Konzentration im Reaktivierungsansatz (Plasmaprobe nach Oximzugabe) von 0,1 mM, MARTIN et al. (1981) bei inhibierter ZNS-AChE von Japanwachteln (*Coturnix japonica*) von 0,25 mM Pralidoxim ein. Obidoxim wurde von

ROTENBERG et al. (1995) in einer Dosis von 0,5 mM zur Reaktivierung OP-inhibierter, humaner ChE verwendet.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich die *in vivo* carbamylierten oder phosphorylierten Esterasen durch Inkubation mit Obidoxim von 0,064 bis 6,4 mM im Reaktivierungsansatz bei 4 °C reaktivieren. Dabei führte die Zugabe höher konzentrierter Obidoxim-Verdünnungsstufen zu einer stärkeren Reaktivierung. In den meisten Fällen hatte aber bereits die niedrigste Reaktivatorkonzentration einen signifikanten Aktivitätsanstieg zur Folge.

Ein Anstieg der ChE-Aktivität blieb dagegen, wie schon bei der thermischen Reaktivierung beschrieben, bei den 8 h und vor allem 24 h *p. appl.* des Parathions entnommenen Blutproben aus. Eine Alterung der phosphorylierten Enzyme ist hierfür die wahrscheinliche Ursache.

Bei den Plasmaproben der Carbofuran-belasteten Tauben bestand nach 1 h Inkubation mit der niedrigsten Obidoxim-Konzentration kein signifikanter Aktivitätsanstieg. Nach 6 h zeigten alle Proben dieser Gruppe einen Anstieg der ChE-Aktivität um ca. 10 %, der jedoch der parallel verlaufenden, thermischen Reaktivierung entspricht und somit allein auf sie zurückzuführen ist. Ein Ausbleiben der Reaktivierung Dimethyl-Carbamyl-inhibierter Acetylcholinesterase nach Zugabe von 0,1 mM 2-PAM wird auch von DAWSON und PORETSKI (1985) berichtet. MARTIN et al. (1981) untersuchten die Oxim-induzierte Reaktivierung der ZNS-AChE von mit verschiedenen CA vergifteten Japanwachteln (*Coturnix japonica*). Die Autoren stellten eine signifikante Reaktivierung nach Zugabe von 0,5 mM 2-PAM fest, die allerdings, ähnlich den vorliegenden Ergebnissen, aufgrund der progressiveren Natur des Aktivitätsanstiegs im Vergleich zu den phosphorylierten Proben hauptsächlich auf eine spontane Reaktivierung zurückgeführt wurde.

In den Plasmaproben der Parathion-belasteten Tauben zeigten sich unter Einsatz der beiden höheren Obidoxim-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den nach 1 h und 6 h Inkubation gemessenen ChE-Aktivitäten, obwohl im gleichen Zeitraum im parallelen Inkubationsansatz auch spontane thermische Reaktivierungen beobachtet wurden. Bei der schwächsten Oximkonzentration konnte dagegen auch nach 1 h Inkubation noch ein protrazierter ChE-Aktivitätsanstieg

beobachtet werden. Vom 1 h- zum 6 h-Wert lag dabei ein ChE-Aktivitätsanstieg vor, der den Wert der thermischen Reaktivierung deutlich übersteigt und somit auf eine protrahierte Oximwirkung zurückzuführen ist.

Der Vergleich der Oxim-induzierten Reaktivierung der Plasmaproben Carbofuran- und Parathion-belasteter Tauben macht deutlich, daß die phosphorylierten ChE bereits bei niedrigeren Obidoximkonzentrationen und kürzeren Inkubationszeiten einen hochgradigeren Aktivitätsanstieg zeigten als die carbamylierten Enzyme.

Die Richtigkeit der mit dem trockenchemischen Analysensystem gemessenen ChE-Aktivitätsanstiege durch Oxim-induzierte Reaktivierung wurde durch parallele naßchemische Messung mit dem Substrat BThChI überprüft. Bei den Parathion-inhibierten Plasmaproben zeigte sich dabei eine gute Übereinstimmung bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,95$. Eine hochgradige Diskrepanz wiesen dagegen die mit beiden Meßmethoden bestimmten Reaktivierungen der carbamylierten Enzyme auf. Als Ursache dieser methodikspezifischen Unterschiede sind chemischen Wechselwirkungen zwischen Esterase, Inhibitor, Reaktivator und Meßsubstrat zu vermuten. Zwischen den naß- und trockenchemischen Analysemethoden bestehen neben den hochgradig unterschiedlichen Oximkonzentrationen auch differierende Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Bestandteile des Meßansatzes. Die naßchemische Meßmethode ist somit bei Bestimmung der ChE-Aktivität in carbamylierten Plasmaproben nicht als Referenzmethode der trockenchemischen Analyse geeignet.

5.7 Blutchemische Diagnostik einer Intoxikation mit OP oder CA

Die blutchemische Diagnose einer OP- oder CA-Vergiftung läßt sich durch über einen längeren Zeitraum durch wiederholte Messungen der ChE-Aktivität stellen, wenn dabei eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität auftritt. Ein solcher Wiederanstieg der Enzymaktivität belegt das Vorliegen einer Dephosphorylierung oder Decarbamylierung gehemmter ChE und kann durch zusätzliche Verdünnung

der Plasmaprobe, Wärmezufuhr und/oder Oximzugabe beschleunigt werden (MARTIN et al. 1981, HOOPER 1988, STANSLEY 1993).

Die hohe diagnostische Aussagekraft der thermischen und/oder Oxim-induzierten Reaktivierung konnte auch mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen belegt werden. Bei beiden Inhibitortypen führte eine höhere Inkubationstemperatur zu einer schnelleren thermischen Enzymreaktivierung. So zeigten sich bereits nach 1 h Inkubation bei 37 °C hochgradige ChE-Aktivitätsanstiege, die aber nach Lagerung bei 4 °C erst ab der 6 h-Messung auftraten. Bei Inkubationszeiten über 6 h ließ sich allerdings bei den bei 37 °C inkubierten Proben eine Abnahme der ChE-Aktivität feststellen, die auf Enzymdegenerationen zurückgeführt wurde.

Während bei kurzen Lagerzeiten somit eine Inkubationstemperatur von 37 °C empfohlen werden kann, ist bei einer absehbaren Aufbewahrungszeit von über 6 h eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur anzuraten. Bei dieser Temperatur konnte eine Haltbarkeit des gehemmten Plasmaenzyms von zumindest 72 h bei fortgesetzter Reaktivierung gezeigt werden.

Eine signifikante Oxim-induzierte Reaktivierung der phosphorylierten ChE erfolgte bei allen drei verwendeten Obidoxim-Konzentrationen bereits nach einer Einwirkzeit von 1 h. Bei den carbamylierten Enzymen war dagegen nur mit der höchsten Obidoxim-Verdünnung eine Reaktivierung zu provozieren.

Analog zu den Angaben aus der Literatur (FLEMING u. GRUE 1981, WESTLAKE et al. 1981a,b, HOOPER 1988) wurde auch in den eigenen Untersuchungen der Zeitraum der möglichen blutchemischen Diagnosestellung durch den rapiden Abfall der Enzymhemmung *in vivo* aufgrund spontaner Reaktivierung und Enzymneubildung begrenzt. Die Alterung der phosphorylierten Enzyme limitierte zudem die Effizienz der induzierten Reaktivierung. Die Diagnostik einer subletalen Vergiftung ist unter Einsatz blutchemischer ChE-Aktivitäts-Bestimmung deshalb lediglich innerhalb 24 h nach oraler Aufnahme möglich.

Im Falle einer dermalen Pestizidaufnahme wird jedoch noch mehrere Tage nach der Exposition der Inhibitor perkutan resorbiert. Dabei kommt es zu einer hochgradigen persistierenden ChE-Hemmung (HENDERSON et al. 1994, SHLOSBERG et al.

1994). In solchen Situationen ist durch fortwährend neu entstehende Enzym-OP-Verbindungen ein paralleles Auftreten von reaktivierbarer und gealterter, phosphorylierter ChE zu vermuten.

Bei der Vergiftungsdiagnose anhand Reaktivierung einzelnen Plasmaproben ist der Untersucher auf einen Schwellenwert des Enzymaktivitätsanstiegs zur konkreten Diagnosestellung angewiesen. Die Reaktivierung kann dabei als prozentualer Aktivitätsanstieg im Bezug zum Hemmwert berechnet werden. Als diagnostischer Grenzwert fungierte bei WILSON et al. (1991) nach Oxim-induzierter und bei HUNT und HOOPER (1993) sowie HUNT et al. (1995) nach thermischer Reaktivierung ein Aktivitätsanstieg von über 5 % gegenüber der Erstmessung. MORTENSEN et al. (1998) sahen nach thermischer Reaktivierung der ZNS-AChE von Carbofuran-vergifteten Vögeln erst einen Anstieg der Enzymaktivität auf zumindest 110 % des Hemmwerts als diagnostisch an.

Bei der Definition des Grenzwerts muß eine falsch positive Vergiftungsdiagnose ausgeschlossen werden, wie sie durch biologische Variabilität der Enzymaktivität und der Enzymhemmung sowie, bei Einsatz von Oxim-induzierter Reaktivierung mit hoher Reaktivatorkonzentration, durch die Schwankungsbreite der Oxim-induzierten Hydrolyse des Meßsubstrats auftreten kann.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an Haustauben kann kein allgemeingültiger Schwellenwert festgesetzt werden. Der Gebrauch eines generellen prozentualen Wertes, wie in den oben zitierten Arbeiten, wird der Problematik nicht gerecht. Bei einer hochgradigen Hemmung der ChE der Taube, z. B. auf 300 U/l, würde bei einem Anstieg um 5% der zunächst gemessenen Aktivität lediglich ein Wert von 315 U/l, bei einem Anstieg auf 110% 330 U/l erreicht werden. Ein derart geringer Aktivitätsunterschied liegt aber bei einer einzelnen Probe im Bereich der biologischen und methodischen Schwankungsbreite. Er führt zu keiner eindeutigen diagnostischen oder forensisch nutzbaren Aussage.

5.8 Differenzierung von OP- und CA-Vergiftungen durch Einsatz der diagnostischen Reaktivierung

Phosphorylierte und carbamylierte ChE unterscheiden sich in der Höhe der thermischen und Oxim-induzierten Reaktivierbarkeit. Während erstere eine schwache spontane und vor der Alterung eine hochgradige chemische Reaktivierung zeigen, ist bei den zweiten das Gegenteil der Fall. Einige Autoren berichten von einem völligen Ausbleiben der spontanen Reaktivierung bei den häufig als „irreversibel gehemmt“ bezeichneten OP-inhibierten Cholinesterasen bei Vögeln. Sie sehen daher die Feststellung eines spontanen Anstiegs der ChE (RAINWATER et al. 1995) oder ZNS-AChE (HILL 1989a, STANSLEY 1993, HUNT et al. 1995) als ausreichend für den Nachweis einer CA-Inhibition an.

SMITH et al. (1995) untersuchten die ZNS-AChE verendet aufgefundenen Wildvögel. Lag die ZNS-AChE-Aktivität mehr als zwei Standardabweichungen unterhalb der artspezifischen Referenzwerte, so wurden Gehirnhomogenisate 16 bis 18 h bei 37 °C inkubiert. Überschritt nach dieser Zeit die Enzymaktivität den oben definierten Schwellenwert, so wurde das Vorliegen einer CA-Intoxikation vermutet. Im entgegengesetzten Fall ging man von einer OP-Vergiftung aus. Durch chemische Analyse der Ingesta wurde die blutchemisch diagnostizierte Pestizidgruppe nachgewiesen und damit eine hohe Genauigkeit dieser Methode belegt. Es traten keine falsch positiven CA- und keine falsch negativen OP-Bewertungen auf. Fehler kamen dagegen in geringer Zahl aufgrund nicht reaktivierbarer CA-Intoxikation durch sehr hohe Inhibitorkonzentrationen, Pestizidkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, dermale Exposition, Autolyse oder des Vorliegens unbekannter ChE-Inhibitoren vor.

Die Diagnostizierung einer CA-Vergiftung durch einfachen Nachweis einer spontanen Reaktivierung ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bei Messung der Aktivität der BChE der Taube nicht zulässig. Sowohl bei den *in vitro*, als auch bei den *in vivo* phosphorylierten ChE konnte im Gegensatz zu der oben beschriebenen Einschätzung eine hochgradige thermische Reaktivierbarkeit festgestellt werden. Über signifikante spontane Dephosphorylierungen der ZNS-AChE wurde auch von

BUNYAN et al. (1968) bei Diazinon-vergifteten Fasanen (*Phasianus colchicus*) und HOOPER (1988) bei Japanwachteln (*Coturnix japonica*) mit Parathion-Intoxikation berichtet.

WOREK et al. (1997) zeigten an Paraoxon-inhibierter, humaner Erythrozyten-Acetylcholinesterase eine spontane Reaktivierung um ca 30 %R nach 24 h und 50 %R nach 72 h. THOMPSON et al. (1991b) stellten bei dreitägiger Aufbewahrung von ZNS- und Plasmaproben von mit den OP Chlorpyrifos und Triazophos vergifteten Staren (*Sturnus vulgaris*) eine geringgradige bis vollständige spontane Wiederherstellung der Ausgangsaktivität fest. Eine hochgradige spontane Reaktivierung von Parathion-inhibierter ZNS-AChE beobachteten auch LUDKE et al. (1975) bei Japanwachteln.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung ist aber eine Inhibitordifferenzierung durch parallele thermische und Oxim-induzierte Reaktivierung möglich. Liegt die thermische Reaktivierung (bei 37 °C) höher als die Oxim-induzierte Reaktivierung, so handelt es sich um eine CA-Vergiftung. Die gegenteilige Situation kann dann als Nachweis einer OP-Inhibition herangezogen werden, wenn die niedrigste Oxim-Konzentration eingesetzt wurde.

Zu einem analogen Ergebnis kamen MARTIN et al. (1981) nach thermischer und Oxim-induzierter Reaktivierung von ZNS-AChE von mit verschiedenen OP und CA vergifteten Japanwachteln. Die carbamylierten Enzyme zeigten in dieser Studie eine der Oxim-induzierten um das 1,5-fache bis 4-fache überlegene spontane Reaktivierung. Bei allen OP-inhibierten Proben lag dagegen eine signifikante Oxim-induzierte (30 min Inkubation 4 °C, 0,5 mM 2-PAM), aber keine spontane Reaktivierung (Gelfiltration, Verdünnung, 24 h Inkubation bei 4 °C) vor.

5.9 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere OP- und CA-Vergiftungen

Bei der diagnostischen Reaktivierung potentiell gehemmter ChE beeinflussen mehrere, dem Untersucher zumeist unbekannt Faktoren die Höhe und den Verlauf der Enzymaktivität.

Die Stabilität der Enzym-Inhibitor-Bindung ist nicht nur von der Einordnung des Enzymhemmers als OP oder CA abhängig, sondern wird in beiden Fällen auch stark von dem Molekülaufbau der jeweiligen Substanz beeinflusst. Mit Diethyl-substituierten OP gehemmte Cholinesterasen zeigen z. B. eine niedrigere Rate der spontanen Dephosphorylierung, eine höhere Geschwindigkeit der Oxim-induzierten Reaktivierung und eine langsamere Alterung als mit Dimethyl-substituierten OP inhibierte Enzyme (ETO 1974, MARTIN et al. 1981, SCHMIDT u. ZECH 1988, ROTENBERG et al. 1995, WOREK et al. 1997). Die Oximzugabe führt bei Carbaryl-Inhibitionen zu einer Potenzierung der Hemmwirkung (DAWSON u. PORETSKI 1985, HARRIS et al. 1985). Die Konzentration der einzelnen Bestandteile des Meßansatzes verändert darüber hinaus ebenso den Ablauf der Hemm- und Reaktivierungsreaktionen wie die Oximkonzentrationen, die Probenvorbereitung und Meßintervalle (MARDEN et al. 1994).

Eine allgemeingültige Übertragung der in der vorliegenden Arbeit erstellten Ergebnisse auf alle OP/CA-Vergiftungen ist somit nicht zulässig. Aufgrund der hohen Übereinstimmung mit den Literaturangaben sind jedoch zwei Regeln der diagnostischen Reaktivierung als allgemeingültig einzustufen:

Steigt die ChE-Aktivität durch thermische Reaktivierung (37 °C) signifikant stärker an als nach Oxim-Zugabe, so liegt eine CA-Vergiftung vor. Besteht dagegen eine signifikante Oxim-induzierte Reaktivierung bei vollständigem Ausbleiben oder nur geringgradiger Ausprägung einer thermischen Reaktivierung, so handelt es sich um eine OP-Intoxikation.

5.10 Klinische und blutchemische Diagnostik von OP- und CA-Vergiftungen unter Einsatz des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II®

Die Bestimmung der BChE-Aktivität mit Hilfe des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II® wird durch eine gute Präzision und Richtigkeit ausgezeichnet. Die Präzision gibt die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse, die

Richtigkeit die Übereinstimmung des gemessenen Werts mit der tatsächlich in der Probe vorhandenen Enzymaktivität an (KIESAU 1997). Dieses trockenchemische Analysensystem ist in vielen tierärztlichen Kliniken verbreitet und bietet ein übereinstimmendes Meßverfahren mit einheitlichen Referenzwerten bei minimalem Laboraufwand. Besteht bei einem zur Untersuchung in der tierärztlichen Klinik vorgestellten Zier- oder Wildvogel der Verdacht auf das Vorliegen einer Pestizidintoxikation, so kann die BChE-Messung und die diagnostische Reaktivierung ohne zwischenzeitliche Probenaufbewahrung und Transport in ein Untersuchungslabor durchgeführt werden.

Zur blutchemischen Diagnostik beim Vogel sollte nach der Blutentnahme eine umgehende Abzentrifugation des Plasmas und die trockenchemische Bestimmung der ChE-Aktivität erfolgen. Unterschreitet dieser Wert den von der untersuchten Vogelart bekannten und Meßmethodik-spezifischen Referenzbereich, so ist die Verdachtsdiagnose einer Intoxikation mit ChE-Inhibitoren berechtigt. Differentialdiagnostisch muß in solchen Fällen klinisch-symptomatisch, röntgenologisch, blutchemisch oder durch diagnostische Reaktivierung eine mangelnde ChE-Synthese in Folge hochgradiger Leberinsuffizienz ausgeschlossen werden (ZINKE et al. 1999b).

Bei Fehlen spezifischer Referenzwerte gilt auch die Unterschreitung der ChE-Aktivität parallel gemessener Kontrollwerte gesunder Artgenossen um die doppelte Standardabweichung als diagnostisch für das Vorliegen einer Intoxikation mit ChE-Inhibitoren (HILL u. FLEMING 1982, WILSON et al. 1992, McINNES et al. 1996).

Liegen von der untersuchten Vogelart jedoch keine spezifischen ChE-Vergleichswerte vor, kann eine diagnostische Reaktivierung durchgeführt werden. Zur Minimierung des Pipettier- und Analysensystem-immanenten Fehlerquotienten sind zumindest Doppelmessungen durchzuführen. Die trockenchemische Analysenmethode ist dazu geeignet, thermische- und Oxim-induzierte Reaktivierungen zu messen. Eine Potenzierung der spontanen Reaktivierung durch Probenverdünnung ist aufgrund der relativ niedrigen intrinsischen Aktivität des Plasmaenzyms nicht möglich. Vergleichende Untersuchungen von HUNT und HOOPER (1993) an der ZNS-AChE von CA-vergifteten Virginiawachteln (*Colinus*

virginianus) zeigten allerdings, daß der Enzym-reaktivierende Effekt einer Inkubation bei 37 °C in den ersten Inkubationsstunden signifikant höher ist als der Aktivitätsanstieg durch exzessive Verdünnung.

Zur diagnostischen Reaktivierung unter Einsatz des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II[®] ist das in Kap. 9 angegebene Protokoll anzuraten. Ein dabei ausbleibender Aktivitätsanstieg der ChE kann neben fehlender Enzymhemmung auch durch eine Alterung von phosphorylierten Enzymen hervorgerufen werden.

Da das trockenchemische Analysensystem VITROS DT 60 II[®] BThChI als Meßsubstrat benutzt, wird ausschließlich die Aktivität der BChE erfasst. Die ChE-Aktivität geht bei einigen Greif- und Singvogelarten aber zu 40 bis 95% auf AChE-Aktivität zurück (HOOPER u. WILSON 1987, HOOPER 1988, HOOPER 1991, KIESAU 1997). Das Analysensystem VITROS DT 60 II[®] ist demnach zur Vergiftungsdiagnostik bei den Vogelarten, die eine physiologische BChE-Aktivität im Bereich der unteren Nachweisgrenze des Gerätes von 200 U/l aufweisen, nicht geeignet.

5.11 Vergleich der Hemm- und Reaktivierungsergebnisse durch ChE-Inhibition *in vitro* und *in vivo*

Die Phosphorylierung oder Carbamylierung der ChE ist durch Zugabe der Inhibitoren *in vitro* zu Plasmaproben möglich.

Die Reaktionskinetik der Cholinesterasehemmung durch reversible Inhibitoren ist jedoch derart komplex, daß eine quantitative Korrelation zwischen *in vitro*-Verhalten gehemmter ChE und pharmakologischen Zusammenhängen *in vivo* nicht möglich ist (HOBBIGER 1951). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, daß qualitative Analogien sehr wohl vorliegen. So war bei beiden Versuchsreihen die spontane Reaktivierung der carbamylierten ChE abhängig von der Inkubationstemperatur, während die phosphorylierten Enzyme eine temperaturunabhängige spontane Reaktivierung zeigten. In beiden Fällen war auch

die Unterscheidung von OP und CA durch unterschiedliche Reaktivierung bei niedrigen Obidoxim-Konzentrationen möglich. Das Ausbleiben der Alterung während der *in vitro*-Inkubation OP-gehemmter Proben und der relative zeitliche Verlauf der thermischen und Oxim-induzierten Reaktivierung entsprachen ebenfalls den Verhältnissen *in vivo*.

Eine Enzyminhibition *in vitro* in Plasmaproben ist demnach zur Charakterisierung der diagnostischen Reaktivierung anderer ChE-hemmender Pestizide wie zur Charakterisierung von Oximpräparaten geeignet.

6. Zusammenfassung

Vergiftungen von Vögeln durch Organophosphate (OP) oder Carbamate (CA) führen zu einer Inhibition der Cholinesterasen. Diese Enzyme treten in den Synapsen und muskulären Endplatten sowie im Plasma der Tiere auf. Die Aktivität der Plasmacholinesterase (ChE) setzt sich aus vogelartspezifischen Anteilen an Acetylcholinesterase (AChE)- und Butyrylcholinesterase (BChE)-Aktivitäten zusammen. Die Verdachtsdiagnose einer Intoxikation mit OP oder CA kann durch Bestimmung einer unterhalb des spezifischen Referenzbereichs liegenden, der Nachweis durch Messung einer sich *in vitro* reaktivierenden ChE-Aktivität erfolgen.

Ziel dieser Arbeit war es, unter Einsatz des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II[®] (VITROS) eine Methode zum klinischen Nachweis von OP- und CA-Vergiftungen *in vivo* bei der Taube (*Columba livia dom.*) zu etablieren. Als Referenzmethode diente bei allen Messungen eine parallele naßchemisch-photometrische ChE-Aktivitätsbestimmung.

Als Basis dazu wurden im ersten Teil der Arbeit spezifische Referenzbereiche unter Beachtung der Beeinflussung der Höhe der physiologischen ChE-Aktivität durch Alter, Geschlecht, Haltungsform und Jahreszeit erstellt. Zu diesem Zweck fanden in vierteljährlichem Abstand ChE-Aktivitätsmessungen in einem extensiv versorgten Stadtaubenschlag (n= 44) und einem intensiv betreuten Brieftaubenschlag (n= 62) sowie bei halbjährigen Tauben (n= 28 Stadtauben, n= 11 Brieftauben) und Nestlingen (n=11) zwischen dem 7. und 42. Lebenstag statt.

Nestlingstauben wiesen signifikant niedrigere ChE-Aktivitäten (VITROS 37 °C: 2132 bis 3014 U/l) als halbjährige und adulte Artgenossen auf (2377 bis 5332 U/l, $p < 0,05$). Zwischen den letztgenannten Altersgruppen existierten dagegen keine signifikanten Unterschiede. Im Alter von 1 bis 6 Wochen traten weder signifikante Veränderungen der Höhe der ChE-Aktivität noch der Anteile der AChE- und BChE-Aktivität an der ChE-Aktivität auf. Bei Nestlingen wurden allerdings signifikant höhere prozentuale Anteile der AChE- an der ChE-Aktivität (10%) festgestellt als bei den älteren Tieren (6%).

In der warmen Jahreshälfte lagen signifikant höhere mittlere ChE-Aktivitäten (VITROS 37 °C, Stadttauben: 4635 U/l) vor als in Herbst und Winter (Stadttauben: 3792 U/l). Da diese jahreszeitliche Differenz bei den Stadttauben stärker ausgeprägt war als bei den Brieftauben, können insbesondere alimentäre Unterschiede zwischen beiden Haltungformen als ursächlich vermutet werden.

Die Referenzbereiche für Haustauben wurden alters- und haltungsformspezifisch erstellt. Sie unterschieden sich unter Anwendung der gleichen Meßmethodik vor allem in der Höhe der oberen Referenzbereichsgrenze (VITROS 37 °C: 3014 bis maximal 6660 U/l), wohingegen die untere Begrenzung zwischen allen Gruppen um höchstens 524 U/l differierte (2132 bzw. 2656 U/l). Das Geschlecht und der Reproduktionszyklus beeinflussten bei Haustauben die Höhe der ChE-Aktivität nicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Möglichkeit einer Reaktivierung von mit Parathion und Carbofuran gehemmter ChE *in vitro* durch Beschleunigung der spontanen Reaktivierung mittels Wärmezufuhr (thermische Reaktivierung) sowie Zugabe der Enzymreaktivators Obidoxim (Oxim-induzierte Reaktivierung) für diagnostische Zwecke untersucht. Nach Vorversuchen der diagnostischen Reaktivierung an *in vitro* mit Parathion oder Carbofuran gehemmten Taubenplasmaproben wurde Tauben Parathion (n= 12) oder Carbofuran (n= 6) peroral in subletaler Dosierung verabreicht und zu verschiedenen Zeiten *post applikationem* Plasma zur Reaktivierung gewonnen. Innerhalb von 1 bis 2 h *post applikationem* bestand eine hochgradige Hemmung der ChE auf 8 – 30 % der Ausgangsaktivität (%A).

Sowohl bei den Parathion-, als auch bei den Carbofuran-gehemmten Proben konnten signifikante ChE-Aktivitätsanstiege um bis zu 88 %A durch thermische bzw. Oxim-induzierte Reaktivierungen erreicht werden. Zudem konnte gezeigt werden, daß bei der parallelen Inkubation einer gehemmten Plasmaprobe bei 37 °C zur thermischen sowie mit einer Obidoxim-Lösung bei 4 °C zur Oxim-induzierten Reaktivierung eine Differenzierung zwischen OP- und CA-Intoxikationen nach folgenden Grundsätzen möglich ist:

1. Steigt die ChE-Aktivität durch thermische Reaktivierung (37 °C) signifikant stärker an als nach Oxim-Zugabe (z.B. von Obidoxim, $6,4 \times 10^{-5}$ M im trockenchemischen Meßansatz), so liegt eine CA-Vergiftung vor.

2. Besteht eine signifikante Oxim-induzierte Reaktivierung bei Ausbleiben oder lediglich geringer thermischen Reaktivierung, so handelt es sich um eine OP-Intoxikation.

Diese Methode ermöglicht unter Praxisbedingungen eine blutchemische Diagnostik von OP- und CA-Intoxikationen. Bei minimalem Laboraufwand kann mit Hilfe eines verbreiteten trockenchemischen Analysensystems innerhalb weniger Stunden nach der Blutentnahme ein Vergiftungsnachweis geführt werden.

Inhibition und Reaktivierung der ChE durch CA und OP verliefen qualitativ gleichartig nach oraler Belastung *in vivo* und Inhibitorzugabe *in vitro*. Eine Enzyminhibition *in vitro* ist demnach zur Charakterisierung der diagnostischen Reaktivierung bei verschiedenen ChE-Hemmstoffen und zur Bewertung der reaktivierenden Potenz von Oximpräparaten gut geeignet.

7. Summary

Axel Zinke

Diagnosis of organophosphorus and carbamate poisoning in the pigeon (*Columba livia v. domestica*) using blood chemistry including plasma cholinesterase reactivation techniques.

Intoxications of birds by organophosphates (OP) or carbamates (CA) lead to an inhibition of cholinesterases. These enzymes are present in synapses and muscular end-plates as well as in avian plasma. The plasma cholinesterase (ChE) activity consists, species specifically, of the activities of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). An intoxication with OP or CA can be detected by measuring a ChE-activity that lies below the specific reference range and/or which reactivates *in vitro*.

This study was designed in order to develop a method for diagnosing OP- and CA-intoxications in the pigeon (*Columba livia dom.*) *in vivo* by using a dry chemistry system (VITROS DT 60 II®). Wet chemical photometric ChE-activity assays were run parallel as a reference method.

Beforehand specific reference values were drawn up taking into consideration the influences of age, sex, type of housing and season on the level of the physiological ChE-activity. In a pigeon loft with domestic pigeons (n=44) and a pigeon loft with racing pigeons (n=62) quarterly ChE-activity measurements were conducted as well as in half-year old pigeons (n=28 domestic pigeons, n=11 racing pigeons) and 11 nestlings between 7 and 42 days old.

Nestling pigeons had significantly lower ChE-activities (VITROS 37 °C: 2132 – 3014 U/l) than half-year old and adult animals of the same species (2377 – 5332 U/l, p<0,05). Differences of this kind did not exist between the latter age-groups. From

the 1st until the 6th week of age no significant changes could be seen either in the level of ChE-activity or in the relation of AChE- and BChE-activity. In nestlings though, a significantly higher percentage of ChE-activity could be attributed to AChE-activity (10%) than was noted in older pigeons (6%). In the warmer seasons significantly higher ChE-activities (VITROS 37 °C, domestic pigeon: 4635 U/l) were found than in autumn and winter (domestic pigeon: 3792 U/l). Since seasonal differences were more distinct in domestic pigeons especially alimentary differences between both types of housing can be considered to be causative. Therefore reference ranges were drawn up age- and type of housing-related. Above all they differed in the level of the upper reference ranges (VITROS 37 °C: 3014 – 6660 U/l) while the lower limits stay nearly the same in all age-groups (2132 – 2656 U/l). Sex and reproductive cycle did not influence the ChE-activity level.

In the second part of this study the possibility of reactivating parathion- and carbofuran-inhibited ChE *in vitro* for diagnostic purposes was examined by maximizing spontaneous reactivation via warmth (thermal reactivation) as well as adding the enzyme reactivator Obidoxime (oxim-induced reactivation). Preliminary experiments of induced reactivation took place with samples of pigeon plasma in which parathion and carbofuran were used as inhibitors *in vitro*.

After that pigeons were given parathion (n=12) or carbofuran (n=6) per os in a sublethal dose which resulted in 30 to 92 % ChE inhibition. Plasma samples were taken at different points of time *post applicationem*. Significant reactivation of ChE-activity could be achieved in parathion- as well as in carbofuran-inhibited samples by thermal and oxim-induced reactivation. In addition it could be shown that it is possible to differentiate between OP- and CA-intoxications by parallel incubation of samples at 37 °C (thermal reactivation) and at 4 °C with Obidoxime-solution (oxim-induced reactivation). If thermic reactivation is stronger than oxim-induced reactivation using a relatively low Obidoxime-dilution a CA-intoxication is present. In the opposite case an OP-intoxication can be suspected.

In practice this method facilitates a blood chemical diagnostic of OP- and CA-intoxications. With minimal laboratory expenditure and a common dry chemistry

system a present intoxication can be detected within a few hours after the blood sample has been taken.

8. Literaturverzeichnis

- ABOU-DONIA, M.B. (1981):
Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 511 - 548
- ABOU-DONIA, M.B., u. A.A. NORMEIR (1986):
The role of pharmacokinetics and metabolism in species sensitivity to neurotoxic agents.
Fundam. Appl. Pharmacol. 6, 190 - 207
- ALBUQUERQUE, E.X., M. ALKONDON, S.S. DESHPANDE, W.M. CINTRA, Y. ARACAVALA u. A. BROSSI (1988):
The role of carbamates and oximes in reversing toxicity of organophosphorus compounds: a perspective into mechanism
in: G.G. LANT (Hrsg.): Neurotox '88: Molecular basis of drug & pesticide action.
Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 349 - 373
- ALDRIDGE, W.N. (1953a):
Serumesterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 - 117
- ALDRIDGE, W.N. (1953b):
The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organophosphorus compounds.
Biochem. J. 53, 62 - 69
- ALDRIDGE, W.N. (1953c):
The inhibition of erythrocyte cholinesterase by triesters of phosphoric acid. 3. The nature of the inhibitory process.
Biochem. J. 54, 422 - 448
- ALDRIDGE, W.N., u. J.M. BARNES (1952):
Some problems in assessing the toxicity of the „organophosphorus“ insecticides towards mammals.
Nature 169, 345 - 352
- ALDRIDGE, W.N., u. E. REINER (1972):
Enzyme inhibitors as substrates – Interactions of esterases with esters of organophosphates and carbamates.
North-Holland Publishing, Amsterdam
- ALKONDON, M., K.S. RAO u. E.X. ALBUQUERQUE (1988):
Acetylcholinesterase reactivators modify the functional properties of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 245, 543 - 556

- ALLEMAND, P., S. BON, J. MASSOULIE u. M. VIGNY (1981):
The quaternary structure of chicken acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase;
effect of collagenase and trypsin.
J. Neurochem. 36, 860 - 867
- ALLES, G.A., u. R.C. HAWES (1940):
Cholinesterases in the blood of man.
J. Biol. Chem. 133, 375 – 390
- AUGSPURGER, T., M.R. SMITH, C.U. METEYER u. K.A. CONVERSE (1996):
Mortality of passerines adjacent to a North Carolina corn field treated with granular
carbofuran.
J. Wildl. Dis. 32, 113 - 116
- AUGUSTINSSON, K.B. (1949):
Substrate concentration and specificity of choline ester-splitting enzymes.
Arch. Biochem. 23, 111 - 126
- AUSTIN, L., u. W.K. BERRY (1953):
Two selective inhibitors of cholinesterase.
Biochem. J. 54, 695 - 700
- BALCOMB, R. (1983):
Secondary poisoning of red-shouldered hawks with carbofuran.
J. Wildl. Manage. 47, 1129 - 1132
- BALCOMB, R., C.A. BOWEN, D. WRIGHT u. M. LAW (1984):
Effects on wildlife of at-planting corn applications of granular carbofuran.
J. Wildl. Manage. 48, 1353 - 1359
- BARTKOWIAK, D.J., u. B.W. WILSON (1995):
Avian plasma carboxylesterase activity as a potential biomarker of organophosphate
pesticide exposure.
Environ. Toxicol. Chem. 14, 2149 - 2153
- BAUM, G. (1986):
Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel als Ursache für akute Vergiftungen
bei Haus- und Wildtieren.
Tierärztl. Umschau 41, 186 - 196
- BENNETT, R.S., u. J.K. BENNETT (1991):
Age-dependent changes in activity of mallard plasma cholinesterase.
J. Wildl. Dis. 27, 116 - 118
- BENNETT R.S., u. A. FAIRBROTHER (1991):
unpublished observations.
zit. nach B.A. RATTNER u. A. FAIRBROTHER (1991)

- BENNETT, R.S. et al. (1991):
unpublished observations.
zit. nach B.A. RATTNER u. A. FAIRBROTHER (1991)
- BERGMANN, F., u. H. GOVRIN (1973):
Influence of pyridine-2-aldoxime-methochloride (PAM) on non-enzymic and enzymic ester hydrolysis.
Biochimie 55, 515 - 520
- BERRY, W.K., u. D.R. DAVIES (1966):
Factors influencing the rate of ageing of a series of alkyl methylphosphonyl-acetylcholinesterases.
Biochem. J. 100, 572 - 576
- BESSER, R., L. WEILEMANN u. L. GUTMANN (1995):
Efficacy of obidoxime in human organophosphorus poisoning: Determination by neuromuscular transmission studies.
Muscle & Nerve 18, 15 - 22
- BEST, L.B. (1992):
Characteristics of corn rootworm insecticide granules and the grit used by cornfield birds: evaluating potential avian risks.
Am. Midl. Nat. 128, 126 - 138
- BEST, L.B., u. D.L. FISCHER (1992):
Granular insecticides and birds: factors to be considered in understanding exposure and reducing risk.
Environ. Toxicol. Chem. 11, 1495 - 1508
- BLABER, S.C., u. N.H. CREASEY (1960):
The mode of recovery of cholinesterase activity *in vivo* after organophosphorus poisoning: 2. Brain cholinesterase.
Biochem. J. 77, 597 - 604
- BOLTON, T.B. (1976):
Nervous system
in: P.D. STURKIE (Hrsg.): Avian physiology.
Verlag Springer, New York, Berlin, S. 1 - 28
- BON, S., K. MEFLAH, F. MUSSET, J. GRASSI u. J. MASSOULIE (1987):
An immunoglobulin M monoclonal antibody, recognizing a subset of acetylcholinesterase molecule from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*, belongs to the HNK-1 anti-carbohydrate family.
J. Neurochem. 49, 1720 - 1731
- BON, S., M. VIGNY u. J. MASSOULIE (1979):
Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 2546 - 2550

- BOSKOVIC, B., V. VOJVODIC, M. MAKSIMOVIC, S. GRANOV, S. BESAROVIC-LAZAREV u. Z. BINENFELD (1976):
Effect of mono- and bis-quaternary pyridinium oximes on the acute toxicity and on the serum cholinesterase inhibitory activity of dioxacarb, carbaryl and carbofuran.
Arh. Hig. Rada Toksikol. 27, 289 - 295
- BUERGER, T.T., R.J. KENDALL, C.J. DRIVER u. T. LACHER JR. (1985):
The effect of methyl parathion on northern bobwhite survivability.
Environ. Toxicol. Chem. 10, 527 - 532
- BULGER, J.E., W.R. RANDALL, P.S. NIEBERG, G.T. PATTERSON, M.G. McNAMEE u. B.W. WILSON (1982):
Regulation of acetylcholinesterase forms in quail and chicken muscle cultures.
Dev. Neurosci. 5, 474 - 483
- BUNYAN, P.J., u. D.M. JENNINGS (1976):
Carbamate poisoning. Effect of certain carbamate pesticides on esterase levels in the pheasant and pigeon.
J. Agr. Food Chem. 24, 136 - 143
- BUNYAN, P.J., D.M. JENNINGS u. A. TAYLOR (1968):
Organophosphorus poisoning. Diagnosis of poisoning in pheasants owing to a number of common pesticides.
J. Agr. Food Chem. 16, 332 - 339
- BUNYAN, P.J., u. A. TAYLOR (1966):
Esterase inhibition in pheasants poisoned by Thimet.
J. Agr. Food Chem. 14, 132 - 137
- BUNYAN, P.J., M.J. VAN DER HEUVEL, P.I. STANLEY u. E.N. WRIGHT (1981):
An intensive field trial and a multi-site surveillance exercise on the use of aldicarb in investigative methods for the assessment of possible environmental hazard presented by new pesticides.
Agro-Ecosystems 7, 239 - 262
- BURN, J.D., u. F.A. LEIGHTON (1996):
Further studies of brain cholinesterase: cholinergic receptor ratios in the diagnosis of acute lethal poisoning of birds by anticholinesterase pesticides.
J. Wildl. Dis. 32, 216 - 224
- BUZNIKOV, G.A. (1984):
The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis.
Pharmacol. Ther. 25, 23 - 59
- CHAMBERS, H.W. (1992):
Organophosphorus compounds: An Overview
in: J.E. CHAMBERS u. P.E. LEVI (Hrsg.): *Organophosphates: chemistry, fate and effects.*
Academic Press, San Diego, S. 15 - 17

- CHEMNITIUS, J.M., K.H. HASELMEYER u. R. ZECH (1983):
Neurotoxic esterase. Identification of two isoenzymes in hen brain.
Arch. Toxicol. 53, 235 - 244
- CISSON, C.M., u. B.W. WILSON (1983):
Percutaneous toxicity and delayed neurotoxicity of organophosphates in the scaleless hen.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 67, 310 - 321
- CLITHEROW, J.W., M. MITCHARD u. N.J. HARPER (1963):
The possible biological function of pseudocholinesterase.
Nature 199, 1000 - 1001
- DAWSON, R.M. (1994):
Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning.
J. Appl. Toxicol. 14, 317 - 331
- DAWSON, R.M., u. M. PORETSKI (1985):
Carbamylated acetylcholinesterase: Acceleration of decarbamylation by bispyridinium oximes.
Biochem. Pharmacol. 34, 4337 - 4340
- DE CLERMONT, P. (1854):
Chimie organique – Note sur la preparation de quelques ethers.
Compt. Rend. Acad. Sci. 39, 338 - 341
- DIETER, M.P. (1974):
Plasma enzyme activities in coturnix quail fed graded doses of DDE, polychlorinated biphenyl, malathion and mercuric chloride.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 27, 86 - 98
- DORRESTEIN, G.M., u. N. KUMMERFELD (1998):
Singvögel
in: K. GABRISCH u. P. ZWART (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere.
Verlag Schlütersche, Hannover, S. 327 - 395
- DREWS, U. (1975):
Cholinesterase in embryonic development.
Prog. Histochem. Cytochem. 7, 1 - 52
- DRIVER, C.J., M.W. LIGOTKE, P. VAN VORIS, B.D. McVEETY, B.J. GREENSPAN u. D.B. DROWN (1991):
Routes of uptake and their relative contribution to the toxicologic response of northern bobwhite (*colinus virginianus*) to an organophosphate pesticide.
Environ. Toxicol. Chem. 10, 21 - 33

- DUMONCEAUX, G., u. G.J. HARRISON (1994):
Toxins
in: B.W. RITCHIE, G.J. HARRISON u. L.R. HARRISON (Hrsg.):
Avian medicine: Principles and application.
Wingers Publishing, Lake Worth, Florida, S. 1030 - 1052
- ELLIN, R.I. (1981):
Anomalies in theories and therapy of intoxication by potent organophosphorus
anticholinesterase compounds.
Biomedical laboratory special publication USABML-SP-81-003, 1981, 11 - 28
- ELLIOTT, J.E., K.M. LANGELIER, P. MINEAU u. L.K. WILSON (1996):
Poisoning of bald eagles and red-tailed hawks by carbofuran and fensulfotion in the
Fraser Delta of British Columbia, Canada.
J. Wildl. Dis. 32, 486 - 491
- ELLMAN, G.L., K.D. COURTNEY, V. ANDRES JR. u. R.M. FEATHERSTONE (1961):
A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.
Biochem. Pharmacol. 7, 88 - 95
- ENGELHARD, H., u. W.D. ERDMANN (1963):
Ein neuer Reaktivator für durch Alkylphosphat gehemmte Acetylcholinesterase.
Klin. Wschr. 41, 525 - 527
- ERDMANN, W.D., R. ZECH, P. FRANKE u. I. BOSSE (1966):
Zur Frage der therapeutischen Wirksamkeit von Esterase-Reaktivatoren bei der
Vergiftung mit Dimethoat.
Arzneim. Forsch. 16, 492 - 494
- ETO, M. (1974):
Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry.
CRC Press, Cleveland
- EVANS, R.T. (1986):
Cholinesterase phenotyping: Clinical aspects and laboratory applications.
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 23, 25 - 64
- FAIRBROTHER, A. (1996):
Cholinesterase-inhibiting pesticides
in: A. FAIRBROTHER, L.N. LOCKE, G.L. HOFF (Hrsg.): Noninfectious diseases of
wildlife.
Iowa State University Press, Ames, Iowa, S. 52 - 60
- FAIRBROTHER, A., R.S. BENNETT u. J.K. BENNETT (1989):
Sequential sampling of plasma cholinesterase in mallards as an indicator of exposure
to cholinesterase inhibitors.
Environ. Toxicol. Chem. 8, 117 - 122

- FAIRBROTHER, A., M.A. CRAIG, K. WALKER u. D. O'LOUGHLIN (1990):
Changes in mallard serum chemistry due to age, sex, and reproductive condition.
J. Wildl. Dis. 26, 67 - 77
- FAIRBROTHER, A., B.T. MARDEN, J.K. BENNETT u. M.J. HOOPER (1991):
Methods used in determination of cholinesterase activity
in: P. MINEAU (Hrsg.): Cholinesterase-inhibiting insecticides.
Vol. 2. Chemicals in agriculture.
Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 35 - 71
- FARAGE-ELAWAR, M. (1991):
Development of esterase activities in the chicken before and after hatching.
Neurotoxicol. Teratology 13, 147 - 152
- FARAGE-ELAWAR, M., M.F. EHRICH, B.S. JORTNER u. H.P. MISRA (1988):
Effects of multiple oral doses of two carbamate insecticides on esterase levels in young
and adult chickens.
Pest. Biochem. Physiol. 32, 262 - 268
- FARAGE-ELAWAR, M., u. M. FRANCIS (1987):
Acute and delayed effects of fenthion in young chicks.
J. Toxicol. Environ. Health 21, 455 - 469
- FLEISHER, J.H., u. L.W. HARRIS (1965):
Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl
methylphosphonofluoridate.
Biochem. Pharmacol. 14, 641 - 650
- FLEMING, W.J. (1981):
Recovery of brain and plasma cholinesterase activities in ducklings exposed to
organophosphorus insecticides.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 10, 215 - 229
- FLEMING, W.J., u. C.E. GRUE (1981):
Recovery of cholinesterase activity in five avian species exposed to dicrotophos, an
organophosphorus pesticide.
Pest. Biochem. Physiol. 16, 129 - 135
- FLICKINGER, E.L., G. JUENGER, T.J. ROFFE, M.R. SMITH u. R.J. IRWIN (1991):
Poisoning of canada geese in Texas by parathion sprayed for control of russian wheat
aphid.
J. Wildl. Dis. 27, 265 - 268
- FORGET, G. (1991):
Pesticides and the third world.
J. Toxicol. Environ. Health 32, 11 - 31
- FOWLE, C.D. (1972):
Effects of phosphamidon on forest birds in New Brunswick.
Can. Wildl. Serv. Rep. Ser. 16, 1 - 23

- FUKUTO, T.R. (1990):
Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.
Environ. Health Perspect. 87, 245 - 254
- FUNNEL, H.S., u. W.T. OLIVER (1965):
Proposed physiological function for plasma cholinesterase.
Nature 208, 689 - 690
- GARCIA-RODRIGUEZ, T., M. FERRER, F. RECIO u. J. CASTROVIEJO (1987):
Circadian rhythms of determined blood chemistry values in buzzards and eagle owls.
Comp. Biochem. Physiol. 88, 663 - 669
- GARD, N.W., u. M.J. HOOPER (1993):
Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of eastern bluebirds and european starlings
J. Wildl. Dis. 29, 1 - 7
- GRUE, C.E., W.J. FLEMING, D.G. BUSBY, u. E.F. HILL (1983):
Assessing hazard of organophosphate pesticides to wildlife.
Trans. N. Am. Wildl. Nat. Res. Conf. 48, 200 - 206
- GRUE, C.E., A.D.M. HART u. P. MINEAU (1991):
Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife
in: P. MINEAU (Hrsg.): Cholinesterase-inhibiting insecticides.
Vol. 2. Chemicals in agriculture.
Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 35 - 71
- GRUE, C.E., u. C.C. HUNTER (1984):
Brain cholinesterase activity in fledgling starlings: Implications for monitoring exposure
of songbirds to ChE inhibitors.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32, 282 - 289
- GRUE, C.E., G.V.N. POWELL u. N.L. GLADSON (1981):
Brain Cholinesterase (ChE) activity in nestling starlings: Implications for monitoring
exposure of nestling songbirds to ChE inhibitors.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26, 544 - 547
- GYLSTORFF, I., u. F. GRIMM (1998):
Vogelkrankheiten.
Verlag Ulmer, Stuttgart, S. 295 - 298
- HACKLEY, B.E., Jr., G.M. STEINBERG u. J.C. LAMB (1959):
Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl
methylphosphonofluoridate.
Arch. Biochem. Biophys. 80, 211 - 214

- HÄNISCH, D., u. H. GEMMEKE (1992):
Saatgutbehandlung bei Raps und Vogelgefährdung
in: H. GEMMEKE u. H. ELLENBERG (Hrsg.): Pflanzenschutzmittel und
Vogelgefährdung.
Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch., Berlin-Dahlem 280, S. 123 - 130
- HAHN, H.L. (1970):
Phosphorylierung und Obidoxim (Toxogonin[®])-induzierte Dephosphorylierung von
Cholinesterase des Hundes in vivo und in vitro.
Würzburg, Univ., Med. Fak., Diss.
- HAPKE, H.J. (1988):
Toxikologie für Veterinärmediziner.
Enke Verlag, Stuttgart, 198 - 247
- HARRIS, L.W., B.G. TALBOT, D.R. ANDERSON, M.D. GREEN, D.E. JONES u. I.
KOPLOVITZ (1986):
Induced decarbamylation and atropine plus 2-PAM therapy of guinea pigs exposed to
physostigmine.
Pharmacol. 28, 131
- HARRIS, L.W., B.G. TALBOT, W.J. LENNOX u. D.R. ANDERSON (1989):
The relationship between oxim-induced reactivation of carbamylated
acetylcholinesterase and antidotal efficacy against carbamate intoxication.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 98, 128 - 133
- HART, A.D.M. (1993):
Relationship between behaviour and the inhibition of acetylcholinesterase in birds
exposed to organophosphorus pesticides.
Environ. Toxicol. Chem. 3, 61 - 66
- HAWKES, A.W., L.W. BREWER, J.F. HOBSON, M.J. HOOPER u. R.J. KENDALL (1996):
Survival and cover-seeking reponse of northern bobwhites and mourning doves dosed
with aldicarb.
Environ. Toxicol. Chem. 15, 1538 - 1543
- HAWKINS, R.D., u. J.M. GUNTER (1946):
Studies on cholinesterase. Selective inhibition of pseudochoolinesterase in vivo.
Biochem. J. 40, 192 - 197
- HAWKINS, R.D., u. B. MENDEL (1947):
Selective inhibition of pseudochoolinesterase by diisopropyl fluorophosphonate.
Brit. J. Pharmacol. 2, 173 - 180
- HAWKINS, R.D., u. B. MENDEL (1949):
Studies on Cholinesterase. 6. The selective inhibition of true cholinesterase in vivo.
Biochem. J. 44, 260 - 264

- HEILBRONN, E. (1965):
Phosphorylated cholinesterases. Their formation, reactions and induced hydrolysis.
Svensk Kemisk Tidskr. 77, 11 - 41
- HENDERSON, J.D., J.T. YAMAMOTO, D.M. FRY, J.N. SEIBER u. B.W. WILSON (1994):
Oral and dermal toxicity of organophosphate pesticides in the domestic pigeon
(*Columba livia*).
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52, 633 - 640
- HILL, E.F. (1989a):
Divergent effects of postmortem ambient temperature on organophosphorus and
carbamate-inhibited brain cholinesterase activity in birds.
Pest. Biochem. Physiol. 33, 264 – 275
- HILL, E.F. (1989b):
Sex and storage affect cholinesterase activity in blood plasma of japanese quail.
J. Wildl. Dis. 25, 580 - 585
- HILL, E.F. (1992):
Avian toxicology of anticholinesterases
in: B. BALLANTYNE u. T.C. MARRS (Hrsg.): Clinical and experimental toxicology of
organophosphates and carbamates.
Verlag Butterworth-Heinemann, Oxford, S. 272 - 294
- HILL, E.F. (1995):
Organophosphorus and carbamate pesticides
in: D.J. HOFFMANN, B.A. RATTNER, G.A. BURTON Jr., u. J. CAIRNS Jr. (Hrsg.):
Handbook of ecotoxicology
CRC Press, Boca Raton, S. 243 - 273
- HILL, E.F., u. M.B. CARMADSE (1984):
Toxicity of anticholinesterase insecticides to birds: technical grade versus granular
formulations.
Ecotoxicol. Environ. Safety 8, 551 - 563
- HILL, E.F., u. W.J. FLEMING (1982):
Anticholinesterase poisoning of birds: Field monitoring and diagnosis of acute
poisoning.
Environ. Toxicol. Chem. 1, 27 - 38
- HILL, E.F., u. V.M. MENDENHALL (1980):
Secondary poisoning of barn owls with famphur, an organophosphate insecticide.
J. Wildl. Manage. 44, 676 - 681
- HILL, E.F., u. H.C. MURRAY (1987):
Seasonal variation in diagnostic enzymes and biochemical constituents of captive
northern bobwhites and passerines.
Comp. Biochem. Physiol. 87, 933 - 940

- HOBBIGER, F. (1951):
Inhibition of cholinesterases by irreversible inhibitors *in vitro* and *in vivo*.
Brit. J. Pharmacol. 6, 21 – 30
- HOBBIGER, F. (1956):
Chemical reactivation of phosphorylated human and bovine true cholinesterase.
Brit. J. Pharmacol. 11, 295 – 303
- HOBBIGER, F. (1960):
Reactivation of phosphorylated acetylcholinesterases by pyridinium aldoximes and related compounds.
Biochem. J. 75, 363 - 372
- HOLMES, S.B., u. P.T. BOAG (1990):
Inhibition of brain and plasma cholinesterase activity in zebra finches orally dosed with fenitrothion.
Environ. Toxic. Chem. 9, 323 - 334
- HOOPER, M.J. (1988):
Avian cholinesterases: Their characterization and use in evaluating organophosphate insecticide exposure.
Univ. of Calif., Ph. D.
- HOOPER, M.J. (1991):
unpublished observations.
zit. nach A. FAIRBROTHER, B.T. MARDEN, J.K. BENNETT u. M.J. HOOPER (1991)
- HOOPER, M.J., P.J. DETRICH, C.P. WEISSKOPF u. B.W. WILSON (1989):
Organophosphorus insecticide exposure in hawks inhabiting orchards during winter dormant-spraying.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 42, 651 - 659
- HOOPER, M.J., u. B. WILSON (1987):
Report to California Department of Fish and Game.
Contract No. C-1523.
zit. nach A. FAIRBROTHER, B.T. MARDEN, J.K. BENNETT u. M.J. HOOPER (1991)
- HUDSON, R.H., M.A. HAEGELE u. R.K. TUCKER (1979):
Acute oral and percutaneous toxicity of pesticides to mallards: Correlation with mammalian toxicity data.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 451 - 460
- HUDSON, R.H., R.K. TUCKER u. M.A. HAEGELE (1972):
Effect of age on sensitivity: acute oral toxicity of 14 pesticides to mallard ducks of several ages.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 22, 556 - 561
- HUDSON, R.H., R.K. TUCKER u. M.A. HAEGELE (1984):
Handbook of toxicity of pesticides to wildlife.
2. Aufl., Fish and Wildlife Service, Washington DC, 62 – 63

- HUNT, K.A., u. M.J. HOOPER (1993):
Development and optimization of reactivation techniques for carbamate-inhibited brain and plasma cholinesterases in birds and mammals.
Anal. Biochem. 212, 335 - 343
- HUNT, K.A., M.J. HOOPER u. E.E. LITTRELL (1995):
Carbofuran poisoning in herons: diagnosis using cholinesterase reactivation techniques.
J. Wildl. Dis. 31, 186 - 192
- ILLSLEY, N.P., u. C.A. LAMARTINIERE (1981):
Endocrine regulation of rat serum cholinesterase activity.
Endocrinology 108, 1737 - 1743
- INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY (1984):
The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits.
Clin. Chim. Acta 137, 97 - 114
- JOERMANN, G. (1992a):
Die Toxikologie von Organophosphaten und Carbamaten bei Vögeln
in: H. GEMMEKE u. H. ELLENBERG (Hrsg.): Pflanzenschutzmittel und Vogelgefährdung.
Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch., Berlin-Dahlem 280, S. 139 - 145
- JOERMANN, G. (1992b):
Moderne Pflanzenschutzmittel und ihre Auswirkungen auf die Vogelwelt
in: H. GEMMEKE u. H. ELLENBERG (Hrsg.): Pflanzenschutzmittel und Vogelgefährdung.
Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch., Berlin-Dahlem 280, S. 29 - 35
- JOERMANN, G., u. H. GEMMEKE (1994):
Meldungen über Pflanzenschutzmittelvergiftungen von Wirbeltieren.
Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 46, 295 - 297
- JOHNSTON, G., u. A.D. BAYLIS (1995):
The study of interactive effects of pesticides in birds – a biomarker approach.
Asp. Appl. Biol. 41, 25 - 31
- KAMPHUES, J., N. KUMMERFELD u. B. JOHANNES (1990):
Vergiftungsfälle bei Kanarien durch Endrin-kontaminiertes Futter
in: VII. Tagung der DVG-Fachgruppe „Vogelkrankheiten“, 1990, S. 220 – 225
- KARLOG, O., u. E. POULSON (1963):
Spontaneous and pralidoxime-induced re-activation of brain cholinesterase in the chicken after fatal nitrothymine (parathion) poisoning.
Acta Pharmacol. Toxicol. 20, 174 - 180

- KIESAU, B. (1997):
Untersuchungen zur Cholinesterase-Aktivität im Plasma und Gehirn bei Zier- und Wildvögeln.
Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.
- KIESAU, B. u. N. KUMMERFELD (1998):
Plasma-Cholinesterase- Bestimmung bei Vögeln- ein diagnostisches Hilfsmittel zum Nachweis von Intoxikationen mit Organophosphaten und Carbamaten.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 105, 269 - 274
- KITOS, P.A., D.S. ANDERSON, E.M. UYEKI, M. MISAWA u. C.R. WYTTENBACH (1981):
Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryo: II. Effects on the NAD content on early embryos. *Biochem. Pharmacol.* 30, 2936 - 2949
- KLEMM, D., G. BLÜMCHEN, P. PFANNENSTIEL, W. VOGEL u. K. BECK (1968):
Cholostatische Hepatose nach Toxogoninbehandlung bei einem Fall von Alkylphosphatvergiftung.
Med. Klin. 63, 94 - 96
- KNEDEL, M., u. R. BÖTTGER (1967):
Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudocholinesterase.
Klin. Wschr. 45, 325 - 331
- KRAFT, W., W. KLEE, H. BOSTEDT u. K. HEINRITZI (1995):
Referenzbereich, „Normalbereich“, „Normbereich“
in: W. KRAFT u. U. DÜRR (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*.
3. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 1 - 4
- KUCERA, E. (1987):
Brain cholinesterase activity in birds after a city-wide application of malathion.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38, 456 - 460
- KUHR, R.J., u. H.W. DOROUGH (1976):
Carbamate insecticides: Chemistry, biochemistry and toxicology.
CRC Press, Cleveland
- KUMMERFELD, N. (1998a):
Hühnervogel
In: K. GABRISCH u. P. ZWART (Hrsg.): *Krankheiten der Heimtiere*.
Verlag Schlütersche, Hannover, S. 625 - 661
- KUMMERFELD, N. (1998b):
Tauben
in: K. GABRISCH u. P. ZWART (Hrsg.): *Krankheiten der Heimtiere*.
Verlag Schlütersche, Hannover, S. 569 – 624
- KUMMERFELD, N., u. M. KIETZMANN (1990):
Klinische Strategie bei Verdacht auf akute Vergiftung im Vogelbestand durch belastetes Futter oder Insektizide.
in: VII. Tagung der DVG-Fachgruppe „Vogelkrankheiten“, 1990, S. 210 - 219

- KUMMERFELD, N., u. M. KIETZMANN (1991):
Vergiftungsverdacht im Vogelbestand - klinische Strategie.
Kleintierpraxis 36, 87 - 92
- KUREC-VAJIC, E., N. BERNAT u. D. MUACEVIC-KATANEC (1992):
Effect of hypolipidemic drugs on cholinesterase activity in the rat.
Gen. Pharmacol. 23, 217 - 219
- KUTTY, K.M. (1980):
Review: Biological function of cholinesterase.
Clin. Biochem. 13, 239 - 243
- KUTTY, K.M., u. R.H. PAYNE (1994):
Serum-pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism.
J. Clin. Lab. Anal. 8, 247 - 250
- LA BONDE, J. (1988):
Pet avian toxicology.
Proc. Assoc. Avian Vet. 1988, 159 - 170
- LA BONDE, J. (1991):
Avian toxicology.
Vet. Clin. North Am. Sem. Anim. Prac. 21, 1329 - 1342
- LA BONDE, J. (1992):
Two clinical cases of exposure to household use of organophosphate and carbamate insecticides.
Proc. Assoc. Avian Vet. 1992, 113 - 118
- LANGE, W., u. G. VON KRÜGER (1932):
Über Ester der Monofluorphosphorsäure.
Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 65, 1598 - 1601
- LIESKE, C.N., J.H. CLARK, D.M. MAXWELL, L.D. ZOEFFEL, u. W.E. SULTAN (1992):
Studies of the amplification of carbaryl toxicity by various oximes.
Toxicol. Lett. 62, 127 - 137
- LIESKE, C.N., C.E. GESSNER, R.T. GEPP, J.H. CLARK, H.G. MEYER u. C.A. BROOMFIELD (1990):
pH effects in the spontaneous reactivation of phosphinylated acetylcholinesterase.
Life Sci. 46, 1189 - 1196
- LOCKRIDGE, O. (1990):
Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine.
Pharmacol. Ther. 47, 35 - 60

- LÖSCHER, W. (1994):
Spezielle Pharmakologie und Pharmakotherapie. A; Pharmaka mit Wirkung auf das autonome (vegetative) Nervensystem
in: W. LÖSCHER, F.R UNGEMACH. u. R. KROKER (Hrsg.): Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.
2. Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 39 - 59
- LOEWI, O., u. E. NAVRATIL (1926):
Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. XI. Mitteilung. Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin.
Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 214, 689 - 696
- LUDKE, J.L., E.F. HILL u. M.P. DIETER (1975):
Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 3, 1 - 21
- LUMEIJ, J.T., M. MEIDAM, J. WOLFSWINKEL, M.H. VAN DER HAGE u. G.M. DORRESTEIN (1988):
Changes in plasma chemistry after drug-induced liver disease or muscle necrosis in racing pigeon (*Columba livia domestica*).
Avian Pathol. 17, 865 - 874
- LUMEIJ, J.T., u. J. WOLFSWINKEL (1988):
Blood chemistry reference values for use in columbine hepatology.
Avian Pathol. 17, 515 - 517
- LYLES, J.M., E.A. BARNARD u. I. SILMAN (1980):
Changes in the levels and forms of cholinesterases in the blood plasma of normal and dystrophic chickens.
J. Neurochem. 34, 978 - 987
- LYLES, J.M., I. SILMAN u. E.A. BARNARD (1979):
Developmental changes in levels and forms of cholinesterases in muscles of normal and dystrophic chickens.
J. Neurochem. 33, 727 - 738
- MACKNESS, M.I., H.M. THOMPSON, A.R. HARDY u. C.H. WALKER (1987):
Distinction between 'A'-esterases and arylesterases. Implications for esterase classification.
Biochem. J. 245, 293 - 296
- MARDEN, B.T., A. FAIRBROTHER u. J.K. BENNETT (1994):
Interlaboratory comparison of cholinesterase assay measurements.
Environ. Toxicol. Chem. 13, 1761 - 1768
- MARTIN, A.D., G. NORMAN, P.I. STANLEY u. G.E. WESTLAKE (1981):
Use of reactivation techniques for the differential diagnosis of organophosphorus and carbamate pesticide poisoning in birds.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26, 775 - 780

- MASSOULIE, J., u. S. BON (1982):
The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates.
Annu. Rev. Neurosci. 5, 57 - 106
- McINNES, P.F., D.E. ANDERSEN, D.J. HOFF, M.J. HOOPER u. L.L. KINKEL (1996):
Monitoring exposure of nestling songbirds to agricultural application of an organophosphorus insecticide using cholinesterase activity.
Environ. Toxicol. Chem. 15, 544 - 552
- McQUEEN, M.J. (1995):
Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements.
Clin. Chim. Acta 237, 91 - 105
- MENDEL, B., u. H. RUDNEY (1943):
Studies on Cholinesterase. 1. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase.
Biochem. J. 37, 59 - 63
- MENDELSSOHN, H., u. U. PAZ (1977):
Mass mortality of birds of prey caused by azodrin, an organophosphorus insecticide.
Biol. Conserv. 11, 163 - 169
- MICHEL, H.O. (1949):
An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity.
J. Lab. Clin. Med. 34, 1564 - 1570
- MISAWA M., J. DOULL, P.A. KITOS u. E.M. UYEKI (1981):
Teratogenetic effects of cholinergic insecticides in chick embryo:I. Diazinon treatment on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 57, 20 - 29
- MOHAN, R. (1990):
Dursban toxicosis in a pet bird breeding operation.
Proc. Assoc. Avian Vet. 1990, 112 - 114
- MOORE-EDE, M.C. (1986):
Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis.
Am. J. Physiol. 250, 735 - 752
- MORLEY, H.V. (1992):
Pesticides: a general introduction
in: R.G. TARDIFF (Hrsg.): *Methods to assess adverse effects of pesticides in non-target organisms.*
Verlag Wiley, New York, S. 85 - 102
- MORTENSEN, S.R., K.A. JOHNSON, C.P. WEISSKOPF, M.J. HOOPER, T.E. LACHER u. R.J. KENDALL (1998):
Avian exposure to pesticides in Costa Rican banana plantations.
Contam. Toxicol. 60, 562 - 568

- MUNRO, N.B., L.R. SHUGART, A.P. WATSON u. R.S. HALBROOK (1991):
Cholinesterase activity in domestic animals as a potential biomonitor for nerve agent and other organophosphate exposure.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 199, 103 - 115
- MURPHY, S.D. (1966):
Comparison of malathion-esterase and acetylcholinesterase activity in animals treated with malathion.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 8, 348 - 352
- MYERS, D.K. (1953):
Studies on cholinesterase. 9. Species variation in the specificity pattern of the pseudo cholinesterases.
Biochem. J. 55, 67 - 79
- NACHMANSOHN, D., u. M.A. ROTHENBERG (1945):
Studies on cholinesterase. On specificity of enzyme in nerve tissue.
J. Biol. Chem. 158, 653 - 666
- NAMBA, T., u. K. HIRAKI (1958):
PAM (Pyridine-2-aldoxime methiodide) therapy for alkylphosphate poisoning.
J. Am. Med. Assoc. 166, 1834 - 1839
- NATOFF, I.L., u. B. REIFF (1973):
Effect of oximes on the acute toxicity of anticholinesterase carbamates
Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 569 - 575
- NATURSCHUTZBUND DEUTSCHLAND (NABU) (1995):
Vögel sterben an gebeiztem Saatgut.
Gefiederte Welt 6, 180
- NOUIRA, S., F. ABROUG, S. ELATROUS, R. BOUJDARIA u. S. BOUCHOUCHA (1994):
Prognostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning.
Chest 106, 1811 - 1814
- O'BRIEN, R. (1965):
The mechanism of inhibition of cholinesterase by carbamates.
Exp. Med. surg. Suppl. 1965, 117 - 123
- OLSEN, G.H., J.M. NICOLICH u. D.J. HOFFMAN (1990):
A review of some causes of death of avian embryos.
Proc. Assoc. Avian. Vet. 1990, 106 - 109
- PARLAR, H., u. D. ANGERHÖFER (1995):
Chemische Ökotoxikologie. Bd. 2. Organophosphate.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, S. 141 - 161

- POPE, G., u. P. WARD (1972):
The effects of small applications of an organophosphorus poison, fenthion, and the weaver bird (*Quela quela*).
Pestic. Sci. 3, 197 - 205
- PORTER, S.L. (1992):
Organophosphorus and carbamate poisoning in birds of prey.
Proc. Am. Assoc. Zoo. Vet. 1992, 176 – 177
- PORTER, S.L., u. S.E. SNEAD (1990):
Pesticide poisoning in birds of prey.
J. A. A. V. 4, 84 - 85
- QUINN, D.M. (1987):
Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states.
Chem. Rev. 87, 955 - 979
- RAINWATER, T.R., V.A. LEOPOLD, M.J. HOOPER u. R.J. KENDALL (1995):
Avian exposure to organophosphorus and carbamate pesticides on a coastal South Carolina golf course.
Environ. Toxicol. Chem. 14, 2155 – 2161
- RATTNER, B.A., u. A. FAIRBROTHER (1991):
Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity
in: P. MINEAU (Hrsg.): Cholinesterase-inhibiting insecticides.
Vol. 2. Chemicals in agriculture.
Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 89 - 107
- RATTNER, B.A., u. J.C. FRANSON (1984):
Methyl parathion and fenvalerate toxicity in american kestrels: acute physiological responses and effects of cold.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 62, 787 - 792
- RATTNER, B.A., u. C.E. GRUE (1990):
Toxicity of parathion to captive european starlings (*Sturnus vulgaris*) – absence of seasonal effects.
Environ. Toxicol. Chem. 9, 1029 – 1033
- RATTNER, B.A., L. SILEO, C.G. SCANES (1982):
Oviposition and the plasma concentrations of LH, progesterone and corticosterone in bobwhite quail (*Colinus virginianus*) fed parathion.
J. Reprod. Fert. 66, 147 - 155
- REDDY, V.K., S.S. DESHPANDE, u. E.X. ALBUQUERQUE (1987):
Bispyridinium oxime HI-6 reverses organophosphate (OP)-induced neuromuscular depression in rat skeletal muscle.
Fed. Proc. 46, 861

- REECE, R.L. (1982):
Observations on the accidental poisoning of birds by organophosphate insecticides and other toxic substances.
Vet. Rec. 111, 453 - 455
- REED, W.D., u. T.R. FUKUTO (1973):
The reactivation of carbamate-inhibited cholinesterase, kinetic parameters.
Pest. Biochem. Physiol. 3, 120 - 130
- REINER, E., u. W.N. ALDRIDGE (1967):
Effect of pH on inhibition and spontaneous reactivation of acetylcholinesterase treated with esters of phosphorus acids and carbamic acids.
Biochem. J. 105, 171 - 179
- REINER, E., W.N. ALDRIDGE, F.C.G. HOSKIN (1989):
Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds.
Ellis Horwood Limited, Chichester, UK
- RITCHIE, B.W. (1987):
Treatment of organophosphate toxicosis in *Columba livia*.
Assoc. Avian Vet. Today 1, 23
- ROSENBERRY, T.L. (1975):
Acetylcholinesterase.
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 43, 103 - 218
- ROßBACH, R. (1992):
Saatgutbehandlung bei Raps und Vogelgefährdung
in: H. GEMMEKE u. H. ELLENBERG (Hrsg.): Pflanzenschutzmittel und Vogelgefährdung.
Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch., Berlin-Dahlem 280, S. 137 - 138
- ROTENBERG, M., M. SHEFI, S. DANY, I. DORE, M. TIROSH u. S. ALMOG (1995):
Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning.
Clin. Chim. Acta 234, 11 - 21
- ROTUNDO, R.L. (1988):
Biogenesis of acetylcholinesterase molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool.
J. Biol. Chem. 263, 19398 - 19406
- SCHAFER, E.W., W.A. BOWLES, J. HURLBUT (1983):
The acute oral toxicity, repellency, and hazard potential of 998 chemicals to one or more species of wild and domestic birds.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 12, 355 - 382
- SCHAFER, E.W., R.B. BRUNTON, N.F. LOCKYER u. J.W. DeGRAZIO (1973):
Comparative toxicity of seventeen pesticides to the *Quelea*, house-sparrow, and red-winged blackbird.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 26, 154 -

- SCHMIDT, G., u. R. ZECH (1988):
Organophosphate. Biochemie – Toxikologie – Therapie
Verlag Osang, Bonn
(Schriftenreihe der Schutzkommission beim Bundesminister des Inneren, Zivilschutz-
Forschung 22)
- SCHOENE, K. (1972):
Reaktivierung von 0,0-Diäthylphosphoryl-Acetylcholinesterase. Reaktivierungs-
Rephosphorylierungs-Gleichgewicht.
Biochem. Pharmacol. 21, 163 - 170
- SCHRADER, G. (1952):
Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage von organischen Fluor- und
Phosphorverbindungen. 2. Aufl.
Verlag Chemie, Weinheim
(Monographie 62.)
- SEIBER, J.N., u. J.E. WOODROW (1984):
Airborne residues and human exposure
in: M. SIERWIERSKI (Hrsg.): National agricultural pesticide impact program.
Determination and assessment of pesticide exposure.
Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 133 - 146
- SHLOSBERG, A. (1976):
Treatment of monocrotophos-poisoned birds of prey with pralidoxime iodide.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 989 - 990
- SHLOSBERG, A., M. BELLAICHE, V. HANJI u. E. ERSHOV (1995):
Treatment of anticholinesterase toxicosis in birds.
Proc. Conf. Eur. Com. Assoc. Avian Vet. 1995, 124 - 127
- SHLOSBERG, A., M. BELLAICHE, V. HANJI u. E. ERSHOV (1997):
New treatment regimens in organophosphate (diazinon) and carbamate (methomyl)
insecticide-induced toxicosis in fowl.
Vet. Human Toxicol. 39, 347 - 350
- SHLOSBERG, A., M.N. EGYED, A. EILAT, M. MALKINSON u. E. PREISLER (1976):
Efficacy of pralidoxime iodide and obidoxime dichloride as antidotes in diazinon-
poisoned goslings.
Avian Dis. 20, 162 - 166
- SILVER, A. (1974):
Frontiers of Biology Volume 36.
American Elsevier Publishing Co. New York, NY, 1 - 596
- SKETELJ, J., M.G. McNAMEE u. B.W. WILSON (1978):
Effect of denervation on the forms of acetylcholinesterase in normal and dystrophic
chicken muscles.
Exp. Neurol. 60, 624 - 629

- SMITH, J.D. (1987):
Pesticide use and toxicology in relation to wildlife: organophosphorus and carbamate compounds.
US Fish Wildl. Serv., Resource Publication 170, Washington, 171 pp.
zit. nach E.F. HILL (1995)
- SMITH, G.J., J.W. SPANN u. E.F. HILL (1986):
Cholinesterase activity in black-crowned night-herons exposed to fenthion-treated water.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 15, 83 - 86
- SMITH, M.R., N.J. THOMAS u. C. HULSE (1995):
Application of brain cholinesterase reactivation to differentiate between organophosphorus and carbamate pesticide exposure in wild birds.
J. Wildl. Dis. 31, 263 - 267
- SMUCKER, S.J., u. B.W. WILSON (1990):
Multiple molecular forms and lectin interactions of organophosphate-sensitive plasma and liver esterases during development of the chick.
Biochem. Pharmacol. 40, 1907 - 1913
- SOLER-RODRIGUEZ, F., M-P. MIGUEZ-SANTIYAN, A. REJA-SANCHEZ, V. RONCERO-CORDERO u. J-P. GARCIA-CAMBERO (1998):
Recovery of brain acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in quail (*Coturnix coturnix*) after chlorpyrifos administration and effect of pralidoxime treatment.
Env. Toxicol. Chem. 17, 1835 - 1839
- STAFFORD, T.R., u. L.B. BEST (1997):
Effects of granular pesticide formulations and soil moisture on avian exposure.
Env. Toxicol. Chem. 16, 1687 - 1693
- STANSLEY, W. (1993):
Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25, 315 - 321
- STEDMAN, E., u. G. BARGER (1925):
J. Chem. Soc. 127, 247
zit. nach E. BÖCKER (1970): Carbamate
in: R. WEGLER (Hrsg.): Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Bd. 1.
Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, S. 220
- STEDMAN, E., E. STEDMAN u. L.H. EASSON (1932):
Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse.
Biochem. J. 26, 2056 - 2066

- STEDMAN, E., u. E. STEDMAN (1935):
The relative choline-esterase activities of serum and corpuscles from the blood of certain species.
Biochem. J. 26, 2056 - 2066
- STERRI, S.H., B. ROGNERUD, S.E. FISKUM u. S. LYNAGAAS (1979):
Effect of toxogonin and P2S on the toxicity of carbamates and organophosphorus compounds.
Acta pharmacol. et toxicol. 45, 9 - 15
- SUN, M., Z. CHANG, M. SHAU, R. HUANG u. T. CHOU (1979):
The mechanism of ageing of phosphonylated acetylcholinesterase.
Eur. J. Biochem. 100, 527 - 530
- SUNG, S.C., u. B.A. RUFF (1987):
Intracellular distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in rat brain and changes after diisopropylfluorophosphate treatment.
Neurochem. Res. 12, 15 - 19
- SVENSMARK, O. (1963):
Enzymatic and molecular properties of cholinesterases in human liver.
Acta Physiol. Scand. 59, 378 - 389
- TATARUCH, F., T. STEINECK u. H. FREY (1998):
Vergiftungen durch Carbofuran bei Wildtieren (Greifvögel, Singvögel und Carnivoren) in Österreich.
Wien. Tierärztl. Mschr. 85, 12 - 17
- THIERMANN, H., U. MAST, R. KLIMMEK, P. EYER, A. HIBLER, R. PFAB, N. FELGENHAUER u. T. ZILKER (1997):
Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients.
Hum. Exp. Toxicol. 16, 473 - 480
- THOMPSON, H.M. (1991):
Inhibition of avian esterases by organophosphorus insecticides: problems of reactivation and storage.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 509 - 513
- THOMPSON, H.M. (1993):
Avian serum esterases: species and temporal variations and their possible consequences.
Chem. Biol. Interactions 87, 329 - 338
- THOMPSON, H.M., M.I. MACKNESS, C.H. WALKER u. A.R. HARDY (1991a):
Species differences in avian serum B esterases revealed by chromatofocussing and possible relationships of esterase activity to pesticide toxicity.
Biochem. Pharm. 41, 1235 - 1240

- THOMPSON, H.M., C.H. WALKER u. A.R. HARDY (1988):
Avian esterases as indicators of exposure to insecticides – the factor of diurnal variation.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41, 4 - 11
- THOMPSON, H.M., C.H. WALKER u. A.R. HARDY (1991b):
Changes in activity of avian serum esterases following exposure to organophosphorus insecticides.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 514 – 518
- TRUNDLE, D., u. G. MARCIAL (1988):
Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements.
Ann. Clin. Lab. Sci. 18, 345 - 352
- TUCKER, R.K., u. M.A. HAEGELE (1971):
Comparative acute oral toxicity of pesticides to six species of birds.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 20, 57 - 65
- TURNER, B.C., u. J.H. CARO (1973):
Uptake and distribution of carbofuran and its metabolites in field grown corn plants.
J. Environ. Qual. 2, 245 - 252
- VAN LITH, H.A., M. HALLER, G. VAN TINTELEN, L.F.M. VAN ZUTPHEN u. A.C. BEYNEN (1992):
Plasma-esterase-1 activity in rats is influenced by the amount and type of dietary fat, and butyryl cholinesterase activity by the type of dietary fat.
J. Nutr. 122, 2109 - 2120
- WALKER, C.H., u. H.M. THOMPSON (1991):
Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases
in: P. MINEAU (Hrsg.): Cholinesterase-inhibiting insecticides.
Vol. 2. Chemicals in agriculture.
Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 5 - 34
- WEISSFEDER, J. (1990):
Feld- und andere Vergiftungen bei Tauben.
Die Brieftaube 107, 955 u. 970
- WERNER, E. (1992):
Vergiftungen
in: G. HEIDER u. G. MONREAL (Hrsg.): Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Bd. 2.
Verlag Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, S. 610 - 613
- WESTLAKE, G.E., P.J. BUNYAN, A.D. MARTIN, P.I. STANLEY u. L.C. STEED (1981a):
Carbamate poisoning. Effects of selected carbamate pesticides on plasma enzymes and brain esterases of japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).
J. Agr. Food Chem. 29, 779 - 785

- WESTLAKE, G.E., P.J. BUNYAN, A.D. MARTIN, P.I. STANLEY u. L.C. STEED (1981b):
Organophosphate poisoning. Effects of selected organophosphate pesticides on
plasma enzymes and brain esterases of japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).
J. Agric. Food Chem. 29, 772 - 778
- WESTLAKE, G.E., A.D. MARTIN, P.I. STANLEY u. C.H. WALKER (1983):
Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in
britain.
Comp. Biochem. Physiol. 76, 15 - 24
- WHITE, D.H., C.A. MITCHELL, E.J. KOLBE u. J.M. WILLIAMS (1982):
Parathion poisoning of wild geese in Texas.
J. Wildl. Dis. 18, 389 - 391
- WILLIAMS, T. (1997):
Silent scourge.
J. Pest. Reform. 17, 9 - 13
- WILSON, B.W., M.J. HOOPER, M.E. HANSEN u. P.S. NIEBERG (1992):
Reactivation of organophosphorus inhibited AChE with oximes
in: J.E. CHAMBERS u. P.E. LEVI (Hrsg.): Organophosphates: chemistry, fate and
effects.
Academic Press, San Diego, S. 107 - 137
- WILSON, B.W., M.J. HOOPER, E.E. LITTRELL, P.J. DETRICH, M.E. HANSEN, C.P.
WEISSKOPF u. J.N. SEIBER (1991):
Orchard dormant sprays and exposure of red-tailed hawks to organophosphates.
Bull. Environ. Toxicol. 47, 717 - 724
- WILSON, B.W., u. P.S. NIEBERG (1983):
Recovery of acetylcholinesterase forms in quail muscle cultures after intoxication with
diisopropylfluorophosphate.
Biochem. Pharmacol. 32, 911 - 918
- WILSON, B.W., P.S. NIEBERG, C.R. WALKER, T.A. LINKHART u. D.M. FRY (1973):
Production and release of acetylcholinesterase by cultured chick embryo muscle.
Dev. Biol. 33, 285 - 299
- WILSON, I.B. (1951):
Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of tetra ethylpyrophosphat inhibition.
J. Biol. Chem. 190, 111 - 117
- WILSON, I.B. (1952):
Acetylcholinesterase. XIII. Reaktivtion of alkyl phosphate-inhibited enzyme.
J. Biol. Chem. 199, 113 - 120
- WILSON, I.B., u. S. GINSBURG (1955):
A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase.
Biochim. Biophys. Acta 18, 168 - 170

- WINTERINGHAM, F.P., u. K.S. FOWLER (1966):
Substrate and dilution effects on the inhibition of acetylcholinesterase by carbamates.
Biochem. J. 101, 127 - 134
- WITTER, R.F. (1963):
Measurement of blood cholinesterase.
Arch. Environ. Health 6, 537 - 559
- WOREK, F., M. BÄCKER, H. THIERMANN, L. SZINICZ, U. MAST, R. KLIMMEK u. P. EYER (1997):
Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning
Hum. Exp. Toxicol. 16, 466 - 472
- ZECH, R.K., u. H. ENGELHARD (1965):
Praeparative Trennung und Charakterisierung von 4 Cholinesterasen aus Pferdeserum.
Biochem. Z. 343, 86 - 96
- ZECH, R.K., H. ENGELHARD u. W.D. ERDMANN (1966):
Reaktionen von Pyridinium Oximen mit dem Alkylphosphat Dimethoat und seinen Derivaten. Wirkung auf Cholinesterasen.
Biochim. Biophys. Acta. 128, 363 - 371
- ZECH, R., W.D. ERDMANN u. H. ENGELHARD (1967):
Grenzen der Therapie mit Oximen bei Vergiftungen mit insektiziden Alkylphosphaten.
Arzneim. Forsch. 17, 1196 - 1202
- ZECH, R. K. FRANKE u. G.F. DOMAGK (1969):
Eine Mikromethode zur gleichzeitigen Bestimmung der Acetylcholinesterase und der Butyrylcholinesterase im Säugetierblut.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, 547 - 550
- ZECH, R., u. K. ZÜRCHER (1974):
Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals.
Comp. Biochem. Physiol. 48, 427 - 433
- ZINKE, A., K. KAHNT, F.J. KAUP u. N. KUMMERFELD (1999a):
Klinische, blutchemische und morphologische Charakterisierung einer chronisch-aktiven Hepatitis bei einer Rotbug-Amazone (*Amazona aestiva aestiva*).
Kleintierpraxis 44, 447 - 460
- ZINKE, A., B. KIESAU u. N. KUMMERFELD (1999b):
Die Bedeutung der Plasmacholinesterase-Bestimmung in der Diagnostik von Lebererkrankungen und Organophosphat- /Carbamatvergiftungen bei Zier- und Wildvögeln
in: Tagungsbericht DVG Fachgruppe „Kleintierkrankheiten“ 45, 478 - 482

- ZINKL, J.G., R.B. ROBERTS, C.J. HENNY u. D.J. LENHARD (1980):
Inhibition of brain cholinesterase activity in forest birds and squirrels exposed to aerially applied acephate.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24, 676 - 683

9. Anhang

Protokoll für die diagnostische Reaktivierung aviärer ChE unter Verwendung des trockenchemischen Analysensystems VITROS DT 60 II®

1. Nach Blutentnahme (ca. 700 µl Vollblut) und umgehender Abzentrifugation des Plasmas sofortige gepaarte Messung der ChE-Aktivität (Hemmwert).
2. Aufteilung der Plasmaprobe in drei 100 µl-Aliquote.
3. Inkubation von 100 µl unbehandelten Plasmas bei 37 °C.
4. Herstellung zweier Verdünnungen des handelsüblichen Präparats Toxogonin® (Merck):
 - 10 µl Toxogonin® ad 100 µl physiologischer NaCl-Lösung (1/10-Verdünnung)
 - 10 µl der 1/10-Verdünnung ad 1000 µl physiologischer NaCl-Lösung (1/1000-Verdünnung).
5. Zugabe von jeweils 10 µl der 1/10- und 1/1000-Verdünnung zu je 100 µl Plasma und Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank.
6. Zur Bestimmung der Toxogonin®-induzierten Substrathydrolyse Zugabe von jeweils 10 µl der 1/10- und 1/1000-Verdünnung zu je 100 µl physiologischer Kochsalzlösung und gepaarte Messung der ChE-Aktivität in diesen Ansätzen.
7. Nach einer Inkubationszeit von 1 h gepaarte Messung der bei 37 °C gelagerten und der mit Toxogonin® versetzten Proben. Bei den zuletzt genannten Subtraktion des Oxim-induzierten Substratzerfalls und Multiplikation mit 1,1 zur Korrektur der Probenverdünnung durch Zugabe der Toxogonin®-Lösung.
8. Bei geringgradigem Aktivitätsanstieg weitere Messungen im Abstand mehrerer Stunden.

Die aufgeführten Plasmavolumina können in Abhängigkeit von der Körpermasse des Vogels bei entsprechender Änderung der Toxogonin®-Konzentrationen variiert werden. Sind Inkubationszeiten über 6 h zu erwarten, so ist zur thermischen Reaktivierung ausschließlich oder zusätzlich zur Inkubation bei 37 °C eine Aufbewahrung der unbehandelten Plasmaproben im Kühlschrank vorzunehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. N. Kummerfeld sowie Herrn Prof. U. Neumann für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundlich gewährte Beratung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Die untersuchten Tauben wurden von den Herren Dr. M. und N. Warzecha aus Oering sowie Herrn Prof. H.J. Hedrich der MHH Hannover zur Verfügung gestellt. Ihnen möchte ich hiermit ausdrücklich für die Überlassung des Probenmaterials und die gute Zusammenarbeit danken.

Für die praktische Unterstützung bei der Gewinnung der Blutproben danke ich den Mitarbeitern der Kleintierpraxis Dr. M. Warzecha sowie Frau A. Köhnen, Frau C. Neff, Frau S. Contak, Frau E. Kirsch und Frau M. Schmooch.

Für die freundliche fachliche und praktische Unterstützung bei der Durchführung der Messungen sowie für die Benutzung von institutseigenen Geräten bedanke ich mich weiterhin bei Herrn Prof. H.-P. Sallmann, Herrn Prof. W. Leibold und Herrn Prof. H.-O. Hoppen sowie Herrn Dr. S. Schlote, Herrn U. Rabe, Herrn U. Glockenthör und Frau H. Niederstucke.

Während der gesamten Arbeit wurde ich von Frau A. Meiwes und Herrn Dr. J. Brinkmeyer unterstützt. An dieser Stelle möchte ich mich für ihre Hilfe herzlich bedanken.

Bei Frau Dr. B. Kiesau bedanke ich mich herzlich für die Einführung in Thematik und Methodik sowie das Überlassen umfangreicher Literatur.

Dem Förderverein für tiergerechte Brieftaubenhaltung e.V. danke ich für die finanzielle Förderung, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes möchte ich meinen Eltern danken.

Über die gesamte Zeit stand mir Konstanze Kahnt unermüdlich durch Rat und Tat zur Seite und hat damit sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ihr gehört mein besonderer Dank.