Entwicklung und Evaluierung eines In-vitro-Testsystems zur Überprüfung der Wirkung von Organochlorpestiziden auf Sertolizellen der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von Matthias Franz
aus Pirmasens

Gießen 2004

Entwicklung und Evaluierung eines In-vitro-Testsystems zur Überprüfung der Wirkung von Organochlorpestiziden auf Sertolizellen der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Matthias Franz
aus Pirmasens

Gießen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen
Leiter: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill

Betreuer: Dr. rer. nat. T. Monsees
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Henkel
Gutachter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt
Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

In Dankbarkeit meinen Eltern und Manuela gewidmet

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Einführung	1
1.2.1.	Anatomie / Physiologie des männlichen Reproduktionstraktes und Spermatogenese	5
1.3.	Beschreibung der untersuchten Organochlorpestizide	14
1.3.1.	Lindan	14
1.3.2.	DDT	20
1.3.3.	DDE	23
1.4.	Zellvitalität	25
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	26
2. Material und Methoden		28
2.1.	Materialien	28
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Präparation von Sertolizellen und Anlegen der Primärkultur	28
2.2.2.	Kultur der Sertolizellen	34
2.2.3.	Optimierungen	35
2.2.4.	Stammlösung und Verdünnungsreihe	36
2.2.4.1.	Stammlösung	36
2.2.4.2.	Verdünnungsreihe	37
2.2.5.	Inkubation mit Noxe in vitro	37
2.2.6.	Verwendete Nachweismethoden	39
2.2.6.1.	MTT-Assay	39
2.2.6.1.	Ablauf	39
2.2.6.2.	Laktat-Assay	41
2.2.6.3.	Pyruvat-Assay	47

2.2.6.4. Inhibinassay 52
2.2.6.4.1. Grundlagen 53
2.2.6.4.2. Durchführung 54
2.2.6.5. Protein-Assay 60
2.2.7. Statistische Auswertung 63

3. Ergebnisse 64
3.1. Optimierungen 64
3.2. Zellvitalität nach Inkubation mit verschiedenen Noxen 69
3.3. Laktatproduktion 72
3.4. Pyruvatproduktion 74
3.5. Inhibinproduktion 76

4. Diskussion 79

5. Zusammenfassung 95

6. Literaturverzeichnis 98

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die stetig zunehmende Umweltbelastung birgt eine Vielzahl ökologischer und für den Menschen gesundheitliche Probleme. Neben Belastungen durch akut eintretende Verschmutzungen von Wasser oder Luft (z.B. Tankerunglück, Smog etc.) sind es vor allen Dingen chronische Intoxikationen, die zu vielfältigen Schädigungen lebenswichtiger Organe (Nieren, Leber) sowie der männlichen Reproduktionsorgane führen können.

Insbesondere die Beeinträchtigung der männlichen Fertilität durch Umweltnoxen rückt zunehmend in das öffentliche Interesse und ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Arbeiten (Stachel et al.,1989; Strohmer et al.,1993; Monsees et al.,1998). Eine Kategorie der in Frage kommenden toxischen Substanzen sind die sogenannten Organochlorpestizide Di-chloro-diphenyltrichloroethan (DDT), Di-(-p-chlorphenyl)-dichlorethylen (DDE) und γ-Hexachlorcyclohexan (Lindan) (Hodgson & Levi,1996; Traina et al.,2003). Jeder dieser Stoffe besitzt halogenierte (mit Chloratomen verbundene) Kohlenwasserstoffringe und eine ausgeprägte Lipophilie, was ihre Persistenz in der Umwelt erklärt (Feng et al.,2003; Binelli & Provini,2003; Ma et al.,2003; Walker et al.,2003). Weltweit werden pro Jahr 2,3 Millionen Tonnen Pflanzenschutzmittel hauptsächlich in den wirtschaftlich schwächeren Ländern zur Ertragssteigerung eingesetzt, darunter auch die drei oben genannten Noxen. In einer Studie zur Erfassung von Pestizidrückständen im Nilgewässer in Nordafrika, die sich über zwei Jahre erstreckte, wurden Konzentrationen von Lindan, DDT und DDE von 0,39 µg/l bis zu 0,7 µg/l gefunden (Abbassy et al.,1999).

Es konnte eine hohe Korrelation zwischen der sekundären Sterilität von Menschen (Unfruchtbarkeit durch endogene oder exogene Faktoren nach ursprünglicher Fertilität), die mit der Herstellung und Anwendung von Organochlorpestiziden zu tun hatten und dem hohen Gehalt an Lindan sowie DDT im Sperma bzw. der Follikelflüssigkeit der weiblichen Eizelle andererseits aufgezeigt werden (Wagner et al.,1990). Auf dieser Grundlage untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluss der genannten Noxen auf die männliche Fertilität über einen der möglichen Angriffspunkte, der Manipulation der Sertolizelle, einem wichtigen Glied der Spermatogenese.

Von der Entdeckung der ersten breitflächig nutzbaren Insektizide an galt das Ziel, eine stetig zunehmende Weltbevölkerung durch ausreichend große Nahrungsmitteldepots zu versorgen. Diese Stoffgruppe erwies sich hierbei als vermeintlich effektiv, da billig in der Herstellung und hoch in der Wirksamkeit; bis man begründete Verdachtsmomente für eine Fertilitätsbeeinträchtigung bei chronischer Exposition gegenüber diesen Substanzen fand (Strohmer et al.,1993). Eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten belegte bereits eine Schädigung der Spermaqualität durch chronische Exposition gegenüber Insektiziden wie Epichlorohydrin oder Carbaryl (Wagner et al.,1990). Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Screening-Untersuchung von Männern (n=861), die in der Insektizidsynthese in Kalifornien und Ohio tätig waren, ein hoher Prozentsatz an Oligozoospermiefällen auftrat (8,7%) bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Probanden (Whorton et al.,1984). Auch 1,2-Dibromo-3- chloropropan verursachte

bei Männern, die mit der Herstellung und dem Einsatz dieses Insektizids betraut waren, einen hohen Anteil an Oligozoospermien bis hin zu vereinzelten Fällen von Azoospermien (kompletter Verlust von Spermien im Ejakulat) (Eaton et al.,1986).

Eine weitere Arbeit (Strohmer et al.,1993) unterstreicht die fertilitätsbeeinträchtigende Wirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln in anderer Hinsicht. Bei einem Vergleich zweier Patientengruppen, die aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches auf die AID (Artificial insemination with donor sperm) bzw. IVF (In-vitro-Fertilization) angewiesen waren, zeigte sich in der Gruppe der AID-Patienten ein signifikant höherer Anteil an Männern, die einer chronischen Exposition gegenüber Insektiziden ausgesetzt waren im Vergleich zu einer wesentlich geringeren Prävalenz in der IVF-Gruppe. Dies unterstreicht indirekt die eingangs formulierte Hypothese, da der Anteil entsprechend belasteter Patienten in der Gruppe, die aufgrund einer unzureichenden Spermaqualität auf Fremdsperma zurückgreifen mussten (AID) wesentlich höher lag als in der IVF-Gruppe, bei der mit patienteneigenem Sperma gearbeitet wird (Strohmer et al.,1993). Somit zeigte sich auch hier ein Zusammenhang zwischen permanenter Noxeninokulation (Bauer, Winzer, Fabrikarbeiter der Insektizidsynthese) und Reduktion der Spermaqualität. Das Vorkommen von Organochlorverbindungen, insbesondere DDT, DDE und dem hier nicht näher untersuchten Hexachlorbenzol im Sperma lag in einer Studie (Stachel et al.,1989) im gleichen Konzentrationsbereich wie im Blut der untersuchten Probanden (DDT 2,0-14,6 µg/l; DDE 0,4-6 µg/l).

Dies waren im konkreten Fall vor allem Chemiestudenten mit häufigem Kontakt zu den betreffenden Substanzen. Eine direkte Korrelation zwischen Noxenkonzentration und vorhandener verminderter Spermaqualität konnte hierbei nicht nachgewiesen werden, jedoch kann die Existenz von Insektiziden im Sperma darauf hinweisen, dass eine Beeinträchtigung der Fertilität je nach Konzentration der Noxe möglich wäre. Darüberhinaus gibt es sehr detaillierte Angaben über die Konzentration von DDE und Lindan im menschlichen Sperma (Kumar et al., 2000).
In Indien, wo besagte Insektizide über lange Zeit in der Agrarwirtschaft eingesetzt wurden, fanden sich bei einer gaschromatographischen Untersuchung menschlichen Spermas Rückstände von Lindan und DDE (Tab.1). Von DDT konnten hier keine messbaren Konzentrationen gaschromatographisch nachgewiesen werden.

Tab. 1: Organochlorpestizide in menschlichem Sperma bei exponierten Personen (Fabriksynthesearbeiter) (Kumar et al., 2000).

Lindan	DDE
61,32 µg/l	35,31 µg/l

1.2. Anatomie / Physiologie des männlichen Reproduktionstraktes und Spermatogenese

Die Fruchtbarkeit des Mannes ist ein sehr komplexer Regelmechanismus, an dem viele Zellfunktionen und hormonelle Kontrollsysteme zusammenwirken. Nur ein perfektes Zusammenspiel dieser Regulationsvorgänge in der Spermatogenese liefert die Grundvoraussetzung für eine unbeeinträchtigte Fertilität des Mannes. Folgerichtig existieren verschiedene Möglichkeiten, über die eine Manipulation der Keimzellreifung durch exogene Noxen erfolgen kann. Die Spermatogenese erfolgt in den sogenannten Tubuli seminiferi des Hodens. Dies sind gewundene Kanälchen, deren Innenwand von dem eigentlichen Keimepithel ausgekleidet ist. Es hat eine Höhe von ca. 80µm und besteht aus Keimzellen und den ***Sertolizellen.*** Die Entwicklung der reifen Spermatozoen beginnt an der Basalmembran des Keimepithels in Form der Spermatogonie, die durch mehrere Reifeteilungen das Stadium der reifen Spermatide erreicht, welche dem Tubuluslumen zugewandt ist.

Durch den kompletten Entwicklungsprozess hindurch spielen die Sertolizellen eine eminent wichtige Rolle: Einerseits fungieren sie als Stützgerüst für die heranreifenden Spermatozoen und sind andererseits durch ihre Laktat-/Pyruvatproduktion (Nicolet et al.,1981) essentiell für den Stoffwechsel der sie umgebenden Keimzellen. Ferner ist die Sertolizelle durch die Produktion von Hormonen, wie z.B. das **Inhibin-B** in ein Regulationssystem eingebunden, das die Spermatogenese auf komplexe Weise reguliert.

Die heranreifenden Keimzellen haben während ihres gesamten Reifevorganges zu befruchtungsfähigen Spermatozoen engen Kontakt zu benachbarten Sertolizellen. Der Kopf mit der darin enthaltenen Erbinformation ist bis zur Ablösung in das Tubuluslumen (Spermiation) in Zellmembrankrypten der Sertolizelle (ectoplasmic specialization) adhärent (Russell et al.,1993). Sertolizellen untereinander besitzen ebenfalls weit verzweigte Zellmembrankontakte. Leistenförmige Anordnungen dieser Kontakte bilden im basalen Bereich des Keimepithels die sogenannte Zonula occludens als Grenzzone zwischen basalem und adluminalem Teil der Spermatogenese. Diese Separation in verschiedene Kompartimente ist als Blut-Hoden-Schranke bekannt, sie verhindert den Übertritt von Schadstoffen aus dem Blutkreislauf in den luminalen Bereich der Tubuli contorti, wo sich die letzten Reifungsvorgänge zum Spermatozoon vollziehen. Hieraus wird ersichtlich, dass die Sertolizelle neben ihrer Funktion als Energielieferant (zytoplasmatischer Kontakt zu Spermatiden) und Stützgerüst (zytoplasmatische Zellausläufer bis zum Tubuluslumen) auch eine protektive Funktion im Rahmen der Spermatogenese übernimmt (Benninghoff, 1994).

Nach Ausdifferenzierung zu Spermatozoen gelangen diese durch das Gangsystem der Tubuli contorti in das Rete testis, einem Netzwerk aus Spalträumen, Blut- und Lymphgefäßen. Die Ductuli efferentes schließen sich an und transportieren die Keimzellen in den Ductus epididymidis, der gemeinsam mit den distalen Anteilen der Ductuli efferentes den Nebenhoden bildet, in dem eine weitere Ausreifung der Spermatozoen erfolgt. Das Gangepithel der Nebenhoden produziert eine Vielzahl verschiedener Substanzen (Glycerylphosphorylcholin,

Carnitin u.a.), die den Stoffwechsel der Keimzellen sowie die Stabilität der Zellmembran günstig beeinflussen. Der Transport durch das Gangsystem des Nebenhodens dauert beim Menschen etwa 12 bis 14 Tage. An den Nebenhoden schließt sich der Samenleiter (Ductus deferens) an, der die Verbindung zwischen Nebenhodengang und Harnröhre herstellt. Im Nebenhodenschwanz werden Spermatozoen bis zu drei Wochen gespeichert, bevor sie bei einer Ejakulation über die Harnröhre durch pulsative Kontraktionen des Genitaltraktes ausgestoßen werden.

Abbildung 1 zeigt die Architektur eines Tubulus contortus sowie die Keimzellstadien der Spermatogenese auf lichtmikroskopischer Ebene. Im basalen Bereich unterscheidet man drei Typen von Spermatogonien, Typ A dark, Typ A pale und Typ B, wobei die Typ A-Zellen als Stammzellen der Keimzellreifung dienen. Durch mitotische Zellteilung entstehen hieraus Spermatogonien Typ B; anschließende Reifungsprozesse mit Wanderung zum adluminalen Bereich des Tubulus lassen hieraus primäre Spermatozyten (Z/P) werden (Spermatozytogenese). Die folgende Meiose führt zur Entstehung von haploiden runden Spermatiden (St) (Stevens & Lowe,1992).

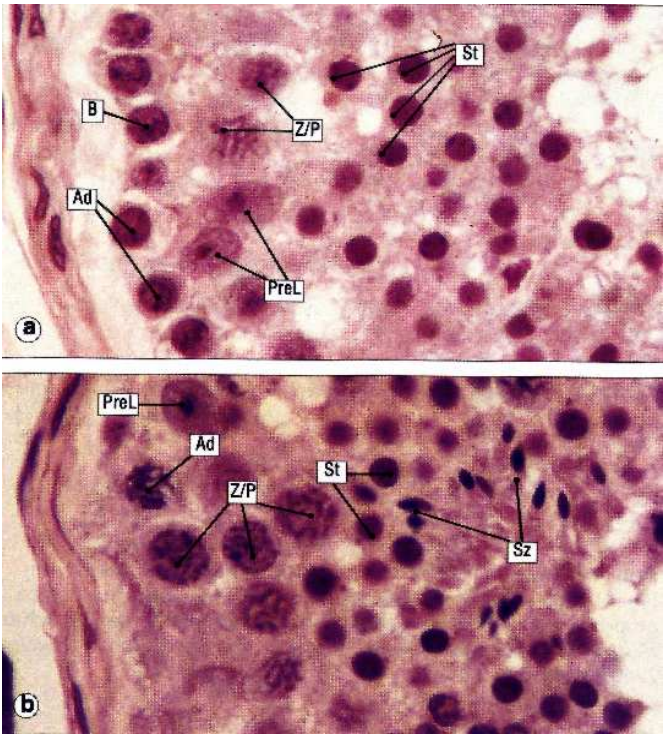


Abb.1: Aufbau eines Tubulus contortus (human)
a: Basal sind unterschiedliche Spermatogonientypen (Typ A dark = Ad,Typ B = B) sowie im adluminalen Bereich Spermatozyten im Präleptotän (PreL) und im Zygotän/Pachytän (Z/P) zu erkennen. Die Spermatiden (St) liegen weit im luminalen Bereich.
b: Die Einbettung unreifer Spermatozooen (Sz) erfolgt in Zytoplasma von benachbarten Sertolizellen (siehe Text) (Stevens und Lowe, 1992).

Die Spermatogenese unterliegt einer komplexen hormonellen Steuerung. Mit der Pubertät beginnt der Hypothalamus als Bestandteil des Zentralnervensystems vermehrt das sogenannte Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) zu produzieren und über einen Pfortaderkreislauf zur benachbarten Hypophyse zu transportieren. Hier bewirkt GnRH im Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) die Sekretion von:

a) LH (Luteinisierendes Hormon) und

b) FSH (Follikelstimulierendes Hormon)

LH stimuliert die im Interstitium des Hodens gelegenen Leydig-Zellen zur Synthese von Testosteron, welches sowohl die LH- als auch die FSH-Ausschüttung supprimiert (Benninghoff,1994). FSH bewirkt an der Sertolizelle über Mechanismen, die noch nicht ausreichend geklärt sind, einen positiven Einfluss auf die Differenzierung heranreifender Spermatozoen. In einem negativen Feedbackmechanismus hemmt die reflektorische Produktion von Inhibin-B in der Sertolizelle die wei-tere Sekretion von FSH aus der Hypophyse (de Kretser et al.,1989). Es ist seit geraumer Zeit möglich, Inhibin aus in-vitro-Zellkulturen zu bestimmen (Le Gac et al.,1982; Hancock et al.,1992), um mehr über die Auswirkungen exogener Einflüsse sowie die Inhibinsekretion als einen Marker zur Beurteilung der Sertolizellfunktion zu erfahren (Dong et al.,1992; Plymate et al.,1992). Ein Beispiel hierfür sind die Veränderungen der Inhibinsekretion in vitro nach Gabe von Nitrobenzol, einer bekannten fertilitätsbeeinträchtigenden Noxe in vivo. In sehr hohen Konzentrationen (1µM; 1mM) erkannte man eine signifikante Steigerung der Inhibinsekretion, während der Bereich zwischen 10 µM bis 100 µM keinen Effekt zeigte.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Inhibinsekretion in vitro als zusätzlicher Marker zur Interpretation von reproduktionstoxikologischen Mechanismen herangezogen werden kann (Allenby et al.,1990). Dieses hormonell regulierte System kann durch Manipulation der einzelnen Steuerelemente (Hormonspiegel im Blutserum) aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Abbildung 2 verdeutlicht, dass z.B. eine Manipulation der sezernierten Inhibinmenge (Sertolizelle) durch exogene Noxen zu einer gestörten Spermatogenese führen könnte (Veränderung des FSH-Spiegels im Blutserum).

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass Inhibin sowohl in vivo als auch in vitro einen starken Inhibitor der FSH-Ausschüttung darstellt (Findlay et al.,1987) und somit in der Fragestellung dieser Arbeit einen wichtigen Platz einnimmt. FSH hat als Steuerungshormon der Hypophyse einen positiven Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Sertolizelle. Darüberhinaus konnte eine signifikante Steigerung der Laktat-/Pyruvatproduktion kultivierter Sertolizellen unter FSH-Einfluß nachgewiesen werden (Jutte et al.,1983). Diese wäre bei erhöhter Inhibinproduktion durch exogene Noxen erniedrigt und hätte somit eine Beeinträchtigung der Spermatogenese zur Folge. Die Inhibinsekretion unterliegt einem Biorhythmus mit einem Sekretionsmaximum in den frühen Morgenstunden (Carlsen et al.,1999). Inhibin wird als dimeres Glykoproteinhormon von der Sertolizelle gebildet und existiert in zwei verschiedenen Formen, Inhibin-A und Inhibin-B. Neuere Arbeiten zeigten, dass beim Mann nur Inhibin-B physiologisch aktiv ist (Andersson et al., 1998). Beiden Formen ist eine α-Untereinheit gemeinsam. Der Rest der Proteinkette unterscheidet sich in Form einer βA-Untereinheit für Inhibin-A sowie einer βB-Untereinheit für Inhibin-B (de Kretser et al., 1989).

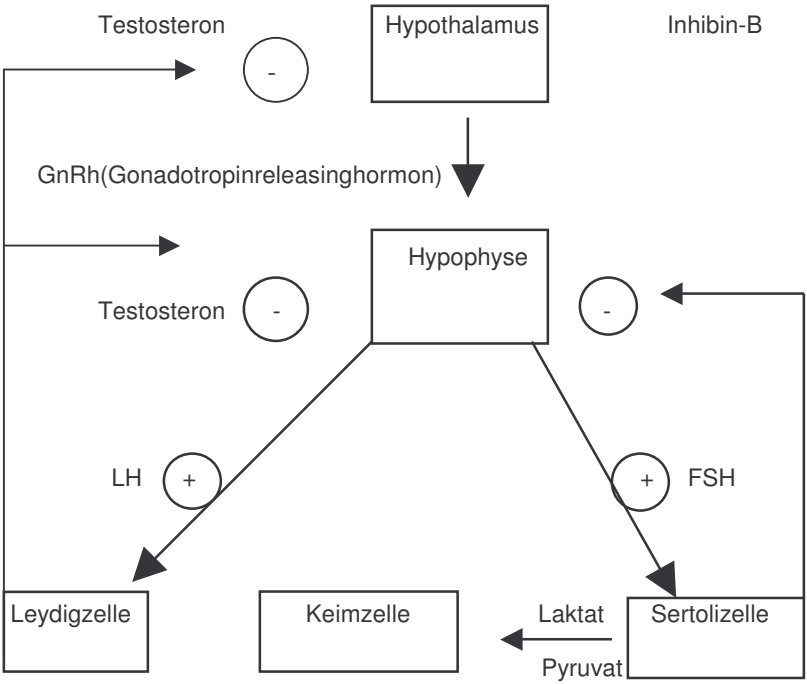


Abb. 2: Hormoneller Regelkreis der Spermatogenese

Eine Vielzahl von Sekretionsprodukten der Sertolizelle gewährleisten eine intakte Spermatogenese. Dies sind neben Hormonen, wie z.B. das Inhibin-B auch Substrate zur Ernährung der benachbarten Keimzellen, die während ihrer Differenzierungsphase zu reifen Spermatozooen einen hohen Stoffwechsel aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass in heranreifenden Spermatozyten eine spezifische Laktatdehydrogenase existiert, die durch ihre Lokalisation in Mitochondrien nahe der Zellmembran bevorzugt exogenes Laktat der Sertolizelle metabolisiert (Meistrich et al.,1977; Clermont et al.,1978).

Sowohl Laktat als auch Pyruvat sind die Endprodukte des anaeroben (ohne die Anwesenheit von Sauerstoff) Abbaus von Glucose im Stoffwechsel der Sertolizelle und jeder anderen Zelle mit eigener Energiegewinnung. Sie stehen in einem dynamischen Gleichgewicht untereinander, wobei dieses weit auf der Seite des Laktats liegt. Die Metabolisierung von Glucose in Sertolizellen führt zu einer hohen Akkumulation von Laktat / Pyruvat, welches den umgebenden Keimzellen als Energielieferant zur Verfügung steht, unter physiologischen Bedingungen nahezu 600 nmol / mg Zellprotein/h, als Hinweis einer hohen Glykolyserate in vitro (Robinson et al.,1981).

Die Sertolizelle ist durch Ihre Sekretion von Laktat / Pyruvat der wichtigste Energiedonator der Spermatogenese. Man fand in Keimzellkulturen ohne Zugabe von Laktat / Pyruvat mikroskopisch nachweisbare Veränderungen im Sinne einer Zelldegeneration mit Chromatinkondensation und Zytoplasmaveränderungen. Entsprechend wiesen diese Zellen einen deutlich niedrigeren Stoffwechsel auf als eine Kontrollpopulation mit Laktat / Pyruvatzusatz, nachgewiesen durch den Sauerstoffverbrauch pro mg Zellprotein sowie durch gesteigerten Umsatz radioaktiv markierter Nukleotide unter Laktatbereitstellung (Nicolet et al.,1981). Zusammenfassend stellt sich die Produktion von Laktat / Pyruvat der Sertolizelle als ein wichtiger Faktor zum physiologischen Ablauf der Spermatogenese dar.

Die Bedeutung der Laktat- / Pyruvatbestimmung im Rahmen dieser Arbeit liegt in der Eigenschaft von Sertolizellen, auf Noxenexposition im Kulturmedium mit einer Veränderung der Laktat-/Pyruvatproduktion zu reagieren. Dieses Phänomen ist für verschiedene Noxen bereits beschrieben. Nach Exposition gegenüber Dinitrobenzol sowie einer Monophtalatverbindung (Mono-(-2-ethyl-hexyl)-phtalat, MEHP) zeigten sich signifikante Steigerungen der Sekretion dieser Parameter in das Zellkulturmedium bei kultivierten Sertolizellen (Williams et al.,1988).
Die Laktatsekretion war um das vierfache, die Pyruvatsekretion um das achtfache gestiegen. In einer Arbeit von Chapin et al. (1988) fand sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Laktatproduktion. Nickel, Platin und Kobalt besitzen als Metalle ebenfalls die Eigenschaft, die Sekretion von Laktat nach Inkubation mit Sertolizellen in vitro zu steigern (Monsees et al.,1998).
Aus der Darstellung von Anatomie und Physiologie der Keimzellreifung ergeben sich verschiedene Ansatzpunkte für eine mögliche Manipulation der Spermatogenese durch exogene Noxen:

a) Eine direkte Schädigung der Sertolizelle bewirkt durch einen möglichen Zusammenbruch der Blut-Hoden-Schranke sowie durch eine Beeinträchtigung der hormonellen und nutritiven Versorgung der heranreifenden Spermatozoen eine Manipulation der Spermatogenese (s. Abb.2)

b) Durch antihormonelle Eigenschaften der Noxe resultiert ein Wirkungsverlust körpereigener Hormone mit Beeinträchtigung der Spermatogenese.

c) Die Speicherung der Spermatozoen im Nebenhoden mit direktem Kontakt zum Blutkreislauf ermöglicht eine direkte Schädigung durch Noxenübertritt in die Keimzelle.

1.3. Beschreibung der untersuchten Organochlorpestizide

1.3.1. Lindan

Lindan (γ-Hexachlorcyclohexan) gehört wie jede der drei untersuchten Insektizide zur Gruppe der Organochlorpestizide. Dies sind eine Vielzahl von chemischen Verbindungen, die als Gemeinsamkeit ein Kohlenwasserstoffgrundgerüst besitzen, dessen Wasserstoffatome an verschiedenen Positionen durch Chloratome substituiert wurden.

Der Begriff Hexachlorcyclohexan (HCH) ist ein Oberbegriff und umfasst ein Gemisch verschiedener Isomere (α-, β-, δ-,γ- und ε-Isomere), die sich lediglich in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden. Der Begriff „Lindan“ ist dem γ-Isomer vorbehalten, da nur dies eine insektizide Wirksamkeit aufweist und somit im Interesse dieser Arbeit steht. Schon Faraday entdeckte 1825 das γ-Isomer Lindan, aber erst 1912 gelang es Van der Linden ein reines γ-Isomer zu isolieren. Der heutige Name des häufig benutzten Isomers geht auf diesen Forscher zurück. Lindan lässt sich relativ einfach und billig aus Benzol synthetisieren (Büchel,1977).

Prinzipiell sind hierfür zwei Arbeitsschritte notwendig (Abb. 3):

1. HCH-Synthese

Benzol + Chlor + UV-Licht ⟶ Hexachlorcyclohexan

$C_6H_6 + 3\,Cl_2$ + UV-Licht ⟶ $C_6H_6Cl_6$

(Isomerengemisch)

2. Extraktion des Lindans (γ-Isomers)

Abb.3: Schematische Darstellung des Synthesewegs und der Isolierung von Lindan

Lindan wurde 1949 zur Schädlingsbekämpfung eingeführt und fand sowohl in Europa als auch in Amerika und auf dem afrikanischen Kontinent bis Ende der siebziger Jahre Anwendung. Ferner erfolgte die Imprägnierung von Bauholz mit Lindan im Sinne einer Schädlingsprophylaxe, so dass auch heute noch aus entsprechenden Wand- oder Deckenverschalungen Lindan ausdünsten kann. In den Industrienationen ist es heute relevant zur Therapie ektoparasitärer Erkrankungen (Skabies u.a.) mit einer einheitlichen Konzentration von 0,3 % im Medikament. Die erste Therapie eines an Skabies erkrankten Patienten wurde 1948 erfolgreich durchgeführt (Woolridge et al.,1948). Außer der medizinischen Anwendung wird dieses Insektizid auch heute noch in den sogenannten „Dritte Welt Ländern“ zur effektiven Insektenbekämpfung eingesetzt. Im Gegensatz zu seinen verwandten Substanzen dieser Stoffgruppe (DDT, DDE, Dieldrin, Aldrin) ist Lindan durch eine relativ schnelle Metabolisierung und Ausscheidung aus dem betreffenden Organismus gekennzeichnet.

Dies liegt in der vergleichsweise guten Wasserlöslichkeit der Substanz. Akute Vergiftungserscheinungen sind in der Literatur vielfach beschrieben und beruhen hauptsächlich auf unsachgemäßer Anwendung (Überdosierung, orale Einnahme). Diese sind gekennzeichnet durch Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen bis hin zu epileptiformen Krampfanfällen (Greave et al.,1950). Eine Ausnahme bildet der Fall einer jungen Patientin, bei der es auch nach regulärer Anwendung eines Lindanshampoos zu massiven Intoxikationserscheinungen kam (Fischer et al.,1994).
Die Akuttoxizität (LD 50) bei oraler Zufuhr von Lindan und DDT ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: LD 50-Werte von Lindan und DDT bei der Ratte nach oraler Gabe (Ulmann,1973)

Lindan	DDT
125 mg / kg KG	250 mg kg KG

Auswirkungen durch längerfristige Exposition bei Versuchstieren sind ebenfalls beschrieben. Nach täglicher Verabreichung von 100 pg/l Lindan in öliger Trägerlösung über die Lebenszeit der Tiere fanden sich Lebergewichtserhöhungen, Leberzellverfettungen bis hin zu schwersten Nierenschädigungen bei 1600 pg/l (Truhaut et al.,1954). Die erhebliche Beeinträchtigung teilungsaktiver Gewebe durch Lindan wurde durch Gabe von 20-40 mg / kg Körpergewicht (KG) an Mäusen offensichtlich. Hier kam es nach dreitägiger Inokulation zu einer histologisch nachweisbaren Knochenmarkssupression (Verminderung aller teilungsaktiver Stammzellen im Knochenmark) (Hong et al.,1993).

Dieses Versuchsergebnis kann als Hinweis dafür gelten, dass Lindan neben einer Affektion des Zentralnervensystems vor allem auch proliferierendes Gewebe beeinflusst. Dies hat im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit eine wichtige Bedeutung, die bei der Darstellung der möglichen Angriffspunkte der Noxen noch näher zu beleuchten ist.

Tabelle 3 fasst die bekannten toxischen Eigenschaften von Lindan beim Versuchstier nach einer Akutintoxikation zusammen:

Tab. 3: Histopathologie bei Mäusen nach akuter Lindanintoxikation (Chen et al.,1968; Hong et al.,1993)

Organ	Befunde
ZNS	fettige Zelldegeneration
Leber	vakuolige Degeneration, Nekrosen
Niere	fettige Degeneration des Tubulusepithels
Lunge	Ödeme, Pneumonien nach Inhalation
Magen	Blutextravasate
Knochenmark	Hemmung der Hämopoese

Dieses Wissen über akute und chronische Toxizität des Lindans führte zur Erstellung des sogenannten „no-effect-levels“, derjenigen Menge, bei dem im Tierversuch bei chronischer Inokulation keine Intoxikationserscheinungen auftraten. Diese beläuft sich auf eine Konzentration von 25 ppm im Futter. Der Wert diente als Grundlage des für den Menschen relevanten ADI (Acceptable Daily Intake) von 0,01 mg / kg KG / Tag (Herbst et al.,1993), der Menge, bei der auch bei chronischer Inokulation nicht von einer gesundheitsschädlichen Wirkung auszugehen ist. Personen mit regelmäßiger Exposition (Beschäftigte in der Lindansynthese) wiesen im Durchschnitt 50-100 fach höhere Serumspiegel auf als eine vergleichbare Kontrollgruppe (Tabelle 4). Diese Ergebnisse wurden im Zeitraum von fünf Jahren im Rahmen arbeitsmedizinischer Untersuchungen erhoben.

Tab. 4: Blutserumspiegel von Lindan bei Exponierten / Kontrollgruppe als Mittelwert im Zeitraum von fünf Jahren (aus Lindan-Workshop,1982).

Exponierte	Nicht - Exponierte
188 µg / l	3 µg / l

Hinsichtlich der reproduktionstoxikologischen Eigenschaften des Lindans existieren mehrere Forschungsergebnisse, vor allem seit eine Beeinträchtigung der Spermamotilität bei Schweinen in einem in-vitro-Versuch nachgewiesen wurde (Beck et al.,1953). Nach direkter Injektion von Lindan in das Hodengewebe der Ratte (1-1,25 mg/kg KG) traten Zellveränderungen im Sinne einer Zerstörung des Keimepithels, signifikante Reduktion der Spermatozoen sowie unspezifische dege-

nerative Veränderungen im inter- und intratubulären Bereich auf (Dikshith et al.,1978).
Eine weitere Arbeit stellt den Einfluss von Lindan nach oraler hochdosierter Gabe an Ratten auf Sertolizellen deutlich dar. Die Noxe wurde zu 5 mg/kg KG in gelöster Form über 5 Tage verabreicht im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Versuchstieren, die lediglich die Trägerlösung (Erdnussöl) ohne Lindan bekamen. Nach zwei Wochen zeigten sich bei den exponierten Ratten eine signifikante Reduktion der Spermatozoenzahl im aufgearbeiteten Hodengewebe. Mikroskopisch zeigte sich ein deutliches Aufblähen einzelner Sertolizellen, stellenweiser Verlust von Zellorganellen sowie ein allgemeiner Verlust des epithelialen Zellverbandes (Dalsenter et al.,1996).

Orale Inokulation von Lindan in einer Menge von 25 mg/kg KG an trächtige Ratten führte zu Auffälligkeiten in der Chromatinstruktur von Keimzellen bei der Nachfolgegeneration sowie zu Defekten der Laktatdehydrogenase (Traina et al.,2003). Nach Verabreichung von Lindan an Kaninchen während Trächtigkeit und Laktationsphase in einer Menge von 1 mg/kg KG imponierten Strukturschäden an Zellorganellen der Spermatozoen sowie Minderung der Fertilität bei der folgenden Generation männlicher Jungkaninchen (Fausto et al.,2001).
Die intraperitoneale Applikation von Lindan bei der Ratte verursachte ebenfalls Schäden im testikulären Gewebe sowie Zerstörung der Leydigzellen und Gewichtsreduktion der betreffenden Hoden (Chowdhury et al.,1987). Alle erwähnten Schädigungen des Keimepithels wurden in einem Konzentrationsbereich beobachtet, der keine allgemeintoxischen Symptome beim Versuchstier verursachte.

1.3.2. DDT

DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethan) ist ebenfalls eine chlorierte Kohlenwasserstoffverbindung, die verschiedene Isomere aufweist, welche sich in Ihrer räumlichen Struktur unterscheiden (Cremlyn, 1978). Analog zu dem zuvor beschriebenen Lindan bietet DDT seine Vorteile in einer herausragenden insektiziden Wirksamkeit, in einem relativ einfachen Syntheseverfahren (Abb. 4) sowie in einem breiten Wirkungsspektrum gegenüber verschiedensten Insektenarten. Von Zeidler im Jahr 1874 erstmalig beschrieben, entdeckte aber erst Paul Müller 1939 die insektizide Wirksamkeit dieses Stoffes. Seine sozio-ökologische Bedeutung besteht hauptsächlich in der großen Effektivität zur Eindämmung der Malaria aufgrund der Wirkpotenz gegenüber Anophelesmücken (Vektor der Malaria), ferner gegen diverse Läuse und Fliegen als Überträger von Fleckfieber, Cholera und Typhus (Casas et al.,1998). Vor diesem Hintergrund erhielt Paul Müller für die Fortschritte auf dem Gebiet der Seuchenbekämpfung 1948 den Nobelpreis.

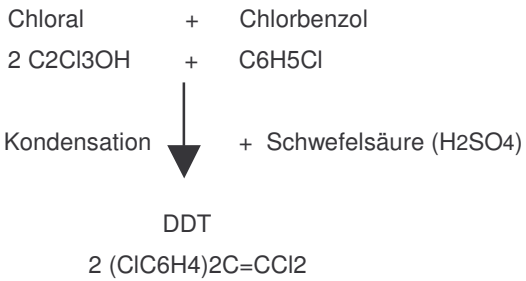


Abb. 4: Schematische Darstellung des Synthesewegs von DDT

Im Laufe der Zeit wurde die Umweltpersistenz und ihre ökologischen Folgen stetig mehr Mittelpunkt der Diskussionen über Sinn und Zweck dieses Insektizids. Man beobachtete als eine der beschriebenen Konsequenzen einer breitflächigen DDT-Anwendung ein ausgedehntes Massensterben von Delphinen entlang der westlichen Atlantikküste, obwohl DDT aufgrund der bekannten Lipophilie und damit der Anreicherung in unserer Nahrungskette bereits seit 1971 in den westlichen Industrienationen nicht mehr zugelassen ist (Perkow, 1971). Als Grund für das ausgedehnte Delphinsterben fand man damals eine signifikant erhöhte Prävalenz an Tumorerkrankungen, bedingt durch eine sehr starke Immunsuppression durch DDT (Lahvis et al.,1995). Diese Erkenntnis führte dazu, den immunsuppressiven und den somit möglichen kanzerogenen Effekt beim Menschen zu untersuchen.
Eine Arbeit aus Mittelamerika (Baris et al.,1999) beschäftigte sich mit der chronischen Exposition gegenüber DDT über Jahre und der Inzidenz von malignen Lymphomen bei den betreffenden Probanden. Hierbei konnte allerdings keine eindeutige Kausalität nachgewiesen werden. Eine Rolle als Kokanzerogen in Verbindung mit anderen Organochlorpestiziden wurde dennoch nicht ausgeschlossen. Diese Fakten sollten jedoch nicht die Gefährlichkeit im Hinblick auf die hohe Umweltpersistenz dieses Stoffes relativieren. DDT bleibt auch 30 Jahre nach seinem Verbot in den Industrienationen vor allem durch seine Rückstände in alltäglichen Nahrungsmitteln ein ernstes Problem. In Dänemark fand man in bis zu 25% der untersuchten Gemüse- und Früchtesorten Rückstände von DDT und verwandten Insektiziden (Juhler et al.,1999).

In Gemüse einer insektizidbelasteten Stadt in Indien (Lucknow) fand man Lindan in einer Konzentration von 0,015 - 0,068 parts per million (ppm) sowie DDT mit 0,004-0,03 ppm (Raizada et al.,1996). DDE wurde hierbei nicht gesondert untersucht. Solche Beobachtungen unterstreichen die hohe Potenz dieser Insektizide, sich in unserer Umwelt anzureichern und die betreffenden Organismen bei chronischer Exposition zu schädigen.
Ergebnisse aus Tierversuchen ergaben eine relativ hohe Dosis für die LD 50- Rate bei oraler Verabreichung (100-300 mg/kg KG) (Ulmann et al.,1973). Im Vergleich hierzu sind die Konzentrationen von DDT im Blutserum chronisch exponierter Personen, die bei der DDT-Synthese zur Malariaeindämmung beschäftigt waren, relativ gering. Trotzdem ist in Tabelle 5 eine zehnfach höhere DDT-/ DDE-Konzentration bei exponierten versus nichtexponierten Personen auffallend.

Tab. 5 : Serumspiegel von DDT und DDE bei Exponierten / Kontrollgruppe (Chand et al.,1991)

	Kontrollgruppe	Exponierte
DDT	0,0826 µg/l	0,8634 µg/l
DDE	0,0278 µg/l	0,2106 µg/l

1.3.3. DDE

DDE, Di-(-p-chlorphenyl)-dichlorethylen ist neben DDD eines der Hauptabbauprodukte von DDT und diesem in seinen chemischen Eigenschaften vor allem hinsichtlich Lipophilie sehr ähnlich (Perkow et al.,1971). Die enge chemische Verwandtschaft mit DDT sowie einige substanzspezifische Besonderheiten, die im Folgenden noch dargelegt werden, legten nahe, DDE als drittes Agenz im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen.

Hinsichtlich der Konzentration von DDE im Blutserum Exponierter (Synthesefabrikarbeiter, Farmer) liegen ebenfalls aussagekräftige Daten vor. Mehrere Forschungsergebnisse wiesen eine signifikant hohe Konzentration im Vergleich zu einer nichtexponierten Kontrollgruppe auf (Chand et al.,1991). Analog zu DDT zeigte sich eine zehnfach höhere Blutserumkonzentration bei Exponierten ohne gesundheitsschädigende Konsequenzen (Tab.5). Zur Frage der Mechanismen einer zellschädigenden Wirkung existieren Ergebnisse, die im Hinblick auf die Methodik dieser Arbeit erwähnenswert sind. Nach oraler Applikation von DDE an trächtige Mäuse in einer Konzentration von 25 mg/kg KG waren nach 16 Tagen in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung deutliche fetale Schädigungen von Nebennierenrindenzellen mit mitochondrialer Degeneration (Zerstörung der organelleigenen Membranen im Sinne eines Cristaezerfalls) zu erkennen. Eine Affinität zu mitochondrialen Strukturen könnte durch den nachgewiesenen Gehalt von DDE im menschlichen Sperma (Kumar et al., 2000) auch zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Sertolizelle führen.

Es existieren verschiedene Hinweise für einen hormonellen Wirkungsaspekt von DDT und DDE im exponierten Organismus und damit einen Eingriff in die komplexe Regulation der Spermatogenese. Sowohl DDT, als auch sein Hauptabbauprodukt DDE, sind in der Lage, aufgrund ihrer chemischen Struktur als Antiandrogen zu einer Verminderung der Testosteroneffekte zu führen und damit auch zu einer möglichen Verminderung der Spermiendichte bei exponierten Personen (Hodgson et al.,1995; Kelce et al.,1995; Sohoni et al.,1998). Die Wirkungsweise besteht darin, dass DDE die Bindung von körpereigenen Androgenen an den entsprechenden Rezeptor inhibiert. Weiterhin wurde eine Aktivitätssteigerung der hepatischen Aromatase nach Inokulation von 100 mg DDE über sieben Tage bei der Ratte beobachtet (You et al.,2001). Dieses Enzym ist für die Synthese körpereigener Östrogene verantwortlich. Orale Verabreichung von DDE in einer Konzentration von 100 mg/kg KG führte bei Embryonen trächtiger Sprague-Dawley-Ratten (14.-18. Schwangerschaftstag) zu einer auffälligen Feminisierung im Sinne einer Milchleistenbildung sowie einer Reduktion der anogenitalen Dammlänge. In einem abnehmenden Konzentrationsbereich bis 10 mg/kg KG waren diese Stigmata zunehmend diskreter ausgeprägt (You et al.,1998). Beim Menschen wurde bereits eine signifikante Zunahme von Kryptorchismus (fehlender Hodendeszensus beim Neugeborenen) sowie Hypospadie (Fehlanlage der Harnröhrenmündung) bei Müttern beobachtet, die Serumkonzentrationen von über 85,5 µg DDE/l Blutserum aufwiesen (Longnecker et al.,2002).

1.4. Zellvitalität

Einer der möglichen Ansatzpunkte einer Fertilitätsbeeinträchtigung besteht in einer direkttoxischen Wirkung auf die Sertolizelle. Daher lag einer der Schwerpunkte dieser Arbeit in der Ermittlung einer möglichen Beeinflussung der Zellvitalität nach Noxenexpositon.

Eine Methode zur Ermittlung der Zellvitalität besteht darin, die zu untersuchende Biomasse mit radioaktiv markierten Nukleotiden zu inkubieren, die sich aufgrund zelleigener Stoffwechselvorgänge in das Genom integrieren und somit durch ihre Radioaktivität indirekt die Vitalität der betreffenden Zellpopulation repräsentieren. Dieses Verfahren findet sowohl Verwendung zur Ermittlung einer Teilungsrate als auch zur Bestimmung einer prozentualen Vitalitätsreduktion nach Noxeninkubation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Eine weitere Möglichkeit der Vitalitätsmessung besteht in der Bestimmung von ATP (Adenosintriphosphat), einem Energieträger, der in jeder vitalen Zelle produziert wird (Russel et al.,1995). Im Gegensatz hierzu stehen bei dem sogenannten MTT-Assay (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zur Vitalitätsbestimmung mitochondriale Dehydrogenasen im Vordergrund, welche einen zugegebenen Farbstoff reduzieren und damit in seiner Farbintensität verändern. Diese kann anschließend photometrisch bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden (Laschinski et al.,1990).

1993 etablierte sich der MTT-Assay im Rahmen der Untersuchung des Einflusses von Neurotoxinen auf kultivierte Zellpopulationen als präferierte Methode vor den oben genannten Vitalitätsassays (Manger et al.,1993).
Im Laufe der Zeit fand diese Methode ein zunehmend breiteres Anwendungsgebiet, auch als Indikatormethode zur Ermittlung von Zellpopulationswachstumsraten (Gomez-Flores et al.,1995). Sie ist zur günstigen, zeitsparenden Vitalitätsmessung geeignet und zu radioaktiv gekoppelten Vitalitätsassays vergleichbar messempfindlich (Bean et al., 1995). Im Vergleich zur Anlagerung von radioaktiv markierten Nukleotiden in das Zellgenom, die mit unmarkierten Nukleotiden aus lysierten Zellen interagieren können und somit ein falsch positives Resultat liefern, ist die Umwandlung des Farbstoffes beim MTT-Assay an die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gebunden und somit direkt an die Vitalität der Zelle. Sertolizellen stellen nach der Pubertät des betreffenden Organismus ihre Teilungsaktivität ein. Somit ist ein Abfall der gemessenen Vitalitätsrate in Prozent bezogen auf eine Kontrollgruppe ohne Noxeninkubation auf eine direkte Wirkung der untersuchten Substanz zurückzuführen und nicht durch eine Teilungsaktivität der kultivierten Sertolizelle verfälscht.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Bestimmung der genannten Parameter erlaubt eine Aussage über Veränderungen der sekretorischen Eigenschaften von Sertolizellen in vitro nach Noxenexposition. Es sollte versucht werden, die beschriebene Beeinträchtigung der männlichen Fertilität durch Organochlorverbindungen als ein multifaktorielles Phänomen zu erklären, in dem die Sertolizelle eine wichtige Rolle einnimmt.

Durch ihre sekretorischen Eigenschaften sowie die Einbindung in die hormonelle Steuerung der Spermatogenese ist sie ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Keimzellreifung. Ziel dieser Arbeit war es insofern, eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit eine Beeinträchtigung der Zellfunktionen von Sertolizellen durch Organochlorpestizide erfolgen kann. Es sollte versucht werden, Rückschlüsse aus den erhaltenen Ergebnissen aus in-vitro-Bedingungen auf die Situation in vivo zu ziehen und diese in Ihrer Relevanz zu diskutieren. Unter den vielen Ansatzpunkten einer möglichen Fertilitätsbeeinträchtigung durch exogene Einflüsse setzte sich diese Arbeit das Ziel, ein in-vitro-Modell zu erstellen, das durch Betrachtung der Sertolizelle einen weiteren Beitrag zur Ätiologie dieses Phänomens liefern kann.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Die Sertolizellen wurden aus Hoden 18 - 21 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchen, Deutschland) nach der Methode von Hadley et al. (1985) isoliert. Insgesamt wurden im Rahmen der Versuchsdurchführungen 110 Ratten verwendet. Alle Chemikalien wurden, soweit nicht explizit erwähnt, in der höchsten erhältlichen Qualität (p.A.; pro Analysi) eingesetzt.

Die Organochlorpestizide Lindan 99% (H 4500), DDT 98% (38, 634-0) und DDE 99% (12,389-7) stammten von Sigma, Deisenhofen, Deutschland. Für die Primärkultur der Sertolizellen wurden speziell für Zellkultur getestete Medien und Zusätze benutzt. Die Noxen standen nach Vorlösung in DMSO (Dimethylsulfoxid) (1.02931.1000 Merck Darmstadt; Deutschland) mit einer Endkonzentration von 0,1% dieses Lösevermittlers in Zellkulturmedium zur Verfügung (DMEM: HAM`s F-12; 1:2; 31330-038, Gibco; Berlin, Deutschland).

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation von Sertolizellen und Anlegen der Primärkultur

Grundbedingung dieser Arbeit war die Isolation und Aufbereitung der Sertolizellen aus dem Rattenhodenparenchym. Dies ist ein sehr zeitaufwendiger Vorgang, der nach fest definierten Kriterien vollzogen wurde (Abb. 5).

An erster Stelle der Sertolizellaufbereitung stand die Gewinnung von Hodengewebe aus der Sprague-Dawley-Ratte. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in einen luftdichten Behälter gesetzt und mit Kohlendioxid begast. Dieses Gas verdrängte den Sauerstoff in der Atemluft, so dass die Ratten durch zehnminütige Kohlendioxidaspiration getötet wurden. Anschließend wurden die Tiere zur Desinfektion in einen Behälter mit 70%igem Alkohol gelegt, um dadurch möglichst viele Kontaminationsquellen ausschalten zu können. Vor allem das Fell der Ratte barg die Gefahr der Kontamination bei der Präparation der Rattenhoden.
Zur Gewinnung der Sertolizellen in Reinform wurden die folgenden Enzymmedien verwendet:

Medium A:

- 20 mg Kollagenase (Sigma; C-0130)
- 0,4 mg DNAse (Sigma ; DN-25)
- 20 ml Basismedium (DMEM : F12 Ham 1:2)

Medium B:

- 40 mg Kollagenase
- 40 mg Hyaluronidase (Sigma; H-3506)
- 0,4 mg DNAse
- 20 ml Basismedium

Stoppmedium:

- 20 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Sigma; H9003)
- 100 mg bovines Serumalbumin (Sigma; H-7825)
- 50 ml Basismedium

Zellnährmedium:

- 500 ml Basismedium
- Cytosin Arabinosid (Sigma; C 1768) (2 µg/ml)
- L-Glutamin (Gibco; 04305030-H) (2 mM)
- Penicillin-Streptomycin Lsg. (Sigma; P-3539) (100 µg/ml)
- Epidermal Growth Factor (EGF) (Sigma; E-1257) (10 ng/ml)
- Apo-Transferrin (Sigma; T-1147) (5 µg/ml)
- Humaninsulin (Sigma; I-1882) (2 µg/ml)
- Hydrocortison (Sigma; H-0135) (10 pM)
- D-alpha-Tocopherol (Vitamin E) (Serva; Heidelberg Deutschland, 36560) (200 ng/ml)
- All-Trans-Retinol (Vitamin A) (Serva; 38280) (200 ng/ml)
- Testosteron (Sigma; T-5641) (100 pM)

Nach dem Zusammenbringen aller erforderlichen Substanzen erfolgte die Sterilfiltration (Sterilfilterflaschen, Nalgene, New York, USA). Cytosin, ein Zytostatikum, welches dem Nährmedium zugeführt wurde, das dem Zelltransfer auf die Kulturplatte diente, unterdrückte die Vermehrung unerwünschter Zellarten (Spermatogonien, peritubuläre Zellen). Die Sertolizelle selbst blieb von diesem zytostatischen Effekt unberührt, da sie ihre Teilungspotenz zu Beginn der Pubertät, im konkreten Fall bei 18 Tage alten Ratten, einstellt (Russel et al.,1989).

Die Enzyme der Medien hatten sehr unterschiedliche Wirkmechanismen zur Isolation der Sertolizellen. Die DNAse wirkte als Endonuclease, es spaltete Phosphodiesterbindungen in den Nukleotidsträngen der Ribonukleinsäure, die daraufhin ihre räumliche Struktur veränderte. Ziel der Anwendung dieses Enzyms war die Hydrolysierung freier Erbträgersubstanz; hierdurch wurde eine Aggregation der DNA verhindert, die sonst die Gewebesuspension zähflüssig machen würde.

Das zweite Enzym, die Kollagenase, spaltete selektiv bestimmte Bindungsstellen zwischen den Aminosäuren eines Kollagenmoleküls, das dadurch denaturierte. Dies stellte sich als ein relativ schonendes Verfahren dar, um bei der Gewebszerlegung Einzelzellen gewinnen zu können, d.h. im konkreten Fall, Sertolizellen aus Ihrem Bindegewebsverband herauszulösen.

Hyaluronidase wurde zusammen mit der Kollagenase verwendet. Diese Esterase war zuständig für den Abbau von Hyaluronsäure, einem Glykosaminoglykan, das als wesentlicher Bestandteil der Grundsubstanz des Bindegewebes anzusehen ist (Voet,1992). Aus diesem Grunde stellte es sich als sehr effektiv dar zur Dissoziation von kollagenreichen Bindegewebszellen.

Der verwendete Trypsininhibitor inaktivierte die Kollagenaseinaktivität des beschriebenen Enzyms, indem er einen Protein-Inhibitor-Komplex ausbildete. Gleichen Zweck erfüllte das in Medium gelöste Albumin. Allerdings war diese Hemmwirkung nicht vollständig, so dass nach der Kollagenasebehandlung zentrifugiert werden musste.

Für das weitere Arbeiten mit den zu präparierenden Rattenhoden diente eine Sterilbank (Köttermann-Kochen-GmbH, Hänigsen, Deutschland). Es war darauf zu achten, die Arbeitsfläche vor der eigentlichen Nutzung mit einer hierfür eingebauten UV-Lichtquelle für zirka 30 min. zu bestrahlen und mit 70%igem Ethanol nachzuwischen. Unter der Sterilbank wurde der Bauchraum der Ratte mit sterilen Instrumenten eröffnet und die Hoden ohne Beimengung von Tierhaaren entnommen. Daraufhin wurden die Hoden in eine Petrischale, die mit 2 ml Zellnährmedium (DMEM:HAM F12;1:2) und 1 ml des Antibiotikums Gentamycin (Sigma; Nr. 3527), einem Aminoglykosid, im Verhältnis 1:2 gefüllt war, gelegt. Die Hoden wurden mit einem scharfen Skalpell zu einer homogenen Gewebsmasse verarbeitet, in 20 ml Medium A gegeben und anschließend kräftig durchmischt.

Daraufhin erfolgte eine Schüttelwasserbadbehandlung für 15 min. bei 37°C. Anschließend wurde in einem Falconröhrchen (50 ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) für 7 min. sedimentiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand, der hauptsächlich aus Leydigzellen bestand, die zur Reinkultivierung von Sertolizellen unerwünscht sind, mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt. Durch Zugabe von 25 ml des Stoppmediums erfolgte eine Hemmung der biochemischen Isolationsvorgänge im Falconröhrchen, dessen Inhalt nach Absaugen des Überstandes lediglich aus einem Bodensatz, einem sogenannten Pellet bestand. Mit Hilfe einer sterilen Einmalpipette wurde das Pellet mit 20 ml Medium B resuspendiert. Eine erneute 30 minütige Wasserbadbehandlung und eine Zentrifugation für 30 sec. bei 35xg beendeten diese erste Phase der Isolation.

Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand, der diesmal hauptsächlich aus Myoidzellen bestand, wurde erneut abgesaugt. Ein zweites Mal bewirkte die Zugabe von 25 ml Stoppmedium auf das Pellet ein Sistieren der enzymatischen Auftrennungsreaktionen. Das Falconröhrchen wurde erneut durchmischt und bei 35xg für eine Zeitdauer von 60 sec. zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden erneut 20 ml Medium B auf das Pellet hinzugefügt und bei 37°C inkubiert. Danach wurde bei 35xg für 45 sec. zentrifugiert. Es erfolgte eine Zugabe von 25 ml des Zellnährmediums (siehe S.27) zum Pellet, eine kräftige Durchmischung und eine nochmalige Zentrifugation bei 35xg für eine Zeitdauer von 45 sec..

Der erneut entstandene Überstand wurde mit einer sterilen Einmalpipette abgesaugt. Nachdem 30 ml Zellnährmedium in das Röhrchen gegeben und gemischt wurden, bewirkte die Behandlung mit einem Homogenisator, d.h. einem Edelstahlstab mit einem Teflonkopf, dessen Durchmesser genau dem Glasröhrchen entsprach, durch permanente Auf-und-ab-Bewegungen eine nochmalige gleichmäßige Zerkleinerung größerer Zellverbände. Es erfolgte eine Filterung der Zellsuspension durch ein 70 µm Nylonsieb (Falcon), wodurch hauptsächlich Einzelzellen gewonnen wurden. Als letzten Arbeitsschritt wurde der Inhalt des Falcongefäßes mit Zellnährmedium auf ein Volumen von 64 ml aufgefüllt und gemischt. Nach diesem Zellisolationsvorgang erfolgte die eigentliche Sertolizellkultivierung durch Transfer auf eine entsprechende Kulturplatte (Primaria, BD Biosciences) mit je 24 Wells. Diese wurden nacheinander mit je 1 ml (500.000 Zellen/ Quadratzentimeter entspricht 1.000.000 Zellen/Well) der hergestellten Zellsuspension aufgefüllt.

Anschließend wurden die Zellen bei 34°C und unter 5% CO2 im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert.

2.2.2. Kultur der Sertolizellen

Das Zellkulturmedium, mit welchem die Sertolizellen über Nacht inkubiert wurden, enthielt neben den unter 2.2.1. aufgeführten Zusätzen weiterhin 10% FCS (Fötales Kälberserum). Am darauffolgenden Morgen erfolgte ein Mediumwechsel, das wiederum Cytosin, aber kein FCS enthielt. Am dritten Tag erfolgte der sogenannte ***hypotone Schock***. Dieser diente der Eliminierung der auf der Zellkulturplatte befindlichen Keimzellen, die durch die enzymatische Auftrennung noch nicht eliminiert werden konnten und daher auf dem Zellrasen wuchsen. Durch Zugabe eines hypoosmolaren Mediums auf den Zellrasen erfolgte ein Konzentrationsausgleich zwischen intra- und extrazellulärem Medium durch Flüssigkeitsübertritt in den Intrazellularraum. Keimzellen sind hochempfindlich gegenüber intra-zellulärer Volumenzunahme und gehen dadurch zugrunde. Der einschichtige Zellrasen wurde hierfür mit einer hypotonen Flüssigkeit, einer 20mmol Tris-HCl-Lösung (pH=7,5; 20°C), behandelt (Galdieri et al.,1981). Nach Absaugen des Zellmediums wurden mit Hilfe einer sterilen Einmalpipette 1 ml Tris HCl-Puffer (Sigma, Trizma Base, T1503) in jedes Well hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 3 min. wurde die Lösung entfernt und der Zellrasen mit einer PBS Pufferlösung (pH=7,30; Phosphate Buffered Saline; OXOID; Hampshire; England; X514D) gespült. Anschließend erhielt jeder Zellrasen der Kulturplatte das schon beschriebene Kulturmedium ohne Cytosin in einer Menge

von 1 ml, bevor sie in den Brutschrank zurückgestellt wurden. Durch Anwendung des hypoosmolaren Tris-HCl-Puffers (90 mOsmol/kg) konnten Sertolizellen in Reinkultur gewonnen werden. Die Reinheit der Zellkultur wurde regelmäßig unter einem Lichtmikroskop überprüft.

2.2.3. Optimierungen

Das Hauptproblem beim Arbeiten mit Organochlorpestiziden ist ihre ausgeprägte Lipophilie und die damit verbundene schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien.

Tab. 7: Löslichkeit von Lindan und DDT in verschiedenen Medien (Ulmann,1973)

	Wasser	Äthylalkohol	Aceton	Xylol
Lindan	10 ppm	6,4 ppm	43,5 ppm	24,7 ppm
DDT	0,0012 ppm	6 ppm	50 ppm	60 ppm

Tabelle 7 zeigt die ausgeprägte Lipophilie sowie Unlöslichkeit in polaren Medien, sowohl in Wasser als auch in verschiedenen Alkoholen erfolgt nur eine geringe Lösung der untersuchten Organochlorpestizide. Diese Tatsache war der Grund dafür, dass zum Einbringen der in Pulverform vorliegenden Noxen in das polare Zellmedium ein Lösemittel verwendet werden musste.

Lediglich bis zu einer Konzentration von 15µmol/l in Nährmedium konnten die untersuchten Insektizide ohne Hilfsstoff gelöst werden, eine Konzentration, die im unteren Bereich der zu testenden Konzentrationen lag. Andererseits sind Lösemittel meist sehr aggressive Agenzien, die ihrerseits ebenfalls zu einer Eigentoxizität auf die inkubierten Sertolizellen führen konnten. An erster Stelle stand die Überlegung, die Organochlorpestizide in Ethanol vorzulösen, das dann im Zellmedium in einer Endkonzentration von 75 Vol.% vorlag. Allerdings hatte der Alkohol schon in diesem Bereich eigentoxische Wirkung auf die Sertolizellen, wie mittels MTT-Assay ermittelt wurde (Abb. 8).
Somit bestand nach wie vor die Notwendigkeit eines Lösemittels. Auf der anderen Seite musste diese Substanz in einer möglichst geringen Konzentration vorliegen, in der keine eigentoxischen Effekte zu verzeichnen waren. Als Lösung dieses Problems stellte sich die Verwendung von DMSO (Dimethylsulfoxid) als Lösemittel dar. Eine Endkonzentration von 0,1 Vol.% des DMSO im Nährmedium ließ die kultivierten Sertolizellen hinsichtlich der untersuchten Parameter unbeeinflusst, wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte (Abb. 7).

2.2.4. Stammlösung und Verdünnungsreihe

2.2.4.1. Stammlösung

Um den getesteten Konzentrationsbereich von 6,25 µM - 100 µM abdecken zu können, fand eine 100 µM Stammlösung Verwendung, die durch weitere Verdünnung die niedrigeren Noxenkonzentrationen (50-;25- ;12,5- und 6,25 µM) ergab. Es musste ein Lösevermittler ange-

wendet werden, der zwar die betreffenden Insektizide in Lösung bringt, dies allerdings in einer Konzentration, die keine Eigentoxizität entfaltet. Als geeignetes Lösungsmittel wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,1% (V/V) in Zellmedium verwendet. Nach Auflösung des Organochlorpestizids in reinem DMSO wurde dieses bis zu einer Endkonzentration von 0,1% (V/V) DMSO mit Zellmedium verdünnt. Nach gründlicher Durchmischung des gefüllten Falconröhrchens auf einer elektrisch betriebenen Drehscheibe lag die Noxe nach vorausgegangener Berechnung in einer Konzentration von 100 µM in der Stammlösung vor. Für jeden Versuchstag wurde eine frische Stammlösung angesetzt.

2.2.4.2. Verdünnungsreihe

Gleiche Volumenanteile der Stammlösung wurden mit gleich vielen Anteilen Zellmedium gemischt, welche ebenfalls DMSO in einer Konzentration von 0,1% (V/V) enthielten. Somit entstand eine 50 µM - Noxenlösung, die durch beschriebenes Procedere zu einer 25 µM- 12,5 µM- und 6,25 µM-Lösung führte.

2.2.5. Inkubation mit Noxe in vitro

Nachdem am dritten Tag der Zellkultivierung der hypotone Schock erfolgte, begann am sechsten Tag der eigentliche Versuch. Das Zellmedium wurde mittels einer sterilen Glaspipette vorsichtig aus jedem Well der Kulturplatte abgesaugt und unmittelbar danach je vier Wells mit der jeweiligen Insektizidkonzentration zu je 500 µl aufgefüllt.

Pro Versuch und Methode (MTT-Assay, Laktatassay/Pyruvatassay, Inhibinassay) dienten zwei Kulturplatten mit je 24 Wells. Abgesehen vom Pyruvatassay wurde jedes Messergebnis in Doppelbestimmung durchgeführt. Folglich resultierten acht Messresultate je Zellkulturplatte und Konzentrationsbereich. Die Platten wurden nach Inkubation mit den Insektizidlösungen für exakt 24 Stunden im Inkubator bei einem Kohlendioxidgehalt von 5% und 34°C inkubiert.

Bevor nun auf die eigentliche Versuchsauswertung näher eingegangen wird, hier eine chronologische Übersicht der Vorbereitungen bis zur Inkubation der kultivierten Sertolizellen mit der entsprechenden Noxenlösung.

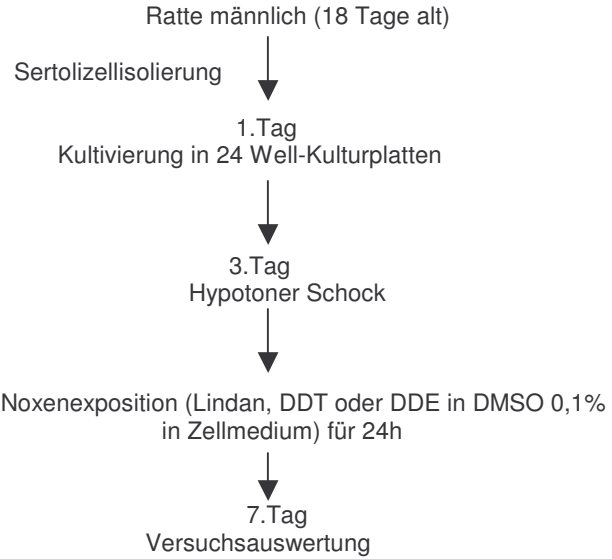


Abb. 5: Chronologische Abfolge der Kultivierung von Sertolizellen und Exposition mit Noxen

2.2.6. Verwendete Nachweismethoden

Im Folgenden werden der Versuchsaufbau und die Anwendungen der verschiedenen Assays erläutert.

2.2.6.1. MTT-Assay

Die Wirkungsweise des MTT-Assays beruht auf der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, welche die Farbe eines Agens (Tetrazolium) durch enzymatische Reduktion verändern.

Folgendes Schema verdeutlicht die grundlegende Reaktion dieses Assays:

Tetrazolium (gelb) —Dehydrogenase→ **Formazan** (blau)

Die absorptionsphotometrische Bestimmung des löslichen Formazans erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm. Hierbei ist, wie bei allen erwähnten Vitalitätsassays, auf die Einhaltung eines konstanten pH-Wertes zu achten.

2.2.6.1.1. Ablauf

Unmittelbar nach 24-stündiger Noxeninkubation der Sertolizellen begann die Vitalitätsauswertung mit Hilfe des MTT-Assays. Das gelblich erscheinende MTT-Pulver wurde in PBS-Puffer, pH=7,3, in einer Konzentration von 5 mg / ml Puffer gelöst.

Der PBS-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 mM Natriumhydrogenphosphat
- 10 mM Kaliumhydrogenphosphat
- 136 mM Natriumchlorid
- 1,42 mM Kalziumchlorid
- 1 mM Magnesiumchlorid

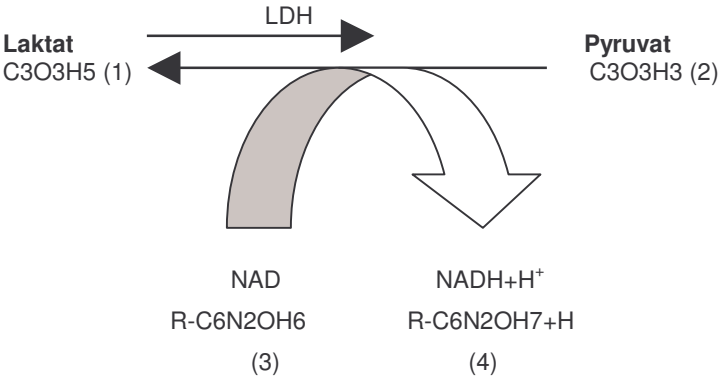
Die vollständige Lösung des MTT wurde nach einer einminütigen Beschallung in einem Ultraschallwasserbad erzielt. Danach war die Lösung gebrauchsfertig. Pro Versuchsreihe wurden zwei Zellkulturplatten entsprechend der Noxenkonzentrationsanordnung (0, 6, 25, 12,5, 25, 50 und 100 µM) verwendet. Pro Insektizidkonzentration ergaben sich folglich acht Messwerte, die in Doppelbestimmung ausgeführt wurden. Das Zellmedium, das über 24 Std. mit der darin gelösten Noxe auf die kultivierten Sertolizellen einwirkte, wurde abgesaugt und als erster Schritt jede Zellschale mit 500 µl PBS-Puffer gespült, um etwaige Rückstände aus jedem Well zu entfernen. Nach vorsichtigem Absaugen dieser Spülflüssigkeit erfolgte ein nochmaliges Aufbringen von 1 ml PBS-Puffer pro Well, bevor je 100 µl der vorbereiteten MTT-Lösung hinzugefügt wurden. Eine weitere Inkubation der auf diese Weise präparierten Kulturplatten für zwei Stunden im Brutschrank (34°C, 5% CO2) führte zur Entstehung des blau erscheinenden Formazans. Danach wurde der Puffer vorsichtig abgesaugt und 500 µl DMSO in jedes Well gegeben. DMSO fungierte als Solvens zur Auflösung des aggregierten blauen Formazans in der Zellkulturplatte.

Nachdem das Reaktionsprodukt in Lösung war, wurden pro Well zweimal 200 µl des in DMSO gelösten Formazans in eine Mikrotiterplatte transferiert. Aus diesen beiden Messwerten errechnete der MTP-Reader (EAR 400 ATC, SLT LAB-Instruments, Wien, Österreich) einen Mittelwert anhand der gemessenen Absorption bei 550 nm und 620 nm Hintergrundabsorption. Erhaltene Ergebnisse nach Inkubation mit Noxen unterschiedlicher Konzentration wurden prozentual bezogen auf eine Kontrollgruppe ohne Insektizidexposition. Im Detail bedeutet dies, dass jeder Messwert des MTT-Assays auf den Mittelwert der acht Kontrollgruppenergebnisse bezogen und dies prozentual ausgedrückt wurde. Schließlich erfolgte eine Mittelwertsbildung der jeweiligen acht Messergebnisse nach DDT-, DDE- oder Lindaneinfluss und deren graphische Auswertung.

2.2.6.2. Laktat-Assay

Die Laktatbestimmung erfolgte nach der Methode von Noll (1974). Sie beruht auf dem Prinzip, dass bei der Reaktion von Laktat zu Pyruvat mittels Laktatdehydrogenase (LDH) Elektronen und ein ungebundenes Proton entstehen, die durch NAD aufgenommen werden. Dieses wird dabei zu NADH reduziert und ändert dabei seine absorptionsphotometrischen Eigenschaften. NADH besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Messung dieser Absorption ist proportional zum vorhandenen NADH und somit auch zum Laktat in der Probe.

Die grundlegende Reaktion dieses Assays ist nachfolgend dargestellt:



Durch die Anordnung der Reaktionspfeile ist zum einen zu erkennen, dass die chemische Reaktion in beide Richtungen abläuft. Es herrscht ein chemisches Gleichgewicht, das allerdings weit auf der Seite des Laktats liegt. Diese Tatsache hat für das Funktionsprinzip des Assays eine herausragende Bedeutung: Bei der Reaktion von Laktat (1) zu Pyruvat (2) reagiert zeitgleich NAD (3) zu $NADH+H^+$ (4), es werden der Milchsäure zwei Wasserstoffatome entzogen. Die Messung des Laktats im Zellmedium erfolgte indirekt über die absorptionsphotometrische Bestimmung des $NADH+H^+$ nach Aufbereitung der Proben.

Aufgrund des geschilderten Gleichgewichtsverhältnisses ist es notwendig, Pyruvat aus der Reaktionskette zu entfernen, damit alles vorhandene Laktat zu Pyruvat reagieren kann und somit $NADH+H^+$ als Messparameter entsteht. Durch Umwandlung des Pyruvats mittels Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in eine Ketokarbonsäure wird dieses Ziel erreicht.

Laktat wurde aus dem Zellmedium bestimmt, in dem die betreffende Noxe gelöst war und mit dem die betreffenden Sertolizellen für 24 Std. inkubiert wurden. Pro Versuchsreihe und Konzentrationsbereich (6,25µM; 12,5µM; 25µM; 50µM; 100µM) fanden acht Wells Verwendung. Es lagen acht eigenständige Messwerte vor, die in Doppelbestimmung ermittelt wurden. Nach der 24-Stundeninkubation mit Lindan, DDT oder DDE bestand der erste Arbeitsschritt im Übertragen des betreffenden Zellmediums in Eppendorfcups zu je 200 µl in Doppelabfüllung pro Well und fünfminütigem Erhitzen bei 95°C, um Enzyme zu inaktivieren. Die Proben wurden anschließend bei -18 °C eingefroren.

Folgende Puffer und Stammlösungen wurden für die Laktatbestimmung verwendet:

- **Laktat-Stammlösung**

  Um bei jedem Versuchsgang einen Referenzwert zu besitzen, liefen zwei fest definierte Eichkonzentrationen mit 160 µg/ml und 80 µg/ml mit. Zur Herstellung dieser Stammlösungen wurde ein Laktatnatriumsalz (Serva, 29763), welches in der entsprechenden Menge in Glutamatpuffer gelöst wurde, verwendet.

- **Glutamatpuffer**

  Der Glutamatpuffer diente zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Werts im Reaktionsmedium der Photometerküvetten, weil nur dann eine optimale Wirkungsintensität der verwendeten Enzyme gewährleistet war (pH = 8,9).

  Zur Herstellung dieses Glutamatpuffers wurden zunächst 56,75g L-(+)-Glutamat (Merck, Deutschland; 1.00291.0100) in 380 ml Natronlauge (1 mol/l;Merck 1.00291.0250) gelöst und mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt, was einer 0,77 M Glutamatstammlösung entspricht, die zu je 20 ml in entsprechenden Falcon-Röhrchen bei -20°C eingefroren wurde.

  Am Versuchstag wurde nach Auftauen von 20 ml der Glutamatstammlösung 9,4 ml Natronlauge (1 mol/l) zugefügt, so dass der gebrauchsfertige Glutamatpuffer (0,52 mol/l; pH=8,9) entstand.

- **ß-NAD-Lösung**
  Das in kristalliner Form vorliegende ß-NAD (Boehringer, Deutschland; 127965) wurde zu 40 mg abgewogen und in einem Eppendorfgefäß mit 2 ml destilliertem Wasser aufgefüllt, woraus eine ß-NAD-Lösung entstand (24 mmol/l).

- **Laktatdehydrogenase (LDH)**
  LDH mit 45 units/ml (Sigma; L-2518) wurde bei + 4°C gelagert und bei Bedarf Bedarf vor Assaybeginn auf Zimmertemperatur erwärmt.

- **Die Amino-Alanin-Transferase (ALT = GPT)**
  GPT mit 21 units / ml (Sigma; G-9880) wurde ebenfalls bei +4°C gelagert und bei Bedarf auf Zimmertemperatur erwärmt.

Versuchsdurchführung:
Nach Auftauen und Durchmischen der eingefrorenen Laktataliquots erfolgte die Auswertung der Laktatmenge pro Well in Doppelbestimmung nach folgendem Schema. Zusätzlich waren bei jedem Assay jeweils zwei Blankproben (ohne Laktat) und zwei Standardproben zu 160 µg/ml und 80 µg/ml integriert.

- 700 µl destilliertes Wasser in jede Reaktionsküvette (auch Standard und Blank)
- 250 µl Glutamatpuffer
- 30 µl ß-NAD-Lösung
- 80 µl der jeweiligen Laktatprobe (Blank: 80 µl dest. Wasser)
- 10 µl GPT (21 unit/ml), kräftiges Durchmischen des Inhalts, 10 min. Wartezeit
- 1. Messung am Photometer (Beckmann DU 68) bei 340 nm (E 10-Wert)
- 11µl LDH (45 unit/ml), kräftiges Durchmischen des Inhalts, zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur
- 2. Messung am Photometer bei 340 nm (E120-Wert)

Zur Auswertung der erhaltenen Messergebnisse wurde zunächst die Differenz zwischen dem E 120-Wert und dem E 10-Wert gebildet, die für die allgemeine Formel zur Berechnung einer Konzentration notwendig ist (= D) .
Diese setzt sich wie folgt zusammen (aus Gebrauchsanleitung L-Laktat, Enzymatische Bioanalytik, Boehringer Mannheim):

$$c = \frac{V * MG}{\varepsilon * d * v * 1000} * D$$

c = Konzentration
V = Testvolumen [ml]
v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]
d= Schichtdicke [cm]
ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm [l / mmol * cm]
D = Differenz E120 - E 10

Im konkreten Fall ergibt dies in die Gleichung eingesetzt:

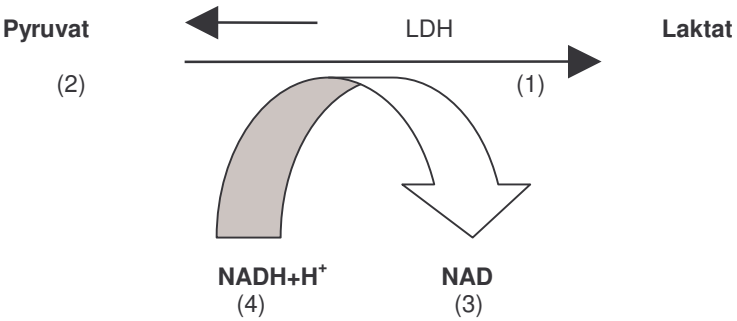
$$c = \frac{1{,}081 \text{ ml} * 90 \text{ g / mol}}{6{,}3 \text{ l / mmol} * \text{cm} * 1 \text{ cm} * 0{,}08 \text{ ml} * 1000} * D$$

Dieses Resultat musste schließlich auf die Proteinmenge pro Zellschale bezogen werden, um die verschiedenen Messergebnisse vergleichbar zu machen. Die Messung verlief linear im Konzentrationsbereich von 2 - 20 mg Laktat / ml.

2.2.6.3. Pyruvat-Assay

Die enzymatische Bestimmung dieser Substanz erfolgte nach Czok et al. (1974). Es wurde hierbei die Umkehrreaktion benutzt, die zur Laktatbestimmung herangezogen wurde: Das in der Probe vorhandene Pyruvat reagierte zu Laktat und hierbei entstand aus $NADH+H^+$ das NAD. Diese Konzentrationsabnahme von $NADH+H^+$ wurde analog dem Laktatassay photometrisch bei 340 nm erfasst und entsprechend ausgewertet.

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt, wie schon erläutert, weit auf der Seite des Laktats. Daher lief die NAD-Entstehung aus $NADH+H^+$ nach Zugabe des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) freiwillig ab, ohne vorherige Entfernung eines Reaktionspartners aus dem Gleichgewicht, wie es im Falle des Laktatassays notwendig war.
Nachfolgend die grundlegende Gleichung, auf der die Funktionsweise des Pyruvatassays beruhte.



Im Gegensatz zur Laktatbestimmung zeigt der Pyruvatassay ein wesentlich einfacheres Reaktionsmodell, was sich in der geringeren Anzahl der verwendeten Materialien und der kürzeren Zeitdauer des Assays widerspiegelte. $NADH+H^+$ wirkte hierbei als Protonendonator, gab folglich beide Wasserstoffatome an Pyruvat ab, das dadurch zu Laktat reduziert wurde. Die Abnahme an $NADH+H^+$, das sein Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt, wurde, wie eingangs erwähnt, absorptionsphotometrisch bestimmt und war dadurch ein indirektes Maß für den Pyruvatgehalt in der untersuchten Probe.

Die Gewinnung der Proben zur Pyruvatauswertung erfolgte wie unter 2.2.6.2. beschrieben. Pro Versuchsreihe wurden ebenfalls acht Messwerte in jeder Konzentration (6,25µM, 12,5µM, 25µM, 50µM,100µM) zuzüglich acht Kontrollwerte ohne Noxe bestimmt.
Zum Pyruvatassay wurden folgende Materialien verwendet:

- **Pyruvatstammlösung**:
  Als Referenzwert diente bei jedem durchgeführtenAssay eine Pyruvatstammlösung mit 11 mg / 100 ml Puffer. Pyruvat als Mononatriumsalz stammte von Serva. Das Pyruvatsalz wurde in einem Triethanolaminpuffer gelöst und als 100% (11 mg/100 ml Puffer) bzw. als 50% Stammlösung bei jeder Versuchsreihe in zweifacher Messung mitgeführt.

- **Triethanolaminpuffer**:
  Zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes von 7,6 diente ein Puffermedium, im konkreten Fall war dies eine fest definierte Menge eines gelösten Triethanolaminsalzes.

Der Puffer wurde wie folgt hergestellt:

- In einem Messzylinder erfolgte das Abwiegen von 14,91 g des Puffersalzes
- Zugabe von 100 ml destilliertem Wasser
- Titrieren mit Natronlauge (0,5 M) auf pH=7,6
- Zugabe von 0,47 g des Komplexbildners EDTA (Boehringer, 11280), gut durchmischen

Der Triethanolaminpuffer wurde bei +4 bis +7°C gelagert und war zwei Wochen haltbar.

- **$NADH+H^+$-Lösung**
  $NADH+H^+$ in kristalliner Form (Sigma, N8129) zu 10 mg portioniert und in 2 ml destilliertem Wasser gelöst (5 mg / ml).

- **Laktatdehydrogenase (LDH ; 45 U / ml)**
  Die Laktatdehydrogenase (SIGMA, L-2518) musste zur Anwendung im Pyruvatassay im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Im konkreten Fall erfolgte ein Durchmischen von 100 µl reiner LDH mit 900 µl Kaliumphosphatpuffer (pH=7,5; 10 mmol/l; 50% Glycerin; 142 mg Na_2HPO_4 und 27 mg KH_2PO_4 wurden in 100ml Glycerin 50 % gelöst und mit 0,5 M NaOH auf pH 7,5 titriert). Nach gutem Durchmischen entstand die gebrauchsfertige Enzymlösung.

Pro Assay wurden jeweils zwei Standards (100%), zwei Standards (50%) und zwei Blanks (ohne Pyruvatgehalt) mitgemessen.

- 20 µl $NADH+H^+$ in jede Photometerküvette, in beide Blankgefässe 20 µl Kaliumphosphatpuffer statt NADH+H
- 200 µl Probenmedium, in beide Blanks 200 µl Triethanolaminpuffer
- 600 µl Triethanolaminpuffer, Durchmischen des Inhalts

- nach 10 Minuten erste Messung bei 340 nm im Absorptionsphotometer (Beckmann DU 68) (E10 - Wert)
- Zugabe von 10 µl LDH (4,5 unit/ml) in der hergestellten Verdünnung 1:10 in jede Reaktionsküvette, nochmaliges Durchmischen des Inhalts
- nach 60 Minuten zweite Messung bei 340 nm (E 60-Wert)

Zur Errechnung der Pyruvatmenge in dem entsprechenden Well wurde zunächst die Differenz zwischen dem E 60-Wert und dem E-10 Wert gebildet (= D). Dieser Wert ergab in der Formel die Pyruvatkonzentration in µg / ml Probenmedium.
Im Falle des Pyruvatassays ergab dies:

$$c = \frac{0{,}83 \text{ ml} * 110 \text{ g / mol}}{6{,}3 \text{l / mmol} * \text{cm} * 1 \text{ cm} * 0{,}2 \text{ ml} * 1000} * D$$

Der erhaltene c-Wert musste analog dem Ergebnis der Laktatbestimmung auf die Proteinmenge pro Well bezogen werden, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu ermöglichen. Die Messung verlief linear im Konzentrationsbereich von 0,3 - 0,6 mmol/l.

2.2.6.4. Inhibin-Assay

Die Bestimmung des Inhibins stellte sich im Rahmen dieser Arbeit als das anspruchsvollste Verfahren hinsichtlich Material- und Zeitaufwand dar.

Die Bestimmung von Inhibin-B beruhte auf dem ELISA Prinzip (Siehe 2.2.6.4.1.). Hierbei befindet sich auf einer Festphase ein Antikörper, der selektiv im Probevolumen enthaltenes Inhibin-B, welches sich aus einer α-Kette und einer β-Kette zusammensetzt, bindet (Abb. 6 A). Ein weiterer zugesetzter Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt (Abb. 6 B), die einen zugesetzten Farbstoff in seiner Farbintensität verändert (Abb. 6 C). Die Aktivität der Phosphatase (Farbintensität) wird photometrisch bestimmt und ist proportional der im Probevolumen vorhandenen Inhibinkonzentration. Die Relevanz des B-Inhibins liegt in seiner herausragenden Bedeutung im Rahmen der männlichen hormonellen Keimzellreifungskontrolle (Illingworth et al.,1996) (siehe 1.2.).

Der erste Versuch Inhibin in einem Probevolumen quantitativ zu erfassen (Mc Lachlanet et al.,1986) basierte auf einem Radioimmunoassay, der allerdings im Vergleich zu dem heute verwendeten ELISA eine wesentlich unspezifischere Bestimmung der Hormonuntereinheiten zuließ (Betteridge et al.,1991), da er gegen die α-Untereinheit gerichtet war, und somit stets alle Formen des Inhibins detektierte. Um besagte B-Kette des Inhibins im Rahmen dieser Arbeit messen zu können, wurde ein hochsensitiver monophasischer ELISA (Serotec Limited, Oxford Artikel-Nr.MCA 1312 KZZ) verwendet.

2.2.6.4.1. Grundlagen

Folgendes Schema verdeutlicht die grundlegenden Schritte zur Bestimmung des Inhibins in der zu untersuchenden Probe.

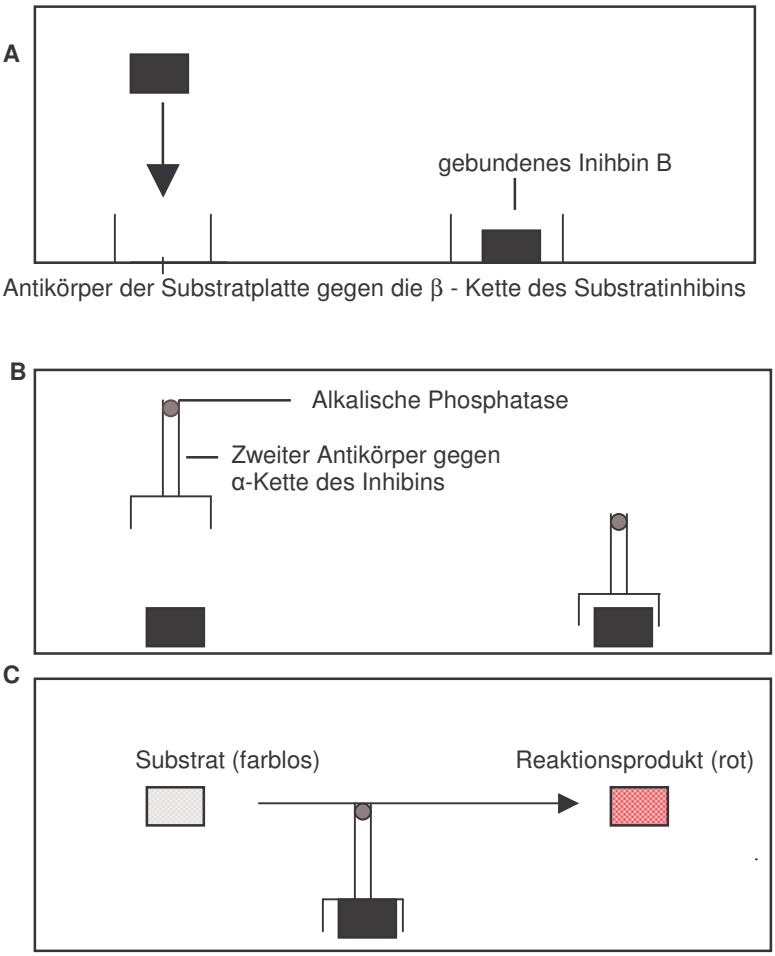


Abb 6: Funktionsprinzip des ELISA-Assays

A: Substratinhibin bindet mit einem Antikörper der Mikrotiterplatte, der gegen die β-Kette gerichtet ist

B: Ein zugefügter Antikörper, der gegen die α-Kette des Substratinhibins gerichtet ist und mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, geht in Verbindung mit dem Substratinhibin

C: Ein hinzugefügtes farbloses Substrat wird unter der enzymatischen Wirkung der alkalischen Phosphatase in ein rotes Reaktionsprodukt umgewandelt

2.2.6.4.2. Durchführung

Benötigte Reagenzien (Inhibin-B Dimer Assay Kit, Serotec Limited, Oxford):

- **Inhibin-B-Mikrotiterplatte (Artikel-Nr. MCA 1312K)**
  Beschichtet mit einem Antikörper, dessen freies Epitop gegen die β-Untereinheit des zu messenden Inhibins gerichtet war. Sie bestand aus 96 dieser beschichteten Reaktionsschälchen.

- **Fötales Kälberserum (Artikel-Nr. CO 1312)**
  Es diente zur Herstellung des Inhibinstandards und zur Aufbereitung der Messproben. 5 ml destilliertes Wasser wurden dem lyophilisierten Pulver hinzugegeben (1mg / ml) und für 10 min. vorsichtig durchmischt (10 %).

- **Inhibin-B-Standard (Artikel-Nr. HPS 1312)**
  Das Inhibin-B der Standardlösung wurde aus menschlichem Serum isoliert. Der Inhibin-B-Standard wurde in 1,3 ml (1mg/ml) des fötalen Kälberserums gelöst und für 30 min. unter zeitweiligem vorsichtigem Durchmischen stehen gelassen. Somit entstand eine Inhibinstandardlösung mit einer Konzentration von 2000 pg/ml.

Pro Mikrotiterplatte liefen sieben verschiedene Konzentrationen als Assaystandards mit, die wie folgt hergestellt wurden (jede Probe, sowohl Standard als auch Versuchsmessung ging als Doppelbestimmung mit anschließender Mittelwertsbildung in die Ergebnisdarstellung mit ein):

- In sieben Eppendorfröhrchen wurden jeweils 0,3 ml (1 mg/ml) des fötalen Kälberserums gefüllt
- Nach dem Hinzufügen 0,3 ml der Inhibinstandardlösung (HPS1312) in das erste Röhrchen wurde dieses kräftig durchmischt und anschließend 0,3 ml des Inhalts in das nächste Röhrchen übertragen.
  Durch diese Methodik erhielt man eine Standardreihe mit den Konzentrationen 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 und 15,6 pg/ml.

- **Waschpuffer (Artikel-Nr. WB 1312):**
  Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten dieses Assays war es notwendig, die Mikrotiterplatte gründlichst zu waschen, um unspezifisch gebundene Antikörper bzw. Inhibin vollständig zu entfernen. Zu diesem Zweck diente der Inhibinwaschpuffer, der als Konzentrat mitgeliefert wurde und vor Verwendung pro Volumeneinheit mit 24 Volumeneinheiten destilliertem Wasser verdünnt werden musste.

- **SDS-(Sodium-Dodecyl-Sulfat) Lösung 6% (Artikel-Nr. SDS 1312):**
  Sie diente im Verlauf des Versuches zur Steigerung der Aussagekraft des Assays, indem sie die Bindungsaffinität des in der Messprobe befindliche Inhibins verbesserte.

- **Inhibinassay-Diluentlösung (Artikel-Nr. BUF 1312):**
  Diese Lösung diente ebenfalls zur Affinitätserhöhung der Inhibinbindungsregion, indem es vor dem Aufbringen der Messprobe auf die Mikrotiterplatte dieser in einer definierten Menge zugefügt wurde (siehe unten).

- **Wasserstoffperoxydlösung (Merck, Darmstadt)**
  Die Wasserstoffperoxydlösung diente zur Verbesserung der Bindungseigenschaften des Inhibins der Messprobe durch Oxidation von Methioninresten in dem Epitop, das schließlich mit dem gebundenen Antikörper der Platte reagierte. Die 6%ige Wasserstoffperoxidlösung wurde jeweils frisch aus einer 30 % igen Stammlösung angesetzt (Verdünnung mit Aqua dest.)

- **Fab-Antikörper (Artikel-Nr. MCA 1312A)**

  Der Fab-Antikörper war gegen die freie α-Kette des Inhibins gerichtet und mit Alkalischer Phosphatase konjugiert. Die Antikörperlösung wurde mit 1 ml der Inhibinassay-Diluentlösung (BUF 1312) verdünnt und nach gründlichem Durchmischen mit weiteren 5 ml dieser Flüssigkeit zusammengebracht.

- **Assaysubstrat (Artikel-Nr. SB 011)**

  Das Substrat, das durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase eine Zunahme der Farbintensität erfuhr, die absorptionsphotometrisch bestimmt wurde, bestand ursprünglich aus zwei Komponenten. Das eigentliche Substrat (SB 011), das in lyophilisierter Form vorlag, musste mit einem Substratlösungsmittel (DS 011) gemischt werden, um ein gebrauchsfertiges Agenz zu erhalten.

- **Substratverstärkerlösung (Artikel-Nr. AMP 011)**

  Dieses Reagenz diente zur Verstärkung der Phosphataseaktivität und somit zur Möglichkeit, die Unterschiede in der Inhibinkonzentration der verschiedenen Proben sichtbar zu machen. Analog zur Substratvorbereitung existierte auch hier ein Verstärkerlösungsmittel (DA 011), das mit dem in Pulverform vorliegenden Verstärkeragenz zusammengebracht werden musste, um es im Ablauf des Assays verwenden zu können.

Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte in zeitlicher Abfolge aufgeführt, die für einen regelrechten Ablauf des Inhibinassays notwendig waren, entsprechend den Anweisungen in der Gebrauchsanleitung des Herstellers (Serotec).

Versuchsdurchführung:

- 100 µl Probe oder Standard wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben, in zwei weitere Gefäße jeweils 100 µl fötales Kälberserum als Blankprobe
- Zugabe von 50 µl SDS (6%)-Lösung zu jeder Probe, gutes Durchmischen
- Erhitzen auf 95°C für 5 min.
- Nach Abkühlung Hinzufügen von 100 µl Inhibinassay-Diluentlösung, Durchmischen des Gefäßinhaltes
- Zugabe von 50 µl Wasserstoffperoxid (6%) in jedes Probevolumen, gutes Durchmischen
- Die Eppendorfgefässe wurden für 30 min. bei Raumtemperatur stehengelassen
- Aufbringen von 80 µl jeder Probe in doppelter Ausführung auf die mitgelieferte Mikrotiterplatte inklusive Standardreihe und Blankproben
- Nach Abdecken der Assayplatte wurde diese bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Diese Inkubation bewirkte das Binden des Inhibins in den Probenvolumina an den wandständigen Antikörper der Mikrotiterplatte.

- Am nächsten Tag erfolgte ein gründliches Waschen der Assayplatte mit dem vorbereiteten Waschpuffer in vier Spülphasen
- 50 µl der fertigen Fab-Antikörperlösung in jedes Reaktionsschälchen
- Anschließend erfolgte ein nochmaliges Abdecken der Mikrotiterplatte und eine Inkubation bei Raumtemperatur für drei Stunden
- Nach diesem Zeitintervall wurden die einzelnen Reaktionsschälchen abermals mit dem Waschpuffer in acht Waschperioden behandelt und die Platte letztendlich für 15 min. mit aufgefülltem Waschpuffer stehen gelassen, bevor ein weiterer Waschvorgang in dreimaliger Wiederholung erfolgte. Es wurde somit sichergestellt, dass jeder ungebundene Antikörper entfernt ist und das Endergebnis nicht verfälschen kann, bevor das vorbereitete Assaysubstrat in einer Menge von 50 µl in jedes Reaktionsschälchen gegeben wurde.
- Eine Inkubation für die Dauer von einer Stunde bewirkte die Substratumwandlung durch die Aktivität der gebundenen alkalischen Phosphatase des zweiten Antikörpers
- Um diese Veränderung optisch messbar zu machen, wurde nach diesem Zeitraum 50 µl der Substratverstärkerlösung in jedes Schälchen der Mikrotiterplatte aufgebracht und die Absorption bei 490 nm gemessen, sobald der 1000 pg/ml-Standard einen Absorptionswert von 1,500 - 1,800 erreicht hatte.

Die Messung wurde mit Hilfe des MTP-Readers EAR 400 ATC (SLT Lab-Instruments) durchgeführt. Das Photometergerät rechnete den ermittelten Absorptionswert direkt in den Inhibingehalt (pg/ml) pro Versuchsprobe um. Um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Messergebnisse zu ermöglichen, mussten die Resultate der verschiedenen Bestimmungsmethoden auf die jeweilige Proteinmenge pro Zellkulturschale bezogen werden. Dies erfolgte mit Hilfe des im nächsten Abschnitt erläuterten Proteinassays.

2.2.6.5. Protein-Assay

Die Bestimmung der Proteinmenge pro Zellschale beruhte auf einer absorptionsphotometrischen Methode. Grundlage des Assays war die Komplexbildung des in der Probe vorhandenen Zellproteins mit zugefügten Kupferionen. Dieses Reaktionsprodukt verursachte eine chemische Reduktionskaskade in einem Substrat, das als letzter Arbeitsschritt hinzugegeben wurde und sich dadurch blau verfärbte. Die gemessenen Absorptionswerte bei 750 nm waren proportional der in der Versuchsprobe enthaltenen Zellproteinmenge (Methode nach Lowry, 1956).

Nachdem das Zellkulturmedium in entsprechender Menge zur Laktat-/Pyruvat- und Inhibinbestimmung aus jeder Zellschale nach Noxeninkubation entnommen war, erfolgte ein Trocknen der Kulturplatte (Schale mehrfach auf Filterpapier geklopft), bevor auf jeden Sertolizellrasen 200 µl eines sogenannten Lysispuffers (0,1 g SDS/100 ml Natronlauge 0,5 M) aufgebracht wurde.

Dieser Lysispuffer führte zur Lösung des auf dem Boden der Zellkulturplatte haftenden Proteins und ermöglichte daher nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden eine Weiterverarbeitung des nun in gelöster Form vorliegenden Sertolizellproteins. Zur nachfolgenden absorptionsphotometrischen Messung wurde eine Eichkurve benötigt, die aus vier verschiedenen Standardlösungen mit definiertem Proteingehalt (Albumine Bovine; Sigma; A-2153) in einer Konzentration von 1400µg/ml, 1000 µg/ml, 600 µg/ml und 200 µg/ml jedesmal neu erstellt wurde.

Der eigentliche Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt:

- Nach Inkubation mit dem Lysispuffer bei Zimmertemperatur wurden von jedem Standard / Probe 2 x 20 µl auf eine Mikrotiterplatte gegeben, mit der eine photometrische Messung im MTP-Reader möglich war
- Zugabe von 25 µl Reagenz A (Bio-Rad, Hercules, USA; 68532A) in jedes Well
- Zugabe von 200 µl Reagenz B (Bio-Rad; 69041A) in jedes Well
- nach einer Wartezeit von 15 min. erfolgte die Messung im MTP-Reader bei 750 nm

Die Ergebnisdarstellung erfolgte in µg Protein / ml Puffer.

Als letzter Arbeitsschritt blieb die Umrechnung der ermittelten Laktat-/Pyruvat- und Inhibinwerte auf die sezernierte Menge pro 100 µg Protein. Da durch die Methodik des Zelltransfers auf die Kulturplatte jede Zellschale unterschiedliche Proteinmengen aufwies und 200 µl Lysispuffer pro well verwendet wurden, diente eine mathematische Formel zur Vergleichbarkeit der erhaltenen Messergebnisse aus den absorptionsphotometrischen Assays:

1. Proteinmenge pro Well

$$P = \frac{20 * a}{100}$$

a = Proteinmenge (µg / ml) im maschinellen Ausdruck

P = Proteinmenge / Well

2. Substratmenge pro 100 µg Protein

$$S = \frac{100 * SW}{P}$$

SW = Substratmenge / Well

P = Proteinmenge / Well

Diese Umrechnung ermöglichte eine direkte Aussage über Veränderungen der gemessenen sekretorischen Parameter kultivierter Sertolizellen

durch Standardisierung der Versuchsergebnisse auf 100 µg Protein, unabhängig von der Absolutmenge an Laktat, Pyruvat oder Inhibin pro Well.

2.2.7. Statistische Auswertung

Die Messungen zur Laktat-, Pyruvat-, Inhibin-B- und MTT-Messung wurden mindestens dreimal wiederholt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar. Die dargestellten Ergebnisse entsprachen jeweils einem repräsentativen Experiment, durchgeführt an je zwei Kulturplatten mit insgesamt acht wells pro untersuchter Noxenkonzentration.

Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung mit Hilfe des zweiseitigen Student´s t-tests. Die Resultate wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Sonst wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Die Bestimmung der Statistik erfolgte mit dem Programm Instat 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Optimierungen

Die verwendeten Organochlorpestizide sind insgesamt durch eine ausgeprägte Lipophilie charakterisiert, daher war eine direkte Lösung im wässrigen Zellmedium nicht möglich. Bei Versuchen mit dieser Direktmethode fiel das jeweilige Insektizid bei einer Konzentration von über 15 µM aus dem Zellmedium aus. Um den zu testenden Konzentrationsbereich (6,25 -100 µM) zu erfassen, musste ein Lösevermittler verwendet werden. Das Problem lag darin, dass außer der gelösten Noxe auch der Lösevermittler ab einer bestimmten Konzentration einen eigentoxischen Effekt besaß. Es musste folglich eine Konzentration des Lösemittels gefunden werden, in der zwar eine komplette Lösung des Insektizids in Zellnährmedium erfolgen konnte, jedoch kein eigentoxischer Effekt des zugesetzten Lösevermittlers auftrat.
Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde in einem Volumenanteil von 0,05 - 5% (in Zellnährmedium) auf eine Beeinflussung der Zellvitalität getestet, nachdem eine komplette Lösung der Organochlorpestizide in dieser Substanz beobachtet wurde.
Abb. 7 zeigt, dass erst ab einer Konzentration von 1% DMSO die Zellvitalität negativ beeinflusst wurde. Die auffallende Beeinträchtigung der Zellvitalität bei einer Konzentration von 0,05% DMSO erklärt sich mit der Anordnung der Konzentrationsreihen auf der Zellkulturplatte. In jedem dargestellten Vitalitätsassay ist eine signifikante Reduktion der Überlebensrate in der linken senkrechten Zellkulturreihe zu beobachten, unabhängig von Art oder Konzentration der zugesetzten Noxe.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt darin, dass bei der Bestimmung der jeweiligen Proteinmenge pro Well in der linken senkrechten Zellkulturreihe aufbereitungsbedingt 20-30 µg weniger Zellprotein als in den restlichen Wells vorhanden war.
Bei Inkubation mit den untersuchten Organochlorpestiziden fand sich ebenfalls diese auffällige Erniedrigung der Zellüberlebensfähigkeit aufgrund der Anordnung der Konzentrationsreihen auf der Kulturplatte. Es kann nicht von einem eigentoxischen Effekt der verwendeten Noxen sowie des Lösemittels DMSO (0,05%) ausgegangen werden, vielmehr beweisen diese Ergebnisse indirekt eine verminderte Zellproteinmenge pro Well im Vergleich zur Kontrollgruppe im Zentrum der Zellkulturplatte.

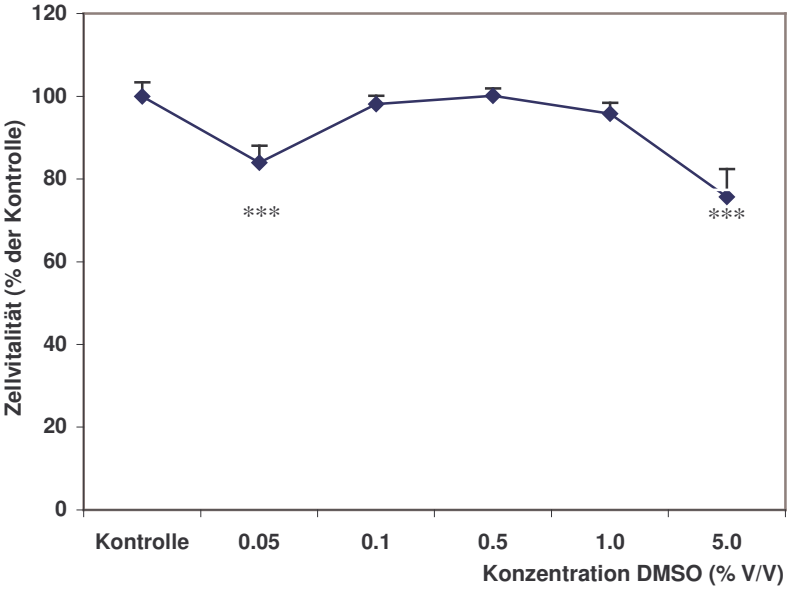


Abb. 7: Sertolizellvitalität bestimmt mit dem MTT-Assay nach 24h-Inkubation mit DMSO 0,05 - 5% in Medium. Mittelwerte von acht Messwerten in Doppelbestimmung pro Gruppe ±SD (n=8).(***) zeigt hohe Signifikanz ($p<0,0002$) in Bezug auf die Kontrollgruppe, (*) zeigt $p<0,01$.

Zur Suspension der Organochlorpestizide fand ein Nährmedium mit einer Endkonzentration von 0,1 % DMSO Verwendung. Dieser Volumenanteil führte zur Lösung der verwendeten Noxen ohne eine eigentoxische Wirkung zu entfalten. Die Löslichkeit von Lindan, DDT und DDE in Alkohol war möglich, allerdings in solch hohen Ethanolkonzentrationen, dass ein eigentoxischer Effekt auf kultivierte Sertolizellen im MTT-Assay nachgewiesen werden konnte. Erst ein Nährmedium mit einem Volumenanteil von 75% Ethanol führte zur Lösung der jeweiligen Noxe, induzierte aber eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, die signifikant war. Bei der Verwendung von Ethanol in dieser Konzentration hätte ein möglicher toxischer Effekt der Organochlorpestizide durch diesen Ethanoleffekt verfälscht werden können und eine sichere Aussage über konzentrationsabhängige Vitalitätsbeeinträchtigungen wäre unmöglich gewesen.
Abb. 8 zeigt die Messergebnisse im Vitalitätsassay einer Kontrollgruppe ohne Ethanol im Vergleich zu Nährmedium mit einem Volumenanteil Ethanol von 75%.

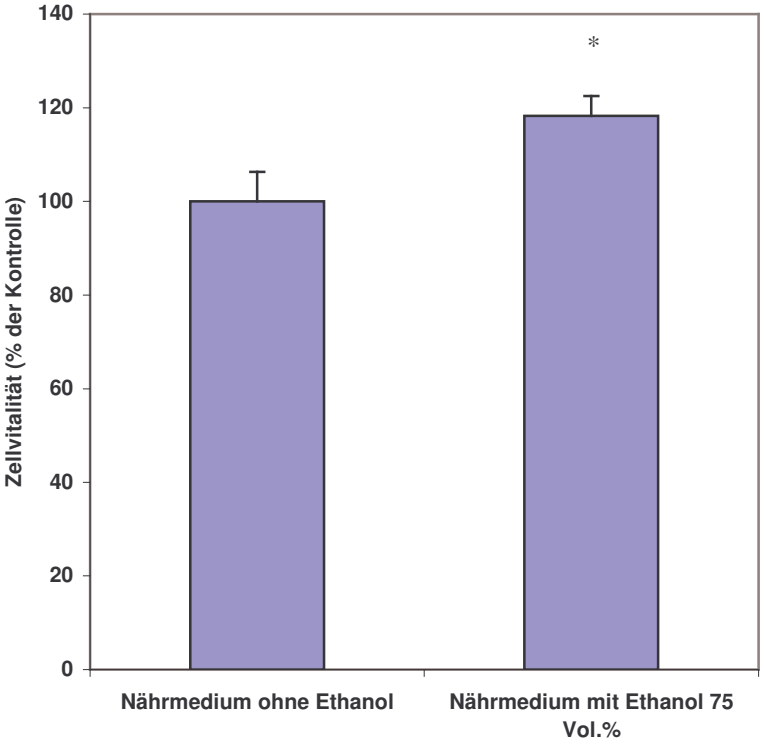


Abb. 8 : Zellvitalität bestimmt mit dem MTT-Assay nach 24h-Inkubation Nährmedium mit Ethanol 75 Vol.% im Vergleich zu Nährmedium ohne Ethanol. Mittelwerte von acht Messwerten in Doppelbestimmung pro Gruppe ±SD (n=8). (*) zeigt Signifikanz ($p < 0,01$) in Bezug auf die Kontrolgruppe.

3. 2. Zellvitalität nach Inkubation mit verschiedenen Noxen

Es folgt eine Übersicht der Messergebnisse der Vitalitätsprüfung nach 24-stündiger Exposition gegenüber den untersuchten Noxen.
Stellvertretend für alle erhaltenen Ergebnisse wurden jeweils acht Messresultate einer Versuchsreihe zur graphischen Darstellung verwendet. Insgesamt zeigten alle durchgeführten Messreihen (jeweils 4 Messreihen pro Noxe) tendenziell die in Abb. 9 dargestellten Verläufe.
Zur Errechnung der Signifikanz wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung der Student`s t-Test sowie in anderen Fällen der Mann-Whitney-Test verwendet. Im getesteten Konzentrationsbereich von 6,25 -100 µM lag lediglich für DDT ab einer Konzentration von 50 µM eine geringe Beeinträchtigung der Zellvitalität vor. Im Gegensatz hierzu fand sich sowohl bei Lindan als auch bei DDE eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um bis zu 10% erhöhte Vitalitätsrate, eine Tatsache, die in der Ergebnisdiskussion noch ausführlich dargestellt wird. Eine direkte (akut-) toxische Reaktion dieser beiden Insektizide hinsichtlich Reduktion der Zellvitalität konnte im gesamten Konzentrationsbereich nicht nachgewiesen werden.
Eine Besonderheit stellt die Signifikanz der Kurvenverläufe bei 6,25 µM dar, die, wie eingangs schon besprochen, eine Vitalitätsbeeinträchtigung vortäuscht. Um dies zu überprüfen, wurden entsprechende Experimente, bei denen die Probenreihen für 6,25 µM und 100 µM jeweils außen und innen lagen, durchgeführt. Hier zeigte sich für beide Konzentrationen (6,25 µM und 100 µM) in äußeren Bereich der Zellkulturplatte eine signifikante Reduktion der Zellvitalität, die bei 6,25 µM

deutlich ausgeprägter war. Im inneren Bereich lag bei der niedrigeren Konzentration keine Vitalitätsbeeinträchtigung vor, bei 100 µM war eine noxenbedingte Affektion der Sertolizellen zu erkennen (Abb. 10). Die Bestimmung der Inhibinproduktion zeigte ebenfalls einen signifikanten Abfall bei 6,25 µM (Abb. 13).

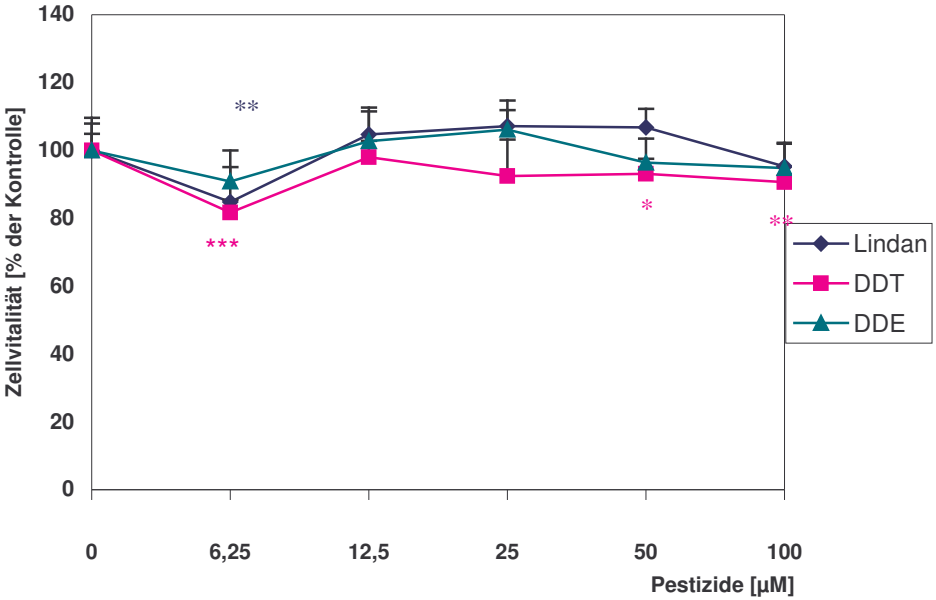


Abb. 9 : Sertolizellen in vitro wurden 24 Stunden mit den Pestiziden inkubiert. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase diente als Indikator zur Bestimmung der Zellvitalität mit Hilfe des MTT-Assays. Darstellung der Mittelwerte ± SD für Doppelbestimmung von acht einzelnen Zellschalen (n=8). (***) zeigt Signifikanz ($p < 0{,}001$) in Bezug auf die Kontrollgruppe, (**) zeigt $p < 0{,}01$, (*) zeigt $p < 0{,}05$.

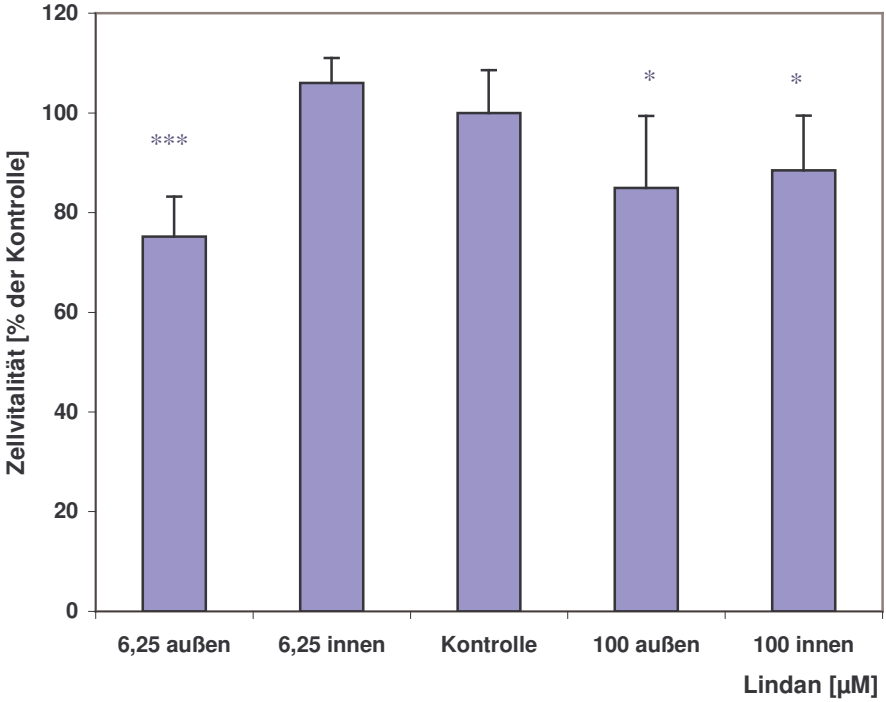


Abb.10 : Sertolizellen in vitro wurden 24 Stunden mit Lindan inkubiert. Ein Vergleich der Zellvitalität von zwei verschiedenen Konzentrationen 6,25/100µM in Referenz zu einer Kontrollgruppe. Darstellung der Mittelwerte ±SD in Doppelbestimmung von acht einzelnen Zellschalen mit peripherer sowie zentraler Lage auf der Zellkulturplatte (n=8). (***) zeigt Signifikanz ($p<0,0001$) in Bezug auf die Kontrollgruppe, (*) zeigt $p<0,05$.

3. 3. Laktatproduktion

Die Laktatbestimmung aus dem Zellnährmedium erfolgte nach Inkubation der Sertolizellen mit der jeweiligen Noxe für einen Zeitraum von 24 Stunden.
Die Ergebnisse sind konzentrationsabhängig in Abb. 11 dargestellt. Die Inkubation der Sertolizellen mit Lindan über einen definierten Zeitraum zeigte einen signifikanten Anstieg der Laktatmenge ab einer Konzentration von 50 µM. Im Gegensatz hierzu stellte sich mit zunehmender Noxenkonzentration sowohl bei DDT als auch bei DDE ein Abfall der Laktatmenge dar. Dieser war bei DDT ab einer Noxenkonzentration von 25 µM signifikant, bei DDE ab 50 µM.

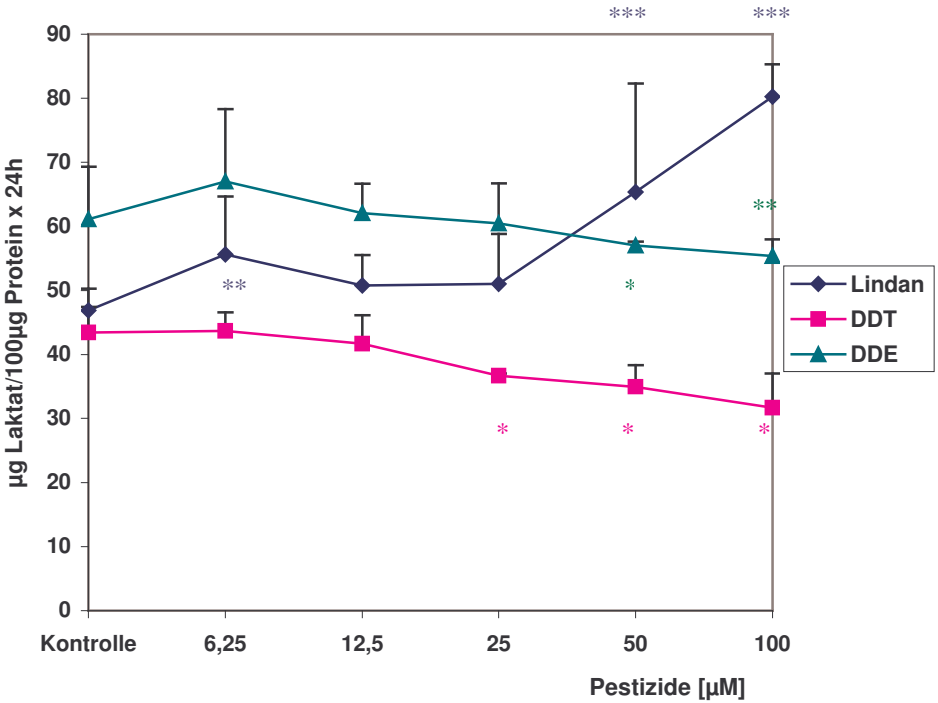


Abb.11 : Laktatproduktion der kultivierten Sertolizellen in vitro nach Inkubation mit den Pestiziden für 24 Stunden. Darstellung der Mittelwerte ± SD für Doppelbestimmung von acht einzelnen Zellschalen (n=8). (***) zeigt Signifikanz ($p<0,001$) in Bezug auf die Kontrollgruppe, (**) zeigt $p<0,005$, (*) zeigt $p<0,05$.

3. 4. Pyruvatproduktion

Pyruvat wurde als weiteres Endprodukt der anaeroben Glykolyse nach Noxenexposition quantitativ bestimmt (Abb 12). Bei der Betrachtung der gemessenen Pyruvatmengen nach Noxeninkubation fällt ein tendenziell vergleichbarer Kurvenverlauf zur Laktatproduktion auf (Abb.11). Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Pyruvatmenge unter DDE- und DDT-Exposition ab einer Konzentration von 50 µM. Die Pyruvatproduktion unter Lindanexposition blieb unter dem gesamten Konzentrationsbereich ohne Signifikanz.

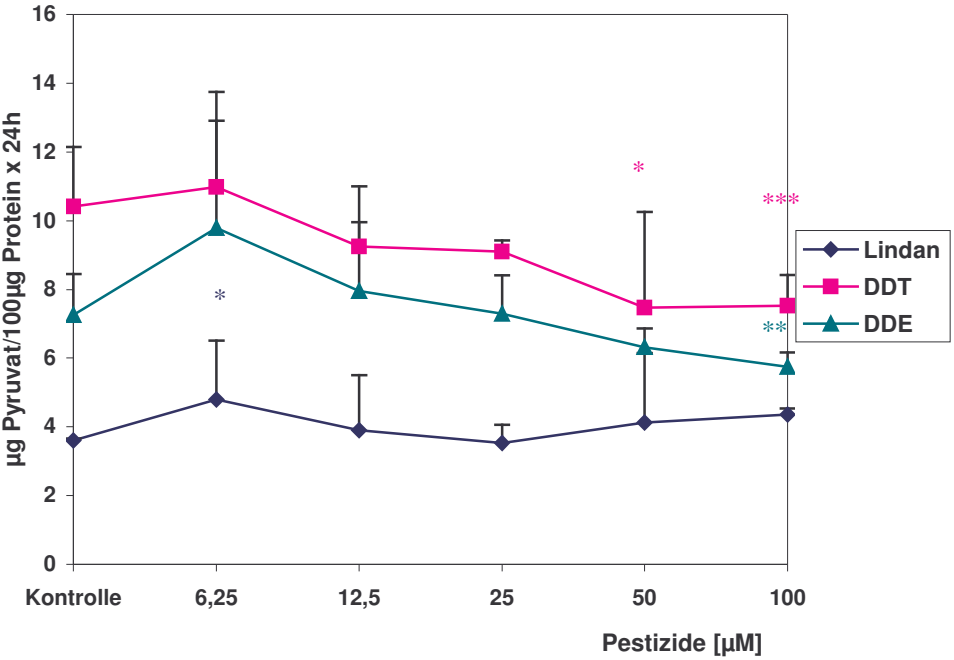


Abb.12 : Pyruvatproduktion der kultivierten Sertolizellen in vitro nach Inkubation mit den Pestiziden für 24 Stunden. Darstellung der Mittelwerte ±SD für Doppelbestimmung von acht einzelnen Zellschalen (n=8). (***) zeigt Signifikanz ($p<0,001$) in Bezug auf die Kontrollgruppe, (**) zeigt $p<0,01$, (*) zeigt $p<0,05$.

3. 5. Inhibinproduktion

Mit der Bestimmung von Inhibin wurde ein weiterer sekretorischer Parameter herangezogen, um eine mögliche Beeinträchtigung von Sertolizellen unter Exposition gegenüber Organochlorpestiziden zu beschreiben.

Die Gewichte der Ratten bewegten sich zwischen 27 - 38 g entsprechend einem Alter von 18-21 Tagen, die zugehörigen Inhibinmengen zwischen 150 - 800 pg/100 µg Protein x 24h. Bei den in Abb.14 dargestellten Messergebnissen wurden Versuche aus unterschiedlichen Zellpräparationen zusammengefasst. Die produzierten Inhibinmengen zeigten jedoch unabhängig von der Absolutmenge einen vergleichbaren Verlauf über die verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Insektizids hinweg.

Zur graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse werden im Folgenden Messresultate von vergleichbarer Zahlengröße herangezogen (s. Abb. 14). Zum Erhalt dieser Werte dienten Versuchstiere mit annährend gleichem Körpergewicht von ca. 38 g. Vor Demonstration dieser Resultate erfolgt eine Darstellung der zeitabhängigen Inhibinproduktion kultivierter Sertolizellen nach FSH-Stimulation. Das Körpergewicht dieser Versuchstiere lag unter 38 g, lieferte eine sechsfach höhere Inhibinmenge als die Ergebnisse aus Abb. 14. Die zeitabhängige Akkumulation von Inhibin im Zellüberstand ist aber unabhängig von den dargestellten Absolutwerten. Abb.13 zeigt die zeitabhängige Akkumulation von Inhibin im Zellkulturmedium. Eine statistisch aussagekräftige Beeinflussung der Inhibinproduktion nach Insektizidwirkung ist somit frühestens nach einer Kultivierungsdauer von 4 Stunden möglich. Hier liegt die produzierte Inhibinmenge bei durchschnittlich 50 pg/ 100 µg Protein, nach 24 Std. bei 900 pg/ 100 µg Protein.

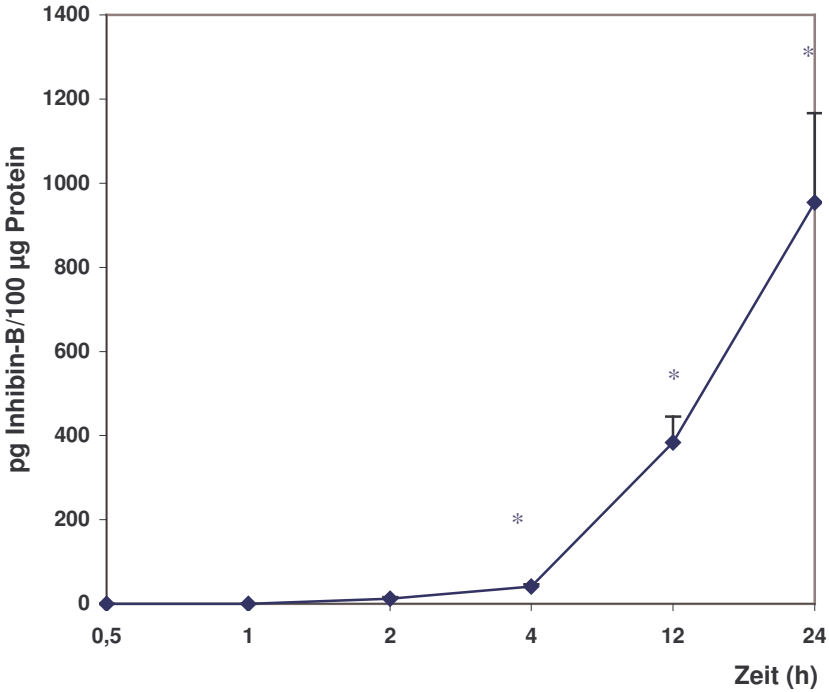


Abb.13 : Inhibinproduktion der kultivierten Sertolizellen in vitro nach 0,5-24h mit FSH-Stimulation 100 ng/ml. Darstellung der Mittelwerte ± SD für Doppelbestimmung von vier einzelnen Zellschalen (n=4). (*) zeigt Signifikanz ($p<0,02$) in Bezug auf die Kontrollgruppe.

Nach Inkubation mit DDE zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Inhibinproduktion mit statistischer Signifikanz ab einer Konzentration von 25 µM. DDT wies eine signifikante Reduktion der Hormonproduktion bei 100 µM dieses Insektizids auf. Eine Inkubation der Sertolizellen mit Lindan hatte eine signifikante Reduktion der Inhibinsekretion ab einer Konzentration von 25 µM zur Folge.

Bei Betrachtung der Kontrollwerte fällt die große Streubreite der Inhibinwerte auf, da im Alter zwischen 10 - 20 Tagen eine Steigerung der Inhibinproduktion um nahezu das Fünffache erfolgt (Alter der Versuchstierratten 18-21 Tagen).

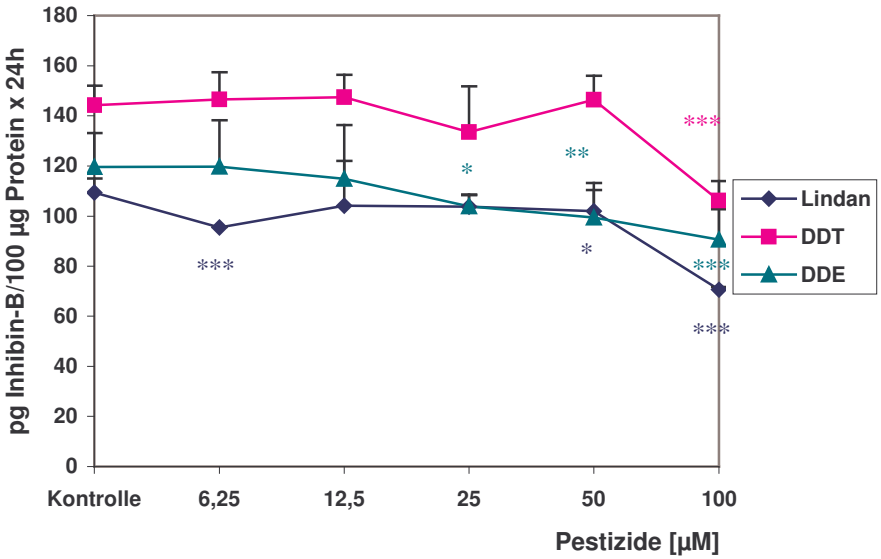


Abb. 14 : Inhibinproduktion der kultivierten Sertolizellen in vitro nach Inkubation mit den Pestiziden für 24 Stunden. Darstellung der Mittelwerte ± SD für Doppelbestimmung von acht einzelnen Zellschalen (n=8). (***) zeigt Signifikanz ($p<0,001$) in Bezug auf die Kontrollgruppe, (**) zeigt $p<0,01$, (*) zeigt $p<0,1$.

4. Diskussion

Organochlorpestizide, darunter auch Lindan, DDT und sein Hauptmetabolit DDE stehen unter dem Verdacht, die männliche Fertilität zu beeinträchtigen (Eaton et al.,1986; Wagner et al.,1990; Strohmer et al.,1993). Man fand Rückstände dieser Insektizide in Seminalplasma des Mannes sowie ein signifikantes Auftreten von Oligospermien bei chronischer Exposition (Whorton et al.,1984). Lindan verursachte eine signifikante Reduktion funktionsfähiger Spermatozoen und strukturelle Schädigungen benachbarter Sertolizellen der Ratte nach oraler Inokulation (5 mg/kg KG) sowie nach Exposition in utero bei Jungkaninchen (1 mg/kg KG) (Dalsenter et al.,1996; Fausto et al.,2001).
Hauptsächlich DDE als Abbauprodukt von DDT besitzt eine hormonelle Wirkkomponente im Sinne antiandrogener Eigenschaften durch strukturelle Ähnlichkeit mit körpereigenen Hormonabbauprodukten (Kelce et al.,1995; Sohoni et al.,1998) sowie eine nachgewiesene Induktion östrogensynthetisierender Aromatasen (You et al.,2001). Es zeigten sich Fälle von hypotropher Genitalausbildung sowie Kryptorchismus (nicht deszendierter Hoden) nach Exposition gegenüber DDT in utero (Hodgson et al.,1996). Lindan scheint ebenfalls mit körpereigenen Androgenen zu konkurrieren bzw. diese in ihrer Synthese zu hemmen (Ronco et al.,2001). Nach oraler Verabreichung (5 mg/kg KG) imponierten Gewichtsreduzierungen von Prostata, Hoden und Nebenhoden der Ratte im Sinne antiandrogener Eigenschaften der Noxe (Sujatha et al.,2001). Das genannte Auftreten von Oligozoospermien nach Noxenexposition könnte mitunter durch diesen antiandrogenen Effekt der Organochlorpestizide bedingt sein.

Weiterhin konnte nach Exposition von Lindan in einer Konzentration von 50 µM an kultivierte Leydigzellen eine signifikante Reduktion der Steroidsynthese (81%) nachgewiesen werden ohne akute Beeinträchtigung der Zellvitalität. Es kam allerdings selektiv zu einer Verminderung der Synthese von Trägerproteinen, die Cholesterol als Ausgangsstoff der Steroidsynthese aus dem Extrazellularmedium zu den Mitochondrien transportieren (Walsh et al.,2000). Unter diesem Aspekt zeigt sich bereits die Komplexität bei der Klärung der Frage, inwieweit eine Fertilitätsbeeinträchtigung durch Organochlorpestizide möglich ist. Neben der in dieser Arbeit untersuchten möglichen Schädigung der Sertolizelle gibt es weitere Wirkmechanismen. Hierbei kann die Noxe entweder durch eine strukturelle Ähnlichkeit direkt hormonelle Wirkungen entfalten (DDE) (Kelce et al.,1995; Sohoni et al.,1998) oder die Hormon-/Proteinsynthese selbst stören (Lindan) (Walsh et al., 2000; Sujatha et al.,2001).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, eine Aussage darüber zu machen, inwieweit eine Beeinträchtigung der Sertolizelle durch Lindan, DDT oder DDE erfolgen kann. Durch eine mögliche Veränderung sekretorischer Zellparameter sowie einer potentiellen Manipulation der Zellvitalität nach Exposition mit den Insektiziden wurde versucht, mögliche Rückschlüsse auf die Beeinträchtigung der männlichen Fertilität zu ziehen. Die Folgen einer Inkubation mit diesen Insektiziden auf die Zellvitalität stellten hierbei ein wichtiges Kriterium dar. Eine Lösung der Insektizide gelang zunächst nur in einer 75%-igen Ethanollösung, einer Konzentration, die zur Zellfixierung verwendet wird und daher eine signifikante Reduktion der Zellvitalität zur Folge hatte. Zur Versuchsdurchführung fand ein Zellmedium mit 0,1 % DMSO Verwendung, in dem eine komplette Lösung der Noxen möglich war.

Bei Betrachtung der Zellvitalitätsergebnisse aus dem MTT-Assay fällt der signifikante Abfall der Vitalitätswerte bei 6,25 µM Noxe auf. Eine denkbare Fehlerquelle wäre in der Übertragung der Zellen auf die Kulturplatte zu diskutieren. Hierbei wurden zu Beginn des Zelltransfers in den ersten vier Pellets der Platte relativ zu wenig Sertolizellen übertragen, was sich in den Einzelmesswerten des Proteinassays bestätigen lässt. Bei Errechnung der Inhibin- sowie Laktat / Pyruvatmenge fiel diese Tatsache nicht sonderlich ins Gewicht, da keine Absolutwerte bestimmt, sondern immer die gemessene Absolutmenge auf 100 µg Protein bezogen wurden.

Die Vitalitätsbestimmung basierte allerdings auf einem direkten Vergleich Konzentrationsgruppe versus Kontrollgruppe. Hierbei fiel eine deutlich geringere Zellmenge pro Well in der ersten Zellreihe der Platte deutlich ins Gewicht, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte prozentuale Zellvitalität war die Konsequenz.

Im getesteten Konzentrationsbereich von 6,25 -100 µM zeigte sich mit Hilfe des MTT-Assays keine Akuttoxizität. Lindan ist seit der Arbeit von Dalsenter et al. (1996) bekannt als schädigende Substanz bezüglich der Zellorganellen exponierter Sertolizellen. Nach Verabreichung von 5 mg Lindan/kg KG des Versuchstieres (Ratte) über fünf Tage bzw. 30 mg/kg KG als Einzeldosis beobachtete man zwar keine Akuttoxizität, jedoch elektronenmikroskopische Fragmentation und komplette Zerstörung der Zellorganellen, inklusive mitochondrialer Strukturen. Weiterhin wurde eine Ballonierung der Sertolizellen beschrieben. Diese erklärt sich durch eine Permeabilitätsstörung der Zellmembran, die bereits seit längerer Zeit als Folge einer Exposition gegenüber Lindan bekannt ist (Schüttmann,1964). Diese Beobachtungen sprechen zusammen mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit für eine mögliche Schädigung auf Zellorganellenebene ohne akuten Zelltod.

Bei Umrechnung der verabreichten Lindandosen in Molare Masse (g/mol) zeigt sich, dass bereits 20,6 µmol Lindan/kg KG (= 5 mg / kg KG) nach oraler Verabreichung über einen Zeitraum von fünf Tagen zu erheblichen Strukturschädigungen der Sertolizellen führen (Dalsenter et al.,1996). Dies entspricht in dieser Arbeit dem Konzentrationsbereich in vitro, bei dem nach 24-stündiger Inkubation eine tendenziell erhöhte Vitalität im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte. Der MTT-Assay zeigt über den gesamten Konzentrationsbereich keine direkte Schädigung der Sertolizelle, allerdings ab 12,5 µM eine nicht signifikante Induktion mitochondrialer Dehydrogenasen, die für die enzymatische Umwandlung des Tetrazoliums verantwortlich sind.

Lindan ist durch Hemmung der Aktivität von Superoxiddismutase sowie Katalase bereits bekannt als Noxe mit hoher Affinität zu zellulären Enzymen (Samanta et al.,1999). Beide Proteine fungieren als Radikalfänger und gewährleisten somit einen physiologischen Zellstoffwechsel, indem sie mögliche Störfaktoren (freie Radikale) eliminieren. Sowohl diese beeinträchtigte zelluläre Schutzfunktion als auch die hohe Affinität von Lindan zu mitochondrialen Enzymen (inkl. Dehydrogenasen) könnte durch einen additiven Effekt längerfristig zu einer Störung des Sertolizellstoffwechsels in vivo führen. Ferner ist eine direkte Schädigung der Spermatozoen durch freie Radikale in Betracht zu ziehen. Es ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies die Spermienmotilität durch Blockade der zellulären ATP-Bildung beeinträchtigen (Mankovska & Serebrovska,1998) sowie eine Oligozoospermie hervorrufen können (Griveau et al.,1998).

Die enzymstimulierende Eigenschaft von Lindan ist außerhalb des Hodens auch für das Enzym Cytochrom P450 der Leber belegt. Hierbei bewirkte die orale Inokulation von 2,5 mg Lindan/kg KG der Ratte eine signifikante Erhöhung dieser Enzymaktivität mit vermehrter Radikalbildung. Nach Inokulation von 5 mg Lindan / kg KG bei der Ratte ist ein deutlicher Anstieg von Radikalbildnern im Nebenhoden bereits beschrieben (Chitra et al.,2001).

In einem Konzentrationsbereich von 50 µM zeigte sich bei Sertolizellen in vitro eine Manipulation der Zellmembranproteine (gap-junctions), die zur Verbindung der Sertolizellen untereinander sowie mit den benachbarten Keimzellen dienen (Defamie et al.,2001). Eine erhöhte Zellpermeabilität könnte hiermit einhergehen. Unabhängig von einer möglichen Induktion mitochondrialer Dehydrogenasen könnten die aufgeführten Mechanismen ebenfalls wirksam werden und im MTT-Assay die aufgezeigte zelluläre Stressreaktion mitbedingen, bevor eine eigentliche Dekompensation des Sertolizellstoffwechsels zu erkennen ist.

Obwohl ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen von Dalsenter et al. (1996) aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht möglich ist, scheint doch der Zeitfaktor eine wichtige Rolle bei dem Einfluss von Lindan auf Sertolizellen zu spielen. Je länger die Inkubationsdauer, desto schwerwiegender sind die Folgen, ausgehend von einer reversiblen Stressreaktion in vitro nach 24-stündiger Exposition bis hin zu irreversiblen Schädigungen verschiedener Zellstrukturen nach fünftägiger Inkubation in vivo (Dalsenter et al.,1996). Der Einfluss von DDT sowie seinem Hauptmetaboliten DDE auf die Zellvitalität ist tendenziell nicht vergleichbar.

Nach in vitro Inkubation über 24 Std. war bei DDE eine mit Lindan vergleichbare, nicht signifikante Aktivierung mitochondrialer Dehydrogenasen, bei DDT dagegen eine signifikante Reduktion der Aktivität dieses Enzyms ab einer Konzentration von 50 µM zu erkennen. Eine Ballonierung der Zellen konnte hierbei lichtmikroskopisch nicht nachgewiesen werden.

Nach einmaliger intramuskulärer Injektion von 3 mg DDE/kg KG konnte bei der Nebennierenrinde der Ratte elektronenmikroskopisch eine Degeneration zentraler mitochondrialer Cristae nachgewiesen werden (Jonsson et al.,1991). Applikation von 25 mg DDE i.m. führte nach 24-stündiger Inkubation zum zellulären Tod. Nach Umrechnung auf die verwendete Maßeinheit dieser Arbeit führten 9,4 µmol DDE/kg KG zum selektiven Verfall mitochondrialer Strukturen, bereits 78 µmol DDE/kg KG zum Zelltod in der Nebennierenrinde der Ratte.

Es scheint eine hohe Affinität aller drei Organochlorpestiziden zu mitochondrialen Strukturen exponierter Zellen zu existieren, die bei Untersuchungen in vivo bei gleicher Inkubationszeit erheblich größere Auswirkungen besitzen als dies bei kultivierten Zellen in vitro nachzuweisen ist. Eine Schädigung mitochondrialer Strukturen exponierter Sertolizellen könnte in vivo schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen erfolgen als die dargestellten Ergebnisse dieser in vitro-Arbeit es vermuten ließen. Eine Manipulation von Mitochondrien der Sertolizellen hat direkten Einfluss auf die Energiegewinnung, denn ein oxidativer Stoffwechsel wäre bei derart beeinträchtigten Zellorganellen nicht möglich, es kommt zur Akkumulation von Stoffwechselprodukten der anaeroben Glykolyse (Laktat / Pyruvat).

Die Bestimmung von Laktat und Pyruvat im Zellmedium nach Noxenexposition hatte mehrere Gründe. Einerseits stellt Laktat eine wichtige Energiequelle für benachbarte Spermatozyten dar, sowohl Sauerstoffverbrauch als auch Proteinstoffwechsel kultivierter Spermatozoen konnte nach Zugabe von Laktat signifikant gesteigert werden (Nicolet et al.,1981). Andererseits erwiesen sich Laktat und Pyruvat als wichtiger Marker einer Manipulation der Sertolizelle in vitro nach Zugabe verschiedener Noxen wie 1,3-Dinitrobenzon (Williams & Foster, 1988) und Mono-(2-ethylhexyl)-phtalat (MEHP) (Chapin et al.,1988). Lindan führte in dieser Arbeit zu einem signifikanten Anstieg der sezernierten Laktatmenge in das Zellmedium ab einer Konzentration von 50 µM. Es ist bekannt, dass ca. 90% der aufgenommenen Glukose in der Sertolizelle über die anaerobe Glykolyse zu Laktat abgebaut wird (Robinson et al.,1981), welches dann als Energielieferant für benachbarte Spermatozoen zur Verfügung steht. Ein Anstieg der Laktatmenge im Zellmedium nach Lindanexposition könnte verschiedene Ursachen besitzen. Denkbar wäre eine Induktion der Aktivität von Glykolyseenzymen durch Lindan. Hinsichtlich der bereits dargestellten Affinität dieser Noxe zu mitochondrialen Enzymen (Samanta et al.,1999) erscheint es jedoch wahrscheinlicher, die Akkumulation von Laktat durch eine Blockierung des Zitronensäurezyklus zu erklären, der eine intakte Mitochondrienfunktion voraussetzt. Ein bekannter Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung ist Gossypol, das ebenfalls zu einer gesteigerten Laktatmenge in vitro führte (Reyes et al.,1986), ebenso das bereits erwähnte MEHP (Chapin et al.,1988).

Es existieren folglich mehrere Substanzen, die die Möglichkeit einer Entkopplung des oxidativen Stoffwechsels der Sertolizelle unterstreichen. Lindan scheint aufgrund vorliegender Ergebnisse eine weitere Noxe dieser Stoffgruppe zu sein.

Sowohl DDT als auch sein Hauptabbauprodukt DDE führten zu einer signifikanten Reduktion der sezernierten Laktatmenge ab einer Noxenkonzentration von 50 µM. Über die Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels hinaus scheinen diese beiden Noxen auch die anaerobe Energiegewinnung zu erniedrigen. Ein vermindertes Angebot an Laktat könnte in vivo zu einer insuffizienten Energiebereitstellung benachbarter Spermatozooen führen, da Laktat eine der wichtigsten Energiequellen für heranreifende Keimzellen jenseits der Blut-Hoden-Schranke ist (Nicolet et al.,1981; Robinson et al.,1981).

Letztendlich könnte die allgemeine Manipulation des Sertolizellstoffwechsels durch DDT/DDE eine Verringerung der ATP-Produktion (Adenosintriphosphat) als wichtigsten Energieträger einer Zelle zur Folge haben. ATP entsteht während des gesamten Substratabbaus von der anaeroben Glykolyse über den Zitronensäurezyklus bis hin zur mitochondrialen Endoxidation (Voet & Voet,1992). Das Phänomen einer erniedrigten ATP-Produktion wurde bereits nach Inkubation kultivierter Sertolizellen mit MEHP (Mono-(2-ethylhexyl)-phtalat) beschrieben (Chapin et al.,1988). Auch hier fand sich eine signifikant erniedrigte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Ein verringertes Angebot an ATP könnte neben einer verminderten Bereitstellung von Laktat zusätzlich zu einer Schädigung der Spermatogenese beitragen.

Jede Produktion von zelleigenen Hormonen wie z.B. Inhibin oder sogenannte androgenregulierte Proteine, die wahrscheinlich z.T. in der Sertolizelle synthetisiert werden (Sharpe et al.,1992), benötigt ATP. Durch eine Manipulation des Sertolizellstoffwechsels ist folglich eine Störung der hormonellen Spermatogenesesteuerung ebenfalls wahrscheinlich. Die Bedeutung von Pyruvat als Energiesubstrat für heranreifende Spermatozooen ist ebenfalls hinlänglich beschrieben. Man fand einen zehnfach gesteigerten Proteinstoffwechsel in Spermatiden nach Zugabe von Pyruvat oder Laktat (Nakamura et al.,1981).
Im Gegensatz zu anderen Noxen, die auf ihre reproduktionstoxikologischen Eigenschaften bezüglich der Sertolizelle untersucht worden sind, fand sich bei allen hier getesteten Organochlorpestiziden eine Pyruvatproduktion, die konzentrationsabhängig mit den Laktatmengen im Zellmedium tendenziell vergleichbar war. Eine Arbeit, die das bereits erwähnte MEHP untersuchte, fand steigende Laktatmengen bei fallender Pyruvatproduktion bis zu einer Konzentration von 0,3 mmol MEHP/l (Chapin et al.,1988). Solche gegenläufige Ergebnisverläufe sind in ihrer Interpretation sehr komplex, für die Ätiologie dieser Phänomene müssen viele biochemischen Aspekte in Betracht gezogen werden, um alle möglichen Schädigungsmechanismen zu berücksichtigen. Die hier beobachtete gesteigerte Pyruvatproduktion nach Inkubation mit Lindan stellte sich zwar als statistisch nicht signifikant dar, unterstreicht allerdings eine mögliche Entkopplung der Glykolyse vom oxidativen Stoffwechsel. Pyruvat als weiteres Endprodukt der anaeroben Glykolyse wird von der Sertolizelle in wesentlich geringeren Mengen produziert als Laktat, weil das Gleichgewicht, wie in dieser Arbeit bereits erwähnt, weit auf der Seite des Laktats liegt.

Die gesteigerte Sekretion von Pyruvat, auch wenn statistisch nicht signifikant, gibt einen weiteren Hinweis dafür, dass eine mitochondriale Dysfunktion als Ursache hierfür verantwortlich sein könnte. Mit einer Manipulation des Mitochondriums kommt es zu einer Anhäufung von Laktat/Pyruvat als Edukte des oxidativen Stoffwechsels. Im Konzentrationsbereich von 12,5-50 µM Lindan konnte eine Induktion mitochondrialer Dehydrogenasen im Sinne einer zellulären Stressreaktion beobachtet werden. Ab 50 µM erfolgte die Akkumulation vornehmlich von Laktat als möglichen Hinweis dafür, dass ab diesem Konzentrationsbereich die Irritation mitochondrialer Enzyme in eine manifeste Funktionsstörung des Mitochondriums übergeht. Im Gegensatz zu Lindan kam es sowohl bei DDT als auch bei DDE zu einem signifikanten Abfall des Pyruvats im Zellmedium.

Dies entspricht tendenziell der bereits dargelegten Reduktion der Laktatmenge nach Inkubation mit diesen beiden Noxen. Erniedrigte Pyruvatspiegel scheinen bei ebenfalls deutlich reduzierter Laktatproduktion ein weiteres Resultat einer gestörten Glykolyse zu sein. Weiterhin könnte es ab einer Noxenkonzentration von 50 µM mit verminderter Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase im MTT-Assay zu einer zytotoxischen Wirkung mit vermehrtem Zelltod kommen.

Konsekutiv wäre dann auch eine erniedrigte Laktat-/Pyruvatproduktion zu verzeichnen. Eine weitere Erklärung für diese signifikant erniedrigten Pyruvatmengen nach DDT/DDE- Inkubation könnte darin liegen, dass eine primär erhöhte Pyruvatproduktion zu einer Induktion der Fettsäuresynthese führen könnte und ein dadurch erhöhter Pyruvatverbrauch vorliegende Ergebnisse liefert. Dieses Phänomen ist bereits

bei Sertolizellen in vitro nach MEHP-Inkubation beschrieben (Chapin et al.,1988). Allerdings erfordert eine gesteigerte Syntheseleistung der Zelle ein hohes Angebot an ATP, welches ab einer DDT-/DDE-Konzentration von 50 µM bei reduzierter Glykolyse sowie eingeschränkter Mitochondrienfunktion nur schwer zur Verfügung gestellt werden dürfte. ATP ist als Energieträger zum Ablauf eines störungsfreien Zellstoffwechsels hinlänglich bekannt (Nogueira et al.,2001).
Es kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Pyruvatergebnisse die Aussage eines gestörten anaeroben Stoffwechsels unterstreichen. Eine pauschale Schädigung der Energiegewinnung mit gestörtem oxidativen Stoffkatabolismus in den Mitochondrien kann aufgrund vorliegender Ergebnisse dieser Arbeit nach DDT- sowie DDE-Inkubation vermutet werden. Die eingangs erwähnten elektronenmikroskopisch nachweisbaren Schäden der mitochondrialen Cristae (Jonsson et al.,1991) nach DDE-Applikation in vivo unterstreichen zusätzlich die dargestellten Ergebnisse. Lindan scheint eine auffallend hohe Affinität zu mitochondrialen Strukturen zu besitzen, die ebenfalls ab einer Schwellenkonzentration von 50 µM zu einer Entkopplung des oxidativen Stoffwechsels führt, ohne jedoch eine primäre Schädigung des anaeroben Stoffwechsels zu verursachen. Eine Besonderheit anderer Art ist die große Streubreite in den Startpunkten der Kontrollgruppen (4 µg Pyruvat/100 µg Protein - 10 µg Pyruvat/100 µg Protein) bei der Pyruvat-/Laktatbestimmung. Es scheint so zu sein, dass neben einer altersabhängigen Inhibinproduktion auch die Pyruvat-/Laktatproduktion vom Alter der verwendeten Versuchstiere abhängt.

Die Fehlerquelle einer ungleichmäßigen Proteinverteilung auf die Zellschalen ist durch die Standardisierung auf 100 µg Protein ausgeschlossen. Um eine umfassende Aussage darüber machen zu können, inwieweit eine Manipulation der Sertolizelle durch die untersuchten Organochlorpestizide erfolgen kann, muss auch die Einbindung in die hormonelle Steuerung der Keimzellreifung berücksichtigt werden. Die Sertolizelle produziert Inhibin, ein Hormon, das aus zwei Untereinheiten (α-Kette und β-Kette) besteht (Hancock et al.,1992). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein ebenso von der Sertolizelle in vitro sezerniert wird (Le Gac & de Kretser,1982). Inhibin supprimiert als Produkt der Sertolizelle hauptsächlich die Sekretion von FSH im Hypophysenvorderlappen (Jenner et al.,1983; Farnworth et al.,1988), welches die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen sowie die Spermatogenese in den Tubuli contorti stimuliert.

Die Suppression von FSH durch Inhibin wurde im Tierversuch eindeutig bewiesen (Findlay et al.,1987). Es konnte ebenso eine Reduktion von FSH sowie in geringerem Maße auch von LH durch Inhibin bei kultivierten Hypophysenvorderlappenzellen in vitro nachgewiesen werden (Jenner et al.,1983; Farnworth et al.,1988). Zwischen FSH und der Inhibinproduktion der Sertolizelle besteht ein positiver Rückkopplungsmechanismus, der auch in vitro nachgewiesen werden konnte (Gonzales et al.,1988). Die enge Verbindung dieser beiden Größen muss bei der Diskussion der Messresultate berücksichtigt werden.

Alle drei untersuchten Organochlorpestizide führten zwischen 50-100 µM zu einem signifikanten Abfall der Inhibinproduktion.
Überträgt man dies auf die hormonelle Situation in vivo, so könnte der abfallende Inhibinserumspiegel einen deutlich erhöhten FSH-Spiegel zur Folge haben. Von diesem Hormon ist eine Steigerung der Laktat-Pyruvatproduktion der Sertolizelle (Nicolet et al.,1983) bekannt. Bei Lindanexposition in vivo wäre eine Steigerung der Laktat-/Pyruvatproduktion durch Entkopplung des oxidativen Stoffwechsels sowie durch einen erhöhten FSH-Spiegel im Sinne eines additiven Effekts denkbar. Allerdings ist die Abnahme der sekretorischen Hormonproduktion (Inhibin) nach Pestizidexposition mit einer Abnahme der Zellvitalität einhergehend. Eine direkte Wirkung der genannten Organochlorpestizide auf die Hormonsynthese von Inhibin wird daraus folglich nicht ersichtlich. Mögliche FSH-Serumspiegelerhöhungen mit gesteigerter Laktatproduktion könnten durch einen vermehrten Sertolizelltod in vivo relativiert werden.
Die erniedrigte Inhibinproduktion als Folge der Inkubation mit dieser Noxe ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels eine erniedrigte ATP-Produktion mit reduzierter Proteinsynthese zur Folge hat. Eine Verminderung der Inhibinsynthese könnte auch ATP-unabhängig erfolgen, da Lindan ein bekannter Inhibitor zellulärer Carrierproteine ist (Walsh & Stocco, 2000). Die signifikante Abnahme der Inhibinproduktion unter DDT ist allerdings eindeutiger auf einen Abfall der kompletten Zellenzymaktivität zurückzuführen, da im MTT-Assay ebenfalls eine signifikante Reduktion der Zellvitalität zu erkennen ist.

Um zu einer umfassenden Aussage darüber zu kommen, inwieweit eine Beeinflussung der Spermatogenese über eine Manipulation der Sertolizelle durch Organochlorpestizide möglich ist, scheint es wichtig, die Ergebnisse dieser Arbeit nicht als verschiedene Einzelaussagen zu betrachten, sondern einen Konsens zu finden, der versucht, die erhaltenen Resultate auf die Gegebenheiten in vivo zu projizieren. Alle signifikanten Messergebnisse dieser Arbeit waren in einem Konzentrationsbereich zwischen 50-100 µM zu verzeichnen.

Höchstkonzentrationen im Blutserum der untersuchten Noxen lagen jedoch bei Personen mit chronischer Exposition wesentlich niedriger, 2,44 µM DDT bei Exponierten bzw. 0,6 µM DDE ohne gesundheitsschädigende Konsequenzen (Chand et al.,1991). Dies sind zwar Messgrößen, die gegenüber einer nicht exponierten Kontrollgruppe um das zehnfache erhöht waren, die jedoch weit unter dem Konzentrationsbereich lagen, bei denen in vitro die beschriebenen Effekte beobachtet werden konnten. Es wurde bereits retrospektiv die Blutserumkonzentrationen von DDT und DDE bei Frauen bestimmt, die im Zeitraum von 1960 bis 1963 ein Kind geboren haben. Hierbei fanden sich Serumkonzentrationen von ca. 10 µg DDT/DDE/l, entsprechend ca. 0,03 µM DDT/DDE mit signifikant erniedrigter Fertilitätsrate der betroffenen Frauen (Cohn et al.,2003). Eine weitere Arbeit fand signifikant erhöhtes Auftreten von Hypospadien und Kryptorchismus bei Serumspiegeln von mehr als 0,15 µM DDE in graviditate bei den betreffenden männlichen Neugeborenen (Longnecker et al.,2002).

Bezüglich der Akkumulation im Fettgewebe liegen Daten von Zugvögeln in Korea vor, hierbei wurden 0,006 µg DDT/g Fettgewebe gefunden (Choi et al.,2001), wobei DDT in Südostasien auch heute noch breitflächig angewendet wird. Bei Delphinen wurden Konzentrationen von 0,02-0,96 µg DDE/g Fettgewebe bestimmt (Troisi et al.,2001). Lindan sowie DDT mit seinen Abbauprodukten (Chlorophenylmethanol) trat in einer Konzentration von 0,002- 0,018 µg/g Fettgewebe bei Japanern ohne gesonderte Exposition auf (Minh et al.,2000). Bei Betrachtung dieser Daten fällt auf, dass gemessene Konzentrationen (Blutserum, Fettgewebe) deutlich niedriger liegen als die in vorliegender Arbeit verwendeten Bereiche. Die Konzentrationen von Lindan/ DDE im Sperma exponierter Personen (Lindan: 0,2 µM, DDE: 0,12 µM) ohne Beeinträchtigung der männlichen Fertilität sind ebenfalls deutlich niedriger angesiedelt (Kumar et al.,2000).

Allerdings scheinen die untersuchten Organochlorpestizide bereits in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen zu hormonellen Imbalancen zu führen (Longnecker et al.,2002). Mit steigender Blutserumkonzentration treten die direkt gewebstoxischen Eigenschaften im Sinne einer akuten Beeinträchtigung der Fertilität mit Zellzerstörung in den Vordergrund (Dalsenter et al.,1996; Fausto et al.,2001).

Dies lässt sich mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit ab einer Konzentration von 100 µM unterstreichen. Die Manipulation der Sertolizellen hinsichtlich Zellvitalität und Störung des Stoffwechsels scheint einer von mehreren Ursachen für dieses Phänomen zu sein. Letztendlich stellt sich die Frage, ob eine reproduktionstoxikologische Gefährdung durch die untersuchten Organochlorpestizide für den Menschen auszuschließen ist.

Eine definitive Aussage hierzu scheint zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, die Sertolizelle in vitro ist aus dem physiologischen Medium eines Tubulus contortus entbunden, es entfallen somit vielerlei Einflüsse von Hormonen (FSH, Inhibin) sowie peritubulärer Zellen (Skinner et al., 1989; Sharpe et al.,1992).
Die kultivierte Sertolizelle dagegen ist in direktem Kontakt mit der inkubierten Noxe im Gegensatz zu den anatomischen Gegebenheiten in vivo. Dies kann zu Ergebnissen führen, die nicht zwangsläufig auf einen Organismus übertragbar sind (Russel&Steinberger,1989). Ergänzend zu den hier dargestellten Ergebnissen stehen noch gezielte Untersuchungen aus. Es muss zu einer umfassenden Aussage darüber gekommen werden, inwieweit die untersuchten Effekte in vitro im physiologischen Ablauf der Spermatogenese zu verifizieren sind. Lindan zeigte bereits eine hohe Wirkpotenz an Sertolizellen in vivo (Dalsenter et al.,1996) in einem Konzentrationsbereich, der unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit keinerlei Effekte zeigte. Aus diesem Grunde sollten die Organochlorpestizide als Störfaktor der Sertolizelle in vivo angesehen werden, die weiterer Forschungsergebnisse bedürfen. Forschungsarbeiten, die sowohl die hormonelle Situation (Inhibin) in vivo als auch die Stoffwechselsituation der Sertolizelle berücksichtigen (Kultivierung der Sertolizellen nach Noxenexposition in vivo) stehen noch aus, um ggf. die Resultate aus physiologischen und in vitro-Bedingungen miteinander vergleichen zu können. An erster Stelle sollte allerdings das Ziel stehen, Lindan auf seine medizinische Anwendung zu beschränken sowie DDT weltweit durch modernere Malariabekämpfung zu ersetzen (Turusov et al.,2002; Jaga & Dharmani,2003; Walker et al.,2003). Dies dürfte aufgrund der finanziellen Situation in den Entwicklungsländern sowie der fehlenden Problemeinsicht eine große Herausforderung bleiben.

5. Zusammenfassung

Organochlorpestizide wie Lindan, DDT und sein Hauptabbauprodukt DDE stehen unter dem Verdacht, die männliche Fertilität zu beeinträchtigen. Ihre insektizide Wirkung wurde lange Zeit auch in den Industrienationen breitflächig genutzt. Seitdem nun seit längerer Zeit über Ihre Persistenz in der Umwelt und möglichen Gesundheitsschädigungen diskutiert wird, beschränkt sich die Anwendung von Lindan auf die Therapie ektoparasitärer Erkrankungen. Allerdings wird DDT auch heute noch in den Entwicklungsländern zur Eindämmung der Malaria verwendet und hat daher noch immer einen aktuellen Bezug zur Fragestellung dieser Arbeit. Es wurden Rückstände von Lindan und DDT im Sperma von Probanden gefunden, die mit der Insektizidsynthese beschäftigt waren und signifikant häufig eine sekundäre Sterilität aufwiesen (Wagner et al.,1990). Im Tierversuch (Ratte, Kaninchen) war nach oraler Inokulation von 1-5 mg Lindan/kg KG eine signifikante Reduktion der Spermatozoenzahl sowie Ballonierung von Sertolizellen im Keimepithel des Tubulus contortus auffällig (Dalsenter et al.,1996; Fausto et al.,2001).

Die Sertolizelle erfüllt im Rahmen der Spermatogenese wichtige Funktionen und ist Ausgangspunkt dieser Arbeit, deren Aufgabe es war, eine Aussage darüber zu machen, inwieweit eine Manipulation der Sertolizelle zu einer Beeinträchtigung der Spermatogenese (Keimzellreifung) führen kann. Kultivierte Sertolizellen der Ratte wurden mit den verschiedenen Noxen über 24 h in einer Konzentration von 6,25 - 100 µM inkubiert. Als Messparameter dienten hierbei die Zellvitalität, die Laktat-/Pyruvatproduktion sowie die sezernierte Inhibinmenge nach Noxeninkubation.

Laktat/Pyruvat sind essentiell für die Energiegewinnung heranreifender Spermatozoen, Inhibin ist ein wichtiges Hormon im hormonellen Regelkreis der Spermatogenese. Keine der drei untersuchten Insektizide zeigte im getesteten Konzentrationsbereich eine Akuttoxizität, lediglich für DDT war ab 50 µM eine geringe Beeinträchtigung der Zellvitalität zu verzeichnen.

Weiterhin zeigte sich bei einer Lindankonzentration von 100 µM eine signifikante Steigerung der Laktat-/Pyruvatproduktion, was seine Ursache in einer Entkopplung des oxidativen Stoffwechsels durch beginnende Schädigung der Mitochondrien haben könnte. Die Folge könnte eine verminderte Bereitstellung zellulärer Energieträger (ATP) mit reduzierter Proteinsynthese sein. Die signifikant erniedrigte Inhibinsynthese in diesem Konzentrationsbereich könnte als Indiz hierfür gelten. Inkubation mit DDT / DDE zeigte ab 50 µM sowohl eine tendenziell abnehmende Laktat-/Pyruvatmenge als auch eine reduzierte Inhibinproduktion, hierbei scheint der komplette Energiestoffwechsel der Sertolizelle negativ betroffen zu sein.

Zusammenfassend kann bei den untersuchten Organochlorpestiziden von einer Beeinträchtigung der Energiebereitstellung sowie der hormonellen Spermatogenesesteuerung (Inhibin) in höheren Konzentrationsbereichen (50-100 µM) ausgegangen werden. Strukturelle Schädigungen der Sertolizelle in vivo ließen sich nur bei wesentlich größeren Mengen betreffender Organochlorpestiziden nachweisen. In Anbetracht der Lipophilie und der damit verbundenen Persistenz in der Umwelt und Anreicherung im Fettgewebe betroffener Organismen ist eine fertilitätsbeeinträchtigende Wirkung der untersuchten Noxen auch in wesentlich geringeren Blutserumkonzentrationen (<100 µM) über Jahre hinweg nicht auszuschließen.

Unabhängig von den bekannten antihormonellen Wirkaspekten der untersuchten Organochlorpestiziden kann davon ausgegangen werden, dass die chronische Beeinträchtigung der Sertolizelle durch Lindan, DDT und DDE eine ernstzunehmende Gefahrenquelle für die männliche Fertilität darstellt. Diese Arbeit untersuchte eine Kurzzeitexposition in vitro, eine langjährige Affektion der Sertolizelle in vivo könnte weitaus schwerwiegendere morphologische und sekretorische Veränderungen zur Folge haben.

Literaturverzeichnis

Abbassy M., Ibrahim H., El-Amayem M. (1999): Occurrence of pesticides and polychlorinated biphenyls in water of the Nile river at the estuaries of Rosetta and Damiatta branches, north of delta. Egypt. J. Environ.Sci.Health.B. 34(2): 255-267

Allenby G., Sharpe R., Foster P. (1990): Changes in sertoli cell function in vitro induced by nitrobenzene. Fund. Appl. Toxicol. (14): 364-375

Andersson A., Muller J., Skakkebaek N. (1998): Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin-B levels.
J. Clin. Endocrinol.Metab. 83 (12): 4451-4458

Baris D., Zahm S., Cantor K., Blair A. (1998): Agricultural use of DDT and risk of non - Hodgkin`s lymphoma: Pooled analysis of three case-control studies in the United states. Occup. Environ. Med. 55(8): 522-527

Bean T., Zhuang W., Tong P., Eick J., Chappelow C., Yourtee D. (1995): Comparison of tetrazolium colorimetric and 51Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. Dent. Mater. 11 (5): 327-331

Beck S. (1953): Manipulation von Spermatozoen unter Lindaneinfluss in vitro. J. Econ. Ent. 46: 570

Benninghoff (1994): Anatomie Band II; 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg; 79-81.

Betteridge A., Craven R. (1991): A two-site enzyme-linked immunosorbent assay for Inhibin. Biol. Reprod. 45: 748-754

Binelli A., Provini A. (2003): DDT is still a problem in developed countries:The heavy pollution of Lake Maggiore. Chemosphere 52 (4): 717-723

Büchel K.H. (1977): Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfung. Georg Thieme Verlag Stuttgart: 13-14

Carlsen E., Olsson C., Petersen J., Andersson A., Skakkebaek N. (1999): Diurnal rhythm in serum levels of inhibin-B in normal men: relation to testicular steroids and gonadotropins. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84(5): 1664 -1669

Casas M., Torres J., Bown D., Rodriguez M., Arredondo-Jimenez J. (1998): Selective and conventional house-spraying of DDT and bendiocarb against Anopheles pseudopunctipennis in southern Mexico. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 14(4): 410-420

Chand B., Sankaranarayan T., Yadava R., Narasimham M. (1991): Residues of DDT and its metabolite in blood of exposed factory workers and their correlation with ill health symptoms. J. Commun. Dis. 23(4) : 245-247

Chapin R. Gray T., Phelps J., Dutton S. (1988): The effects of Mono-(2-ethylhexyl)-phtalate on rat sertoli cell - enriched primary cultures. Tox. Appl. Pharm. 92: 467-479

Chen C. (1968): The effects of proteindeficient diet on the acute toxicity of lindane. M. Sc. Thesis, Queen´s Univ., Kingston, Ont. Canada.

Chitra K., Sujatha R., Latchoumycandane C., Mathur P. (2001): Effect of lindane on antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats. Asian J. Androl. 3 (3): 205-208

Choi J., Matsuda M., Kawano M., Min B., Wakimoto T. (2001): Accumulation profiles of persistent organochlorines in waterbirds froman estuary in Korea. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41 (3): 353-363

Chowdhury A., Venkatakrishna-Bhatt H., Gautam A. (1987): Testicular changes of rats under lindane treatment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. (38): 154-156.

Clermont Y., Rambourg A. (1978): Evolution of the endoplasmatic reticulum during rat spermiogenesis. Am. J. Anat. 151: 191-212

Cohn B., Cirillo P., Wolff M., Schwingl P., Cohen R., Sholtz R., Ferrara A., Christianson R., van den Berg B., Siiteri P. (2003): DDT and DDE exposure in mothers and time to pregnancy in daughters. Lancet 361 (9376): 2205-2206

Cremlyn R. (1978): Pesticides - Preparation and mode of action. Hatfield Polytechnic Hertfordshire: 52-53

Czok P., Lamprecht W. (1974): Pyruvate, Phosphoenolpyruvate and D-Glycerate-2-phosphate. Bergmeyer HU (ed), Academic press NY in: Methods of enzymatic analysis: 607-611

Dalsenter P., Faqi A., Webb J., Merker H - J., Chahoud I. (1996): Reproductive toxicity and tissue concentrations of lindane in adult male rats. Hum. Exp. Toxicol. (15): 406- 410

Defamie N., Mograbi B., Roger C., Cronier L., Malassine A., Brucker - Davis F., Fenichel P., Segretain D., Pointis G. (2001): Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin 43 and zonula occludens - 1 in 42 GPA9 Sertoli cells. Carcinogenesis 22 (9): 1537-1542

De Kretser D., Robertson D. (1989): The isolation and physiology of inhibin and related proteins. Biol. Reprod. 40: 33-47

Dikshith T., Datta K., Tandon S., Gupta P. Behari J. (1978): Comparative response of male rats to parathion and lindane: Histopathological and biochemical studies. Environ. Research (17): 1-9.

Dong Q., Hawker F., Mc William D., Bangah M., Burger H., Handelsman D. (1992): Circulating immunoreactive inhibin and testosterone levels in men with critical illness. Clin. Endocrinol. (36): 399-404

Eaton M., Schenker M., Whorton M., Samuels S., Perkins C., Overstreet J. (1986): Seven-Year follow-up of workers exposed to 1,2-Dibromo-3-chloropropane. J. Occ. Med. 28 (11): 1145-1150

Farnworth P. G., Robertson D., de Kretser D., Burger H. (1988): Effects of 31 kDa bovine inhibin on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: Actions under basal conditions. Endocrinology 122: 207-213

Fausto A., Morera P., Margarit R., Taddei A. (2001): Sperm quality and reproductive traits in male offspring of female rabbits exposed to lindane (gamma - HCH) during pregnancy and lactation. Reprod. Nutr. Dev. 41 (3): 217-225

Feng K., Yu B., Ge D., Wong M., Wang X., Cao Z. (2003): Organochlorine pesticide (DDT and HCH) residues in the Taihu Lake region and its movement in soil - water system I. Field survey of DDT and HCH residues in ecosystem of the region. Chemosphere 50 (6): 683-687

Findlay J. K., Robertson D., Clarke I. (1987) : Influence of dose and route of administration of bovine follicular fluid and the suppressive effect of purified 31 kDa bovine inhibin on plasma FSH in ovarectomized ewes. J. Reprod. Fertil. 80: 455 - 461

Fischer T. F. (1994): Lindane toxicity in a 24-year-old woman. Ann. Emerg. Med. 24(5): 972-974

Galdieri M., Ziparo E., Palombi F., Russo M., Stefani M. (1981): Pure sertoli cells cultures: A new model for the study of somatic - germ cell interactions. J. Androl. (5): 249-254

Gomez-Flores R., Gupta S., Tamez-Guerra R., Mehta R. (1995): Determination of MIC`s for Mycobacterium avium - M. intracellulare complex in liquid medium by a colorimetric method. J. Clin. Microbiol. 33 (7): 1842-1846

Gonzales G., Risbridger G., de Kretser D. (1988): In vitro synthesis and release of inhibin inresponse to FSH stimulation by isolated segments of seminiferous tubules from normal adult male rats. Mol. Cell. Endocrinol. 59 (3): 179-185

Greave K., Herrnring G. (1950) : Toxische Wirkung des gamma-Hexachlorcyclohexan bei seiner Anwendung als Anthelminticum am Menschen. Klin. Wochenschr. 28: 622- 623

GriveauJ., Grizard G., Boucher D., Le Lannou D. (1998) : Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors. Hum. Reprod. 13 (11): 3108-3113.

Hadley M., Byers S., Suarez-Quian C., Kleinmann H., Dym M. (1985): Extracellular matrix regulates sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. J. Cell. Biol. (101): 1511 -1522

Hancock A., Robertson D., de Kretser D. (1992): Inhibin and Inhibin α-chain pre-cursors are produced by immature rat sertoli cells in culture. Biol. Reprod. 46:155-161

Herbst M. (1983): Toxizität von gamma HCH (Lindan). Hexachlorcyclohexan als Schadstoff in Lebensmitteln. Materialien aus zwei Kolloquien der Senatskommision zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln am 28/29.11.1979 und 6.3.1980. Verlag Chemie, Weinheim

Hodgson E., Levi P. (1996): Pesticides - an important but underused model for the environmental health sciences. Environ. Heal. Persp. 104, Supplement 1: 97-106

Hong H., Boorman G. (1993): Residual myelotoxicity of lindane in mice. Fundam. Appl. Toxicol. 21 (4): 500-507

Illingworth P., Groome N., Byrd W., Rainey W., Mc Neilly A., Mather J., Bremner W. (1996): Inhibin-B: A likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. J. Clin. Endocrinol. Metab. (81): 1321-1325

Jaga K. & Dharmani C. (2003): Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissue. Int. J. Occup. Med. Environ. Health 16 (1) : 7-20

Jenner A., de Koning J., van Rees G. (1983): Effect of inhibin-like activity on LH-RH-stimulated release of FSH by pituitary glands from female rats in vitro. Life Sci. 32 (10): 1091-1098

Jonsson C. Rodriguez-Martinez H., Lund B., Bergman A., Brandt I. (1991): Adrenocortical toxicity of 3-methylsulfonyl-DDE in mice. Mitochondrial changes following ecologically relevant doses. Fundam. Appl. Toxicol. 16 (2): 365-374

Juhler R., Lauridsen M., Christensen M., Hilbert G. (1999): Pesticide residues in selected food commodities: Results from the Danish National Pesticide Monitoring Program 1995 - 1996. J. AOAC. Int. 82(2): 337-358

Kelce W., Stone C., Laws S., Gray L., Kemppainen J., Wilson E. (1995): Persistent DDT metabolite p,p´- DDE is a potent androgen receptor antagonist. Nature 375: 581- 582

Kumar R., Pant N., Srivastava S. (2000): Chlorinated pesticides and heavy metals in human semen. Int. J. Androl. 23:145-149

Lahvis G., Wells R., Kuehl D., Stewart J., Rhinehart H., Via C. (1995): Decreased lymphocyte responses in free ranging bottlenose dolphins are associated with increased concentrations of PCB`s and DDT in peripheral blood. Environ. Health. Perspect. 103(4): 67-72

Laschinsky G., Spielmann H., Vogel R. (1990): In-vitro-Testsystem in der Reproduktionstoxikologie: Zytotoxizitätstest an embryonalen Stammzellen der Maus. Fertilität 6: 214-219

Le Gac F. & de Kretser D. (1982): Inhibin production by sertoli cell cultures. Endocrinol. 28: 487-498

Lindan-Workshop (1982): Lindan-ja, HCH-nein, Freiburg/Breisgau Schillinger-Verlag S.15

Longnecker M., Klebanoff M., Brock J., Zhou H., Gray K. Needham L., Wilcox A. (2002): Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethyleneand risk of cryptorchidism, hypospadias and polythelia among male offspring. Am. J. Epi-demiol. 155 (4): 313-322

Ma J., Daggupaty S., Harner T., Li Y. (2003): Impacts of lindane usage in the Canadian prairies on the Great Lakes ecosystem. 1. Coupled atmospheric transport model and modeled concentrations in air and soil. Environ. Sci. Technol. 37 (17): 3774 -3781

Manger R., Leja L., Lee S., Hungerford J., Wekell M. (1993): Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: Semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. Analyt. Bio-chem. 214: 190-194

Mankovska I., Serebrovska Z. (1998): The role of oxygen radicals in the physiology and pathology of human sperm. Fiziol Zh 44 (5-6): 118-125.

Mc Lachlanet R., Robertson D., Burger H., de Kretser D. (1986): The radioimmunoassay of bovine and human follicular fluid and serum inhibin. Mol. Cell. Endocrinol. (46): 178-185

Meistrich M., Trostle P., Frapart M., Erickson R. (1977): Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase X in pachytene spermatocytes and spermatids of mouse testes. Devl. Biol. 60: 428-441

Minh T., Watanabe M., Tanabe S., Yamada T., Hata J., Watanabe S. (2000): Occurrence of Tris (4-chlorophenyl)methane, tris (4-chlorophenyl)methanol and some other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue. Environ. Health Perspect 108 (7): 599-603

Minh T., Watanabe M., Tanabe S., Yamada T., Hata J., Watanabe S. (2001): Specific accumulation and elimination kinetics of tris (4-chlorophenyl)-methane, tris-(4-chlorophenyl)methanol and other persistent organochlorines in humans from Japan. Environ. Health Perspect 109 (9): 927-935

Monsees T., Winterstein U., Hayatpour J., Miska W., Schill W-B. (1998): Einfluss von Umweltnoxen auf die Funktion testikulärer Zellen. Fertilität 13: 75-78

Nakamura M., Hino A., Yasumasu I, Kato J. (1981): Stimulation of protein synthesis in round spermatids from rat testes by lactate. J. Biochem. (Tokyo) 89 (4): 1309-1315

Nicolet H. , GrootegoedJ., Rommerts F., van der Molen H. (1981): Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. J. Reprod. Fert. 62: 399-405

Nogueira V., Rigoulet M., Piquet M., Devin a., Fontaine E., Leverve X. (2001): Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. J. Biol. Chem. 276 (49): 46104-46110

Noll F. (1974): L-(+)-Lactate. Methods of enzymatic analysis. 582-588. Bergmeyer HU (ed) Academic Press, New York.

Parmar D., Yadav S., Dayal M., Johri A., Dhawan A., Seth P. (2003): Effect of lindane on hepatic and brain cytochrome P 450s and influence of P450 modulation in lindane induced neurotoxicity. Food. Chem. Toxicol. 41 (8): 1077-1087

Perkow W. (1971): Wirksubstanzen der Pflanzenschutz - und Bekämpfungsmittel. Verlag Paul Parey Berlin/Hamburg: 6-7

Plymate S., Paulsen C., Mc Lachlan R. (1992): Relationship of serum inhibin levels to serum follicle stimulating hormone and sperm production in normal men and men with varicoceles. J. Clin. Endocrinol. Metab. (74): 859-864

Raizada R. (2002): Organochlorine pesticide residues in environmental component food material and human tissues. Presented in International Seminar on “Problem of Monitoring the Pesticide Residue in Exportable Commodities viz Rice, Tea, Fish and Minor Crops.” Colombo, Sri Lanka. 4 - 9 April.

Reyes J., Borriero L., Tanpaichitr N., Bellve A., Benos D. (1986): Energy metabolism of cultured TM 4 cells and the action of gossypol. Biol. Reprod. 34: 809-819

Robinson R. & Fritz I. (1981): Metabolism of glucose by sertoli cells in culture. Biol. Reprod. 24: 1032-1041

Ronco A., Valdes K., Marcus D., Llanos M. (2001): The mechanism for lindane-induced inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells.Toxicology 159 (1 - 2): 99-106

Russell L. & Griswold M. (1993): The Sertoli-Cell. Cache River Press, 1. Auflage: 274-276

Russell D., Sutherland L., Hunter E., Cree I. (1995): Comparison of MTT and ATP-Based assays for the measurement of viable cell number. J. Biolumin. Chemilumin 10: 29-34

Russell L., Bartke A., Goh J. (1989): Postnatal development of the sertoli cell barrier, tubular lumen and cytoskeleton of sertoli and myoid cells in the rat and their relationship to tubular fluid secretion and flow Am. J. Anat. (184): 179 - 189

Russel L., Steinberger A. (1989): Sertoli cells in culture, views from the perspectives of an in vivoist and an in vitroist. Biol. Reprod. 41: 571-577

Samanta L., Sahoo A., Chainy G. (1999): Age-related changes in rat testicular oxidative stress parameters by hexachlorocyclohexane. Arch. Toxicol. 73 (2): 96-107

Sharpe R., Maddocks S., Millar M., Kerr J., Saunders P., Mc Kinnell C. (1992): Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. J. Androl. 13 (2): 172-184

Sharpe R., Turner K., Mc Kinell C., Groome N., Atanassova N., Millar M., Buchanan D., Cooke P. (1999): Inhibin B levels in plasma of the male ratfrom birth to adulthood. Effect of experimental manipulation of sertoli cell number. J. Androl. 20 (1): 94-101

Schüttmann W. (1964): Toxische Gesundheitsschäden durch Gamma-Hexachlorcyclohexan. Habilitationsschrift, Berlin.

Skinner M., Schlitz S., Anthony C. (1989): Regulation of sertoli cell differentiated function: Testicular transferrin and androgenbinding protein expression. Endocrinol. 124(6): 3015-3024

Sohoni P., Sumpter J. (1998): Several environmental oestrogens are also antiandrogens. J. Endocrinol. 158 (3): 327-339

Stachel B., Dougherty R., Lahl U., Schlösser M., Zeschmar B. (1989): Toxic environmental chemicals in human semen: Analytical method and case studies. Andrologia 21 (3): 282-291

Stevens A., Lowe J. (1992): Histologie, VCH-Verlag; 308.

Strohmer H., Boldizsar A., Plöckinger B., Feldner-Busztin M., Feichtinger W. (1993): Agricultural work and male infertility. Am. J. Ind. Med. 24: 587-592

Sujatha R., Chitra K., Latchoumycandane C., Mathur P. (2001): Effect of lindane on testicular antioxidant system and steroidogenic enzymes in adult rats. Asian J. Androl. 3 (2): 135-138

Traina M., Rescia M., Urbani E., Mantovani A., Macri C., Ricciardi C., Stazi A., Fazzi P., Cordelli E., Eleuteri P., Leter G., Spano M. (2003): Long - lasting effects of lindane on mouse spermatogenesis induced by in utero exposure. Reprod. Toxicol. 17 (1): 25- 35

Troisi G., Haraguchi K., Kaydoo D., Nyman M., Aguilar A., Borell A., Siebert U., Mason C. (2001): Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenylethan (DDE) methyl sulfones in tissues of seal and dolphin morbivillivirus epizootic victims. J. Toxicol. Environ. Health 62 (1): 1-8

Truhaut R. (1954): Mitteilung beim Symp. Intern. De la Prevention du cancer, Sao Paulo.

Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L. (2002): Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence and risks. Environ. Health Perspect 110 (2): 125-128

Ulmann E. (1973): Lindan-Monographie eines insektiziden Wirkstoffs. Schillinger Freiburg: 25

Voet D., Voet J. (1992): Biochemie, 251 - 252, VCH - Verlag Weinheim.

Wagner U., Schlebusch H., van der Ven H., van der Ven K, Diedrich K., Krebs D. (1990): Accumulation of pollutants in the genital tract of sterility patients. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 28: 683-688

Walker K., Ricciardone M., Jensen J. (2003): Developing an international consensus on DDT: A balance of environmental protection and disease control. Int. J. Hyg. Environ. Health 206 (4-5): 423-435

Walsh L., Stocco D. (2000): Effects of lindane on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. Biol. Reprod. 63: 1024-1033.

Whorton M., Meyer C. (1984): Sperm count results from 861 American chemical/ agricultural workers from 14 separate studies. Fert. Ster. 42(1): 82-86

Williams J., Foster P. (1988): The production of lactate and pyruvate as sensitive indices of altered rat sertoli cell function in vitro following the addition of various testicular toxicants.Tox. Appl. Pharm. 94: 160-170

Woolridge W. E. (1948): The gamma isomer of hexachlorocyclohexane in the treatment of scabies. J. Invest. Dermatol. 10: 363-366

You L., Casanova M., Archibeque-Engle S., Sar M., Fan L., Heck H. (1998): Impaired male sexual development in perinatal Sprague-Dawley and Long-Evans hooded rats exposed in utero and lactationally to p,p´-DDE. Toxicol. Sci. 45 (2): 162-173

You L., Sar M., Bartolucci E., Ploch S., Whitt M. (2001): Induction of hepatic aromatase by p, p `- DDE in adult male rats. Mol. Cell. Endocrinol. 178 (1-2): 207-214

Folgende Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Originalarbeit:

- Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill W-B, Hayatpour J (2000). Sertoli cells as a target for reproductive hazards. Andrologia 32; 239-246
- Monsees TK, Franz M, Hayatpour J (2004). Influence of organochlorine pesticides on rat sertoli cell function. Reprod. Toxicol. (in preparation)

Abstracts:

- Franz M, Hayatpour J, Monsees TK (2000). Effect of organochlorine pesticides on rat sertoli cells in vitro. Andrologia 32;188
- Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Franz M, Gebhardt S, Schill W-B, Hayatpour J (2001). Influence of xenobiotics on male reproduction. J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. 15;19
- Monsees TK, Franz M, Hayatpour J, Schill WB (1998). Wirkung von Organochlorpestiziden auf Sertolizellfunktionen: Ein in-vitro Modell. Abstract book, S. 104, 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Münster, 08-10.10.1998

Buchbeitrag:

- Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Akaza H, Franz M, Gebhardt S, Pflieger-Bruss S, Schill WB, Hayatpour J (2001). Effects of xenobiotics on male reproduction. In: Proceedings of the 10th Congress European Academy of Dermatology and Venerology, Munich 10.-14.10.2001; pp. 995-999.

Poster:

- Monsees TK, Franz M, Hayatpour J, Schill WB (1998). Wirkung von Organochlorpestiziden auf Sertolizellfunktionen: Ein in-vitro Modell. 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Münster, 08.10.10.1998
- Franz M, Hayatpour J, Monsees TK (1999). Effect of organochlorinepesticides on rat Sertoli cells in vitro. Molecular aspects of Male Reproductive Toxicology. Rauischholzhausen, 13.-14.11.1999

Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. W-B. Schill als geschäftsführender Direktor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie aller verwendeten Materialien und Arbeitsgeräten, ohne dessen Schirmherrschaft wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Henkel als Doktorvater für die hilfreiche Korrektur und die wertvollen Ratschläge für meine Arbeit danken. Ein weiterer großer Dank an Herrn Dr. rer. nat. T. Monsees für die kontinuierliche optimale Betreuung während meiner praktischen Arbeit und die Hilfsbereitschaft und Präsenz in der Auswertung und Darstellung der Arbeitsergebnisse.

Frau G. Thiel hat durch Ihre Gewissenhaftigkeit und Verlässlichkeit in der Aufbearbeitung und Isolierung der Sertolizellen einen sehr wichtigen Beitrag für vorliegende Arbeit geleistet.

„Ich erkäre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis , wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Matthias Franz
geboren am:	19. Oktober 1972
in:	Pirmasens
Konfession:	katholisch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

08/1979 - 06/1983	Grundschule Waldfischbach
08/1983 - 06/1989	Staatl. Real-schule Wald-fischbach
08/1989 - 05/1992	Staatl. Burg-gymnasium Kaiserslautern

Abschluss: Abitur

Freiwilliges soziales Jahr

10/1992 - 09/1993	Städtisches Krankenhaus Rodalben Abteilung Chirurgie

Hochschulausbildung

10/1993 - 07/1995	Vorklinisches Studium an der Universität Giessen
10/1995 - 07/1998	Klinisches Studium an der Universität Giessen
10/1998 - 02/1999	Urlaubssemester
04/1999 - 02/2000	Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Bad Homburg
05/2000 - 11/2001	AiP Gynäkologie im Hospital zum Heiligen Geist in Frankfurt
seit 04/2002	Assistenzarzt im Klinikum Landsberg am Lech (Gynäkologie/Geburtshilfe)