

Entwicklung und Evaluierung eines In-vitro-Testsystems
zur Überprüfung der Wirkung von Schwermetallionen und Gossypol
auf Sertoli-Zellen der Ratte

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

vorgelegt von Udo Winterstein
aus Kassel

Gießen 2000

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Dr. rer. nat. Th. Monsees

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

Gutachter: Prof. Dr. med. W. Weidner

Tag der Disputation: 20. Dezember 2001

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 AUSWAHL DER SCHADSTOFFE	7
1.1.1 BLEIAZETAT	7
1.1.2 NICKELAZETAT	9
1.1.3 KOBALTCHLORID	9
1.1.4 HEXACHLOROPLATINSÄURE	10
1.1.5 GOSSYPOL	11
1.2 AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN ZELLPARAMETER	13
1.2.1 LAKTATPRODUKTION DER SERTOLI-ZELLEN	13
1.2.2 INHIBINPRODUKTION DER SERTOLI-ZELLEN	14
1.2.3 MTT-ASSAY	14
2 AUFGABENSTELLUNG	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 VERWENDETE NOXEN	17
3.2 VERWENDETE MEDIEN	18
3.3 PRÄPARATION PRIMÄRER SERTOLI-ZELLEN	20
3.3.1 RATTENHODENPRÄPARATION	20
3.3.2 ENZYMATISCHE ZELLISOLATION	21
3.3.3 ANLEGEN DER ZELLKULTUR	23
3.3.4 BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT HYPOTONER LÖSUNG	24
3.3.5 ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT DER ZELLKULTUR	26
3.4 TOXIKOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER ZU TESTENDEN SUBSTANZEN	30
3.4.1 LAKTATBESTIMMUNG	31
3.4.2 INHIBINBESTIMMUNG	33
3.4.3 MTT-MESSUNG	35
3.4.3 PROTEINBESTIMMUNG	36
3.5 OPTIMIERUNGEN	37
3.6 STATISTIK	41

4 ERGEBNISSE	42
4.1 VITALITÄT DER SERTOLI-ZELLEN NACH ZUGABE DER ZU UNTERSUCHENDEN SUBSTANZEN	42
4.1.1 GOSSYPOL	43
4.1.2 SCHWERMETALLSALZE	44
4.2 LAKTATPRODUKTION DER SERTOLI-ZELLEN NACH ZUGABE DER ZU UNTERSUCHENDEN SUBSTANZEN	47
4.2.1 GOSSYPOL	47
4.2.2 SCHWERMETALLSALZE	47
4.3 INHIBINSEKRETION DER SERTOLI-ZELLEN NACH ZUGABE DER ZU UNTERSUCHENDEN SUBSTANZEN	51
4.3.1 GOSSYPOL	51
4.3.2 SCHWERMETALLSALZE	52
4.4 ERGEBNISSE DER OPTIMIERUNG	55
5 DISKUSSION	57
5.1 DISKUSSION DES TESTSYSTEMS	57
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	62
6 ZUSAMMENFASSUNG	80
7 VERÖFFENTLICHUNGEN	83
7.1 PUBLIKATIONEN	83
7.2 PUBLIZIERTE ABSTRACTS	83
8 LITERATURVERZEICHNIS	84
9 LEBENSLAUF	100
10 DANKSAGUNG	102

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Androgenbindendes Protein
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BSA	Rinder-Serum-Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
cis-Platin	Cis-Diaminodichlor-Platin
DBCP	1,2-Dibrom-3-Chlorpropan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GGT	Gammaglutamyltranspeptidase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GnRH	Gonadotropes Releasinghormon
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
LH	Luteinisierendes Hormon
MTT	3-[4,5-dimethyl-2]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TM-Zellen	Transformierte Mäusezellen

1 Einleitung

Infertilität und ungewollte Kinderlosigkeit sind längst nicht mehr nur Probleme der davon betroffenen Paare. Die Präsenz dieser Fragen in den Medien zeigt, daß es sich dabei um einen Sachverhalt von außerordentlichem gesellschaftlichen Interesse handelt. Ging man lange davon aus, daß die Ursache von Unfruchtbarkeit bei Paaren in den weitaus meisten Fällen bei der Frau liegt, so ist mittlerweile anzunehmen, daß in etwa 40% der Fälle die Gründe beim Mann zu suchen sind.

Epidemiologische Studien in den letzten Jahrzehnten deuten an, daß es möglicherweise zu einer stetigen Abnahme der Spermienqualität bei der männlichen Bevölkerung in den Industrienationen gekommen ist (Seibert, 1996). Die umfangreichste Arbeit zu diesem Thema zeigt anhand der retrospektiven Analyse von 61 Untersuchungen an einem Gesamtkollektiv von 14.947 Männern einen durchschnittlichen Rückgang der Spermienzahl um etwa 50% und eine Abnahme des Ejakulatvolumens um etwa 20% innerhalb der letzten 50 Jahre (Carlsen et al., 1992). Die Zunahme von Tumoren und Mißbildungen der männlichen Reproduktionsorgane, die nicht nur beim Menschen, sondern auch bei wildlebenden Tieren beobachtet wurden, sind in gleichem Zusammenhang zu sehen. Die Inzidenz für das Auftreten von Hodenkrebs stieg beispielsweise in Deutschland von 1962 bis 1988 um das Dreifache (Adami, 1994). Die Häufigkeit von Kryptorchismus bei 3 Monate alten Säuglingen in England hat sich von den fünfziger Jahren bis in die achtziger Jahre knapp verdoppelt (Ansell et al., 1992).

Die angeführten Studien haben zu einer breiten wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Diskussion über die Umweltfaktoren geführt, die für all diese Phänomene verantwortlich gemacht werden. Eine besondere Rolle scheinen dabei Schadstoffe zu spielen, die über die Nahrungskette, durch die Atemluft oder die Haut in den menschlichen Organismus gelangen. Die Wirkung dieser Schadstoffe auf die Reproduktionsorgane des Mannes steht

derzeit im Mittelpunkt des Interesses. Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine Schädigung der Spermienproduktion bei Männern, die chronisch solchen Schadstoffen exponiert waren. Der jahrelange Umgang mit dem Pesticid DBCP (1,2-Dibrom-3-Chlorpropan) führte beispielsweise zu Infertilität bei Arbeitern eines Chemieunternehmens in den USA (Eaton et al., 1986).

Die Spermatogenese ist ein komplexer Prozeß, der nur durch das Zusammenspiel aller Zellpopulationen des Hodengewebes, der somatischen Zellen und der Keimzellen möglich wird. Die wichtigsten somatischen Zellen sind hier die Leydig-Zellen und die Sertoli-Zellen. Die sogenannten Leydigischen Zwischenzellen liegen außerhalb der Hodentubuli eingebettet in eine komplexe extrazelluläre Matrix (Dym and Fawcett, 1970), die im wesentlichen aus Bindegewebe besteht. In diesem Bindegewebe verlaufen außerdem Blut- und Lymphgefäße, die zur Versorgung des Hodens mit Nährstoffen und Sauerstoff beitragen. Leydig-Zellen sind die endokrin aktivsten Zellen des Hodens. Die von ihnen unter dem Einfluß von in der Hypophyse produziertem LH freigesetzten Androgene sind essentiell für die Hodenfunktion. Die Peritubulär-Zellen umgeben die Hodentubuli und tragen so zu deren struktureller Integrität bei.

Im basalen Bereich der Tubuli liegen die Sertoli-Zellen in dichtem Zellverband. Sie sind über „tight junctions“ miteinander verbunden. Es besteht demnach keine direkte Verbindung zwischen den interstitiellen Strukturen und den haploiden Keimzellen innerhalb der Hodentubuli. Für diese strukturelle Besonderheit, wie sie ähnlich auch im zentralen Nervensystem vorkommt, wurde der Begriff der „Blut-Hoden-Schranke“ geprägt (vgl. S.3f).

Eine Schädigung der Sertoli-Zellen könnte für einen Teil der beobachteten Effekte verantwortlich sein. Unterschiedliche Substanzen wurden in den letzten Jahren auf ihren Einfluß auf die Sertoli-Zell-Funktion hin untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf sogenannte Umweltgifte

gelegt, d.h. Stoffe anthropogenen Ursprungs die teils bei industriellen Prozessen freigesetzt, teils als Inhaltsstoffe von Verpackungsmaterialien verwendet werden oder aber als Pestizide bzw. Herbizide in die Umwelt gelangen und dort aufgrund ihrer oft inerten chemischen Zusammensetzung in den Nahrungsketten und im menschlichen Organismus kumulieren. Zu diesen Substanzen gehören beispielsweise Schwermetalle wie Cadmium, Quecksilber oder Blei, aber auch Phtalatester, chlorierte Kohlenwasserstoffe und Nitroaromate (Nolte et al., 1994). Stachel et al. (1989) weisen das Vorkommen dieser und anderer Umweltschadstoffe in der Samenflüssigkeit nach und stellen einen Zusammenhang zwischen deren Konzentration und beruflicher Exposition bzw. außergewöhnlicher Umweltbelastung her.

Zu Beginn der Forschung auf diesem Gebiet wurden vor allem In-vivo-Testsysteme verwendet. Hierbei wurden Versuchstieren definierte Mengen einer Noxe oral bzw. parenteral zugeführt und dann die Reproduktionsfähigkeit der Tiere überprüft oder aber morphologische Studien an den entsprechenden Organen durchgeführt (Russel, 1993). Diese Studien dienten vor allem dem Zweck, eine quantitative Beziehung zwischen potentiell Schadstoff und dem männlichen Reproduktionssystem herzustellen. Aussagen über den genauen Mechanismus der Schädigung können mit diesen komplexen Testsystemen nur beschränkt gemacht werden. Wirkmechanismen, wie z.B. die spezifische biochemische Leistung der einzelnen Zelle, die beeinflusst wird, sind dagegen bei In-vitro-Testsystemen weitaus besser zu untersuchen.

Sertoli-Zellen wurden erstmals in den späten siebziger Jahren in solchen In-vitro-Systemen verwendet. Dies hatte verschiedene Gründe.

Die Sertoli-Zelle hat als sogenannte Ammenzelle eine zentrale Bedeutung innerhalb der Spermatogenese. Durch eine epithelartige Auskleidung der Hodentubuli und die engen Interzellularkontakte – tight junctions – bilden die Sertoli-Zellen das morphologische Substrat der Blut-Hoden-Schranke

(Skinner, 1987). Sie schaffen dadurch eine spezifische geschützte Umgebung für die Spermatogenese. Die Produktion von Laktat als wichtigstem Energieträger für die sich entwickelnden Keimzellen stellt eine ihrer wesentlichen metabolischen Funktionen dar. Bei der Untersuchung von Morphologie, Sauerstoffverbrauch und Proteinsynthese der Spermatozyten und Spermatischen zeigt sich eine direkte Abhängigkeit dieser Parameter vom Laktatangebot in der Umgebung. Abwesenheit von Laktat führt zu frühzeitiger Degeneration und irreversiblen Abfall der Proteinsynthese, während sich unter Laktatzufuhr keine Veränderung dieser Meßgrößen einstellt. Laktat führt dabei zu einem Anstieg des ATP-Gehaltes der Keimzellen (Grootegod et al., 1984). Die Keimzellen sind nicht in der Lage, Glukose als energetisches Substrat zu nutzen (Nicolet et al., 1981).

Eine Vielzahl von Stoffen führt zu einer Stimulation der Laktatproduktion durch die Sertoli-Zellen. Dazu gehört nicht nur das FSH (Jutte et al., 1983), sondern auch cAMP und seine Agonisten (Le Gac et al., 1983), Insulin (Oonk et al., 1989), IGF-I (Oonk et al., 1989), EGF (Mailea et al., 1986) und TGF- β (Esposito et al., 1991). Alle diese Stoffe werden schon unter physiologischen Bedingungen in mehr oder weniger großen Mengen vom Körper produziert. Sie haben so auch in vivo einen Einfluß auf die Spermatogenese.

Die enzymatische Ausstattung der Sertoli-Zellen umfaßt neben den für die Laktatproduktion entscheidenden Enzymen der Glykolyse (unter anderem verschiedene LDH-Isoenzyme) noch die Alkalische Phosphatase, die Creatinkinase und die Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGT). Die GGT scheint dabei in Hinblick auf die im Hoden vorkommenden Zellpopulationen recht spezifisch für die Sertoli-Zellen zu sein (Carreau, 1996).

Durch die Abgabe verschiedener Proteine, u.a. Transferrin (Skinner and Griswold, 1980), Plasminogen Aktivator (Lacroix et al., 1977), Androgen-Binding-Protein (ABP; Fritz et al., 1974) und Inhibin (Moore, 1993), zeigt sich die sekretorische Leistung dieser Zellen. ABP, das zur Vermittlung der

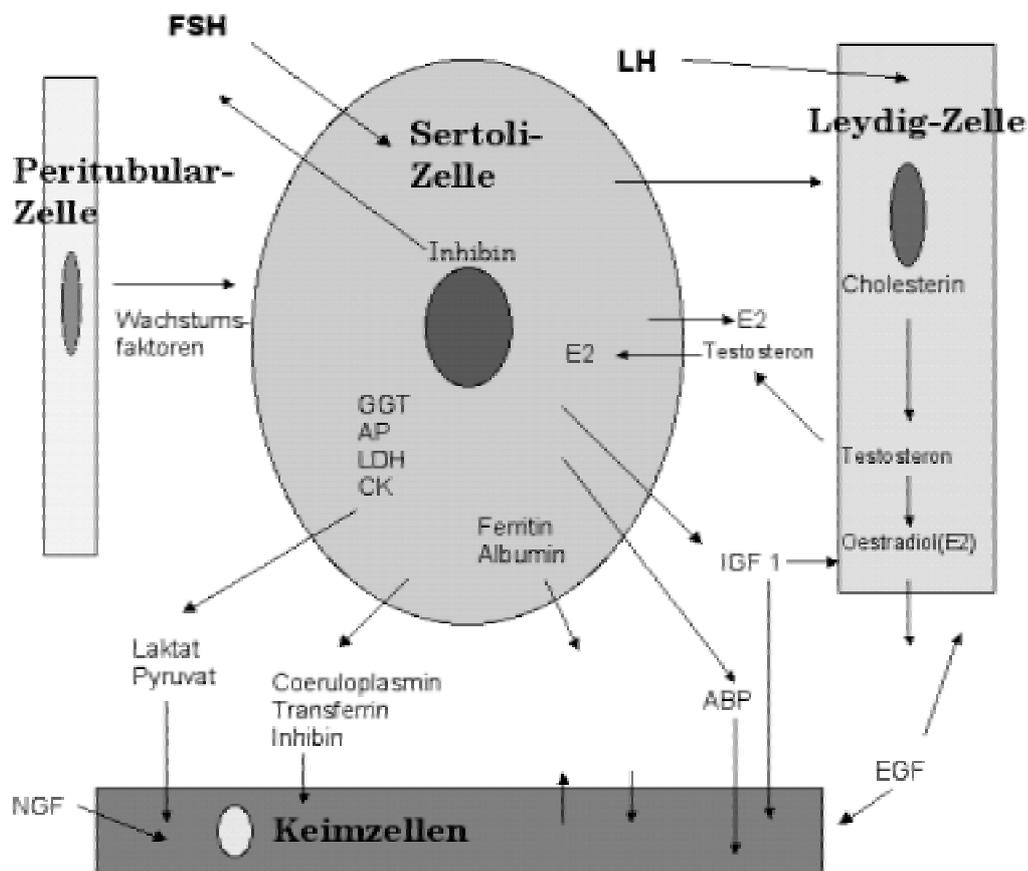
Androgenwirkung im Hodengewebe notwendig ist, wurde in zahlreichen Studien als Sertoli-Zell-Marker beschrieben. Ein Abfall der ABP-Produktion wurde dabei als Indikator für eine gestörte Sertoli-Zellfunktion beobachtet (Chapin et al., 1988).

Sertoli-Zellen stehen unter dem Einfluß von FSH, das in der Hypophyse produziert wird und über das Blut den Hoden erreicht. Sie stellen im Hodengewebe die einzige Zellart, die in nachweisbarer Größenordnung FSH-Rezeptoren besitzt. FSH steigert die metabolische Aktivität der Sertoli-Zellen. Die Vermittlung der Wirkung vollzieht sich dabei über die Aktivierung der Adenylatcyclase und die Produktion von cAMP (Fakunding et al., 1976; Steinberger et al., 1979).

Die Zellen selbst produzieren das Hormon Inhibin, das durch einen negativen Feedback-Mechanismus zu einer Abnahme der Gonadotropin-Produktion in der Hypophyse führt (Moore, 1993). FSH führt demzufolge zu einer Steigerung der Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen (in vitro um etwa 40%; Carreau, 1995). Die chemische Struktur des Inhibins ist seit weniger als zehn Jahren bekannt (Eramaa et al., 1992). Inhibin ist ein 32 kDa Glykoprotein mit dimerer Struktur. Es besteht aus einer Alpha-Untereinheit und einer von zwei möglichen Beta-Einheiten (βA oder βB).

Es existiert jedoch noch eine weitere Substanz aus diesen Bausteinen, deren Wirkung der des Inhibins entgegengesetzt ist: das Aktivin. Es entsteht durch die Kombination zweier Beta-Untereinheiten und existiert daher in drei möglichen Formen: $\beta A/\beta A$, $\beta A/\beta B$ und $\beta B/\beta B$ (Moore et al., 1993). Aktivin führt zur Stimulation der FSH-Produktion von hypophysären Zellen, sowohl in vitro (Ling et al., 1986) als auch in vivo (McLachlan et al., 1989). Inhibin und Aktivin scheinen zudem entscheidende Bedeutung in der parakrinen Regulation der Spermatogenese zu haben (Mather et al., 1992). Beide führen zur Modulation der Funktion der interstitiellen Zellen und zum Anstieg der Spermatogonienproliferation in vitro (Moore et al., 1993).

Das Wissen um die parakrine Funktion der Sertoli-Zellen, also insbesondere ihre Interaktion mit den Keimzellen oder auch den Leydig-Zellen via Botenstoffen, ist insgesamt gesehen allerdings noch sehr lückenhaft. Während die einzelnen Sekretionsprodukte und deren Produktionsort bekannt ist, weiß man doch sehr wenig über die Wirkungsmechanismen. Zur Verdeutlichung soll folgendes Schema dienen:



- **Abb. 1.1: Schema der „cell-to-cell“ Interaktionen und Sertoli-Zellfunktionen im menschlichen Hoden (modifiziert nach Carreau, 1995).** ABP=Androgenbindendes Protein; NGF=Nervaler Wachstumsfaktor; EGF=Epidermaler Wachstumsfaktor; IGF=Insulinähnlicher Wachstumsfaktor; LDH=Laktatdehydrogenase; AP=Alkalische Phosphatase; CK=Kreatinkinase; GGT=Gammaglutamyltranspeptidase

Betrachtet man die vielfältigen spezifischen Leistungen der Sertoli-Zellen so wird deutlich, wie wichtig die Integrität dieser Zellen für den Ablauf der Spermatogenese ist. Eine Modulation der Zellfunktionen wird sich zwangsläufig auf die Entwicklung der Keimzellen auswirken.

1.1 Auswahl der Schadstoffe

Schwermetalle sind, wie oben bereits angeführt, in besonderem Maße geeignet, die toxische Potenz von Umweltgiften in Hinblick auf die Sertoli-Zelle zu überprüfen. Zum einen belegt eine Vielzahl von in vivo Studien deren Einfluß auf das Reproduktionssystem, zum anderen sind diese Stoffe in der Umwelt mittlerweile tatsächlich ubiquitär vorhanden, so daß ihre Untersuchung auch praktische Relevanz besitzt. Ein weiterer Vorteil liegt in dem einfachen Umgang mit diesen Substanzen, da sie fast ausnahmslos als wasserlösliche Salze vorhanden sind und somit die Herstellung von Lösungen im Kulturmedium und ihre Verwendung in der Zellkultur problemlos durchführbar ist. Zur Anwendung kommen in dieser Arbeit die Schwermetallsalze Bleiazetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), Nickelazetat ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), Kobaltchlorid (CoCl_2) sowie Hexachloroplatinsäure ($\text{H}_2[\text{PtCl}_6]$).

1.1.1 Bleiazetat

Aus der Gruppe der Schwermetalle ist Blei die wohl am besten untersuchte Substanz – die Toxizität von Blei ist schon seit Jahrzehnten bekannt. Seine Eigenschaften machen es jedoch in vielen Bereichen der industriellen Fertigung und des täglichen Lebens zu einem kaum ersetzbaren Werkstoff. Zur Anwendung kommt es in Akkumulatoren, als Bestandteil von Farben, in Holzschutzmitteln und als Inhaltsstoff von Benzin. Letzteres ist zwar seit

einigen Jahren in Europa verboten, findet allerdings in weiten Teilen der Welt nach wie vor Anwendung. Erste Berichte über die gesundheitlichen Folgen vor allem beruflicher Bleiexposition datieren aus dem letzten Jahrhundert (Scanlon, 1975). Die Giftwirkung des Bleis wurde in Frankreich als *colica pictonum*, in England als Devonshire Kolik, in Deutschland als Hüttenkrätze beschrieben (Seidel, 1991). Mehrere Studien belegen die In-vivo-Toxizität auf das männliche Reproduktionssystem. Blei in hohen Konzentrationen führt zur Störung der Spermio-genese (Lancranjan et al., 1975). Eine Untersuchung an 2469 Arbeitern einer Bleischmelze zeigt eine positive Korrelation zwischen erhöhten Bleikonzentrationen im Serum und einer Reduktion der Spermiedichte im Ejakulat. Ein deutlicher Effekt ist dabei ab einer Serum-Bleikonzentration von 40 µg Blei/dl zu erwarten, was in etwa 1µM entspricht (Alexander et al., 1996). Azoospermie und Oligospermie zeigten sich bei einer großen Zahl von Arbeitern mit Bleiintoxikationen (Braunstein et al., 1978; Cullen et al., 1983). Der Zusammenhang von abnormer Spermienmorphologie und Bleiexposition konnte bei Arbeitern einer südafrikanischen Batteriefabrik nachgewiesen werden (Robins et al., 1997).

Der Schädigungsmechanismus, der diesen Veränderungen zu Grunde liegt, ist zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion. Sowohl ein direkter Effekt auf die testikuläre Funktion (Assennato et al., 1986) als auch eine Beeinflussung der hypothalamisch-hypophysären Achse (Klein et al., 1994; Thoreux-Manlay et al., 1995) werden diskutiert.

Ein schädigender Einfluß von Blei auf die Spermatogenese gilt demnach als gesichert. Die Schädigung scheint sowohl auf direkten zytotoxischen Effekten als auch auf Störungen der endokrinen Funktionen zu beruhen. Die Rolle der Sertoli-Zellen in diesem Zusammenhang ist unklar. Möglicherweise kann diese Arbeit etwas zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

1.1.2 Nickelazetat

Nickel und seine Verbindungen finden Anwendung vor allem bei der Herstellung von korrosionsfesten Stahllegierungen, bei chirurgischen Prothesen, der Münzproduktion, in der synthetischen Chemie, bei der Batterie-, Keramik- und Glasproduktion. Als Spurenelement scheint es außerdem essentiell für einige Spezies zu sein. Während die allergenen und kanzerogenen Eigenschaften des Nickels lange bekannt sind (Seidel, 1991; Clayton and Kaldor, 1987), ist das hier verwendete Nickelazetat in bezug auf seine reproduktionstoxikologische Bedeutung nur wenig untersucht. Die verfügbaren Studien zeigen bei Ratten die Induktion von Spermiendegeneration durch Nickelsulfat (Sobti and Gill, 1989). Bei Nickelchlorid kommt es nach intraperitonealer Injektion zur Abnahme der Fertilität und zur Reduktion des Hodengewichtes (Xie et al, 1995).

Neueste Untersuchungen machen überdies eine Beeinflussung der männlichen Fertilität durch Nickelionen sehr wahrscheinlich (Das and Dasgupta, 1997; Kakela et al. 1999; Pandey et al., 1999). Eine generelle Beurteilung der Reproduktionseffekte ist jedoch aufgrund der wenigen Daten und der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Verbindungen – vor allem in Hinblick auf ihre Wasserlöslichkeit – nicht möglich.

1.1.3 Kobaltchlorid

Das Metall Kobalt und seine Verbindungen finden breite Anwendung z.B. bei der Herstellung von Werkzeugen, Autos, elektrischen Geräten, Flugzeugtechnik, Farben, Glas oder Zement. Biologische Bedeutung erhält das für den Menschen essentielle Element als Cofaktor für Vitamine (Vit. B₁₂) oder Enzyme (Karlson, 1988; Kpt. 5). Bisherige Studien zeigen einen negativen Einfluß von Kobalt auf das männliche Reproduktionssystem. Es führt

nach oraler Gabe bei Ratten zu einem Rückgang der Spermatogenese, testikulärer Atrophie und zu Beeinflussung der Testosteronproduktion, wobei chronische Effekte eine weitaus größere Bedeutung haben als akute (Pedigo et al., 1988; Carrier et al., 1985). Weiterhin scheinen sowohl direkte zytotoxische als auch indirekte Mechanismen an den Schädigungen beteiligt zu sein (Andersson et al., 1992; Mollenhauer et al., 1985).

1.1.4 Hexachloroplatinsäure

Hexachloroplatinsäure, ein wasserlösliches Platinat, wird vor allem als analytisches Reagenz und zur Herstellung anderer Platinverbindungen verwendet. Der Kontakt mit dieser Substanz in fester und flüssiger Form oder als Aerosol kann akut zu Irritationen der Augen, der Haut, der Schleimhaut und des Respirationstraktes führen. Chronische Exposition führt zu einer allergischen Typ-III-Reaktion. Dieses als „Platinosis“ bezeichnete Krankheitsbild geht einher mit allergischem Asthma und allergischer Kontaktdermatitis (ACGIH, 1986). Die intravenöse Gabe von Hexachloroplatinsäure führt bei Ratten zur Entwicklung einer hämolytischen Anämie (Kolpakov and Kolpakova, 1974). Über die reproduktionsbiologischen Auswirkungen der Hexachloroplatinsäureexposition ist nur wenig bekannt. Platinstaub selbst führt zu einem geringfügigen Rückgang der Spermienmotilität bei menschlichen Spermien *in vitro* (Kesseru and Leon, 1974). Eine *In-vitro*-Studie mit Hexachloroplatinsäure an humanen Spermatozoen zeigt eine Induktion der Akrosomenreaktion (Köhn et al., 1995).

Die Bedeutung von Platin in diesem Zusammenhang liegt allerdings in seiner Verwendung als Grundlage für Chemotherapeutika zur Behandlung testikulärer Tumore. Die älteste und meistverwendete Verbindung darunter ist das *cis*-Platin (*cis*-Diaminodichlor-Platin). Sein Einsatz als Chemotherapeutikum ist verbunden mit zahlreichen Nebenwirkungen, wobei auch und vor allem das männliche Reproduktionssystem betroffen ist. Dies konnte

tierexperimentell bestätigt und die Sertoli-Zelle als ein möglicher Angriffspunkt lokalisiert werden (Mizoguchi et al., 1990; Pogach et al., 1989).

1.1.5 Gossypol

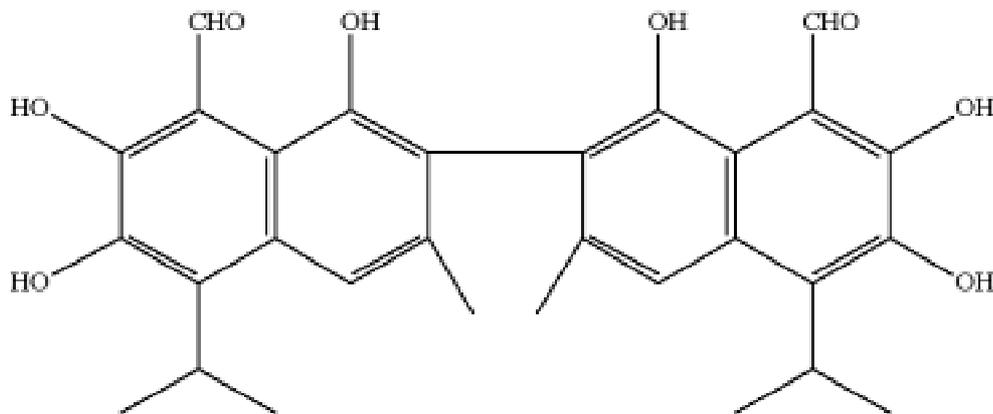
Gossypol nimmt eine Sonderstellung bei der Auswahl der untersuchten Substanzen ein. Zum einen handelt es sich beim Gossypol nicht um einen Umweltschadstoff im eigentlichen Sinne, zum anderen sind seine Wirkungen auf das männliche Reproduktionssystem recht gut erforscht, sowohl was seinen Einfluß in vivo als auch in vitro – hier im besonderen die Schädigung der Sertoli-Zelle – angeht. Daher erscheint die Analyse der durch Gossypol hervorgerufenen Effekte besonders geeignet, die Aussagekraft des Testsystems zu überprüfen.

Die Möglichkeit, durch Verwendung von Gossypol (einem Polyphenol, das aus dem Öl des Baumwollsamens isoliert wird) Sterilität beim Mann auszulösen, ist schon seit Ende der fünfziger Jahre bekannt (Liu, 1957). Man geht davon aus, daß sich Naturvölker diese Wirkung schon weitaus früher zur Geburtenkontrolle zu nutze machten. Im Zuge der sich etablierenden restriktiven Familienpolitik im kommunistischen China sah man in Gossypol eine praktische und kostengünstige Alternative zur Verwendung der Antibabypille oder anderer kontrazeptiver Maßnahmen.

Zahlreiche Studien wurden daher zu Beginn der siebziger Jahre in Angriff genommen, um die Anwendungsmöglichkeiten dieser „Pille für den Mann“ näher zu untersuchen. Der erste klinische Test 1972 zog groß angelegte Versuche in den folgenden Jahren mit insgesamt annähernd 9000 Testpersonen nach sich. Gossypol erwies sich dabei als potentes männliches Kontrazeptivum mit einer Effizienz von 99%. Im Rahmen dieser Studien kam es allerdings auch zum Auftreten von wesentlichen Nebenwirkungen. Bei etwa 10% der Männer persistierte die ausgelöste Azoo- bzw. Oligozoospermie mit der Folge einer Zeugungsunfähigkeit für einen Zeitraum

zwischen vier Monaten bis zu 3,5 Jahren nach Absetzen des Gossypols. Bei weiteren 10% kam es zum Auftreten von teilweise lebensbedrohlichen Hypokaliämien (National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1978; Qiang et al., 1980). Die einzige außerhalb Chinas durchgeführte Untersuchung zeigt eine Effizienz von 83% und eine Irreversibilitätsrate von 33%. Hypokaliämien oder weitere relevante Nebenwirkungen traten dabei nicht auf (Coutinho, 1984). Möglicherweise sind diese Unterschiede durch die verwendete geringere Dosis und die kleinere Gruppe von Testpersonen bedingt (n=12). Weitere chinesische Studien zu Beginn der achtziger Jahre mit geringerer Dosis bestätigten die zuvor gemachten Erfahrungen, wobei für die aufgetretenen Hypokaliämien nephrotoxische Wirkungen des Gossypol verantwortlich gemacht werden (Liu, 1987; Liu et al., 1987). Gossypol scheint also nach wie vor nicht geeignet, in der klinischen Anwendung andere kontrazeptive Maßnahmen zu ersetzen (Matlin, 1994).

Aufgrund seiner Eigenschaften ist Gossypol jedoch in besonderem Maße geeignet, eine Referenzsubstanz für das hier verwendete Testsystem darzustellen. Gossypol ist ein Racemat, wobei nur die (L-) Form reproduktionstoxische Potenz besitzt (Wang and Lei, 1979).



• **Abb. 1.2: Chemische Struktur von Gossypol**

1.2 Auswahl der untersuchten Zellparameter

Die Auswahl der untersuchten Zellparameter sollte der komplexen Funktion und Aufgabe der Sertoli-Zelle gerecht werden, ohne dabei praktische Gesichtspunkte wie Reproduzierbarkeit, Möglichkeit der Standardisierung, Untersuchung einer großen Anzahl von Proben und Wirtschaftlichkeit außer acht zu lassen.

1.2.1 Laktatproduktion der Sertoli-Zellen

Als metabolischer Parameter wurde die Laktatproduktion der Zellen bestimmt. Wie oben bereits angeführt, dient Laktat als energiereiches Substrat für die sich entwickelnden Spermatozyten. Der Nachweis von Laktat mit Hilfe eines gekoppelten Enzym-Assays ist ein in der klinischen Chemie seit langem verwendetes und standardisiertes Verfahren (Noll, 1984). Die Veränderung der Laktatproduktion ist ein sensitiver Marker für die Störung der Sertoli-Zellfunktion *in vitro* (Williams and Foster, 1988). Zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Phtalatester und ihrer Metaboliten auf die Sertoli-Zellen konnten das zeigen (z.B. Chapin et al., 1988; Allenby et al., 1989; Stuart et al., 1990). Die Studien belegen außerdem, daß es eine Korrelation zwischen der bei diesen Substanzen bekannten *In-vivo*-Toxizität (morphologische Alterationen an den Sertoli-Zellen, Rückgang der Spermio-genese) und der Laktatproduktion gibt. Die potentesten Noxen in bezug auf die Schädigung des Reproduktionssystems führen zu den größten Veränderungen des Zellmetabolismus. Interessanterweise kommt es dabei ausschließlich zu einer Steigerung der Laktatproduktion (Moss et al., 1988) – ein Phänomen, das auch bei Gossypol (*s.o.*), DBCP (Miller et al., 1985) und weiteren Substanzen zu beobachten ist und das später zu diskutieren sein wird.

1.2.2 Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen

Inhibin als Referenz für die endokrine Funktion der Zellen kann erst seit einigen Jahren nachgewiesen werden (Moore et al., 1993). Die Detektion dieses nur in minimalen Konzentrationen produzierten, aber für die Sertoli-Zelle hochspezifischen Hormons erfordert die Verwendung eines Radioimmuno-Assays. Nach Beendigung der Versuchsreihe kam ein Testkit auf den Markt, das in der Lage ist, in einem ELISA die β -Kette des Inhibin selektiv und äußerst sensitiv nachzuweisen (Inhibin-B Dimer Assay Kit, Fa. Serotec Oxford, England). Neueste Untersuchungen zeigen, daß nur Inhibin-B beim Mann biologisch aktiv ist (De Kretser et al., 1996; Illingworth et al., 1996). Der hier verwendete RIA weist dagegen die Alpha-Kette nach, die in allen Inhibin-Formen auftritt.

In Hinblick auf die Beeinflussung der Inhibinproduktion durch unterschiedliche Schadstoffe gibt es zur Zeit nur wenig Daten. Cadmium führt in hoher Dosierung zur Abnahme der Inhibinproduktion in vitro, wahrscheinlich bedingt durch direkte zytotoxische Wirkung (Janecki et al., 1992).

1.2.3 MTT-Assay

Die beiden relativ speziellen Parameter dieser Testreihe Laktat und Inhibin, werden ergänzt durch die Anwendung des MTT-Assays. MTT, ein gelber Farbstoff, wird von den Zellen aufgenommen und zu einem blauen Formazanprodukt umgewandelt. Dieser Prozeß benötigt die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen und findet ausschließlich in lebenden Zellen statt. Die Ausbeute an blauem Farbstoff, die auf photometrischem Wege bestimmt wird, ist ein direktes Maß für die Vitalität der untersuchten Zellpopulation. Sie ist direkt proportional zur Zellzahl und zur Zahl der Mitochondrien und nimmt in nonvitalen Zellen/Zellverbänden rapide ab. Da die

Zahl der Mitochondrien in der Sertoli-Zellkultur relativ stabil bleibt (Kelly et al., 1991), reflektiert eine Veränderung der Farbstoffmenge eine Veränderung der Zellzahl, der Zellvitalität oder beider Parameter (s. Kpt. 3.4.3). Der MTT-Assay wurde außerdem gewählt, da er eine relativ sensitive Methode ist, um einen Vitalitätsabfall zu detektieren. Bei der Untersuchung zeigen sich morphologische Veränderungen an Sertoli-Zellen erst, wenn es im MTT-Assay zu einem Abfall der Werte auf etwa 50% der Ursprungsaktivität gekommen ist. Auch beim DNA-Gehalt der Zellen kommt es später als beim MTT-Assay zu statistisch signifikanten Veränderungen (Janecki, 1992).

2 Aufgabenstellung

1. Ziel dieser Arbeit ist es nun, ein **Testsystem** zu entwickeln und zu evaluieren, das den Einfluß von Noxen auf biochemische Parameter von Sertoli-Zellen überprüft.
2. Für die **untersuchten Stoffe** sollte dabei eine In-vivo-Wirksamkeit auf das Reproduktionssystem bereits nachgewiesen, zumindest jedoch als sehr wahrscheinlich gelten.
3. Die **untersuchten Parameter** sollten möglichst umfassend die Zellfunktionen repräsentieren und deren Modulation darstellen können.
4. Anhand der gewonnenen **Ergebnisse** sollte es möglich sein, eine Aussage darüber zu machen, ob die Sertoli-Zelle eine potentielle Zielzelle für die jeweils untersuchte Substanz darstellt.
5. Bei der Entwicklung des Testsystems sollten die Aspekte der Praktikabilität und der Wirtschaftlichkeit besondere Berücksichtigung finden. Das Fernziel stellt dabei die Etablierung einer effizienten reproduktions- to- xikologischen **Screeningmethode** dar.

3 Material und Methoden

Für die Zellkultur wurden Sertoli-Zellen von 18 Tage alten Sprague-Dawley Ratten (Fa. Harlan Winkelmann, Borchen) verwendet. Die Ratten wurden jeweils unmittelbar vor der Präparation geliefert. Die Versuche wurden beim Regierungspräsidium Gießen unter dem Geschäftszeichen 17a-19c 20/15(c) gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz angezeigt. Alle Chemikalien wurden, soweit nicht explizit erwähnt, in der höchsten erhältlichen Qualität eingesetzt (pro analysi oder biochemisch rein). Für die Primärkultur der Sertoli-Zellen wurden speziell für die Zellkultur getestete Medien und Zusätze benutzt.

3.1 Verwendete Noxen

Gossypol (Racemform, Sigma, Nr. G4382) wurde in 95% Reinheit (laut HPLC) als äquimolarer Komplex mit Essigsäure eingesetzt. Nach Einstellen der jeweiligen Endkonzentration an Gossypol zeigte sich keine Veränderung des pH-Wertes der gepufferten Zellkultur-Medien. Ein Einfluß dieser geringen Menge freigesetzter Essigsäure auf die untersuchten Parameter kann daher ausgeschlossen werden.

Die verwendeten Metallsalze wurden von Merck, Darmstadt bezogen:

Blei(II)-acetat-Trihydrat (Nr. 107372, krist. reinst, BPC)

Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat (Nr. 102539, z. Analyse, ACS)

Nickel(II)-azetat-Tetrahydrat (Nr. 12278, z. Analyse)

Hexachloroplatin(IV)-säure-Hexahydrat (Nr. 807340, 40% Pt, z. Synthese)

3.2 Verwendete Medien

1. Basismedium (Medium zum Herstellen der Kulturmedien unter Verwendung entsprechender Zusätze, Waschmedium)

Dullbecco's Modified Eagle's Medium:Ham's F-12 Medium
(DMEM:Ham's F-12; 1:1; Gibco, 31330-038)

2. Kulturmedium A

500 ml Basismedium mit folgenden Zusätzen (angegeben ist die jeweilige Endkonzentration im Basismedium):

- Cytosin Arabinosid (2 µg/ml; Sigma, Deisenhofen, C-1768)
- L-Glutamin (2 mM; Gibco, USA, 04305030-H)
- Penicillin-Streptomycin Lsg. (100 µg/ml; Sigma, P-3539)
- Epidermal Growth Factor (EGF; 10 ng/ml; Sigma, E-1257)
- Apo-Transferrin (5 µg/ml; Sigma, T-1147)
- Humaninsulin (2 µg/ml; Sigma, I-1882)
- Hydrocortison (10^{-8} M; Sigma, H-0135)
- D-alpha-Tocopherol (Vitamin E; 200 ng/ml; Serva, Heidelberg, 3656)
- All-trans-Retinol (Vitamin A; 200 ng/ml; Serva, 38280)
- Testosteron (10^{-7} M; Sigma, T-5641)
- FSH (100 ng/ml; Sigma, F-4520)

3. Kulturmedium B

Entspricht Medium A ohne Zusatz von Cytosin-Arabinosid

4. Kulturmedium C

Entspricht Medium A ohne Cytosin-Arabinosid und ohne FSH

Bei der enzymatischen Isolation der Sertoli-Zellen wurden die nachfolgenden Medien verwendet:

1. Isolationsmedium A

20 ml Basismedium unter Zusatz von

- 20 mg Kollagenase (Sigma, C-0130) und
- 0,4 mg DNase (Sigma, DN-25)

2. Isolationsmedium B

20 ml Basismedium mit

- 40 mg Kollagenase,
- 40 mg Hyaluronidase (Sigma, H-3506) und
- 0,4 mg DNase

3. Stopmedium

50 ml Medium A mit

- 20 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Sigma, T-9003)
- 100 mg Rinderserumalbumin (Sigma, H-7825)

3.3 Präparation primärer Sertoli-Zellen

Bei der Präparation und im Umgang mit der Zellkultur wurde besonders auf die Verhinderung möglicher mikrobieller Kontamination geachtet. Dies bedeutet keimarmes Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank (Klasse 2), Verwendung von sterilen Einmalartikeln bei Kunststoffröhrchen, Petrischalen, Pipettenspitzen, Pinzetten, Skalpellen, Handschuhen und Zellkulturschalen. Alle Kulturmedien und sonstige verwendete Lösungen wurden durch Ultrafiltration (0,2 μm , Sigma) sterilisiert. Zum Anlegen der primären Sertoli-Zellkultur wurden im wesentlichen die Methoden von Hadley et al. (1985) und Onoda et al. (1990) angewendet. Dabei wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

3.3.1 Rattenhodenpräparation

3.3.2 Enzymatische Isolation der Sertoli-Zellen

3.3.3 Anlegen der Zellkultur

3.3.4 Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung

3.3.5 Überprüfung der Reinheit der Zellkultur

3.3.1 Rattenhodenpräparation

Die Tiere wurden in einen geschlossenen Kunststoffbehälter gesetzt und für ca. 10 min mit CO_2 begast. Anschließend wurden die getöteten Ratten durch Eintauchen in 70% Ethanol äußerlich desinfiziert, um bei der Präparation mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Es wurde nun die Bauchhöhle eröffnet, die noch nicht deszendierten Hoden wurden entnommen und in mit Gentamycin versetztem Basismedium (2 ml Medium + 1 ml Gentamycin; Sigma, G-3527) gewaschen. Anschließend wurde die Tunica Albu-

ginea der Hoden entfernt und der herausgeschabte Inhalt mit dem Skalpell zu einem feinen Brei zerkleinert.

3.3.2 Enzymatische Zellisolation

Kollagenase spaltet das Kollagen der Interzellularverbindungen, ohne die einzelnen Zellen allzu stark zu schädigen, während Hyaluronidase besonders kollagenreiche Zellverbände der Bindegewebszellen auftrennt. Die DNase hydrolysiert freigesetzte DNA, die sonst die Aggregation von Einzelzellen fördern würde. Der im Stopmedium enthaltene Trypsin-Inhibitor und das Rinderserumalbumin inaktivieren das Enzym Kollagenase.

1. Schritt

- Gabe des zerkleinerten Hodengewebes in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Falcon, New Jersey, USA) mit 20 ml Isolationsmedium A
- 15 min Schüttelwasserbad (37°C)
- Herausnehmen, 7 min bei Raumtemperatur stehen lassen, Absaugen des Überstandes

2. Schritt

- Zugabe von 25 ml Stopmedium auf das Pellet
- Schütteln und 7 min stehen lassen
- Absaugen des Überstandes

3. Schritt

- Zugabe von 20 ml Isolationsmedium B zum Pellet
- Mischen und für 30 min ins Schüttelwasserbad stellen
- Zentrifugieren für 30 s bei 500 U/min (35xg)
- Absaugen des Überstandes

4. Schritt

- Zugabe von 25 ml Stopplösung zum Pellet
- Mischen und bei 500 U/min (35xg) 1 min zentrifugieren
- Absaugen des Überstandes

5. Schritt

- Zugabe von 20 ml Isolationsmedium B zum Pellet
- Mischen und für 15 min ins Schüttelwasserbad stellen
- 45 s bei 1000 U/min (130xg) zentrifugieren
- Absaugen des Überstandes

6. Schritt

- Zugabe von 30 ml Kulturmedium A
- Mischen
- Gabe der gesamten Menge in einen Homogenisator (sog. „Potter“, ein Glasgehäuse mit einem teflonüberzogenen Edelstahlstab)
- Homogenisieren durch 10maliges Auf- und Abbewegen des „Potters“

7. Schritt

- Filtern der Zellsuspension durch ein 70 µm Nylonsieb (Falcon)

Die letzten beiden Schritte dienen dabei der nochmaligen mechanischen Trennung der Zellen und der Gewinnung möglichst vieler Einzelzellen.

3.3.3 Anlegen der Zellkultur

Die Zellzahl wurde in einer handelsüblichen Zählkammer bestimmt und durch Zugabe einer entsprechenden Menge Kulturmedium A auf eine Dichte von 10^6 Zellen pro ml Suspension eingestellt. Die Zellen wurden anschließend auf 24er Kulturplatten (Falcon) mit je 1 ml Suspension pro Vertiefung (Well) ausplattiert (entsprechend 10^6 Zellen/Well bzw. 0.5×10^6 Zellen/cm²). Das in Kulturmedium A enthaltene Mitosezellgift Cytosin-Arabinosid hemmt die Proliferation und unterdrückt damit das Wachstum von kontaminierenden Zellpopulationen (hauptsächlich Peritubular-Zellen). Die Sertoli-Zellen werden dabei nur wenig beeinflusst, da sie bei 18 Tage alten Ratten praktisch keine Mitosen mehr durchlaufen (Russel et al., 1993). Vor Anlegen der Kultur wurden die Zellkulturplatten mit Matrigel (Collaborative Research Inc., Bedford, USA) sehr dünn beschichtet. Als extrazelluläre Matrix verbessert Matrigel die Anhaftung der Sertoli-Zellen an den Kulturplatten und beeinflusst auch das Zellwachstum positiv. Es ermöglicht so die Ausbildung eines gleichmäßigen einschichtigen Zellrasens. Das Gel wurde bei -18°C im Eisschrank aufbewahrt und vor Verwendung langsam (über Nacht) im Kühlschrank aufgetaut. Die benutzten Materialien (Schalen, Pipetten, Medium) mußten auf etwa 4°C abgekühlt werden, weil sich Matrigel bei höheren Temperaturen sehr schnell verfestigt. Das Vorgehen bei der Beschichtung sah folgendermaßen aus:

- Ansetzen der benötigten Menge Matrigel im Verhältnis 1:4 (Matrigel:Gebrauchsmedium)
- Verteilen des Matrigels auf den Kulturplatten (je 500 µl pro Well)
- Sofortiges Absaugen (Durch das sofortige Absaugen gelingt es, eine sehr dünne Matrigelschicht auf den Kulturplatten zu erzeugen)

Die Reinheit der Zellkultur wurde regelmäßig morphologisch und histochemisch überprüft (s. Kpt. 3.3.5). Dazu wurden jeweils 100 µl Sertoli-Zellsuspension (400.000 Zellen/ml) auf jede Vertiefung der teflonbeschichteten Objektträger gegeben. Diese wurden vor Gebrauch wie oben beschrieben mit Matrigel beschichtet. Die Objektträger wurden anschließend in einem Brutschrank in angefeuchteter 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 34°C aufbewahrt. Nach 24 Std. wurde das Medium erstmals gewechselt.

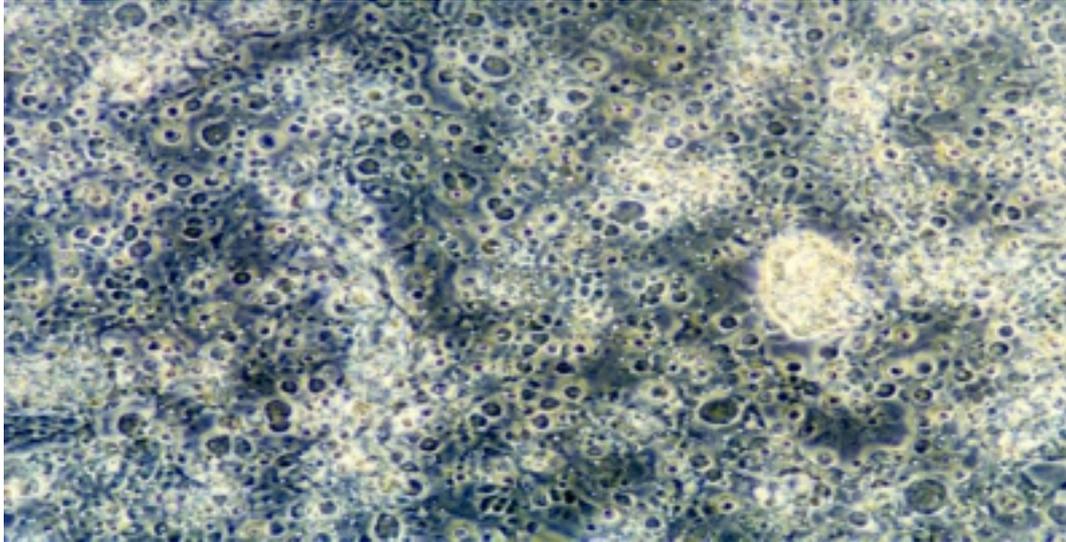
3.3.4 Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung

Nach 48 Std. wurden die Zellen mit einer hypotonen Lösung (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) behandelt. Die Osmolarität dieses Tris-Puffers beträgt nur 90 mOsmol/kg gegenüber 300 mOsmol/kg des normalen Zellkulturmediums. Dieser sogenannte „hypotone Schock“ läßt die Sertoli-Zellen relativ unbeeinflusst, führt jedoch zum Absterben der in der Kultur vorhandenen Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden; Galdieri et al., 1981). Die Behandlung der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

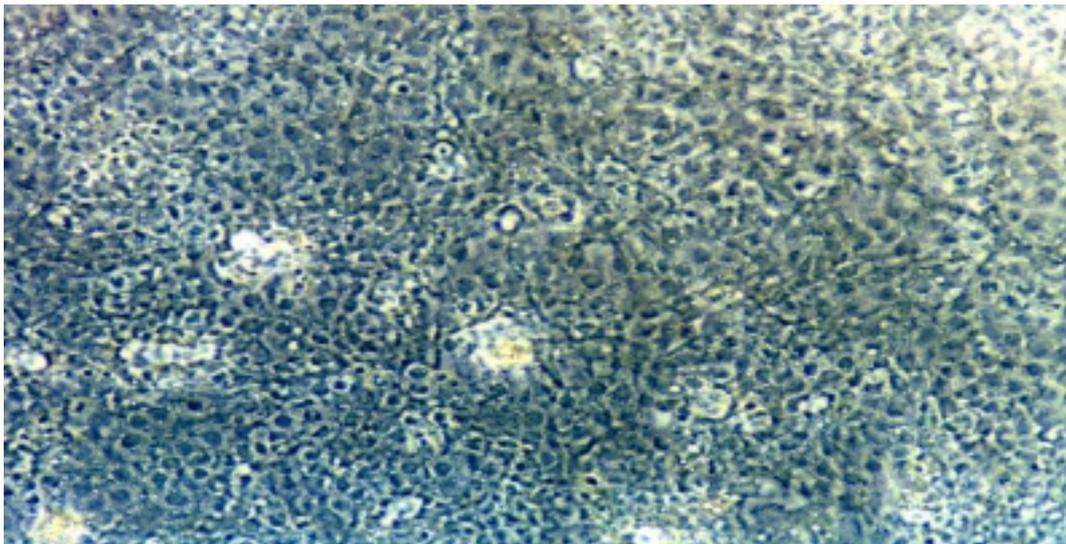
- Auflösen von 240 mg Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma 6791) in 100 ml Aq. dest.
- Titrieren der 20 mM Tris-Lösung auf den pH Wert von 7,5 mit HCl
- Steril-Filtration
- Erwärmen auf 34°C im Schüttelwasserbad
- Absaugen des Mediums von den Zellkulturschalen und Zugabe von 1 ml Tris-HCl pro Well
- Inkubation für 5 min
- Absaugen der Lösung
- Waschen der Zellen mit 1 ml Gebrauchsmedium pro Well

- Zufügen von je 1 ml Kulturmedium B (ohne Cytosin Arabinosid)

Die Zellen wurden anschließend wieder in den Brutschrank gegeben.



- **Abb. 3.1: Zellkultur am zweiten Tag nach Präparation vor Behandlung mit hypotoner Lösung (Vergrößerung 310fach). Die Keimzellkontamination ist deutlich zu erkennen.**



- **Abb. 3.2: Zellkultur am sechsten Tag nach Präparation nach Behandlung mit hypotoner Lösung (Vergrößerung 310fach)**

3.3.5 Überprüfung der Reinheit der Zellkultur

Zur Überprüfung der Reinheit der Zellkultur wurden die mit Matrigel und Zellsuspension präparierten Objektträger verwendet, die zeitgleich mit den Kulturplatten angelegt worden waren. An Tag 1-6 der Kultur wurden diese Objektträger in Petrischalen mit Medium gelagert und entsprechend den Kulturplatten behandelt (Mediumwechsel, Aufbewahrung im Brutschrank, hypotoner Schock nach 48 Std.). Am sechsten Tag wurde die Kultur dann durch spezifische Färbung und Mikroskopie auf das Vorhandensein von fremden Zellpopulationen untersucht.

Leydig-Zellen wurden durch Färbung auf 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (nach Welsh et al., 1975) nachgewiesen. Das Färbemedium setzt sich folgendermaßen zusammen:

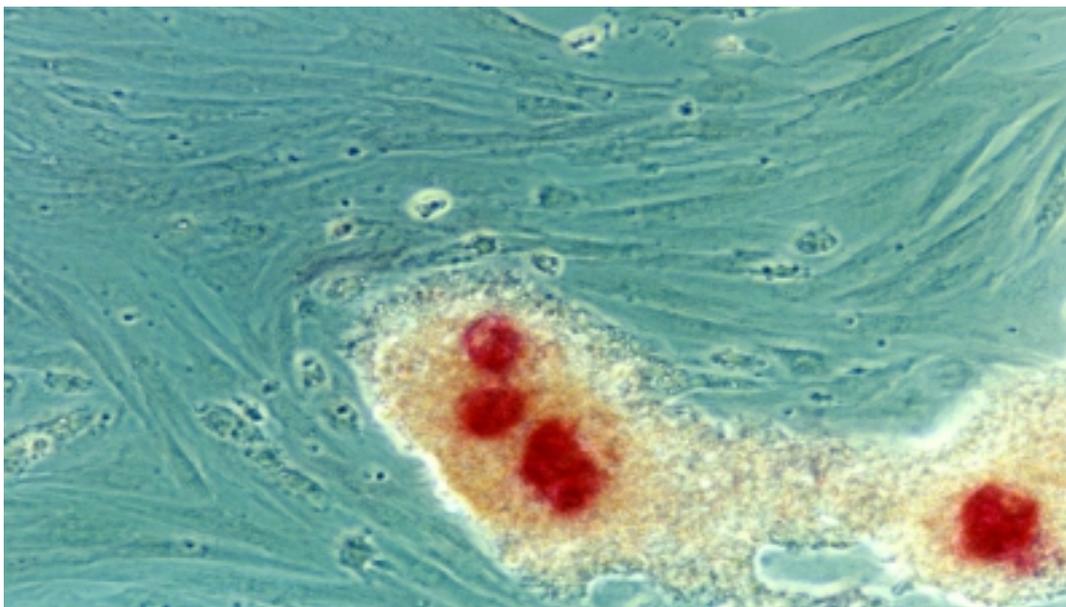
- 2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,42 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,3; Oxoid, Unipath Ltd., England)
- 0,25 ml Nitro-Blue Tetrazolium (NBT; 0,25 mg/0,25 ml Aq. dest; Sigma, N-6876)
- 0,5 ml NAD (2,5 mg/0,5 ml Aq. dest.; Sigma, H-7825)
- 0,25 ml Etiocholan-3 β -ol-17-one (0,4 mg/ml propyleneglycol-ethanol, 1:1; Sigma, E-5251)
- Einstellen des pH Wertes auf 7,7 mit ca. 200 μ l 0,1 M Na₂HPO₄

Das Kontrollfärbemedium enthielt Aq. dest. anstelle von NBT. Die mit Zellsuspension versehenen Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 40 min in der Feuchtkammer angefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. Mit der hier beschriebenen Methode konnten keine Leydig-Zellen in der Zellkultur nachgewiesen werden, so daß eine Kontamination mit dieser Zellart auszuschließen ist.

Peritubuläre Myoidzellen wurden durch Färbung auf alkalische Phosphatase (Anthony et al., 1987), die im wesentlichen in diesen Zellen lokalisiert ist, dargestellt. Das Färbemedium wurde folgendermaßen angesetzt:

- 10 mg Naphtol AS-biphosphoric acid (Sigma, N-2250) werden in 40 µl DMSO (Serva) gelöst und mit 5 ml Aq. dest. verdünnt
- Zugabe von 5 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)-Puffer: 25 mM AMP (1,11 g/500 ml Aq. dest.; Sigma) mit 1,25 mM MgCl₂ (0,127 g/500 ml), pH 8,9 (mit 37 % HCl einstellen)
- Kurz vor der Inkubation werden 10 mg Fast Red Violet LB (Sigma, F-3381) hinzugefügt und das gesamte Medium durch einen 0,2 µm Spritzfilter (Sigma) gegeben

Vor der Färbung wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 10 min mit einer Lösung aus 4% (V/V) Formaldehyd in 100 mM Phosphatpuffer fixiert. Zur Färbung wurden 600 µl Reagenzlösung pro Objektträger appliziert und dann für 30 min in die Feuchtkammer gegeben. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Bei der Mehrzahl der Präparationen war der Anteil AP-positiver Zellen $\leq 5\%$.



- **Abb 3.3: AP-Färbung mit Darstellung von peritubulären Myoidzellen. In der Umgebung niedrige Zelldichte (Vergrößerung 190fach)**

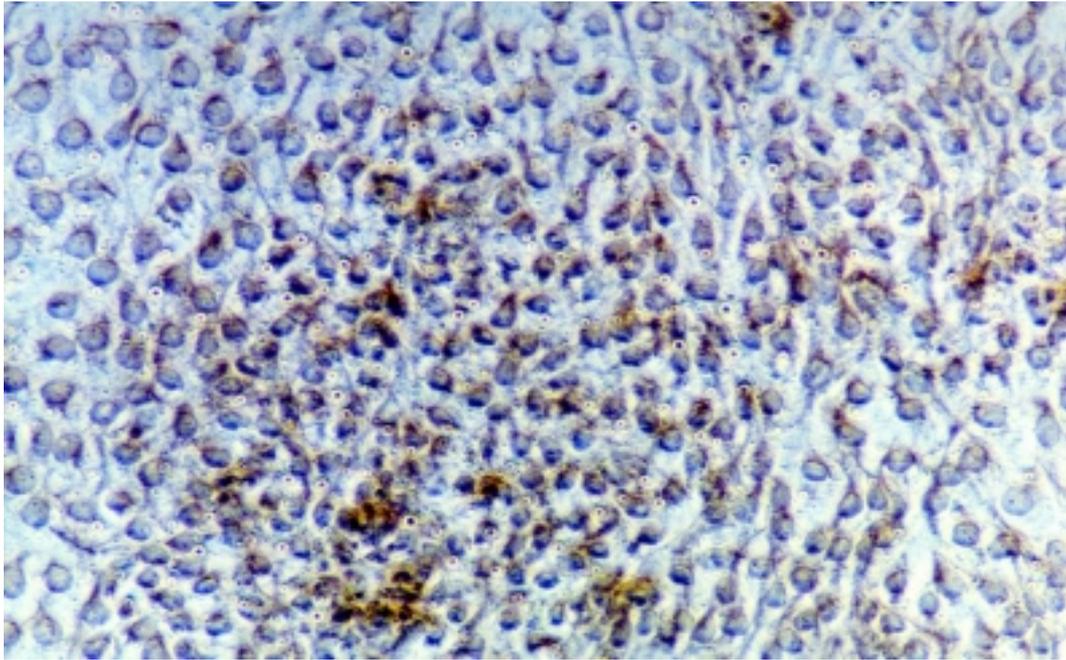
Sertoli-Zellen wurden durch Anfärben des intermediären Filamentproteins Vimentin nachgewiesen (Wrobel et al., 1995). Vimentin kommt in allen somatischen Zellen vor, d.h. im Testis werden neben Sertoli-Zellen auch Peritubular- und Leydig-Zellen angefärbt. In isoliertem Keimepithel allerdings wird Vimentin nur von Sertoli-Zellen exprimiert. Keimzellen zeigen dagegen keine immunhistochemische Anfärbung. Dazu waren folgende Schritte notwendig:

1. Tag:

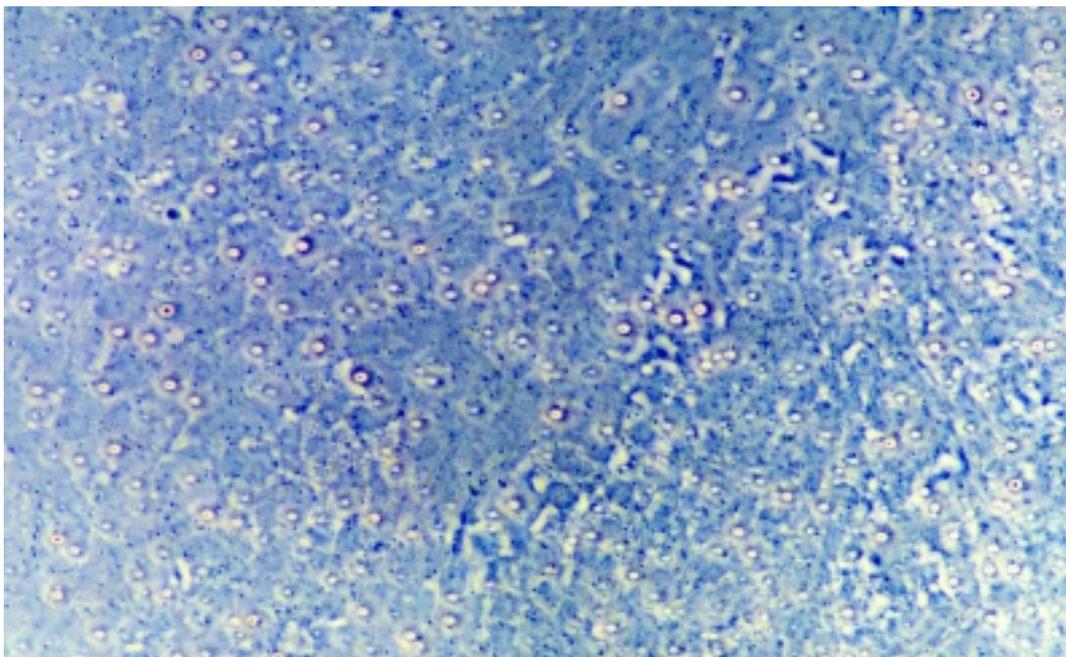
- Nach Absaugen des Mediums Spülen mit PBS (pH 7,5)
- Inkubation in 3%igem H_2O_2 für 5 min bei Raumtemperatur
- 3maliges Waschen mit PBS für 5 min
- Präinkubation der Objektträger für 60 min bei Raumtemperatur in normalem Kaninchenserum (Dako, USA, X-902) 1:5 in PBS verdünnt plus 5% BSA
- Inkubation der Zellen über Nacht mit dem 1. Antikörper: 1:1000 Monoklonaler Anti-Vimentin Antikörper von Mäusen (Sigma, V-6630) in PBS plus 1% BSA bei 4°C

2. Tag

- 3maliges Waschen in PBS für 5 min
- Inkubation der Zellen für 60 min bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper: Peroxidase-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus-IgG (Dako, P-260), 1:100 mit PBS plus 1% BSA
- 3maliges Waschen in PBS, 5 min
- Einmaliges Waschen in Tris-HCl (pH 7,3) für 5 min
- Inkubation in DAB (Sigma, D-5905), 1 Tbl. in 15ml Tris-HCl plus 1% $NiCl_2$



- **Abb. 3.4: Anfärbung der Zellkultur auf Vimentin sieben Tage nach Präparation (Vergrößerung 310fach). Die Sertoli-Zellen färben sich deutlich an.**



- **Abb. 3.5: Gleiches Präparat wie Abb. 3.4. Darstellung des Randbereichs der Kultur.**

Die hier beschriebenen biochemischen und histochemischen Methoden und die mikroskopische Kontrolle der Morphologie zeigten eine Reinheit der Zellkultur von 90-95%.

3.4 Toxikologische Untersuchung der zu testenden Substanzen

Am 6. Tag wurde das Medium abgesaugt und durch je 500 μl Kulturmedium C pro Well, in dem verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Agens enthalten waren, ersetzt. Die Schwermetallsalze Bleiazetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), Nickelazetat ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), Kobaltchlorid (CoCl_2) sowie Hexachloroplatinsäure ($\text{H}_2[\text{PtCl}_6]$) wurden für jede Versuchsreihe frisch in Kulturmedium C gelöst und fünf Lösungen zu je 5/10/25/50 und 100 μM hergestellt (zur Spezifizierung der Metallsalze s. Kpt. 3.1). Gossypol wurde in 100% Ethanol gelöst und fünf Stammlösungen in Ethanol zu 0,6/1,2/1,8/2,4 und 3 mM angesetzt. Die Kulturplatten mit 24 Wells wurden folgendermaßen behandelt:

- Absaugen des Mediums
- Well 1-4 (Kontrolle):
 1. Metalle – 500 μl Kulturmedium C
 2. Gossypol – 500 μl Kulturmedium C
(bei Kontrolle + 2,5 μl EtOH 100%)
- Well 5-24:
 1. Metalle – 500 μl Metallsalzlösung (s.o.) zu
5/10/25/50/100 μM (4 Wells/Konzentration)
 2. Gossypol – 500 μl Kulturmedium C + 2,5 μl
Gossypol Stammlösung zu 0,6/1,2/1,8/2,4/3 mM
(Endkonzentration: 3/6/9/12/15 μM Gossypol;
4 Wells/Konzentration)

Die Zellen wurden nun im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Std. wurden Proben des Mediums (250 μl /Well) für die Laktat- und Inhibinbestimmung entnommen (weiteres Vorgehen s. Laktat- und Inhibinbestimmung). Das restliche Medium wurde vorsichtig abgesaugt und der Proteingehalt der Zellen bestimmt (s. Kpt. 3.4.3). Bei der MTT-Messung wurde ohne vorher-

rige Probenentnahme das gesamte Medium abgesaugt und die Zellen entsprechend weiterbehandelt (s. Kpt. 3.4.3).

3.4.1 Laktatbestimmung

Die Messung der Laktatkonzentration im Medium erfolgte basierend auf der Methode nach Noll (1974) unter Verwendung eines gekoppelten Enzym-Assays. Bei diesem Assay wird im ersten Schritt L-Laktat durch Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) in Gegenwart von L-Laktatdehydrogenase (LDH) zu Pyruvat oxidiert.



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weitgehend auf der Seite des Laktat. Es kann jedoch durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Pyruvat verschoben werden:



Die in der ersten Reaktion gebildete NADH-Menge ist äquimolar zu dem in der Lösung enthaltenen Laktat. NADH ist Meßgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 339 nm photometrisch bestimmt. Die große Anzahl von Proben bei dieser Arbeit machte es notwendig, die in der Literatur beschriebene Methode wie folgt zu modifizieren.

Nach 24-stündiger Inkubation mit frischem bzw. schadstoffhaltigem Medium wurden je 250 µl des Zellüberstandes entnommen, für 5 min auf 95°C erhitzt, zentrifugiert und bei -18°C tiefgefroren. Die Proben wurden dann innerhalb einer Woche weiterverarbeitet. Für die Laktatbestimmung wurden folgende Lösungen benötigt:

1. Glutamat-Puffer (0,52 M, pH 8,9)

- Auflösen von 55,75 g L-(+)-Glutamat (Merck, Darmstadt) in 380 ml 1 M NaOH (Merck) und Auffüllen zu 500 ml mit Aq. dest.
- Einfrieren bei -18°C
- Vor Durchführung des Assays Zugabe von 470 µl 1 M NaOH pro ml Lösung

2. β-NAD-Lösung

- Auflösen von 50 mg β-NAD (Sigma, H-7825) in 2 ml Aq. dest.

3. GPT-Lösung (833 U/ml; Sigma, H-9530)

4. LDH-Lösung (4166 U/ml; Sigma, H-9568)

5. Laktatstandardlösung

- Auflösen von 8 bzw. 16 mg L(+)Laktat (Sigma, H-5706) in 100 ml Kulturmedium B (s. Kpt. 3.2)

Zur Durchführung des Assays wurden in eine 1-ml-Kunststoffküvette bei Raumtemperatur folgende Lösungen pipettiert:

- 80 µl Probe (bzw. Standardlaktatlösung)
- 30 µl β-NAD-Lösung
- 250 µl Glutamat-Puffer
- 18 µl Glutamat-Pyruvat-Transaminase (15 U)
- 700 µl Aq. dest.

Der Ansatz wurde vermischt und nach 10 Minuten die Extinktion (E_1) bei 340 nm am Spektralphotometer DU 68 (Beckmann, München) bestimmt. Um die Reaktion zu starten, wurden anschließend jeweils 11 µl Laktatdehydrogenase (21 U) hinzugegeben, wiederum gemischt und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde abermals die Extinktion (E_2) bestimmt und aus der Extinktionsdifferenz ($\Delta E = E_2 - E_1$) die Laktatkonzentration mittels folgender Formel berechnet:

$$C = \frac{\Delta E \times MG \times V_1}{\epsilon \times d \times V_2} \times 1000 [\text{g} / \text{l}]$$

Hierbei gilt:

C=Laktatkonzentration=gesuchte Größe

MG=Molekulargewicht von Laktat=90,1 g/mol

V₁=Testvolumen=1,089 ml

ε=Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm=6,3 [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]

d=Schichtdicke=1 cm

V₂=Probenvolumen=0,08 ml

Bei jeder Bestimmung wurde der Laktatgehalt zweier Lösungen mit standardisierter Konzentration (s.o.) mitbestimmt. Die Messung verlief linear im Konzentrationsbereich von 2 bis 20 mg Laktat/100ml (=20-200 µg/ml).

3.4.2 Inhibinbestimmung

Die Bestimmung der Inhibinkonzentration im Medium erfolgte mit dem Inhibin Radioimmuno-Assay Kit (Peninsula Laboratories Inc., Belmont, USA) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser kompetitive Radioimmuno-Assay (RIA) beruht auf der Bindung eines vom Kaninchen produzierten Antikörpers an die 1-32 Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes der α-Untereinheit des Inhibins. Die Probenentnahme aus der Zellkultur erfolgte 24 Std. nach Zugabe frischen Mediums, in dem verschiedene Konzentrationen des zu untersuchenden Agens gelöst waren. Die Proben (je 250 µl) wurden bei -80°C tiefgefroren und innerhalb einer Woche auf folgende Weise weiterverarbeitet:

1. Tag

- Vorbereiten der Proben (je 100 µl Probe pro Messröhrchen in Doppelbestimmung)
- Ansetzen der Standards in Konzentrationen von 1-128 pg Inhibin pro Röhrchen
- Zugabe einer definierten Menge des Antikörpers (1. Ak) gegen die Alpha Untereinheit des Inhibins
- Inkubation für 24 Std. bei 4°C

2. Tag

- Zugabe von radioaktiv markiertem Inhibin (¹²⁵J-Inhibin). Das markierte und das in den Proben und Standards enthaltene nicht markierte Inhibin konkurrieren um die limitierten Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers; je mehr Inhibin in der Probe enthalten ist, desto weniger ¹²⁵J-Inhibin kann an den Antikörper binden (Prinzip des kompetitiven Radioimmuno-Assays)
- Inkubation für 24 Std. bei 4°C

3. Tag

- Zugabe eines Antikörpers (2. Ak) gegen den inhibinspezifischen Antikörper (1. Ak). Daraufhin fällt ein Komplex aus, der aus erstem Antikörper, zweitem Antikörper und Inhibin besteht
- Zentrifugieren bei 4°C und 3000 Upm (75xg)
- Absaugen des Überstandes
- Messung der verbleibenden Radioaktivität im Multi Crystal Counter LB 2104 der Fa. Berthold, Wildbad. Die gemessene Radioaktivität ist umso geringer, je mehr nicht markiertes Inhibin in der Probe enthalten ist

Aus den Werten der Standards wurde nun eine Eichkurve bestimmt, aus der die Inhibinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt werden konnte.

Die Sensitivität dieses Assays betrug 1 pg Inhibin/Probe bzw. 0,2 pg Inhibin/100 µg Protein/24 Std.

3.4.3 MTT-Messung

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. MTT (3-[4,5-Dimethyl-2]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid), ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan-Produkt reduziert. Diese Umwandlung vollzieht sich ausschließlich in lebenden Zellen. Die Konzentration des reduzierten blauen Farbstoffes wird photometrisch gemessen. Für diese Bestimmung wurden die Zellen für 24 Std. bei 34°C mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen inkubiert und folgendermaßen weiterbehandelt.

1. Absaugen des Mediums und Zugabe von je 1 ml PBS (pH 7,3) und 100 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS gelöst; Serva, Heidelberg)
2. Inkubation für 1 Std. bei 34°C
3. Absaugen des Überstandes und Auflösen des reduzierten MTT in je 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva)
4. Entnahme von je 200 µl Probe und Messung der Absorption in Doppelbestimmung bei 550 nm unter Subtraktion der Hintergrundabsorption bei 620 nm in Mikrotiterplatten im MTP Reader EAR 400 ATC (SLT Labinstruments, Österreich)

Je höher der gemessene Extinktionswert, desto größer die Konzentration des Farbstoffes und damit der Anteil an vitalen Zellen in der untersuchten Probe. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe unbehandelter Zellen dargestellt:

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

3.4.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellen wurde als Bezugswert für die Parameter Laktat und Inhibin verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BIO-Rad Protein Assay (Hercules, CA, USA, 500-0116), basierend auf der Methode von Lowry (1951).

Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, und die Zellen wurden mit jeweils 200 µl 1 M NaOH unter Zusatz von 0,1% SDS (Natrium-dodecylsulfat; Serva; entsprechend 1 g SDS/l Natronlauge) pro Well versetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils eine Probe von 20 µl für die Messung in Doppelbestimmung auf Mikrotiterplatten verwendet. Zu diesem Zeitpunkt waren mikroskopisch keine Zellbestandteile mehr nachweisbar. Die Messung verlief wie folgt:

1. Zugabe von 200 µl Reagenz A zu je 20 µl Probe (dabei bindet der Farbstoff unspezifisch an die Aminogruppen der in der Probe enthaltenen Proteine)
2. Zugabe von je 25 µl Reagenz B (Auslösen einer Farbreaktion, die umso stärker ausfällt, je mehr Protein vorhanden ist)
3. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur

4. Messung der Absorption der Lösung am MTP-Reader EAR 400 ATC (SLT Labinstruments, Österreich) bei $\lambda=690$ nm und Bestimmung des Proteingehaltes mittels Standardkurve

Die Standardkurve wurde mit in NaOH + SDS (s.o.) gelöstem Rinder-serumalbumin (BSA; Sigma, H-9568) ermittelt und verlief im Bereich von 200-1400 $\mu\text{g/ml}$ linear. Die untere Nachweisgrenze lag bei 200 $\mu\text{g/ml}$. Die gemessenen Proteinmengen lagen zwischen 60 und 100 μg Zellprotein pro Well bzw. pro 10^6 Zellen.

3.5 Optimierungen

Beim Anlegen der Zellkulturen und der Durchführung der verschiedenen Assays traten immer wieder Probleme auf, die teils umfangreiche Vorversuche bzw. Veränderungen der in der Literatur beschriebenen Methoden notwendig machten. Der Zeitaufwand für diese Optimierungen war dabei oft größer als für die eigentliche Messung.

Beim Ausplattieren fiel auf, daß die Sertoli-Zellen möglicherweise aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften zu Klusterbildung neigen. Dies hatte zur Folge, daß beim Auszählen einzelner Proben einer Präparation (s. Kpt. 3.3.3) die Zelldichte stark variierte. Die gewonnenen Daten wurden zwar auf die jeweilige Proteinmenge bezogen, dennoch ist davon auszugehen, daß sich das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Struktur und Größe des Zellverbandes verändert. Die Klusterbildung führte zudem zu einer mikroskopisch sichtbaren inhomogenen Verteilung der Zellen auf den einzelnen Vertiefungen der Zellkulturschale. Dies hatte weiterhin zur Folge, daß die gemessenen Werte (Protein, Laktat und Inhibin) stark variierten, was die Erstellung verschiedener Standardkurven notwendig machte, bzw.

daß die Proben entsprechend verdünnt werden mußten. Im ungünstigsten Fall lagen die Werte außerhalb der Nachweisgrenze. Um dieses Problem zu beheben, wurden Nylonmembranen unterschiedlicher Maschenweite benutzt, wobei eine Weite von etwa 70 µm am besten geeignet schien, möglichst viele Einzelzellen zu gewinnen, ohne einen relevanten Zellverlust zu bedingen. Diese Nylonmembranen mußten allerdings von Hand zugeschnitten und einzeln sterilisiert werden. Bei den abschließenden Präparationen verwendeten wir schließlich sterile Einmal-Siebe der Firma Falcon mit einer Maschenweite von 70 µm.

Der Versuch, die Zellen auf unbeschichteten Platten anzuzüchten, mißlang. Die Zellzahl reduzierte sich deutlich im Verlauf der Kultur, so daß nach mehrfachem Mediumwechsel die Proteinmenge deutlich abgesunken war. Dies war bei den mit Matrigel beschichteten Platten in wesentlich geringerem Umfang der Fall.

Zu Beginn der Versuchsreihen sollte nicht die Proteinmenge, sondern der DNA-Gehalt der Zellen die Referenzgröße für die Stoffwechselfparameter darstellen. Moderne sensitive Verfahren zur Bestimmung des DNA-Gehaltes beruhen auf fluoreszierenden Farbstoffen, die an DNA binden (Labarca and Paigen, 1980). Zur Messung ist ein Fluoreszenzspektrometer nötig, welches allerdings nicht zur Verfügung stand. Eine ältere Methode (Burton, 1956) die auf einem colorimetrischen Nachweis der DNA beruht, erwies sich als zu unempfindlich und war darüber hinaus sehr aufwendig. Daher wurde auf die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) zurückgegriffen. Anfangs wurde zum Auflösen der Zellen Dispase verwendet. Dazu mußten die Zellen mehrfach im Brutschrank inkubiert und der Zellrasen anschließend mit einem sog. „Rubber Policeman“ vom Untergrund abgelöst werden. Der Überstand wurde dann mehrfach zentrifugiert und auf Eis sonifiziert, bevor mit dem eigentlichen Assay begonnen werden konnte. Dieses Vorgehen war sehr zeitaufwendig. Das Auflösen in verdünnter Natronlauge stellte hier eine einfache und praktische Alternative

dar. Einige Zellbestandteile lösten sich allerdings nur sehr schlecht in der verwendeten Natronlauge. Bei den abschließenden Versuchen wurde daher das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt.

Bei der Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Assay wird in der Originalvorschrift das Auflösen der Zellen und das Lösen des Formazanproduktes in salzsaurem Isopropanol empfohlen. Nach einigen Versuchen zeigte sich, daß schon nach kurzer Zeit durch Verdunstung Fehler in der photometrischen Bestimmung des Proteingehaltes auftraten. Daher wurde letztlich DMSO als Lösungsmittel verwendet. Aufgrund des wesentlich höheren Siedepunktes sind hier Fehler durch Verdunstung des Lösemittels zu vernachlässigen.

Die Optimierung des Laktat-Assays gestaltete sich schwierig. Eine Verwendung der handelsüblichen Kits zur Laktatmessung war nicht praktikabel, da zum einen das erforderliche Probenvolumen zu groß war und zum anderen durch die erhebliche Anzahl an Proben der Kostenfaktor berücksichtigt werden mußte. Daher wurde das Originalverfahren nach Noll den Versuchsbedingungen angepaßt. Das erforderliche Volumen mußte von ursprünglich 3 ml auf 1 ml reduziert werden, da das Volumen des zur Verfügung stehenden Zellkulturüberstandes begrenzt war. Die Messung konnte in 1 ml Kunststoffküvetten durchgeführt werden. Für eine 24-Well-Zellkulturplatte waren dabei etwa 52 Einzelmessungen (Doppelbestimmung + Standards) nötig. Es zeigte sich, daß bei Verwendung der Enzyme GPT und LDH in der für das geringere Probenvolumen vorgeschriebenen Menge die für die Reaktion notwendige Zeit größer war als zuvor angenommen. Daher wurden der Anteil der Enzymlösung am Versuchsansatz erhöht und die Proben nach Zugabe der Enzyme vorsichtig durchmischt. Die Reaktion konnte dadurch erheblich beschleunigt und der Zeitaufwand reduziert werden. Die Vorbehandlung des Überstandes mit Perchlorsäure erwies sich als unnötig. Ein Erhitzen der Proben auf 95°C, anschließendes Zentrifugieren sowie Lagerung bei -18°C erfüllten den gleichen Zweck.

Bei der Durchführung des Inhibin-Assays fiel auf, daß die Konzentration des Hormons bei vielen Proben so gering war, daß es nicht mehr detektiert werden konnte. Die Ursache sahen wir zum einen im unterschiedlichen Alter der Versuchstiere (s.Kpt. 5) und zum anderen in der Lagerung der Proben vor der Durchführung des Assays. Die Proben wurden daher unmittelbar nach Versuchsende bzw. innerhalb einer Woche nach Gewinnung weiterverarbeitet. Für die eigentlichen Experimente wurde das Endvolumen pro Well auf 500 µl verringert, wodurch sich die Konzentration des Inhibin deutlich erhöht. Beide Maßnahmen führten zu einer optimierten Bestimmung der Inhibin-Werte.

Das Auflösen der Schwermetalle im Medium war dank deren guter Wasserlöslichkeit unproblematisch. Gossypol dagegen ist stark lipophil. Die Löslichkeit in reinem DMSO war gut. Allerdings mußte bis zur vollständigen Auflösung eine Wartezeit von einigen Stunden in Kauf genommen werden. Bei einer Endkonzentration von 0,3% im Zellkulturmedium zeigte sich im MTT-Assay keine signifikante Beeinflussung der Zellvitalität durch DMSO. In Ethanol löst sich Gossypol wesentlich schneller. Damit die zugesetzte Menge gering sein konnte, mußte reiner Alkohol verwendet werden. Die Endkonzentration des Ethanol im Medium betrug 0,5%. Ein Einfluß auf die Vitalität der Zellen konnte in Vorversuchen auch hier nicht beobachtet werden. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde daher Ethanol als Lösungsmittel verwendet.

3.6 Statistik

Die Experimente zur Laktat- und MTT-Messung wurden mindestens dreimal wiederholt. Dabei ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Die dargestellten Resultate entsprechen jeweils einem repräsentativen Experiment; durchgeführt an je zwei Kulturplatten mit insgesamt acht Wells pro untersuchter Schadstoffkonzentration. Die Experimente zur Untersuchung der Inhibinsekretion wurden je einmal wiederholt. Die Ergebnisse zeigen eines dieser Experimente, durchgeführt an einer Kulturplatte mit vier Wells pro Konzentration. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test.

Die Werte in den Diagrammen des Ergebnisteils (Kpt. 4) entsprechen dem Mittelwert \pm der Standardabweichung. Die Symbole (***) , (**) und (*) kennzeichnen dabei ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$) , ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Angaben zu den Maßeinheiten finden sich am jeweiligen Diagramm.

Die EC_{50} -Werte wurden durch graphische Extrapolation aus den entsprechenden Dosis-Wirkungs-Diagrammen ermittelt. Der EC_{50} -Wert entspricht derjenigen Schadstoffkonzentration, bei der eine Abnahme der Meßgröße auf 50% des Kontrollwertes (unbehandelte Probe) beobachtet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Vitalität der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Die Sertoli-Zellkultur wurde für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Schadstoffes inkubiert. Direkt im Anschluß wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Dabei wird MTT, ein gelber Farbstoff, von den Zellen aufgenommen und zu einem blauen unlöslichen Formazanprodukt reduziert. Dieser Prozess benötigt die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen und findet ausschließlich in lebenden Zellen statt. Die Ausbeute an blauem Farbstoff, die auf photometrischem Wege bestimmt wird, ist ein direktes Maß für die Vitalität der untersuchten Zellpopulation (s. Kpt. 3.4.3). Die Diagramme 4.1-4.5 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Die Werte in diesen und den folgenden Diagrammen entsprechen dem Mittelwert \pm der Standardabweichung. Die Symbole (***) , (**) und (*) kennzeichnen dabei ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (zur statistischen Auswertung s. Kpt. 3.6).

4.1.1 Gossypol

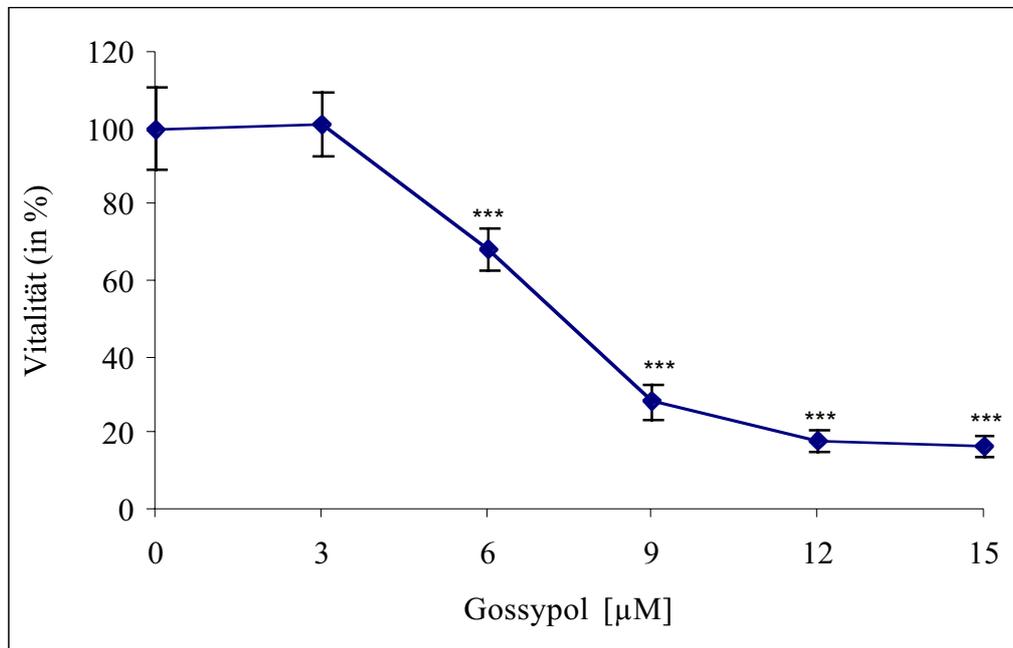


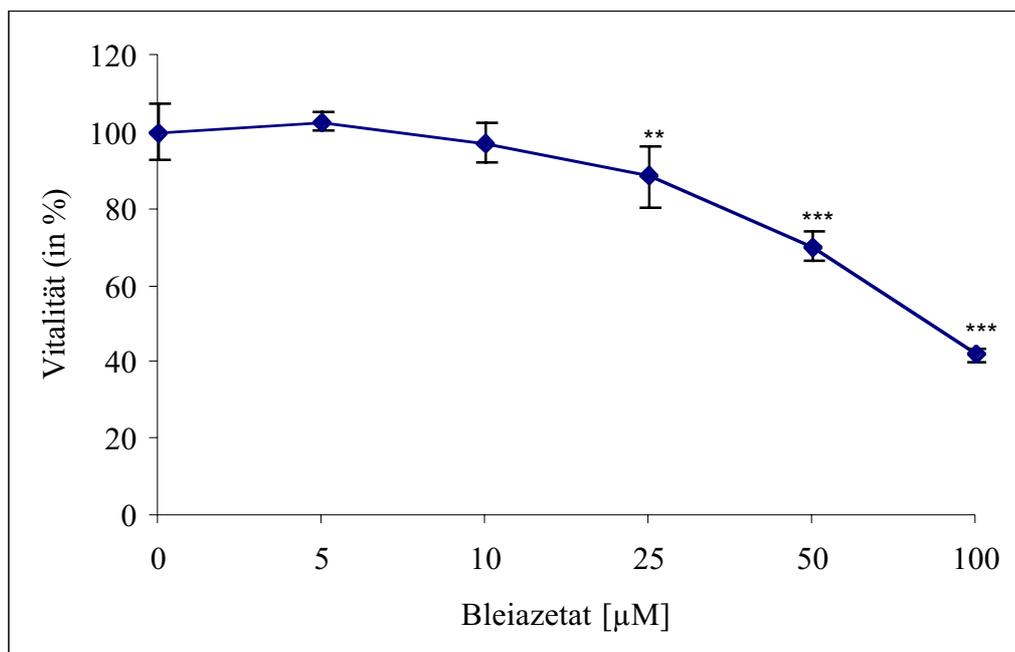
Diagramm 4.1: Vitalität der Zellen nach Zugabe von Gossypol

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent (%) der Kontrolle. (***) (** und *) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=8$

Niedrige Konzentrationen von Gossypol hatten keinen (3 μM) oder nur geringen (6 μM) Einfluß auf die Vitalität der Sertoli-Zellen. Höhere Konzentrationen (9-15 μM) führten jedoch zur Abnahme der Zellvitalität um 70%. Für einen Rückgang der MTT-Reduktionskapazität der Zellen auf 50% (EC_{50} -Wert) war eine Gossypolkonzentration von 7,6 μM nötig ($\text{EC}_{50} = 7,6 \mu\text{M}$).

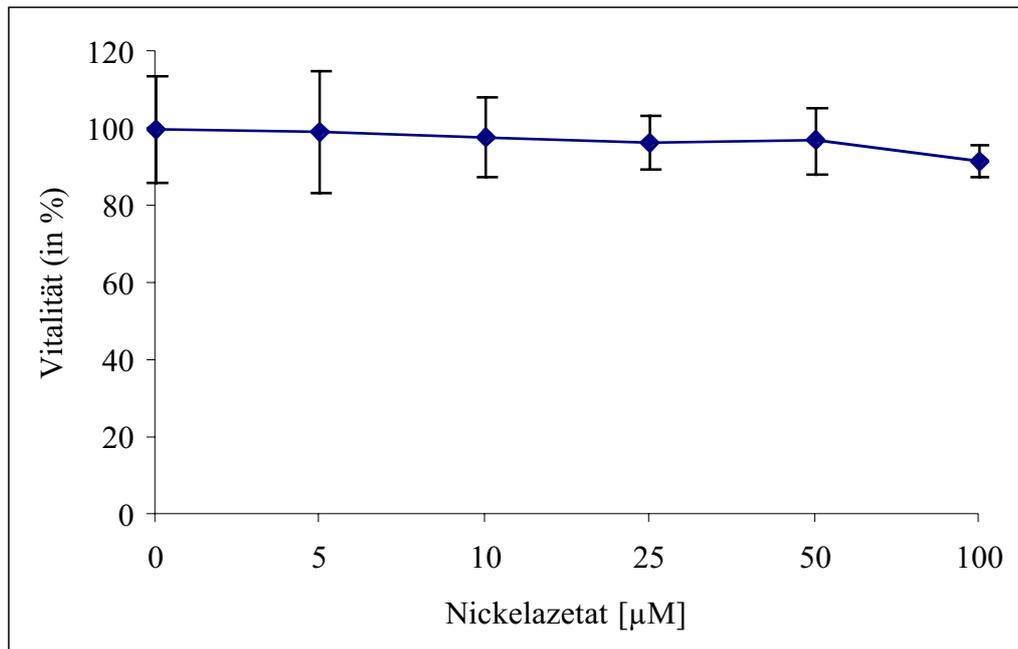
4.1.2 Schwermetallsalze

Die Untersuchung der Schwermetallsalze zeigte, daß nur Bleiazetat die Zellvitalität negativ beeinflusst. Bei höheren Konzentrationen (25 und 50 μM) kam es hier zu einem signifikanten Rückgang um 12% bzw. 30% im Vergleich zur Kontrolle. Bei Konzentrationen von 100 μM nahm die Vitalität der Sertoli-Zellen um 58% ab. Der EC_{50} -Wert war bei 82 μM Bleiazetat erreicht.



• **Diagramm 4.2: Vitalität der Zellen nach Zugabe von Bleiazetat**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent (%) der Kontrolle. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$).
n=8

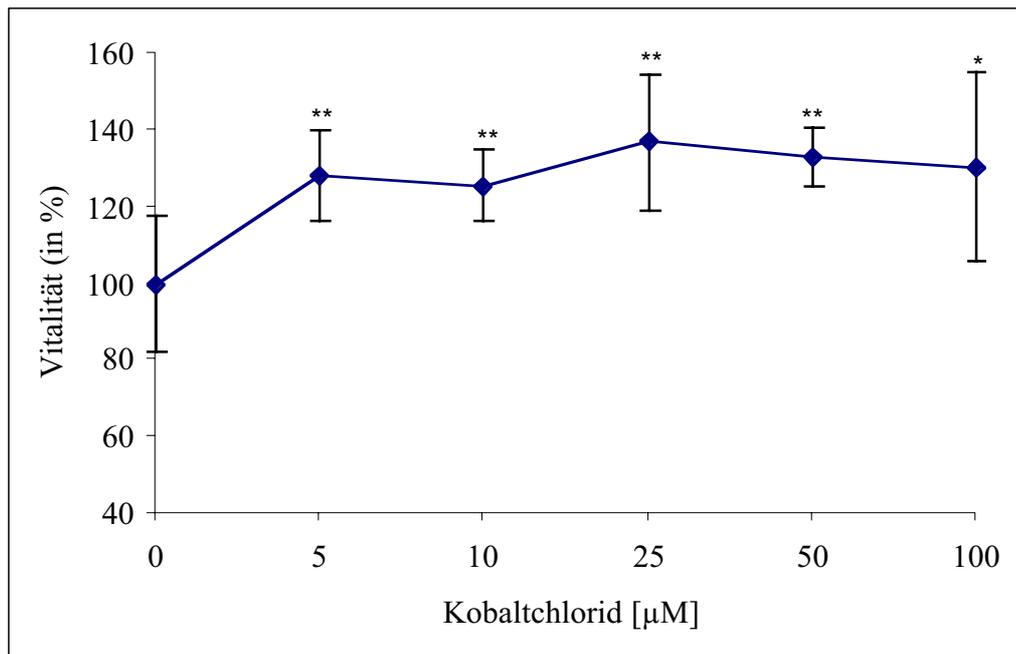


- **Diagramm 4.3: Vitalität der Zellen nach Zugabe von Nickelacetat**

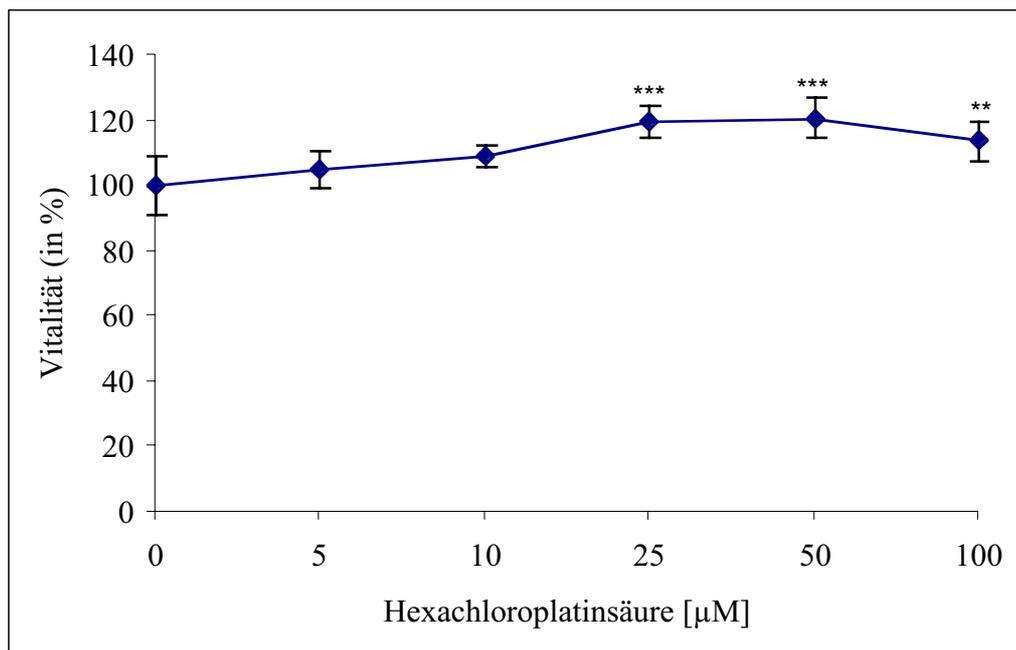
Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent (%) der Kontrolle. (***) (**), (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=8$

Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigten Nickelionen in Form von Nickelacetat keinen meßbaren Einfluß auf die Zellvitalität.

Kobaltchlorid und Hexachloroplatinsäure steigerten demgegenüber die MTT-Reduktionskapazität der Zellen um bis zu 36% (Kobaltchlorid, 25 μM) bzw. 20% (Hexachloroplatin, 50 μM).



• **Diagramm 4.4: Vitalität der Zellen nach Zugabe von Kobaltchlorid**



• **Diagramm 4.5: Vitalität der Zellen nach Zugabe von Hexachloroplatin-säure**

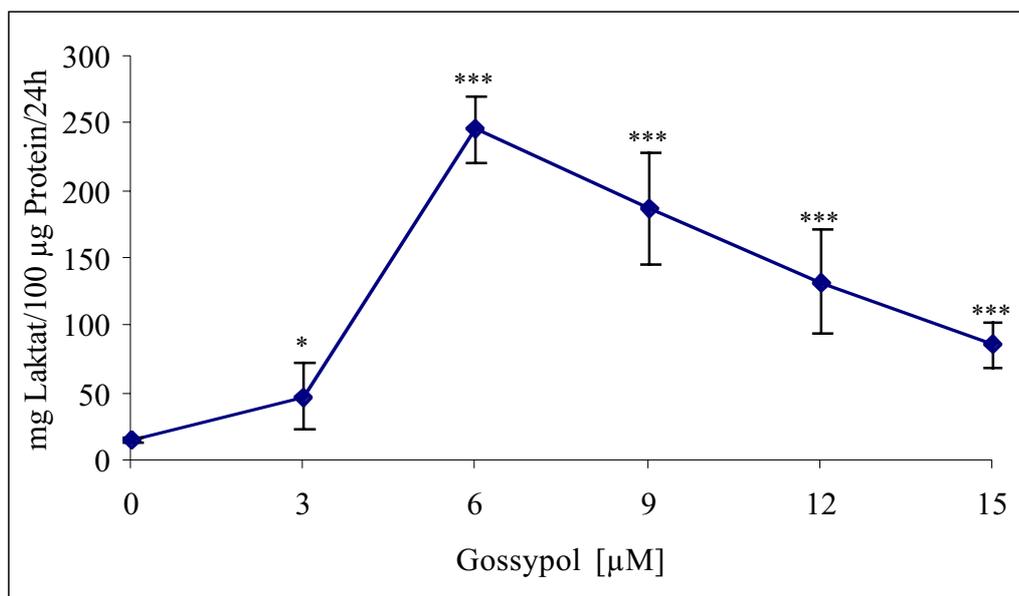
Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent (%) der Kontrolle. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=8$

4.2 Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Die Laktatproduktion der Zellen wurde mit Hilfe eines gekoppelten Enzym-Assays bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Std. wurde das Medium entfernt und dessen Laktatgehalt photometrisch ermittelt.

4.2.1 Gossypol

Gossypol hatte den weitaus größten Einfluß auf die Laktatproduktion. Schon geringe Konzentrationen führten zu einer massiven Zunahme der Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand um das bis zu 15fache der Kontrolle (6 μM). Bei höheren Gossypolkonzentrationen (9-15 μM) kam es im Vergleich dazu zu einem geringeren Anstieg des Laktatgehaltes (5facher Anstieg bei 15 μM). Diese relative Abnahme der Laktatmenge ist auf eine verringerte Vitalität der Sertoli-Zellen zurückzuführen, da hier parallel eine verringerte mitochondriale Aktivität gemessen wurde (s. Diagramm 4.1).

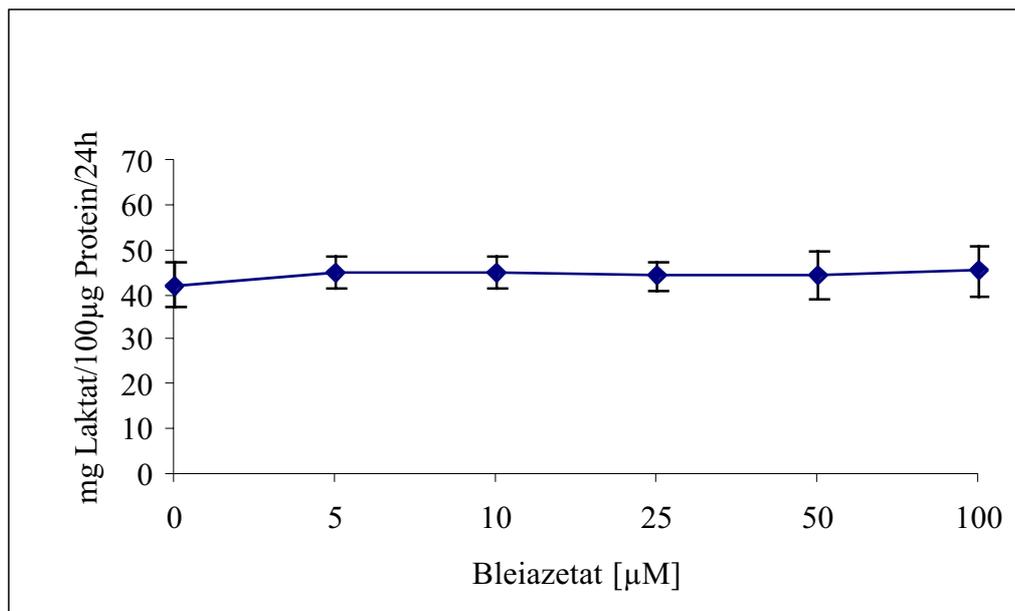


- **Diagramm 4.6: Laktatproduktion nach Zugabe von Gossypol**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$) , ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$) . $n = 8$

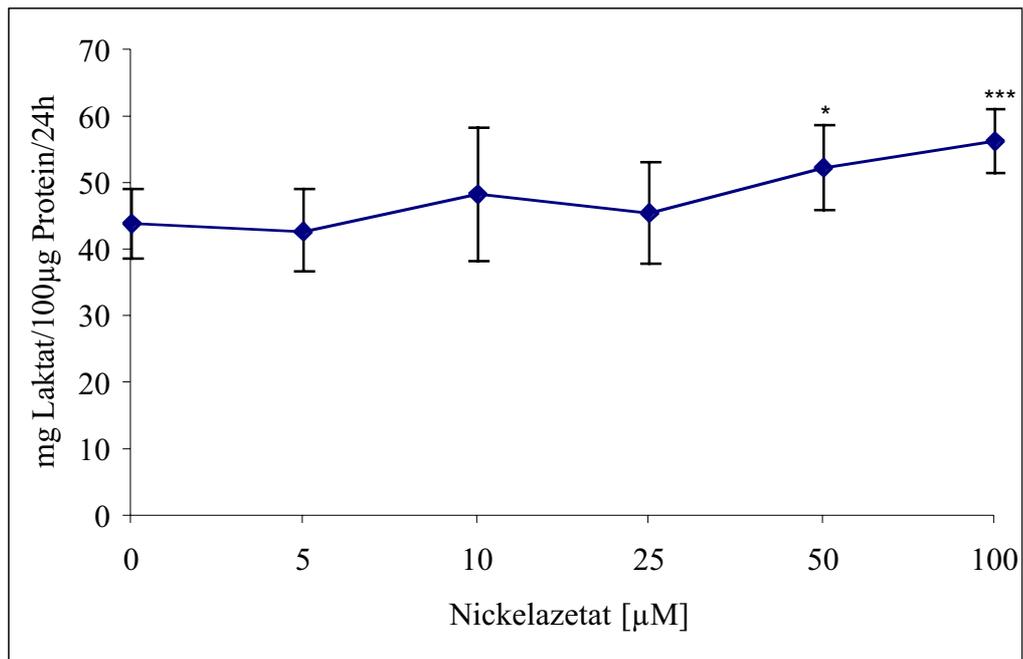
4.2.2 Schwermetallsalze

Im Vergleich zum Gossypol wurde bei den Metallsalzen erst bei höheren Konzentrationen des jeweiligen Agens ein Einfluß auf die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen beobachtet. Hier zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Zunahme der Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand. Hexachloroplatinsäure hatte dabei den größten Effekt mit einer Zunahme des Wertes im Medium um das 2,6fache bei 100 μM . Kobaltchlorid und Nickelazetat führten bei dieser Konzentration zu einem 1,6 bzw. 1,3fachen Anstieg des Laktatspiegels. Unter dem Einfluß von Bleiazetat konnte keine Änderung der Laktatproduktion beobachtet werden.

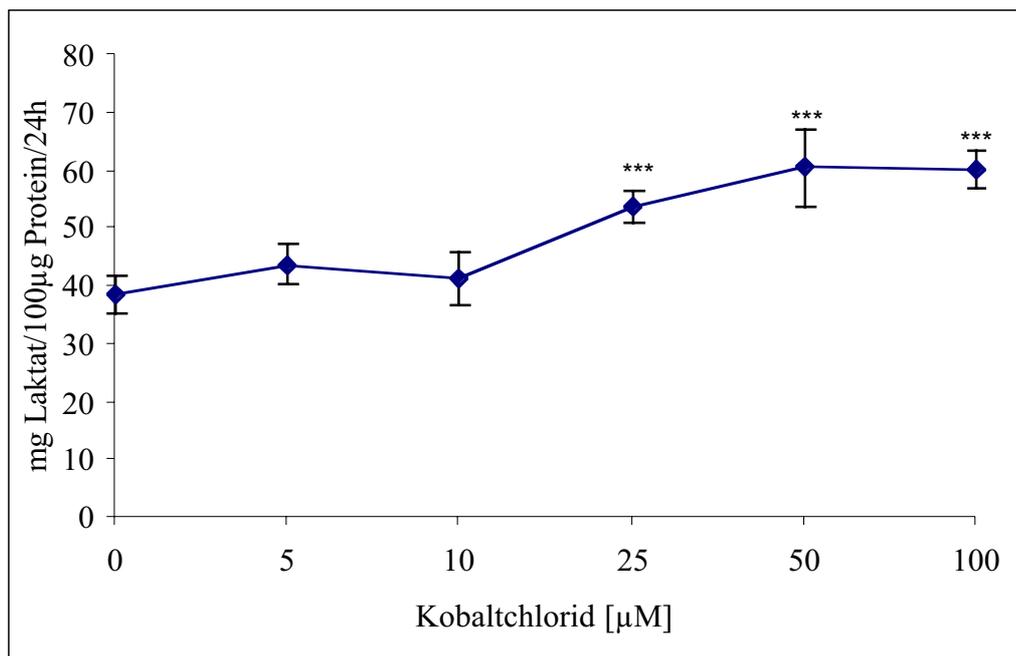


- **Diagramm 4.7: Laktatproduktion nach Zugabe von Bleiazetat**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) (** und *) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=8$

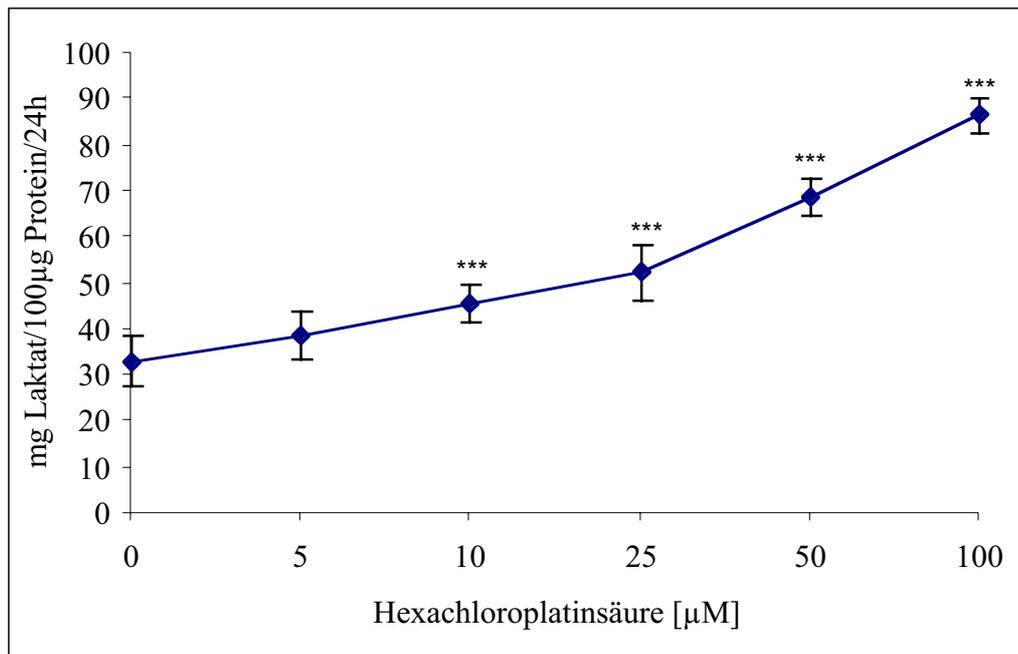


• **Diagramm 4.8: Laktatproduktion nach Zugabe von Nickelacetat**



• **Diagramm 4.9: Laktatproduktion nach Zugabe von Kobaltchlorid**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$) , ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$) . $n = 8$



• **Diagramm 4.10: Laktatproduktion nach Zugabe von Hexachloroplatinsäure**

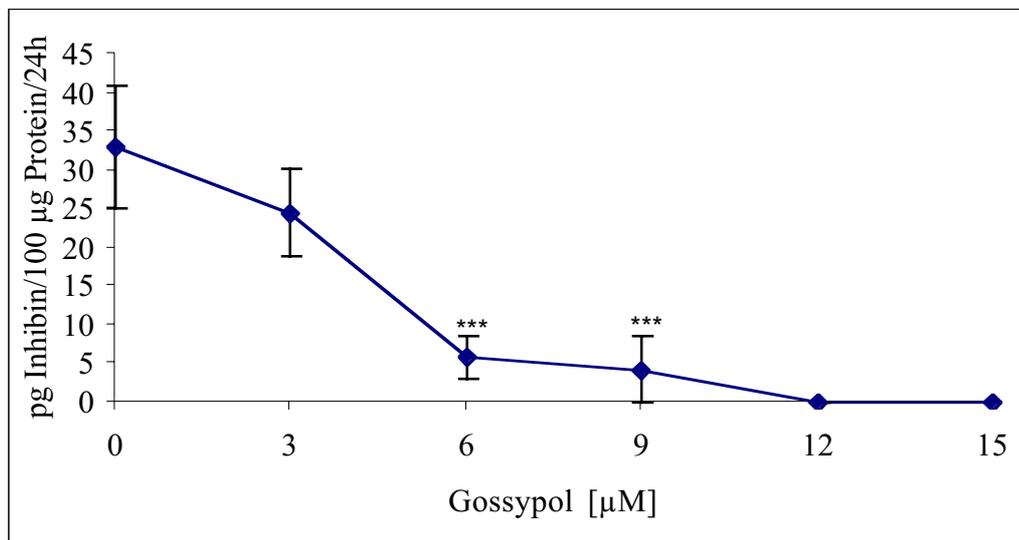
Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) (** und *) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=8$

4.3 Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Das Polypeptid Inhibin ist ein spezifischer Parameter für die Funktion der Sertoli-Zelle. Dieses Hormon wird nur in sehr geringen Mengen produziert und abgegeben. Zur Detektion war darum die Verwendung eines hochsensitiven Radioimmuno-Assays nötig. Nach einer Inkubationszeit von 24 Std. wurde das Medium entfernt und der Inhibingehalt bestimmt. Die Sensitivität des Assays betrug 0,2 pg Inhibin/100 µg Protein/24 Std. (s. Kpt. 3.4.2). Die Untersuchung zeigte folgende Ergebnisse:

4.3.1 Gossypol

Steigende Konzentrationen von Gossypol führten zu einer stetigen Abnahme der Inhibinproduktion. Bei 6 µM kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion um 83%. Bei 12 µM und 15 µM Gossypol sank der Inhibinspiegel unter die Nachweisgrenze.

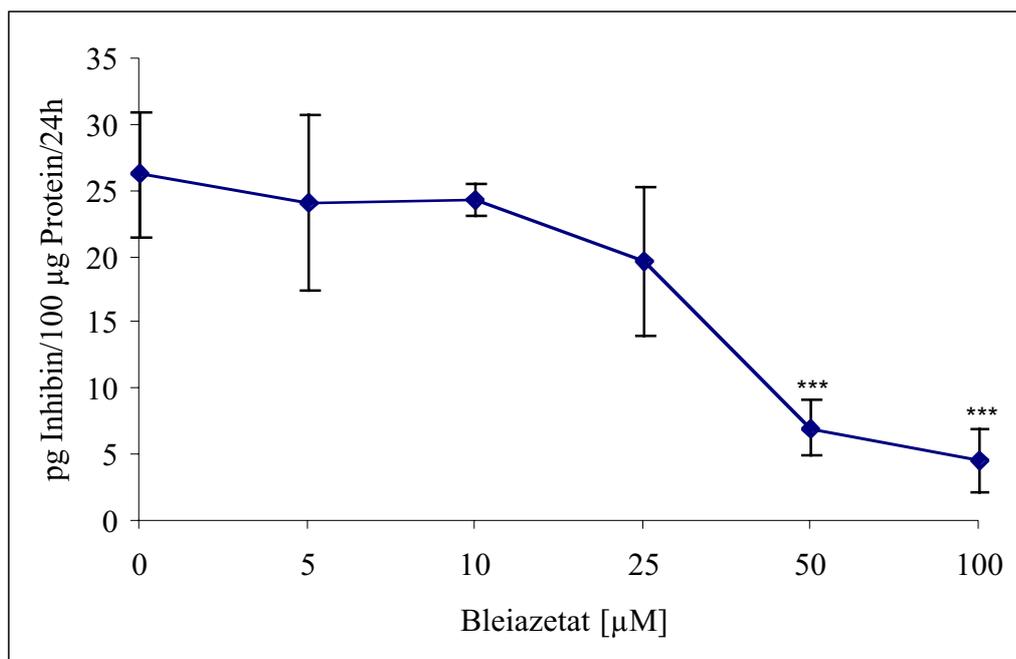


• **Diagramm 4.11: Inhibinsekretion nach Zugabe von Gossypol**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=4$

4.3.2 Schwermetallsalze

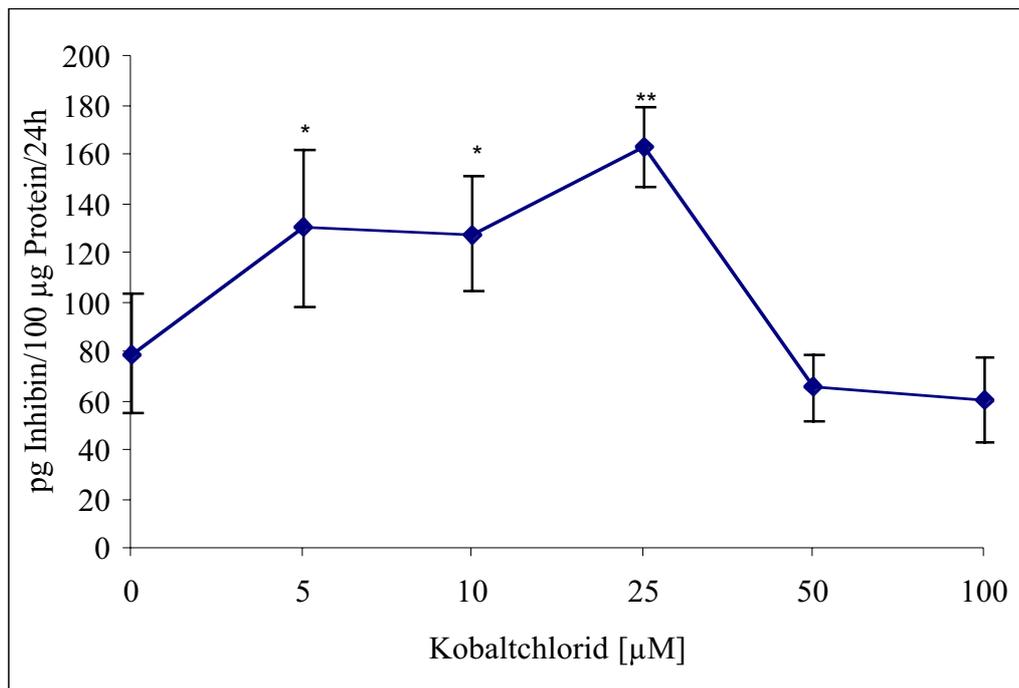
Bei der Untersuchung der Schwermetalle zeigten sich abhängig von der Substanz unterschiedliche Resultate. Als Reaktion auf die Zugabe von Bleiazetat kam es ähnlich wie bei der Verwendung von Gossypol zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Inhibinproduktion. Obwohl statistisch nicht signifikant, zeigte sich schon bei niedrigen Konzentrationen (5 und 10 μM) eine tendenzielle Abnahme des Inhibins. Bei 50 μM ging die Sekretion hochsignifikant auf 27%, bei 100 μM bis auf 18% der Kontrolle zurück. Dies wird jedoch in diesem Konzentrationsbereich am ehesten durch die zytotoxische Wirkung von Blei verursacht (vgl. Diagramm 4.2).



- **Diagramm 4.12: Inhibinsekretion nach Zugabe von Bleiazetat**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) (**), (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=4$

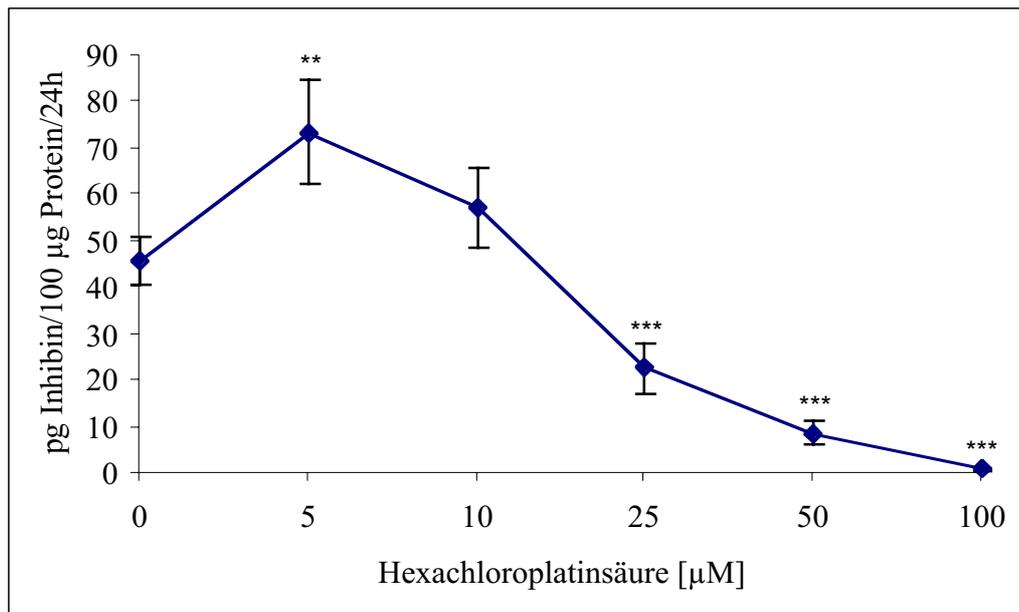
Kobaltchlorid und Hexachloroplatinsäure führten im Gegensatz zu Gossypol und Bleiazetat bei geringen Konzentrationen (ab 5 μM) zu einer Zunahme der Inhibinproduktion. Kobaltchlorid konnte die Inhibinsekretion bis auf das Doppelte der Kontrolle steigern (25 μM). Bei höheren Konzentrationen (50 und 100 μM) fiel der Inhibinpiegel wieder ab, unterschied sich dabei jedoch nicht signifikant von der Vergleichsgruppe.



• **Diagramm 4.13: Inhibinsekretion nach Zugabe von Kobaltchlorid**

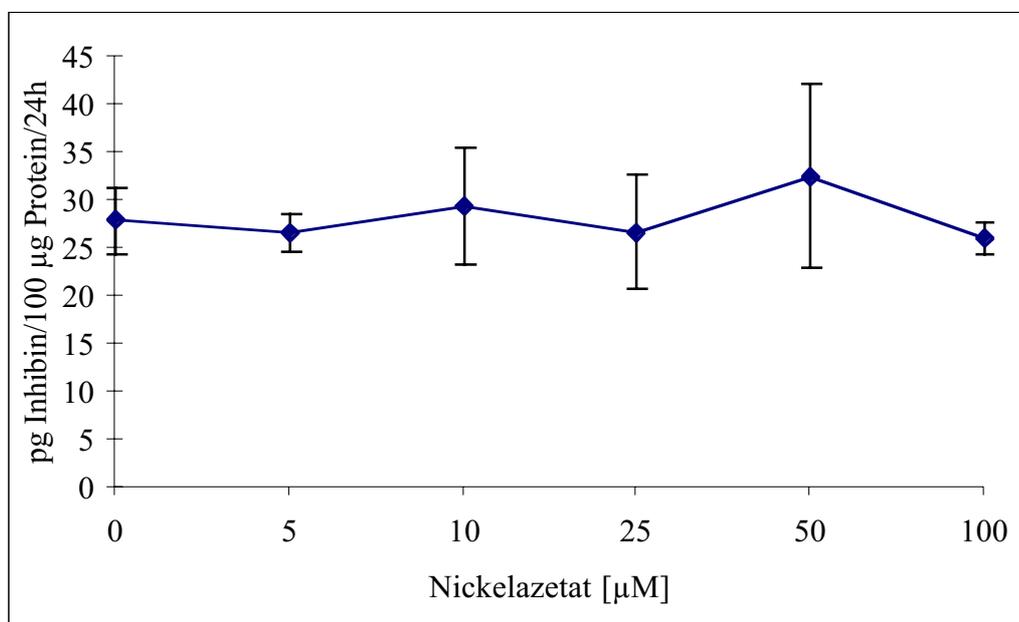
Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$) , ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$) . $n=4$

Bei Zugabe von Hexachloroplatinsäure erreichte die Inhibinproduktion bei 5 μM ihr Maximum (1,6fache der Kontrolle). Danach zeigte sich ein signifikanter Abfall des Inhibinpiegels bis in den Bereich der Nachweisgrenze.



- **Diagramm 4.14: Inhibinsekretion nach Zugabe von Hexachloroplatinsäure**

Nickelazetat zeigte dagegen im verwendeten Konzentrationsbereich keinen meßbaren Einfluß auf die Sekretion von Inhibin.



- **Diagramm 4.1: Inhibinsekretion nach Zugabe von Nickelazetat**

Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. (***) , (**) und (*) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0.001$), ($p < 0.01$) und ($p < 0.05$). $n=4$

4.4 Ergebnisse der Optimierung

Der erste Schritt zur Verbesserung der Testmethode war die Verwendung von Einmal-Nylonsieben mit 70 μm Maschenweite zur mechanischen Zellseparation. Damit gelang es, die Klusterbildung der Zellen zu minimieren und eine homogene Verteilung der Population auf den einzelnen Wells zu erreichen. Das Ergebnis war ein gleichmäßiger Monolayer, wie er auf Abb. 3.2 und 3.4 zu sehen ist.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkultur als Referenzwert für die gemessenen Parameter erwies sich für die praktische Anwendung als unbrauchbar. Stattdessen wurde die Proteinmenge mit einem handelsüblichen Kit bestimmt. Die Proteinbestandteile des Matrigel stellten dabei keine wesentliche Fehlerquelle dar, da ihr Anteil zu gering war, um auf die Messung Einfluß zu nehmen. Dies konnte in mehrfachen Testreihen nachgewiesen werden. Die Proteinmenge lag zwischen 60 und 100 μg pro Well.

Die schlechte Löslichkeit der Zellen machte die Anwendung eines Detergenz (SDS) notwendig. Hiernach waren mikroskopisch keine sichtbaren Bestandteile in der Probe mehr zu erkennen.

Durch das Auflösen der Zellen und des Farbstoffes in DMSO statt in Isopropanol konnten Verdunstungsfehler vermieden und die Handhabung des MTT-Assays erleichtert werden.

Beim Laktat-Assay mußte die umfangreiche Vorbehandlung der Proben und der notwendige Messansatz verändert bzw. optimiert werden. Dazu wurde das Volumen der einzelnen Substanzen (Puffer, Substrate) entsprechend verändert und die Enzymmengen optimiert. Im Ergebnis konnte so der Assay an die Versuchsgegebenheiten (kleines Probenvolumen, große Zahl der Proben, Kostenfaktor) angepaßt werden. Sowohl der Zeitaufwand als auch die Kosten wurden durch diese Vorgehensweise im Vergleich zu einem handelsüblichen Verfahren um etwa 50% reduziert.

Der aufwendigste Teil der Messungen war die Durchführung des Inhibin-Assays. Obwohl die Empfehlungen des Herstellers befolgt wurden, kam es schon nach kurzer Lagerung der Proben zu relevanten Veränderungen der Messwerte, so daß nach umfangreichen Vorversuchen die Proben unmittelbar bzw. innerhalb einer Woche weiterverarbeitet wurden. Das Absinken der Messwerte unter die Nachweisgrenze trat so nicht mehr auf.

5 Diskussion

5.1 Diskussion des Testsystems

Primäre Aufgabe dieser Arbeit ist es, ein Testsystem als mögliches Screening-Verfahren zu etablieren, das es ermöglicht, die reproduktionstoxische Potenz einer Noxe innerhalb kurzer Zeit beurteilen zu können. Die Bewertung eines Testsystems erfolgt nicht zuletzt aufgrund der bei der praktischen Tätigkeit auftretenden Probleme. Zu Beginn der Diskussion soll daher eine Betrachtung dieser Probleme stehen, die vor allem im Bereich der Standardisierung und Optimierung auftraten.

Beim Anlegen der Zellkultur konnte auf die schon bestehenden Erfahrungen der hiesigen Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden, die in entsprechenden Arbeiten veröffentlicht sind (Monsees et al., 1996). Das wesentliche Problem lag in der Zellseparation. Die Gewinnung von Einzelzellen stellte sich zu Beginn als schwierig dar, war aber notwendige Voraussetzung, um eine möglichst gleich große Zellpopulation in den einzelnen Kulturschalen zu erhalten. Die Verwendung eines 70 µm Nylonsiebes nach enzymatischer und grober mechanischer Trennung führte zwar zu einer Reduktion der Gesamtzahl gewonnener Zellen, konnte aber die Auflösung von Adhäsionen und Zellklustern gewährleisten, so daß im wesentlichen Einzelzellen gewonnen wurden. Daher wurde dieser Schritt bei der Zellpräparation hinzugefügt, der so in den Publikationen nicht beschrieben ist (Hadley et al., 1985; Onoda et al., 1990).

Bei der Anwendung der einzelnen Assays ergaben sich grundsätzliche Probleme. Die Detektion von Laktat ist zwar eine seit vielen Jahren in der Biochemie verwendete Methode, die erhältlichen Testkits arbeiten jedoch mit weitaus grösseren Volumina, als sie bei dieser Arbeit zur Verfügung

standen. Es war nötig, den Assay auf die vorhandenen Probenvolumina zu standardisieren und zur weiteren Vereinfachung den Meßbereich an die zu erwartenden Laktatmengen anzupassen. Dadurch war keine weitere Verdünnung bzw. Konzentration der Proben, die in nicht unerheblichem Umfang anfielen, nötig. In Vorversuchen, die am Überstand von unbehandelten Zellen durchgeführt wurden, wurde vor Testbeginn die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft. Es zeigte sich dabei, daß unter Einbeziehung der jeweiligen Zellproteinmengen als Referenzwert vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten.

Das wesentliche Problem bei der Inhibinbestimmung lag zum einen in der äußerst geringen Konzentration des Inhibins in den Proben; zum anderen in der durch das komplizierte und langwierige Testverfahren verursachten Störanfälligkeit des Assays. In Vorversuchen zeigte sich, daß es trotz Einhaltung der vom Hersteller des Assays angegebenen Methode zur Konservierung der Proben durch Einfrieren bei -80°C zu einem relevanten Abbau des Inhibins nach etwa 14 Tagen gekommen war. Die Proben wurden daher möglichst unmittelbar nach Versuchsende bzw. innerhalb einer Woche weiter bearbeitet. Je nach Zellpräparation zeigte sich außerdem, daß die basale Inhibinsekretion der Zellen stark variierte, wobei die Standardabweichung des Inhibingehaltes der Proben einer Präparation konstant blieb. Zum Teil lagen die gesamten Meßwerte einer Versuchsreihe unterhalb der Nachweisgrenze. Möglicherweise sind schon minimale Altersunterschiede bei den Versuchstieren verantwortlich für dieses Phänomen. Es wurde gezeigt, daß junge Ratten eine deutlich höhere Inhibinproduktion haben als ältere Tiere (Rivier et al., 1988).

Kurz nach Beendigung der praktischen Tätigkeit an dieser Arbeit kam ein Testsystem auf den Markt, das mit Hilfe eines ELISA Inhibin nachweist. Dieses System ist weniger sensitiv als der RIA, kommt allerdings mit einem

geringeren Zeitaufwand aus. Zur Optimierung müßte hier mit einer größeren Zellzahl gearbeitet werden.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Methode nach Lowry (1951). Die Werte lagen relativ konstant (allerdings abhängig von der jeweiligen Präparation) zwischen 60 und 100 µg pro Well in einem Volumen von 1 ml und bei einer Zellzahl von 10^6 Zellen/ml (s. Kpt. 3.3.3). Auffallend ist, daß in vorausgegangenen Studien meist mit größeren Zellzahlen gearbeitet wurde. Williams und Foster (1988) verwendeten beispielweise $4-5 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium, allerdings ohne die Angabe der Proteinmenge.

Chapin et al. (1988) arbeiteten dagegen bei einer Studie über den Einfluß von Phtalatestern auf Sertoli-Zellkulturen mit einem Volumen von 26 ml pro Well und einem Proteingehalt von 1,8-2,5 mg. Dies entspricht 70-100 µg Protein pro ml. Leider finden sich hier keine Angaben zur Zellzahl. Bei einer ähnlichen Arbeit wurden 15×10^6 Zellen in 5 ml Volumen mit 3,5 mg Zellprotein pro Well verwendet (Gray and Beaman, 1984). Dies sind 3×10^6 Zellen/ml mit einem Proteingehalt von 230 µg pro 10^6 Zellen. Die Differenz ist dadurch zu erklären, daß in dieser Arbeit keine Sertoli-Zell-Monokulturen sondern lediglich mit Sertoli-Zellen angereicherte Kulturen verwendet wurden und daß die Proteinmessung vor dem Anlegen der eigentlichen Kultur erfolgte. Wie in Kpt. 3.5 schon angedeutet, kommt es durch mehrfachen Mediumwechsel zu Zellverlusten, die am sinkenden Proteingehalt abzulesen sind.

Das gesamte Testsystem „Sertoli-Zelle“ zeigte sich insgesamt weniger stör anfällig als vor Versuchsbeginn angenommen. Im praktischen Umgang erwies es sich – was Handhabung, Zeitaufwand und Wirtschaftlichkeit angeht – den Anforderungen gewachsen. Es ist möglich, innerhalb von etwa 10 Tagen das gesamte Testsystem mit einer Testsubstanz durchzuführen. Dabei entfallen etwa 6 Tage auf die Präparation und das Anlegen der Zellkul-

tur, die verbleibenden 4 Tage auf die Durchführung der einzelnen Assays. Der Inhibin-Assay verursacht durch lange Inkubationszeiten den größten Zeitaufwand. Bei Verwendung des oben erwähnten neuen Testkits könnte der Zeitbedarf auf nur 8 Tage reduziert werden. Um statistisch sichere Ergebnisse zu erhalten, wurden diese Experimente aber noch mindestens zweimal wiederholt.

Abgesehen von den praktischen Belangen zeigt sich bei der Interpretation der Ergebnisse, daß sich die Auswahl und vor allem die Kombination der Testparameter vorteilhaft auf die Aussagekraft des Testsystems auswirkte. In vorausgegangenen Studien wurden meist morphologische Gesichtspunkte als Referenz für die Vitalität der Zellkulturen verwendet. Diese besitzen natürlich nur eine geringe Trennschärfe, so daß Korrelationen zu den gemessenen biochemischen Parametern nur bedingt möglich sind.

Die Verwendung des MTT-Assays bietet die Möglichkeit der Ermittlung von subtoxischen Konzentrationen der verwendeten Schadstoffe, bei denen wohl die Zellfunktion, nicht aber die Vitalität signifikant beeinflußt wird. Damit ist auch eine ungefähre Aussage darüber möglich, ob das nachgewiesene Laktat bzw. Inhibin aus stoffwechselaktiven lebenden oder aus avitalen lysierten Zellen stammt.

Insgesamt zeigen sich beim Vergleich mit In-vivo-Studien auch die Grenzen in der Verwendung von Monozellkulturen. Wie im dritten Kapitel ersichtlich, wurde dem Kulturmedium nur bis zum Tag vor Versuchsbeginn FSH hinzugefügt. Diese Stimulation sollte bei den eigentlichen Untersuchungen keine Rolle spielen, um nur den tatsächlichen Einfluß der Noxe zu messen. Die Relevanz der Ergebnisse wird aber durch diese unphysiologischen Verhältnisse eingeschränkt. In bezug auf hormonelle Interaktionen der Zellen, gerade bei Betrachtung der Inhibinproduktion, ist keine Aussage möglich. Eine Lösung wäre dabei das Anlegen von Co-Kulturen (z.B. Ser-

toli- und Leydig-Zellen), wie es mit Sertoli-Zellen auch schon durchgeführt worden ist (Foucault et al., 1994). In der Praxis können dafür primär Monozellkulturen angelegt werden, welche dann mit Hilfe eines Zwei- oder Mehrkammersystems zu einer Co-Kultur vereinigt werden. Getrennt werden diese Kammern durch eine Membran, die die Interaktion der Zellpopulationen ermöglicht. Hiermit konnte beispielsweise nachgewiesen werden, daß es in einer Cytochrom-P450-abhängigen Reaktion in Leydig-Zellen zu einer Potenzierung der toxischen Wirkung der für Sertoli-Zellen ohnehin schädlichen Substanz Tri-o-crescyl-Phosphat kommt (Chapin et al, 1990). Sertoli-Zellen selbst enthalten nur sehr wenig Cytochrom-P450.

Das Anlegen einer Sertoli-Keimzell-Co-Kultur ist dazu geeignet, morphologische Parameter wie z.B. die Loslösung der Keimzellen von den Sertoli-Zellen (sog. Detachment) zu untersuchen (Reader and Foster, 1990). Hierfür ist es notwendig, die entsprechenden Schritte zur Sertoli-Zell-Separation (hypotoner Schock) bei der Präparation wegzulassen (s. Kpt. 3.3.4). Der Nachteil einer solchen Kultur liegt sicher in der unvorhersehbaren Zusammensetzung der Zellpopulation auch in Abhängigkeit vom Alter des Tieres.

Die Verwendung von Co-Kulturen bietet somit die Möglichkeit, spezielle Fragestellungen zu untersuchen, bei denen die Interaktion von Zellpopulationen eine Rolle spielen. Dabei sollte allerdings beachtet werden, daß auch Co-Kulturen nur eine Annäherung an die physiologischen Bedingungen darstellen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Innerhalb der letzten 50 Jahre soll in den Industrienationen ein Rückgang der durchschnittlichen Spermienzahl bei Männern um etwa 50% zu beobachten sein (Carlsen et al., 1992). Trotz heftiger Kritik an dieser groß angelegten retrospektiven Studie (Übersicht in Nieschlag, 1998) kam es in der Folge zu einer breiten wissenschaftlichen Auseinandersetzung über die möglichen Ursachen. In der aktuellen Diskussion im Bereich der Reproduktionsbiologie werden gerade Umweltschadstoffe für den vermeintlichen Rückgang der Fertilität bei Männern verantwortlich gemacht. Die Wirkung dieser Schadstoffe auf die Reproduktionsorgane des Mannes steht im Mittelpunkt des Interesses. Zahlreiche Untersuchungen bei chronisch exponierten Männern zeigen eine Schädigung der Spermienproduktion (Seibert, 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, ein In-vitro-Testsystem zu entwickeln, das den Einfluß von Umweltnoxen auf die Funktion testikulärer Zellen überprüft. Basierend auf bereits vorhandenen Untersuchungen (Zhuang et al., 1983; Corrier, 1985; Chapin et al., 1988) und den oben angeführten Studien wurden hierfür Sertoli-Zell-Monokulturen verwendet, da die Integrität dieser Zellen essentiell für einen ungestörten Ablauf der Spermatogenese ist. Marker der Zellfunktion stellten unspezifische sowie spezifische biochemische Parameter der Zellen dar; die Produktion von Laktat als Nährstoff für die sich entwickelnden Spermatozyten und die Sekretion von Inhibin, das im endokrinen System zu einer Abnahme der FSH-Abgabe der Hypophyse führt.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Ermittlung subtoxischer Konzentrationen der verwendeten Substanzen, d.h. mit Einfluß auf die biochemischen Leistungen der Zellen ohne Beeinflussung der Vitalität. Dies läßt in begrenztem Umfang den Vergleich mit In-vivo-Studien zu, bei denen

Serum bzw. Gewebkonzentrationen der entsprechenden Stoffe (Gossypol bzw. Schwermetallsalze) gemessen wurden.

Gossypol wurde als Referenzsubstanz ausgewählt, da ausführliche Studien zur In-vivo- und In-vitro-Toxizität vorliegen, aus denen hervorgeht, daß die Sertoli-Zelle einen wesentlichen Angriffspunkt für die schädigende Wirkung auf zellulärer Ebene darstellt.

Zur Untersuchung der doch relativ selektiven Schädigung des männlichen Reproduktionssystems wurden zahlreiche Studien initiiert. Die Chance, die sich hier bot, war – möglicherweise exemplarisch für viele andere Stoffe – genaue Erkenntnisse über den zugrundeliegenden Schädigungsmechanismus einer Substanz zu erzielen, deren In-vivo-Wirkung beim Menschen zweifelsfrei belegt ist.

Ob der Schädigung durch Gossypol ein direkter zytotoxischer Effekt oder eine indirekte Einflußnahme via Hormonhaushalt zugrunde liegt, kann folgendermaßen beantwortet werden. Die weitaus größte Anzahl der Studien findet keinen Hinweis für eine Veränderung des Hormonstatus, weder bei In-vivo-Tests am Menschen (Coutinho et al., 1984; National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, 1980), noch beim Versuchstier in vivo (Weinbauer et al., 1983; Xue et al., 1980) oder in vitro (Zhuang et al., 1983). Eine einzelne Studie weist die signifikante Abnahme der Testosteronsynthese bei Ratten nach, die über eine Woche mit 1-10 mg/kg KG/d s.c. behandelt wurden. Die gleiche Studie zeigt an isolierten Leydig-Zellen die Reduktion der Steroidgenese durch die Blockierung des LH-Rezeptors durch Gossypol (Lin, 1981). Die Autoren sind sich dabei nicht sicher, wie der Unterschied der Ergebnisse im Vergleich zu den oben angeführten Studien zu erklären ist.

Eine eher unspezifische Wirkung des Gossypols liegt in der Reduktion des Gewichtes von Hoden und Nebenhoden nach längerer Anwendung bei Ratten (Srivastava, 1987). Die hervorgerufene Oligozoospermie wird be-

gleitet von einer erhöhten Anzahl an mißgebildeten Spermatozyten, so daß vermutet werden kann, daß auch eine Direktwirkung auf die Spermatogenese besteht (Kainz et al., 1988). Die histologische Untersuchung des Hodengewebes von mit Gossypol behandelten Tieren zeigt bei geringer Dosis und kurzer Applikationsdauer keine Auffälligkeiten (Weinbauer et al., 1982). Mit steigender Dosis kommt es dann zur Schädigung, die im Bereich des Tubulusepithels selektiv die Sertoli-Zellen betrifft. Leydig-Zellen sind weitaus weniger sensitiv, sowohl was deren zelluläre Struktur als auch ihre biochemischen Leistungen betrifft. Während der Testosteronspiegel nahezu unverändert bleibt, zeigt sich ein signifikanter Abfall der ABP-Sekretion der Sertoli-Zellen (Zhuang et al., 1983). Dieses Ergebnis wird, wie auch alle anderen biochemischen Wirkungen, der unspezifischen Eigenschaft des Gossypols zugeschrieben, kovalente Bindungen mit Proteinen einzugehen (Strom-Hansen, 1989). Daraus resultiert die Hauptwirkung des Gossypol auf zellulärer Ebene, die Inhibition verschiedener Enzyme.

Es zeigt sich dies an der Hemmung der Mg-ATPase, Ca-ATPase (Lee et al., 1982; Tso et al., 1982; Breitbart et al., 1984), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Whaley and Bishop, 1982; Tso et al., 1982), Pyruvat-Dehydrogenase (Adeyemo et al., 1982) und Laktat-Dehydrogenase-X (Lee and Malling, 1981; Eliasson and Virji, 1983).

LDH-X (LDH, EC 1.1.1.27), ein Isoenzym der Laktatdehydrogenase mit ausschließlichem Vorkommen in reifem Hodengewebe einiger Säugetierpezies (Blanco and Zinkham, 1963; Goldberg, 1963), ist spezifisch für Spermatozyten und Spermatiden und wird weder in Sertoli- noch in Leydig-Zellen gefunden (Blackshaw and Elkington, 1970; Sarkar et al., 1978). Gossypol besitzt eine Hemmwirkung auf dieses Enzym. Gossypol ist ein Racemat aus einem (+) und einem (-) optischen Isomer, wobei das Gemisch in der Lage ist, bei Ratten, Hamstern (Chang et al., 1980; Dai et al., 1978; Shi and Zhuang, 1980) und Mäusen (Coulson et al., 1980), nicht aber bei Kaninchen (Chang et al., 1980), Infertilität auszulösen. Der wirksame

Bestandteil dabei ist das (-)-Gossypol (Wang and Lei, 1979; Waller et al., 1983). (+)-Gossypol erwies sich als unwirksam.

Obwohl (+)-Gossypol nachweislich nicht für die In-vivo-Wirkungen des Racemates verantwortlich ist, hat es in vitro den gleichen Effekt auf die LDH-X-Aktivität wie sein Isomer. Es führt zur deutlichen Inhibition der Enzymaktivität (Kim et al., 1985). Dies und die dazu in Widerspruch stehende Aktivitätszunahme in vivo lassen den Schluß zu, daß die Keimzellen nicht der wesentliche Angriffspunkt für die Gossypol-Wirkung sind.

Beim vorliegenden Versuchsmodell trat eine Steigerung der Laktatproduktion ohne Abnahme der Vitalität schon bei 3 μM Gossypol auf (s. Diagramm 4.1 und 4.6), was in etwa der Plasmakonzentration entspricht, die bei Ratte und Mensch nach mehrmonatiger oraler Applikation auftritt. Hier wurde beim Menschen nach oraler Gabe von Gossypol in einer Dosis von 20 mg/d (etwa 0,28 mg/kg KG) über 3-4 Monate gefolgt von 50-60 mg/Woche (bei Ratten nach einer Dosis von 15 mg/kg KG) eine Serumkonzentration von 1,7-2 μM erreicht. Bei diesen Konzentrationen kam es bei 90% aller Patienten zu Azoospermie bzw. Oligozoospermie (Coutinho et al., 1984; Liu et al., 1987; Wang et al., 1988; Xie et al., 1990).

Einen entscheidenden Einfluß auf zellulärer Ebene scheint dabei die Beeinflussung der Mitochondrienfunktion der Sertoli-Zellen zu haben. Gossypol kann die oxidative Phosphorylierung im Zell-Homogenat des Hodens (Kim and Waller, 1984) entkoppeln und somit zu einer Störung der Funktion der Atmungskette führen (Abou-Donia and Dieckert, 1974). Die Hemmung der Atmungskette durch Gossypol, die nicht automatisch mit der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung gleichzusetzen ist, scheint relativ spezifisch im Mitochondrienhomogenat des Hodens abzulaufen, ohne daß sich eine ähnliche Wirkung in Mitochondrien der Leber darstellen läßt (Kim and Waller, 1984). Möglicherweise ist dieser unabhängige Prozeß durch eine Störung des Elektronentransportes an der Mitochondrienmembran verur-

sacht (Hansen and Jaroszewski, 1996). Der durch die Blockierung der Atmungskette erreichte Abfall des zytoplasmatischen ATP-Spiegels kann die Glykolyse und die Aktivität der Laktatdehydrogenase stimulieren und so die Laktatproduktion der Zellen steigern. Damit einher geht ein Effektivitätsverlust der ATP-Synthese mit Abnahme des Quotienten aus gewonnener ATP-Menge pro Glucosemolekül. Dies wird deutlich anhand der Untersuchung des Glukose-Metabolismus und ATP-Gehaltes in TM4 Sertoli- und TM3 Leydig-Zellen.

Gossypol führt hier zu einer Abnahme des intrazellulären ATP-Spiegels (Hansen und Jaroszewski, 1996). Die nachgewiesene Steigerung der LDH-Aktivität durch Gossypol-Applikation *in vivo* läßt einen ähnlichen Schluß zu (Olgiati et al., 1984; Srivastava et al., 1988). Die Steigerung der LDH-Aktivität läßt sich jedoch *in vitro* am Beispiel des LDH-X nicht bestätigen. Auch hier scheint der Mechanismus also abhängig von der untersuchten Zellpopulation zu sein (s.o.).

In bezug auf die Sertoli-Zellen zeigen neueste Studien eine Beeinflussung der Ausbildung der gap-junctions unter Gossypoleinfluß, wodurch es möglicherweise zu weitreichenden Veränderungen der Zell-zu-Zell-Kommunikation kommt (Herve et al., 1996). Unabhängig davon gelangt Gossypol erst im Bereich des Nebenhodens in serumäquivalenten Konzentrationen in das Tubulussystem (Wang et al., 1988).

Der Schluß liegt also nahe, daß sich die Hauptwirkung nicht an Spermatischen, sondern an den Sertoli-Zellen selbst vollzieht, zumal man an diesen schon vor Auftreten von Schäden an anderen Zellen morphologische Veränderungen beobachten konnte (Zhuang et al., 1983).

Wie schon erwähnt scheint die Beeinflussung des Glucose-Metabolismus dabei eine große Rolle zu spielen. Die Aufnahme von Glukose in die Sertoli-Zelle ist direkt proportional zu dessen Konzentration in der Umgebung, wobei für den Transport durch die Zellmembran vermutlich aktive Carrier-

systeme verantwortlich sind (Reyes et al., 1986). Die Produktion von Laktat mittels Glykolyse führt zur Freisetzung von Protonen, die wiederum mit Hilfe aktiver Vorgänge aus der Zelle transportiert werden müssen. Dieser Prozeß benötigt Energie und führt zum Absinken des extrazellulären pH-Wertes. Somit ist er möglicherweise verantwortlich für den Rückgang der Spermatogenese unter Gossypoleinfluß (Reyes et al., 1986). Das Ansprechen der Sertoli-Zellen auf Gossypol ist in dieser Studie weitaus geringer ausgeprägt als in der vorgelegten Arbeit. Es kommt dort zu einer dosisabhängigen Stimulation der Laktatproduktion, die bis zur untersuchten Maximalkonzentration von 40 μM etwa linear verläuft. Die Steigerung beträgt maximal etwa 150%, während wir bei der weitaus geringeren Konzentration von 3 μM Steigerungsraten auf das 10fache nachweisen konnten (s. Diagramm 4.6). Erklärt werden könnte dieser Unterschied zum einen durch die Verwendung von transformierten Zellen (TM4 Zellen) gegenüber primären Sertoli-Zellen (s. Kpt. 3.3) in der vorliegenden Arbeit und zum anderen durch die geringere Inkubationszeit von nur zwei Stunden. Nach dieser Zeit ist der Energiehaushalt der Zelle möglicherweise noch intakt, während sich nach 24 Stunden die zytotoxische Wirkung des Gossypol bemerkbar macht. Die Ausführungen haben gezeigt, daß die Sertoli-Zelle in Hinblick auf ihren Energiemetabolismus eine äußerst aktive Zellart darstellt. Die weitreichende Beeinflussung dieses Metabolismus ist wahrscheinlich der entscheidende Mechanismus bei der Schädigung der Sertoli-Zellen durch Gossypol. Warum die Schädigung jedoch spezifisch bei diesen Zellen auftritt, bleibt unklar.

Es ist auffallend, daß eine Steigerung der Laktatproduktion durch eine Vielzahl verschiedener, auch physiologischerweise zirkulierender Stoffe ausgelöst werden kann (s. Kpt. 1). Dabei ist sehr unwahrscheinlich, daß all diese Stoffe in gleicher Weise wie Gossypol wirksam werden. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, daß die Steigerung der Laktatproduktion eine

mehr oder weniger unspezifische Reaktion der hochdifferenzierten Zelle auf eine Stresssituation darstellt. Anders ausgedrückt: Die unterschiedlichen Angriffspunkte der Stoffe auf zellulärer Ebene münden alle in einer gemeinsamen Endstrecke, der Steigerung der Sekretion von Laktat. Dafür spricht, daß die Größe der Laktatproduktion ein wesentlicher Marker für die Differenzierung der Sertoli-Zelle zu sein scheint. Bei der Untersuchung der basalen Laktatproduktion zeigte sich bei 42 Tage alten Ratten im Vergleich zu 18 Tage alten Ratten ein 4facher Anstieg (Jutte et al., 1983). Parallel dazu kommt es zu einer Abnahme der Hormonsensitivität (FSH) mit zunehmendem Alter der Versuchstiere (Anthony et al., 1991). Die Steigerung ihrer spezifischen Leistung, der Laktatproduktion für die davon abhängigen Keimzellen, darf also nicht gleichgesetzt werden mit dem sogenannten oxidativen „burn-out“ wie er z.B. bei Myozyten unter Hypoxie auftritt, und der ebenfalls mit der Anhäufung von Laktat und damit von Protonen einhergeht (Pfeifer und Gulotta, 1992). Mit zunehmender Dauer der Stimulation kommt es auch bei der Sertoli-Zelle zur Erschöpfung der Energiereserven mit Versagen der Na^+ - K^+ -ATPase und Anstieg des intrazellulären Natriumgehaltes (Hansen und Jaroszewski, 1996). Damit werden alle zellulären Abläufe eingeleitet, die eine irreversible Schädigung nach sich ziehen. Dies zeigt sich hier im MTT-Assay ab Gossypolkonzentrationen von 6 μM (s. Diagramm 4.1).

Die untersuchten Metallionen Kobalt und Platin weisen einen vergleichbaren Effekt in bezug auf die Laktatsekretion auf, wenn dieser auch weit weniger ausgeprägt ist. Die Stimulation der Laktatproduktion erreicht dabei allerdings kein Maximum, sondern zeigt bei diesen Substanzen einen kontinuierlichen Anstieg bis zu 100 μM (s. Diagramm 4.9 und 4.10).

Zur Konzentration von Kobalt in Hodengewebe und Serum der damit behandelten Tieren liegen keine Daten vor. Für die in vivo beobachteten Veränderungen durch Kobalt – Rückgang der Spermatogenese und testikuläre

Atrophie – wurden anfangs Durchblutungsstörungen des Hodengewebes durch Verursachung einer Polyzytämie und eine damit verbundene mikrovaskuläre Schädigung (Thrombosierung) verantwortlich gemacht (Mollenhauer et al., 1985). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen jedoch nahe, daß es zusätzlich einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Sertoli-Zellen gibt. Dies wird bestätigt durch die histopathologischen Veränderungen im Hodengewebe, die sich nach oraler Kobaltgabe bei Mäusen zeigen. Es kommt zu Vakuolisierung der Sertoli-Zellen sowie zu Veränderungen in peritubulären Zellen und Endothelzellen. Die Sertoli-Zellen erwiesen sich hier zwar resistenter als andere Populationen, der schädigende Einfluß auf sie durch Kobalt ist jedoch evident (Andersson et al., 1992). Auch bei Ratten wurden morphologische Veränderungen an Sertoli-Zellen nach oraler Kobaltzufuhr gesehen (Corrier, 1985). Die dosisabhängige Steigerung der Laktatproduktion in der hier vorgelegten Arbeit (s. Diagramm 4.9) bestätigt diese Beobachtungen.

Ein negativer Einfluß auf Leydig-Zellen durch Kobaltchlorid konnte ebenfalls gezeigt werden. Isolierte Zellen wurden mit verschiedenen Schwermetallen in einer Konzentration bis zu 100 µM inkubiert. Parallel zu einem Absinken der Zellvitalität wurde ein Rückgang der LH-induzierten Testosteronproduktion durch Kobalt beobachtet. Nickel hatte dagegen keinen Einfluß auf diese Parameter (Ng and Liu, 1990). Eine In-vivo-Studie zeigte dagegen einen drastischen Anstieg des Testosteronspiegels bei erwachsenen Ratten nach oraler Gabe von Kobalt ohne Veränderung des FSH- oder LH-Spiegels. Diese Beobachtung spricht für eine Beeinflussung der lokalen Regulation der Testosteronsynthese (Pedigo, 1988).

Die biochemische Bedeutung von Kobalt liegt in der Bildung des mit verschiedenen Apoenzymen gekoppelten Coenzym „Adenosyl-Cobalamin“. Adenosyl-Cobalamin ist beteiligt an Umlagerungsreaktionen, bei denen Wasserstoff und organische Gruppen (Transmethylierung) ihren Platz wechseln (Karlson, 1988; Kpt. 5). Ob die exogene Zufuhr von Kobalt je-

doch Veränderungen dieser Reaktionen bzw. der Bildung des Coenzym mit sich bringt und auf diesem Wege den Stoffwechsel der Sertoli-Zelle beeinflussen kann, ist spekulativ.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die von Kobalt ausgelösten Effekte bietet die Eigenschaft des Metalls, membranständige Kalzium-Kanäle zu blockieren. Bei einer In-vitro-Untersuchung an Leydig-Zellen zeigte sich, daß Kobalt eine Reduktion der LH-stimulierten und cAMP-vermittelten Testosteronsynthese über Blockade der Kalzium-Kanäle verursacht. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß ein Abfall des extrazellulären Kalziumspiegels im Hodeninterstitium ebenfalls zu einem Rückgang der Testosteronproduktion führt (Moger, 1984). Kalzium-Kanäle sind in Zellmembranen nahezu aller somatischen Zellen lokalisiert u.a. auch Sertoli-Zellen (Lalevee et al., 1997) und in der Mitochondrienmembran. Kalzium spielt eine wichtige Rolle als Vermittler der Hormonwirkung in Second-Messenger-Systemen.

Beim IP_3 -System kommt es durch die Vermittlung von Inositoltriphosphat, einem weiteren „second messenger“, zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (Karlson, 1988; Kpt. 18). Wie oben angedeutet ist das cAMP-System von besonderer Bedeutung für die Beeinflussung des Kalziumtransportes durch Kobalt. Über die Vermittlung von cAMP kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A, die zur Phosphorylierung des Kalziumkanals und damit zu vermehrtem Einstrom von Kalzium in die Zelle führt. Dies setzt wiederum verschiedene Zellreaktionen in Gang, so z.B. die Steigerung der Steroidsynthese in der Leydig-Zelle (s.o.). Hohe Kalziumspiegel wiederum führen zu einer Aktivierung der Phosphodiesterase, die das entstandene cAMP abbaut.

Eine Untersuchung des Kalziumflusses an den Zellmembranen von isolierten Sertoli-Zellen zeigt auch hier das Vorhandensein von Kalziumkanälen, die sich sowohl durch Kobalt- als auch durch Nickelionen hemmen lassen. Diese Kanäle scheinen allerdings nicht direkt unter dem Einfluß von FSH

zu stehen (Lalevee et al., 1997). Der initial beobachtete Anstieg der Inhibinproduktion durch Kobaltchlorid (s. Diagramm 4.13) ist damit nicht über eine Beeinflussung der FSH-Wirkung auf die Sertoli-Zelle zu erklären, die im Sinne einer Inhibition eher zu einer Abnahme der Inhibin-Sekretion hätte führen müssen.

Die Vielschichtigkeit der Aufgaben des Kalziums bei der intrazellulären Signalübertragung läßt annehmen, daß die Blockade der Kalzium-Kanäle durch Kobaltchlorid dennoch gerade bei hormonsensitiven Zellen wie den Sertoli-Zellen Auswirkungen haben könnte. Eine Direktwirkung von Kobalt konnte allerdings auch auf humane Spermatozoen nachgewiesen werden. Kobalt bindet an die Sulfhydryl-Gruppen der Zellmembranen von Spermatozoen und führt damit zur Inhibition verschiedener Enzyme (Nivsarkar, 1998).

Für Platinverbindungen, insbesondere für cis-Platin, wurde die In-vivo- und In-vitro-Wirksamkeit mit spezieller Schädigung der Sertoli-Zellen schon belegt. Nach vierwöchiger cis-Platin-Gabe an Ratten kommt es zum Rückgang der Spermienzahl und zu histopathologischen Veränderungen in Form von Vakuolisierung von Spermatozyten, Spermatisden und Sertoli-Zellen (Mizoguchi et al., 1995). Weiterhin kommt es zum Abfall des Testosteronspiegels im Serum, wahrscheinlich bedingt durch eine Verringerung der Anzahl testikulärer LH-Rezeptoren, die vornehmlich an Leydig-Zellen lokalisiert sind. LH- und FSH-Spiegel bleiben allerdings unverändert (Maines et al., 1990). Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Tubulusepithels zeigt vor allem Schäden an den Sertoli-Zellen mit Auflösung der tight junctions. Der ebenfalls verzeichnete Anstieg des Natrium- und Abfall des Kaliumgehaltes der Tubulusflüssigkeit unter Einfluß von cis-Platin wird von den Autoren als Hinweis für die gestörte biochemische Leistung der Sertoli-Zellen angesehen (Pogach et al., 1989). Außerdem beobachtet wird eine strukturelle Störung der Sertoli-Zelle mit Desintegration des Zyto-

plasmas und Pyknosis. Damit kommt es zur Zerstörung der Blut-Hoden-Schranke und zur Beeinflussung von Spermatogenese und Spermiohistogenese durch cis-Platin (Kopf-Maier, 1992). Dies wird bestätigt durch den nachgewiesenen Anstieg der FSH-Ausschüttung bei entsprechend lange und hochdosiert behandelten Tieren (Fuse et al., 1996). Eine einzelne In-vitro-Studie mit Hexachloroplatinsäure an humanen Spermatozoen zeigt eine Induktion der Akrosomenreaktion noch vor Auftreten zytotoxischer Effekte (Köhn et al., 1995), so daß es Anhaltspunkte für eine reproduktionsbiologische Bedeutung dieser Substanz gibt. Die Feststellung, daß Platin toxikologisch unbedenklich sei (Holleman, 1995; Kpt. XXXI) kann daher nicht auf die hier verwendete Hexachloroplatinsäure übertragen werden. In-vitro-Studien an Sertoli-Zellkulturen mit Hexachloroplatinsäure liegen bisher nicht vor. Ebenso gibt es keine Daten über Serumspiegel oder Gewebkonzentrationen dieser Substanz.

Die fehlende Abnahme der Zellvitalität bei gleichzeitigem Anstieg der Laktatproduktion sowohl bei Kobalt als auch bei Platin lassen den Schluß zu, daß die hier verwendeten Konzentrationen noch nicht ausreichen, um einen unspezifischen zytotoxischen Effekt zu erzielen, wohl aber, um mit biochemischen Prozessen der Zelle zu interagieren (s. Diagramm 4.4 und 4.5). Inwieweit dafür ein ähnlicher Mechanismus verantwortlich ist, wie er für Gossypol postuliert wird, ist unklar, zumal beide Substanzen zu einer Steigerung der mitochondrialen Aktivität führen, während es bei Gossypol zu einer Abnahme derselben gekommen war. Aufschlußreich ist in diesem Zusammenhang eine Studie, bei der die Wirkung verschiedener Substanzen auf ein LDH-Isoenzym aus dem Hoden getestet wurde. Unter anderem wurden hier auch Platinverbindungen und Gossypol untersucht. Es zeigte sich, daß Platin die Hinreaktion (Pyruvat-Laktat) hemmte, während Gossypol sowohl Hin- als auch Rückreaktion negativ beeinflusste (Javed and Waqar, 1996). Dies ist zwar für die Wirkung von Gossypol nicht der ent-

scheidende Faktor, gibt aber einen Hinweis auf ähnliche Mechanismen der Wirkungsweise von Gossypol und Platin. Eine Erklärung für den beobachteten Anstieg der Laktatproduktion (s. Diagramm 4.10) bietet dies nicht, es ist jedoch ein Beleg für die mögliche Interaktion mit dem Glucosestoffwechsel.

Der Rückgang der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im MTT-Assay durch Gossypol wird bestätigt durch die Arbeiten von Kim and Waller (1984), die eine selektive Aktivitätsminderung von Enzymen der Atmungskette *in vivo* zeigen. Die Mitochondrien werden, wie schon dargestellt, als subzelluläres Ziel der Gossypolwirkung angesehen. Die Steigerung der Aktivität der Dehydrogenasen durch Kobalt und Platin wirft die Frage auf, ob diese Substanzen möglicherweise auch durch eine Beeinflussung der Mitochondrienfunktion ihre Wirkung entfalten, oder ob ein eher unspezifischer Effekt im Sinne einer generellen Stimulation der Zellfunktion vorliegt.

Der komplexe Sachverhalt ist mit Hilfe der vorhandenen Daten nicht zu entscheiden. Zu diesem Zweck wäre es nötig, weitere Parameter der Zellfunktion unter Einfluß dieser Metalle zu untersuchen.

Der negative Einfluß von Blei auf die Spermatogenese ist unstrittig (Alexander et al., 1996; Lancranjan et al., 1975). Der Mechanismus der Schädigung bleibt jedoch nach wie vor unklar. Histologische Untersuchungen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Affen führt die orale Zufuhr von Bleiazetat in einer Dosis von 1500 µg/kgKG/d für 400 Tage zu deutlichen morphologischen Veränderungen der Sertoli-Zellen mit vermehrtem Auftreten von Lipideinschlüssen, lysosomalen Elementen und Störung der Struktur der Basalmembran (Singh et al., 1993). Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Murthy et al. (1991) bei Ratten nach Gabe von Bleiazetat mit dem Trinkwasser in einer Dosis von 250 ppm/d für 70 Tage.

Ebenfalls bei Ratten (60 µg/d Bleiazetat für 18 Monate p.o.) zeigen sich strukturelle Veränderungen der Sertoli-Zellen, ohne daß weitere Zellpopulationen, z.B. Leydig-Zellen, betroffen sind (Boscolo et al., 1988). Eine ähnliche Studie mit neunmonatiger oraler Gabe von Bleiazetat in 1%iger wässriger Lösung führt dagegen weder zu elektronenmikroskopisch nachweisbaren ultrastrukturellen Veränderungen des Tubulusepithels, noch zur Schädigung von Sertoli- oder Leydig-Zellen (Wenda-Rozewicka et al., 1996).

Zur In-vitro-Toxizität liegen bisher nur wenige Daten vor. Wiebe et al. (1983) weisen die Reduktion der FSH-Rezeptor-Bindung und den damit verbundenen Abfall von cAMP sowie den Rückgang des Steroidmetabolismus (Konversion von Progesteron zu Steroid-Metaboliten) bei Sertoli-Zellen in vitro nach Bleiinkubation nach.

Es liegen mehrere Studien vor, in denen auf die Konzentration von Blei in Serum und Sperma und die möglicherweise dosisabhängigen Effekte auf das männliche Reproduktionssystem eingegangen wird. Bei Arbeitern einer Bleischmelze zeigten sich beispielsweise signifikante Auswirkungen ab einem Bleispiegel von 40 µg/dl im Serum (Alexander et al., 1996). Dies entspricht etwa 1 µM.

Die Inkubation mit Bleiazetat führte in keiner der bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen (5-100 µM) zu einer signifikanten Änderung der Laktatproduktion (s. Diagramm 4.7). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Bartaseh et al. (1986), die ebenfalls in vitro eine dosisabhängige Zunahme der Laktatproduktion ab 50 µM Bleiazetat nachweisen konnten. In dieser Studie wird außerdem kein Einfluß auf die Zellvitalität gefunden, während in der vorliegenden Arbeit ein Rückgang um bis zu etwa 60% (100 µM) nachgewiesen werden kann (s. Diagramm 4.2). Verantwortlich für die Diskrepanz der Ergebnisse könnten methodische Unterschiede sein. Zum einen wurde die Vitalitätsbestimmung mit der Trypan-Blau-Färbung durchgeführt, zum anderen betrug die Inkubationszeit

maximal 12 Std., so daß später auftretende Effekte nicht berücksichtigt werden konnten. Die Autoren geben in der Diskussion ihrer Arbeit an, daß Inkubation für 24 Std. durchaus zu einer Abnahme der Vitalität geführt hätte. Das spricht dafür, daß der wesentliche Einfluß auf die Vitalität erst nach Inkubationszeiten >12 Std. zum tragen kommt. Die Kontamination mit Keimzellen könnte ein weiterer Faktor für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Eine hypotone Behandlung der Zellen wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Es ist jedoch bekannt, daß die Sertoli-Zellfunktion durch die Anwesenheit von Keimzellen in der Zellkultur moduliert wird. Unter anderem wird die Inhibinsekretion dadurch um etwa 40% gesteigert (Carreau et al., 1996).

Der fehlende Einfluß auf die Laktatproduktion und der mit der Vitalitätsabnahme verbundene Rückgang der Inhibinsekretion nach Inkubation mit Bleiazetat führt zu keiner weiteren Klärung der Frage nach dem Schädigungsmechanismus durch Blei. Möglicherweise kann die Konstanz der Laktatwerte bei abnehmender Vitalität der Zellen als relative Steigerung der Produktion angesehen werden. Zur weiteren Klärung wäre es sinnvoll, die Laktatproduktion und die Vitalität in verschiedenen Zeitintervallen zu überprüfen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der angeführten Studien und der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Resultate ist es also nach wie vor unklar, ob die Sertoli-Zelle die Zielzelle für den schädigenden Einfluß von Blei auf die Spermatogenese ist.

Mikrovaskuläre Veränderungen, wie sie für die neurogenen Schäden nach chronischer Bleiexposition verantwortlich gemacht werden, sind bisher an den männlichen Reproduktionsorganen nicht untersucht worden.

Die Inhibinproduktion als spezifischer Parameter für die Sertoli-Zelle reagiert unterschiedlich auf die eingesetzten Noxen. Die Abnahme der Sekretion unter Gossypoleinfluß korreliert, ähnlich wie schon bei Bleiazetat

erwähnt, mit der parallel dazu verzeichneten Reduktion der Zellvitalität. Bei einer Konzentration von 3 μM (bei der kein Einfluß auf die Vitalität der Zellen zu sehen ist) zeigt sich tendenziell eine Abnahme der Inhibinproduktion ohne statistische Relevanz (s. Diagramm 4.11). Eine Aussage über die selektive Wirkung auf die Inhibinproduktion ist daher nicht möglich. Die einzig vorliegende Arbeit zu diesem Thema kommt zu einem ähnlichen Ergebnis. Das dort verwendete Cadmiumchlorid führt *in vitro* bei Sertoli-Zell-Kulturen dosisabhängig zu einer Abnahme der Inhibinsekretion parallel zum Vitalitätsverlust (Janecki et al., 1992), ebenfalls bestimmt mit dem MTT-Assay. Über einen mit dem Inhibinabfall verbundenen Anstieg der hypophysären FSH-Sekretion unter Gossypol-Einfluß kann nur spekuliert werden, da *In-vivo*-Studien abhängig von der jeweiligen Versuchsanordnung zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Die orale Gabe von 15 mg/kg KG über 16 Wochen führt zu signifikanter Zunahme des FSH-Spiegels bei Ratten (Kainz et al., 1988). Baba (1988) beobachtet dagegen bei einer Dosis von 20 mg/kg KG über zwei Wochen einen erniedrigten FSH-Spiegel. Unverändert zeigt sich die FSH-Produktion nach 10-20wöchiger Gabe einer Dosis von 2,5-30 mg/kg/d (Weinbauer et al., 1983). Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse liegen für Bleiazetat vor. Assenato et al (1987) berichten über unveränderte Spiegel an FSH, Testosteron, LH und Prolaktin bei einer Gruppe von 18 Arbeitern einer Batteriefabrik in Italien mit signifikant erniedrigten Spermienzahlen (45 versus 73×10^6 per ml in der Kontrollgruppe). Auch Alexander et al. (1996) sehen keine Korrelation zwischen bleiinduziertem Fertilitätsrückgang und Veränderungen der Sexualhormone.

Die Annahme, eine Störung der hypophysär-gonadalen Achse sei verantwortlich für die durch Blei hervorgerufenen Effekte wird dagegen unterstützt durch den Nachweis des Anstiegs der mRNA für GnRH und LH unter steigenden Bleiserumkonzentration bei Ratten (Klein et al, 1994). Thoreux-Manlay et al. (1995) detektierten einen Rückgang der Testosteronprodukti-

on um etwa 80% und einen Abfall der LH-Freisetzung um 32% nach oraler Gabe von Blei in einer Dosis von 8 mg/kg/d für 35 Tage. Sie postulieren eine Störung der Leydig-Zellfunktion als verantwortlich für die Schädigung durch Blei.

Nathan et al. (1992) konnten in einer In-vivo-Studie (Bleiazetat, 1%ige Lsg., 10 Wochen, erwachsene Tiere) keine Veränderung der Sertoli-Zell-Marker-Proteine ABP (Androgen-Binding-Protein) und Inhibin in der Tubulusflüssigkeit und der interstitiellen Flüssigkeit feststellen. Die Autoren selbst führen ihre Ergebnisse auf die unterschiedliche Sensibilität der Sertoli-Zellen auf Blei bei Erwachsenen und Jungtieren zurück.

Ein Schlüssel zum Verständnis dieser widersprüchlichen Ergebnisse könnte die Annahme unterschiedlicher Wirkungsmechanismen in Abhängigkeit von Dosis und vor allem Expositionsdauer bei den einzelnen Individuen und Gattungen sein. Es ist kaum anzunehmen, daß beruflich exponierte Menschen Blei in einer Größenordnung inkorporieren, wie dies im Tierversuch der Fall ist. Versuche, bei denen dieser Sachverhalt ausreichend berücksichtigt werden kann, sind jedoch zeit- und kostenintensiv.

Die Schwermetallsalze Hexachloroplatinsäure und Kobaltchlorid zeigen einen zweiphasigen Einfluß auf die Inhibinsekretion der Zellen ohne nachweisbaren Vitalitätsverlust im MTT-Assay. Nach Anstieg im niedrigen Konzentrationsbereich (Hexachloroplatinsäure, 5 µM; Kobaltchlorid, 5-25 µM) kommt es bei höherer Dosierung zu einem Abfall der Inhibinproduktion (s. Diagramm 4.13 und 4.14). Bei Kobalt werden bei 50 und 100 µM basale Werte erreicht, während bei Hexachloroplatinsäure schon bei 10 µM die Werte der Kontrollgruppe erreicht werden und bei 25 bis 100 µM signifikant niedrigere Werte zu verzeichnen sind.

Damit wird zum ersten Mal eine Steigerung der Inhibinproduktion durch ein schädigendes Agens in vitro an Sertoli-Zellen nachgewiesen. Bei der In-vitro-Testung der bekannten testikulären Noxen meta-Dinitrobenzol

(mDNB) und Nitrobenzol (NB) zeigte sich eine nur geringe oder gar keine Beeinflussung der Inhibinsekretion, wobei die Ergebnisse stark von den In-vivo-Ergebnissen abwichen (Allenby et al., 1989; Allenby et al., 1991; Maddocks et al., 1992). Nicht zuletzt deshalb ist die Relevanz der Steigerung der Inhibinproduktion durch Kobalt und Platin für das In-vivo-System fraglich. Eine Schädigung des Reproduktionsapparates durch Suppression der FSH-Sekretion und damit verbundener Abnahme der Sertoli-Zellaktivität erscheint jedoch möglich. Die wenigen vorliegenden Daten über den Einfluß dieser Salze auf die Sertoli-Zellfunktion erlauben es an dieser Stelle nicht, ein abschließendes Urteil abzugeben. Der für Platinverbindungen (insbesondere cis-Platin) sicher nachgewiesene reproduktionstoxische Effekt aber ist damit möglicherweise auf seine Beeinflussung der Sertoli-Zelle zurückzuführen. Ob Kobalt in gleicher Weise wirksam wird oder, wie oben angedeutet, über die Blockade von Kalziumkanälen Einfluß nimmt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Die Reduktion der Testosteronsynthese der Leydig-Zellen über diesen Mechanismus scheint allerdings gesichert (Moger, 1983), so daß eine indirekte Beeinflussung der Sertoli-Zellen wahrscheinlich ist. Kobalt ist außerdem in der Lage, selektiv das im Hoden vorkommende Isoenzym des Angiotensin-Converting-Enzyms zu hemmen (Velletri et al., 1985). Die Rolle von Kobalt als Enzyminhibitor und die biochemische Grundlage, auf welcher sich diese Wirkung vollzieht, ist noch nicht abschließend untersucht.

Nickelazetat hatte trotz seiner großen toxischen Potenz auf andere Organsysteme (s. Kpt. 1.1.2) kaum einen nennenswerten Einfluß auf die hier untersuchten Parameter. Lediglich bei hohen Konzentrationen zeigte sich eine geringe Steigerung der Laktatproduktion. Nickelazetat blieb ohne Einfluß auf Vitalität oder Inhibinproduktion der Zellen (s. Diagramm 4.3 und 4.15). Neueste Untersuchungen zeigen allerdings durchaus eine reproduktionstoxikologische Bedeutung von Nickel. Bei Ratten führte die orale Zufuhr von

Nickelsulfat in 10 Dosen zu 2 mg pro g Körpergewicht zu einer Abnahme des Hodengewichtes und der Aktivität der LDH im Hodengewebe. Es kam außerdem zur Kumulation von Glykogen und Cholesterin, was eine Beeinflussung des Metabolismus der Zellen wahrscheinlich macht (Das and Dasgupta, 1997). Nach Gabe von Nickelsulfat kommt es außerdem zu einem Rückgang der Spermienmotilität und der Spermienzahl. Die Akkumulation von Nickel im Testis und histopathologische Veränderungen des Hodengewebes konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Pandey et al., 1999). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine andere Arbeit, bei der Nickelchlorid p.o. bei Ratten zur Abnahme der Fertilität, zur Atrophie der Hodentubuli und zum Rückgang der Zahl der basalen Spermatogonien führte (Kakela et al., 1999). Auf diesem Hintergrund und in Anbetracht der oben schon erwähnten Studie, in der eine Blockade von Kalzium-Kanälen an der Sertoli-Zelle auch durch Nickel (Lalevee et al., 1997) nachgewiesen wurde, kann die Steigerung der Laktatproduktion bei hohen Nickelkonzentrationen (s. Diagramm 4.8) als erster Hinweis für eine Beeinflussung der Sertoli-Zelle gelten.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist es gerade in den entwickelten Industrienationen zu einem Anstieg der Zahl infertiler Paare gekommen. Der Grund dafür ist in etwa 40% der Fälle bei den Männern zu suchen. Die Ursachen für Infertilität allerdings sind vielfältig. Umweltschadstoffe die vor allem bei der industriellen Fertigung, durch Verbrennungsmotoren, in der Landwirtschaft etc. entstehen bzw. freigesetzt werden, scheinen dabei eine besondere Rolle zu spielen. Zur Gruppe der Umweltschadstoffe, die schon lange bekannt sind, zählen die Schwermetalle.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung eines Testmodells, das die Auswirkungen von Schwermetallsalzen und der Substanz Gossypol auf die biochemischen Leistungen und die Vitalität von Sertoli-Zellen untersucht. Die Integrität dieser Zellen stellt eine wesentliche Voraussetzung für den ungestörten Ablauf der Spermatogenese dar.

Die Versuche wurden an Sertoli-Zellmonokulturen durchgeführt, die vorher aus dem Hoden 18 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten isoliert worden waren. Die Substanzen wurden dazu in fünf Konzentrationen (Metallionen 5-100 μM ; Gossypol 3-15 μM) in Medium gelöst und die Zellen dann für 24 Stunden damit inkubiert. Danach wurde der Proteingehalt mit der Methode nach Lowry und die Vitalität der Zellen mit dem MTT-Assay untersucht. Desweiteren wurde die Laktatproduktion als metabolischer und die Inhibinproduktion als endokriner Parameter bestimmt. Dazu wurde zum einen ein gekoppelter Enzym-Assay, zum anderen ein RIA verwendet.

Gossypol, ein Bestandteil des Baumwollsamens, diente dabei als Positivkontrolle, da seine reproduktionstoxische Wirksamkeit insbesondere in Hinblick auf die Sertoli-Zelle schon lange bekannt und in vielen Studien nachgewiesen ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen stellen sich folgendermaßen dar:

Gossypol führte in hohen Konzentrationen zu einem deutlichen Rückgang der Zellvitalität um maximal 70%. Bei den Schwermetallsalzen konnte nur Bleiazetat die Vitalität (maximal um etwa 50%) negativ beeinflussen, während Hexachloroplatinsäure und Kobaltchlorid sogar zu einer Steigerung der im MTT-Assay gemessenen Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen führten. Nickelazetat beeinflusste die Vitalität nicht.

Bis auf Bleiazetat waren alle Stoffe in der Lage, die Laktatproduktion der Zellen zu steigern. Gossypol hatte dabei mit einer Steigerung auf das maximal 15fache den stärksten Einfluß. Der Anstieg der Laktatproduktion, der durch Metalle erreicht wurde, war etwa um den Faktor 10 geringer. Er lag zwischen dem 1,5- und 2,5fachen der Kontrolle. Die Inhibinproduktion ging unter dem Einfluß von Gossypol und Bleiazetat parallel zum beobachteten Vitalitätsabfall zurück. Bei Hexachloroplatinsäure und Kobaltchlorid zeigt sich ein zweigipfliger Verlauf. Nach einer initialen Steigerung kommt es bei höheren Konzentrationen wieder zum Rückgang der Inhibinproduktion. Damit wurde zum ersten Mal die Steigerung der Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen unter Einfluß eines schädigenden Agens *in vitro* detektiert. Die Untersuchungsergebnisse für die Referenzsubstanz Gossypol entsprechen weitestgehend dem Forschungsstand, der in der Literatur beschrieben ist.

Die Interpretation der Daten vor allem in Hinblick auf den zellulären Angriffspunkt der unterschiedlichen Substanzen ist schwierig. Von Gossypol ist bekannt, daß ein wesentlicher Wirkmechanismus die Hemmung der Atmungskette darstellt und daß die exorbitante Steigerung der Laktatproduktion im wesentlichen darauf zurückzuführen ist. Ob dies auch bei den Metallen der Fall ist, oder ob sie über andere Mechanismen wie z.B. die Blockade von membranständigen Kalzium-Kanälen ihre Wirkung entfalten, kann nicht abschließend geklärt werden.

Festzuhalten bleibt, daß die Laktat- und Inhibinbestimmung in Zusammenhang mit den Vitalitätswerten eine valide Aussage über die toxische Potenz

einer Substanz in bezug auf die Sertoli-Zelle zulässt. Die Inhibinsekretion scheint dabei der noch sensitivere Parameter zu sein.

Durch die ergänzende Messung weiterer Parameter und die zusätzliche Verwendung des aktuellen Inhibin-ELISA (s. Kpt. 1.2.2) steht damit ein effizientes Testmodell zur Verfügung. Die Etablierung des Testsystems konnte also erfolgreich durchgeführt werden. Praxistauglichkeit und Zeitaufwand hielten sich dabei im Rahmen der anfänglichen Zielformulierung.

7 Veröffentlichungen

Folgende Teile der Dissertation sind bereits veröffentlicht bzw. zum Druck eingereicht:

7.1 Publikationen

- 7.1.1 Monsees TK, Winterstein U, Hayatpour J, Miska W, Schill WB (1998) Einfluß von Umweltnoxen auf die Funktion testikulärer Zellen. *Fertilität* 13, 75-78.
- 7.1.2 Monsees TK, Winterstein U, Schill WB, Miska W (1998) Influence of gossypol on the secretory function of cultured Sertoli cells. *Toxicol* 36, 813-816.
- 7.1.3 Monsees TK, Winterstein U, Hayatpour J, Schill WB, Miska W (1998) Effects of heavy metals on the secretory function of testicular cells in culture. *J Trace Microprobe Techn* 16, 427-435.
- 7.1.4 Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J (2000) Sertoli cells as target for reproductive hazards. *Andrologia*, in press.

7.2 Publierte Abstracts

- 7.2.1 Monsees TK, Winterstein U, Schill WB, Miska W (1996) Effects of gossypol on rat Sertoli cells secretory function. *Human Reprod* 11, 111.
- 7.2.2 Monsees TK, Winterstein UM, Miska W, Schill WB (1998) Influence of metal ions on the secretory function of cultured Sertoli cells. *Andrologia* 30, 171.

8 Literaturverzeichnis

1. Abou-Donia MB, Othman MA, Obih P (1989) Interspecies comparison of pharmacokinetic profile and bioavailability of (\pm) gossypol in male Fisher-344 rats and male B6C3F mice. *Toxicol* 55, 33-38.
2. ACGIH (1996) Threshold Limit Values (TLVs[R]) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure indices (BEI[R]). Am conference Govt Ind Hyg, Inc, Cincinnati, OH.
3. Alexander BH, Checkoway H, van Netten C, Muller CH, Ewers TG, Kaufman JD, Mueller BA, Vaughan TL, Faustman EM (1996) Semen quality of men employed at a lead smelter. *Occupat Environm Med* 53, 411-416.
4. Allenby G, Foster PM, Sharpe RM (1991) Evaluation of changes in the secretion of immunoreactive inhibin by adult rat seminiferous tubules in vitro as an indicator of early toxicant action on spermatogenesis. *Fundam Appl Toxicol* 16 (4), 710-724.
5. Allenby G, Sharpe RM, Foster PMD (1990) Changes in Sertoli cell function in vitro induced by nitrobenzene. *Fundam Appl Toxicol* 14, 364-375.
6. Anderson MB, Pedigo NG, Katz RP, George WJ (1992) Histopathology of testes from mice chronically treated with cobalt. *Reprod Toxicol* 6 (1), 41-50.
7. Anthony CT, Rosselli M, Skinner MK (1991) Actions of the testicular paracrine factor (P-Mod-S) on Sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development. *Endocrinology* 129 (1), 353-360.
8. Assennato G, Claudio P, Molinini R, Candela RG, Baser ME, Altamura BM, Giorgino R (1986) Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead-exposed men. *Arch Environ Health* 41, 387-390.

9. Baba Y (1988) Effect of HCG administration in the gossypol treated male rats. *Hinyokika-Kiyo* 34, 643-647.
10. Batarseh LI, Welsh MJ, Brabec MJ (1986) Effect of lead acetate on Sertoli cell lactate production and protein synthesis in vitro. *Cell Biol Toxicol* 2, 283-292.
11. Blackshaw AW, Elkington JSH (1970) Developmental changes in LDH isoenzymes in the testis of the immature rat. *J Reprod Fertil* 22, 69-75.
12. Blanco A, Zinkham WH (1963) Lactate dehydrogenase in the human testis. *Science* 139, 601-602.
13. Boekelheide K (1993) Sertoli cell toxicants. In: *The Sertoli cell*, eds. LD Russel and MD Griswold, 551-575. Cace River Press, Clearwater.
14. Boscolo P, Carmignani M, Sacchettoni-Logroscino G, Rannelletti FO, Artese L, Preziosi P (1988) Ultrastructure of the testis in rats with blood hypertension induced by long-term lead exposure. *Toxicol Lett* 41 (2), 129-137.
15. Braunstein CG, Dahlgren J, Loriaux DL (1978) Hypogonadism in chronically lead poisoned men. *Infertility* 1, 33-51.
16. Breitbart H, Rubinstein S, Nass-Arden L (1984) Effect of gossypol acetic acid on calcium transport and ATPase activity in plasma membrans from ram and bull spermatozoa. *Int J Andro* 7, 439-447.
17. Burton K (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62, 315-321.
18. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek N (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *B Med J* 305, 609-613.
19. Carreau S (1995) Human Sertoli cells produce inhibin in vitro: an additional marker to assess the seminiferous epithelium development. *Hum Reprod* 10, 1947-1949.

20. Carreau S, Drosdowsky MA, Foucault P (1996) Enzymatic properties of adult human Sertoli cells in vitro. *Andrologia* 28, 91-97.
21. Chang MC, Gu Z, Saksena SK (1981) Effects of Gossypol on the fertility of male rats, hamsters and rabbits. *Contraception* 21, 461-470.
22. Chapin RE, Gray TJB, Phelps JL, Dutton SL (1988) The Effects of mono-(2-ethylhexyl)-phthalate on rat Sertoli cell-enriched primary cultures *Toxicol Appl Pharmacol* 92, 467-479.
23. Chapin RE, Phelps JL, Somkuti SG, Heindel JJ, Burka LT (1990) The interaction of Sertoli and Leydig Cells in the testicular toxicity of Tri-o-crescyl phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol* 104, 483-495.
24. Clayton DG, Kaldor JM (1987) Diagnostic plots for departures from proportional hazards in cohort study data. *J Chronic Dis* 40 (2), 125-132.
25. Corrier DE, Mollenhauer HH, Clark DE, Hare MF, Elissalde MH (1985) Testicular degeneration and necrosis induced by dietary cobalt. *Vet Pathol* 22 (6), 610-616.
26. Coulson PB, Snell RL, Parise C (1980) Short term metabolic effects of the antifertility agent gossypol on various reproductive organs of male mice. *Int J Androl* 3, 507-518.
27. Coutinho EM, Melo JF, Barbosa I, Segal SJ (1984) Antispermatic action of Gossypol in men. *Fertil Steril* 42, 424-430.
28. Cullen MR, Kayne RD, Robins JM (1984) Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication. *Arch Environ Health* 39, 431-440.
29. Dai R, Pang S, Lin X, Ke Y, Liu Z, Dong R (1978) A study of antifertility of cottonseed. *Acta Biol Exp Sinica* 11, 8-11.
30. Dass KK, Dasgupta S (1997) Alteration of testicular biochemistry during protein restriction in nickel treated rats. *Biol Trace Elem Res* 60 (3), 243-249.

31. De Kretser DM, McFarlane JR (1996) Inhibin in the Male. *Journal of Andrology* 17 (3), 179-182.
32. Drummond GS, Smith TJ, Kappas A (1996) Effects of a series of metalloporphyrins on adrenal, testicular and thyroid function in rats. *Pharmacology* 52 (3), 178-186.
33. Dym M, Fawcett DW, (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3 (3), 308-326.
34. Eaton M, Schenker M, Whorton MD, Samuels S, Perkins C, Overstreet J (1986) Seven-years follow-up of workers exposed to 1,2-dibromo-3-chloropropane. *J Occupat Med* 28 (11), 1145-1150.
35. Eramaa M, Heikinheimo K, Voutilainen R (1992) Developmental and cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acids in human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 75 (3), 806-811.
36. Fakunding JL, Tindall DJ, Dedman JR, Mena CR, Means AR (1976) Biochemical actions of follicle stimulating hormone in the Sertoli cell of the rat testis. *Endocrinology* 98, 392-402.
37. Farrow S (1994) Falling sperm quality: fact or fiction? *Brit Med J* 309, 1-2.
38. Foster WG, Mc Mahon A, Young Lai EV, Hughes EG, Rice DC (1993) Reproductive endocrine effects of chronic lead exposure in the male cynomolgus monkey. *Reprod Toxicol* 7 (3), 203-209.
39. Foucault P, Drosdowsky MA, Carreau S (1994) Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Human Reproduction* 9 (11), 2062-2068.
40. Fritz IB, Kopec B, Lam K, Vernon RG (1974) Effects of FSH on levels of androgen binding proteins in the testis. In: *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*, eds. ML Dufau and AR Means, 311-327. Plenum, New York.

41. Fuse H, Fujiuchi Y, Junicho A, Iwasaki M, Katayama T (1996) Effect of carboplatin on rat spermatogenesis. *Urol Int* 56, 219-223.
42. Galdieri M, Ziparo E, Palombi F, Russo MA, Stefani M (1981) Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic-germ cell interactions. *J Androl* 5, 249-254.
43. Goldberg E (1963) Lactate and malic dehydrogenase in human spermatozoa. *Science* 139, 602-603.
44. Gui-Yuan Z, Meng-Chun J, Jin-Lai C, Wen-Qing Y (1989) The effect of long-term treatment with crude cotton seed oil on pituitary and testicular function in men. *Intern J Androl* 12, 404-410.
45. Hadley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinmann HK, Dym MC (1985) Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol* 101, 1511-1522.
46. Hansen LL, Jaroszewski JW (1996) Effect of gossypol on cultured TM3 Leyding and TM4 Sertoli cells: P31 and ^{23}Na NMR study. *NMR Biomed* 9, 72-78.
47. Hansen PV, Hansen SW (1993) Gonadal function in men with testicular germ cell cancer: the influence of cisplatin based chemotherapy. *Eur Urol* 23, 153-156.
48. Herve JC, Pluciennik F, Bastide B, Cronier L, Verrecchia F, Malassine A, Joffre M, Deleze J (1996) Contraceptive gossypol blocks cell to cell communication in human and rat cells. *Eur J Pharmacol* 313, 243-255.
49. Hoey MG (1966) The effect of metallic salts on the histology and functioning of the rat testis. *J Reprod Fertil* 12, 461-472.
50. Hollemann AF (1995) Kapitel XXXI: Die Nickelgruppe. In: *Lehrbuch der anorganischen Chemie / Hollemann-Wiberg, N Wiberg*, 1575-1604. De Gruyter Verlag, Berlin; New York.

51. Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, Bremner WJ (1996) Inhibin-B: A likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (4), 1321-1325.
52. Jakubowiak A, Janecki A, Steinberger A (1990) Kinetics of inhibin secretion in static and superfused Sertoli cell cultures in response to follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 43, 939-945.
53. Janecki AJ, Jakubowiak A, Steinberger A (1992) Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment cultures – A new model for toxicological investigations of the „blood-testis“ barrier in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 51-57.
54. Javed MU, Waqar MA (1996) Inhibition studies on LDH isoenzyme purified from Uromastix testes. *J Enzyme Inhib* 10 (3), 187-193.
55. Jones LA (1991) Definition of gossypol and its prevalence in cottonseed products. In: *Cattle research with gossypol-containing feeds*, eds. LA Jones, DH Kinard and R Mills, 1-18. National Cottonseed Products Association, Memphis, TN.
56. Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FFG, Van der Molen HJ (1983) FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 68(1), 219-226.
57. Jutte NH, Grootegoed JA, Rommerts FFG, Van der Molen HJ (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62, 399-405.
58. Kainz V, Frick J, Kainz P, Kalla NR (1988) The effect of gossypol acetic acid on the different stages of spermatogenic cycle in the rat. *Intern J Androl* 11, 533-546.

59. Kakela R, Kakela A, Hyvarinen H (1999) Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123 (1), 27-34.
60. Karlson P (1988) Kapitel 5: Coenzyme. In: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, P Karlson. Thieme Verlag, Stuttgart.
61. Karlson P (1988) Kapitel 18: Hormone. In: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, P Karlson. Thieme Verlag, Stuttgart.
62. Kasseru E, Leon F (1974) Effect of different solid metals and metallic pairs on human sperm motility. *Int J Fertil* 19, 81-84.
63. Kelly CW, Janecki A, Steinberger A, Russel LD (1991) Structural characteristics of immature rat Sertoli cells in vivo and in vitro. *Am J Anat* 192, 183-193.
64. Kim IC, Waller DP (1984) Specific inhibition of the testicular mitochondrial respiratory chain in vitro by gossypol. *J Androl* 5, 424-430.
65. Kim IC, Waller DP, Fong HHS (1985) Inhibition of LDH-X by Gossypol optical isomers. *J Androl* 6, 344-347.
66. Klein D, Wan YJY, Kamjab S, Okuda H, Sokol RZ (1994) Effects of toxic levels of lead on gene regulation in the male axis: increase in messenger ribonucleid acids and intracellular stores of gonadotrophs within the central nervous system. *Biol Reprod* 50, 802-811.
67. Köhn FM, Schuppe HC, Schill WB, Jeyendran RS (1995) Hydrogen hexachloroplatinate induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl* 18 (6), 321-325.
68. Kolpakov FI, Kolpakova AF (1978) Peripheral blood cellular reactions to intravenous platinum in an experiment on animals. *Gig Tr Prof Zabol Jun* (6), 52-53.

69. Kopf-Maier P (1992) Effects of carboplatin on the testis. A histological study. *Cancer Chemother Pharmacol* 29 (3), 227-235.
70. Kreuser ED (1986) Chronic gonadal toxicity in patients with testicular cancer after chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22, 289-294.
71. Labarca C, Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102, 344-352.
72. Lalevee N, Pluciennik F, Joffre M (1997) Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. *Biol Reprod* 56 (3), 680-687.
73. Lacroix M, Smith FE, Fritz IB (1977) Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 9, 227-236.
74. Lancranjan I, Popescu HI, Gavenesu O, Klapsh I, Serbanescu M (1975) Reproductive ability of workmen exposed to lead. *Arch Environ Health* 30, 396-401.
75. Lee CYG, Moon YS, Yuan JH, Chen AF (1982) Enzyme inactivation and inhibition by gossypol. *Mol Cell Biochem* 47, 65-70.
76. Lin YC, Rikihisia Y (1987) Anti-androgenic activity of gossypol metabolites in young male rats. In: *Cell biology of the testis and epididymis*, eds. MC Orgebin-Crist and J Danzo, pp 532-534. New York academy of science, New York.
77. Lin TU, Murono EP, Osterman J, Nankin HR, Coulson PB (1981) Gossypol inhibits testicular steroidogenesis. *Fertil Steril* 35, 563.
78. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321 (6072), 779-782
79. Liu BS (1957) A tentative idea for the use of cottonseed oil for fertility control. *Shanghai J Chinese Med* 6, 43.
80. Liu G, Lyle KC, Cao L (1987) Clinical trial of gossypol as a male contraceptive drug. Part I. Efficacy study. *Fertil Steril* 48 (3), 459-461.

81. Liu G, Lyle KC (1987) Clinical trial of gossypol as a male contraceptive drug. Part II. Hypokalemia study. *Fertil Steril* 48 (3), 462-465.
82. Liu G, Lyle KC, Cao L (1987) Experiences with gossypol as a male pill. *Am J Obstet Gynecol* 157, 1079-1081.
83. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-267.
84. McLachlan RI, Dahl KD, Bremner WJ, Schwall R, Schmelzer CH, Mason AJ, Steiner RA (1989) Recombinant human activin-A stimulates basal FSH and GnRH-stimulated FSH and LH release in the adult male macaque, *Macaca fascicularis*. *Endocrinology* 125 (5), 2787-2789.
85. Maddocks S, Kerr JB, Allenby G, Sharpe RM (1992) Evaluation of the role of germ cells in regulating the route of secretion of immunoreactive inhibin from the rat testis. *J Endocrinol* 132 (3), 439-448.
86. Mather JP, Woodruff TK, Krummen LA (1992) Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med* 201 (1), 1-15.
87. Maines MD, Sluss PM, Iscan M (1990) Cis Platinum mediated decrease in serum testosterone is associated with depression of luteinizing hormone receptors and cytochrome P-450_{sc} in rat testis. *Endocrinology* 126 (5), 2398-2406.
88. Miller GE, Welsh MJ, Brabec MJ (1985) Alteration in lactate metabolism in Sertoli cells and spermatocytes by 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Toxicologist* 5, 120.
89. Mizoguchi K, Tsuno T, Hara H, Tanaka N, Igarashi S (1995) Effects of a new platinum complex on male fertility in rats – collaborative work to determine the optimal period and optimal parameters to detect effects on male fertility in rats. *J Toxicol Sci* 20 (3), 207-216.

90. Moger WH (1983) Effects of the calcium-channel blockers cobalt, verapamil, and D600 on Leydig cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 28 (3), 528-535.
91. Mollenhauer HH, Corrier DE, Clark DE, Hare MF, Elissalde MH (1985) Effects of dietary cobalt on testicular structure. *Virchows Arch Cell Pathol* 49 (3), 241-248.
92. Monsees TK, Miska W, Schill WB (1996) Enzymic digestion of bradykinin by rat Sertoli cell cultures. *J Androl* 17, 375-381.
93. Moss EJ, Cook MW, Thomas LV, Gray TJB (1988) The effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalate esters on lactate production by Sertoli cells in vitro. *Toxicol Lett* 40, 77-84.
94. Moore A, Lynne A, Krummen Mather J (1993) Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 100, 81-86.
95. Mullaney BP, Rosselli M, Skinner MK (1994) Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. *Molecular and Cellular Endocrinology* 104, 67-73.
96. Murthy RC, Saxena DK, Gupta SK, Chandra SV (1991) Lead induced ultrastructural changes in the testis of rats. *Exp Pathol* 42 (2), 95-100.
97. Nathan E, Huang HF, Pogach L, Giglio W, Bogden JD, Seebode J (1992) Lead acetate does not impair secretion of Sertoli cell function marker proteins in the adult Sprague Dawley rat. *Arch Environ Health* 47 (5), 370-375.
98. National Coordinating Group on Male Antifertility Agents (1978) Gosypol, a new antifertility agent. *National Medical Journal of China* 91, 417-428.
99. Ng TB, Liu WK (1990) Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis. *In Vitro Cell Dev Biol* 26 (1), 24-28.

100. Nieschlag E (1998) Kritische Bemerkungen zur Diskussion über Veränderungen der Spermienqualität. *Fertilität* 13, 2-5.
101. Nivsarkar M, Cherian B, Patel S (1998) A regulatory role of sulfhydryl groups in modulation of sperm membrane conformation by heavy metals: sulfhydryl groups as markers for infertility assessment. *Biochem Biophys Res Commun* 247 (3), 716-718.
102. Noll F (1984) L-(+)-Lactate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol III, ed. HU Bergemeyer, pp 582-588. Academic Press, New York.
103. Nolte T, Harleman JH, Jahn W (1994) Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Exp Toxic Pathol* 47, 267-286.
104. Onoda M, Suarez-Quian CA, Dym M (1990) Characterization of Sertoli cells cultured in the bicameral chamber system: relationship between formation of permeability barriers and polarized secretion of transferrin. *Biol Reprod* 43, 672-683.
105. Olgiati KL, Hoffer AP, Toscano WA (1984) Gossypol modulation of nucleotide metabolizing enzymes in the reproductive tract of male rats. *Biol Reprod* 31, 759-770.
106. Pandey R, Kumar R, Singh SP, Saxena DK, Srivastava SP (1999) Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. *Biometals* 12 (4), 339-346.
107. Pedigo NG, George WJ, Anderson MB (1988) Effect of acute and chronic exposure to cobalt on male reproduction in mice. *Reprod Toxicol* 2(1), 45-53.
108. Pedigo NG, Vernon MW (1993) Embryonic losses after 10-week administration of cobalt to male mice. *Reprod Toxicol* 7, 111-116.
109. Pinon-Lataillade G, Thoreux-Manlay A, Coffigny H, Monchaux G, Masse R, Soufir JC (1993) Effect of ingestion and inhalation of lead on the reproductive system and fertility of adult male rats and their progeny. *Hum Exp Toxicol* 12 (2), 165-172.

110. Pfeifer U, Gulotta F (1992) Reversible Schäden und Regeneration. In: Einführung in die allgemeine Pathologie, Hrsg. E Grundmann, 21. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
111. Pogach LM, Lee Y, Gould S, Giglio W, Meyenhofer M, Huang HF (1989) Characterization of cis-platinum-induced Sertoli cell dysfunction in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* 98 (2), 350-361.
112. Qiang SZ, Jing GW, Wu XY, Xu Y, Li YG, Zhou ZH (1980) Gossypol related to hypokalemia: clinicopharmacological studies. *Chin Med J* 93, 477.
113. Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB (1991) Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 73 (5), 1141-1149.
114. Reader SCJ, Foster PMD (1990) The in vitro effects of four isomers of dinitotoluene on rat Sertoli and Sertoli-germ cell cocultures: germ cell detachment and lactate and pyruvate production. *Toxicol Appl Pharmacol* 106, 287-294.
115. Reyes J, Borriero L, Tanpaichitr N, Bellve AR, Benos DJ (1986) Energy metabolism of cultured TM4 cells and the action of gossypol. *Biol Reprod* 34, 809-819.
116. Rivier C, Cajander S, Vaughan J, Hsueh AJW, Vale W (1988) Age dependent changes in physiological action, content and immunostaining of inhibin in male rats. *Endocrinology* 123, 120-126.
117. Robins TG, Bornman MS, Ehrlich RI, Cantrell AC, Pienaar E, Vallabh J, Miller S (1997) Semen quality of men employed in a South African lead acid battery plant. *American Journal of Industrial Medicine* 32, 369-376.
118. Sarkar S, Dubey AK, Banerji AP, Shah PN (1978) Patterns of lactate dehydrogenase isoenzymes during gonadogenesis in the rat. *J Reprod Fertil* 53, 285-288.

119. Scanlon JW (1975) Dangers to the human fetus from certain heavy metals in the environment. *Rev Environ Health* 2, 39-64.
120. Seibert H (1996) Störungen der Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems. *UWSF Z Umweltchem Ökotox* 8 (5), 275-284.
121. Seidel HJ (1991) Blei und seine Verbindungen. In: *Ökologisches Stoffgebiet*, Hrsg. G Reinhardt, H-J Seidel, H-G Sonntag, W Gaus, V Hingst, R Mattern, 29-30. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
122. Shi Q, Zhuang Y (1980) Studies on antifertility effect of gossypol I. Effects of Gossypol on androgen-dependent organs in mice and rats. *Acta Biol Exp Sinica* 26, 311-316.
123. Shi Q, Zhuang Y, Yuan Y (1981) Studies on antifertility effect of gossypol II. The effects of Gossypol acetic acid on the spermatogenesis in rats. *Acta Biol Exp Sinica* 27, 22-23.
124. Singh A, Cullen C, Dykeman A, Rice D, Foster W (1993) Chronic lead exposure induces ultrastructural alterations in the monkey testis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 25 (4), 479-486.
125. Skinner MK (1987) Cell-cell interactions in the testis. *Ann N Y Acad Sci* 513, 158-171.
126. Skinner MK (1993) Secretion of growth factors and other regulatory factors. In: *The Sertoli cell*, eds. LD Russel and MD Griswold, 237-247. Cache River Press, Clearwater.
127. Skinner MK, Griswold MD (1980) Sertoli cell synthesizes and secretes transferrin-like protein. *J Biol Chem* 255, 9523-9525.
128. Srivastava A, Gupta G, Setty BS (1988) Studies on mechanisms of antifertility action of gossypol in rat and hamster. *Contraception* 39, 337-355.
129. Stachel B, Dougherty RC, Lahl U, Schlösser M, Zeschmar B (1989) Toxic environmental chemicals in human semen: Analytical method and case studies. *Andrologia* 21 (3), 282-291.

130. Steinberger A, Hintz M, Heindel JJ (1978) Changes in cyclic AMP responses to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biol Reprod* 19, 566-572.
131. Steinberger A, Jakubowiak A (1993) Sertoli cell culture: Historical perspective and review of methods. In: *The Sertoli cell*, eds. LD Russel and MD Griswold, 155-194. Cache River Press, Clearwater.
132. Strom-Hansen T, Cornett C, Jaroszewski JW (1989) Interaction of gossypol with amino acids and peptides as a model of enzyme inhibition. *Int J Peptide Protein Res* 34, 306-310.
133. Thoreux-Manlay A, Velez de la Calle JF, Olivier MF, Soufir JC, Masse R, Pinon Lataillade G (1995) Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology* 100, 101-109.
134. Tso WW, Lee CS, Tso MYW (1982) Sensitivity of various spermatozoal enzymes to gossypol inhibitor. *Arch Androl* 9, 31-32.
135. Velletri PA, Billingsley ML, Lovenberg (1985) Thermal denaturation of rat pulmonary and testicular angiotensin-converting enzyme isozymes. Effects of chelators and CoCl_2 . *Biochem Biophys Acta* 839 (1), 71-82.
136. Wallace WH, Shalet SM, Crowne EC, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR, Price DA (1989) Gonadal dysfunction due to cis-platinum. *Med Pediatr Oncol* 17, 409-413.
137. Waller DP, Bunyaphatsara N, Martin A, Vournazos CJ, Ahmed MS, Soejarto DD, Cordell GA, Fong HHS, Russell LD, Malone JP (1983) Effects of (+)-gossypol on fertility in male hamsters. *J Androl* 4, 276-279.
138. Wang NG, Lei HP (1979) Antifertility effect of gossypol acetic acid on male rats. *Chung-hua I Hseuh Tso Chih* 59, 402-405.
139. Wang DX, You MM, Xue SP (1982) Ultrastructural observation of gossypol effect on the Sertoli cells in rat. *Acta Anat Sin* 13, 211-214.

140. Wang J, Qiu J, Wu X, Zhang Z, Shao Y, Cao R (1988) The correlation between the gossypol contents in blood plasma, rete testis fluid, and cauda epididymal fluid following chronic treatment with gossypol in rats. *J Andrology* 9, 397-402.
141. Weinbauer GF, Rován E, Frick J, Adam H (1983) The endocrine status of gossypol-treated male rats. *Andrologia* 15, 565-570.
142. Welsh MJ, Wiebe JP (1975) Rat Sertoli cells: a rapid method for obtaining viable cells. *Endocrin* 96, 618-624.
143. Wenda-Rozewicka L, Marchlewicz M, Barcew-Wiszniewska B, Piasecka M (1996) The ultrastructure of the testis in rats after long-term treatment with lead acetate. *Andrologia* 28, 97-102.
144. Wiebe JP, Salhanick AI, Myers KI (1983) On the mechanism of action of lead in the testis: in vitro suppression of FSH receptors, cyclic AMP and steroidogenesis. *Life Sci* 32(17), 1997-2005.
145. Williams J, Foster PMD (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 Appl Pharmacol* 94, 160-170.
146. Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995) Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell Tissue Res* 279, 277-289.
147. Xie F, Wang J, Wu X, Gu Z (1990) Blood gossypol concentration in men receiving low dose of gossypol. *Adv Contracept Deliv Syst* 6, 81-87.
148. Xie JM, Funakoshi T, Shimada H (1995) Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel. *Toxicology* 103, 147-155.
149. Xue S, Zong S, Su S, Wu Y, Liu Y, Zhou Z, Ma X (1980) Antispermato-genic effect of gossypol on the germinal epithelium of the rat testes. *Scientia Sinica* 23, 642.

-
150. Zhuang GY, Meng-Chung J, Jin LC, Qing YW (1989) The effect of long-term treatment with crude cottonseed oil on pituitary and testicular function in men. *Int J Androl* 12, 404-410.

9 Lebenslauf

Name: Udo Winterstein

Geburtsdatum: 13.01.1968

Geburtsort: Kassel

Wohnort: Römerplatz 6, 53179 Bonn

Familienstand: ledig

Schulausbildung: 1974-78 Grundschule Baunatal
1978-84 Gesamtschule Baunatal
1984-87 Oberstufengymnasium Kassel
21.5.1987 Abitur, Note 1,5

Ziviler Ersatzdienst: 1987-89 Individuelle Schwerstbehinderten
Betreuung, Hessisch-Lichtenau und
Kassel

Studium: 1989-91 Studium der Musikwissenschaft an
der Justus-Liebig-Universität Gießen
1991 Beginn des Medizinstudiums an der
JLU Gießen
1996-97 Praktisches Jahr an der Neurologischen
Klinik der JLU Gießen und am Evan-
gelischen Krankenhaus Gießen
28.10.97 Abschluß des Medizinstudiums
Gesamtnote: sehr gut

Berufliche Tätigkeit: 1/1998-6/99	AiP in der Neurologischen Abteilung des Johanna-Etienne-Krankenhauses in Neuss
7/1999-12/99	Assistenzarzt in der gleichen Abteilung
seit 1/2000	Assistenzarzt im Neurologischen Rehabilitationszentrum „Godeshöhe“ in Bad Godesberg

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der andrologischen Forschungsabteilung des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill, Direktor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen, für die Überlassung des Themas, die Betreuung sowie die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und Geräte. Für die intensive Betreuung während der Experimente sowie für kritische Anregungen und Ratschläge beim Verfassen dieser Arbeit bin ich Herrn Dr. rer. nat. Th. Monsees zu großem Dank verpflichtet.

Desweiteren geht mein Dank an Dr. W. Miska für die Unterstützung während meiner praktischen Tätigkeit.

Für die Einarbeitung und die Unterstützung bei der Betreuung der Zellkultur danke ich ganz herzlich Fr. G. Thiele.

Allen Mitarbeitern der andrologischen Forschungsabteilung gilt mein besonderer Dank für ihre Geduld und die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

