

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
des Universitätsklinikum Gießen

Leiter: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill

Betreuer: PD Dr. rer. nat. T. Monsees

Gutachter: PD Dr. rer. nat. T. Monsees

Gutachter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2006

Einfluß von Estrogenen und Xenoestrogenen auf die Vitalität,
Testosteron-/Progesteron- und Laktatproduktion
der R₂C-Leydig-Zellen von Ratten

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sonja Judith Hinkel
aus Konstanz

Gießen 2005

Folgende Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder zur Publikation eingereicht:

Publizierte Vorträge

1. **Monsees TK, Hinkel S, Mihm K, Endo F, Schill WB, Hayatpour J (2001).** Effects of environmental hormones on the function of testicular cells. Proceedings of the Second status-seminar "Endocrine Disrupters", Berlin, 02.-04.04.2001. Umwelt Bundesamt Berlin, 133-136
2. **Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Akaza H, Franz M, Gebhardt S, Pfliegerbruss 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

Publizierte Abstracts

1. **Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Franz M, Gebhardt S, Schill WB, Hayatpour J (2001).** Influence of xenobiotics on male reproduction. J Eur Acad Dermatol Venerol 15:19
2. **Hinkel S, Hayatpour J, Henkel R, Monsees TK (2005).** Influence of Xenoestrogens on rat Leydig cell functions. Andrologia 37:237

Weitere Abstracts

1. **Monsees TK, Hinkel S, Mihm K, Endo F, Schill WB, Hayatpour J (2001).** Effects of environmental hormones on the function of testicular cells. Abstract book, p 43, Second status-seminar "Endocrine Disrupters", Berlin, 02.-04.04.2001.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1	
1.1	Die Bedeutung der Estrogenrezeptoren	10
1.2	Kriterien zur Auswahl der Schadstoffe	12
1.2.1	Xenoestrogene	13
1.2.1.1	17 β -Estradiol und Ethinylestradiol	13
1.2.1.2	Daidzein	14
1.2.1.3	Bisphenol A	15
1.2.2	Metallionen	16
1.2.2.1	Quecksilberdinitrat	16
1.2.2.2	Natrium-m-Arsenit	16
1.3	Kriterien zur Auswahl der Zellparameter	17
1.3.1	Testosteron- und Progesteronproduktion der Leydig-Zelle	17
1.3.2	Laktatproduktion der Leydig-Zelle	18
1.3.3	Vitalität der Leydig-Zelle	18
2. Zielsetzung der Arbeit		19
3. Material und Methoden		20
3.1	Kultur der immortalisierten R2C-Leydig-Zelle	20
3.1.1	Auftauen der Zellen	21
3.1.2	Passagieren von R2C Kulturen	22
3.1.3	Umplattierung auf die 24 Wells Zellkulturplatten	23
3.2	Inkubation mit Noxen	23
3.2.1	Ansetzen einer Verdünnungsreihe	23
3.2.2	Inkubation von R2C-Leydig-Zellen mit Noxen	24
3.3	Proteinbestimmung	25
3.4	Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay	26
3.5	Progesteronbestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA)	27
3.6	Testosteronbestimmung mittels Radioimmunoassay	29

3.7	Laktatbestimmung	30
3.8	Statistik	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Einfluss auf die Vitalität der Leydig-Zelle nach Zugabe verschiedener Noxen	34
4.1.1	Vitalität der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Ethinylestradiol	34
4.1.2	Vitalität der Leydig-Zelle nach Inkubation mit 17 β -Estradiol	35
4.1.2	Vitalität der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Daidzein	36
4.1.3.	Vitalität der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Bisphenol A	37
4.1.4.	Vitalität der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Natrium-m- Arsenit (NaAsO ₂)	38
4.1.5	Vitalität der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat Hg(NO ₃) ₂	39
4.2.	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Zugabe verschiedener Noxen	40
4.2.1	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Ethinylestradiol	40
4.2.2	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit 17 β -Estradiol	42
4.2.1.2	Nachweise der Kreuzreaktion zwischen 17 β -Estradiol bzw. Ethinylestradiol und den verwendeten Testosteron- antikörpern im Radioimmunoassay	44
4.2.3	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Daidzein	46
4.2.4	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Bisphenol A	47
4.2.5.	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit (NaAsO ₂)	48
4.2.6	Testosteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat Hg(NO ₃) ₂	49

4.3.	Progesteronproduktion der Leydig-Zelle nach Zugabe verschiedener Noxen	50
4.3.1.	Progesteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Ethinylestradiol	50
4.3.2.	Progesteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit 17 β -Estradiol	51
4.3.3	Progesteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Daidzein	52
4.3.4	Progesteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Bisphenol A	53
4.3.5.	Progesteronproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit (NaAsO ₂)	54
4.3.6	Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat Hg(NO ₃) ₂	55
4.4	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Zugabe verschiedener Noxen	56
4.4.1	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Ethinylestradiol	56
4.4.2	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit 17 β -Estradiol	57
4.4.3	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Daidzein	58
4.4.4	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Bisphenol A	59
4.4.5	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit (NaAsO ₂)	60
4.4.6	Laktatproduktion der Leydig-Zelle nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat	60
5.	Diskussion	61
5.1	Einfluß von Estrogenen und Xenoestrogenen auf die Progesteron- und Testosteronsynthese	65
5.1.1	Einfluß von 17 β -Estradiol und Ethinylestradiol auf die Progesteron- und Testosteronsynthese	65
5.1.2	Einfluß von Daidzein und Bisphenol A auf die Progesteron-	

	und Testosteronsynthese	72
5.1.3	Einfluß von Arsenit und Quecksilberionen auf die Progesteron- und Testosteronsynthese	75
5.2	Einfluß von Estrogenen, Xenoestrogenen und Metallionen auf die Bildung von Laktat	78
6.	Zusammenfassung	82
7.	Literaturverzeichnis	84
	Danksagung	101
	Eidesstattliche Erklärung	102
	Lebenslauf	103

1. Einleitung

Seit Anbeginn der Menschheit nimmt die Fruchtbarkeit in allen Kulturkreisen und Völkern einen hohen Stellenwert ein. Sie symbolisiert nicht nur Kraft und Schönheit, sondern sichert den Fortbestand der Menschen und der Gesellschaft. Im Zuge der industriellen Revolution ist die Bevölkerung immer mehr verschiedenen Umweltgiften ausgesetzt, welche gesundheitliche Probleme für den Menschen mit sich bringen. Zur Schädigung der männlichen Reproduktionsorgane führen vor allem chronische Belastungen mit z.B. Umwelttoxinen.

Zahlreiche Untersuchungen geben Anlass zu der Vermutung, dass eine zunehmende Störung der Entwicklung und Funktion der männlichen Reproduktionsorgane und der Spermatogenese in den letzten Jahrzehnten stattgefunden hat. Studien haben ergeben, dass die Spermienzahl abgenommen hat und Hodenkrebs, Kryptorchismus und Hypospadie vermehrt aufgetreten sind (Seibert, 1996). Eine Studie von Moller (2001) beschreibt einen Anstieg des Hodenkrebses von 2,6 % pro Jahr, während Prostatakrebs um 1,6 % pro Jahr angestiegen ist. Im Alter von 32 Jahren steigt die Inzidenz von Hodenkrebs rapide auf 30 von 100 000 Personen an, während bei Prostatakrebs die höchste Inzidenz ab einem Alter von 82 Jahren vorzuweisen ist (Moller, 2001). Eine Studie von Carlsen et al. (1992) gab Anlass zu heftigen Diskussionen. Er behauptete, dass sich innerhalb weniger Jahrzehnte die Spermienzahl von 113 auf 66 Mio/ml reduziert hätte. Eine Reihe neuerer Untersuchungen wie zum Beispiel in den USA widerlegten diese Angaben, da in Seattle und Umgebung die Spermienkonzentration in den letzten 21 Jahren konstant geblieben ist (Paulsen et al., 1996). In Finnland (Suominen und Vierula, 1993) und Toulouse (Bujan et al., 1996) konnte ebenfalls keine Abnahme der Spermiedichte in den letzten 20 Jahren festgestellt werden. Aitken und Sawyer (2003) beschrieben ebenfalls eine Abnahme der Spermienqualität und Fertilität. Sie vermuten die Ursache dafür in einem vermehrten oxidativen Streß, der durch den Einfluß von Umwelttoxinen, die vermehrt freie Radikale freisetzen, induziert würde. Durch ein Übermaß an freien Radikalen und zu wenig neutralisierenden Antioxidantien, wird die Spermienogenese gestört (Aitken und Sawyer, 2003). Dieser vermehrte oxidative Streß führt zur Ablösung von Spermatozyten vom Keimepithel, zu DNA Schäden und dem damit verbundenen Verlust der Zellfunktion.

Aus den sehr unterschiedlichen Studien wird deutlich, dass die Befunde über die Spermienproduktion sehr variieren. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es

sich hierbei eher um ein regionales und nicht um ein globales Problem zu handeln scheint. Dagegen gilt die Zunahme des Hodenkrebses in den letzten Jahren als gesichert, da in mehreren Ländern mit Krebsregister ein Anstieg der Fälle mit Hodenkrebs festgestellt worden ist. Die Zunahme von Kryptorchismus und Hypospadie ist wiederum schwieriger zu beurteilen und wird deshalb ebenfalls kritischer betrachtet (Weybridge, 1996).

Fortpflanzungs- und Entwicklungsprozesse reagieren sehr empfindlich auf Umweltchemikalien, wobei Pestizide und Industriechemikalien mit estrogenen Wirkung besonders schädigend sein sollen (Schlumpf und Lichtensteiner 1996). Die Estrogenhypothese besagt, dass die Ursache für die Störungen in der Entwicklung der Reproduktionsorgane in einer pränatalen Exposition gegenüber Estrogenen besteht. Zu den exogenen Estrogenen zählen die Phyto- und Mykoestrogene, synthetische Estrogene sowie alle Chemikalien mit estrogenen Wirkung (Sharpe und Skakkebeck, 1993). Ebenso spielen die Schadstoffe, die sich in unserer Nahrungskette anreichern sowie die berufliche Exposition mit Chemikalien eine wichtige Rolle für die Reproduktionsfähigkeit des erwachsenen Mannes. Einige Untersuchungen zeigten einen Rückgang der Spermienproduktion bei Männern, nach einer ständigen Exposition mit Umweltschadstoffen. Es wurde zum Beispiel Infertilität bei Männern beobachtet, die einer beruflichen Organochlor- oder Schwermetall-Exposition (DDT oder polychlorierte Biphenyle) ausgesetzt waren (Bush et al., 1986). Auch Dibromchlorpropan, ein Nematizid, welches für Zitrusfrüchte in Israel und Zentralamerika eingesetzt wurde, verursachte Infertilität und Sterilität bei den Arbeitern (Potashnik und Porath, 1995).

Der Hoden ist der Bildungsort von Spermatozoen und der für die Entwicklung des Mannes notwendigen Steroidhormone (Androgene). Die Ausreifung und Speicherung der Spermatozoen erfolgt im Nebenhoden. Unter dem Begriff Spermatogenese versteht man alle Prozesse, die zur Bildung der Gameten beitragen. Die Steroidogenese umfaßt dagegen alle Reaktionen zur Bildung der Steroidhormone.

Das Hodengewebe wird in zwei nach morphologischen und funktionellen Kriterien voneinander getrennte Kompartimente unterteilt. Das tubuläre Kompartiment enthält die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi), in denen die Spermatogenese stattfindet. Im interstitiellen Kompartiment (Interstitialium) sind die Leydig-Zellen lokalisiert, in denen die Steroide synthetisiert werden (Abb. 1).

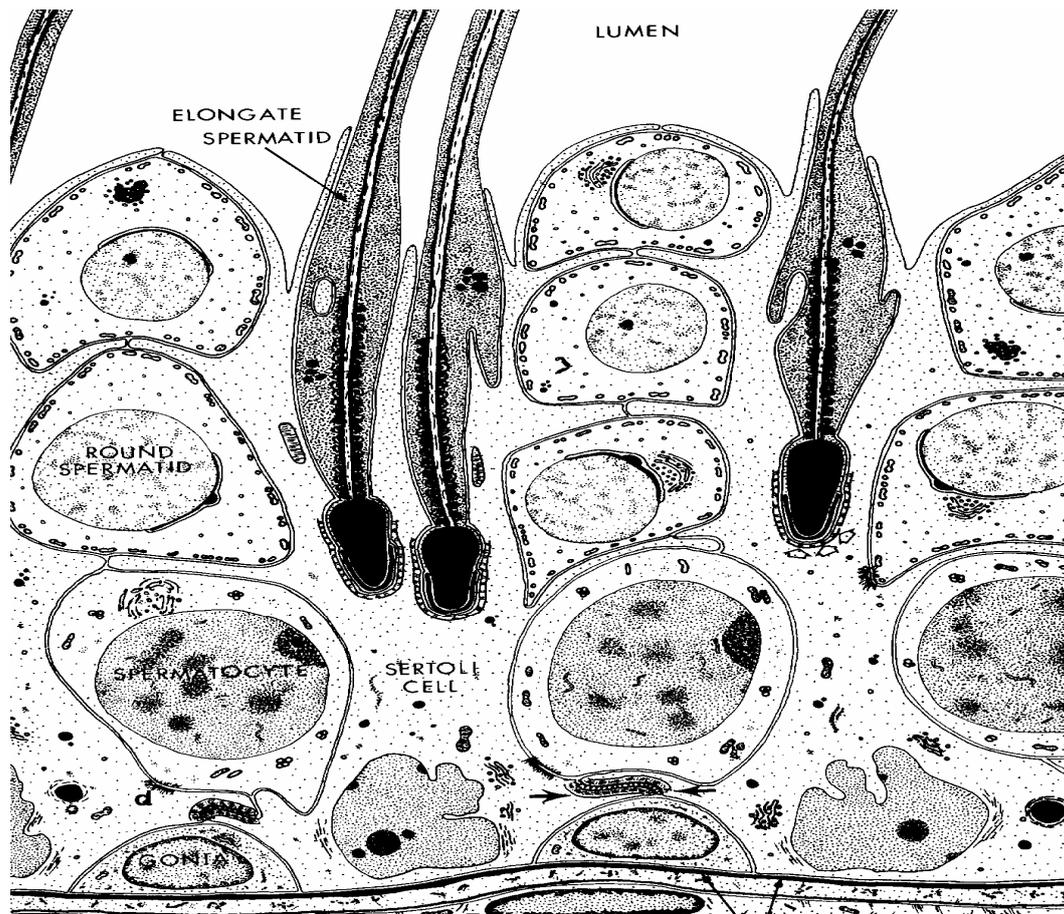


Abb. 1: Histologischer Schnitt durch die Samenkanälchen beim Mann

1 Spermatogonien, 2 Spermatozyten, 3 Spermien, 4 Sertoli-Zelle, 5 Leydig-Zelle
(Histological and Histopathological Evaluation of the testis, Russel et. al, USA 1990)

Abbildung 1 zeigt einen histologischen Schnitt durch den menschlichen Hoden. Es sind die Samenkanälchen und das interstitielle Kompartiment dargestellt. Die Tubuli seminiferi sind von peritubulären Zellen und einer Basallamina umgeben. Auf Letzterem fußt das Keimepithel, das aus Sertoli-Zellen und Keimzellen besteht. Im Keimepithel findet die Spermatogenese statt. Die Spermatogonien sind die Ausgangszellen der Spermatogenese und liegen der Basalmembran direkt an. Durch die erste meiotische Teilung entstehen die Spermatozyten I und II, die sich weiter lumenwärts befinden. Runde Spermatiden entstehen durch die zweite meiotische Teilung aus den Spermatozyten. Danach erfolgt die morphologische Differenzierung über elongierte Spermatiden zu den langgestreckten Spermatozoen. Von den unreifen Spermatogonien bis zu den Spermien am Ende der Nebenhodenreifung vergehen ca. 80 Tage. Davon entfallen beim Menschen ca. 67 Tage auf die Spermatogenese und 10 – 12 Tage auf die Reifung der Spermien im Nebenhoden.

Weiterhin besteht das Keimepithel aus Sertoli-Zellen. Diese bilden die Blut-Hodenschranke zum Schutz vor schädigenden Substanzen. Die Sertoli-Zellen versorgen die Keimzellen mit Nährstoffen und sezernieren eine Flüssigkeit, die unter anderem zum Abtransport der Spermatozoen in den Nebenhoden dient.

Peritubuläre Zellen sind Myofibroblasten und liegen der Basallamina in mehreren Schichten von außen an. Sie sind kontraktile und fördern androgenabhängig den Transport der Spermien. Das Interstitium besteht aus Bindegewebe mit Blut-Lymphgefäßen und den Leydig-Zellen. Leydig-Zellen liegen meist in der Nähe von Gefäßen und produzieren die männlichen Sexualhormone, wie das Testosteron und dessen Vorstufe, das Gestagen Progesteron. Testosteron wirkt endokrin aber auch lokal (parakrin) auf die Spermatogenese ein.

Bei der Steuerung und Reifung der Spermatogenese wirken überregionale und lokale Regelkreise zusammen (Abb. 2). Im Hypothalamus wird GnRH (Gonadotropin freisetzendes Hormon) gebildet, welches auf die Hypophyse einwirkt. GnRH stimuliert endokrin die Adenohypophyse zur Abgabe der gonadotropen Hormone FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon). Die Ausschüttung von GnRH in das Pfortadersystem der Hypophyse erfolgt in 60- bis 90-minütigen hypothalamischen Impulsen. Somit bestimmen Frequenz und Amplitude der GnRH Sekretion die Freisetzung von LH und FSH aus der Hypophyse. Die gonadotropin produzierenden Zellen stellen ca. 15 % der Zellpopulation der Adenohypophyse dar.

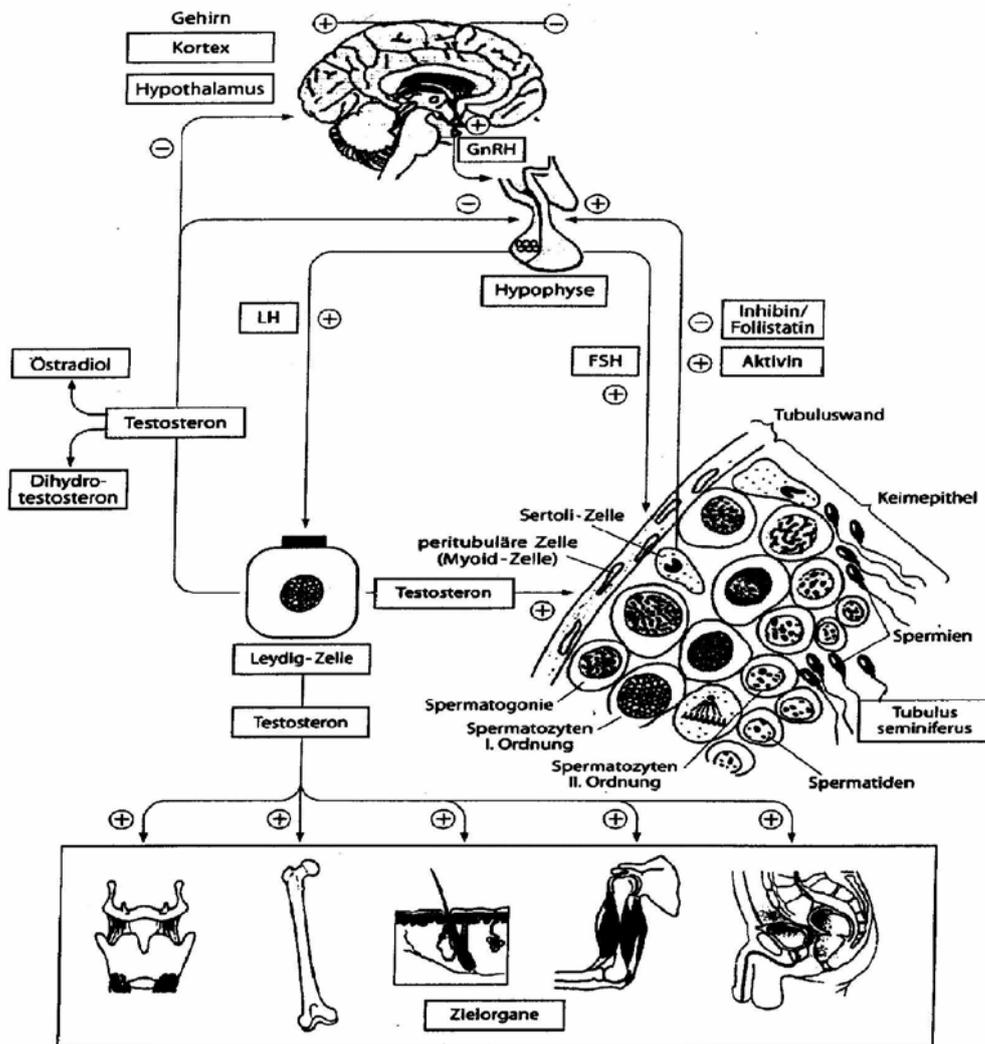


Abb. 2: Hormonelle Steuerung der Hodenfunktion und Wirkung der Androgene
(aus Nieschlag et al., 1999: Physiologie der Hodenfunktion, Springer Verlag, Heidelberg)

Beim Mann regt FSH die Spermatogenese über die Sertoli-Zelle an, während LH die Testosteronbildung in den Leydig-Zellen stimuliert. Da die Sertoli-Zellen mit Rezeptoren für FSH und Testosteron ausgestattet sind, wirkt Testosteron über die Sertoli-Zelle stimulierend auf die Spermatogenese.

Wachstumsfaktoren wie Inhibin und Aktivin sind an der Regulation der Spermatogenese beteiligt. Inhibin, ein Glykoprotein hemmt die Proliferation der Spermatozyten während sein Gegenspieler Aktivin diese stimuliert. Die Hemmung durch Inhibin-B erfolgt durch eine nach Stimulation vermehrte Ausschüttung von Inhibin-B aus der Sertoli-Zelle und bewirkt eine selektive Inhibition der hypophysären Ausschüttung von FSH. Das von den Leydig-Zellen gebildete Testosteron gelangt über die Blutbahn zur Hypophyse und hemmt dort die Bildung von LH und im

Hypothalamus die Synthese von GnRH. Somit untersteht das hypothalamo-hypophysär-testikuläre System einem echten Regelkreis mit negativer Feedback-Hemmung. Der negative Feedback-Mechanismus kann durch Testosteron, seinen Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) oder durch Estrogene ausgelöst werden.

Zu den Aufgaben des Testosterons gehören in der Embryonalentwicklung die Differenzierung der Geschlechtsorgane, in der Pubertät die Entwicklung zum Mann und im Erwachsenenalter die Bildung des männlichen Phänotyps (Renz-Polster und Braun, 2000). Testosteron, das in den Leydig-Zellen gebildet wird, stimuliert die Spermatogenese in den Sertoli-Zellen und ist für die Ausbildung des Bartwuchses, der tiefen Stimme, des Knochenwachstums, des Muskel- und Knochenaufbaus und der sekundären Geschlechtsmerkmale (Schambehaarung, Peniswachstum etc.) verantwortlich (Abb. 2). Zum einen Teil wirkt Testosteron direkt an der Zelle des Erfolgsorganes, zum anderen Teil wird das biologisch aktivere Hormon 5α -Dihydrotestosteron (DHT) erst im Zielorgan (z.B. Prostata) durch Reduktion mittels 5α -Reduktase gebildet. DHT ist für den männlichen Behaarungstyp und die vermehrte Talgproduktion verantwortlich. Das Androgen Testosteron kann durch das Enzym Cytochrom-P450 Aromatase in das Estrogen 17β -Estradiol umgewandelt werden.

Progesteron ist ein wichtiges Gestagen, welches ebenfalls durch die Stimulation von LH ausgeschüttet wird. Es ist eine Zwischenstufe für die Synthese von Testosteron, Estrogen und anderer corticosteroider Hormone und wird auch in der Nebennierenrinde gebildet.

Die Sexualhormone Testosteron und Estrogen und das Gestagen Progesteron werden im Plasma zum größten Teil durch Bluteiweiße transportiert. Bindungsproteine sind das sehr fest bindende SHBG (Sexualhormon bindendes Globulin), sowie das locker und unspezifisch bindende Albumin. Nur etwa 2 % der Steroide liegen frei im Plasma vor und sind damit physiologisch aktiv.

Von beiden Geschlechtern werden Estrogene und Testosteron gebildet, allerdings in unterschiedlichen Mengen. Beim Mann ist Testosteron das wichtigste im Blut vorkommende Androgen (C_{19} -Steroidhormon). Es werden täglich 6 - 7 mg Testosteron synthetisiert, wovon mehr als 95 % aus dem Hoden stammen. Der Rest wird in der Nebennierenrinde gebildet (Renz-Polster und Braun, 2000).

Die Synthese der Sexualhormone findet in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum der Leydig-Zellen statt. Die gemeinsame Grundsubstanz für die Entstehung aller Steroide ist das Cholesterin. Es wird

entweder über einen LDL-Rezeptor aufgenommen oder innerhalb der Leydig-Zellen aus Acetat synthetisiert (Abb. 3)

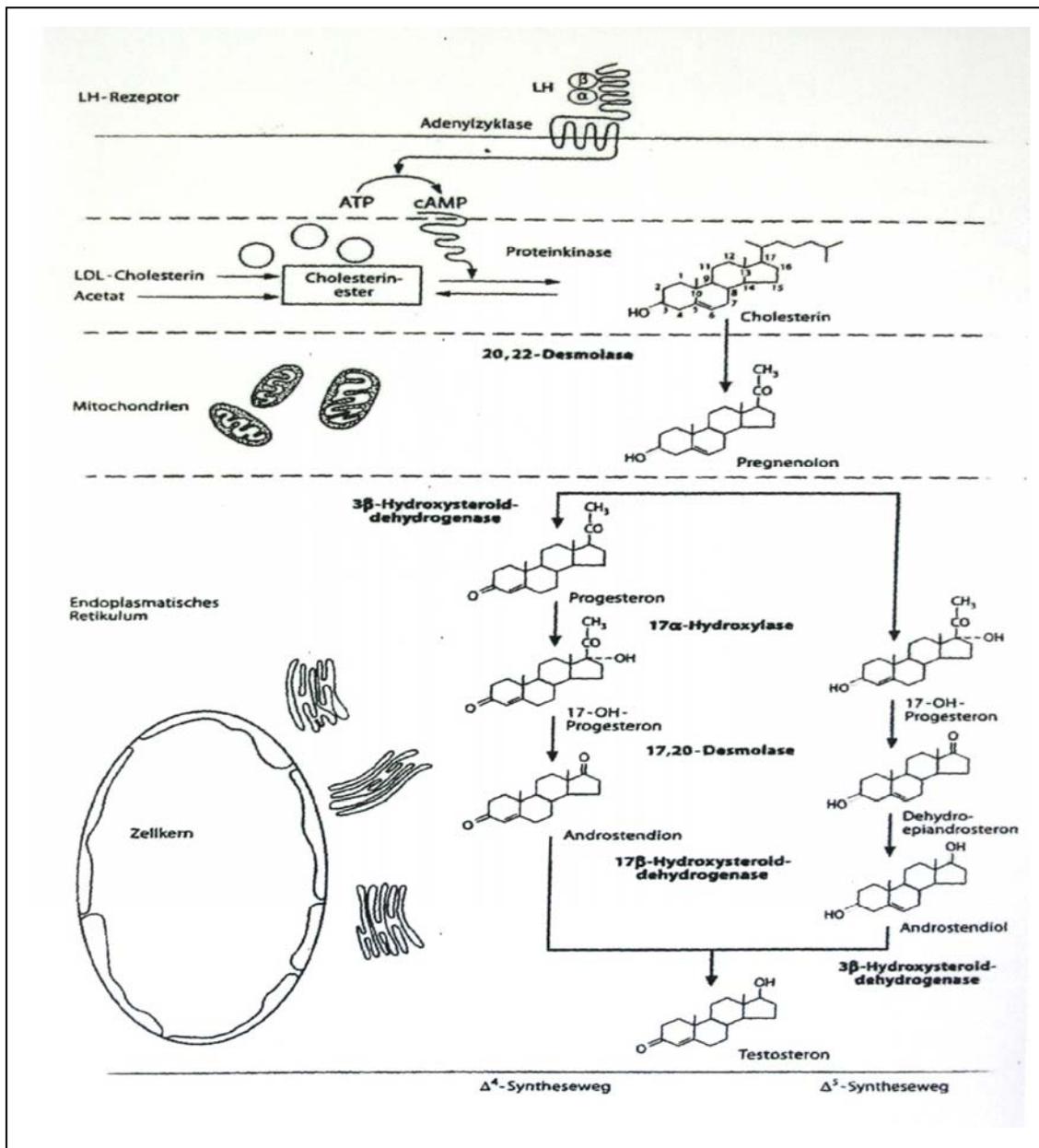


Abb. 3: Steroidbiosynthese in den Leydig-Zellen des Hodens

(aus Nieschlag et al., 1999: Physiologie der Hodenfunktion, Springer Verlag, Heidelberg)

In allen Spezies ist der erste limitierende Schritt der Steroidogenese die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon durch das Enzym 20,22-Desmolase in den Mitochondrien. Limitierend ist hierbei die Aufnahme des Cholesterins in die Mitochondrien (Payne und O'Shaughnessy 1996). Alle Faktoren, welche die Menge des vorhandenen Enzyms regulieren, beeinflussen dadurch die Steroidogenese

(Le Goascolne et al., 1987). Pregnenolon wird danach in das glatte endoplasmatische Retikulum transportiert und dort durch das Enzym 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β HSD) in Progesteron umgewandelt, welches selbst das wichtigste Gestagen darstellt. Aus Progesteron kann einerseits Cortisol und andererseits 17 α -Hydroxyprogesteron durch das Enzym 17 α -Hydroxylase gebildet werden. Im nächsten Schritt wird mit Hilfe des Enzyms 17,20-Desmolase Androstendion oder Dehydroepiandrosteron synthetisiert. Androstendion wird durch 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Testosteron metabolisiert. Aus Dehydroepiandrosteron wird auf einem anderen Weg ebenfalls über das Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Androstendiol und dann durch das Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Testosteron synthetisiert. Die Biosynthese des Estradiols entsteht aus Testosteron und Androstendion durch das Enzym P450-Aromatase (Payne und O'Shaughnessy 1996).

Androgene steuern die Geschlechtsentwicklung in der Embryonalzeit und der Pubertät, regulieren die Spermatogenese und somit die Fertilität und sind für die Libido von entscheidender Bedeutung. Ein Androgenmangel in der Fetalperiode führt zu Anlagedefekten des Genitals bis hin zum Pseudohermaphroditismus masculinum (männlicher Genotyp, weibliches Genital). Ein zu niedriger Androgenspiegel in der Pubertät hat das Ausbleiben des Stimmbruchs, einen eunuchoiden Hochwuchs und eine verminderte Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale zur Folge. Der Androgenmangel beim Erwachsenen bedingt eine Hodenhypoplasie mit mangelhafter oder fehlender Spermio-genese und Azoo- oder Oligozoospermie. Die Libido ist gesenkt, die Körperbehaarung reduziert und die Männer haben meist eine Gynäkomastie. Der Körperbau, die Stimmlage und die Penisgröße sind normal. Die Ursache für einen Hypogonadismus ist meist gonadalen Ursprungs. Da gegenregulatorisch die Gonadotropine der Hypophyse und des Hypothalamus erhöht sind, spricht man auch vom hypergonadotropen Hypogonadismus (Renz-Polster und Braun, 2000).

Das Klinefelter Syndrom mit dem Karyotyp XXY ist beim Mann die häufigste Form eines hypergonadotropen Hypogonadismus. Hierbei führt ein Defekt in den Gonaden nicht zur Proliferation der Samenkanälchen, sondern zu deren Fibrosierung und Hyalinisierung und dadurch bedingten Azoospermie und Infertilität. Durch die ständige Stimulation des LH ist Estradiol erhöht und Testosteron durch einen

gleichzeitigen Leydig-Zell-Defekt erniedrigt. Die erhöhten Estradiolspiegel bewirken eine Feminisierung und Gynäkomastie des Mannes (Renz-Polster und Braun, 2000). Die Leydig-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der gesunden Entwicklung und Fortpflanzungsfähigkeit des Mannes. Sie sind jedoch sehr empfindlich gegenüber schädlichen Einflüssen aus der Umwelt (Schlumpf und Lichtensteiner, 1999).

Die in dieser Arbeit untersuchten Schadstoffe werden als Umwelthormone oder „endocrine disrupters“ bezeichnet. Diese können an Steroidrezeptoren binden, welche sich in der Zelle befinden, und eine estrogene oder antiestrogene Wirkung auf die Hormonrezeptoren im Körper ausüben. Die toxischen Wirkungen dieser Substanzen können sich prätestikulär, testikulär oder posttestikulär äußern. Angriffspunkte sind hierbei entweder der hypothalamisch-hypophysär-gonadale Regelkreis, die Spermatogenese oder die Spermatozoenreifung im Nebenhoden. Im Hoden binden Estrogene oder endocrine disrupters zuerst im nM-Bereich an die Estrogenrezeptoren, welche sich im Zellinneren befinden. Durch die Aktivierung des Rezeptors wird ein Estrogen-vermitteltes Protein bilden, welches die Enzyme der Testosteronsynthese hemmt (Schlumpf und Lichtensteiner, 1999). Im μM -Bereich binden die Schadstoffe dagegen direkt an die Enzyme der Testosterosynthese und bewirken dort eine kompetitive Hemmung oder Aktivierung (Wuttke et al., 1999). Verschiedene Organchlorverbindungen z. B. Dioxine oder PCB binden an den Ah-Rezeptor (Arylhydrocarbonhydroxylase), wodurch vermehrt Cytochrom-P450 Enzyme in der Leber gebildet wird. Das aktivierte Cytochrom-P450 kann zum vermehrten Abbau von Hormonen führen (Schlumpf und Lichtensteiner, 1996). Durch das Blut gelangen die Schadstoffe in die Hypophyse, bewirken dort eine direkte Hemmung der Estrogenrezeptoren und darüber eine verminderte LH-Ausschüttung. Die wissenschaftliche Forschung zeigt, dass diese Stoffe in hormonell gesteuerte Prozesse eingreifen und somit möglicherweise die sexuelle Entwicklung stören oder zu einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen führen können (Degen et al., 1999). Eine wichtige Rolle bei der Schädigung der Leydig-Zellen spielen jedoch der Zeitpunkt der Einwirkung von Substanzen, die Dosis der Noxe und die Spezies (Degen et al., 1999).

Zur Prüfung der estrogenen und antiestrogenen Aktivität können verschiedene in vivo und in vitro Methoden herangezogen werden. Sie besitzen unterschiedliche Empfindlichkeit und Aussagekraft. In vivo Testsysteme haben den Vorteil, dass sie bei der Beurteilung der estrogenen Wirkungsstärke die Resorption, Verteilung und

Ausscheidung eines Stoffes im Körper mit berücksichtigen. Dies macht sie bei der Bestimmung der Expositionshöhe und der Risikoabschätzung unverzichtbar. In vitro-Systeme eignen sich dagegen vorrangig zur Prüfung von Stoffen und einer ersten Schätzung ihrer hormonellen Aktivität (Degen et al., 1999). Sie sind sehr hilfreich zur Prüfung, ob eine Substanz direkt schädigend auf eine Zelle wirkt oder erst deren Metabolit. Sie eignen sich sehr gut zur Analyse des Schadstoffmechanismus. Außerdem sind z.B. die in den in vitro Testsystemen verwendeten Krebszellen von Ratten länger lebensfähig, robuster und somit einfacher in der Handhabung.

1. 1 Die Bedeutung der Estrogenrezeptoren

Androgene und Estrogene gehören in die Gruppe der Steroidhormone. Während im Hoden vorwiegend Testosteron als Endprodukt vorhanden ist, wird im Ovar vor allem Estradiol gebildet. Die Steroidhormonrezeptoren befinden sich im Zytoplasma von Zellen. Dorthin diffundieren die hydrophoben und daher Zellmembran permeablen Hormone und binden an den entsprechenden Rezeptor, der dadurch aktiviert wird (Schlumpf und Lichtensteiner, 1999).

Estrogenrezeptoren sind in allen Organen in unterschiedlicher Anzahl vorhanden. Kuiper et al. (1996) fanden heraus, dass es zwei verschiedene Estrogenrezeptoren gibt ($ER\alpha$ und $ER\beta$), die in unterschiedlichen Organen in verschiedenen Mengen gebildet werden (Kuiper et al., 1996). Der Uterus und das Vaginalepithel scheinen nur Typ α -Estrogenrezeptoren zu bilden, während alle anderen Organe (außer einige Gehirnareale) beide Rezeptortypen besitzen (Bryant und Dere, 1998). Estrogenrezeptoren sind außerdem in den verschiedenen Zelltypen der Reproduktionsorgane vorhanden. In den Leydig-Zellen, den Ductuli efferentes und dem Epididymis werden die α -Typen des Estrogenrezeptors exprimiert (Fisher et al., 1997; Sar und Welsh, 2000), während in den Sertoli-Zellen, den Spermatogonien, pachytänen Spermatozyten, Spermatischen, der Prostata und dem Epididymis der kürzlich entdeckte β -Typ exprimiert wird (Saunders et al., 1998; Ans et al., 1999).

Hormone können agonistische oder antagonistische Wirkungen an Estrogenrezeptoren ausüben. Durch Studien mit Estrogenrezeptor-knock-out-Mäusen (ERKO-Mäusen) konnten wichtige Informationen über $ER\alpha$, $ER\beta$ und $ER\alpha\beta$ gewonnen werden (Lubahn et al., 1993; Krege et al., 1998; Couse et al., 1999). Durch Manipulation an embryonalen Stammzellen waren die Mäuse nicht fähig,

α -Typ Estrogenrezeptoren zu bilden und dadurch infertil (Hess et al., 1997). Der Grund für die Infertilität lag in einer Unterbrechung der Flüssigkeitsabsorption in den Ductuli efferentes des Nebenhodens. Dies führte schließlich zur Ablösung oder Zerstörung des Keimepithels. Obwohl die β -Typ Estrogenrezeptoren von ER α KO-Mäusen exprimiert wurden, konnten diese nicht die Funktion der ER α kompensieren. Eine Studie von Smith et al. (1994) bei Männern zeigte, daß eine Mutation, welche das ER α -Gen inaktivierte, zu einer normalen Anzahl an Spermatozoen führte. Ihre Lebensdauer war jedoch verkürzt und der Patient war unfruchtbar. In einem weiteren Versuch wurden die Gene für die α - und β -Rezeptoren ausgeschaltet (α , β -ERKO-Maus). Die sich daraus entwickelten Mutanten zeigten eine normale Entwicklung der Reproduktionsorgane, aber sie waren infertil. Die Follikel in den Ovarien der weiblichen Tiere zeigten jedoch Strukturen, die den Tubuli seminiferi sehr ähnlich waren (Couse et al., 1999).

Xenoestrogene besitzen die Fähigkeit an Estrogenrezeptoren in vitro und in vivo zu binden. Da auch in den im Hoden lokalisierten Leydig-Zellen Estrogenrezeptoren vorhanden sind, können Xenoestrogenen auch hier endogene Hormone verdrängen und so das hormonelle Gleichgewicht beeinflussen (Thierfelder, 1995; Korach et al., 1988). Diese Fremdstoff-Rezeptorkomplexe sind jedoch nicht völlig identisch, mit denen der natürlichen Hormone. So können Xenoestrogene andere Wirkungen an den Estrogenrezeptoren auslösen (Schlumpf und Lichtensetiner, 1999). Ein weiterer Angriffspunkt für Umweltchemikalien und auch Schwermetalle sind die für die Steroidogenese benötigten Enzyme. Umweltchemikalien können in den Hormonstoffwechsel eingreifen, indem sie die für die Steroidproduktion wichtigen Enzyme hemmen oder aktivieren (Wuttke et al., 1999).

1. 2 Kriterien zur Auswahl der Schadstoffe

Xenoestrogene oder „endocrine disrupters“ stehen immer mehr im Mittelpunkt von Diskussionen, da der Verdacht geäußert wurde, dass sie für die Reproduktions- und Entwicklungsstörungen bei Tieren und den Rückgang der Spermienproduktion beim Mann mitverantwortlich sind (Carlsen et al., 1992; Sharpe et al., 1993; Toppari et al., 1996).

Eine Vielzahl von in vivo Versuchen ebenso wie die Beobachtungen von Tieren in der Natur belegen die schädigende Wirkung von Umwelthormonen. Bei der Ratte löste z.B. die Exposition mit Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) eine selektive Zerstörung der Leydig-Zellen aus (Barlett et al., 1986). Die Aufnahme von Rotklee, mit einem hohen Gehalt an Isoflavonen (Phytoestrogenen) führte bei Schafen zur Infertilität (Price und Fenwick, 1985). Da noch keine eindeutigen Ergebnisse über die Wirkung von Umwelthormonen auf die Reproduktionsorgane vorliegen, stehen sie immer mehr im Interesse der Forschung.

In dieser Arbeit wurden das endogene Hormon 17β -Estradiol, das synthetische Estrogen Ethinylestradiol, das Phytoestrogen Daidzein und das Xenoestrogen Bisphenol A untersucht.

Die wasserlöslichen Metallsalze Quecksilberdinitrat und Natriumarsenit eignen sich besonders gut, um toxische Einflüsse auf Leydig-Zellen zu überprüfen, da auch schon andere in vivo und in vitro Versuche deren Einflüsse im verwendeten Konzentrationbereich auf die Reproduktionsorgane belegt haben (Larochette et al., 1999; Schuppe et al., 1999). Sie dienen deshalb als Positivkontrolle für das Testsystem. Es wurden die Salze des Metalls Quecksilber sowie des Halbmetalls Arsen untersucht. Während die Xenoestrogene an Estrogenrezeptoren binden oder die Enzyme hemmen bzw. aktivieren, wirken Quecksilberionen und Arsenit (III) nur am Enzymsystem.

1.2.1 Xenoestrogene

1.2.1.1 17 β -Estradiol und Ethinylestradiol

Fast jede Zelle im menschlichen Körper besitzt Estrogenrezeptoren. Einige Organe stehen besonders unter dem Einfluss von Estrogenen und verändern sich krankhaft bei Estrogenmangel.

Durch Beobachtungen im Tierreich und in einigen Studien an Labor-Ratten wurden negative Einflüsse des Estrogens auf die männliche Entwicklung vermutet (Colborn et al., 1993). Colborn et al., (1993) untersuchten Alligatorenmännchen nach einem Industrieunfall in Florida, wobei das Pestizid Dicofol freigesetzt wurde. Sie stellten ein paar Jahre später verkleinerte Penis fest und die Alligatoreneier blieben sehr oft unbefruchtet. Bei einigen Möwen, die sich von Fischen ernährten, wurden mehr Weibchen als Männchen bei den Nachkommen gezählt (Colborn et al., 1993). Ratten zeigten ein vermindertes Sexualverhalten nach pränataler Gabe von Dioxin (Schlumpf und Lichtensteiner, 1999). Diese Studien und Beobachtungen gaben Anlass dazu, die Forschungen mit Xenoestrogenen zu intensivieren.

Während 17 β -Estradiol ein endogenes Hormon ist, gehört Ethinylestradiol in die Gruppe der synthetische Estrogene und wird oft als orales Kontrazeptivum oder in der Menopause eingenommen. Sie werden von Mensch und Tier ausgeschieden, sammeln sich im Abwasser an, verbleiben im Klärschlamm und gelangen so in die Oberflächengewässer. Im Laborversuch genügte schon eine Menge von 0.5 ng/ml Ethinylestradiol, um einen Anstieg von Vitellogenin, einem weiblichen Protein für die Eireifung, in männlichen Forellen auszulösen (Purdom et al., 1994). Untersuchungen mit Belebtschlamm-Modellen deuten darauf hin, dass Ethinylestradiol nicht oder nur langsam abgebaut wird (Turan, 1995). Trinkwasserproben in Süddeutschland ergaben schon 1977 Ethinylestradiolkonzentrationen von bis zu 22,5 ng/ml (Rurainsky et al., 1977).

Nach der Umwandlung des Testosterons zu Estradiol katalysiert durch das Enzym Aromatase in den Nervenzellen, bindet Estradiol an die Estrogen-Rezeptoren und steuert dadurch die neuronale Differenzierung. Synthetische Hormone dagegen können sexuelle Entwicklungsprozesse stören (Schlumpf und Lichtensteiner, 1996). Bei der Ratte wurde z. B. eine Abschwächung des männlichen Sexualverhaltens nach pränataler Gabe von Dioxin beobachtet (Schlumpf und Lichtensteiner, 1996).

Ein Beispiel für ein synthetisches Estrogen ist Diethylstilbestrol (DES). Es wurde in den 50-iger Jahren in den USA Frauen zur Erhaltung der Schwangerschaft verabreicht. Daraufhin wurde bei den Müttern eine erhöhte Inzidenz von Brustkrebs festgestellt (Greenberg et al., 1984). Die DES-Töchter erkrankten häufiger an einer vaginalen Adenose und anderen Veränderungen des Genitaltraktes (Herbst, 1981), während DES-Söhne vermehrt Epididymis-Zysten, Kryptorchismus und eine Abnahme der Spermienqualität aufwiesen (Gill et al., 1987). Auch beim 17β -Estradiol wurden hemmende Effekte auf die Steroidogenese der Leydig-Zelle durch z.B. Hemmung des Cytochrom-450-Komplexes nachgewiesen (Brinkmann et al., 1980). So führte eine Exposition von Ratten mit Estradiol bei den männlichen Nachkommen zu einer Reduktion der Testes und Epididymis sowie zur Atrophie der Zellen im Interstitium, Degeneration von Samenkanälchen und zur reduzierten Spermienproduktion (Cook et al., 1998).

1.2.1.2 Daidzein

Daidzein und Genistein sind die bekanntesten Isoflavone und gehören in die Gruppe der Phytoestrogene. Isoflavone werden von Pflanzen, z.B. den Sojabohnen, gebildet und haben eine estrogenähnliche Wirkung. Atanassova et al. (2000) beschrieben nach Zugabe von Phytoestrogenen (Genistein) eine Senkung des FSH-Levels und einen erhöhten Keimzellapoptoseindex. Duncan et al. (1999) konnten belegen, dass geringe Dosen an Isoflavonen den LH- und FSH-Level in der periovulatorischen Phase der Frau senkten und hohe Dosen zu einer Abnahme der Estrogenwerte während der folliculären Phase führten.

Ein aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Cimifuga racemosa*) gewonnener Extrakt enthält ein schwach estrogen-wirksames Isoflavon (Formonentin), welches im Körper zu Daidzein metabolisiert wird (Jarry et al., 1995). Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es die LH-Sekretion aus der Hypophyse supprimiert (Düker et al., 1991). Diese verschiedenen Studien zeigen, daß Phytoestrogene estrogenagonistische und estrogenantagonistische Wirkungen aufweisen können (Fotsis et al., 1995). Daidzein bindet im Vergleich zu 17β -Estradiol mit einer viel geringeren Affinität an den β -Typ des Estrogenrezeptors ($ER\beta$) und einer leicht geringeren Affinität an den α -Typ des Estrogenrezeptors ($ER\alpha$), übt jedoch die gleiche transaktivierende Wirkung wie 17β -Estradiol auf den Rezeptor aus. Die antiestrogene Wirkung von Sojaprodukten scheint hemmend auf die Entwicklung von

Mamma- und Prostatakarzinomen zu wirken (Cassidy, 1996). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sie osteo- und kardioprotektiv sind (Wuttke et al., 1999). Phytoestrogene werden aber auch zu den „endocrine disrupters“ gezählt und beeinflussen die Lebensqualität des Menschen. Der bekannteste estrogene Effekt von Phytoestrogenen ist die Süßkleeerkrankung (sweet clover disease), die bei australischen Schafen bei Aufnahme von Klee mit einem hohen Gehalt an Isoflavonen zur Infertilität führte (Price und Fenwick, 1985). In Tierversuchen an Ratten wurde beobachtet, dass Daidzein die LH-Produktion senkte. Daraus resultiert eine verminderte Testosteronproduktion der Leydig-Zelle (Düker et al., 1991).

1.2.1.3 Bisphenol A

Bisphenol A ist ein Monomer von Polykarbonatplastik und wird in der Verpackungsindustrie u.a. zur Beschichtung der Innenseite von Konservendosen genutzt (Krishnan et al., 1993). Bisphenole reichern sich in der Nahrungskette an und man findet ihre Spuren fast überall. In mehreren Studien wurde in den letzten Jahren der Zusammenhang zwischen Brustkrebs und Umweltchemikalien wie Bisphenol A untersucht (Falck et al., 1992; Hunter et al., 1997). Eine Zelllinie von Mammakarzinomzellen (MCF-7-Zellen) proliferiert vermehrt unter Einfluss von Bisphenol A (Hunter et al., 1997). Die einen Ergebnisse wiesen auf ein vermehrtes Wachstum von Mammakarzinomzellen hin, während andere Studien behaupteten, dass mit der Nahrung aufgenommene Xenoestrogene die Entstehung von Brustkrebs verhindern (Toppari et al., 1996). Es gibt bis jetzt jedoch noch keine klaren Hinweise darauf, dass Bisphenol A Brustkrebs verursacht (Wuttke et al., 1999). In vivo Versuche an Ratten zeigten, dass Bisphenol A, bei physiologisch relevanten Dosen ($\mu\text{g}/\text{kg KG}$) während der Fötalentwicklung, geringe morphologische Veränderungen an den Reproduktionsorganen verursacht und zu einer Verringerung der Spermienproduktion führt (vom Saal et al., 1998; Fisher et al., 1999; Welshons et al., 1999).

1.2.2 Metallionen

1.2.2.1 Quecksilberdinitrat

Quecksilber gehört in die Gruppe der Schwermetalle. Quecksilbernitrat ist ein weißes Salz und ist zusammen mit Quecksilberchlorid und Phenylquecksilberacetat in Desinfektionsmitteln vorhanden. Als Saatbeizmittel werden hauptsächlich organische Quecksilberverbindungen, wie zum Beispiel Methyl-, Ethyl- oder Phenylquecksilber verwendet. In der Industrie werden Quecksilber und seine Verbindungen als Emissionen in die Umwelt freigesetzt. Die toxischen Wirkungen von Quecksilberionen beruhen auf der Reaktion der Substanz mit freien Sulfhydrylgruppen in Proteinen. Da schwefelhaltige Enzyme fast ubiquitär im Körper vorkommen, sind die Symptome einer Quecksilbervergiftung äußerst vielfältig. Chronische Quecksilbervergiftungen führen zur Schädigung von Gehirn (Tremor, Krämpfe) und Niere (Nierenversagen). Des Weiteren konnten Stoffwechselstörungen, Membranschäden und Schäden am Erbgut nachgewiesen werden (IPCS/WHO, 1997).

Jährlich gelangen durch menschliche Aktivitäten zwischen 30.000 und 50.000 Tonnen des Metalls in die Umwelt (IPCS/WHO 1997). Quecksilberhaltige Schlämme erreichen über Fließgewässer die Meere. Von den Meeresbewohnern wird es über die Kiemen aufgenommen und akkumuliert. Über die Nahrungsaufnahme von Meerestieren kann es beim Menschen zu akuten Vergiftungserscheinungen oder zu Langzeit- und Fetusschäden kommen. Ein bekanntes Beispiel ist die Verseuchung einer japanischen Meeresbucht (Minimata-Katastrophe). Quecksilberhaltige Industrieemissionen gelangten in der Nachkriegszeit um 1953 ins Meer, worauf es zu einer Massenvergiftung der Bevölkerung mit organischem Methylquecksilber kam. Quecksilber und Blei gelten als gesicherte Reproduktionstoxine. Bei Untersuchungen von beruflich exponierten Menschen mit Quecksilber wurden schwere Schädigungen der Hoden, sowie eine herabgesetzte Libido festgestellt (Schuppe et al., 1999).

1.2.2.2 Arsenit

Arsen ist ein Halbmetall und kommt als Spurenelement in allen Lebewesen und in der Natur vor (Erdkruste, Wasser). Arsen und seine Verbindungen werden von Haut, Nägeln und Haaren gebunden und auf diese Weise nur sehr langsam ausgeschieden. Arsenit wird bei der Schädlingsbekämpfung eingesetzt.

Es ist für seine toxischen Wirkungen bekannt und schon seit vielen Jahren erforscht. Bei chronischer Exposition mit Arsenit treten Hautverfärbungen, Lähmungen und Krebs auf. Das in dieser Arbeit verwendete Natriumarsenit induziert eine zelluläre Stressreaktion, da es vor allem die Mitochondrien angreift und die Membranpermeabilität verändert (Larochette et al., 1999).

1.3 Kriterien zur Auswahl der Zellparameter

Bei der Auswahl der Zellparameter sollten alle Funktionen und Aufgaben der Leydig-Zelle berücksichtigt werden.

Da im Hoden nur 4 % der testikulären Zellen Leydig-Zellen sind, ist es schwierig sie für eine Primärkultur zu isolieren. Darüber hinaus werden sie schnell unempfindlich gegenüber einer Stimulation mit LH oder hCG und verlieren zum Teil ihre Fähigkeit zur Steroidogenese. Aus diesen Gründen werden vermehrt immortalisierte Leydig-Zellen verwendet, die jedoch eine veränderte Physiologie im Vergleich zu den Leydig-Zellen der Primärkultur aufweisen. R2C-Leydig-Zellen stammen aus einem Leydigzelltumor und bilden unabhängig von LH oder cAMP vor allem die Steroide Progesteron und 20α Hydroxyprogesteron (Freeman, 1987). Sie weisen noch eine basale Produktion des Androgens Testosteron auf. R2C-Leydig-Zellen sind eine sehr homogene Population, die sich in einer Kultur gut fortpflanzen lassen und für Manipulationen gut geeignet sind (Ascoli, 1981).

1.3.1 Testosteron- und Progesteronproduktion der Leydig-Zelle

Das wichtigste Hormon der Leydig-Zelle ist das Testosteron, welches auch den zentralen, spezifischen Marker für die Funktion der Leydig-Zelle darstellt. Durch die veränderte Physiologie immortalisierter Leydig-Zellen kann jedoch mehr Progesteron als Testosteron gebildet werden. Somit dient Progesteron in dieser Versuchsreihe auch als ein wichtiger Marker für die Zellaktivität. Die hier verwendeten R2C-Leydig-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Progesteronproduktion und eine basale Testosteronsynthese aus, die keine Stimulation durch LH benötigt (Freeman, 1987).

Progesteron ist eine wichtige Zwischenstufe für die Synthese von Testosteron, Estrogenen und anderen corticosteroidalen Hormonen.

1.3.2 Laktatproduktion der Leydig-Zelle

Laktat und Pyruvat sind die Endprodukte der anaeroben Glykolyse im Stoffwechsel jeder Zelle. Laktat gilt in Zellen als bevorzugtes Energiesubstrat zum Beispiel für die Spermatogenese. Die Veränderung der Laktatsynthese nach Zugabe von Noxen ist ein sensitiver, aber unspezifischer Marker für die Störung der Leydig-Zelle. Dabei korrelieren die für die Noxen bereits bekannte in vivo Toxizität mit der Laktatproduktion und führen in den Zellen zum Anstieg der Synthese von Laktat (Williams und Foster 1988). Der zur Messung des Laktats verwendete gekoppelte Enzymassay ist ein seit langem erprobtes und standardisiertes Verfahren (Noll, 1984).

1.3.3 Vitalität der Leydig-Zelle

Der MTT(3-[4,5-dimethyl-2]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid)-Assay ist eine sehr sensitive Methode, um den Abfall der Vitalität in der Leydig-Zelle zu untersuchen. MTT ist ein gelber Farbstoff, welcher von lebenden Zellen aufgenommen und mit Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem blauen Formazanprodukt umgewandelt wird. Die Intensität des blauen Farbstoffes ist somit ein Maß für die Zellvitalität der untersuchten Zellkultur. Die Zellvitalität ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und der Zahl der Mitochondrien und sinkt bei geschädigten Zellen ab (Mosmann, 1983).

2. Zielsetzung der Arbeit

1. Untersuchung des Einflusses ausgewählter Umwelthormone mit estrogenen oder antiandrogenen Wirkung auf die Funktion isolierter Leydig-Zellen im Rattenmodell. Untersucht wurden das endogene Hormon 17β -Estradiol, das oral wirksame Ethinylestradiol, das Xenoestrogen Bisphenol A und das Phytoestrogen Daidzein. Als Kontrolle dienten die Schwermetallionen Quecksilberdinitrat und Natriumarsenit
2. Für die zu untersuchenden Stoffe sollten etablierte Testsysteme verwendet werden, um anhand der Konzentration-Wirkungskurven quantitative Aussagen über die toxische Wirkung von Xenoestrogenen machen zu können. Die untersuchten Parameter sollten die Zellfunktion weitgehend erfassen.
3. Zum Vergleich der Wirkstärke von Substanzen sollte der Konzentrationsbereich der Noxen mit den im Serum gefundenen Werten beginnen, da diese wahrscheinlich einer chronischen Exposition mit Umwelthormonen entsprechen. Höhere Konzentrationsbereiche sollten im μM -Bereich liegen, um auch nicht-Rezeptor-vermittelte Effekte zu finden.
4. Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines in vitro Testsystemes mit aussagekräftigen Parametern zur Untersuchung der Wirkung von hormonellen Substanzen auf die männliche Fertilität am Beispiel der Testosteron- und Progesteronproduktion der Leydig-Zelle. Dabei sollte das verwendete System möglichst sensibel auf die Zugabe von Noxen reagieren. Außerdem sollten die verwendeten Leydig-Zellen reproduzierbare Ergebnisse liefern und einfach in der Handhabung sein.

3. Material und Methoden

Die bei dieser Arbeit verwendeten R2C-Zelllinien (ATCC-CCL-97) sind immortalisierte Leydig-Zellen aus Leydig-Zelltumoren der Ratte. Sie wurden von der ATCC (American Type Tissue Culture Collection) zur Verfügung gestellt.

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität eingesetzt (pro analysi oder biochemisch rein). Es wurden speziell für die Zellkultur getestete Medien und Zusätze zur Herstellung der Leydig-Zellkulturen benutzt.

Die in dieser Arbeit getesteten Substanzen stammen von folgenden Firmen:

17 β -Estradiol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Nr. E-2758), 17 α -Ethinylestradiol (Sigma, Nr. E-4876, 98 %), Bisphenol A (Sigma, Nr. I-0635), Daidzein (Sigma, Nr. D-7802, 98 %), Natrium-m-Arsenit (Sigma, Nr. S-7400, 99 %), Quecksilberdinitratmonohydrat (Aldrich, München, Deutschland, Nr. 23,042-1)

3.1 Kultur der immortalisierten R2C-Leydig-Zellen

Alle Arbeitsschritte mit Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen, um mikrobielle Kontamination zu vermeiden.

Vor Benutzung der Sterilbank (Köttermann-Kochen GmbH, Hänigsen, Deutschland) wurde das Gebläse angeschaltet und die Sterilbank 15 Minuten mit UV Licht bestrahlt. Danach wurde sie nochmals mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert. Ebenso wurden alle nicht steril verpackten Gegenstände und die Hände mit Alkohol (70 %-ig) gesäubert. Chemikalien wurden unter der Sterilbank sterilisiert, durch Filtration in einem 0.2 μ m Filter (Nalgene, Nex York, USA). Die benötigten Medien wurden im Wasserbad (Köttermann GmbH) bei 37° C vorgewärmt. Vor Arbeitsbeginn wurde das UV-Licht ausgeschaltet.

3.1.1 Auftauen der Zellen

Vor Versuchsbeginn wurde ein Nährmedium für die R2C-Leydig-Zellen hergestellt, die Leydig-Zellen aufgetaut und in Kulturflaschen zur weiteren Inkubation überführt.

Chemikalien:	Aufbewahrung	Hersteller
500 ml Ham F-10 Medium	Kühlraum	Gibco, Eggenstein, Deutschland Nr.:31550-0231
Zusätze:		
75 ml Pferdeserum	-20° C	Gibco Nr.: 16050-098
15 ml fetales Kälberserum (FCS)	-20° C	Gibco Nr.: 10106-078
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lsg (10.000 IU/ml/ 10.000 µg/ml)	-20° C	Gibco Nr.: 15140-031
5 ml L-Glutamin (200 mM)	-20° C	Biochrom, Berlin, Deutschland, Nr.: K0282

- Je nach Anzahl der Zellen, die aufgetaut werden sollen, wurden neue Falconröhrchen (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) für 15 ml und 200 ml Falcon® Zellkulturflaschen mit „vent-cap“ Verschluss bereitgelegt und mit R2C, Datum, Nummer der Passage und Name beschriftet.
- In jedem Falconröhrchen (15 ml) wurden 10 ml und in jeder Kulturflaschen 20 ml Nährmedium aufgelöst.
- Die eingefrorenen R2C-Leydig-Zellen (ATCC-CCL-97; Shin et al., 1968; Stocco et al., 1995) wurden mit Ham F-10 schnell bei 37° C aufgetaut und in die Falconröhrchen überführt.
- Die Röhrchen wurden in eine Zentrifuge gestellt und bei 400 Umdrehungen = 27 x g pro Minute fünf Minuten bei RT zentrifugiert.
- Danach wurde der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt, während die Zellen am Boden der Falconröhrchen verblieben.
- Auf diese Zellen wurden 2 ml Ham F-10 gegeben.
- Mit einer sterilen 2 ml Pipette wurden die Zellen ein paar Mal aufgesaugt, bis alle Zellen voneinander gelöst waren und wurden danach in die bereitgestellten Kulturflaschen überführt.

3.1.2 Passagieren von R2C Kulturen

Die Zellen wurden mehrere Tage in einen 37°C warmen Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) unter 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle 2 Tage musste das Ham F-10 Medium gewechselt werden. Sobald die Zellen nahezu konfluent gewachsen waren, wurden sie umplattiert. Dabei wurden die R2C-Zellen so verdünnt, dass der Zellinhalt aus einer Kulturflasche auf drei neue Flaschen verteilt werden konnte.

Chemikalien:

- PBS (Phosphate Buffered Saline) (Oxoid Ltd., Basingstoke, England): eine Tablette wurde mit 100 ml destilliertem Wasser in einem Becherglas unter Verwendung eines Magnetrührer aufgelöst. Vor der Anwendung wurde das PBS sterilfiltriert.
- Trypsin (Biochrom KG): 1:250 in PBS, 0.25 % (w/w), w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom)
- Ham F-10 Nährmedium (GIBCO Invitrogen GmbH)

Alle Medien wurden bei 4° C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37° C aufgewärmt.

Durchführung:

- Absaugen des Mediums mit einer Pipette
- 10 ml PBS vorsichtig am Rand der Kulturflasche einfüllen und über den Zellrasen schwenken
- Mit einer Pipette absaugen
- 3 ml Trypsin hinzugeben und über den Zellrasen schwenken
- Absaugen und 4 Minuten in den Brutschrank stellen.
- In der Zeit wurden drei neue Kulturflaschen mit jeweils 20 ml Nährmedium aufgefüllt.
- Zellen aus Brutschrank nehmen, wieder 10 ml PBS auffüllen und resuspendieren.
- Danach jeweils 2 ml der Zellsuspension in die Kulturflaschen mit dem frischen Medium geben.

Wechsel des Nährmediums:

Das Ham F-10 Medium diente als Nahrung für die Zellen und musste aus diesem Grund nach 2 Tagen erneuert werden. Dazu wurde es mit der Pipette abgesaugt und durch 20 ml neues Medium ersetzt. Als die Zellen konfluent auf dem Boden der Kulturflasche gewachsen waren, wurden sie für die Versuche auf die 24 Well-Kulturschale (Primaria, BD Biosciences) umplattiert.

3.1.3 Umplattierung auf die 24 Well-Zellkulturplatten:

- 6 sterile 24 Well-Platten wurden bereitgelegt.
- In jede Vertiefung wurde je 1 ml Nährmedium gefüllt.
- Die Zellen der Kulturflasche wurden wie im vorhergehenden Abschnitt mit PBS und Trypsin behandelt.
- Nach 4 Minuten im Brutschrank wurden wieder 10 ml PBS zugegeben, mit der Pipette abgesaugt und in ein Röhrchen gefüllt.
- Die PBS Lösung wurde mit einer Multipipette aufgesaugt und jeweils 61 µl der Lösung in die 24 Well-Zellkulturplatten gefüllt. (= ca. 50.000 – 60.000 Zellen)
- Danach wurden sie weitere drei Tage bei 37°C inkubiert.

3.2 Inkubation mit Noxen**3.2.1 Ansetzen einer Verdünnungsreihe**

Zunächst wurde eine 1000 ng/ml Stammlösung der jeweiligen Noxe in Ham F-10 hergestellt. Dann wurde eine Verdünnungsreihe von 1000 ng/ml über 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml bis 0,1 ng/ml mit der Noxe direkt im kompletten Nährmedium angesetzt.

Für die Verdünnungsreihe wurde 1 ml der Stammlösung entnommen und in das mit 9 ml Medium gefüllte Falconröhrchen für die 100 ng/ml Verdünnung gegeben. Diese wurde geschüttelt und 1 ml für die 10 ng/ml Lösung entnommen. In gleicher Weise wurde mit den letzten beiden Verdünnungen verfahren.

3.2.2 Inkubation von R2C-Leydig-Zelle mit Noxen

- Jeweils 24 Well-Zellkulturplatten wurden aus dem Brutschrank genommen und bereitgelegt.
- Es wurden in beiden Platten zuerst die 8 Wells der 1000er Verdünnung abgesaugt und jeweils mit der entsprechenden Noxenlösung befüllt.
- Mit allen 5 Verdünnungen (1000 ng/ml bis 0,1 ng/ml) wurde in gleicher Weise verfahren. In die Kontrolle wurde nur Nährmedium gegeben.
- Danach wurden die Zellkulturplatten abermals 3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

In den Zellkulturplatten hafteten die Zellen am Boden während sich im Nährmedium das von den Zellen produzierte Testosteron und Progesteron befand.

Als nächstes wurde der Überstand abgenommen. Dieser Arbeitsschritt musste nicht unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Es wurden Eppendorfcups entsprechend den 24 Well-Platten beschriftet. Danach wurde mit einer Pipette, jeweils ein Milliliter eingestellt, der Überstand aus den Wells abgesaugt und in die Eppendorfcups gefüllt. Dies erfolgte mit allen Zellkulturplatten. In den 24 Well-Zellkulturplatten blieben die Zellen am Boden haften. Die Platten mit den Zellen wurden bis zur Proteinbestimmung im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Der in den Eppendorfcups enthaltende Überstand wurde ebenfalls eingefroren.

3.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben diente als Bezugswert für die zu messenden anderen biochemischen Parameter. Die Messung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay (500-0116, Hercules, CA, USA) unter Verwendung der Methode von Lowry (1951). Dabei band der Farbstoff unspezifisch an die in der Probe enthaltenen Aminogruppen von Proteinen.

Chemikalien:

- Stammlösung aus Rinderserumalbumin (H-9568 Sigma) aus 10 mg/ml Natronlauge/SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- 0.1 % SDS in 0.5 M NaOH (0,5 g SDS Pulver, 250 ml destilliertes H₂O, 250 ml 1M NaOH)
- Lowry-Reagenz A und B (gebrauchsfertige Reagenzlösung)

Mit der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt

1 = 1400 µg/ml ⇒ Stammlösung

2 = 1000 µg/ml ⇒ 100 µl Stammlösung + 40 µl SDS

3 = 600 µg/ml ⇒ 100 µl Stammlösung + 133 µl SDS

4 = 200 µg/ml ⇒ 100 µl Stammlösung + 600 µl SDS

- In die Zellkulturplatten wurden jeweils 200 µl Lysisreagenz (0.1% SDS in 0.5 M NaOH) zugegeben und 30 Minuten unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, zum Lösen der auf dem Boden haftenden Zellen.
- In dieser Zeit wurden die 96-er Mikrotiterplatten beschriftet.
- Die Messung der Proteinbestimmung erfolgte in Doppelbestimmung.
- Standardlösung, Blanks (enthält nur Lysisreagenz) und Proben zu je 20 µl in die Mikrotiterplatten überführen.
- Zugabe von 25 µl Reagenz A pro Well.

- Danach Zugabe von 200 µl Reagenz B und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein Farbumschlag ins blaue, der umso stärker ausfiel, je mehr Protein vorhanden war.
- Messung der Absorption der Lösung am MTP-Reader (EAR 400 ATC SLT-Labinstruments, Wien, Österreich) bei $\lambda = 690 \text{ nm}$ und Bestimmung des Proteingehalts mittels Standardkurve.

Die Standardkurve wurde mit in NaOH+SDS gelöstem Rinderserumalbumin ermittelt und verlief im Bereich von 200 - 1400 µg/ml linear. Die untere Nachweisgrenze lag bei 200 µg/ml.

3.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay

Testprinzip:

Die MTT-Bestimmung diente der Messung der Vitalität der Zellen. MTT (3-[4,5-Dimethyl-2]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid) ist ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, der durch Dehydrogenasen zu einem blau-violetten wasserunlöslichen Formazan-Produkt reduziert wird. Die Umwandlung vollzieht sich nur in lebenden Zellen. Sie spiegelt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wider. Der Farbumschlag ins violette ist außerdem proportional zur Anzahl der Zellen.

Chemikalien:

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- MTT Lösung (für 2 Platten á 24 Wells)
20 mg MTT (Serva) wurden in 20 ml PBS gelöst, eine Stunde auf das Rollband gelegt und dann mittels Spritze und Sterilfilter sterilisiert.
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (1.02931.1000 Merck)

Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn 3 Tage bei 37° C mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen inkubiert.

Durchführung:

- Absaugen des Mediums und Zugabe von 1 ml PBS und 100 µl MTT-Lösung.
- Inkubation für eine Stunde bei 37° C
- Absaugen des Überstandes und Zugabe von 500 µl DMSO.

- Je 200 µl der Probe wurden in die Mikrotiterplatten überführt.
- Messung der Absorption in Doppelbestimmung bei 550 nm unter Subtraktion der Hintergrundabsorption bei 620 nm im MTP Reader EAR 400 ATC.

Je stärker die Konzentration des Farbstoffes, desto höher die Extinktion und damit der Anteil an vitalen Zellen. Die Extinktion sollte einen Wert < 1 enthalten. War dies nicht der Fall, wurden die Mikrotiterplatten mit weiteren 500 µl DMSO verdünnt. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe dargestellt.

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\text{Extinktion (Test)}}{\text{Extinktion (Kontrolle)}} \cdot 100$$

3.5 Progesteron-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA)

Testprinzip:

Der Radioimmuno-Assay ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von antigenen Substanzen in Flüssigkeiten. Radioaktive Antigene (125J-Progesteron) konkurrieren mit nicht radioaktiven (Progesteron aus dem Serum, Standards, Kontrollen) Antigenen um eine begrenzte Anzahl von spezifischen Antikörpern, die sich an der Wandung von Polypropylenröhrchen befinden. Dabei ist die Antigenkonzentration der Probe umgekehrt proportional zu den gebundenen radioaktiven 125-J markierten Antigen/Antikörperkomplexen und somit zur gemessenen Radioaktivität. Die Trennung der freien Antigene von den für die Messung relevanten gebundenen Antigenen erfolgt durch Dekantieren der Flüssigkeit aus dem Röhrchen. Das bei dieser Arbeit benutzte ACTIVETM-Progesteron-Coated-Tube-Kit (DSL 3900, Sinsheim, Deutschland) dient zur quantitativen Bestimmung von Progesteron in Serum oder Plasma.

Chemikalien:

- Progesteron-Standards: A-F (lyophilisiert)
Sie enthielten Progesteron in Serum und Natriumazid als Konservierungsmittel.

Die Konzentrationsbereiche reichten von 0 ng/ml (A) über 0,3 ng/ml (B), 1,0 ng/ml (C), 5 ng/ml (D), 20 ng/ml (E) bis 60 ng/ml (F).

Standard A wurde in 1 ml destilliertem Wasser, Standard B-F in 0,5 ml destilliertem Wasser 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgelöst. Danach wurden sie bei -20° C eingefroren.

- Progesteron Kontrollen: L1 und L2 (lyophilisiert) 2 Fläschchen enthalten hohe und niedrige Progesteronkonzentration im Serum. Diese wurden ebenfalls in 0.5 ml destilliertem Wasser über 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgelöst.
- 125J-markiertes Progesteron
- mit Antikörpern beschichtete Polypropylenröhrchen
- PBS

Durchführung:

Da die verwendeten R2C-Leydig-Zellen eine sehr hohe Progesteronproduktion aufwiesen, mussten die Überstände vor der Messung entsprechend verdünnt werden. Die Probe wurde aus einer der 8 Kontrollen entnommen und wie folgt verdünnt:

1/10 \Rightarrow 10 μ l Probe + 90 μ l PBS

1/20 \Rightarrow 10 μ l Probe + 190 μ l PBS

1/50 \Rightarrow 10 μ l Probe + 490 μ l PBS

1/100 \Rightarrow 10 μ l Probe + 990 μ l PBS

- Es wurde zunächst ein RIA mit den verschiedenen Verdünnungen der Proben durchgeführt (s.u.).
- Nun wurde die Verdünnung gewählt, die bei der ersten Messung Werte zwischen 10 ng/ml und 20 ng/ml ergab, also dann innerhalb des Messbereiches des Progesteron-RIAs lag.

- Entsprechend dieser ermittelten Verdünnung wurden alle weiteren Proben eines Versuches verdünnt und ein neuer RIA durchgeführt.
- Die Standards, die verdünnten Proben und Kontrollen wurden zu je 25 µl in Doppelbestimmung in die antikörperbeschichteten Röhrchen überführt.
- Es wurden jeweils 500 µl ¹²⁵-J markiertes Progesteron in die Röhrchen gegeben.
- Die Standards, Proben und Kontrollen wurden 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert.
- Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit dekantiert und die Röhrchen für 1 min im γ -Counter (Biermann, Bad-Nauheim, Deutschland) per RIA gemessen.

3.6 Testosteronbestimmung mittels Radioimmuno-Assay

Testprinzip:

Das Testosteron wurde mittels kompetitiven Radioimmuno-Assay nach den Angaben des Herstellers bestimmt (DSL, Sinsheim, Deutschland, Nr. DSL-4000). Das Testprinzip ist dabei das Gleiche wie beim Progesteron, welches oben bereits beschrieben wurde.

Die Sensitivität des Assays betrug 0.08 ng Testosteron/ml. Die Standards lagen in dem Bereich zwischen 0.1 und 25 ng/ml

Im Unterschied zum Progesteron wurde beim Testosteron keine Verdünnungsreihe angelegt, da die Passagen der verschiedenen Versuche in einem ähnlichen Konzentrationsbereich lagen, der genau innerhalb des Messbereiches des Testosteron-RIAs lag.

Chemikalien:

- Testosteron-Standards: A-F (lyophilisiert)
Sie enthielten Testosteron in Serum und Natriumazid als Konservierungsmittel. Standard A wurde in 1 ml destilliertem Wasser, Standard B-F in 0.5 ml destilliertem Wasser über 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer gelöst. Nach dem Versuch wurden sie bei -20° C eingefroren.

- Testosteron Kontrollen: L1 und L2 (lyophilisiert) die Kontrollen enthielten Testosteron in niedriger und hoher Konzentration und wurden in 0.5 ml destilliertem Wasser aufgelöst.
- ¹²⁵J- markiertes Testosteron
- mit Antikörpern beschichtete Polypropylenröhrchen

Durchführung:

- Standards, Proben und Kontrollen wurden zu je 50 µl in die Antikörper beschichteten Röhrchen pipettiert.
- Es wurden jeweils 500 µl ¹²⁵J-markiertes Testosteron in die Röhrchen gegeben.
- 1 Stunde Inkubation im 37° C warmen Wasserbad.
- Dekantieren des Überstandes
- Messung mittels γ-Counter für jeweils 1 min

3.7 Laktatbestimmung**Testprinzip:**

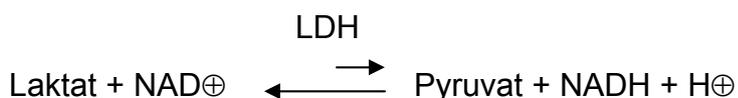
Laktat hatte sich in in vitro Versuchen als ein guter Marker für veränderte Zellfunktionen nach Schadstoff-Exposition erwiesen. Eine Störung der Mitochondrienfunktion oder eine gesteigerte Glykolyse führt zur vermehrten Produktion von Laktat.

Die Messung der Laktatkonzentration erfolgte nach der Methode von Noll (1974) mit Hilfe eines gekoppelten Enzymsystems.

1.Schritt:

L-Laktat wird enzymkatalysiert durch Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) zu Pyruvat oxidiert.

Enzym: L-Laktatdehydrogenase (LDH)



2. Schritt:

Da das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite des Laktats liegt, wird eine weitere Reaktion nachgeschaltet, die das Pyruvat mit Hilfe von L-Glutamat abfängt.

Enzym: Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)



Das gebildete NADH ist äquimolar zu dem in der Lösung enthaltenen Laktat. NADH ist die Messgröße und wurde aufgrund seiner Absorption bei 339 nm photometrisch gemessen.

Chemikalien:

- Laktatstandardlösung
Auflösen von 8 mg bzw. 16 mg L(+) Laktat (H-5706, Sigma) in 1 ml PBS
- 56,75 L(+) Glutamat (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 380ml 1 N NaOH (Merck) aufgelöst und dann mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Am Versuchstag wurden 20 ml dieser Glutamatstammlösung und 9,4 ml 1 N NaOH aufgelöst. Der gebrauchsfertige Glutamatpuffer war 0.5 M mit einem pH von 8.9.
- β -NAD Lösung:
Auflösen von 100 mg β -NAD in 4 ml destilliertem Wasser.
Bei jedem Versuch wieder frisch herstellen.
- GPT Lösung 21 U/ml (Sigma, G-9880)
- LDH Lösung 45 U/ml (Sigma, L-2518)

Durchführung:

In 1 ml Kunststoffküvetten wurden pro Doppelbestimmung folgende Chemikalien pipettiert:

- 30 μ l Probe bzw. beim Blindwert 30 μ l destilliertes Wasser oder
- 30 μ l Laktat 100 % (16 mg/ml Laktat) oder
- 30 μ l Laktat 50 % (8 mg/ml Laktat)
- 760 μ l destilliertes Wasser
- 250 μ l Glutamat-Lösung
- 30 μ l β -NAD-Lösung (Boehringer, Mannheim, Deutschland, 127965)
- 18 μ l GPT

Danach:

- Der Inhalt der Küvetten wurde gemischt, 10 Minuten gewartet und dann im Spektralphotometer DU 68 (Beckmann, München, Deutschland) die Extinktion E1 bei 340 nm gemessen.
- Um die Reaktion zu starten, wurden anschließend 11 µl Laktatdehydrogenase (Sigma L-2518) zugegeben.
- 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Messung der Extinktion E2 im Spektralphotometer.

Die Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Aus der Extinktionsdifferenz ($E=E_2-E_1$) wurde die Laktatkonzentration mit der folgenden Formel berechnet:

$$C = \frac{\Delta E \cdot MG \cdot V_1}{\varepsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot 1000} \quad [\text{g / l}].$$

Hierbei gilt:

C = Laktatkonzentration = gesuchte Größe

MG = Molekulargewicht des Laktats = 90,1 g/mol

V1 = Testvolumen = 1.089 ml

= Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = $6.3[\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

d = Schichtdicke = 1 cm

V2 = Probenvolumen = 0.03 ml

Der Laktatgehalt zweier Lösungen mit standardisierter Konzentration wurde immer mitbestimmt. Die Messung verlief linear im Konzentrationsbereich von 2 - 20 mg Laktat/ml.

3.8 Statistik

Bei dieser Arbeit wurden alle Experimente 3 – 5 Mal wiederholt. Die dabei erzielten Ergebnisse waren vergleichbar und die ausgewählten Resultate entsprachen jeweils einem repräsentativen Experiment. Die Versuche wurden an 2 Kulturplatten mit insgesamt acht Wells pro untersuchter Schadstoffkonzentration durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet. Die Normalverteilung der Proben wurde durch das Programm vorher getestet. War keine Normalverteilung gegeben, so wurde der Mann-Whitney-Test mit dem selben Programm Instat (Ver. 1.11,1990, Dr. Saunders, Graph PAD Software, San Diego USA) angewandt.

Die abgebildeten Werte wurden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle. Die Symbole (***) , (**) und (*) zeigen ein Signifikanzniveau von ($P \leq 0.001$), ($P \leq 0.01$) und ($P \leq 0.05$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Angaben zu den verwendeten Maßeinheiten finden sich im Diagramm.

Die EC_{50} -Werte wurden durch graphische Exploration aus den entsprechenden Konzentration-Wirkungs-Diagrammen entwickelt. Der EC_{50} -Wert entsprach der Schadstoffkonzentration, bei der die Messgröße um 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle abgenommen hatte.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss verschiedener Noxen auf die Vitalität der Leydig-Zellen.

Die aus einem Leydig-Zell-Tumor der Ratte stammenden R2C Kulturen wurden drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen der Estrogene 17β -Estradiol, Ethinylestradiol, dem Xenoestrogen Bisphenol A oder dem Phytoestrogen Daidzein bzw. den Metallionen Quecksilber und Arsenit inkubiert.

Mittels MTT-Assay wurde die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen gemessen, die einen sehr sensiblen Marker für die Vitalität der Zellen darstellen.

Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle. (***) Kennzeichen zeigen hoch signifikante Unterschiede zur Kontrolle $P \leq 0.001$, (**) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von $P \leq 0.01$ und (*) entspricht $P \leq 0.05$.

4.1.1 Vitalität der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Ethinylestradiol

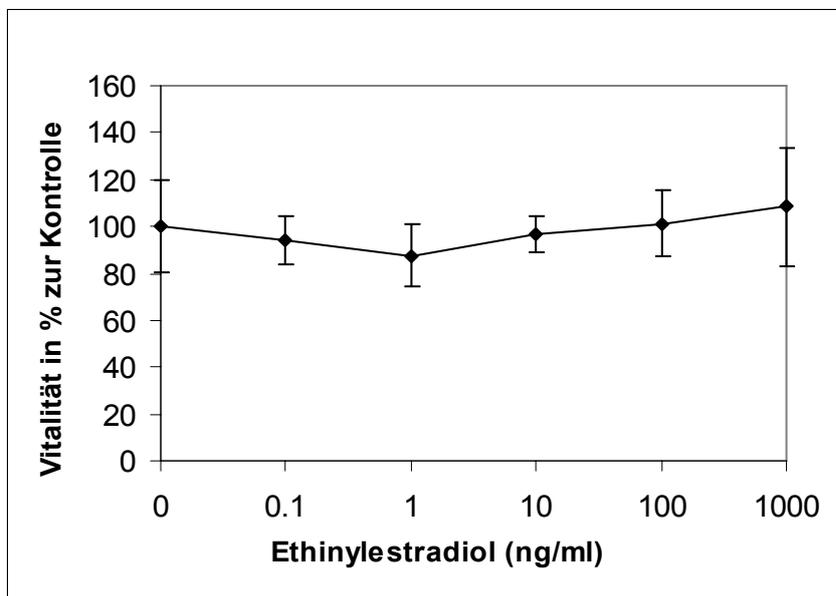


Abb. 4: Einfluss einer dreitägigen Exposition von Ethinylestradiol auf die Vitalität von R2C-Leydig-Zellen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle.

Bei der Zugabe von Ethinylestradiol sank die Vitalität bei 0,1 ng/ml (0,3 nM) leicht ab und hatte bei 1 ng/ml (3 nM) ihr Minimum mit einer Abnahme um 15 – 20 % erreicht (Abb. 4). Danach stieg sie kontinuierlich wieder an mit einem Maximum bei 1000 ng/ml (3,3 μ M) von 110 %. Diese Änderungen waren aber nicht signifikant und

entsprachen der normalen leichten Variation bei Zellkulturversuchen wie andere ähnliche Ergebnisse zeigten.

4.1.2 Vitalität der Leydig-Zellen nach Inkubation mit 17β -Estradiol

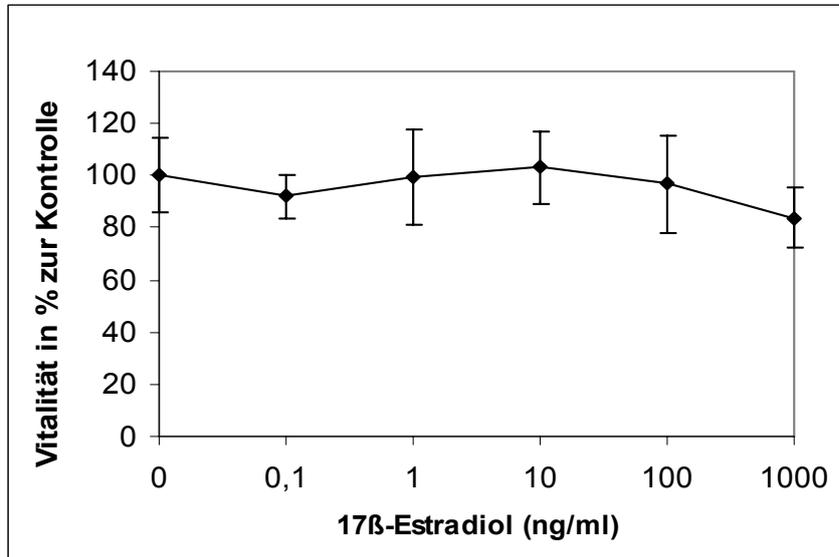


Abb. 5: Einfluss einer dreitägigen Exposition mit 17β -Estradiol auf die Vitalität von R2C-Leydig-Zellen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle.

Eine Exposition mit 17β -Estradiol zeigte bei niedrigen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der R2C-Leydig-Zellen. Erst bei hohen Konzentrationen von 1000 ng/ml ($3,6 \mu\text{M}$) wirkte es leicht zytotoxisch und senkte die Vitalität nicht signifikant um ca. 20 % (Abb. 5).

4.1.2 Vitalität der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Daidzein

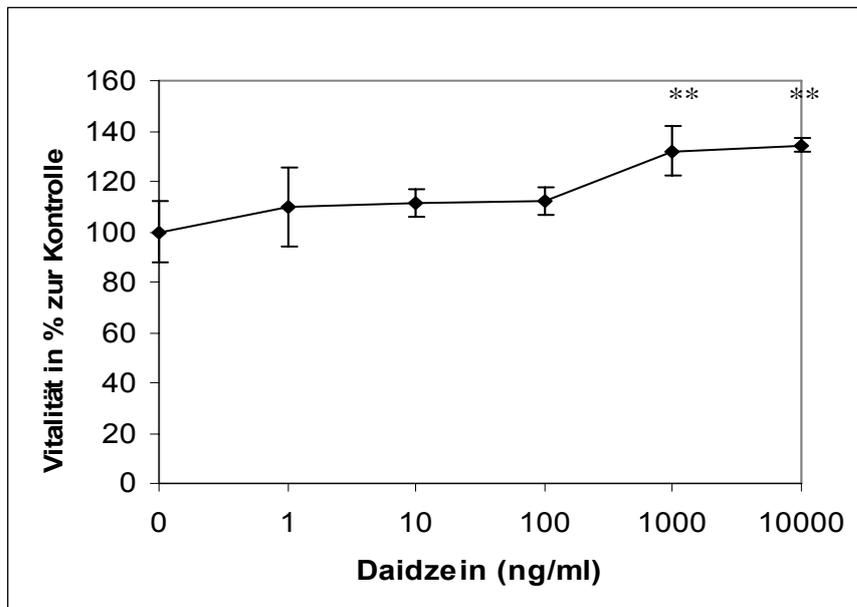


Abb. 6: Einfluss einer dreitägigen Exposition mit Daidzein auf die Vitalität von R2C-Leydig-Zellen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle. (***) zeigen den signifikanten Unterschied ($p \leq 0.01$) zur unbehandelten Kontrolle.

In niedrigen Konzentrationen bis 100 ng/ml (0,39 μ M) zeigte sich kein nennenswerter Einfluss auf die Vitalität der Zellen (Abb 6).

Erst höhere Konzentrationen von Daidzein (1000 ng/ml und 10.000 ng/ml) entsprechend (3,9 μ M und 39 μ M) führten zur signifikanten Steigerung der gemessenen Zellvitalität mittels MTT-Test um 30 – 40 %.

Diese Aktivitätserhöhung der mitochondrialen Dehydrogenasen lässt auf eine zelluläre Stresssituation schließen.

4.1.3 Vitalität der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Bisphenol A

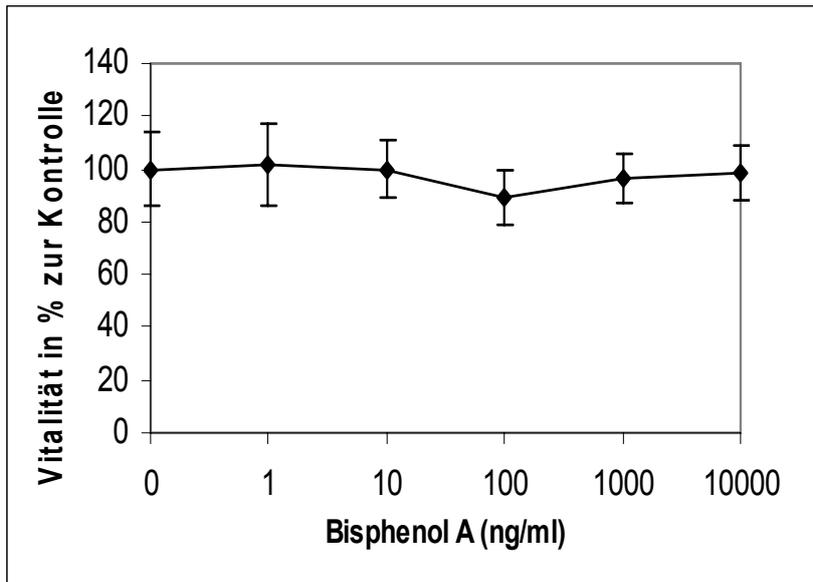


Abb. 7: Einfluss einer dreitägigen Exposition mit Bisphenol A auf die Vitalität der R2C-Leydig-Zellen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle.

Geringe Konzentrationen von Bisphenol A zeigten keinen messbaren Einfluss auf die Zellvitalität (Abb.7). Erst die Exposition mit höheren Konzentrationen 100 ng/ml und 1000 ng/ml (0,43 μ M und 4,3 μ M) senkte die Vitalität leicht ab. Dies konnte auch in weiteren Versuchen beobachtet werden.

4.1.4 Vitalität der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit

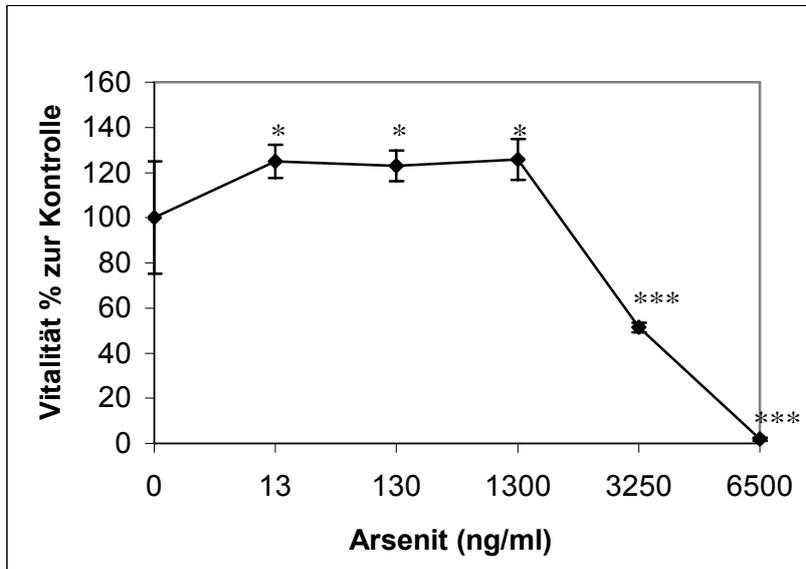


Abb. 8: Einfluss einer dreitägigen Exposition mit Arsenit (III) auf die Vitalität von R2C-Leydig-Zellen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle. (***) und (*) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.001$) und ($p \leq 0.05$) zur unbehandelten Kontrolle.

Arsen beeinflusste die Zellvitalität in Abhängigkeit von der Konzentration negativ. Im niedrigen Konzentrationsbereich 13 ng/ml, 130 ng/ml und 1300 ng/ml (0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M) stieg die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen signifikant um 25 % an und hatte bei 1300 ng/ml (10 μ M) ihr Maximum, was auf eine Stressreaktion schließen lässt (Abb. 8).

Bei hohen Konzentrationen dagegen verursachte Arsenit in allen Versuchsreihen einen hoch signifikanten Rückgang der Vitalität auf Werte unterhalb des Messbereiches, was auf die Zytotoxizität von Arsen zurückzuführen ist. Bei 3250 ng/ml (25 μ M) war die Vitalität auf 50 % abgesunken ($EC_{50} = 25 \mu$ M).

4.1.5 Vitalität der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat

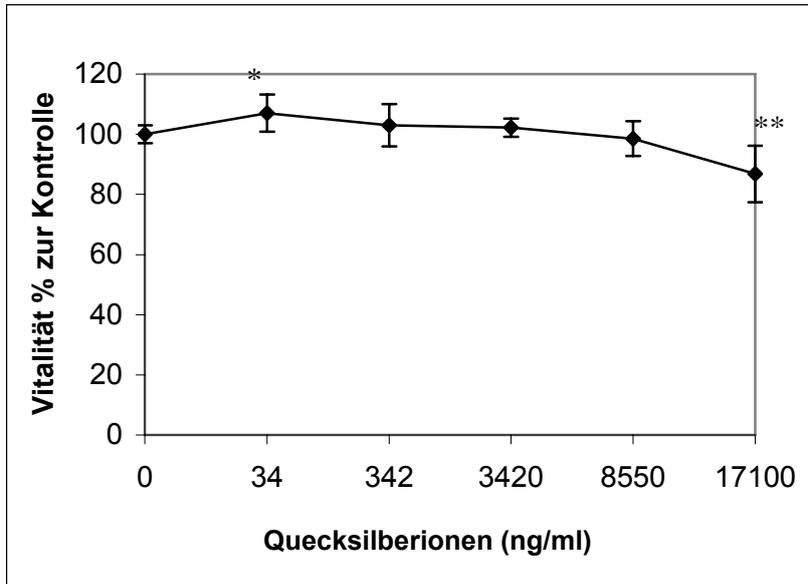


Abb. 9: Einfluss einer dreitägigen Exposition mit Quecksilberionen auf die Vitalität von R2C-Leydig-Zellen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur als 100 % festgelegten unbehandelten Kontrolle. (**) und (*) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.01$) und ($p \leq 0.05$) zur unbehandelten Kontrolle.

Nach der Zugabe von Quecksilberionen zeigten sich im Vergleich zu Arsenit nur eine leichte konzentrationsabhängige Zu- und Abnahmen der Zellvitalität. Quecksilber führte bei einer Konzentration von 34 ng/ml ($0,1 \mu\text{M}$) zu einem leichten signifikanten Anstieg der Vitalität um 15 %, während es bei 17100 ng/ml ($50 \mu\text{M}$) einen Rückgang der Vitalität um 20 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verursachte (Abb. 9). Die anderen Konzentrationen hatten keinen sichtbaren Einfluss auf die Vitalität.

4.2 Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Zugabe verschiedener Noxen

Die R2C-Zellen wurden drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen der Noxen inkubiert und das Testosteron im Zellkulturüberstand mittels Radioimmuno-Assay bestimmt. Bei diesem Testprinzip konkurrieren radioaktiv markierte (^{125}J -Testosteron) und nicht radioaktiv markierte Antigene (Serum und Kontrolle) um hochspezifische Antikörper. Die Anzahl der radioaktiven Antigen/Antikörperkomplexen ist umgekehrt proportional zur Testosteronkonzentration der Probe.

Zur Vermeidung einer ungleichen Proteinverteilung auf die Zellkulturschalen wurde eine Standardisierung auf 100 μg Protein gewählt.

4.2.1 Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Ethinylestradiol

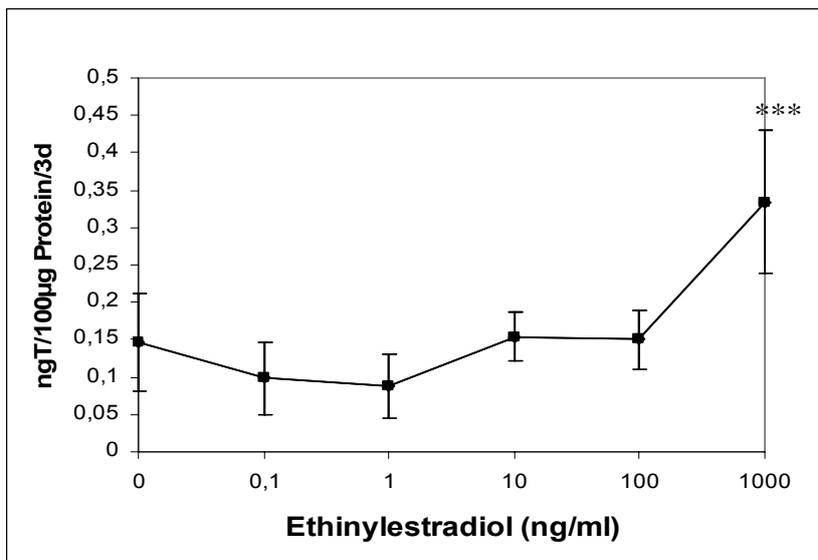


Abb. 10: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Ethinylestradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) zeigt den signifikanten Unterschied ($p \leq 0.001$) zur unbehandelten Kontrolle.

Bei der Zugabe von Ethinylestradiol sank die Testosteronproduktion bei 0,1 ng/ml (0,3 nM) leicht ab und hatte bei 1 ng/ml (3 nM) ihr Minimum mit einer Abnahme um 15 – 20 % erreicht (Abb. 10). Danach stieg sie kontinuierlich wieder an mit einem Maximum bei 1000 ng/ml (3,3 μM) von 110 %. Dieser steile Anstieg beruht aber teilweise auf einer Kreuzreaktion von höheren Estradiol- oder Ethinylestradiol-

Konzentrationen mit dem im RIA benutzten Testosteron-Antikörper und stellt somit teilweise einen Artefakt der Messmethode dar.

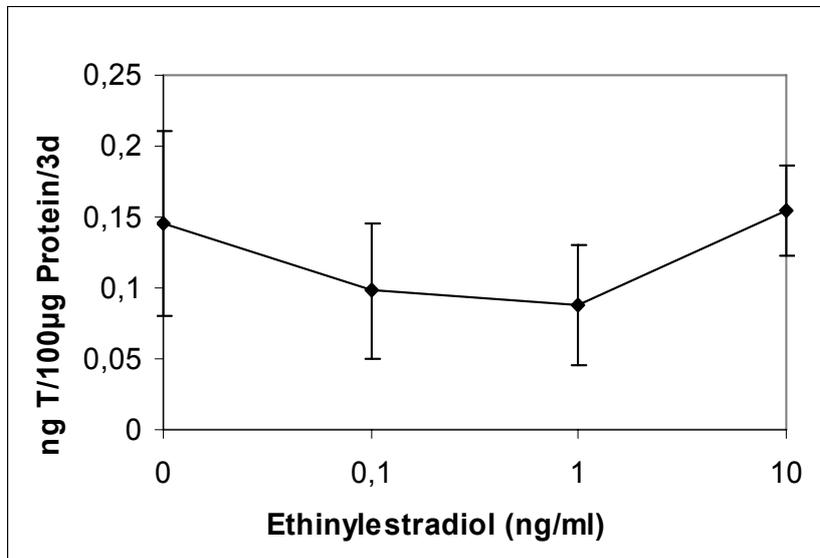


Abb. 11: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Ethinylestradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Abbildung 11 zeigt einen Ausschnitt aus Abbildung 10. Es wird hier der Konzentrationsbereich von 0 ng/ml bis 10 ng/ml (0 μ M bis 30 nM) vergrößert dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass Ethinylestradiol in niedrigen Konzentrationen nicht signifikant die Testosteronproduktion senkte. Bei 1 ng/ml hatte sie ein Minimum mit einer Abnahme um 15 – 20 % erreicht.

4.2.2 Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit 17 β -Estradiol

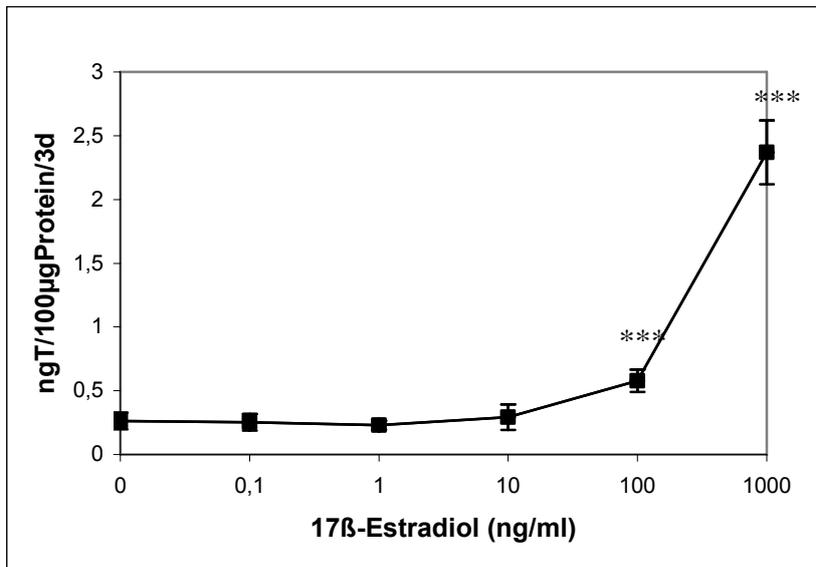


Abb. 12: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit 17 β -Estradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) zeigt die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.001$) zur unbehandelten Kontrolle

Die Exposition mit 17 β -Estradiol in Abbildung 12 zeigte bei 100 ng/ml (0,3 μ M) bereits ein Anstieg um das Doppelte. Bei 1000 ng/ml (3,6 μ M) stieg die Testosteronmenge um das 6-fache der Kontrolle an. Der steile Anstieg der Testosteronproduktion bei hohen Konzentrationen lässt eine Kreuzreaktion zwischen 17 β -Estradiol und den Testosteronantikörpern des RIAs ebenso wie beim Ethinylestradiol (Abb.10) vermuten. Die Kreuzreaktion bei höheren Estradiol oder Ethinylestradiol-Konzentrationen entsteht mit dem im RIA benutzten Testosteron-Antikörper und stellt somit teilweise ein Artefakt der Messmethode dar.

Bei sehr niedrigen Konzentrationen trat keine Kreuzreaktion auf. In diesem Bereich wirkte 17- β -Estradiol analog Estradiol hemmend auf die Testosteronsynthese.

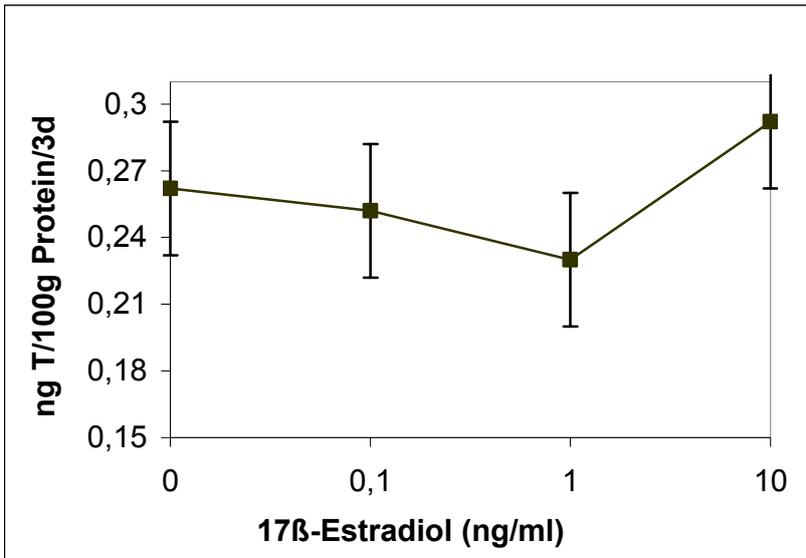


Abb. 13: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit 17β-Estradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 8) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Abbildung 13 ist ein Ausschnitt der niedrigen Konzentrationsbereiche aus Abbildung 12. Bei der vergrößerten Darstellung des kleinen Konzentrationsbereiches sieht man eine Abnahme der Testosteronkonzentration bei 0,1 ng/ml (0,36 nM) und bei 1 ng/ml (3,6 nM).

4.2.1.2 Nachweis der Kreuzreaktion zwischen 17 β -Estradiol bzw. Ethinylestradiol und den verwendeten Testosteronantikörpern im Radioimmuno-Assay

Die in dem Medium angelegten Verdünnungsreihen der Estrogene und Xenoestrogene wurden ohne Kontakt mit den R2C-Leydig-Zellen im Radioimmuno-Assay gemessen.

Die Ergebnisse des RIA mit den verdünnten Estrogenkonzentrationen und die Werte der Estrogene, die drei Tage mit den R2C-Zellen inkubiert wurden, sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tab. 1: Kreuzreaktivität von 17 β -Estradiol mit den Testosteron-Antikörpern

Estrogen	Kontrolle	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
Testosteron	0,08 ng/ml	0,107 ng/ml	0,007 ng/ml	0,12 ng/ml	0,23 ng/ml	1,6 ng/ml

In Tabelle 1 sieht man einen steilen Anstieg der Testosteronkonzentration um das 20-fache nach Inkubation mit 17 β -Estradiol (1000 ng/ml) ohne Zellkontakt mit R2C-Leydig-Zellen.

Tab. 2: Testosteronmenge nach drei Tagen Inkubation von 17 β -Estradiol mit R2C-Zellen

Estrogen	Kontrolle	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
Testosteron	0,262 ng/ml	0,252 ng/ml	0,23 ng/ml	0,29 ng/ml	0,57 ng/ml	2,37 ng/ml

Tabelle 2 zeigt einen Anstieg der Testosteronwerte um das 9-fache der Kontrolle nach Exposition von 17 β -Estradiol (1000 ng/ml) mit R2C-Leydig-Zellen.

Aus diesen Tabellen ist ein deutlicher Anstieg der Testosteronwerte ab 100 ng/ml zugefügtem 17- β -Estradiol ersichtlich. Demnach hatte eine Kreuzreaktion zwischen 17 β -Estradiol und den Antikörpern des RIAs stattgefunden. Die Testosteronwerte der Estrogen-Verdünnungsreihe ohne Zellkontakt waren allerdings niedriger als die Werte bei drei Tagen Inkubation mit R2C-Zellen. Die in der Abbildung 10 und 12 dargestellten Werte zeigen also einen realen Anstieg des Testosterons im Zellkulturüberstand, der jedoch nicht in dem Ausmaß stattgefunden hat, wie es die

Werte ausdrücken. Der Anstieg der Testosteronwerte bei höheren Estradiolkonzentrationen lässt neben der Kreuzreaktion eine Hemmung des Testosteronabbaus vermuten.

Eine ähnliche jedoch schwächer ausgeprägte Kreuzreaktion trat bei Ethinylestradiol auf. Die Werte sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Tab. 3: Kreuzreaktivität von Ethinylestradiol mit den Testosteronantikörpern

EE	Kontrolle	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
Testosteron	0,03 ng/ml	0,028 ng/ml	0,014 ng/ml	0,02 ng/ml	0,07 ng/ml	0,157 ng/ml

In Tabelle 3 sieht man bei 1000 ng/ml Ethinylestradiol einen Anstieg der Testosteronkonzentration um das 5-fache der Kontrolle ohne Zellkontakt mit R2C-Leydig-Zellen.

Tab. 4: Testosteronmenge nach drei Tagen Inkubation von Ethinylestradiol mit R₂C-Zellen

EE	Kontrolle	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
Testosteron	0353 ng/ml	0,375 ng/ml	0,372 ng/ml	0,304 ng/ml	0,38 ng/ml	0,429ng/ml

Tabelle 4 zeigt die Exposition mit Ethinylestradiol und R2C-Leydig-Zellen bei 1000 ng/ml einen Anstieg der Testosteronkonzentration um das 1,2-fache im Vergleich zu Kontrolle.

4.2.3 Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Daidzein

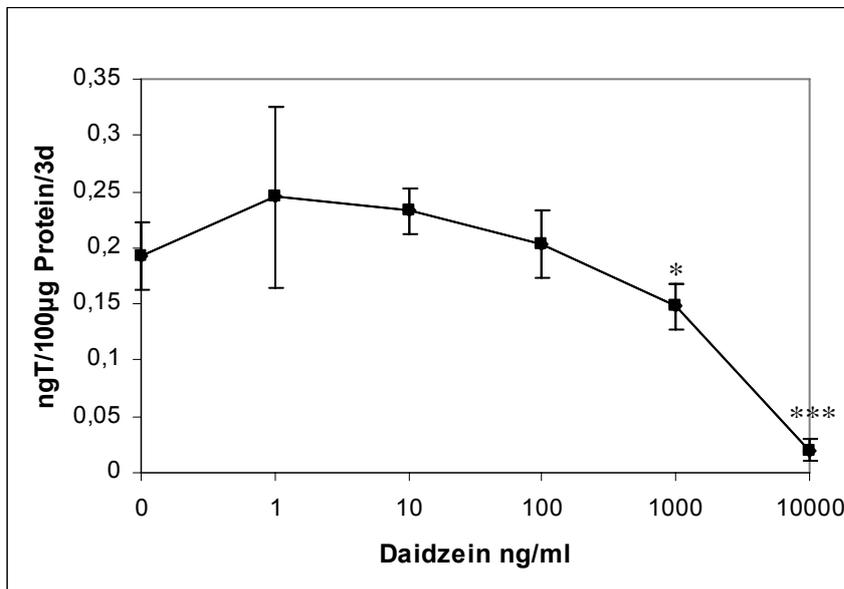


Abb. 14: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Daidzein. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) und (*) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.001$) und ($p \leq 0.05$) zur unbehandelten Kontrolle.

Bei niedrigen Konzentrationen (1 ng/ml und 10 ng/ml) entsprechend (3,9 nM und 39 nM) stieg die Testosteronmenge in Abbildung 14 zunächst um 25 % im Vergleich zur Kontrolle an, wobei sie bei 1 ng/ml (3,9 nM) ihren maximalen Wert erreicht hatte. Bei 100 ng/ml (0,39 μ M) war die Testosteronproduktion wieder auf die Höhe der Kontrolle abgesunken. Eine hoch signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Testosteronkonzentration zeigte sich bei 1000 ng/ml (3,9 μ M) und 10.000 ng/ml (39 μ M). Bei 5.000 ng/ml war das Testosteron bis auf 50 % der Kontrolle abgesunken ($EC_{50} = 5.000$ ng/ml).

4.2.4 Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Bisphenol

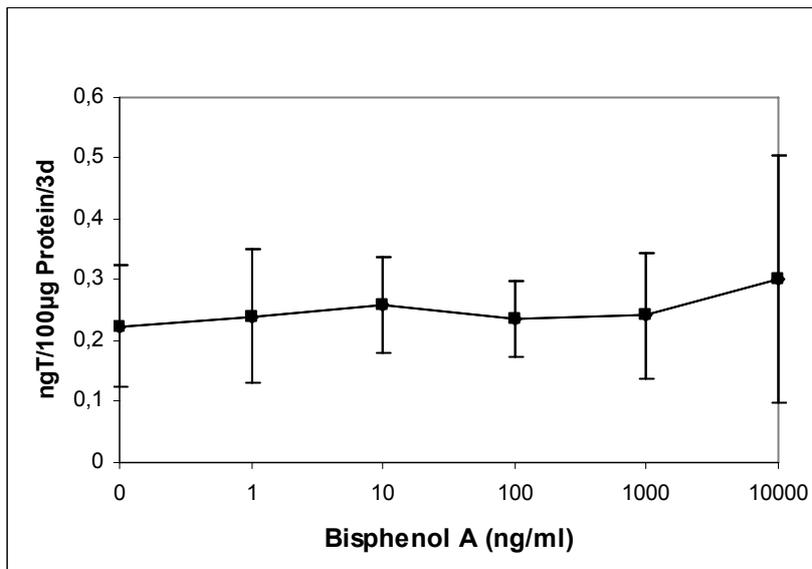


Abb. 15: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Bisphenol A. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Zugabe von Bisphenol A zeigte keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die Konzentrationen von 1 – 10.000 ng/ml (4,3 nM – 43 μ M) verursachten in Abbildung 15 keinen messbaren Einfluss auf die Testosteronproduktion.

4.2.5. Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit (NaAsO₂)

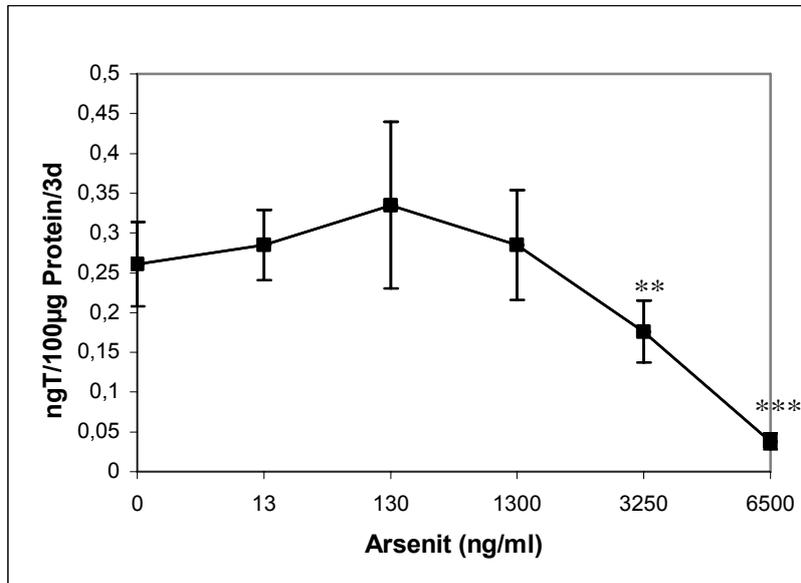


Abb. 16: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Arsenit (III). Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) und (**) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.001$) und ($p \leq 0.01$) zur unbehandelten Kontrolle.

Die Inkubation mit Arsenit zeigte einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Testosteronmenge (Abb. 16). Zunächst stieg die Testosteronproduktion an und hatte bei 130 ng/ml (1 μ M) ihr Maximum mit einer Zunahme um das 1,3-fache. Bei höheren Konzentrationen 3250 ng/ml und 6500 ng/ml (25 μ M und 50 μ M) wurde durch Arsenit eine hoch signifikante Abnahme der Testosteronmenge deutlich. Der starke Rückgang bei der Testosteronproduktion in allen Versuchsreihen sowie bei der Zellvitalität lässt auf einen zytotoxischen Effekt von Arsenit in diesem Konzentrationsbereich schließen.

4.2.6 Testosteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$

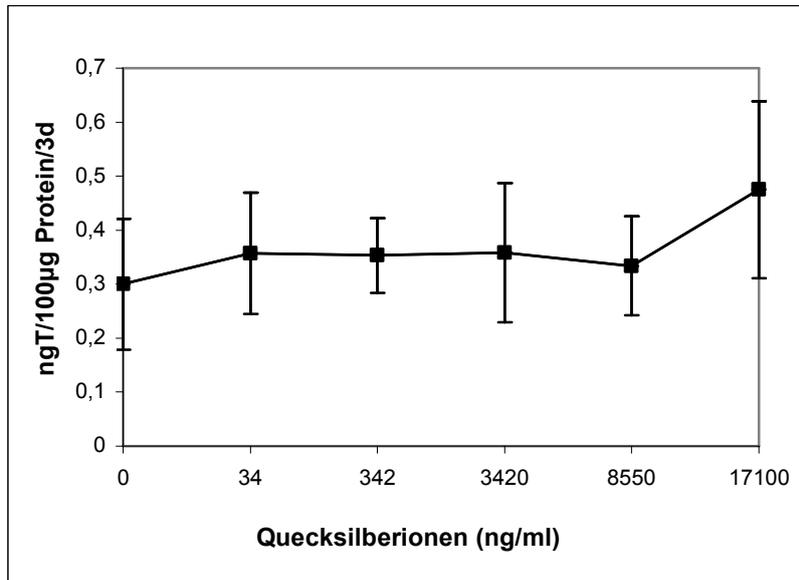


Abb. 17: Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Quecksilberionen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Im Vergleich zu Arsen zeigte die Inkubation mit Quecksilberionen keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (Abb.17). Von 130 ng/ml ($1 \mu\text{M}$) bis 8550 ng/ml ($25 \mu\text{M}$) stieg die Testosteronmenge im Zellkulturüberstand um 17 % an. Bei hohen Konzentrationen 17100 ng/ml ($50 \mu\text{M}$) wurde eine Zunahme um 60 % gemessen. Da bei 17100 ng/ml ($50 \mu\text{M}$) die Standardabweichung sehr hoch ist und in anderen Versuchen dieser steile Anstieg nicht beobachtet wurde, lässt dies auf ein Artefakt in diesem Konzentrationsbereich schließen. Insgesamt gesehen hatte Quecksilberdinitrat keinen Einfluss auf die Testosteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen.

4.3. Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Zugabe verschiedener Noxen

Die Messung der Progesteronmenge im Zellkulturüberstand erfolgt mit Hilfe des Radioimmuno-Assay nach dem gleichen Prinzip wie die Testosteronmessung. (Siehe 4.2)

4.3.1. Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Ethinylestradiol

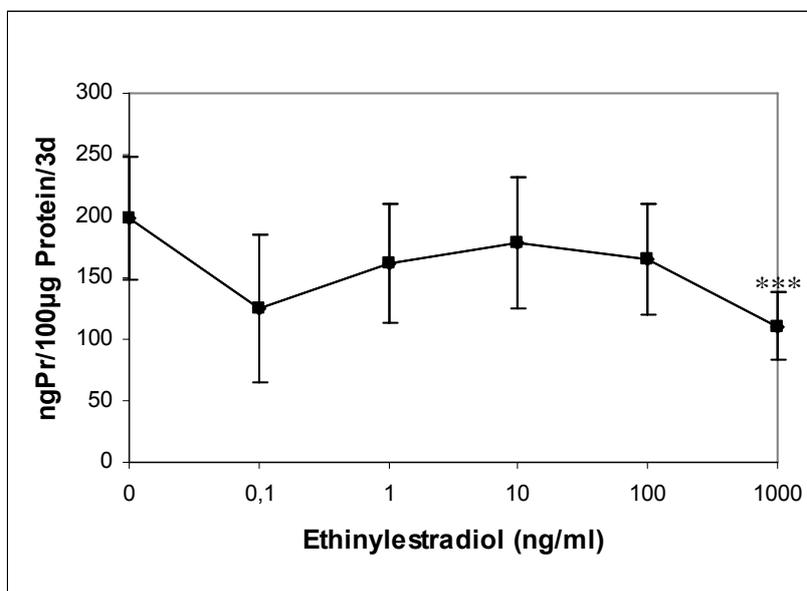


Abb. 18: Progesteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Ethinylestradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) zeigt den signifikanten Unterschied ($p \leq 0.001$) zur unbehandelten Kontrolle.

Die Inkubation mit Ethinylestradiol führte im ganzen Konzentrationsbereich zu einer Abnahme der Progesteronproduktion (Abb. 18). Vor allem bei 1000 ng/ml (3,3 μ M) zeigte der Einfluss von Ethinylestradiol eine signifikante Abnahme der Progesteronmenge um 50 %.

4.3.2. Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit 17β -Estradiol

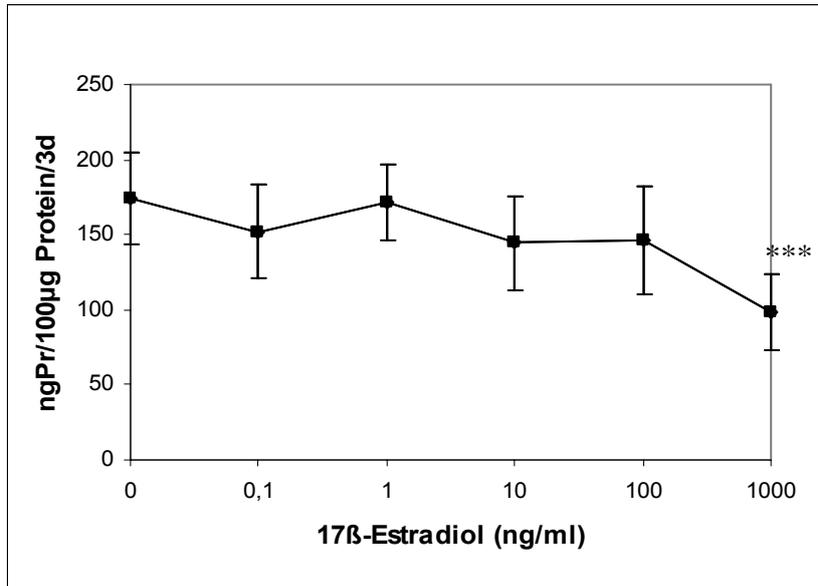


Abb. 19: Progesteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit 17β -Estradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) zeigt den signifikanten Unterschied ($p \leq 0.001$) zur unbehandelten Kontrolle.

Die Zugabe von 17β -Estradiol bewirkte ebenfalls eine stetige Abnahme der Progesteronsynthese, die bei 1000 ng/ml ($3,6 \mu\text{M}$) mit 35 % hochsignifikant war (Abb. 19).

4.3.3 Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Daidzein

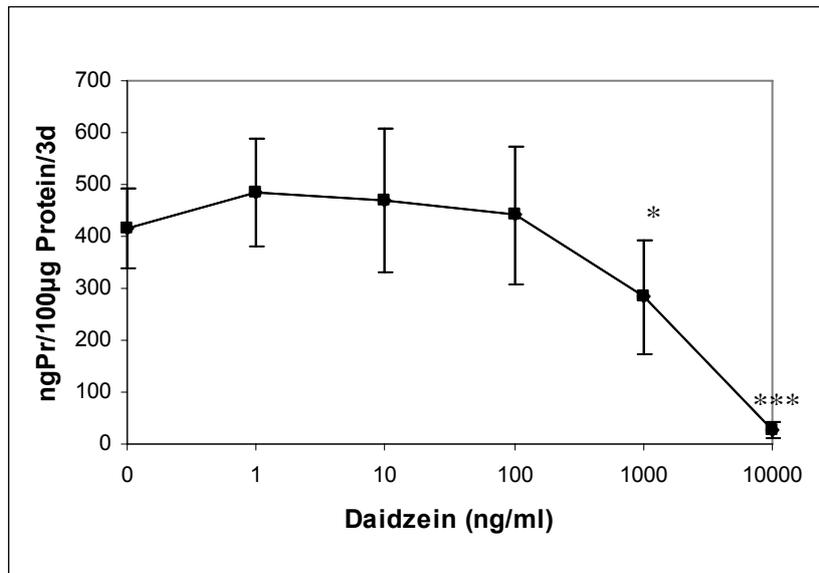


Abb. 20: Progesteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Daidzein. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) und (*) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.001$) und ($p \leq 0.05$) zur unbehandelten Kontrolle.

Abbildung 20 zeigt den konzentrationsabhängigen hochsignifikanten Rückgang der Progesteronmenge im Zellkulturüberstand nach Exposition mit Daidzein. In niedrigen Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml (3,9 nM, 39 nM und 0,39 μ M) stieg die Progesteronproduktion zunächst geringfügig um 10 % bis 25 % an. Die Inkubation mit Daidzein in einem Konzentrationsbereich von 1000 ng/ml (3,9 μ M) und 10.000 ng/ml (39 μ M) bewirkte dagegen einen steilen Rückgang der Progesteronsynthese um 30 % bzw. 90 %. Da bei der Zugabe von Daidzein in hohen Konzentrationen die Zellvitalität um 30 % bis 40 % anstieg, ist die starke Abnahme der Progesteronmenge nicht auf einen zytotoxischen Effekt von Daidzein zurückzuführen. $EC_{50} = 3000$ ng/ml (11,7 μ M)

4.3.4 Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Bisphenol A

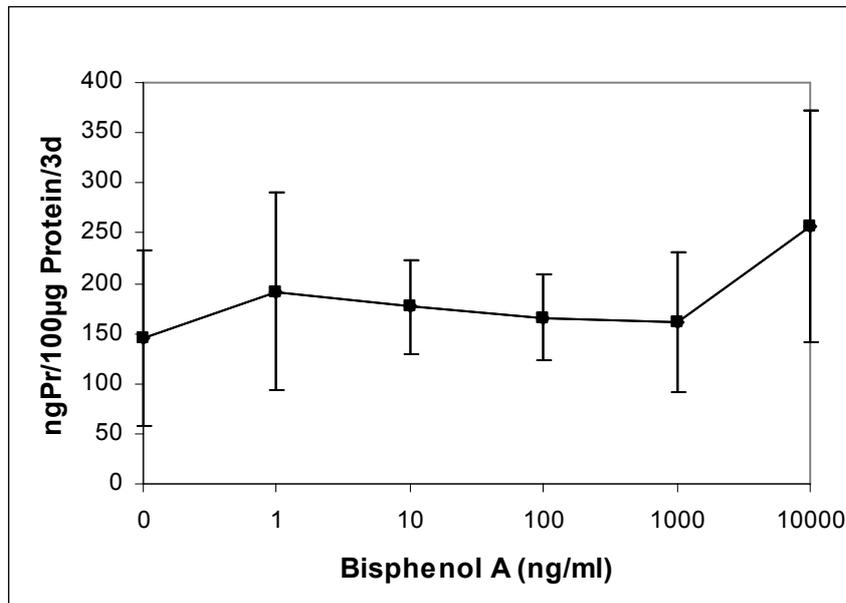


Abb. 21: Progesteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Bisphenol A. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bisphenol A führte im gemessenen Konzentrationsbereich zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Zunahme der Progesteronsynthese. Bei 1 ng/ml (4,3 nM) stieg die Progesteronmenge um 30 % an und bei 10.000 ng/ml (43 μ M) hatte sie ihr Maximum mit einer Zunahme um 66 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei 10 ng/ml (43 nM), 100 ng/ml (0,43 μ M) und 1000 ng/ml (4,3 μ M) zeigte sich in Abbildung 21 nur ein kleiner nicht signifikanter Anstieg der Progesteronmenge. Ein leichter Anstieg der Progesteronsynthese war auch in anderen Versuchsreihen zu erkennen. Der starke Anstieg bei 10.000 ng/ml (43 μ M) lässt auf Grund der hohen Standardabweichung jedoch ein Artefakt vermuten.

4.3.5 Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit (NaAsO_2)

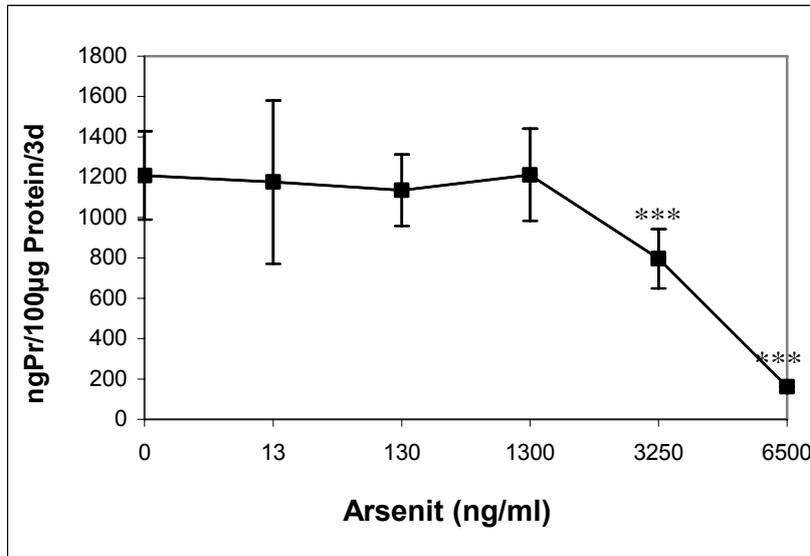


Abb. 22: Progesteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Arsenit (III) Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) zeigt den signifikanten Unterschied ($p \leq 0.001$) zur unbehandelten Kontrolle.

Die Exposition mit Arsenit bewirkte beim Progesteron einen konzentrations-abhängigen Rückgang der Steroidproduktion (Abb. 22). Im niedrigen Konzentrationsbereich hatte Arsenit keinen nennenswerten Einfluss auf die Progesteronsynthese. Bei 3259 ng/ml ($25 \mu\text{M}$) und 6500 ng/ml ($50 \mu\text{M}$) sank dagegen die Progesteronmenge signifikant um 33 % bzw. 83 % ab. Da Arsenit die Zellvitalität ebenfalls negativ beeinflusste, lässt dieser starke Rückgang der Progesteronproduktion einen zytotoxischen Effekt von Arsenit vermuten. ($\text{EC}_{50} = 30 \mu\text{M}$).

4.3.6 Progesteronproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$

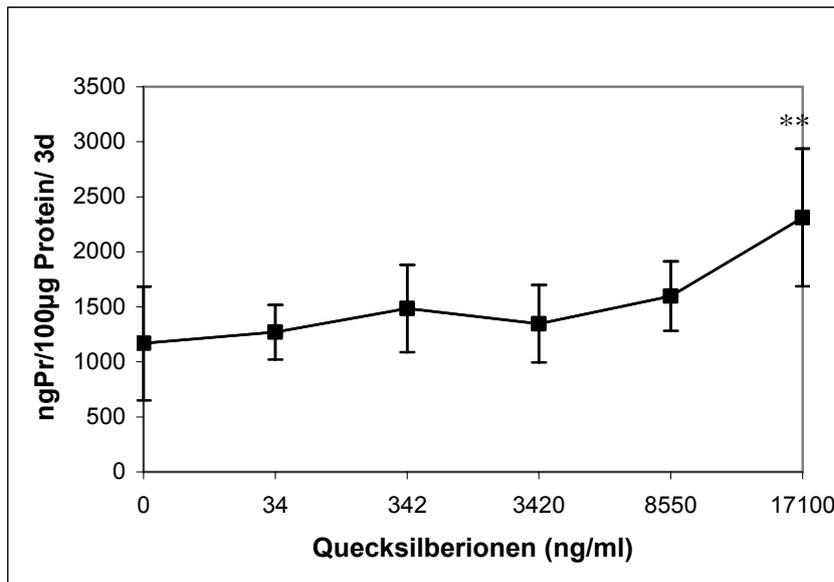


Abb. 23: Progesteronproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach dreitägiger Exposition mit Quecksilberionen. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (**) zeigt den signifikanten Unterschied ($p \leq 0.01$) zur unbehandelten Kontrolle.

Die Progesteronproduktion in Abbildung 23 stieg mit höher werdenden Konzentrationen von Quecksilberionen zunehmend an. Bei 17100 ng/ml ($50 \mu\text{M}$) hatte sie ihr Maximum mit einem Anstieg um 100 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da in diesem Konzentrationsbereich eine hohe Standardabweichung vorliegt, könnte ein Artefakt vermutet werden.

4.4 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Zugabe verschiedener Noxen

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgt nach einer Inkubation von drei Tagen mit verschiedenen Noxen und Konzentrationen unter der Verwendung eines gekoppelten Enzym-Assays.

Das bei der ersten Reaktion gebildete NADH ist äquimolar zu dem im Zellkulturüberstand enthaltenen Laktat. NADH ist die Messgröße und wird bei 339 nm photometrisch bestimmt.

4.4.1 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Ethinylestradiol

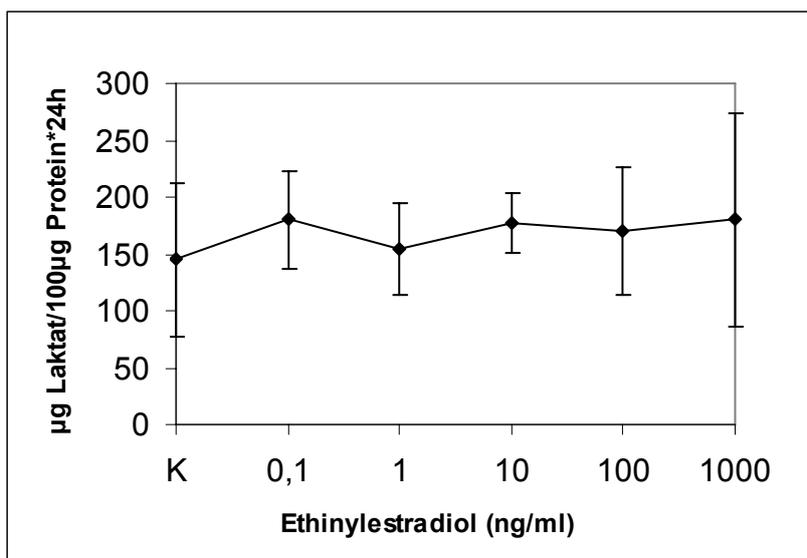


Abb. 24: Laktatproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Ethinylestradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 16$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Inkubation mit Ethinylestradiol zeigt in Abbildung 24 keinen signifikanten Einfluss auf die Laktatmenge im Zellkulturüberstand.

Bei der Zugabe von Ethinylestradiol stieg die Laktatproduktion in allen gemessenen Konzentrationsbereichen leicht an, mit einem maximalen Anstieg von 20 % bei 0,1 ng/ml (0,3 nM).

4.4.2 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit 17 β -Estradiol

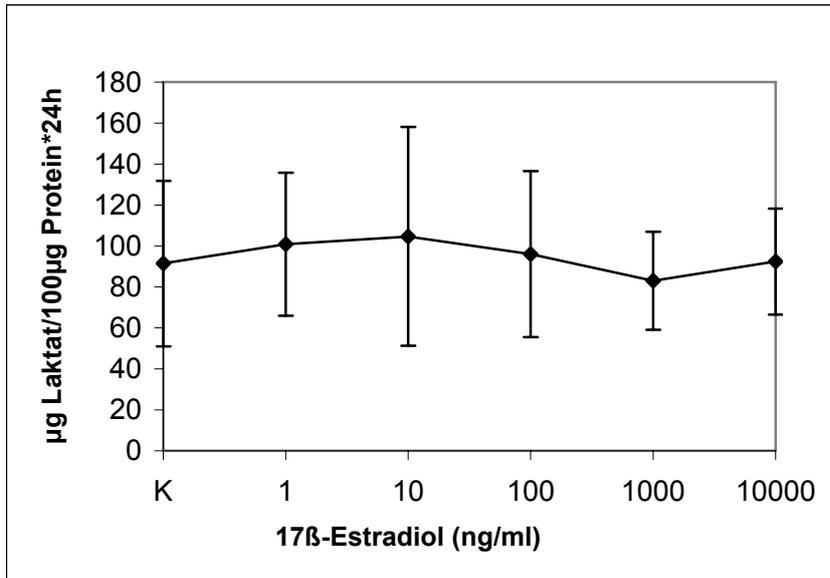


Abb. 25: Laktatproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit 17 β -Estradiol. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 16$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Auch die Inkubation mit 17 β -Estradiol zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Laktatmenge im Zellkulturüberstand. 17 β -Estradiol verursachte einen leichten Anstieg der Laktatproduktion bei 1 ng/ml (3 nM), 10 ng/ml (30 nM) und 100 ng/ml (0,3 μM) (Abb. 25).

4.4.3 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Daidzein

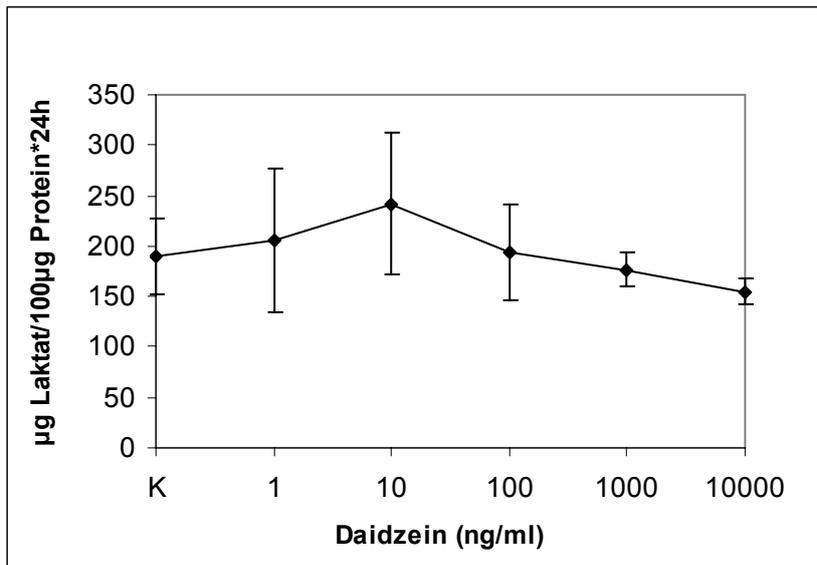


Abb. 26: Laktatproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Daidzein
Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 16$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Exposition mit Daidzein in Abbildung 26 bewirkte konzentrationsabhängig zunächst einen nicht signifikanten Anstieg der Laktatproduktion bis zu 25 % bei 10 ng/ml (39 nM) und sank dann bei 1000 ng/ml (3,9 μ M) und 10.000 ng/ml (39 μ M) um 10 % bzw. 20 % ab (Abb. 26).

4.4.4 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Bisphenol A

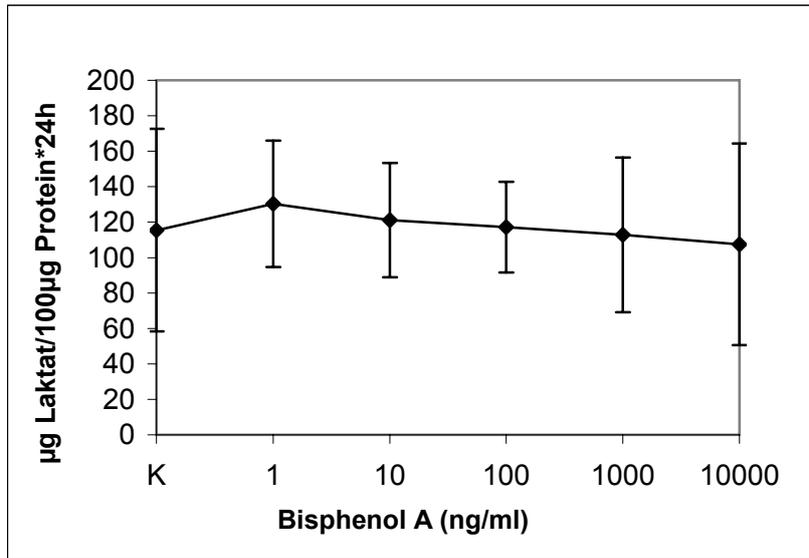


Abb. 27: Laktatproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Bisphenol A. Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 16$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Zugabe von Bisphenol A zeigte keinen nennenswerten Einfluss auf die Laktatproduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 27).

4.4.5 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Natrium-m-Arsenit (NaAsO_2)

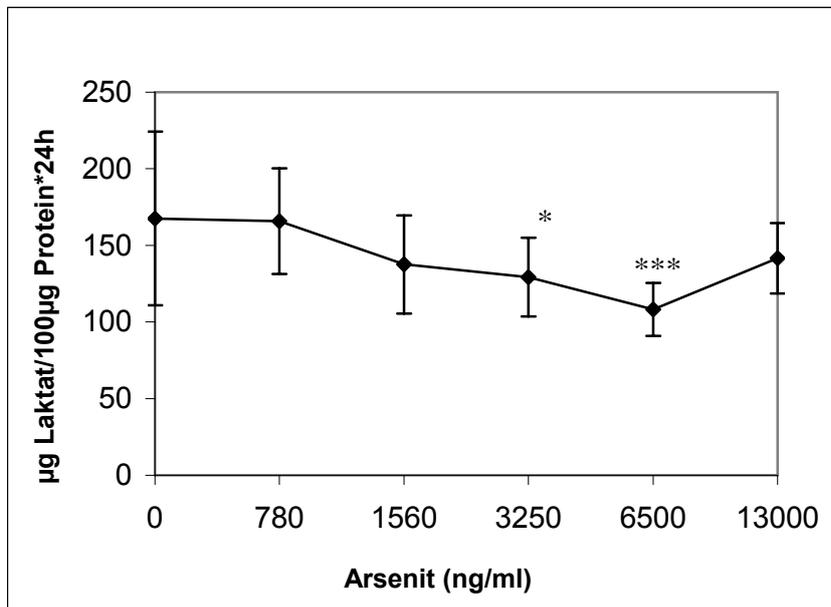


Abb. 28: Laktatproduktion der R2C-Leydig-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit Arsenit (III)
Die abgebildeten Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 16$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (***) und (*) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.001$) und ($p \leq 0.05$) zur unbehandelten Kontrolle.

Die Exposition mit Arsenit bewirkte eine dosisabhängige Senkung der Laktatproduktion von 20 % bei 3250 ng/ml (25 μM) und 30 % bei 6500 ng/ml (50 μM). Bei 13000 ng/ml (100 μM) stieg die Laktatmenge im Zellkulturüberstand wieder leicht an. Die signifikante Abnahme der Laktatsynthese in Abbildung 28 bei höheren Konzentrationen ist auf die Zytotoxizität in diesem Konzentrationsbereich zurückzuführen.

4.4.6 Laktatproduktion der Leydig-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$

Die Versuchsreihe mit R2C-Leydig-Zellen nach der Exposition mit Quecksilberdinitrat wurde nicht weiter fortgesetzt, da sie nicht im vorgegebenen zeitlichen Rahmen der Doktorarbeit durchzuführen war.

5. Diskussion

Viele Studien in Europa haben in den letzten Jahrzehnten einen Rückgang der Spermienproduktion nachgewiesen (Osser et al., 1984, Auger et al., 1995). Eine Studie von Carlsen et al. (1992) belegte einen Rückgang der Spermienzahl in den letzten 30 bis 50 Jahren von 113 auf 66 Mio/ml. Osser et al. beschrieben (1984) einen Rückgang der Spermienkonzentration bei einer Studie mit schwedischen Männern aus infertilen Paaren von $125 \times 10^6/\text{ml}$ auf $78 \times 10^6/\text{ml}$.

Untersucht wurden vor allem die Spermiedichte und die Spermienzahl im Ejakulat sowie die Beweglichkeit und Morphologie der Spermien. Die Daten stammten hauptsächlich von gesunden Samenspendern oder von Männern, die sich aufgrund von Kinderlosigkeit in ärztliche Behandlung begeben hatten. Mit dem Rückgang der Spermiedichte ist gleichzeitig in vielen europäischen Ländern eine Zunahme von Hodenkrebs, Kryptorchismus und Hypospadie nachzuweisen (Schlumpf und Lichtensteiner 1999). Untersuchungen aus Europa und den USA zeigen, dass sich Hodenkrebs bei Männern in den letzten Jahren verdoppelt bis vervierfacht hat (Hakulinen et al., 1986; Boyle et al., 1987).

Die Abnahme der Spermienzahl und die Zunahme der Erkrankungen des männlichen Reproduktionsorgans können unterschiedliche Ursachen haben. Dabei müssen Umwelteinflüsse und weitere Faktoren (Stress, Alkohol, zu enge Kleidung) mit berücksichtigt werden (Schuppe et al., 1999). Unter Umwelteinflüssen wird hier eine vermehrte Exposition mit estrogenähnlichen oder antiandrogenen Chemikalien vor allem während der Fetal- und Kindesentwicklung verstanden (Sharpe und Skakkebaek, 1993; Toppari et al., 1996).

Daten von Jayle et al. (1962) belegen, dass der menschliche Hoden auch Estrogene produziert, da eine Injektion von hCG die Konzentration von Estrogenen im Urin erhöht und eine Kastration des Mannes eine Reduktion von Estrogenen im Urin verursacht. So sind auch im Rete testis und im Caput epididymis der Ratte die Estrogenkonzentrationen höher als im Blut (De Jong et al., 1973). Beim Mann ist die Konzentration der Estrogene in der Vena spermatica fünfzigmal höher als im peripheren Plasma (Hendry et al., 1983). Steroidhormone werden in den Gonaden und der Nebennierenrinde des Mannes produziert. Estradiol kann aber auch in weiteren Organen aus Testosteron gebildet werden, die das Enzym Aromatase aufweisen (z.B. Gehirn).

Leydig-Zellen entwickeln sich aus Vorstufen, die viele Estrogenrezeptoren aufweisen, über Zwischenstufen zu reifen Zellen. Diese weisen weniger Estrogenrezeptoren, dagegen aber viele LH-Rezeptoren auf (Abney 1999). Im Testis beginnt beim Menschen die Estradiolsynthese in den Sertoli-Zellen. Zwischen dem 24. - 28. Tag wechselt die Estradiolsynthese zu den Leydig-Zellen. Leydig-Zellen sind Zielzellen für Estrogene in jedem Alter (Abney, 1999).

Estrogenrezeptoren (ER) gliedern sich in ER α - und ER β -Rezeptoren. Bei der Ratte unterliegen die α -Rezeptoren in den Epithelzellen des Epididymis und Vas deferens einer hohen Zell-, Region- und altersspezifischen Veränderung, während sich die β -Rezeptoren im Laufe des Lebens nicht verändern (Atanassova et al., 2001).

Estrogene, Xenoestrogene und Schwermetalle können an verschiedenen Stellen und in unterschiedlicher Form in die Steroidogenese eingreifen. Im fetalen und neonatalen Testis hemmt Estradiol die Entwicklung von Leydig-Zellen aus deren Vorstufen, da diese sehr viele Estrogenrezeptoren besitzen (Bartke et al., 1977). Im fetalen Testis hemmen demnach Estrogene die Entwicklung und das Wachstum der Leydig-Zellen, während Estrogene im reifen Testis sogar direkt die Androgenproduktion blockieren (Abney, 1999). Dies kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen:

1. Im nM-Konzentrationsbereich binden Estrogene oder Xenoestrogene an Estrogenrezeptoren im Testis und führen so zur vermehrten Bildung eines Proteins, das die Enzyme der Testosteronsynthese hemmen oder aktivieren kann.
2. Im μ M-Bereich binden die Estrogene direkt an Enzyme der Steroidogenese und bewirken eine kompetitive Hemmung oder Aktivierung (Abney, 1999). PBC und Dioxine können sich an Ah-Rezeptoren binden und so die vermehrte Bildung von Cytochrom-P450 in der Leber induzieren. Dies kann zu einem beschleunigten Abbau von Steroidhormonen führen (Schlumpf und Lichtensteiner 1996).
3. Ein weiterer Angriffspunkt der Estrogene und auch der Umwelthormone ist die Hypophyse. In der Hypophyse sind ebenfalls Estrogenrezeptoren vorhanden. Diese wird durch Estrogene gehemmt. Es kommt zu einer Abnahme der LH Ausschüttung aus der Hypophyse. Eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse mit verminderter GnRH-Freisetzung durch negatives Feedback wurde vor allem nach Gabe von Estrogenen, Gestagenen und Androgenen beobachtet (Schuppe et al., 1999).

Estrogene und Testosteron werden aus der Vorstufe Cholesterin gebildet. Die Syntheseschritte werden durch Enzyme katalysiert, die durch verschiedene äußere Faktoren beeinflusst werden können. Die Testosteronsynthese ist von zwei Cytochrom-P450 Enzymen, dem Cholesterol side-chain-cleavage (P450_{scc}) und dem 17 α -Hydroxylase/C17,20-Lyase (P450 17 α) abhängig. Die Bildung dieser Enzyme wird durch LH reguliert (Payne, 1990). LH bindet an Rezeptoren der Leydig-Zelle im Hoden, wodurch cAMP gebildet wird (Dufau et al., 1973). cAMP aktiviert den Transport von Cholesterin zur Mitochondrienmembran und dort verbindet sich Cholesterin mit dem P450 scc. Dieses P450 scc-Enzym katalysiert die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon. Das Nicht-Cytochrom-P450-Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydro-genase-Isomerase wandelt Pregnenolon in Progesteron um. Im glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) befindet sich das P450 17 α , das die Umwandlung von Pregnenolon zu Androstendion katalysiert (Fevold et al., 1989). Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) ist ein Nicht-P450-Enzym, das Androstendion zu Testosteron umwandelt (Bogowich und Payne, 1980). Die ständige Stimulation von cAMP ist notwendig für eine Neusynthese der beiden P450-Enzyme. Ist kein cAMP mehr vorhanden, wird die Bildung von P450 scc-Enzymen und P450 17 α -Enzymen eingestellt (Payne et al., 1990). Die lange Behandlung von intakten oder hypophyseektomierten Ratten mit LH oder seinem Analogon hCG bewirkt eine steigende Testosteronproduktion (Payne et al., 1980) und induziert die Bildung von Enzymen für die Steroidogenese (Purvis et al., 1973; O'Shaughnessy und Payne, 1982). Im Gegensatz dazu resultiert aus einer einmaligen hohen Dosis an LH oder hCG eine Abnahme der Testosteronproduktion, der P450 17 α -Aktivität (O'Shaughnessy und Payne, 1982) und dem mitochondrialen P450 (Leuketich et al., 1983). Die Wirkung des LH auf die Enzyme für die korrekte Produktion von Androgenen ist somit zeit- und dosisabhängig.

Testosteron hemmt im Körper das P450-17 α -Enzym über zwei unterschiedliche Mechanismen. Hohe Dosen von LH bewirken einen Anstieg von Testosteron, das daraufhin an das P450-17 α -Enzym bindet und ein inaktives Pseudosubstrat bildet (Quinn und Payne, 1986). Bei einer ständigen Stimulation von LH in niedriger Dosis, bindet Testosteron an den Androgenrezeptor und hemmt somit die Bildung von P450-17 α -Enzymen (Hales et al., 1987). Ebenso wie bei den Estrogenen erfolgt die Hemmung durch Testosteron entweder über den Rezeptor oder direkt über die Inhibition der Enzyme (Payne, 1990).

Die in dieser Arbeit verwendeten Noxen besitzen eine sehr unterschiedliche Wirkungsstärke auf Estrogenrezeptoren, wobei man zwischen der relativen Bindungsstärke an den Estrogenrezeptor und der transaktivierenden Wirkung unterscheiden muss. Hier bindet Bisphenol A 10.000-mal schwächer an α - oder β -Estrogenrezeptoren als Estrogene. In diesem Fall beträgt die transaktivierende Wirkung nur 50 % von der des Estradiols (Kuiper et al., 1996). Daidzein bindet 1000-mal schwächer an den α -Rezeptor und 200-mal schwächer an den β -Typ des Estrogenrezeptors als das endogen gebildete Estrogen. Die transaktivierende Wirkung ist im Vergleich zu Bisphenol A jedoch genauso hoch, wie des 17β -Estradiols. Ethinylestradiol hat nahezu die gleiche Bindungsaffinität und transaktivierende Wirkung wie das körpereigene 17β -Estradiol (Wuttke et al., 1999). Bei der Betrachtung der Wirkungsintensitäten ist weiterhin die biologische Verfügbarkeit der Xenoestrogene zu berücksichtigen, die von der Bindungskapazität dieser Stoffe an körpereigene Serumproteine abhängt. Exogene Stoffe werden viel weniger an Serumproteine gebunden als körpereigene Estrogene (Nagel et al., 1999). Da nur die nicht gebundenen Stoffe im Körper eine Wirkung auslösen können, haben exogene Stoffe vermutlich eine höhere Bioverfügbarkeit (Nagel et al., 1999). Außerdem ist bei der Exposition gegenüber mehreren Stoffen mit hormoneller Wirkung eine kumulative oder additive Wirkung nicht auszuschließen (Sonnenschein und Soto, 1998). Die unterschiedlichen Wirkungsstärken der Noxen wurden bei der Auswahl des Konzentrationsbereiches berücksichtigt. Für 17β -Estradiol und Ethinylestradiol wurde ein Bereich zwischen 0,1 ng/ml und 1000 ng/ml ausgewählt. Diese Konzentrationen reichen vom pM- bis in den μ M-Bereich und spiegeln somit den Konzentrationsbereich wider, dem der Mensch physiologisch oder pharmakologisch ausgesetzt ist. Daidzein und Bisphenol A benötigen höhere Konzentrationen, um die gleiche Wirkung hervorzurufen. Deshalb wurde hier ein Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 10.000 ng/ml ausgewählt, der vom nM- bis in den μ M-Bereich reicht. Die zu Kontrollzwecken eingesetzten Metallionen Arsenit und Quecksilberdinitrat wirken dagegen nur im μ M-Bereich.

5.1 Einfluß von Estrogenen und Xenoestrogenen auf die Progesteron- und Testosteronsynthese

5.1.1 Einfluß von 17 β -Estradiol und Ethinylestradiol auf die Progesteron- und Testosteronsynthese

Die Experimente wurden mit Hilfe der R2C-Zellen ausgeführt. Diese Tumor-Zelllinie wurde aus Ratten gewonnen und soll unabhängig von LH oder cAMP vor allem die Steroide Progesteron und 20 α -Hydroxyprogesteron bilden (Freeman, 1987). Zusätzlich bilden die R2C-Zellen einen wesentlich geringeren Anteil des Androgens Testosteron.

Die dreitägige Inkubation mit 17 β -Estradiol oder Ethinylestradiol zeigte in dieser Arbeit eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Progesteronmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 18 und 19). Die höchste Konzentration von 1000 ng/ml zeigte bei beiden Estrogenen eine signifikante Abnahme der Progesteronproduktion um 30 – 40 %.

Da die R2C-Zelllinie nur sehr geringe Mengen an Testosteron bildet, war der Einfluss des 17 β -Estradiols und des Ethinylestradiols auf die Testosteronproduktion schwieriger zu bestimmen. Zudem trat bei den Versuchen im höheren Konzentrationsbereich eine störende Kreuzreaktion mit Testosteron Antikörpern des verwendeten RIAs auf (Abb. 11 und 12). Im niedrigen Konzentrationsbereich inhibierten beide Estrogene die Testosteronproduktion, wobei die Hemmung bei Ethinylestradiol mit 20 % im Vergleich zur Kontrolle stärker ausgeprägt war (Abb. 10). Höhere Konzentrationen verursachten dann einen hoch signifikanten Anstieg der Testosteronmenge, der bei 17 β -Estradiol um bis zu 850 % und bei Ethinylestradiol bis zu 150 % betrug. Weitere Messungen zeigten, dass die Ergebnisse zu etwa 50% auf eine Kreuzreaktion mit dem im RIA enthaltenen Testosteron-Antikörpern zu führen ist (Tabelle 1 - 4). Die anderen 50 % lassen auf einen tatsächlichen Anstieg der Testosteronmenge im Zellkulturüberstand schließen. Vor allem nach der Inkubation von Ethinylestradiol wurde deutlich erkennbar, dass ein zweiphasiger Verlauf der Testosteronkurve vorliegt. Die Zunahme des Testosterons lässt sich durch die Gleichgewichtsreaktion erklären. Die sehr hohe (1000 ng/ml) Konzentration und lange Inkubation (drei Tage) mit Estradiol könnte zur Umkehrung der Gleichgewichtsreaktion zwischen Testosteron und Estrogen geführt haben. Das entspricht einer Rückreaktion der Aromatase-Reaktion. Da die Konzentration von Estradiol normalerweise sehr viel geringer ist, als die des Testosterons, läuft dieser

Schritt physiologisch nur in die Richtung des Estradiols. Eine weitere Möglichkeit für den starken Testosteronanstieg liegt in der Hemmung der Enzyme, die für den Abbau von Testosteron verantwortlich sind (Sundaram und Kumar, 1996). Murono et al. (2000) und Onoda und Hall (1981) zeigten, dass Estradiol die Enzyme zur Synthese und Abbau des Testosterons inhibiert. Dies könnte einen verzögerten Testosteron-Metabolismus erklären.

Brinkmann et al. (1980) untersuchten die LH stimulierte Steroidproduktion in vitro bei Leydig-Zellen von 26, 32, 44, 54 und 64 Tage alten Ratten, die er mit Estradiol-Implantaten behandelte. Fünf Tage nach einer Implantation mit Estradiol war die Testosteronproduktion bei den 32, 44, 52 und 64 Tage alten Ratten sehr stark gesunken, während sich die Pregnenolonproduktion nicht veränderte. Bei 26 Tage alten Ratten konnte dagegen eine Abnahme sowohl der Testosteron als auch der Pregnenolonproduktion gesehen werden. Erste Effekte von Estradiol wurden 48 Stunden nach Inkubation gemessen. Die Ergebnisse deuten auf verschiedene Arten der Inhibition hin, die vom Alter der Ratten abhängen. In einem weiteren Versuch mit 32 Tage alten Ratten wurden bei Zugabe von Estradiol verminderte Mengen an Cytochrom-P450 gemessen. In 64 Tage alten hypophysektomierten Ratten, welche fünf Tage mit Estradiol behandelt wurden, zeigte sich eine Abnahme der C17,20-Lyase und 17 α -Hydroxylaseaktivität. Dies konnte auch bei weiteren in vitro-Experimenten nachgewiesen werden, in denen eine direkte Bindung von 17 β -Estradiol an diese Enzyme bestand. Die Experimente machen deutlich, dass der Effekt von Estradiol auf die Leydig-Zellen vom Alter der Ratten abhängig ist. Die dosisabhängigen Veränderungen der Estradiolbehandlung lassen außerdem vermuten, dass Estradiol nicht nur auf den mikrosomalen Enzymkomplex wirkt, sondern auch auf die Estrogenrezeptoren der Leydig-Zellen (Brinkman et al., 1980). 17 β -Estradiol wirkt als kompetitiver Inhibitor der C17,20-Lyase und als nicht kompetitiver Inhibitor der C17 α -Hydroxylase (Onoda und Hall 1981). Zuerst sinkt die Aktivität der C17,20-Lyase (K_i -Wert von 5 μ M) und dann bei höheren Konzentrationen die 17 α -Hydroxylase bei einem K_i -Wert von 20 μ M (Onoda und Hall, 1981). Dies entspricht einem nicht durch Estrogenrezeptor-vermittelten Effekt, da die Estrogene bei dieser Art der Hemmung mit anderen Steroiden mit den aktiven Zentren von Enzymen konkurrieren und diese verdrängen. Die Hemmung der Steroidogenese der R2C-Zellen im mikromolaren Konzentrationsbereich durch 17 β -Estradiol und Ethinylestradiol in dieser Arbeit dürfte ebenfalls auf eine Inhibition

der für die Steroid-Biosynthese beteiligten Enzyme zurückzuführen sein. Dabei sanken in dieser Arbeit die Testosteron- und Progesteronwerte, die auf eine Hemmung der Enzyme noch vor der Bildung des Progesterons schließen lassen.

Weitere Studien von Van Beurden et al. (1978a) an isolierten, mit Estradiol behandelten Leydig-Zellen von Ratten, ließen eine Abnahme der Testosteronproduktion und eine Zunahme der Pregnenolonproduktion erkennen. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls einen Rückschluss auf eine Hemmung der Enzyme in der Steroidogenese zu. Da die Pregnenolonmenge angestiegen war, erfolgte die Hemmung der Enzyme nach der Bildung von Pregnenolon, wodurch dieses Hormon nicht weiter umgewandelt wurde und sich im Zellkulturüberstand vermehrt angehäuft hat. Obwohl mikromolare Konzentrationen im ersten Moment unphysiologisch erscheinen, konnten sie zum Beispiel in den Leydig-Zellen des Schweines nachgewiesen werden (Onoda und Hall, 1981). Es ist daher möglich, dass Estradiol in physiologischen Konzentrationen die Aktivität der C17,20-Lyase durch kompetitive Hemmung ohne Beteiligung des Estrogenrezeptors reguliert.

In ähnlicher Weise wirken auch synthetische Estrogene. Atanassova et al. (1999) zeigten bei Ratten eine Abnahme des Testosterons um 83 %, 71 % und 38 % nach Behandlung mit 10 µg, 1 µg und 0,1 µg Diethylstilbestrol (DES) und eine Reduktion des Testosterons um 70 % nach Inkubation mit 10 µg Ethinylestradiol. Beide synthetischen Estrogene bewirkten eine signifikante und dosisabhängige Abnahme des Hodengewichts und des Spermatogonienvolumens. Die Ratten wiesen eine verringerte Anzahl von Sertoli- und Keimzellen auf. Die Inkubation mit GnRH bewirkte keine Veränderung der Testosteronmenge im Vergleich zur Kontrolle, ebenso zeigte die Konzentration des LH im Plasma keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Dies zeigt, dass die dosisabhängige Abnahme der Testosteronspiegel nicht durch eine verminderte GnRH-Sekretion entsteht. Da der LH-Spiegel nicht durch Ethinylestradiol und DES verändert wird, lässt sich eine direkt hemmende Wirkung des Ethinylestradiols und des DES auf die Testosteronproduktion im Hoden vermuten. Es findet in diesem Beispiel keine Hemmung über den Hypothalamus/Hypophysen-Regelkreis statt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine neonatale Estrogenexposition permanent und dosisabhängig die FSH- (nicht aber die LH-) und die Testosteronproduktion in erwachsenen Tieren verändern kann (Atanassova et al., 1999). Haavisto et al. (2001) beschrieben ebenfalls eine starke Hemmung der Leydig-Zell-Funktion nach Behandlung mit DES und Ethinylestradiol.

Die Testosteronproduktion war konzentrationsabhängig im Hoden, sowie im Blut von fetalen Ratten reduziert. Des Weiteren konnten Haavisto et al. (2001) zeigen, dass DES-Konzentrationen von 100 µg/kg/d bei schwangeren Ratten eine >70% Reduktion der Testosteronkonzentration im Hoden bewirkten.

Ein weiterer Mechanismus der Hemmung wurde in den letzten Jahren entdeckt. Die Zugabe von DES bei Ratten verursachte eine Hemmung der Androgen-Rezeptor-Expression bei Konzentrationen >100 µg/kg (McKinnell et al., 2001; Williams et al., 2001). Ein weiterer Einflussfaktor konnte bei schwangeren Ratten nachgewiesen werden. Die Gabe von Estrogenen während der sexuellen Differenzierungszeit des fetalen Tieres induzierte eine Hemmung des Insulin-like-Faktor, InsL3 (Emmen et al., 2000). InsL3 spielt eine wichtige Rolle bei der fetalen Descendenz des Hodens und somit bei der Entstehung von Kryptorchismus (Sharpe, 2003). Aus bisherigen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass eine verminderte Androgenproduktion die Schlüsselrolle für die Entstehung von Kryptorchismus und Hypospadie ist. Die zusätzliche fetale Exposition von Estrogenen wirkt dann verstärkend, so dass es zur weiteren Reduktion der Androgenproduktion kommt (Sharpe, 2003).

Zimniski et al. (1985) untersuchten die Gonadotropin-sensible Leydig-Tumor-Zelllinie M5480A, welche wesentlich empfindlicher auf exogen zugeführtes Estrogen reagiert. Diese Autoren beschrieben eine signifikante, dosis- und zeitabhängige Abnahme des Pregnenolons und Progesterons nach Inkubation von geringen Dosen mit Estradiol (36 % bei 3,7 nM Estradiol), während das Testosteron keine Veränderung in Vergleich zu Kontrolle erkennen ließ. Auch bei hCG stimulierten Zellen findet eine dosisabhängige Inhibition des Progesterons statt, allerdings erst nach einer Zeit von 6 Stunden (Zimniski et al., 1985). Zum Ausschluss eines gesteigerten Metabolismus des Progesterons wurde in einem weiteren Versuch Progesteron zu den mit Estrogen behandelten Zellen zugegeben. Da nur 20 % des Progesterons zu Testosteron umgewandelt wurden - also kein gesteigerter Metabolismus vorhanden ist - liegt hier eine verminderte Aktivität der 17β-Hydroxylase und 17,20-Lyase vor, die eine Umwandlung von Pregnenolon zu Androstendion katalysiert (Zimniski et al., 1985).

Estradiol und seine Derivate können an unterschiedlichen Punkten der Steroidbiosynthese eingreifen. Das hängt von der Konzentration des Estradiols, von der Zielzelle, vom Alter des Tieres und anderen, nicht bekannten Einflussfaktoren ab. Geringe Konzentrationen von Estradiol oder DES inhibieren die Leydig-Zell-

Steroidogenese über die 17α -Hydroxylase und 17,20-Lyase (Nozu et al., 1981). In hohen Konzentrationen hemmt Estradiol die Steroidbiosynthese von menschlichen fetalen Keimzellen (Fujieda et al., 1982) und Granulosa/Luteal-Zellen von Hühnern (Sgarlata et al., 1984).

Bei MA-10 Zellen, welche aus dem Leydig-Zelltumor einer Maus gewonnen wurden, hemmte 17β -Estradiol in mikromolaren Konzentrationen (IC_{50} bei $2,8 \mu\text{M}$ Estradiol) die Progesteronbiosynthese, während das Pregnenolon als Vorstufe des Progesterons bei $100 \mu\text{M}$ Estradiol um 72 % im Vergleich zur Kontrolle anstieg (Freeman, 1985). Der hemmende Effekt wird hierbei nicht über Estrogenrezeptoren vermittelt, sondern über eine kompetitive Inhibition der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase. Dies belegt auch die Abnahme der Aktivität dieses Enzyms in isolierten Mikrosomen, die keinen Estrogenrezeptor besitzen (Freeman, 1985).

Bei einer weiteren Studie mit Methoxychlor, 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1, 1,1-trichlor-ethane (HPTE), wurden 21, 35 und 90 Tage alte Ratten mit diesem Xenoestrogen in abgestuften Konzentrationen behandelt. Nach verschiedenen Inkubationszeiten konnte eine dosisabhängige Reduktion der Testosteronmenge gemessen werden, die sich auch nach Zugabe von Progesteron und Androstendion nicht veränderte. Die Zugabe von 22R-Hydroxycholesterol bewirkte eine signifikante Abnahme des Testosterons. Dies lässt auf eine direkte Hemmung des Xenoestrogens auf die Cytochrom-P450_{scc}-Aktivität (cholesterol side-chain-cleavage) schließen (Akingbemi et al., 2000).

Bei der Inkubation von unreifen Leydig-Zellen aus 23 Tage alten Ratten mit 4-tert-Octylphenol (OP), das eine 1000-fach schwächere estrogene Wirkung aufweist, - verglichen mit dem natürlichen Estradiol - hemmte OP signifikant in Konzentrationen von $0,5$ - $2 \mu\text{M}$ die cAMP- und die hCG-stimulierte Testosteronsynthese um 30-70 % (Murono et al., 2000). Die gleichzeitige Gabe eines Estrogenrezeptor-Antagonisten (ICI 182,780) hatte keinen Einfluss auf die durch OP gehemmte hCG-stimulierte Testosteronproduktion. Das schließt einen Estrogenrezeptor vermittelten Mechanismus wiederum aus (Murono et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass OP estrogenabhängig das Wachstum von Brustkrebs in vitro fördert (White et al., 1994). Nach chronischer Gabe von OP bei erwachsenen männlichen Ratten steigerte es die Prolaktinsekretion, senkte die Ausschüttung von LH und FSH und bewirkte eine verminderte Produktion von Testosteron (Blake und

Bookfor, 1997). Einerseits hemmt OP den 17α -Hydroxylase/C17,20-Lyase Schritt, der Progesteron in Androstendion umwandelt. Andererseits stört es die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon über eine Inhibition des cholesterol side-chain cleavage Enzyms (Muroño et al., 2001). Aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen und hohen Konzentrationen wirkt OP wahrscheinlich nicht über den klassischen Mechanismus der Estrogene, sondern als Pseudosubstrat für freie Radikale, die P450-Enzyme schädigen können (Muroño et al., 2000).

Ergebnisse von verschiedenen Autoren zeigen übereinstimmend, dass die neonatale Exposition mit synthetischen Estrogenen eine permanente Störung der Steroidbiosynthese und der Spermatogenese bewirkt. Die peripupertale Behandlung (18 Tag) mit DES verursachte zum Beispiel eine Reduktion der Zellproliferation im Epididymis und den Gefäßen. Außerdem konnte nach Behandlung mit DES eine Reduktion an $ER\alpha$ -Rezeptoren nachgewiesen werden (Atanassova et al., 2001). Auch die Behandlung mit 500 μ g Estradiol am Tag der Geburt führte zur Reduktion der proliferativen Aktivität von Epithelzellen im Epididymidis (Gaytan et al., 1990). Die $ER\alpha$ -Rezeptoren werden in der Zeit exprimiert, in der sich die epididymalen Epithelien in ihre Zelltypen differenzieren und proliferieren (Ramirez et al., 1999). Im Unterschied dazu beschrieben Tsutsumi et al. (1987), dass die Reifung der Spermatozoen nach Injektion eines Aromataseinhibitors reduziert war.

Die verschiedenen Studien machen deutlich, dass zuviel (DES) und zu wenig Estrogene (ERKO-Mäuse) die gleichen Veränderungen, wie etwa eine gestörte Entwicklung des Ductuli efferentes hervorrufen (Fisher et al., 1998). Dies belegt, dass für die normale Entwicklung eine ausgewogene Estrogenmenge sehr wichtig ist. Das heißt zu viel oder zu wenig Estrogene stören die Androgen-Estrogen-Balance. Unter physiologischen Umständen leisten die Estrogene auch bei der männlichen Reproduktion und Entwicklung einen entscheidenden Beitrag, der jedoch durch die dominante Rolle der Androgene eher unterschätzt wird (Atanassova et al., 2001).

Neben der direkten Hemmung der Enzyme treten auch durch den Estrogenrezeptor vermittelte Wirkungen im nM-Konzentrationsbereich bei der Leydig-Zelle auf (Zimniski et al., 1985). Estrogene sind bei dieser Art der Inhibition an der Gonadotropin-induzierten Desensitivierung der Steroidbiosynthese der Leydig-Zelle beteiligt. Bei diesem Mechanismus aktivieren Estrogene über die Bindung an

Estrogenrezeptoren die Bildung eines 28-kD großes Proteins, das wiederum den Enzymkomplex der 17α -Hydroxylase/C17,20-Lyase hemmt (Nozu et al., 1981; Onoda und Hall, 1981). Diese, durch Estrogenrezeptoren vermittelte Inhibition wurde auch bei der Steroidbiosynthese des Mannes beobachtet (Yanaihara und Troen, 1974). Da die Wirkung von DES das Vorhandensein von Estrogenrezeptoren voraussetzt, kann hier ebenfalls eine ER gebundene Wirkung vermutet werden (Saunders et al., 1997). Solche Zusammenhänge können auch die Ergebnisse dieser Arbeit belegen. Die Inkubation mit Ethinylestradiol und 17β -Estradiol bewirkte eine Hemmung der Testosteron- und Progesteronproduktion im nM-Bereich, das ebenfalls eine Hemmung über den Estrogenrezeptor vermuten lässt. Im höheren Konzentrationsbereich wird vor allem die Progesteronsynthese von den Estrogenen gehemmt. Dies lässt zudem auf eine kompetitive Hemmung, der an der Steroidogenese beteiligten Enzyme durch Estrogene schließen.

Auch natürliche und synthetische Estrogene können eine Hemmung der Gonadotropinausschüttung bewirken und LH sowie FSH in vitro und in vivo hemmen (Barraclough, 1973; McCann, 1973). Bartke et al. (1977) konnten in ihren Versuchen zeigen, dass die Inkubation von 5 $\mu\text{g/ml}$ Estradiol und DES nach vorheriger Gabe von hCG eine Abnahme der Testosteronkonzentration im Medium bewirkte. Das synthetische Estradiol-Benzoate (E2B) hemmte bereits bei 5 μg die Testosteronsynthese, während das natürliche Estrogen erst bei 50 μg eine signifikante Hemmung zeigte. DES inhibierte in An- und Abwesenheit von hCG die Testosteronproduktion, während bei E2B nur in Anwesenheit von hCG eine Abnahme zu sehen war. Dies macht deutlich, dass E2B nur über die Hypophysenhormone wirken kann und nicht durch direkte Hemmung an Enzymen der Steroidsynthese.

In vitro-Versuche zeigten, dass Leydig-Zellen, die vier Tage mit LH inkubiert wurden, nur noch 39% des Testosterons im Vergleich zur Kontrolle produzierten. LH reguliert die Menge der C17-Hydroxylase im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leydig-Zelle (Darney und Ewing, 1981) und Testosteron selbst hemmt die LH stimulierte Testosteronproduktion durch kompetitive Hemmung der 17α -Hydroxylase oder durch Inhibition an Rezeptoren (Darney und Ewing, 1981).

Die Rolle des Estrogens wurde weiter untersucht durch den Estrogenantagonisten Tamoxifen. Bei der Behandlung von Leydig-Zellen aus Ratten mit Tamoxifen ergab sich zentral eine Senkung des LH und peripher eine Abnahme des Testosterons

(Bartke et al., 1978). Die Reduktion des Testosterons konnte durch eine hohe Dosis an hCG wieder aufgehoben werden (Lacroix et al., 1987). Tamoxifen und Estradiol wiesen bei in vitro-Tests den gleichen Effekt auf die Leydig-Zellen auf (Lin et al., 1981). Außerdem hob sich bei gleichzeitiger Einnahme der Effekt nicht auf, sondern zeigte eine additive Wirkung (Lin et al., 1981).

5.1.2 Einflüsse von Daidzein und Bisphenol A auf die Progesteron- und Testosteronsynthese

In der vorliegenden Arbeit wurden neben 17β -Estradiol und Ethinyloestradiol auch das Xenoestrogen Bisphenol A und das Phytoestrogen Daidzein untersucht. Während eine dreitägige Inkubation mit Bisphenol A keine Veränderung des Testosteron-Niveaus im Vergleich zur Kontrolle erkennen ließ (Abb. 15), führte Daidzein in hohen Konzentrationen (1000 ng/ml und 10.000 ng/ml) zur Reduktion der Testosteronkonzentration im Zellkulturüberstand von 70 – 90 %. Der IC 50 lag bei 5.000 ng/ml (Abb. 14). Auch bei der Messung des Progesterons zeigte Bisphenol A eher einen Anstieg der Progesteronmenge im Zellkulturüberstand (Abb. 21), während Daidzein bei 1000 ng/ml zu einem signifikanten Rückgang der Progesteronsynthese um 30 – 90 % führte (Abb. 20). Da sich die Vitalität der Leydig-Zellen im Verlauf der Versuche mit Daidzein nicht verringerte (Abb. 6), ist die Abnahme der Testosteron- und Progesteronmenge auf eine Inhibition der Steroidsynthese in den R2C-Zellen und nicht auf eine zytotoxische Wirkung zurückzuführen. Bisphenol A stimuliert estrogenabhängig die Zellproliferation und induziert Progesteronrezeptoren (Krishnan et al., 1993).

Die Struktur des Bisphenol A ist der des potenten Estrogens DES sehr ähnlich, allerdings ist es ein 1000- bis 2000-mal schwächeres Estrogen (Krishnan et al., 1993). Es konnte nachgewiesen werden, dass Bisphenol A eine estrogenartige Wirkung hat, da es die Ausschüttung von Prolaktin stimuliert (Steinmetz et al., 1997). Daidzein und Bisphenol A haben eine wesentlich geringere Affinität zum Estrogenrezeptor als die beiden Estrogene Ethinyloestradiol und 17β -Estradiol. Deshalb sind höhere Konzentrationen an Daidzein und Bisphenol A nötig, um eine Hemmung der Testosteron- und Progesteronsynthese hervorzurufen.

Atanassova et al. (2000) beschrieben in ihren Versuchen an männlichen Ratten nach Behandlung mit Bisphenol A, ein normales Hodengewicht und eine normale

Fertilität. Die Zugabe von Phytoestrogenen (Genistein) senkte den FSH-Level und erhöhte den Keimzellapoptoseindex (Atanassova et al., 2000). Genistein hatte dagegen nur eine geringe reduzierende Wirkung auf das Hodengewicht.

In einer Studie beschrieben Vom Saal et al. (1998) eine reduzierte Anzahl an Spermien bei jungen Mäusen, die während der Schwangerschaft (vom 11. bis 17. Tag) mit Bisphenol A behandelt worden waren. Nikula et al. (1999) zeigten in ihren Versuchen mit Leydig-Tumorzellen von Mäusen, dass Bisphenol A und Oktylphenol (OP) nach 48-stündiger Inkubation die hCG-stimulierte cAMP sowie Progesteronsynthese in mLTC-1-Zellen hemmten. Dagegen wurde die Bindung von ¹²⁵I-hCG an LH-Rezeptoren der mLTC-1-Leydig-Zellen durch Xenoestrogene nicht beeinflusst. Eine Inkubation mit 10 nM Estradiol inhibierte zwar die Progesteronsynthese, hatte aber keinen Einfluss auf die cAMP-Produktion. Dies kann belegen, dass die Hemmung von OP und Bisphenol A nicht über Estrogenrezeptoren gesteuert wird. Es ist zu vermuten, dass die beiden Substanzen die Kopplung zwischen dem LH-Rezeptor und der Adenylatzyklase beeinflussen (Nikula et al., 1999).

Studien von Murolo et al. (2001) konnten dagegen nachweisen, dass die Inkubation von steigenden Konzentrationen an 17β-Estradiol, Bisphenol A und Endosulfan bei Leydig-Zellen von Ratten keinen Einfluss auf die Bildung von Testosteron und Progesteron hatten. Auch wurden die Enzyme für die Bildung von Testosteron aus Cholesterol nicht gehemmt. Der Einfluss von Bisphenol A auf die Testosteronsynthese zeigt hier Unterschiede bei verschiedenen Spezies (Mäusen und Ratten) und unterschiedlichen Zelltypen (Tumorzellen und Primärzellen). In anderen Versuchen wurde deutlich, dass Bisphenol A die testikuläre mikrosomale Ca²⁺-ATPase beeinflusst und die intrazelluläre Calcium-Homöostase stört (Michelangeli et al., 1996). Allerdings gibt es noch keine veröffentlichten Studien über direkte Effekte von Bisphenol A auf Leydig-Zell-Funktionen bei in vitro-Tests.

Versuche an 42 australischen Männern zwischen 35 und 62 Jahren, die für vier Wochen einer Phytoestrogen enthaltenden Sojadiät ausgesetzt waren, zeigten keine Veränderung der Testosteron-, DHT- und Estrogenkonzentration. Die Menge des Sexual-Hormon-bindenden Globulins (SHBG) war jedoch um 10 % angestiegen und der Testosteron-Estrogen-Quotient war um 3 % abgefallen (Habito et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, dass eine Phytoestrogendiät, die SHBG-Konzentration erhöht, somit mehr Androgene gebunden werden und daher weniger freie, aktive

Androgene im Blut vorhanden sind. In weiteren in vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass Genistein das Wachstum von Prostata-Tumor-Zellen hemmt (Peterson und Barnes, 1993). Da Genistein auch die Aktivität der 5α -Reduktase reduziert, könnte ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Sojaprodukten und einer verminderten Inzidenz an Prostatakrebs vermutet werden (Evans et al., 1995). Eine Studie von Jarred et al. (2000) beschrieb eine Untersuchung, bei der 20 Männer mit Prostatakrebs vor der chirurgischen Behandlung mit einer Diät von 160 mg /Tag Isoflavone behandelt wurden. Es zeigten sich keine Veränderungen der Serum PSA- und Testosteronwerte. Die Apoptose-Rate war jedoch in gering entartetem Gewebe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Hedlund et al. (2003), die Prostata spezifische Zellreihen mit Equol, einem aktiven Metaboliten von Daidzein behandelten. Equol inhibierte das Wachstum von benignen und malignen Prostatazellen um 37 % bei einer Konzentration von 10^{-6} M.

Gormley et al. (1992) konnten ebenfalls nachweisen, dass die Inkubation mit Finasterid die 5α -Reduktase hemmte und zu einer Reduktion der Prostatahypertrophie bei Patienten führte. Umgekehrt wiesen Männer mit Prostatakrebs eine höhere Konzentration an DHT und 5α -Reduktase im Vergleich zu gesunden Männern auf (Eaton et al., 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass asiatische Männer, die sehr viel Phytoestrogene zu sich nahmen, eine geringere Inzidenz für Prostatakrebs aufwiesen als Männer aus England (Shimizu et al., 1991).

Die Wirkung von Phytoestrogenen beruht also einerseits auf einer vermehrten Bildung von SHBG und somit auf einer verminderten Konzentration an freiem Testosteron und Estrogen und andererseits auf einer Hemmung der Enzyme 17β -Hydrosteroid-Dehydrogenase (Makela et al., 1998) und 5α -Reduktase (Evans et al., 1995). Verschiedene Studien konnten belegen, dass Phytoestrogene die Expression von Estrogen- und Androgenrezeptoren regulieren (Fritz et al., 2002), eine Hemmung der Zellproliferation und DNA Topoisomerase II hervorrufen (Constantinou et al., 1995) und die Zelldifferenzierung sowie Apoptose induzieren (Shapiro et al., 1999). Tesarik et al. (2002) untersuchten die Beziehung zwischen der Caspase-Aktivität und der Zerstörung von DNA in Keimzellen und Sertoli-Zellen nach Behandlung mit FSH und Testosteron. Sie konnten zeigen, daß FSH die DNA Fragmentation in Spermatozyten und Spermatischen erhöht, ohne einen Effekt auf die Caspase-Aktivität in diesen Zellen zu zeigen. Außerdem zeigte FSH keinen Effekt

auf die DNA Fragmentation oder Caspase-Aktivität in Sertoli Zellen. Die Inkubation mit Testosteron dagegen zeigte nach 24 Stunden eine Erhöhung der Caspase-Aktivität und führte zur DNA Fragmentation in Sertoli Zellen, wies dagegen aber nur einen schwachen Effekt auf die DNA Fragmentation und keinen Effekt auf die Caspase Aktivität in Keimzellen auf. Dies zeigt, dass die Aktivierung der Caspase nach Inkubation mit Testosteron einher geht mit einer erhöhten Zerstörung der DNA bei Sertoli-Zellen, während die Apoptose in Keimzellen keine Beziehung zur Caspase-Aktivität hatte (Tesarik et al., 2002).

Bei Experimenten mit prämenopausalen Frauen konnte bei der Aufnahme von Phytoestrogenen eine verminderte Sekretion von LH festgestellt werden (Cassidy et al., 1995). Duncan et al. (1999) konnten belegen, dass geringe Dosen an Isoflavonen den LH- und FSH-Level in der periovulatorischen Phase der Frau senkten und hohe Dosen zu einer Abnahme der Estrogenwerte während der folliculären Phase führten. Umit et al. (2002) untersuchten den Einfluss von Genistein und Daidzein auf das Endometrium und die Drüsen bei Frauen. Es zeigte sich, dass Isoflavone einen signifikanten Anstieg der Zellproliferation ab einer Konzentration von mehr als 10^{-7} M im Endometrium hervorriefen. Bei der Kombination von Isoflavonen mit E2 antagonisierten sie jedoch den proliferativen Effekt von E2 um 10 – 20 %. Isoflavone agieren also ebenfalls über Estrogenrezeptoren und haben dabei estrogene und antiestrogene Wirkungen. Makela et al. (1999) wiesen nach, dass Genistein mit einer zwanzigfach höheren Affinität an ER β -Rezeptoren bindet als an ER α -Rezeptoren.

5.1.3 Einflüsse von Arsenit und Quecksilberionen auf die Progesteron- und Testosteronsynthese

Zur Kontrolle der Versuchsreihe wurden die R2C-Zellen drei Tage mit Natriumarsenit (Na AsO_2) und Quecksilberdinitrat ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) inkubiert. Die Behandlung mit Arsenit verursachte eine starke Abnahme der Testosteronproduktion, die bei 25 μM signifikant war (Abb. 16). Da im MTT-Test bei 25 μM und 50 μM ebenfalls ein deutlicher Rückgang der Vitalität zu beobachten war (Abb. 8), wird die Abnahme des Testosterons eher auf den zytotoxischen Effekt von Arsenit zurückzuführen sein. Quecksilberionen zeigten dagegen keinen Einfluss auf die Testosteronmenge (Abb. 17). Die Progesteronmenge nahm bei der Inkubation mit 1 μM Arsenit um 9 % und bei höheren Konzentrationen um 35 - 85 % ab (Abb. 22). Die Inhibition der

Progesteronsynthese setzte hier schon bei Konzentrationen ein (1 - 10 μM), die im MTT-Assay noch keine Abnahme der Zellvitalität zeigten (Abb. 9). Dies lässt auf eine Hemmung der Steroidogenese durch Arsenit schließen.

In Studien mit Arsenit konnte nachgewiesen werden, dass es bei Menschen ab einer Konzentration von 22 – 121 mg/kg tödlich gewirkt hatte. Bei einem Versuch mit schwangeren Ratten erwiesen sich bereits 20 mg/kg als tödlich (Timothy et al., 2001). Eine chronische Exposition mit Arsenit hatte zu Gewichtsverlust, geringerer Lebenserwartung, Hyperkeratose geführt sowie neurotoxische Wirkungen gezeigt (ATSDR, 2000a). In Verbindung mit Arsenit wird außerdem eine erhöhte Inzidenz an Haut-, Lungen-, Leber- und Blasenkrebs vermutet (ATSDR, 2000a). Oberly et al. (1982) untersuchten L5178Y Zellen von Mäusen. Sie konnten belegen, dass Natrium-m-Arsenit eine schwache genotoxische Wirkung hatte. Moore et al. (1997) zeigten in ihren Versuchen, dass Arsenit Chromosomenaberrationen, Polyploidien und Endo-Reduplikationen verursachte. Weitere Studien an Hamsterembryozellen konnten belegen, dass Arsenit den Austausch von Schwesterchromatiden bewirkte. Die chromosomalen Abberationen waren durch Lücken, Brüche und Redupliationen an Chromatiden charakterisiert (Lee et al., 1985; Kochhar et al., 1996). Mass (2001) konnte bei in vitro- Tests an menschlichen Lymphozyten nachweisen, dass anorganisches Arsenit und Arsenat eine konzentrationsabhängige Steigerung von Schädigungen der DNA verursachten. Das methylierte trivalente Arsenit war dabei 54- bis 77-fach potenter, als die nicht methylierten Formen. Versuche an Nachkommen von Ratten zeigten, dass mit steigender Konzentration an Arsenit die Natrium-, Magnesium- und Calciumkonzentration im Serum abnahm, während die Kalium- und Phosphat-konzentrationen nicht signifikant beeinflusst wurden (Zhang et al., 2000). Die zytotoxische Wirkung von Arsenit konnte in mehreren Versuchen belegt werden. Auch in dieser Arbeit wurde nach der Inkubation mit Arsenit eher eine zytotoxische Wirkung auf die Leydig-Zellen erkennbar, da im MTT-Test ebenfalls ein Rückgang der Vitalität zu erkennen war.

In der Literatur wurde bereits ein hemmender Effekt von Quecksilberionen auf die Enzyme der Steroidbiosynthese beschrieben (Chowdhury et al., 1985). Bei einem Versuch mit Ratten konnte gezeigt werden, dass Quecksilberchlorid (50 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und Methylquecksilberchlorid (5 – 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) die Testosteronmenge im Blut nach 90 Tagen signifikant gesenkt hatte (Vachhrajani und Chowdhury, 1990). Außerdem wurde eine verminderte Anzahl an Leydig-Zellen, Tubuli seminiferi und

Spermatogonien festgestellt. Andere Untersuchungen beschrieben eine Inhibition der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Isomerase (3-HSD) von Ratten, die 0,05 mg/kg bzw. 0,1 mg/kg Quecksilberchlorid für 90 Tage ausgesetzt worden waren (Chowdhury et al., 1985). Weitere Versuche zeigten bei einer Quecksilberdinitratkonzentraion von 20 μ M eine teilweise Hemmung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bei Sertoli-Zellen und ein nachfolgendes Absterben der Zellen (Gebhardt, 2004). Bei einer Konzentraion von 48 μ M kam es zur kompletten Hemmung der mitochondrialen Dehydrogenasen.

Bei einer Studie mit CDF1-Mäusen, die 70 Tage intraperitoneal 1 mg/kg Methylquecksilber bekommen hatten, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Abnahme der Fertilität (Lee und Dixon, 1975). Im Unterschied dazu zeigten andere Autoren, dass bisher in keiner durchgeführten Studie an Männern die Beeinträchtigung der Fertilität durch Quecksilberionen nachgewiesen werden konnte (Lauwerys et al., 1985; Alcer et al., 1989). Eggert-Kruse et al. (1992) zeigten anhand eines in vitro-Spermien-Zervikalmukus-Penetrationstestes, dass Spermien bei einer Konzentraion von 0,5 mM/l HgCl₂ nicht mehr in der Lage waren, den Zervixschleim zu penetrieren. Mitsumori et al. (1990) beschrieben eine Atrophie der Tubuli des Hoden in B6C3F1-Zellen von Mäusen nach einer zweijährigen Zufütterung von 10 ppm (mg/kg Futter) Methylquecksilber. Bei weiblichen Hamstern, die im ersten Zyklus mit 3 – 4 mg Quecksilberchlorid behandelt wurden, hatten 60 % im dritten Zyklus keine Ovulation (Lamperti und Printz, 1974). Weibliche Hamster, die während eines Menstruationszyklusses 1 mg Quecksilberchlorid bekamen, hatten erhöhte FSH-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle (Lamperti und Niewenhuis, 1986).

Bei Versuchen mit Methylquecksilber an schwangeren Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht die Chromosomen schädigte (Watanabe et al., 1982). Bei geringeren Konzentrationen (0,05 - 0,1 μ M) störte Methylquecksilber die Genexpression in vitro bei Gliomzellen (Ramanujam und Prasad, 1979). Des Weiteren traten bei der *Drosophila melanogaster* nach der Behandlung mit Methylquecksilber Non-Disjunktionen und geschlechtsgebundene letale Mutationen auf (Magnusson und Ramel, 1986). Bei Versuchen mit polnischen Zahnärztinnen, die metallischem Quecksilber aus Amalgamen ausgesetzt waren, zeigte sich eine erhöhte Anzahl von Spontanaborten, angeborenen Fehlbildungen und Menstruationsstörungen (Sikorski et al., 1987). Eine Studie von Ericson und

Kallen (1989) mit schwedischen Zahnärztinnen wies allerdings im Gegensatz dazu keine Veränderungen auf.

Es gibt viele Studien mit Quecksilber, die eine schädigende Wirkung auf Organismen und Zellen nachweisen konnten. Eine bereits belegte starke toxische Wirkung hat Quecksilber auf die Niere (Nephritis und Anurie) und das zentrale Nervensystem. In der Niere wurden die Tubuli bei einer Konzentration von 10 mg/kg in Ratten geschädigt, und im Gehirn degenerierten die Zellen des Cortex (Klein, 1972). Des Weiteren wurden schwere gastrointestinale (hämorrhagische Gastritis) und kardiovaskulären Schäden beschrieben (Stockinger, 1981). Auch bei Versuchen mit Tieren wurden toxische Wirkungen von Quecksilberionen auf die Weibchen und deren Nachkommen nachgewiesen. Untersuchungen bei Männern dagegen belegten bisher keine eindeutige Reduktion der Fertilität. Lauwerys et al. (1985) untersuchten die Fertilität von belgischen Arbeitern in einer Zink-Quecksilber Fabrik. Hier wurden ebenfalls keine schädigenden Einflüsse auf die Fertilität bei diesen Männern gefunden. Alcer et al. (1989) untersuchten 247 Männer, die auf einer Plantage arbeiteten, bei der Quecksilber eingesetzt wurde. Die Quecksilberbelastung wurde durch eine Urinuntersuchung nachgewiesen. Beim Vergleich der 247 Arbeiter mit Quecksilberbelastung und 255 Arbeitern, die keinem Quecksilber ausgesetzt waren, zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Fertilität. Auch in der vorliegenden Promotionsarbeit hat die Inkubation von Quecksilberdinitrat bei den Leydig-Zellen keine Reduktion der Testosteron- und Progesteronsynthese erkennen lassen.

Beim Vergleich dieser ganzen Studien muß beachtet werden, dass verschiedene Arten von Studien (Tierversuche, in vitro-Tests) vorliegen. Ein Vergleich der Studien miteinander ist deshalb schwierig, da sich die einzelnen Ergebnisse nicht übertragen lassen.

5.2 Einfluß von Estrogenen, Xenoestrogenen und Metallionen auf die Bildung von Laktat

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von Estrogenen, Xenoestrogenen und Metallionen auf die Laktatproduktion von R2C-Zellen untersucht. Laktat und Pyruvat sind Stoffe, die hormonreguliert von den Leydig- und Sertoli-Zellen bei der Glykolyse gebildet werden. Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH), das für die Bildung von Laktat verantwortlich ist, wurde ebenfalls in Spermatozoen gefunden. Es ist an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Calvin und Tubbs, 1978).

Shin-Shan et al. (1996) zeigten in ihren *in vivo* Versuchen mit Ratten, dass die Zugabe von Laktat nach 10 Minuten zu einem Anstieg von cAMP und dadurch zu einer vermehrten Produktion von Testosteron führte. LH und GnRH stiegen dagegen erst nach 30-minütiger Infusion von Laktat an, woraus geschlossen werden kann, dass Laktat unabhängig von dem Hypothalamus/Hypophyse-Regelkreis Testosteron stimulieren kann. Pyruvat und Laktat gelten außerdem als Indikatoren für die Zellfunktion nach Behandlung mit toxischen Stoffen (Williams und Foster, 1988). In der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation der R2C-Zellen mit Ethinylestradiol und 17 β -Estradiol zu einem leichten Anstieg der Laktatmenge im Zellkulturüberstand (Abb. 24 und 25). Bei den Xenoestrogenen bewirkte Daidzein zuerst einen Anstieg von 25 % bei 10 ng/ml und sank in hohen Konzentrationen wieder ab (Abb. 26). Bisphenol A zeigte nach drei Tagen Inkubation keine Veränderung der Laktatmenge (Abb. 27). Bei Arsenit waren in niedrigen Konzentrationen (25 μ M und 50 μ M) eine Abnahme um 20 % und 30 % (Abb. 28) zu sehen. Die Abnahme der Laktatmenge ist hierbei auf den zytotoxischen Effekt von Arsenit in diesem Konzentrationsbereich zurückzuführen. Laktat und das dazugehörige Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) sind sensitive biochemische Marker für veränderte Laktat-Zell-Funktionen *in vitro* als Antwort auf toxische Stoffe (Williams und Foster, 1988). Keltimlidis et al. (1989) untersuchten 71 fruchtbare und 93 unfruchtbare Männer. Sie fanden, dass die 71 fertilen Männer das Enzym LDH zu 100 % aus den Mitochondrien der Spermatozoen ausschütteten. Von den 93 unfruchtbaren Männern war bei 14 Personen mit Azoospermie LDH nicht vorhanden, während bei 79 Männern mit Oligoasthenospermie die LDH-Affinität um 20,9 % reduziert war.

Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen mit dem im Baumwollsaamen vorkommenden Polyphenol Gossypol, das über die Nahrung (Öl) aufgenommen werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass Gossypol die testikuläre Funktion und die Reifung der Spermatozoen stört. Es inhibierte die Laktatdehydrogenase, welche Pyruvat in Laktat umwandelt, bei Spermatozoen von Menschen und Tieren (Hwang et al., 1971). Williams et al. (2001) konnten zeigen, dass eine 24-stündige Inkubation mit 1,3-Dinitrobenzo (1,2-DNB) und Mono-(2-ethylhexyl)-phythalat (MEHP) eine signifikante dosisabhängige Steigerung der Laktatproduktion in Sertoli-Zellen bewirkte. Die Isomere 1,2 und 1,4 DNB haben dagegen keinen statistisch relevanten Effekt auf die Laktatproduktion im Vergleich zu 1,3 DNB. Diese Isomere wirken auch *in vivo* nicht toxisch auf den Testes (Backburn

et al., 1988). Dagegen hatten die Stoffe Ethylenglycol Monomethyl Ether (EGME) und Methoxyacetyl Säure (MAA) in vivo einen zytotoxischen Effekt auf die Sertoli-Zellen (Foster et al., 1984). EGME zeigte bei in vitro Versuchen keinen Effekt auf die Laktatmenge im Zellkulturüberstand, während MAA bei hohen Konzentrationen signifikant die Laktatproduktion senkte (Williams und Foster, 1988).

In R2C-Zellen wird die Proteinkinase und die Laktatproduktion cAMP und FSH abhängig stimuliert (Freeman, 1987). Beide führen in vitro zu einer Veränderung der Zellfunktion. FSH wird in zyklischer Form ausgeschüttet wobei zu viel oder zu wenig FSH eine Störung der Zellfunktion bewirkte (Williams et al., 2001). Die Laktatproduktion in Steroide-bildenden Zellen stieg nach Zugabe von Wachstumshormonen an.

In der vorliegenden Arbeit nahm die Laktatkonzentration bei der Zugabe der Estrogene und bei Daidzein leicht zu, bei Bisphenol A zeigte sich keine Veränderung und bei Arsenit war eine Abnahme des Laktats im Zellkulturüberstand erkennbar. Wie die bereits beschriebenen Ergebnisse zeigen, haben die Stoffe je nach Versuchsbedingungen und Gewebe unterschiedliche Auswirkungen auf die Laktatproduktion.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes sagen: Chemikalien wie Bisphenol A und zahlreiche Pestizide stehen im Zusammenhang mit den in den letzten Jahrzehnten auftretenden Reproduktionsstörungen bei Tieren und Menschen (Colborn et al., 1996). Zusätzlich hat die erhöhte Exposition mit den in der Natur vorkommenden Estrogenen (Phytoestrogenen) einen ungünstigen Einfluss auf die Reproduktionsorgane des Mannes. Eine definitive Aussage ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch schwer. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden die Leydig-Zellen aus ihrem physiologischen Milieu herausgenommen, wodurch Einflüsse von Hormonen (LH, GnRH) entfallen (Sharpe 1993). Zudem waren die Leydig-Zellen in direktem Kontakt mit den Umwelttoxinen im Gegensatz zu den physiologischen Gegebenheiten in vivo. Die Ergebnisse sind somit nicht direkt auf die in vivo Situation übertragbar (Russel und Steinberger, 1989). Weitere Forschungen, die die hormonelle Situation der Leydig-Zelle in vivo sowie in vitro berücksichtigen, um die Resultate miteinander vergleichen zu können, stehen noch aus.

Eine weitere Zielsetzung der Arbeit war die Entwicklung eines in vitro Testsystems zur Untersuchung von der Wirkung von hormonellen Substanzen auf die männliche

Fertilität am Beispiel der Leydig-Zelle. Die R2C-Zellen in dieser Versuchsreihe eigneten sich sehr gut. Sie erwiesen sich als robust, waren einfach in der Handhabung und reagierten dennoch sensibel auf die zugeführten Umweltnoxen.

6. Zusammenfassung

Seit den letzten Jahren stehen Umweltfaktoren und deren Auswirkungen auf die Gesundheit und Fertilität des Menschen immer mehr im Interesse der Forschung. Fortpflanzungs- und Entwicklungsprozesse reagieren sehr empfindlich auf Umweltchemikalien, wobei Pestizide und Industriechemikalien mit estrogenen Wirkung besonders schädigend zu wirken scheinen. Die Estrogenhypothese besagt, dass die Ursachen für Störungen bei der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane und der Spermatozoen in pränatalen Expositionen gegenüber Estrogenen und anderen estrogen oder antiestrogen wirkenden Substanzen bestehen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Estrogene 17β -Estradiol und Ethinylestradiol, der Xenoestrogene Daidzein und Bisphenol A und der Metallionen Natriumarsenit und Quecksilberdinitrat auf die Testosteron-, Progesteron- und Laktatproduktion der R2C-Leydig-Zellen untersucht. Zudem wurde die akute Zytotoxizität im MTT-Test bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das endogene 17β -Estradiol und das exogen aufgenommene Ethinylestradiol die Testosteronsynthese im nM-Bereich inhibierten. Im höheren Konzentrationsbereich stieg die Testosteronproduktion bis zum 6-fachen der Kontrolle an. Dies ist einerseits auf eine störende Kreuzreaktion zwischen in den im RIA verwendeten Antikörpern und den zugeführten Estrogenen zurückzuführen, andererseits aber auf eine Hemmung des Testosteronabbaus. Die Progesteronsynthese wurde von beiden Estrogenen im nM- und μ M-Konzentrationsbereich gehemmt. Das Phytoestrogen Daidzein inhibierte die Testosteron- und Progesteronproduktion nur im μ M-Bereich. Dies lässt auf eine Hemmung der für die Testosteron- und Progesteronbildung zuständigen Enzyme schließen. Das Xenoestrogen Bisphenol A hatte keinen Einfluss auf die Testosteron- und Progesteronmenge im Zellkulturüberstand.

Natriumarsenit, das zusammen mit Quecksilberdinitrat als Kontrolle des Testsystems eingesetzt wurde, hemmte hoch signifikant im μ M-Bereich die Testosteron- und Progesteronsynthese. Da jedoch auch die Vitalität der Zellen im MTT-Assay in diesem Bereich stark abgenommen hatte, lässt sich dies eher auf eine zytotoxische Wirkung von Arsenit zurückführen. Quecksilberdinitrat hatte insgesamt gesehen keinen Einfluss auf die Testosteron- und Progesteronsynthese.

Die Laktatkonzentration hatte bei der Zugabe der Estrogene und bei Daidzein leicht zugenommen, bei Bisphenol A zeigte sich dagegen keine Veränderung und bei

Arsenit war eine Abnahme des Laktats im Zellkulturüberstand festzustellen. Bei der Inkubation mit Quecksilberdinitrat waren keine signifikanten Einflüsse festzustellen. Aus den Ergebnissen lassen sich die Schlussfolgerungen ziehen, dass die Estrogene 17 β -Estradiol und Ethinylestradiol, sowie das Phytoestrogen Daidzein und das Schwermetallion Natrium-m-Arsenit einen hemmenden Einfluss auf die Testosteron- und Progesteronsynthese ausübten, während Bisphenol A und Quecksilberdinitrat nur sehr schwache Wirkungen erkennen ließen. Im nM-Konzentrationsbereich agierten die Estrogene mit Estrogenrezeptoren und übten somit einen hemmenden Effekt auf die Testosteron- und Progesteronsynthese aus, während in hohen Konzentrationen die an der Steroidsynthese beteiligten Enzyme direkt durch Daidzein und Arsenit inhibiert wurden.

Es wurde ebenfalls die Eignung der R2C-Zellen von Ratten als Testsystem untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich die R2C-Zellen sehr gut für die Versuchsreihe eigneten: Sie haben sich als sehr robust erwiesen, waren einfach in der Handhabung und haben dennoch sensibel auf die Zugabe von Noxen reagiert.

Die Erfassung und Beurteilung der schädlichen Einflüsse von Estrogenen, Xenoestrogenen und anderen Umweltchemikalien auf die männliche Fertilität stellt eine besondere Herausforderung dar. Gesicherte Erkenntnisse liegen nur für wenige Noxen, auf Grund der begrenzten Übertragbarkeit von Studien an Tieren auf den Menschen, vor. Weitere Forschungen sind unerlässlich, um potentielle Reproduktionstoxine frühzeitig erfassen zu können.

7. Literaturverzeichnis

- Abney TO (1999): The potential roles of estrogens in regulating leydig cell development and function. A review. *Steroids* 64: 610-617
- Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, andreu E, Karamertzanis M, Michopoulos J, Deligianni V, Simou M (1996): Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod* 11:1936-1941
- Aitken RJ, Sawyer D (2003): The human spermatozoon-not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol.* 518:85-98
- Akingbemi BT, Ge-RS, Klinefelter GR, Gunsalus GL, Hardy MP (2000): A metabolite of methoxychlor, 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1, 1-trichlorethane, reduces testosterone biosynthesis in rat Leydig-cells through suppression of steady-state messenger ribonucleic acid levels of the cholestreol side-chain cleavage enzyme. *Biol Reprod* 62:571-578
- Alcer KH, Brix KA, Fine LJ, Kallenbach LR, Wotte RA (1989): Occupational mercury exposure and male reproductive health. *Am J Ind Med* 15:517-529
- Anderson D, Dobrzynska MM, Yu TW, Gandini L, Cordelli E, Spano M (1997): DNA integrity in human sperm. *Teratog Carcinog Mutagen* 17:97-102
- Ans MM, van Pelt DG, de Rooij B, van der Burg PT, van der Saag JAG, Kuiper GGJM (1999): Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 140:478-483
- Ascoli M (1981): Characterisation of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidofenic responses. *Endocrinology* 108:88-95
- Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM (1999): Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, sertoli cell number and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 140:5364-537
- Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM (2000): Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898-3907

- Atanassova N, McKinnell C, Williams K, Turner KJ, Fisher JS, Millar MR, Saunders PTK, Sharpe RM. (2001): Age-, cell-and region-specific immunoexpression of estrogen receptor α (but not estrogen receptor β) during postnatal development of the epididymidis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with Diethylstilbestrol. *Endocrinology* 142:874-886
- ATSDR (2000a): Toxicological Profile for Arsenic: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- ATSDR (2000b): Toxicological Profile for Chromium: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Auger J, Kunstmann J.M, Czyglik F, Jouannet P (1995): Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332: 281-285
- Barraclough CA (1973): Sex steroid regulation of reproductive neuroendocrine process. In: *Handbook of Physiologie. Endocrinologie II, Part 1*, Greep RO (Ed) Am. Physiol. Soc., Washington, D.C. pp. 29-56
- Bartke A, Mason M, Dalterio S, Bex F (1978) Effects of tamoxifen on plasma concentrations of testosterone and gonadotropins in the male rat. *J Endocrinology* 79:239-240
- Bartke A, Williams KIH, Dalterio S (1977): Effects of estrogen on testicular testosterone production in vitro. *Biol Reprod* 17:645-649
- Bartlett JMS, Kerr JB, Sharpe RM (1986): The effects of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *J Androl* 7:240-253
- Blake CA, and Boockfor, F R (1997): Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to the adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin and testosterone. *Biol Reprod* 57: 255-266.
- Bogovich K, Payne AH (1980): Purification of rat testicular microsomal 17-ketosteroid reductase. Evidence that 17 ketosteroid reductase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase are distinct enzymes. *J Biol Chem* 255:5552-59
- Boyle P, Kaye SN, Robertson AG (1987): Changes in testicular cancer in Scotland. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 23, 827-830

- Brinkmann AO, Leemborg FG, Roodnat EM, De Jong FH, Van Der Molen HJ (1980): A specific action of estradiol on enzymes involved testicular steroidogenesis. Biol Reprod 23:801-809
- Bryant HU, Dere WH (1998): Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. Proc Soc Exp Biol Med 217: 45-52
- Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R (1996): Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. Br Med J 312:471-472
- Bush, B, Bennet, AH, Snow, JT (1986): Polychlorobiphenyl congeners, p,p'- DDE and sperm funktion. Arch Environm Toxicol. 15: 333
- Calvin J, Tubbs PK, (1978): Mitochondrial transport processes and oxidation of NAPH by hypotonocally-treated boat spermatozoa. Eur J Biochem 89: 315.320
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Brit Med J 305:609-613
- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J (1999): Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. Int J Androl 22:211-223.
- Cassidy A (1996): Physiological effects of phytoestrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc of the Nutr Soc 55:399-417
- Cassidy A, Bingham S, Setchell K (1995): Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. Br J Nutr 74: 587-601
- Chowdhury AR, Vachhrajani KD, Chatterjee (1985): Hydroxy delta 5-steroid dehydrogenase in rat testicular tissue by mercury chloride. Indian J Physiol Pharmacol 45-49
- Chowdhury AR, Makhija S, Vachhrajani KD (1989): Methylmercury induced biochemical and histochemical alterations in rat testis. Indian J Physiol Pharmacol 33:219-222.
- Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM (1993): Developemental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and human. Environ. Health Perspect. 101: 378-384
- Colborn T, Dumanoski D, Myers JP (1996): Die bedrohte Zukunft. Gefährden wir unsere Fruchtbarkeit und Überlebensfähigkeit? Droemer Knauer, München

- Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995): Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure –activity relationship. *J Nat Prod*, 58: 217-225
- Cook JC, Johnson L, O'Connor JC, Biegel LB, Krams CH, Frame SR, Hurtt ME (1998): Effects of dietary 17 beta-estradiol exposure on serum hormone concentrations and testicular parameters in male Crl:CD BR rats. *Toxicol Sci* 44:155-168
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS (1999): Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286:2328-2331
- Darney KJ and LL Ewing (1981): Autoregulation of testosterone secretion in perfused rat testes. *Endocrinology* 109:993-995
- Degen GH, Foth H, Kahl R, Kappus H, Neuman HG, Oesch F, Schult-Hermann R (1999): Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoöstrogene, Stellungnahme der DGPT. *Umweltmed Forsch Prax* 4:367-374.
- Dewailly E, Dodin S, Verreault R, Ayotte P, Sauve L (1994): High organochlorine body burden in women with estrogen receptor positive breast cancer. *JNCI* 86:232-234
- Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS (1999): Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 581-586
- Dufau ML, Watanabe K, Catt KJ, (1973): Stimulation of cAMP production by the rat testis during incubation with hCG in vitro. *Endocrinology* 92:6-11
- Düker E-V, Kopanski L, Jarry H, Wuttke W (1991): Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Plana Med* 57: 420-424
- Eaton NE, Reeves GK, Appleby PN, and Key TJ (1999): Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* 80: 930-934
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Jochum R, Adolph M, Runnebaum B (1992): The effects of heavy metals on the in vitro interaction between human sperm and cervical mucus. *Deutsche Med Wochenschr.* 117: 1383-1389

- Emmen JM, Mc Luskey A, Adham IM, Engel W, Verhoef-Post JM, Themmen AP, Grootegoed JA, Brinkmann AO (2000): Involvement of insulin-like-factor 3 (InsL3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology* 141:846-849
- Ericson A, Kallen B (1989): Pregnancy outcome in women working as dentists, dental assistants or dental technicians. *Int Arch Occ Environ Health* 61:329-333
- Evans BA, Griffiths K, Morton MS (1995): Inhibition of 5 α -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinology* 147: 295-302
- Falck F, Ricci AJ, Wolff MS, Godbold J, Deckers P (1992): Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47:143-146
- Fevold RH, Lorence MC, Mc Carthy JL, Trant JM, Kagimoto M, Waterman MR, Mason JI (1989): Rat P450_{17 α} from testes: characterization of a fulllength cDNA encoding a unique steroid hydrolyase capable of catalyzing both steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol* 3:968-75
- Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH (1996): Semen analysis in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 65: 1009-1014
- Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM (1997): Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinology* 153:485-495.
- Fisher JS, Turner KJ, Fraser HM, Saunders PTK, Brown D, Sharpe RM. (1998): *Endocrinology* 139:3935-3945
- Fisher JS, Turner KJ, Brown D, Sharpe RM (1999): Effects of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ Health Perspect* 107:397-405.
- Fotsis T, Pepper MS, Adlercreutz A, Hase T, Montesano R (1995): Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 125: 790S-797S
- Freeman DA, Ascoli M (1982): Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 257:14231

- Freeman DA (1985): Estradiol inhibits as a competitive inhibitor of the 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 Isomerase enzyme of cultured Leydig tumor cells. *Endocrinology* 117:2127-2132
- Freeman DA (1987): Constitutive Steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line is maintained by the adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate-independent production of a cycloheximide-sensitive factor that enhances mitochondrial pregnenolone Biosynthesis. *Endocrinology* 120: 124-132
- Fritz WA, Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA (2002): Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinology* 186: 89-99
- Fujieda K, Faiman C, Feyes FI, Winter JSD (1982): The control of steroidogenesis by human fetal adrenal cells in tissue culture. IV. The effects of exposure to placental steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 54:89
- Gaytan F, Aceitero J, Bellido C, Pinilla L, Aguilar E, Aguilar R (1990): Are eosinophil leucocytes involved in the oestrogenic response of the postnatal rat epididymidis? *Int J Androl* 13:500-507
- Gebhardt S (2004): Einfluß von Metallionen auf ausgewählte Funktionsparameter von Sertoli-Zellen: Potentielles Testsystem zur Prüfung männlicher Fertilitätsstörungen. *Andrologia* 26: 1-113
- Gill WB, Schuhmacher FB, Bibbo M, Straus Fh, Schoenberg HW.(1987): Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J Urol* 122:36-39
- Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-MCGinley J, Walsh PC, McConnell JD Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS, Vaughan DE, Pappas F, Taylor A, Binkowitz B, Ng J (1992): The effects of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 327: 1185-1191
- Greenberg ER, Barnes AB, Ressegue L (1984): Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N Engl J Med* 311: 1393-1398
- Haavisto T, Numela K, Pohjanvirta R, Huuskonen H, El-Gehani F, Paranko J (2001): Prenatal testosterone and LH-Levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol Cell Endocrinology* 178:169-179

- Habito RC, Montalo J, Ball EM (2000): Effects of replacing meat with soyabean in the diet on sex hormone concentrations in healthy adult males. *Br J Nutr* 84: 557-563
- Hedlund TE, Johannes WU, Miller GJ (2003): Soy Isoflavonoid Equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *The Prostate* 54:68-78
- Hakulinen T, Andersen AA, Malke B, Pukkala E, Schou G, Tulinius H (1986): Trend in cancer incidence in the Nordic countries. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand* 288: 1-151
- Hales DB, Payne AH (1987): Testosterone inhibits cAMP-induced de novo synthesis of Leydig cell cytochrome P450 17 α by an androgen receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem* 262:11200-11206
- Hendry W, Parslow JM, Stedronska J (1983): Exploratory scrotomy in 168 azoospermic males. *Br J Urol* 55:785-791
- Herbst AL (1981): Clear cell adenocarcinoma and the current status of DES exposed females. *Cancer* 48:484-488
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn (1997): A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature London* 390:509-512.
- Hunter DJ, Hankinson SE, Laden F, Colditz GA, Manson JE et (1997): Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 337: 1253-1258
- Hwang P, Guyda H, Friesen H (1971): A radioimmunoassay for human prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1902-1911
- IPCS/WHO (1997): Quecksilbernitrat. BGVV international chemical safety cards p1-7
- Irvine DS, Cawood E, Richardson D, Mac-Donald E, Aitken RJ, (1996): Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 312: 467-471
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick D (1998): Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl* 19:65-71
- Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP (2000): Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology* 141: 3471-3477

- Jarry H, Gorkow CH, Wuttke W (1995): Treatment of menopausal symptoms with extracts of *Cimicifuga racemosa*: in vivo and in vitro evidence of estrogenic activity *Phytopharmaka in Forschung und klinischer Anwendung*: Steinkopf, Darmstadt S 99-112
- Jayle M, Scholler R, Sfikalas A, Heron M (1962): Excretion des phenolsteroides et des 17 cetosteroides apres administration de gonadotropines chorioniques a des hommes. *Clinica Chemica Acta* 7:212-220
- De Jong FH, Hey AH, Van der Molen HJ (1973): Effects of gonadotrophins on the secretion of oestradiol-17 β and testosterone by the rat testis. *Endocrinology* 57:277-284
- Kayisli UA, Aksu CA, Berkkanoglu M, Arici A (2002): Estrogenicity of Isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells. *Endocrinology* 87:5539-5544
- Keltimlidis K, Papadimas J, Bontis J, and Mantalenakis S (1989): LDH isoenzymes in semen of infertile men. *Archives of Andrology* 22:77-84
- Klein R (1972): A model of acute methyl mercury intoxication in rats. *Arch Pathol* 93:408-418
- Kochhar TS, Howard W, Hoffman S (1996): Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamsters ovary (CHO) cells. *Toxicol Lett* 84:37-42
- Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA, McKinney JD (1988) Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol* 33:120-126.
- Krege JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor- β . *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15677-15682
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldmann D, (1993): Bisphenol A: an estrogen substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132: 2279-2286
- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930

- Lacroix E., W. Eechaute, H. Vanderstichele, and I. Leusen (1987) Influence of a prolonged tamoxifen administration on steroidogenesis by incubated rat testis. *J Steroid Biochem* 28:301-305
- Le Goascogne, C, P Robel, M Gouezou, N Sananes, EE Baulieu M Waterman (1987): Neurosteroids: cytochrome P450 scc in rat brain. *Science* 237:1212-1215
- Lamperti AA, Printz RH (1974): Localization, accumulation and toxic effects of mercuric chloride on the reproductive axis of the female hamster. *Biol Reprod* 11:180-186
- Lamperti AA, Niewenhuis R (1986):The effects of mercury on the structure and function of the hypothalamo-pituitary axis in the hamster. *Cell Tissue Res*, 170:315-324
- Larochette N, Decaudin D, Jacotot E, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Zamzami N, Xie Z, Reed J, Kroemer G (1999): Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp Cell Res* 249:413-421
- Lauwerys R, Roels H, Genet P, Toussiant G, Bouckart A, De Cooman S (1985):Fertility of the male workers exposed to mercury vapor or to manganese dust: a questionnaire study. *Amer J Ind Med* 7:171-176
- Lee IP, Dixon RL (1975): Effects of mercury on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. *J Pharmacol Exp Ther* 104:171-181
- Lee T-C (1985): Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis* 6:1421-1426
- Lin T, Muroso EP, Osterman J, Nankin HR (1981) Direct inhibition of rat leydig cell function by tamoxifen. *Metabolism* 30:156-159
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach, Smithies O (1993): Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl Acad Sci USA* 90:11162-11166
- Luketich JD, Melner MH, Guengerich FP, Puett D (1983): Effects of human choriongonadotropin on mitochondrial and cytochrome P450 levels in mouse testes. *Biochem Biophys Res Commun* 111:424-29

- Magnusson J, Ramel G (1986): Genetic variation in the susceptibility to mercury and other metal compounds in *Drosophila melanogaster*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis* 6:4-7
- Makela S, Poutanen M, Kostian ML, Lehtimaski N, Strauss L (1998): Inhibition of 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 310-316
- Mass MJ (2001): Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol* 14:355-361
- McCann SM (1973): Regulation of secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. In: *Handbook of Physiology. Endocrinologie IV, Part 2*, Greep, R.O. (Ed.) Am. Physiol. Soc., Washington, D.C. pp. 489-517
- Mc Kinnell C, Atanassova N, Williams K, Fisher JS, Walker M, Turner KJ, Saunders PTK, Sharoe RM (2001): Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl* 22:323-338
- Michelangeli F, Tovey S, Lowes DA, Tien RF I, Mezna M, McLellan H, Hughes P (1996): Can phenolic plasticizing agents affect testicular development by disturbing intracellular calcium homeostasis? *Biochem Soc Trans* 24: 293S.
- Mitsumori K, Hirano M, Ueda H, Maita K, Shiroso Y (1990): Chronic toxicity and carcinogenicity of methyl mercury chloride in B6C3F1 mice. *Fund Appl Toxicol* 14:179-190
- Moller H (2001): Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer in Denmark. *Human Reprod* 16: 1007-1011
- Moore MM, Harrington-Brock K, Doerr CL. (1997): Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat Res* 386:279-290
- Mosmann, T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63
- Murono EP, Derk RC, De-Leon JH. (2000): Octylphenol inhibits testosterone biosynthesis by cultured precursor and immature Leydig-cells from rat testes *Reprod Toxicol* 14: 275-288
- Murono EP, Derk RC, De-Leon JH (2001): Differential effects of octylphenol, 17 β -estradiol, endosulfan, or bisphenol A on the steroidogenetic competence of cultured adult rat Leydig-cells. *Reprod Toxicol* 15: 551-560

- Nagel SC, Vom Saal FS, Welshons WV (1999): Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 343-357
- Nieschlag E, Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M (1999): *Physiologie der Hodenfunktion*, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland 3: 29-59
- Noll F (1984): L-(+) –Lactate, In *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed H U Bergmeyer, Academic Press New York Vol. III 582-588
- Nozu K, Dufau ML, Catt KJ. (1981): Estradiol receptor mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. *J Biol Chem* 256:1915-1922
- Oberly TJ, Piper CE, Mc Donald DS. (1982): Mutagenicity of metal salts in the L5178Y mouse lymphoma assay. *J Toxicol Environ Health* 9:367-376
- Onoda M, Hall PF (1981): Inhibition of testicular microsomal cytochrome P-450 (17 α -hydroxylase/C-17, 10-lyase) by estrogens. *Endocrinology* 109: 763-767.
- O'Shaughnessy PJ, Payne AH, (1982): Differential effects of a single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations. *J Biol Chem* 257:11503-09
- Osser S, Liedholm P, Ranstam J (1984): Depressed semen quality: a study over two decades. *Arch Androl* 12: 113-116
- Paulsen CA, Berman, NG Wang C (1996): Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril* 65: 1015-1020
- Payne AH, O'Shaughnessy PJ (1996): Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig-cell. *Stanford University of Glasgow* 260-277
- Payne AH, Wong K-L, Vega MM (1980): Differential effects of a single and repeated administration of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *J Biol Chem* 255:7118-7122

- Payne AH, (1990): Hormone regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 α -Hydroxylase/C17 – 20 Lyase in Leydig Cells. Biol Reprod 42: 399-404
- Peterson G, Barnes S (1993): Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. Prostate 22: 335-345
- Potashnik G, Porath A (1995): Dibromochloropropane (DCBP): A 17-year reassessment of testicular function and reproductive performance. JOEM 37: 1267
- Price KR, Fenwick GR (1985): Naturally occurring oestrogens in foods – a review. Food Addict Contam 2: 73-106
- Purdom CE, Hardimann PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem Ecol 8: 275-285
- Purvis JL, Canick JA, Latif SA, Rosenbaum JH, Hollogitas J, Menard RH (1973): Lifetime of microsomal cytochrome P450 and steroidogenic enzymes in rat testes as influenced by human chorionic gonadotropin. Arch Biochem Biophys 159:39-49
- Quinn PG, Payne AH (1986): High affinity binding of substrate and effector ligands to testicular microsomal cytochrome P450. J Steroid Biochem 25:943-949
- Ramanujam M, Prasad KM (1979): Alterations in gene expression after chronic treatment of glioma cell in culture with methylmercuric chloride. Bioch Pharmacol 28: 2979-2984
- Ramirez R, Martin R, Martin JJ, Ramirez JR, Paniagua R, Santamaria L (1999): Changes in the number, proliferation rate and bcl-2 protein immunoeexpression of epithelial and periductal cells from rat epididymidis during postnatal development. J Androl 20:702-711
- Renea AJ, Keikha M, Dowling C, McPherson SJ, Clare AM, Husband AJ, Petersen JS, Frydenberg M, Gail PR (2002): Induction of apoptosis in low to moderate-grade human prostate carcinoma by red clover-derived dietary Isoflavones. Urolog research 11: 1689-1696
- Renz-Polster H, Braun J (2000): Basislehrbuch Innere Medizin. Urban und Fischer. München. Jena. Deutschland 8: 762-765

- Rurainsky RD, Theiss HJ, Zimmermann W (1977): Über das Vorkommen von natürlichen und synthetischen Estrogenen im Trinkwasser GWF-Wasser/Abwasser. 118:H6 288-291
- 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
- Russel LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg EC (Eds) (1990): Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, FL, USA.
- Sar M, Welsh F (2000): Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. Andrologia 32: 295-301.
- Sargalata CS, Mikhail G, Hertelendy F (1984): Clomiphene and tamoxifen with estradiol. Endocrinology 60: 375
- Saunders PT, Majdic G, Parte P, Millar M R, Fisher JS, Turner KJ, Sharpe RM (1997): Fetal and perinatal influence of xenoestrogen on testis gene expression. Adv Exp Med Biol 424: 99-110
- Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR (1998): Expression of oestrogen receptor beta (Erbeta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. Endocrinology 156:R13-17.
- Schlumpf M, Lichtensteiner W (1996): Wirkung von Sexualhormonen auf die Entwicklung des Organismus: Beispiel Säugetierentwicklung. In: Sinkt die Fertilität? (Schlumpf und Lichtensteiner eds.) Verlag Kind und Umwelt, Band Zürich, p 225
- Schlumpf M, Lichtensteiner W (1999): Reproduktionsstörungen beim Menschen Folgen einer frühen Belastung mit hormonaktiven Chemikalien? GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
- Schuppe HC, Köhn FM, Haidl G, Schill WB (1999): Umwelteinflüsse auf die männliche Fertilität. Andrologia 15:87-95
- Seibert H (1996): Störungen der Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems. Umweltchem. Ökotox. 8: 275-284
- Shapiro GI, Koestner DA, Matranga CB, Rollins BJ (1999): Flavopiridol induces cell-cycle arrest and p53-independent apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. Clin Cancer Res 5: 2925-2938
- Sharpe RM (1993): Experimental evidence for Sertoli-germ cell and Sertoli-Leydig cell interactions. In: The Sertoli Cell, Russell LD, Griswold MD (Hrsg.), Cache River Press, Clearwater FL, USA, pp 391-418

- Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341:1392-1395
- Sharpe RM, Knobil E, Neill JD (1994): *Physiol Reprod*, Second edition pp.1363-1424
- Sharpe RM. (1998): Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment *Environmental oestrogens and male infertility*. *Pure and Appl Chem* 70 (9): 1685-1701
- Sharpe RM (2003): The oestrogen hypothesis-where do we stand now. *Reprod Biol* 26:2-15
- Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM (1991): Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63: 963-966
- Shin-Shan LU, Chin-Pang Lau, Yuh-Fan Tung (1996): Lactate and the effects of exercise on testosterone secretion: evidence for the involvement of a cAMP-mediated mechanism. *Medicine and science in sports and exercise* 1048-1054
- Sikorski R, Juskiewicz T, Paszkowski T, Szprengier Juskiewicz T (1987): women in dental surgeries. reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. *Int Arch Occ Env Health* 59: 551-557
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams T, Lubahn DB, Korach KS (1994): Estrogen resistance caused by a mutation in the oestrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331: 1051-1061
- Sonnenschein, C, Soto AM (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 143-150
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, BenJonathan N (1997): The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology* 138: 1780-1786
- Stephan J, Ziminski, Michael H, Melner, Puett D. (1985): Induction of an estrogen-dependent early steroidogenic lesion in murine leydig tumor cells. *Endocrinology* 116: 2583-2590
- Stockinger HE (1981): The metals. In: Clayton GD, Clayton FE, eds. *Pattys industrial hygiene and toxicology*, Vol. 1A, 3rd ed. New York, NY, John Wiley and Sons pp 1769-1792
- Sundaram K, Kumar N (1996): Metabolism of testosterone in leydig cells and peripheral tissues. *Population council*, 13: 288-301
- Suominen J, Vierula M (1993): Semen quality of Finnish men. *Brit Med J* 306:1579

- Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E (2002): In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Human Reprod* 17:1811-1819
- Thierfelder W (1995): Hormone in der Umwelt - das Ende der Männlichkeit? *Bundesgesundhbl.* 9/95
- Thierfelder W (1998): Untersuchung zur Wirkung von Östrogenen und ausgewählten östrogenhaltigen Substanzen auf die männliche Zeugungsfähigkeit. Abschlußbericht. Robert-Koch-Institut, Projekt Nr. 18, gefördert durch das Bundesministerium für Gesundheit.
- Thierfelder W, Seher C, Dortschy R, Engel S (1999): Abnahme der Spermienqualität bei gesunden Männern aus ungewollt kinderlosen Partnerschaften. *Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz* 42: 471-478.
- Timothy F, Chen J, Chen D (2001): Hazard identification and toxicology endpoint selection for inorganic arsenic and inorganic chromium. U.S Environ protect Agency 1-36
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104: 741-757
- Tsutsumi I, Fugimori K, Nakamura RM, Mather JP, Ono T, DiZerega GS. (1987): Disruption of seminiferous epithelial function in the rat by ovarioan protein. *Biol Reprod* 36: 451-61
- Turan A (1995): Exkretion natürlicher und synthetischer Estrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten im Wasser. *UBA-Texte* 65/95, 16-21
- Umit AK, Aksu CA, Berkkanoglu M, Arici A (2002): Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells. *Endocrinology* 87(12): 5539-5544
- Van Beurden WMO, Roodnat B, Van der Molen HJ (1978 a): Effects of estrogen and FSH on LH stimulation of steroid production by testis Leydig-cells from immature rats. *Int J Androl Suppl* 2: 374-383

- Van Beurden WMO, Roodnat B, Mulder E, van der Molen HJ (1978 b): Further characterisation of the effects of hypophysectomy, FSH and estrogen on LH stimulation of testosterone production in Leydig cells isolated from immature rats. *Steroids* 31: 83-98
- Vachrajani KD, Chowdhury AR (1990): Distribution of mercury and evaluation of testicular steroidogenesis in mercuric chloride and methylmercury. *Indian J Exp Biol* 28: 746-751
- Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Indust Health* 14: 239-260
- Watanabe T, Shimada T, Endo A (1982): Effects of mercury compounds on ovulation and mitotic chromosomes in female golden hamsters. *Teratology* 25: 381-384
- Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA, Judy BM, vom Saal FS. (1999): Low dose bio activity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 15: 12-25
- Weybridge (1996): European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, UK,
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182
- Williams J, Foster D (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. *Toxicol* 94: 160-170
- Williams K, McKinnell C, Atanassova N, Fisher JS, Walker M, Turner KJ, Saunders PTK, Sharoe RM (2001): Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen: oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Human Reprod Update* 7:236-247
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova D (1999): Endocrine disrupters. *Reproduktionsmedizin* 15: 173-178

- Wuttke W, Jarry H (1999): Estrogenforschung. Reproduktionsmedizin 15: 405-409
- Yanaihara T, Troen (1974): Studies of human testes. III. Effect of estrogen on testosterone formation in human testis in vitro. Endocrinology 34: 968
- Zhang C, Wang GQ, Liu JW, Ling B, Xiao BY (2000): The effect of fluoride-arsenic exposure on the macroelements in serum of rats' offspring" Chung-Kuo Kung Kung Wei Sheng (China Public Health) 16: 792-793
- Zimniski SJ, Meiner MH, Puett D (1985): Induction of an estrogen-dependent early steroidogenic lesion in murine Leydig cell tumor cells. Endocrinology 116: 2583-2591

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. med. habil. W-B. Schill. Ich danke Ihm herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie aller verwendeten Materialien und Arbeitsgeräte.

Ein weiterer großer Dank geht an Herrn PD Dr. rer. nat. T. Monsees für die kontinuierliche optimale Betreuung, Präsenz in der Auswertung, Darstellung der Ergebnisse und die hilfreiche Korrektur. Frau Dr. rer. nat. J. Hayatpour danke ich für die Einarbeitung und Betreuung während der praktischen Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Henkel für die hilfreiche Korrektur meiner Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die viele Geduld und meinem Vater für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinem Freund Frank Misera bedanken, für das viele Verständnis und die wertvollen Ratschläge.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Konstanz, den 24. Juni 2005

Lebenslauf

Name: Sonja Judith Hinkel

geb. am: 26. Juli 1976

Geburtsort: Mainz

1983 – 1987: Raunerschule, Kirchheim/Teck

1987 – 1996: Schlossgymnasium Kirchheim/Teck

Mai 1996: Allgemeine Hochschulreife

1996-2003: Studium der Humanmedizin an der Justus – Liebig
Universität in Gießen mit Famulaturen u.a. in Herborn
Mainz, Rüdelsheim, Peking (China) sowie Temuco (Chile).

Mai 2003: 3. Staatsexamen

August 2003: Assistenzärztin am Kantonsspital Frauenfeld in der
Schweiz

seit August 2004: Assistenzärztin am Hegau-Klinikum Singen

Konstanz, Juni 2005