

**Einfluß von Metallionen auf ausgewählte
Funktionsparameter von Sertoli-Zellen —
Potentielles Testsystem zur Prüfung
männlicher Fertilitätsstörungen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Swantje Gebhardt

aus Köln

Gießen 2003

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.- B. Schill
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Henkel

Gutachter: Prof. Dr. med. W. Weidner

Tag der Disputation: 05. 07. 2004

Für Johanna

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

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Originalpublikation

Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J (2000). Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 32: 239-246

Proceeding

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

Publizierter Abstract

Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Franz M, Gebhardt S, Schill WB, Hayatpour J (2001). Influence of xenobiotics on male reproduction. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 15: 19

Weiterer Abstract

Monsees TK, Gebhardt S, Winterstein U, Hayatpour J, Miska W and Schill WB (1998) Effect of heavy metals ions on the secretory function of Sertoli cells. Miniposter book G6, 10th European Testis Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology. Capri, Italy, April 1998

Abkürzungsverzeichnis

aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DNAse.....	Desoxyribonukleasen
1,3-DNB	1,3-Dinitrobenzol
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
FSH.....	<u>f</u> ollikel <u>s</u> timulierendes <u>H</u> ormon
GTP.....	<u>G</u> lutamat- <u>P</u> yruvat- <u>T</u> ransaminase
Konz.	Konzentration
LDH.....	<u>L</u> aktat <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase
LH	<u>l</u> uteinisierendes <u>H</u> ormon
MEHP	Mono-2-Ethylhexyl-Phthalat
MT.....	Metallothioneine
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl- Tetrazoliumbromid -> gelber wasserlöslicher Farbstoff
NAD ⁺	<u>N</u> icotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inucleotid
NADH.....	reduziertes <u>N</u> icotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inucleotid
SD.....	Standardabweichung
WHO.....	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Zielsetzung</u>	13
III. <u>Material und Methoden</u>	14
• III.1 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	14
• III.2 Medien und Lösungen für das Anlegen der Zellkultur	14
• III.3 Anlegen einer primären Sertoli-Zellkultur.....	16
• III.4 Testung der Auswirkung der ausgewählten Noxe auf die Sertoli-Zellen.....	25
• III.5 Protein-Assay.....	31
• III.6 MTT-Assay	33
• III.7 Laktat-Assay	36
• III.8 Pyruvat-Assay.....	40
• III.9 Inhibin-Assay	44
• III.10 Statistik.....	48
IV. <u>Ergebnisse</u>	
• IV.a Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung	49
• IV.b Nachweis von Leydig-Zellen	50
• IV.c Nachweis von peritubulären Myoidzellen	50
• IV.d Nachweis von Sertoli-Zellen.....	51
• IV.e Vitalität	53
• IV.f Laktat.....	58
• IV.g Pyruvat.....	64

•	IV.h	Inhibin.....	70
V.	<u>Diskussion</u>		
•		Quecksilberverbindungen.....	74
•		Nitrate.....	79
•		Cadmiumverbindungen.....	81
•		Cis-Platin.....	82
•		Kupferverbindungen.....	83
•		Wirkung von Noxen auf Sertoli-Zellen.....	85
•		Mechanismen der Zellschädigung.....	86
•		Laktat.....	86
•		Pyruvat.....	88
•		Inhibin.....	89
•		Schlußbetrachtung.....	91
•		Ausblick.....	92
VI.	<u>Zusammenfassung</u>		93
VII.	<u>Literatur</u>		96

I. Einleitung

Während der letzten Jahrzehnte wurden viele Studien durchgeführt, die sich mit der Abnahme der Fertilität des Mannes beschäftigen (z.B. Eggert-Kruse et al., 1992; Bataineh et al., 1998; Wong et al., 2001). Eine der ersten Studien zur negativen Beeinflussung des männlichen Fortpflanzungssystems durch arbeits- und umweltbedingte Faktoren wurde 1977 von Whorten durchgeführt. Durch diese Studie wurde die testikuläre Toxizität von Dibromchlorpropan (DBCP) bei Arbeitern in einer Schädlingsbekämpfungsmittelfabrik aufgedeckt. Zwar wurden vor 1977 auch Untersuchungen zur Auswirkung von Chemikalien auf die männliche Fertilität durchgeführt, doch die Ergebnisse der DBCP-Studie haben dazu beigetragen, daß heute verstärkt auf toxische Substanzen am Arbeitsplatz für das männliche und auch das weibliche Fortpflanzungssystem geachtet wird (Whorten, 1987).

Bei der Beurteilung der reproduktionsbiologischen Toxizität verschiedener Schadstoffe spielt die Sertoli-Zelle eine wichtige Rolle. Die Sertoli-Zellen wurden durch den Mailänder Physiologen Enrico Sertoli (1842-1910) entdeckt. Es ist bekannt, daß viele Schadstoffe hauptsächlich Sertoli-Zellen schädigen (Monsees et al., 2000).

Der Ort für die Entwicklung und morphologische Differenzierung der Samenzellen sind die Testes (Hoden). Diese entstehen während der Embryonalentwicklung in der Genitalleiste aus Urgeschlechtszellen und Mesenchymzellen. Die paarig angelegten Hoden treten am Ende der Fetalentwicklung an der Rückwand einer Bauchfelltasche aus dem Leistenkanal in den Hodensack (Skrotum). Das Skrotum enthält neben den Hoden auch die Nebenhoden und Samenstränge samt deren Nerven und Gefäße.

Die Entwicklung und morphologische Differenzierung der Samenzellen in den Testes wird als Spermatogenese bezeichnet und läuft in drei Schritten ab:

Vermehrungsperiode (Spermatozytogenese), Reifeteilungsphase (Meiose) und Differenzierungsperiode (Spermiogenese). Ort dieses Entwicklungsprozesses sind die Tubuli seminiferi contorti (Samenkanälchen). Mit der Reifung und Differenzierung rücken die Zellen von der Basalmembran des Tubulus seminiferus contorti aus zunehmend in zentral gelegene Schichten der Tubuluswand (des „Keimepithels“) vor, der zeitlichen Folge der Spermatogenesestadien entspricht eine räumliche von außen nach innen (Leonhardt, 1990).

Vermehrungsperiode (Spermatozytogenese): Die Spermatogonien, die Stammzellen der Spermatogenese, liegen zunächst als mittelgroße runde Zellen mit großem runden Kern breitflächig auf der Basalmembran des Tubulus seminiferus auf. Auf dieser Basalmembran der Tubuli seminiferi contorti liegen ebenfalls die Sertoli-Zellen breit auf und erreichen mit stadienabhängig unterschiedlich geformten, stark verzweigten Fortsätzen das Lumen der Samenkanälchen (Abb.1). Durch diese Zellfortsätze werden taschenartige Vertiefungen gebildet, in denen die Spermatogenese abläuft.

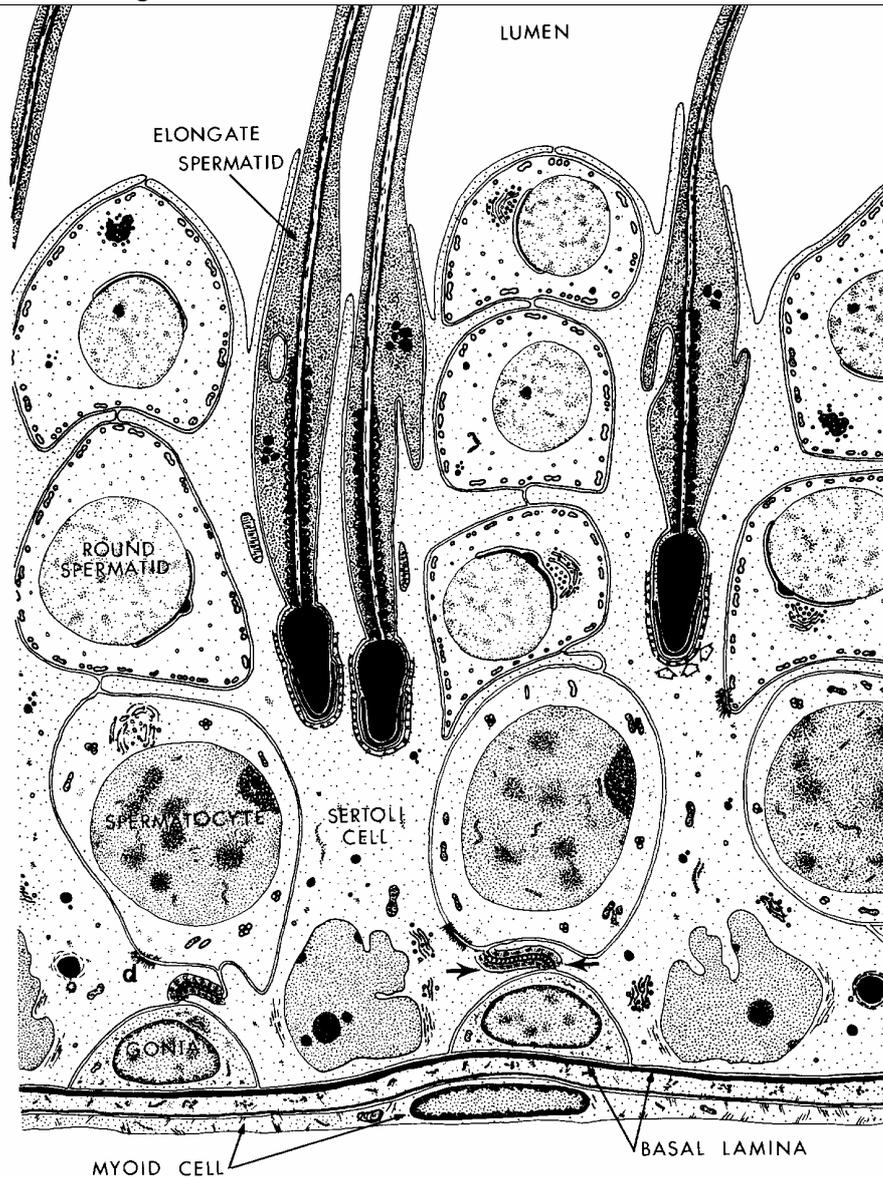


Abb. 1: Schematische Darstellung der Spermatogenese

Die Spermatogonien liegen als mittelgroße runde Zellen breitflächig auf der Basalmembran auf. Die Spermatozyten liegen zwischen den Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zellen sitzen breitbasig auf der Basalmembran des Tubulus seminiferus auf und erreichen mit stark verzweigten Fortsätzen das Lumen der Samenkanälchen. Die Spermatozoen liegen in Büscheln nahe dem Lumen an den Spitzen der Sertoli-Zellen. (Russel et al., 1990)

Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Spermatogonien: Typ-A-Spermatogonien und Typ-B-Spermatogonien. Typ-A-Spermatogonien sind entweder ruhende Reservestammzellen oder Stammzellen, die mitotisch weitere Stammzellen bilden. Von ihnen unterscheidet man Typ-B-Spermatogonien, die

weiter entwickelt sind, sich mitotisch teilen und Spermatozyten I hervorbringen. Diese und alle folgenden Zellen einschließlich des Spermatidenstadiums bleiben durch Zytoplasmabrücken verbunden (Leonhardt, 1990).

Reifeteilungsphase: Nach Verdopplung seiner DNA tritt der Spermatozyt I in die 1. Reifeteilung ein. Es entstehen nun zwei kleinere Spermatozyten II, aus denen durch die zweite Reifeteilung vier Spermatiden hervorgehen. Diese Spermatiden liegen in Büscheln nahe dem Lumen des Tubulus seminiferus an den Spitzen der Sertoli-Zellen (Leonhardt, 1990). Die hohen und polar differenzierten Sertoli-Zellen stützen die reifenden Samenzellen, daher bezeichnet man sie auch als Stützzellen der Spermatogenese.

Differenzierungsperiode: Die Spermatiden lösen ihre Protoplasmabrücken und bilden sich in Spermatozoen (Spermien) um. Reste des Zytoplasmas der Spermatiden werden bei der Spermiation von den Sertoli-Zellen durch Phagozytose aufgenommen. Über das Rete testis (Hodennetz) gelangen die Spermien dann in den Nebenhoden. Das zur weiteren Entwicklung benötigte Testosteron aus der Leydig-Zelle wird den Spermien durch die Sertoli-Zellen zugeführt. Testosteron wird unter dem Einfluß des LH in den Leydig-Zellen produziert. Seine Biosynthese unterliegt einem negativen Feedback-Mechanismus zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Testes. Das FSH wirkt direkt auf die Sertoli-Zellen. Bei der Vermittlung der stimulatorischen Wirkung dieser Hormone auf die Spermatogenese besitzt die Sertoli-Zelle eine entscheidende Mittlerfunktion. Durch die Hormonsignale wird die Sertoli-Zelle zur Produktion einer Vielzahl von Faktoren angeregt, durch die der Ablauf der Spermatogenese kontrolliert und koordiniert wird. Diese Produkte umfassen Steroidhormone, Proteine, Wachstumsfaktoren, Opiode und Prostaglandine. Zwischen den Leydig-Zellen und den Sertoli-Zellen, zwischen den Sertoli-Zellen und den Keimzellen und auch innerhalb der Keimzellen existieren parakrine Regulations- und Kommunikationsmechanismen, mit deren Hilfe die Feinregulation der Gametogenese lokal bewerkstelligt wird.

Die Spermatogenese wird durch die unter dem Einfluß des hypothalamischen Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) gebildeten gonadotropen Hormone LH und FSH reguliert. FSH wirkt stimulierend auf die Sertoli-Zellen und regt über diese die Differenzierung der Spermatozyten an. Die Sertoli-Zellen wirken mit der Bildung von Inhibin-B und Aktinin regulierend entgegen. Inhibin-B wirkt hemmend auf die FSH-Produktion der Hypophyse. LH stimuliert in den interstitiellen Leydig-Zellen die Produktion von Testosteron, das sowohl direkt als auch indirekt über die peritubulären Zellen auf die Sertoli-Zellen und die Spermatogenese einwirkt (Nieschlag et al., 1992).

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Sertoli-Zelle fällt auf, daß der Zellkern basal liegt. Er ist nach basal abgerundet und nach luminal hin eingekerbt.

Im unteren Zellanteil sind benachbarte Sertoli-Zellen durch desmosomale Verbindungen, sogenannte Zonulae occludentes eng miteinander verbunden. Durch diese Membranspezialisierung wird verhindert, daß höhermolekulare Substanzen aus dem Interstitium und den Kapillaren in das lumenseitige Kompartiment des Keimepithels vordringen können. Diesen Zellverband bezeichnet man als Blut-Hoden-Schranke, die dem Schutz der Keimzellen vor mutagenen Substanzen und autoaggressiven Antikörpern dient. Zudem findet ein selektiver Stofftransport statt, der auch die Ernährung der Keimzellen beinhaltet. Daher werden die Sertoli-Zellen auch Ammenzellen der Spermatogenese genannt.

Charakteristisch für die Sertoli-Zellen sind zahlreiche unregelmäßig angeordnete Mitochondrien. Zwischen den Mitochondrien liegen Lipidtropfen, Glykogenschollen, große Areale mit endoplasmatischem Retikulum sowie einzelne freie Ribosomen und Polyribosomen. Die große Anzahl von Mitochondrien in den Sertoli-Zellen läßt auf eine ausgeprägte Stoffwechselaktivität schließen. Während der Vermehrungsperiode entnehmen die Sertoli-Zellen dem Blut Nährstoffe und führen sie den reifenden Keimzellen zu. Bevorzugte und lebenswichtige Energiesubstrate der Keimzellen sind Laktat und Pyruvat. Diese Produkte werden von den Sertoli-Zellen produziert und an die sich entwickelnden Keimzellen abgegeben. Die Sekretion dieser Produkte ist hormonell gesteuert. FSH, c-AMP, Insulin, IGF-I, EGF und TGF- β führen zu einem Anstieg der Laktat-

Produktion durch die Sertoli-Zellen. Produziert der Körper unter pathologischen Umständen nicht ausreichende Mengen dieser Hormone bzw. hormonähnlichen Substrate, so wird die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen erniedrigt bzw. sogar ganz eingestellt. Bei einem Laktat- oder Pyruvatmangel kommt es zu einem Stillstand der Proteinsynthese und somit zu einer Beendigung des Entwicklungsprozesses der Keimzellen; d.h. die Entwicklung bleibt bei den Vorstufen der Spermien in Form von Spermatozyten oder Spermatiden stehen. Diese Vorformen der Spermien haben, wenn sie sich nicht weiter entwickeln, keine Funktion. Die Fertilität des Organismus ist somit reduziert.

Damit Fortpflanzungsfähigkeit des Organismus gewährleistet ist, müssen erneut Keimzellen in der Spermatogenese zu Spermien entwickelt werden.

Weil jede Sertoli-Zelle nur eine bestimmte Anzahl von Keimzellen ernähren kann, steht die Anzahl der Sertoli-Zellen in direktem Zusammenhang mit der Spermienanzahl im Ejakulat eines Mannes.

Eine Schädigung der Sertoli-Zellen führt zudem zu einem bleibenden Schaden der Fertilität eines Mannes, da diese Zellen nur in der fötalen, neonatalen und präpubertären Phase gebildet werden können. Da, wie oben schon erwähnt, die Spermienanzahl im Ejakulat eines Mannes von der Sertoli-Zell-Anzahl abhängig ist, führt eine Schädigung der Sertoli-Zellen zu einer geringeren Spermienanzahl und somit zur Verringerung bzw. zur Infertilität eines Mannes.

Aus der vorangegangenen Beschreibung der Sertoli-Zellen wird ersichtlich, daß die Sertoli-Zellen für den Ablauf der Spermatogenese von großer Bedeutung sind. Noxen, die diese Zellen schädigen, können somit auch die Fertilität des Mannes negativ beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung dreier Schwermetalle auf die Sertoli-Zellen überprüft. Für die Untersuchungen wurden die wasserlöslichen Salze der Schwermetalle eingesetzt, da nur diese über die Blutbahn die Sertoli-Zellen erreichen können. Bei diesen Metallsalzen handelt es sich um: Kupfersulfat (CuSO_4), Cis-Platin ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) und Quecksilberdinitrat ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$).

Im Folgenden soll nun ein Überblick darüber gegeben werden, was in der Literatur über diese Metallsalze bekannt ist.

Kupfersulfat

Das Schwer- bzw. Halbedelmetall Kupfer ist ein Bioelement, das heißt es wird beim Menschen für den Aufbau und die Lebensvorgänge des Organismus benötigt (z.B. als Coenzym). Kupfer macht beim Menschen circa $1,4 \times 10^{-4}$ % des Gesamtgewichtes aus. Es sind eine Vielzahl von Kupfermangelanämien bekannt, z.B. beim Säugling unter reiner Milchdiät. In der Schwangerschaft und bei bestimmten Erkrankungen, wie z.B. Infektionen, ist der Kupferspiegel erhöht. Nimmt man allerdings vermehrt oral Kupfersulfat auf, so kommt es zu einer sogenannten Kupfervergiftung. Diese Vergiftung führt zu örtlicher Verätzung, Erbrechen, Darmkoliken, blutigen Durchfällen. Die tödliche orale Dosis für einen Erwachsenen liegt bei circa 10g. Überlebt man diese Vergiftung so kann es zur Hämolyse, zu einem Ikterus, zur Hämoglobinurie und/oder zu Nieren- und Leberschäden kommen. Kupferstaubexposition über einen längeren Zeitraum führt zu Grünfärbung von Haut, Haaren, Zähnen und Zahnfleisch.

Zur Empfängnisverhütung werden Intrauterinpeessare benutzt, die mit einem Kupferdraht umwickelt sind. Hierbei soll Kupfer als Nidationshemmer wirken. In der Literatur findet man recht wenig über die Auswirkung von Kupfer und seinen Verbindungen auf die Fertilität des Mannes. Zahlreiche Studien beschäftigen sich hingegen mit der Auswirkung auf die Fruchtbarkeit der Frau, nach Insertion der oben erwähnten Intrauterinpeessare. So scheint es interessant zu überprüfen, ob Kupfer und seine Verbindungen vielleicht auch auf die männliche Fertilität einen Einfluß haben. Auf die Motilität der Spermien und deren Penetrationsfähigkeit der Cervixmucosa scheint es weniger Einfluß zu haben als Quecksilberchlorid und Cadmiumchlorid (Runnebaum et al., 1992). Die Kupferkonzentrationen in der Samenflüssigkeit bei infertilen und fertilen Männern unterscheidet sich nicht signifikant (Nieschlag et al., 1992).

Cis-Platin

Der anorganische Schwermetallkomplex Cis-Platin wird in der Onkologie als Zytostatikum verwendet. Es findet vorwiegend Anwendung bei Bronchialkarzinomen und Tumoren des Urogenitaltrakts. Es sind vielerlei Nebenwirkungen dieses Zytostatikums bekannt: neurotoxische Störungen, Hörschäden, gastrointestinale Störungen, Hyperurikämien, Elektrolytstörungen, Herzrhythmusstörungen, Reizungen der Intima der Gefäße, Störungen der Hämatopoese, Nierenschäden und Schäden der ableitenden Harnwege, Immunsuppression, Haut und Schleimhautentzündungen, Störungen der Ovulation und der Spermatogenese. Über den Einfluß von Cis-Platin auf die Spermatogenese liegen zahlreiche Untersuchungen vor (z.B. Pogach et al., 1989; Kinkead et al., 1992). Häufig wurde die Fertilität von Patienten mit Hodenkrebs nach erfolgter Therapie untersucht (z.B. Wallace et al., 1989; Pont et al., 1997; Oliver, 2001; Schrader et al., 2002). Dabei war es oft schwierig zu unterscheiden, ob die Störungen der Spermatogenese durch das Karzinom erfolgten oder durch die Anwendung von Cis-Platin. Früher empfahl man, vor dem Beginn der Chemotherapie mit Cis-Platin Samenflüssigkeit einzufrieren (Ondrus et al., 1986). Mittlerweile ist man anderer Auffassung. Ob die Spermatogenese jedoch irreversibel durch die Chemotherapie geschwächt wird, ist von der kumulativen Dosis von Cis-Platin abhängig (Pont et al., 1999).

Quecksilberdinitrat

Eine weitere untersuchte Noxe ist Quecksilberdinitrat. Quecksilber ist ein zur Zinkgruppe gehörendes, bei Raumtemperatur flüssiges Element. Es kommt in einer Vielzahl von chemischen Verbindungen vor. Quecksilber und seine Verbindungen wirken als Zell- und Protoplasmagift. Zum Teil können Quecksilber und seine Verbindungen sensibilisierend wirken. In den Nieren, der Leber und dem zentralen Nervensystem kann es zu einer Kumulation dieses Giftes kommen. Aufgrund seiner hohen Toxizität sind eine Vielzahl von Vergiftungen durch Quecksilber und seine Verbindungen bekannt, auf die an dieser Stelle nicht im Einzelnen eingegangen werden soll. Man unterscheidet grob zwischen akuten und chronischen Vergiftungen. Am bekanntesten sind die Minimata-Krankheit

und die Feer-Krankheit bei Kleinkindern. 1975 fanden Lee und Dixon heraus, daß Methylquecksilber-Verbindungen möglicherweise eine negative Auswirkung auf die Spermatogenese haben. Danach folgten eine Reihe von Studien, die sich mit dieser Problematik befaßten. Dabei wurde auch untersucht, inwieweit die quecksilberhaltige Legierung Amalgam die Fertilität beeinflusst. Dieses Thema wird in der Öffentlichkeit oft diskutiert, da Amalgam in der Zahnheilkunde als Füllungswerkstoff verwendet wird. Allerdings ist die Bevölkerung in Anbetracht der geringen Mengen von aus zahnärztlichen Amalgamfüllungen stammenden Quecksilber weniger gefährdet als das zahnärztliche Personal selbst (Schuurs, 1999). Heute gilt es als gesichert, daß Quecksilber und seine Verbindungen die Fertilität des Mannes beeinträchtigen (Rao et al., 2001). In experimentellen Tierstudien konnte gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen von Quecksilber das Risiko von Fortpflanzungsproblemen ansteigen lassen (Schuurs, 1999). Quecksilberchlorid beeinflusst in vitro die Spermatozoen-Zervikalmukus-Interaktion negativ (Runnebaum et al., 1992).

Kaliumnitrat

Neben dem Einfluß der oben erwähnten Schwermetallsalze auf die Sertoli-Zellen wurde auch die Auswirkung von Kaliumnitrat (KNO_3) auf die Sertoli-Zellen untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob Nitrat auf die Sertoli-Zellen toxisch wirkt. Nitrat (NO_3^-) ist das Gegenion zu Quecksilber (Hg) in der hier untersuchten Verbindung Quecksilberdinitrat ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$). Es stellte sich nun die Frage, ob der Quecksilberanteil der hier untersuchten Verbindung Quecksilberdinitrat toxisch auf die Sertoli-Zellen wirkt oder Nitrat einen schädigenden Einfluß ausübt. Das Alkalimetallsalz Kaliumnitrat findet seine Hauptanwendung als Düngemittel, Pökelsalz und bei der Herstellung von Schießpulver. Nitrat kann selber nicht als toxisch bezeichnet werden. Im Verdauungstrakt kann Nitrat aber zu Nitrit reduziert werden, das durch Methämoglobinbildung giftig wirkt und das mit sekundären Aminen die Nitrosamine bildet, die als karzinogen eingestuft werden (Streit, 1991).

Testsysteme

Die meisten Studien, die sich mit dem Einfluß bestimmter Noxen auf die Fertilität des Mannes befassen, beruhen auf epidemiologischen Untersuchungen oder in-vivo-Testsystemen. Bei in-vivo-Testsystemen werden Versuchstieren in zuvor festgelegter Dosis Noxen oral oder parenteral zugeführt, anschließend wird die Fertilität der Tiere überprüft. Der Nachteil dieser beiden Testsysteme besteht darin, daß nur schwer Aussagen über die Qualität der Schädigung durch die jeweiligen Noxen gemacht werden können. Es kann also nicht genau festgestellt werden, welche Funktionen der einzelnen Zellen durch die Noxen beeinträchtigt werden. Weiterhin ist bei in-vivo-Testsystemen zu beachten, daß die Auswirkung einzelner Noxen in vivo beim Menschen nur schwer zu beurteilen ist. Grund hierfür ist, daß neben der zu testenden Noxe eine Vielzahl von Einflüssen und Substanzen auf die untersuchten Personen einwirken. Mit in-vitro-Testsystemen hingegen ist genau auszumachen durch welche Noxe und in welchem Grad die Zellen durch die Noxe beeinflusst werden.

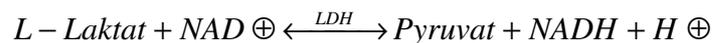
Vitalität

Um die Zytotoxizität der getesteten Noxen auf die Sertoli-Zelle zu ermitteln, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Hierfür wurde der MTT-Assay benutzt. Der wasserlösliche gelbe Farbstoff MTT wird dabei mittels mitochondrialer Dehydrogenasen zu blau-violetter wasserunlöslichem Farbstoff (Formazan) reduziert. Da diese Farbumwandlung abhängig ist von der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, geschieht dies nur in vitalen Zellen. Je mehr blau-violetter Farbstoff in den Wells enthalten ist, desto mehr vitale Zellen waren in den Wells. Die Intensität der Blaufärbung kann photometrisch gemessen werden.

Laktat

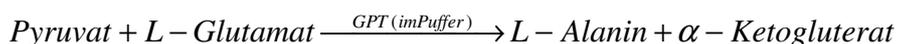
Die Sertoli-Zellen liefern die für die Keimzellen lebenswichtigen Produkte Laktat und Pyruvat. Williams und Foster stellten 1988 fest, daß die Laktat- und Pyruvatproduktion von Ratten-Sertolizellkulturen als Indizes für ihre parakrine Zellfunktion in in vitro-Testsystemen verwendet werden kann. Sie verwendeten

die Laktat- und Pyruvatsekretion als Indizes für den Einfluß von 1,3-DNB und MEHP auf die Funktion der Sertoli-Zellen (Williams and Foster, 1988). Mittlerweile wurde dieser metabolische Index für die Bestimmung der Toxizität verschiedener Stoffe verwendet; so z.B. Nitrobenzol (Allenby et al., 1990). Nickel, Kobalt, Gossypol, Lindan, DDT, Bisphenol-A, Ethinylestradiol (Monsees et al., 1998, 2000); 2-Methoxyethanol und Methoxy Säure (Beattie et al., 1984); Bleiazetat (Batarseh et al., 1986); Isomere von Dinitrotoluol (Reader et al., 1990). Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Laktat-Assay ist ein gekoppelter Enzymassay. Er wurde 1984 von Noll beschrieben. Die Enzymreaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wird L-Laktat durch L-Laktatdehydrogenase (LDH) zu Pyruvat oxidiert, wobei NAD^+ zu NADH und H^+ reduziert wird (Formel 1).



Formel 1: Reaktionsgleichung der Oxidation von L-Laktat mit NAD^+ zu Pyruvat und NADH und H^+ .

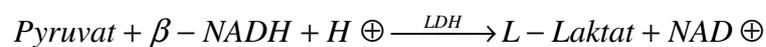
Die NADH Zunahme ist der Laktatkonzentration direkt proportional und kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite des Laktats, deswegen muß in einer Folgereaktion das entstehende Pyruvat mittels des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat (im Puffer) in α -Ketoglutarat umgewandelt werden (Formel 2).



Formel 2: Reaktionsgleichung der Umwandlung von Pyruvat mit L-Glutamat zu L-Alanin und α -Ketoglutarat mittels GPT= Amino-Alanin-Transferase (ACT).

Pyruvat

Neben Laktat wurde Pyruvat als zweiter metabolischer Parameter ermittelt. Der durchgeführte Assay wurde in Anlehnung an den 1974 von Czok und Lamprecht beschriebenen Assay entwickelt. Dieser Assay basiert auf der chemischen Reaktion von Pyruvat mit β -NADH + H⁺ in einer von LDH katalysierten Reaktion zu L-Laktat und NAD⁺ (Nicotinamide-Adenin Dinucleotid) (Formel 3). Die β -NADH-Abnahme ist direkt proportional zur Pyruvatkonzentration in den Proben und kann wie oben beschrieben bei 340 nm photometrisch gemessen werden.



Formel 3: Reaktionsgleichung der Reduktion von Pyruvat mit β -NADH und H⁺ mittels LDH zu L-Laktat und NAD⁺.

Inhibin

Ein weiterer Parameter der Zellfunktion der Sertoli-Zelle ist Ausschüttung von Inhibin. Inhibin-B ist ein spezifisch von der Sertoli-Zelle gebildetes Hormon. Es wirkt hemmend auf die FSH-Produktion der Hypophyse (Aumüller, 1991). Die Inhibinmessung erfolgte mit einem Festphasen-Sandwich-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

II. Zielsetzung

Eine Vielzahl von Noxen steht im Verdacht die männliche Fertilität zu beeinflussen.

Mit der Untersuchung von Cis-Platin und Quecksilberdinitrat wurden zwei Schwermetallsalze herausgegriffen, deren toxische Wirkung auf den gesamten Organismus bekannt ist. Es interessierte nun, wie sich diese Noxen auf die sekretorische Funktion und Vitalität der Sertoli-Zellen auswirken. Zum Vergleich wurde die Auswirkung von Kupfersulfat auf die Sertoli-Zellen untersucht. Es wurde angenommen, daß Kupfersulfat eine weniger toxische Wirkung auf die Sertoli-Zellen hat. Mit der Einbeziehung von Kupfersulfat in die Untersuchungen wurde versucht eine möglichst große Bandbreite von verschiedenen Ergebnissen zu erhalten, um die Versuchsdurchführungen zu überprüfen. Um festzustellen, welchen Einfluß das Gegenion von Quecksilber in der hier untersuchten Verbindung Quecksilberdinitrat auf die Sertoli-Zellen hat, wurde die Wirkung von Nitrat, als Kaliumnitrat auf die Sertoli-Zellen überprüft.

Es stellte sich die Frage, ob es für die jeweiligen Noxen bestimmte Grenzwerte gibt, bei deren Erreichen der jeweilige Schadstoff Sertoli-Zellen schädigt bzw. abtötet. Diese Grenzwerte sollten ermittelt werden.

Die Versuche wurden mit Sertoli-Zellen durchgeführt, da die Anzahl der Sertoli-Zellen im direkten Zusammenhang mit der Spermienanzahl im Ejakulat eines Mannes steht. Sertoli-Zellen sind also ein wichtiger Faktor für die Fertilität eines Mannes.

Durch die Verwendung von Zellkulturen, sollte die Anzahl der getöteten Ratten begrenzt werden und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Überprüfung eines in vitro-Testverfahren, mit dem man den Einfluß von Noxen auf Sertoli-Zellen in Zukunft einfach, sicher, und reproduzierbar ermitteln kann. Als Indizes für die Funktion der Sertoli-Zellen sollten deren Laktat-, Pyruvat- und Inhibinsekretion gemessen werden.

III. Material und Methoden

III.1: Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht explizit erwähnt, in der höchsten erhältlichen Qualität eingesetzt (pro analysi oder biochemisch rein). Für die Primärkulturen der Sertoli-Zellen wurden speziell für Zellkultur getestete Medien und Zusätze benutzt.

Aufstellung der verwendeten Geräte:

- MTP-Reader (EAR 400 ATC; SLT Labinstruments, Grödig (A-5082) Österreich)
- Mikrotiterplatten („Primaria“-Platten; Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) diese haben eine chemisch modifizierte Oberfläche (positive Ladung), wodurch sich die (leicht negativ geladenen) Zellen besser anheften.
- Spektralphotometer DU 68 (Beckmann, München, Deutschland)
- Kunststoffküvetten (1 ml) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

III.2: Medien und Lösungen für das Anlegen der Zellkultur

Die Sertoli-Zellen für die Zellkulturen wurden aus den Hoden 18-21 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland) isoliert. Unmittelbar vor der Präparation wurden die Ratten geliefert.

Vorgehen:

Unmittelbar vor der Präparation der Rattenhoden wurden folgende Medien angesetzt:

I. Gebrauchsmedium:

Dieses Medium wurde zum Herstellen der Kulturmedien unter Verwendung entsprechender Zusätze, sowie als Waschmedium benutzt:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Ham's F-12 Medium (1:2) verdünnt
(DMEM: Ham's F-12;1:2;31330-038, Gibco, Berlin, Deutschland)

II. Kulturmedium A:

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

- Cytosin Arabinosid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland C-1768 (2 µg/ml)
- L-Glutamin; Gibco 04305030-H, (2 mM)
- Penicillin-Streptomycin Lösung; Sigma, E-3539 (100 µg/ml)
- Epidermal Growth Faktor (EGF); Sigma, E-1257 (10 ng/ml)
- Apo-Transferrin(human); Sigma, T-1147 (5 µg/ml)
- Insulin(human); Sigma, I-1882 (2 µg/ml)
- Hydrocortison, Sigma, H-0135 (10^{-8} M)
- D-alpha-Tocopherol(Vitamin E); Serva, Heidelberg, Deutschland, 36560 (200 ng/ml)
- All-trans-Retinol (Vitamin A); Serva , 38280 (200 ng/ml)
- Testosteron; Sigma, T-5641(10^{-7} M)
- FSH (follikelstimulierendes Hormon);Sigma, F-4520 (100 ng/ml)

III. Kulturmedium B:

Entspricht Kulturmedium A ohne Zusatz von Cytosin-Arabinosid

IV. Kulturmedium C:

Entspricht Kulturmedium A ohne Cytosin-Arabinosid und ohne FSH.

Bei der enzymatischen Isolation der Sertoli-Zellen wurden folgende Medien verwendet:

I. Isolationsmedium A:

20 ml Gebrauchsmedium mit Zusatz von:

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

II. Isolationsmedium B:

20 ml Gebrauchsmedium mit Zusatz von:

- 40 mg Kollagenase (Sigma, c-0130)
- 40 mg Hyaluronidase (Sigma, H-3506)
- 0,4 mg DNAse (Sigma, DN-25)

III. Stopmedium:

50 ml Kulturmedium A mit Zusatz von:

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

III.3: Anlegen einer primären Sertoli-Zellkultur

Um eine mikrobielle Kontamination der Zellkultur zu verhindern, wurde bei der Präparation der Zellen und später bei der Arbeit mit den Zellkulturen besonders keimarm und, wenn möglich, steril gearbeitet. Die Präparation der Zellen und auch die spätere Behandlung der Zellkulturen erfolgte unter einer sterilen Cleanbank (Sicherheitswerkbank Klasse 2). Die verwendeten Einmalartikel (Pipettenspitzen, Skalpelle, Kunststoffröhrchen, Zellkulturschalen, Filter, Kanülen) waren steril. Das mehrmals zu benutzende Material (Meßzylinder, Meßbecher, Pinzetten usw.) wurde vor Beginn der Präparation bzw. vor Beginn der Arbeit

mit den Zellkulturen im Autoklaven bei 121 C° und 2 bar sterilisiert. Die verwendeten Kulturmedien und alle anderen Lösungen wurden durch Ultrafiltration (0,2 µM; Sigma) sterilisiert.

Die Sertoli-Zellkulturen wurden größtenteils nach den Methoden von Hadley et al. (1985) und Onoda et al. (1990) durchgeführt.

Arbeitsschritte bei der Präparation Sertoli-Zellen:

1. Präparation der Rattenhoden
2. Enzymatische Isolation der Sertoli-Zellen
3. Anlegen der Zellkultur
4. Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung
5. Überprüfung der Reinheit der Zellkultur

zu 1. Präparation der Rattenhoden:

Die Ratten wurden getötet, indem sie in einen geschlossenen Kunststoffbehälter gesetzt und zehn Minuten lang mit CO₂ begast wurden. Danach wurden die toten Ratten durch Eintauchen in 70%igen Ethanol äußerlich desinfiziert, um bei der folgenden Präparation eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Anschließend wurde die Bauchhöhle der Ratten inzidiert und die bei dieser Altersstufe noch nicht deszendierten Hoden entnommen. Die Hoden wurden anschließend in mit Gentamycin versetztem Gebrauchsmedium (2 ml Medium + 1 ml Gentamycin; Sigma, G-35279) gewaschen, die Tunica albuginea entfernt und der herausgeschabte Inhalt mit einem Skalpell zu feinem Brei zerkleinert.

zu 2. Enzymatische Isolation der Sertoli-Zellen:

Das breiartig zerkleinerte Hodengewebe wurde nun mit der Hilfe von Enzymen aufgespalten, um so einzelne Zellen zu gewinnen. Eines dieser Enzyme, die Kollagenase, spaltet das Kollagen der Interzellularverbindungen. Dabei wurden die einzelnen Zellen kaum geschädigt. Kollagenase ist in den oben aufgeführten Isolationsmedien A und B enthalten. Die Hyaluronidase trennt vorzugswei-

se kollagenreiche Zellverbände der Bindegewebszellen auf. Dieses Enzym ist nur im Isolationsmedium B enthalten. Beim Trennen der Zellverbände wurde DNA freigesetzt, die sehr viskös ist und damit eine Aggregation von einzelnen Zellen fördert. Um diese Aggregation zu stoppen wurde das Enzym DNase eingesetzt: die DNase hydrolysiert die freigesetzte DNA. Zum Ende der enzymatischen Isolation wurde das Enzym Kollagenase durch Rinderserumalbumin und einen Trypsin-Inhibitor gehemmt, um eine weitere enzymatische Spaltung zu verhindern, die über eine Trennung der Zellen von einander hinausgehen könnte. Anschließend erfolgte eine nochmalige mechanische Trennung der Zellen von einander, um möglichst viele einzelne Zellen zu erhalten.

Vorgehen:

1. Schritt:

- das zerkleinerte Hodengewebe wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) gegeben und in 20 ml Isolationsmedium A suspendiert.
- diese Suspension wurde in einem Schüttelwasserbad (37 C°) für 15 Minuten inkubiert.
- nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbad sedimentierten die Zellen bei Raumtemperatur für sieben Minuten, anschließend wurde der Überstand abgesaugt.

2. Schritt:

- Zugabe von 25 ml Stopmedium auf das zerkleinerte Hodengewebe und erneutes Sedimentieren der Zellen.
- Schütteln, danach abermals 7 Minuten bei Raumtemperatur sedimentieren und anschließend Absaugen des Überstandes

3. Schritt:

- zum Pellet wurde 20 ml Isolationmedium B dazu gegeben und gemischt

- danach wurde die Mischung für 30 Minuten in ein Schüttelwasserbad (37 C°) gestellt
- anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 500 U/min (35x g)
- danach wurde der Überstand abgesaugt

4. Schritt:

- auf das Pellet wurden 25 ml Stopplösung gegeben und gemischt
danach erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 500 U/min (35x g)
- anschließend wurde der Überstand abgesaugt

5. Schritt:

- zum Pellet wurde 20 ml Isolationsmedium B gegeben und gemischt
- danach wurde die Mischung 15 Minuten in ein Schüttelwasserbad (37 C°) gestellt
- anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 45 Sekunden bei 1000 U/min (130x g)
- danach wurde der Überstand abgesaugt

6. Schritt:

- zum Pellet wurden 30 ml Kulturmedium A gegeben und gemischt
- diese Mischung wurde in einen sogenannten „Potter“ gegeben und homogenisiert.
- im „Potter“ erfolgte daraufhin eine Homogenisierung der Mischung und mechanische Trennung der Zellen durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen des „Potterstabes“

7. Schritt:

- die durch die Homogenisierung entstandene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Nylonsieb (Falcon, Lincoln Park New Jersey, USA) filtriert, um so die Zellen mechanisch zu trennen
- die Zellen wurden über Nacht in Zellnährmedium mit Cytosin und 10% FCS

(Fötale Kälberserum) ausplattiert

- am nächsten Morgen wurde dann das Medium gewechselt
- am dritten Tag erfolgte dann die Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung (siehe 4.)

zu 3.: Anlegen der Zellkultur:

Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der Zellen pro ml mit einer Zählkammer ermittelt. Es wurde ausgerechnet mit welcher Menge Kulturmedium A die Zellsuspension verdünnt werden mußte, um eine Zelldichte von 10^6 Zellen pro Milliliter Suspension zu erreichen. Anschließend wurde ein Milliliter Suspension in jede runde Vertiefung (Well) einer 24er-Well-Kulturplatte (Falcon, Primaria, USA) gegeben (entsprechend 10^6 Zellen/Well bzw. $0,5 \times 10^6$ Zellen/cm²). Die einzelnen Wells dieser Platten haben eine chemisch modifizierte Oberfläche (positive Ladung), wodurch sich die (leicht negativ geladenen) Zellen besser anheften.

Das im Kulturmedium A enthaltene Mitosezellgift Cytosin-Arabinosid hemmt die Proliferation und unterdrückt so das Wachstum von kontaminierenden Zellpopulationen (hauptsächlich Peritubularzellen). Das Mitosezellgift beeinflusst die Sertoli-Zellen wenig, da diese bei 18 Tage alten Ratten keine Mitosen mehr durchlaufen (Russel et al., 1993). Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Allerdings enthielt das neue Medium kein Cytosin-Arabinosid mehr (Kulturmedium B).

zu 4. Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung:

48 Stunden nach Anlegen der Kultur wurden die Zellen mit einer hypotonen Lösung (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) behandelt. Im Gegensatz zur Osmolarität des normalen Zellkulturmediums (300 mOsmol/kg) betrug die Osmolarität dieses Tris-Puffers nur 90 mOsmol/kg. Man spricht von einem sogenannten „hypotonem Schock“; dieser führt dazu, daß die in der Zellkultur vorhandenen Keimzellen hauptsächlich Spermatogonien und frühe Spermatozyten absterben (Galdieri et al., 1981). Die Sertoli-Zellen nehmen dagegen kaum Schaden.

Durchführung:

- 240 mg Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Sigma, Nr. T6791) wurden in 100 ml aqua dest. aufgelöst
- die 20 mM Tris-Lösung wurde mit HCl (2N) auf pH 7,5 titriert
- anschließend erfolgte eine sterile Filtration der Lösung
- danach wurde die Lösung auf 34 °C im Schüttelwasserbad erwärmt
- das Medium wurde von den Zellkulturschalen abgesaugt
- pro Well wurde 1 ml Tris-HCl zugegeben
- die Zellkulturschalen wurden für fünf Minuten inkubiert
- der Überstand wurde abgesaugt
- die Zellen wurden mit 1 ml Gebrauchsmedium (siehe oben) pro Well gewaschen
- pro Well wurde nun 1 ml Kulturmedium B zugegeben
- am Ende dieser Behandlung wurden die 24-Well-Zellkulturplatten wieder in den Brutschrank gestellt.

zu 5. Überprüfung der Reinheit der Zellkultur:

Zeitgleich mit den 24-Well-Platten wurden sterile Objektträger mit Zellsuspension beschichtet. Diese Objektträger wurden zur histologischen und morphologischen Überprüfung der Reinheit der Zellkultur verwendet. Auf jeden teflonbeschichteten 8-Kammer-Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden 100 µl Sertoli-Zellsuspension gegeben (400.000 Zellen/ml) und für sechs Tage in einem Brutschrank bei 34 °C in angefeuchteter 5%iger CO₂ Atmosphäre aufbewahrt. Ein Wechsel des Mediums auf dem Objektträger erfolgte jeden zweiten Tag nach dem Ansatz der Kultur. Nach 48 Stunden erfolgte genau wie bei den 24-Well-Platten ein hypotoner Schock (nähere Erläuterungen siehe Kapitel 4.). Am sechsten Tag nach Anlegen der Kultur wurde dann die Sertoli-Zellsuspension auf die Anwesenheit von fremden Zellpopulationen untersucht. Als Untersuchungsmethoden dienten hier die immunhistochemische Färbung, die spezifische Färbung und die mikroskopische Untersuchung. Die Zellen auf dem Objektträger wurden auf das Vorhandensein von Leydig-Zellen, peritubulären Myoidzellen und Sertoli-Zellen hin untersucht:

a) Nachweis von Leydig-Zellen:

Der Nachweis von Leydig-Zellen erfolgt durch die Färbung nach Welsh et al. (1975) auf 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, ein spezifisches Enzym der Steroidgenese.

Zusammensetzung des Färbemediums:

- 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;N-6876, Sigma); 0,25 mg NBT /0,25 ml aqua dest.
- 0,5 ml α -Nicotinamid-Adenindinucleotid (NAD) (2,5 mg / 0,5 ml Aqua dest.; H-7825, Sigma)
- 0,25 ml Etiocholan-3 β -ol-17-one (E-5255; Sigma) 0,4mg Etiocholan-3 β -ol-17-one / 1 ml Propyleneglycol-Ethanol) (1:1;V/V)

Der pH-Wert wurde auf 7,7 eingestellt mit circa 200 μ l 0,1 M Na₂HPO₄.

Das Kontrollfärbemedium enthielt Aqua dest. anstelle von Nitro-Blue-tetrazolium. Das Färbemedium wurde auf die mit Zellsuspension beschickten Objektträger gegeben. In einer Feuchtkammer wurden diese 40 Minuten lang inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Objektträger mit PBS gewaschen.

b) Nachweis von peritubulären Myoidzellen:

Die Sertoli-Zellkulturen wurden, neben den oben beschriebenen Nachweisen, auch auf das Vorhandensein von Peritubular-Zellen überprüft. Dies geschah über eine entsprechende immunzytochemische Färbung mit einem für α -Isoactin spezifischen Antikörper, da α -Isoactin ausschließlich in den vasikulären Zellen der glatten Muskulatur in den Peritubular-Zellen der Tubuli seminiferi vorkommt. In Fibroblasten, Sertoli-Zellen oder Keimzellen tritt α -Isoactin nicht

auf (Franke et al., 1980; Tung und Fritz, 1990).

Durchführung:

- Ansetzen des TBS-Puffers: 50 ml 1M Tris-HCL Lösung + 8,7g NaCl mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und auf pH 7,6 einstellen
- nach erfolgter Fixierung der Zellen auf dem Objektträger erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit TBS-Puffer pH 8,2 (0,05M Tris; 0,15M NaCl) für jeweils 10 Minuten
- danach wurden endogene Peptidasen mit 3%igem H₂O₂ blockiert
- anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten mit TBS-Puffer gewaschen
- Abblocken unspezifischer Bindungen durch Protein-Blockierungsreagenz, serumfrei (Dako)
- Inkubation mit dem 1. Antikörper: Anti-Muskel-Actin (Maus), (Dako), 1:1000 in TBS-Puffer über Nacht bei 4 °C
- Negativkontrolle mit Mausserum (Dako), 1:1000 in TBS-Puffer
- dreimaliges Waschen der Zellen mit TBS für jeweils fünf Minuten
- Inkubation mit dem 2. Antikörper: Kaninchen-Anti-Maus-HRP, (Dako), 1:200 in TBS-Puffer für 45 Minuten
- anschließend wurden die Zellen zweimal für jeweils fünf Minuten mit TBS-Puffer gewaschen
- Waschen der Zellen mit Tris (Sigma) (pH 7,5)
- danach erfolgte eine Visualisierung. Dazu wurde eine Tablette DAB (D-5905; Sigma) in 15ml Tris (Sigma) gelöst. Anschließend erfolgte eine Filtration (0,22µm) und die Zugabe von 12µl 30%igem H₂O₂ (frisch angesetzt).
- Spülung der Zellen mit Aqua dest.
- Kernfärbung mit Hämatoxin nach Mayer
- dreimaliger Entwicklungsvorgang mit Leitungswasser
- zum Schluß erfolgte ein letztes Waschen der Zellen mit Aqua dest.
- die Zellen wurden mit Puffer bedeckt, um sie bei der mikroskopischen Betrachtung vor Austrocknung zu schützen

c) Nachweis von Sertoli-Zellen:

Durch Anfärbung des intermediären Filamentproteins Vimentin wurden Sertoli-Zellen dargestellt (Wrobel et al., 1995). Vimentin ist ein Strukturprotein der Zellen, es tritt in Form von Filamenten auf. Alle somatischen Zellen besitzen Vimentin. Keimzellen besitzen daher kein Vimentin, das angefärbt werden könnte (Aumüller et al., 1992; Wrobel et al., 1995).

Peritubular- und Leydig-Zellen wurden über spezifische Methoden nachgewiesen, Keimzellen (Spermatogonien und Spermatozyten, andere gibt es bei 18-Tage alten Ratten noch nicht) kann man mikroskopisch erkennen. Der große Rest müssen dann Sertoli-Zellen sein.

Ablauf der immunhistochemischen Anfärbung:1. Tag:

- nach Absaugen des Mediums wurde mit PBS (pH 7,5) gespült
- danach erfolgte eine Inkubation in 3%igem H₂O₂ für fünf Minuten bei Raumtemperatur
- anschließend wurden die Objektträger für je dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen
- die Objektträger wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert in normalem Kaninchenserum [(Dako; Wiesentheid, Deutschland, X-902) 1:5 in PBS verdünnt plus 5% ; Rinderserumalbumin (BSA; Sigma A-8022)]
- über Nacht wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper inkubiert (1:1.000 Monoklonaler Anti-Vimentin-Antikörper von Mäusen (V-6630; Sigma) PBS plus 1% Rinderserumalbumin (BSA; Sigma A8022), (bei 4 °C)

2. Tag:

- die Objektträger wurden dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen
- anschließend wurden sie für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert mit

dem zweiten Antikörper [Peroxidase-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus-IgG (P-260; Dako) 1: 100 mit PBS plus 1% BSA)

- die Objektträger wurden dreimal für fünf Minuten dreimal in PBS gewaschen
- danach wurden sie einmal in Tris-HCl (pH 7,3) fünf Minuten lang gewaschen
- anschließend erfolgte eine Inkubation in Diaminobenzidin (DAB [(D-5905; Sigma) eine Tablette in 15 ml Tris-HCl plus 1% NiCl₂ aufgelöst])

Mit Hilfe der oben beschriebenen biochemischen und histochemischen Methoden konnte eine Reinheit der Zellkultur von annähernd 90-95% nachgewiesen werden. Zu diesem Ergebnis kommt man ebenfalls wenn man mit dem Mikroskop die Morphologie der Sertoli-Zellkultur untersucht.

III.4: Testung der Auswirkung der ausgewählten Noxen auf Sertoli-Zellen

Am sechsten Tag der Kultur erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Metallsalze: Kupfersulfat (CuSO₄); Cis-Platin (Pt(NH₃)₂Cl₂); Quecksilberdinitrat (Hg(NO₃)₂·2H₂O) oder Kaliumnitrat (KNO₃). Von Kupfersulfat, Quecksilbernitrat und Kaliumnitrat wurde eine hochkonzentrierte Stammlösung mit PBS hergestellt. Von Cis-Platin wurde eine Stammlösung direkt im Medium (Kulturmedium A) hergestellt, da Cis-Platin schlechter löslich ist als Kupfersulfat und Quecksilbernitrat. Hinzukommt noch, daß Cis-Platin ein Zytostatikum und daher sehr giftig ist. Durch das direkte Auflösen im Medium und die einfachere Verdünnung wurde der Kontakt mit diesem Gift reduziert, zudem ist diese Vorgehensweise zeitsparender. Die Stammlösungen wurden für jede Versuchsdurchführung frisch angesetzt, um eine Konzentrationsänderung durch eventuelles Ausfällen bzw. Bindung an Mediumbestandteile zu vermeiden.

Bei allen Noxen wurden die Stammlösungen und die Kulturmedien zuvor gefiltert (0,2µm Filter; Sigma).

Verdünnungsreihe für Kupfersulfat:

Stammlösung 5 mM ->39,9 mg /50 ml PBS=5 mM

Stammlösung 0,5 mM ->1ml Stammlösung 5 mM +9 ml PBS=0,5 mM

Stammlösung 0,05 mM ->1ml Stammlösung 0,5 mM +9 ml PBS=0,05 mM

Am sechsten Tag nach Anlegen der Primärkultur erfolgte ein Mediumwechsel. Das alte verbrauchte Medium wurde abgesaugt und 500µl Kulturmedium C pro Well dazu gegeben. In dieses Medium wurde eine entsprechende Menge der Stammlösungen hineingegeben, so daß sich die in Tabelle1 angegebenen Konzentrationen ergaben.

Tab. 1: Verdünnungsreihe für Kupfersulfat

Die nachfolgende Tabelle zeigt, welche Mengen der jeweiligen Stammlösungen (0,05mM; 0,5mM; 5mM) in die Wells zum Medium gegeben werden mußten, um die gewünschten Kupfersulfat-Endkonzentrationen (in µM) zu erreichen.

Endkonzentration der Noxe pro Well: Zugabe von Stammlösung:

0,1 µM	1 µl	von Stammlösung (0,05 mM)
0,5 µM	5 µl	von Stammlösung (0,05 mM)
1 µM	1 µl	von Stammlösung (0,5 mM)
3 µM	3 µl	von Stammlösung (0,5 mM)
6 µM	6 µl	von Stammlösung (0,5 mM)
9 µM	9 µl	von Stammlösung (0,5 mM)
12 µM	12 µl	von Stammlösung (0,5 mM)
25 µM	2,5 µl	von Stammlösung (5 mM)
50 µM	5 µl	von Stammlösung (5 mM)
100 µM	10 µl	von Stammlösung (5 mM)

Verdünnungsreihe von Cis-Platin:

Eine 100 µM-Stammlösung wurde direkt im Kulturmedium C frisch angesetzt. Diese wurde dann mit Kulturmedium C entsprechend verdünnt, so daß folgende Konzentrationen der Noxe in die Wells gegeben wurden: 0,78 µM; 1,56 µM; 3,125 µM; 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM; 100 µM. Von diesen Lösungen wurden jeweils 500 µl in jedes Well gegeben, nachdem zuvor das alte Medium abgesaugt worden war.

Verdünnungsreihe von Quecksilberdinitrat:

Stammlösung 1 mM → 3,24 mg $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ / 10 ml PBS

Stammlösung 0,1 mM → 1 ml Stammlösung 1 mM + 9 ml PBS = 0,1 mM

Am sechsten Tag der Kultur erfolgte ein Mediumwechsel. Es wurden, wie bei Kupfersulfat schon beschrieben, nach dem Absaugen des alten Mediums, 500µl Kulturmedium C pro Well dazu gegeben. In dieses Medium wurde eine entsprechende Menge der Stammlösung hineingegeben, so daß die in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen entstanden:

Tab.2: Verdünnungsreihe von Quecksilberdinitrat

Die nachfolgende Tabelle zeigt, welche Mengen der jeweiligen Stammlösungen (0,1mM; 1mM) in die Wells zum Medium gegeben werden mußten, um die gewünschten Quecksilberdinitrat-Endkonzentrationen (in µM) zu erreichen.

Endkonzentration der Noxe pro Well: Zugabe von Stammlösung:

0,99 µM	5 µl von Stammlösung (0,1 mM)
1,9 µM	10 µl von Stammlösung (0,1 mM)
3,85 µM	20 µl von Stammlösung (0,1 mM)
5,96 µM	3 µl von Stammlösung (1 mM)
7,94 µM	4 µl von Stammlösung (1 mM)
9,90 µM	5 µl von Stammlösung (1 mM)

14,78 μM	7,5 μl von Stammlösung	(1 mM)
19,60 μM	10 μl von Stammlösung	(1 mM)
29,12 μM	15 μl von Stammlösung	(1 mM)
47,62 μM	25 μl von Stammlösung	(1 mM)

Verdünnungsreihe von Kaliumnitrat:

Stammlösung 1 mM \rightarrow 1,01 mg KNO_3 / 10 ml PBS

Am sechsten Tag nach Anlegen der Primärkultur erfolgte ein Mediumwechsel. Das alte verbrauchte Medium wurde abgesaugt und 500 μl Kulturmedium C pro Well dazu gegeben. In dieses Medium wurde eine entsprechende Menge der Stammlösungen hineingegeben, so daß sich die in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen ergaben.

Tab. 3: Verdünnungsreihe für Kaliumnitrat

Die nachfolgende Tabelle zeigt, welche Mengen der Stammlösung (1 mM) in die Wells zum Medium gegeben werden mußten, um die gewünschten Kaliumnitrat-Endkonzentrationen (in μM) zu erreichen

Endkonzentration der Noxe pro Well: Zugabe von Stammlösung:

5,96 μM	3 μl von Stammlösung	(1 mM)
9,9 μM	5 μl von Stammlösung	(1 mM)
19,6 μM	10 μl von Stammlösung	(1 mM)
29,12 μM	15 μl von Stammlösung	(1 mM)
47,62 μM	25 μl von Stammlösung	(1 mM)

Verdünnungsreihe von FSH:

FSH-Stammlösung: 100 mg FSH pro 1 ml Aqua dest.

Am sechsten Tag nach Anlegen der Primärkultur erfolgte ein Mediumwechsel. Das alte verbrauchte Medium wurde abgesaugt und 3000 μl Kulturmedium C pro Well dazu gegeben. In dieses Medium wurde eine entsprechende Menge

der Stammlösungen hineingegeben, so daß sich die in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen ergaben.

Tab. 4: Verdünnungsreihe für FSH

Die nachfolgende Tabelle zeigt, welche Mengen der Stammlösung (1mM) in die Wells zum Medium gegeben werden mußten, um die gewünschten FSH-Endkonzentrationen (in ng/ml) zu erreichen.

Endkonzentration der Noxe pro Well: Zugabe von Stammlösung:

50 ng FSH/1ml	1,5µl von Stammlösung (1 mM)
100 ng FSH/1ml	3µl von Stammlösung (1 mM)
150 ng FSH/1ml	4,5µl von Stammlösung (1 mM)
200 ng FSH/1ml	6 µl von Stammlösung (1 mM)
250 ng FSH/1ml	7,5µl von Stammlösung (1 mM)

Pro Versuchsdurchgang wurden vier Zellkulturplatten (24-Well-Platten) mit den Noxen inkubiert. Davon wurden zumeist zwei Platten mit den höheren Konzentrationen der Noxen und zwei mit dem niedrigeren Konzentrationsbereich der Noxen beschickt.

Die Belegung der 24-Well-Zellkulturplatten erfolgte nach dem in Tabelle 5 gezeigtem Schema.

Tab. 5: schematische Darstellung der Belegung einer 24-Well-Zellkulturplatte mit den eingesetzten Noxen

In jedes Well einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden jeweils Noxen in vorher definierten Konzentrationen eingebracht. Zur Kontrolle der Versuchsergebnisse wurde in der Mitte der Platte eine Kontrolle aufgebracht. Diese Kontrolle bestand aus 500 µl Kulturmedium C.

Noxe (Konz.a)	Noxe (Konz.b)	Kontrolle	Noxe (Konz.c)	Noxe (Konz.d)	Noxe (Konz.e)
Noxe (Konz.a)	Noxe (Konz.b)	Kontrolle	Noxe (Konz.c)	Noxe (Konz.d)	Noxe (Konz.e)
Noxe (Konz.a)	Noxe (Konz.b)	Kontrolle	Noxe (Konz.c)	Noxe (Konz.d)	Noxe (Konz.e)
Noxe (Konz.a)	Noxe (Konz.b)	Kontrolle	Noxe (Konz.c)	Noxe (Konz.d)	Noxe (Konz.e)

Zur Kontrolle der Versuchsergebnisse wurde in der Mitte der Platte eine Kontrolle aufgebracht. Diese Kontrolle bestand aus 500 µl Kulturmedium C. Die Kontrolle wurde bewußt in die mittleren Wells der Platte gegeben, um eventuell am Rand der Platte auftretende Verfälschungen, die durch Verdunstung oder Temperatureffekte auftreten können, auszuschließen.

Nach der Beschickung der Zellkulturplatten mit den jeweiligen Noxen, beziehungsweise den Kontrollen wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank bei 34 C° in feuchter 5 %iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Well zweimal 250 µl vom Überstand abgenommen, für eine später erfolgende Laktat- und Pyruvatbestimmung abgefüllt, fünf Minuten bei 95 C° erhitzt und bei -20 C° eingefroren (weiteres Vorgehen siehe Laktat-, Pyruvat- und Inhibin-Assay). Mit den für die Inhibinbestimmung bestimmten Proben wurde genauso verfahren, nur daß sie nicht auf 95 C° erhitzt wurden.

Um einen Bezugswert für die Laktat-, Pyruvat- und Inhibinbestimmung zu haben, wurde mit den noch am Boden der Wells anhaftenden Sertoli-Zellen eine Proteingehaltbestimmung (siehe Proteinbestimmung) durchgeführt. Bei weiteren Versuchsreihen wurden keine Überstände abgenommen, sondern ein Vitalitätstest (siehe MTT-Assay) durchgeführt.

Pro Metallsalz und Konzentrationsreihe wurden immer zwei Zellkulturplatten pro Versuchstag gemessen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

III.5: Protein-Assay

Um einen Bezugswert für die Laktat-, Pyruvat- und Inhibinbestimmung zu haben, wurde der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben gemessen. Zur Proteinbestimmung wurde der BIO-Rad Protein Assay (55-0116; Hercules, CA, USA) verwendet. Dieser Assay basiert auf Grundlage der Untersuchungen von Lowry (1951). Die Reaktion von Proteinen mit alkalischer Kupfertartrat-Lösung und Folinsäure ist die chemische Grundlage dieses Assays.

Reagenzien:

- NaOH (0,5M) mit 0,1%SDS (g/l) (Natriumdodecylsulfat, Serva)
- Reagenz A: alkalische Kupfertartrat-Lösung (BIO-Rad Protein Assay)
- Reagenz B: Folinsäure (BIO-Rad Protein Assay)
- Proteinstammlösung: Rinderserumalbumin (BSA; Albumin, Bovine, A-7030; Sigma) 1,4 mg/ml gelöst in NaOH/SDS

Herstellung der Proteinstandardlösungen:

- 1400 µg BSA /ml -> 100 µl Proteinstammlösung
- 1000 µg BSA /ml -> 100 µl Proteinstammlösung + 40 µl NaOH + PBS
- 600 µg BSA /ml -> 100 µl Proteinstammlösung + 133 µl NaOH + PBS
- 200 µg BSA /ml -> 100 µl Proteinstammlösung + 600 µl NaOH + PBS

Vorgehen:

Zuerst wurde das Kulturmedium von den Platten entfernt und diese dann auf Filterpapier trockengeklopft. Danach wurde zum Auflösen der Proteine und Zellmembranen in jedes Well 200 µl NaOH (0,5M) mit 0,1 %SDS (g/l) gegeben. Die Platten wurden zwei Stunden im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden pro Well zweimal 20 µl für eine Doppelbestimmung entnommen und auf

eine Mikrotiterplatte gegeben. Von den vorher hergestellten Standardlösungen wurden ebenfalls zweimal 20 µl auf die Mikrotiterplatte gegeben, um nach der Messung eine Eichkurve/Standardkurve zu erhalten. Zu jeder Probe bzw. Standardlösung wurden 200 µl Reagenz A hinzugefügt. Der im Reagenz enthaltene Farbstoff bindet unspezifisch an die Aminogruppen der in den Proben bzw. Standardlösungen enthaltenen Proteine. Nach Zugabe von je 25 µl Reagenz B pro Well wurde eine Farbreaktion ausgelöst, die um so stärker ausfällt, je mehr Protein sich im Well befindet. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die Platte 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde bei 690 nm im MTP-Reader die Absorption gemessen. Der Proteingehalt in den Proben wurde mit Hilfe der Standardlösungen rechnerisch ermittelt. Die Standardkurve der Standardlösungen verlief im Bereich von 200 µg/ml bis 1400 µg/ml linear.

III.6: MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde für die Bestimmung der Vitalität der Sertoli-Zellen benutzt.

Reagenzien:

- PBS+Ca²⁺ (Herstellung siehe unten)
- MTT (gelber wasserlöslicher Farbstoff -> 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid; Serva)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva) ->Lösungsmittel

Herstellung der PBS+Ca²⁺-Lösung:

- eine Tablette Phosphat Buffered Saline Tablets (PBS 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) wurde in 100 ml Aqua dest gelöst
- dazu werden 21 mg Kalziumchlorid (mit 2H₂O) hinzugefügt
- der pH-Wert wurde mit einigen Millilitern Phosphorsäure oder NaOH auf pH7,3 eingestellt
- anschließend wurde die Lösung steril filtriert

Vorgehen:

Zuerst wurde die MTT-Lösung angesetzt. Dazu wurden 5 mg MTT-Pulver in 1ml PBS+Ca²⁺ in einem Falcon-Röhrchen gelöst. Diese Mischung wurde zum vollständigen Lösen in ein Ultraschallbad gehalten.

Unter einer Cleanbank wurde nun das Medium aus den Wells der 24-Zellkulturplatte abgesaugt. Vorversuche zeigten, daß es sinnvoll ist, ein Waschen der Zellen als Zwischenschritt einzuführen: 500µl PBS+Ca²⁺ wurden in

jedes Well gegeben und wieder abgesaugt. Das Waschen sollte dazu dienen, das Nährmedium der Zellkultur sowie das eingesetzte Schwermetall restlos zu entfernen und somit zu gewährleisten, daß die Inhaltsstoffe des Nährmediums nicht in die Messungen mit eingehen.

Anschließend wurde jeweils 1 ml PBS+Ca²⁺ (vorher auf 34 °C erwärmt) und 100 µl MTT-Lösung in jedes Well gegeben. Anschließend wurden die Zellkulturplatten für eine Stunde bzw. für zwei Stunden bei 34 °C im Brutschrank inkubiert. Durch die längere Einwirkzeit des bei diesem Assays verwendeten MTT wurde so eine höhere Färbung erzielt. Somit konnten zuverlässigere Messergebnisse erzielt werden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten aus dem Brutschrank genommen und der Überstand aus den Wells wurde abgesaugt. Anschließend wurde 500 µl DMSO pro Well dazu gegeben. Die Platten wurden schließlich für 30-60 Sekunden geschüttelt, damit eine vollständige Lösung des entstandenen blauen Farbstoffes erfolgt. DMSO stoppt gleichzeitig auch die Farbumwandlungsreaktion.

Pro Well wurden für eine Doppelbestimmung zweimal 200 µl entnommen und in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurde die Absorption im MTP-Reader bei 550 nm gegen 620 nm als Referenz gemessen.

Ablauf der chemischen Reaktion:

Der wasserlösliche gelbe Farbstoff MTT wurde mittels mitochondrialer Dehydrogenasen zu blau-violett wasserunlöslichem Farbstoff (Formazan) reduziert. Da diese Farbumwandlung von der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen abhängig ist, geschieht dies nur in vitalen Zellen. Je mehr blau-violetter Farbstoff in den Wells enthalten ist, desto mehr bzw. desto vitaler waren die Zellen in den Wells. Die verwendeten Sertoli-Zellen wurden aus 18-21 Tage alten Ratten isoliert. Zu diesem Zeitpunkt proliferieren diese Zellen nicht mehr (Weber et al., 2002), so daß der Farbumschlag ausschließlich von der Vitalität der Zelle, d.h. der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase abhängt. Die Intensität der Blaufärbung kann photometrisch gemessen werden.



Die Vitalität der Zellen wurde mit folgender Formel auf die jeweilige Kontrolle normiert:

$$\text{Vitalität (in \%)} = \text{Extinktion (Probe)} / \text{Extinktion (Kontrolle)} \times 100$$

Formel 4: Formel zur Berechnung der Zellvitalität in %

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten, wie hoch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase in mit Metallionen behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (ohne Noxen) war. Die Aktivität dieses Enzyms diente hier als Marker für die Vitalität der Zellen.

III.7: Laktat-Assay

Der von Noll (1984) beschriebene Laktatassay wurde für die Messung der Laktatausschüttung bei Sertoli-Zellen entsprechend verändert. Dies war notwendig, da die Anzahl der Proben groß war und das Volumen der einzelnen Probe gering. Wie in V.4. beschrieben wurden pro Well zweimal 250 µl vom Überstand abgenommen und für eine spätere Laktat- und Pyruvatbestimmung in Eppendorfcups abgefüllt, für fünf Minuten erhitzt und bei -20°C eingefroren. Aufgrund der zwischen Cupinnenwand und Probenflüssigkeit wirkenden Adhäsionskräfte bleibt bei Entnahme der Proben aus den Cups immer etwas Probenflüssigkeit auf der Cup Innenwand haften. Zudem wirken innerhalb der zurückbleibenden Flüssigkeitstropfen Kohäsionskräfte die ebenfalls eine vollständige Entleerung der Cups unmöglich machen. 80 µl Probevolumen kann man aber in jedem Fall aus den Cups entnehmen. Das Probevolumen in der originalen Versuchsvorschrift von Noll (1984) beträgt 200 µl. Entsprechend mußten nun die Volumina der anderen für den Assay verwendeten Reagenzien reduziert werden, damit die Volumenverhältnisse der einzelnen Flüssigkeiten aufeinander abgestimmt waren. Die Wartezeit von zehn Minuten bis zum Messen der Extension wurde hingegen beibehalten, ebenso die Wellenlänge von Hg 340 nm.

Im folgendem wird nun die genaue Versuchsdurchführung erläutert.

Reagenzien:

- destilliertes Wasser
- β-NAD [nicotinamide-adenin dinucleotid] (H-7825; Sigma)
- GPT (Glutamic-Pyruvic-Transaminase 1000 units, from porcine heart, entspricht der L-Aminotransferase (G-9880; Sigma))
- LDH (L-Lactic-Dehydrogenase 2500 units (L-2518; Sigma))
- NaOH (1 mol/l) (Merck, Darmstadt)
- L-(+)-Glutaminsäure (Merck, Nr. 1.00241)
- L(+)-Laktat (H-5706; Sigma)
- KH₃PO₄

- KH_2PO_4
- Na-Pyruvat

Vorgehen:

Für die Laktatbestimmung mußten zuvor folgende Lösungen angesetzt werden:

Glutamatpuffer:

- 56,75 g L-(+)-Glutaminsäure wurden in 1N 380 ml NaOH gelöst und auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese neutrale L-(+)-Glutamatlösung (0,77 mol/l) wurde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.
- einen Tag vor der Durchführung des Laktat-Assays wurde die neutrale L-(+)-Glutamatlösung in den Kühlschrank gestellt, um sie langsam aufzutauen.
- am Tag des Laktat-Assays wurden zur Herstellung des Glutamatpuffers (0,52 mol Endkonzentration /l, pH 8,9) 20 ml neutrale Glutamatlösung mit 9,4ml NaOH (1 mol/l) gemischt.

Laktatstandardlösungen:

- 16 mg L(+)Laktat wurden in 100 ml Kulturmedium B (siehe Anlegen der Zellkultur) gelöst
- ein Teil dieser Lösung wurde 1:1 mit Aqua dest. verdünnt, so daß man einen Standard mit halber Konzentration erhielt.

Kaliumphosphatpuffer:

- 10mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 50% Glycerin

NAD-Lösung:

- 20 mg β -NAD [Nicotinamide-Adenin dinucleotid] (H-7825; Sigma) in 1 ml destilliertem Wasser lösen

Versuchsablauf:

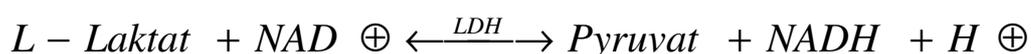
Zuerst wurde bei Raumtemperatur in jede 1 ml Kunststoffküvette 700 µl Aqua dest. und 250 µl Glutamatpuffer gegeben. Danach wurde 30 µl NAD-Lösung in die 1 ml-Kunststoffküvetten pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Reagenzien gut durchmischt wurden. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben (80 µl) in die Küvetten gegeben. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Um einen Referenzwert zu erhalten, wurden zwei Küvetten mit Aqua dest. (Blank), vier andere mit zwei Laktatstandardlösungen bekannter Konzentrationen (80 bzw. 160 mg/ml) gefüllt. Diese Werte dienen als Grundlage für die spätere Berechnung der Laktatkonzentration in den Proben. Des Weiteren war es möglich, mit diesen Werten die ermittelten Ergebnisse auf ihre Korrektheit zu überprüfen.

Nun wurden 10 µl GPT in jede Küvette dazu gegeben. In die Küvette des Blanks wurde Kaliumphosphatpuffer gegeben. Nach zehn Minuten wurde die Extension (E_1) im Photometer gemessen (bei 340 nm). Nach der Messung wurden 11 µl LDH in jede Küvette gegeben und gut vermischt. Nach 60 Minuten wurde erneut die Extension (E_2) im Photometer gemessen.

Ablauf der chemischen Reaktion:

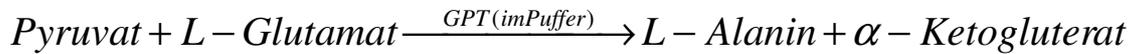
Der durchgeführte Laktat-Assay ist ein gekoppelter Enzymassay. Die Enzymreaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wurde L-Laktat und NAD^+ durch L-Laktatdehydrogenase (LDH) zu Pyruvat, NADH und H^+ oxidiert.



Formel 5: Reaktionsgleichung der Oxidation von L-Laktat mit NAD^+ zu Pyruvat und NADH und H^+

Die NADH Zunahme ist der Laktatkonzentration direkt proportional und kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden. Das Gleichgewicht dieser Reak-

tion liegt auf der Seite des Laktats, deswegen muß in einer Folgereaktion das entstehende Pyruvat mittels GPT in Gegenwart von L-Glutamat (im Puffer) in α -Ketoglutarat umgewandelt werden.



Formel 6: Reaktionsgleichung der Umwandlung von Pyruvat mit L-Glutamat zu L-Alanin und α -Ketoglutarat mittels GPT= Amino-Alanin-Transferase (ATC).

Berechnung der Laktatkonzentration:

E_1 (gemessene Extinktion vor Zugabe der LDH)

E_2 (gemessene Extinktion nach Zugabe der LDH)

Extinktionsdifferenz $\rightarrow \Delta E = E_2 - E_1$

c = Laktatkonzentration = zu ermittelnde Größe

V = Testvolumen [ml] = 1,081 ml

v = Probevolumen [ml] = 0,080 ml

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

d = Schichtdicke [cm] = 1 cm

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

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times dv \times 1000} \times \Delta E [g/l]$$

Formel 7: Konzentrationsgleichung zur Berechnung der Laktatkonzentration

Bei jedem Versuchsdurchlauf wurden vier Proben mit zwei bekannten Konzentrationen (\rightarrow 80 bzw. 160 mg/ml) zur Kontrolle der Meßergebnisse mitbestimmt. Die Messungen verliefen im Konzentrationsbereich von 2 mg L(+)-Laktat/100ml bis 20 mg L(+)-Laktat/100 ml linear.

III 8.: Pyruvat-Assay

Der von Czok und Lamprecht (1974) beschriebene Pyruvat-Assay wurde für die Messung der Pyruvatausschüttung bei Sertoli-Zellen entsprechend verändert. Genau wie bei dem oben dargestellten Laktat-Assay war dies notwendig, da die Anzahl der vorliegenden Proben groß war und das Volumen der einzelnen Probe gering (250 µl).

Da kein Probevolumen von 0,8 ml zur Verfügung stand, wie in der Originalvorschrift von Czok und Lamprecht (1974), wurde versucht mit weniger auszukommen. Wie mit Hilfe der zur Kontrolle eingesetzten Standardlösungen herausgefunden wurde genügt ein Probevolumen von 0,2 ml, obwohl dies nur ein Viertel des Originalvolumens von Czok und Lamprecht (1974) beträgt. Es war nicht möglich, daß von allen verwendeten Reagenzien nur ein Viertel der im Original-Assay eingesetzten Volumina genommen wurde, da zur Messung im Photometer ein bestimmtes Gesamtvolumen benötigt wurde. In den hier verwendeten 1 ml Küvetten muß das Volumen entsprechend hoch sein, damit der Meßstrahl, der immer aus einer Öffnung in einer bestimmten Höhe tritt, auf die zu messende Flüssigkeit trifft.

Die eingefrorenen Pyruvatstandardlösungen dürfen nicht länger als zwei Wochen verwendet werden. Vorversuche zeigten, daß sich nach Ablauf von zwei Wochen die Konzentration änderte und sich diese Lösungen somit nicht mehr als Vergleichswerte eigneten.

Materialien und Reagenzien:

- β -NADH: 10 mg NADH-Na₂ (NADH, disodium salt gerade, 100 %; Nr. 83749127; Boehringer, Ingelheim)
- LDH (L-Laktatdehydrogenase 2500 units (L-2518; Sigma)
- Triäthanolaminhydrochlorid (Nr. 45281720; Boehringer)
- EDTA (Nr. KD 3564718; Merck)

- NaOH (2N)
- K_2HPO_4
- KH_2PO_4
- Na-Pyruvat
- Pyruvat (Mononatriumsalz, kristallin, Nr. 8345102589; Boehringer)

Vorgehen:

Vor Beginn der Messungen mußten folgende Lösungen angesetzt werden:

Triäthanolamin-Puffer (0,5 M; pH=7,6):

- 23,3g Triäthanolaminhydrochlorid wurden in circa 200 ml Aqua dest. gelöst
- 0,47g EDTA (Komplexbildner der Metallionen bindet) wurden zu der Lösung hinzugefügt
- mit circa 20 ml 2N NaOH wurde die Lösung auf pH 7,6 eingestellt
- Anschließend wurde die gesamte Lösung mit Aqua dest. ad 250 ml aufgefüllt

Kaliumphosphatpuffer:

10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5 in 50% Glycerin lösen

Pyruvatstandardlösungen:

- 11 mg Pyruvat wurden in 100 ml Triäthanolamin-Puffer gelöst.
- ein Teil der hergestellten Pyruvatstandardlösung wurde nun um die Hälfte mit Triäthanolamin-Puffer verdünnt -> 5,5 mg Pyruvat /100 ml Triäthanolamin-Puffer
- Vorversuche hatten gezeigt, daß sich nach Ablauf von zwei Wochen die Konzentration der Pyruvatstandardlösungen änderte und sich diese Lösungen somit nicht mehr als Vergleichswerte eigneten. Deshalb dürfen die Pyruvatstandardlösungen nicht länger als zwei Wochen verwendet werden.

Zuerst wurden 10 mg β -NADH-Pulver in 2 ml Aqua dest. gelöst. Danach wurden 10 μ l LDH mit 90 μ l Kaliumphosphat-Puffer verdünnt. Bei Raumtemperatur pipettierte man in jede 1 ml Kunststoffküvette 20 μ l β -NADH-Lösung.

Anschließend wurden 600 μ l Triäthanolamin-Puffer und dann 200 μ l der zu untersuchenden Probelösung hinzugefügt. Wichtig ist hierbei, daß alle Reagenzien zum Schluß gut durchmischt werden.

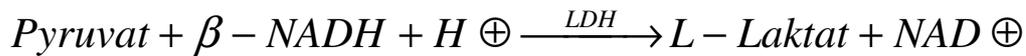
Um einen Referenzwert zu erhalten, wurden zwei Küvetten mit Aqua dest. (Blank) statt der Probe, vier andere mit zwei Pyruvatstandardlösungen bekannter Konzentration (11 bzw. 5,5 μ g/ml) gefüllt. Diese Werte dienten als Grundlage für die spätere Berechnung der Pyruvatkonzentration in den Proben. Des weiteren war es möglich, mit diesen Werten die ermittelten Ergebnisse auf ihre Korrektheit zu überprüfen. In den Blank wurde nicht, wie es bei den anderen Lösungen der Fall ist, β -NADH-Lösung gegeben.

Nach dem Mischen der Reagenzien wurde zehn Minuten gewartet, anschließend wurde dann im Photometer (Spektralphotometer DU68 Beckmann, München, Deutschland) bei 340 nm die Extinktion (E_1) gemessen. Nach der Messung wurde in jede Küvette 10 μ l L-Laktatdehydrogenase (LDH)-Lösung gegeben. Wiederum ist hierbei eine gute Durchmischung der Reagenzien notwendig.

Nach einer Wartezeit von fünfzehn Minuten wurde im Photometer bei 340nm ein zweites Mal die Extinktion (E_2) gemessen.

Ablauf der chemischen Reaktion:

Bei dem hier beschriebenen Enzymassay wird Pyruvat durch β -NADH + H^+ in einer von L-Laktatdehydrogenase (LDH) katalysierten Reaktion zu L-Laktat und NAD^+ (Nicotinamid Adenin Dinucleotid) reduziert. Die β -NADH-Abnahme ist direkt proportional zur Pyruvatkonzentration in den Proben und kann wie oben beschrieben bei 340 nm photometrisch gemessen werden.



Formel 8 : Reaktionsgleichung der Reduktion von Pyruvat mit NADH zu L-Laktat und NAD⁺

Berechnung der Pyruvatkonzentration:

E₁ (gemessene Extinktion vor Zugabe der LDH)

E₂ (gemessene Extinktion nach Zugabe der LDH)

Extinktionsdifferenz -> ΔE = E₂ - E₁

c = Pyruvatkonzentration = zu ermittelnde Größe

V = Testvolumen [ml] = 0,830 ml

v = Probevolumen [ml] = 0,200 ml

MG = Molekulargewicht des Pyruvats [g/mol] = 110,05 g/mol

d = Schichtdicke [cm] = 1 cm

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

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E [g/l]$$

Formel 9: Konzentrationsgleichung zur Berechnung der Pyruvatkonzentration

Bei jedem Versuchsdurchlauf wurden vier Proben mit zwei bekannten Konzentrationen (Pyruvatstandardlösungen -> siehe oben) zur Kontrolle mitbestimmt. Dabei zeigte sich, daß die durchgeführten Messungen im Konzentrationsbereich von 5,5 mg Pyruvat/ 100 ml bis 11 mg Pyruvat/ 100 ml (= 55 bzw. 110 µg/ml) linear verliefen.

III.9: Inhibin-Assay

Die Inhibinkonzentration in den Proben wurde mit dem Inhibin-B Dimer Assay Kit (ultra sensitive; MCA1312KZZ; Serotec Limited, Oxford, Großbritannien) gemessen. Die Anweisungen des Herstellers wurden dabei genau befolgt.

Reagenzien:

- Inhibin-B Dimer Assay Platte (Nr. MCA1312K)
- Natrium Dodecyl-Sulfat (SDS) 6%ige Lösung (Nr. SDS1312)
- Dimeric Inhibin Assay Standard (Nr. HPS1312)
- fötales Kälberserum (lyophilisiert) (Nr. CO1312)
- Dimeric Inhibin Assay Verdünnungsmittel (Nr. BUF1312)
- Fab Mouse anti human Inhibin-Alpha Untereinheit (Alk. Phos.); (Nr.MCA1312A)
- Inhibin-B Waschpuffer, 25fach konzentriert (Nr. WB1312)
- Magnesiumchloridlösung (1M); (Nr. MCL1312)
- Substrat (Nr. SBO11)
- Substratverdünnungsmittel (Nr. DSO11)
- Verstärker (Nr. AMPO11)
- Verstärkerverdünnungsmittel (Nr. DAO11)
- Stopplösung (Nr. STPO11)
- frisch hergestelltes 6%iges Wasserstoffperoxid (Sigma)

Vorgehen:

Zuerst mußten folgende Lösungen angesetzt wurden:

- Rekonstitution des gefriergetrockneten fötalen Kälberserums durch Lösen in 5 ml Aqua dest.
- Rekonstitution des gefriergetrockneten Dimeric Inhibin Standard durch Lö-

sen in 1,3 ml aufgelösten fötalen Kälberserum

- Verdünnung des Waschpuffers: das Inhibin-B Waschpufferkonzentrat wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 1:24 verdünnt
- Bereitung der Assay-Standards: durch Verdünnen des Dimeric Inhibin Assay Standard mit fötalem Kälberserum wurden Stammlösungen folgender Konzentrationen hergestellt 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 pg (Inhibin- B)/ ml.

Der Versuch wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt:

- (1) je 100 µl Probe wurden in Kunststoffcups (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur aliquotiert. In zwei zusätzliche Cups wurden je 100 µl fötales Kälberserum gegeben als Blank.
- (2) in jeden Kunststoffcup wurden 50 µl 6%ige SDS hinzugefügt.
- (3) nach dem Mischen der Lösungen, wurden die Cups für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt.
- (4) nach dem Abkühlen der Cups wurden je 100 µl Dimeric Inhibin Assay Verdünnungsmittel dazugegeben und die Lösung wurde vermischt.
- (5) Zugabe von je 50 µl frisch zu bereiteten 6 % wäßrigen H₂O₂.
- (6) Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
- (7) auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aus dem Inhibin-B Dimer Assay Kit wurden in jedes Well je zweimal 80 µl von jeder behandelten Probe, Leerwert und jedem Standard gegeben (Doppelprobe).
- (8) Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer.
- (9) 100 µl Fab Mouse anti human Inhibin-Alpha Untereinheit wurde mit 6 ml Dimeric Inhibin Assay Verdünnungsmittel verdünnt.
- (10) die Wells der Mikrotiterplatte wurden mit Inhibin-B Waschpuffer dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Platte auf saugenden Papier ausgeklopft um anhaftenden Puffer zu entfernen. Die Wells durften dabei aber nicht austrocknen.
- (11) Zugabe von 50 µl Fab Mouse anti human Inhibin-Alpha Untereinheit in jedes Well.
- (12) die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt und in einer feuchten Kammer bei

Raumtemperatur für drei Stunden inkubiert.

- (13)die Wells der Mikrotiterplatte wurden mit Inhibin-B Waschpuffer achtmal gewaschen. Beim letzten Waschgang wurde der Puffer nicht mehr aus den Wells entfernt, sondern in den Wells belassen. Die Platte wurde so 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- (14)während der Inkubationszeit wurde das Substrat mit dem Substratverdünnungsmittel verdünnt.
- (15)Zugabe von 13 μ l Magnesiumchloridlösung zu 13 ml Substratlösung (in (14) zubereitet).
- (16)der Waschpuffer wurde von der Mikrotiterplatte entfernt. Die Platte wurde nun 2 bis 3 mal gewaschen. Anschließend wurde die Platte auf Filterpapier ausgeklopft.
- (17)Zu jedem Well wurden 50 μ l Substratlösung (in (14) zubereitet) dazugegeben.
- (18)Die Platte wurde abgedeckt, versiegelt und bei Raumtemperatur eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert.
- (19)Während der Inkubationszeit wurde der Verstärker mit dem Verstärkerverdünnungsmittel verdünnt.
- (20)Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 μ l Verstärker pro Well dazugegeben.
- (21)Die Platte wurde abgedeckt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit sollte solange andauern bis der 1000 pg/ml Standard eine Absorption von 1,5- 1,8 bei 490 nm Wellenlänge aufweist. Abhängig von der Raumtemperatur dauerte dies 20 - 60 Minuten. Zur Kontrolle, ob diese Werte schon vorlagen, wurde nach 15, 30, 45, 60 Minuten eine photometrische Messung vorgenommen.
- (22)Bei Bedarf ist es möglich die Reaktion anzuhalten durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung. Anschließend kann die Platte photographiert werden oder tiefgefroren aufbewahrt werden.

Ablauf der chemischen Reaktion:

Dieser Assay basiert auf den Methoden von Groome et al. (1996). Es handelt sich hier um einen Festphasen-Sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Inhibin besteht aus zwei verschiedenen durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten (α -Untereinheit und entweder β A-Untereinheit oder β B-Untereinheit). Die α -Kette ist bei beiden Inhibin-Formen identisch; die β -Kette unterscheidet Inhibin-A und Inhibin-B. Die verwendeten Mikrotiterplatten sind mit einem monoclonalen Antikörper gegen die β -Untereinheit von Inhibin-B beschichtet. Beim Einbringen der Proben und Standards wurden diese nun mit dem Antikörper inkubiert. Es entsteht eine Verbindung zwischen dem Antigen Inhibin-B über dessen β -Untereinheit und dem in den Wells enthaltenem Antikörper. Nach dem zweiten Waschen wurde ein weiterer Antikörper hinzugefügt, der nun an die α -Untereinheit von Inhibin-B bindet. Dieser zweite Antikörper war zudem mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Beim letzten Waschen wurden alle Stoffe aus den Wells entfernt die nicht mit den Antikörpern reagiert haben. Die Menge der alkalischen Phosphatase, die in den Wells enthalten ist, kann mit einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Die Menge des entstehenden Farbstoffes ist direkt proportional zu der Konzentration von Inhibin-B in den zu untersuchenden Proben.

Der oben beschriebene Assay verlief im Konzentrationsbereich von 15,6 pg Inhibin-B/ml bis 1000 pg Inhibin-B linear.

III.10: Statistische Auswertung

Die in den nachfolgenden Diagrammen dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung errechnet aus den Meßergebnissen der einzelnen Wells. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden meist mit Microsoft Excel berechnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem zweiseitigen Student`s-t-test (Microsoft Excel). Die Ergebnisse dieses Tests sind in den Diagrammen mit Hilfe von Symbolen dargestellt. Das Symbol (xxx) kennzeichnet dabei einen signifikanten Unterschied von ($p < 0,001$) im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle; (xx) kennzeichnet ($p < 0,01$) und (x) kennzeichnet ($p < 0,05$). Die Normalverteilung der Proben wurde vorher getestet (Microsoft Excel). Lag keine Normalverteilung vor, so wurde der Mann-Whitney-Test angewandt (Graph PAD In Stat, Dr. Saunders, Graph PAD Software Vers. 1.11a, 1990). Die Anzahl der Proben (n) pro Versuch variierte. Zumeist lagen jedoch acht einzelne Meßergebnisse pro Noxe, Parameter und Konzentration der Noxe vor. Bei jedem vorliegenden Diagramm ist die genaue Anzahl der Meßwerte (n) angegeben. Die einzelnen Meßreihen wurden nicht zusammengelegt, um eine größere Stichprobe zu erhalten, da sie aus unterschiedlichen Isolationen der Sertoli-Zellen stammen. Teilweise liegen daher variierende Ergebnisse der Kontrolle vor; z.B. schwankt der Laktat-Kontrollwert zwischen 40-100 μ g. Der Trend der Konzentration-Wirkungs-Kurve war dabei aber stets sehr ähnlich. Alle Meßreihen wurden mindestens dreimal wiederholt. Es liegt hier eine Darstellung repräsentativer Meßreihen vor.

IV. Ergebnisse

Reinheit der Zellkultur

IV. a: Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung

Die im Kapitel "Material und Methoden" beschriebene Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung führte zu einem sogenannten "hypotonen Schock". Wie in der Abbildung 2a dargestellt sieht man vor der Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung neben Sertoli-Zellen auch Keimzellen, vorwiegend Spermatozyten und frühe Spermatozyten. Zwei bis drei Tage nach dem "hypotonen Schock" erkennt man bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen einen einheitlichen Zellrasen (Abbildung 2b).

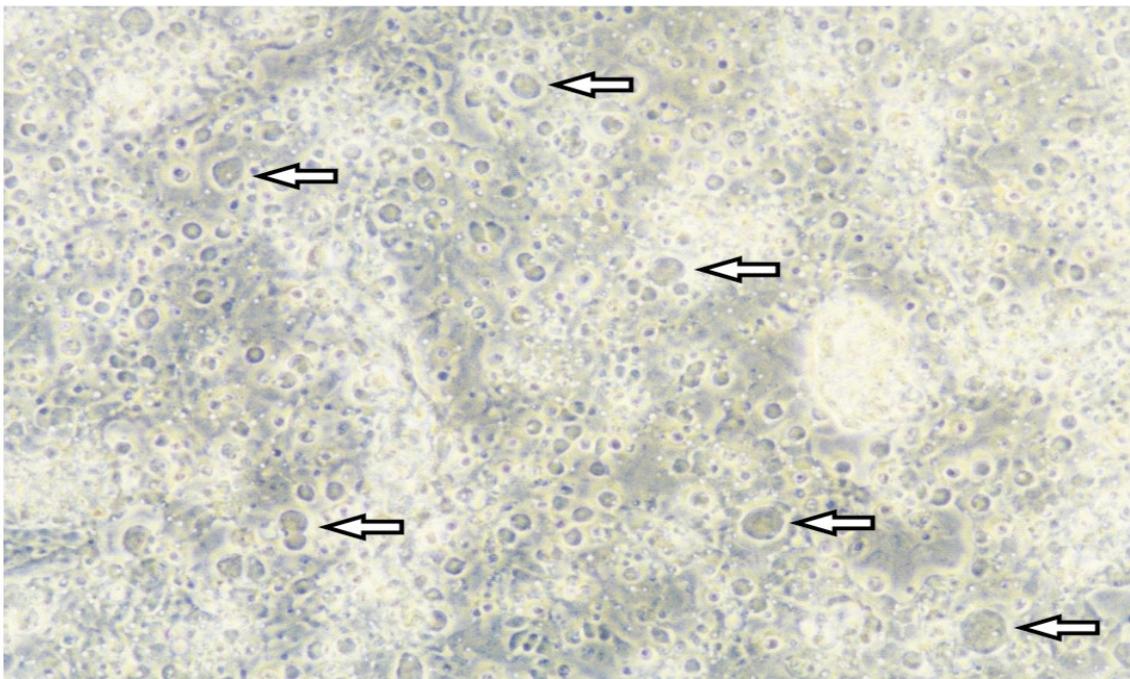


Abb. 2a: Sertoli-Zellen vor dem hypotonen Schock: man sieht neben Sertoli-Zellen auch Keimzellen (Pfeile), vorwiegend Spermatozyten und frühe Spermatozyten.

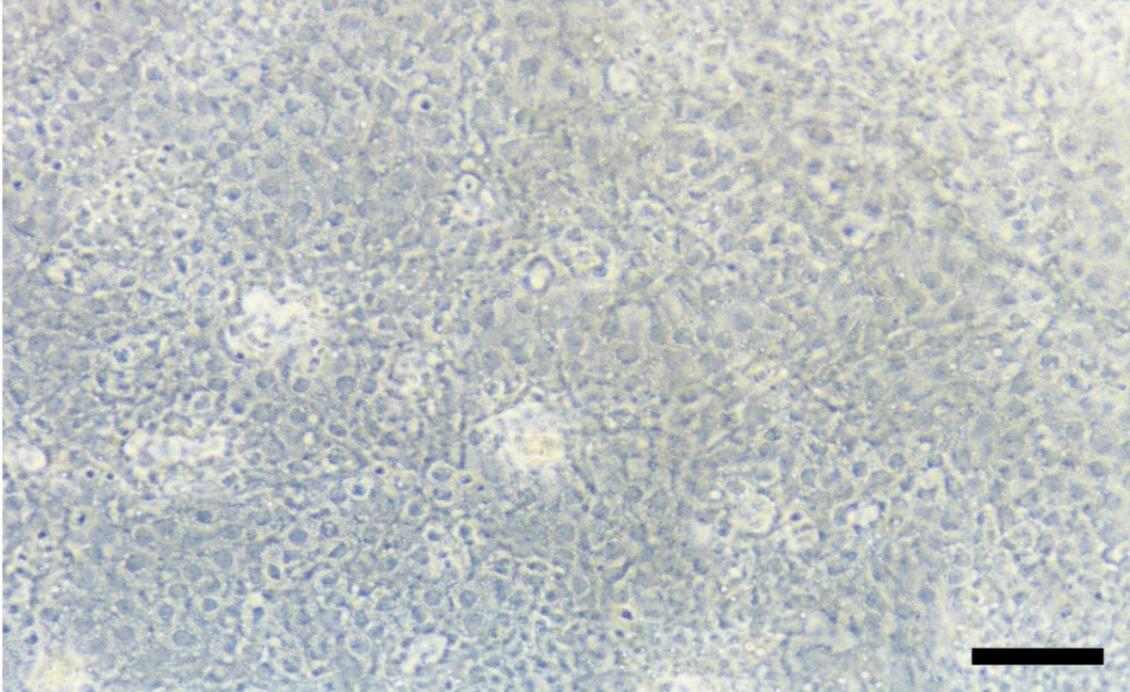


Abb. 2b: Sertoli-Zellen 2-3 Tage nach dem hypotonen Schock: man sieht einen einheitlichen Zellrasen. Der Mikrometerbalken entspricht 50 μ m.

IV. b: Nachweis von Leydig-Zellen

Zum Nachweis von Leydig-Zellen diente der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Nachweis nach Welsh et al. (1975). Mit dieser Methode konnten keine Leydig-Zellen in den Sertoli-Zellkulturen detektiert werden. Eine Kontamination der Zellkulturen mit dieser Zellart ist somit auszuschließen.

IV. c: Nachweis von peritubulären Myoidzellen

Die peritubulären Myoidzellen wurden wie im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben über eine entsprechende immunzytochemische Färbung mit einem für α -Isoactin spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dieser Nachweis ergab regelmäßig eine geringe Kontamination (< 5%) der Sertoli-Zellkulturen mit Zellen, die eine positive Immunreaktion für α -Isoactin aufweisen (Abbildung 3).

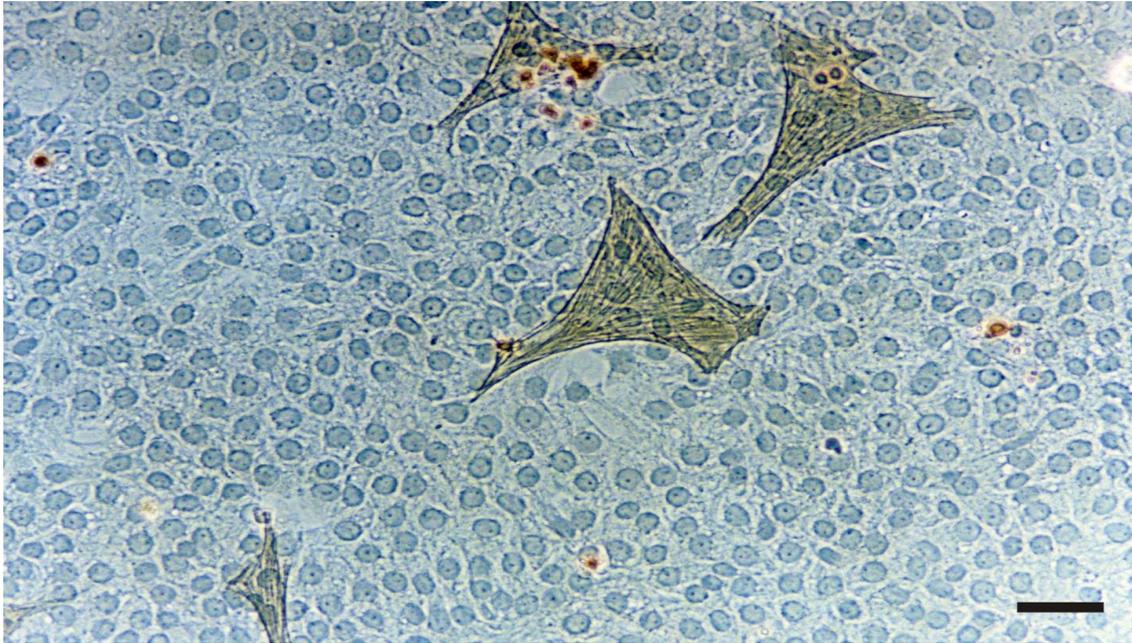


Abb. 3: Immunzytochemischer Nachweis von α -Isoactin in Sertoli-Zellen

Die epithelförmigen Sertoli-Zellen bilden einen dichten Zellrasen und weisen keinen positiven Nachweis von α -Isoactin auf. Immunpositive Peritubular-Zellen finden sich nur vereinzelt. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Der Mikrometerbalken entspricht 50 μ m.

IV. d: Nachweis von Sertoli-Zellen

Durch Anfärbung des intermediären Filamentproteins Vimentin wurden Sertoli-Zellen dargestellt (Wrobel et al., 1995). Mit Hilfe dieser im Kapitel "Material und Methoden" beschriebenen Methode konnte hier eine Reinheit der Sertoli-Zellkultur von annähernd 90-95% nachgewiesen werden (Abbildung 4). Zu diesem Ergebnis kommt man ebenfalls, wenn man mit dem Mikroskop die Morphologie der Sertoli-Zellkultur untersucht.

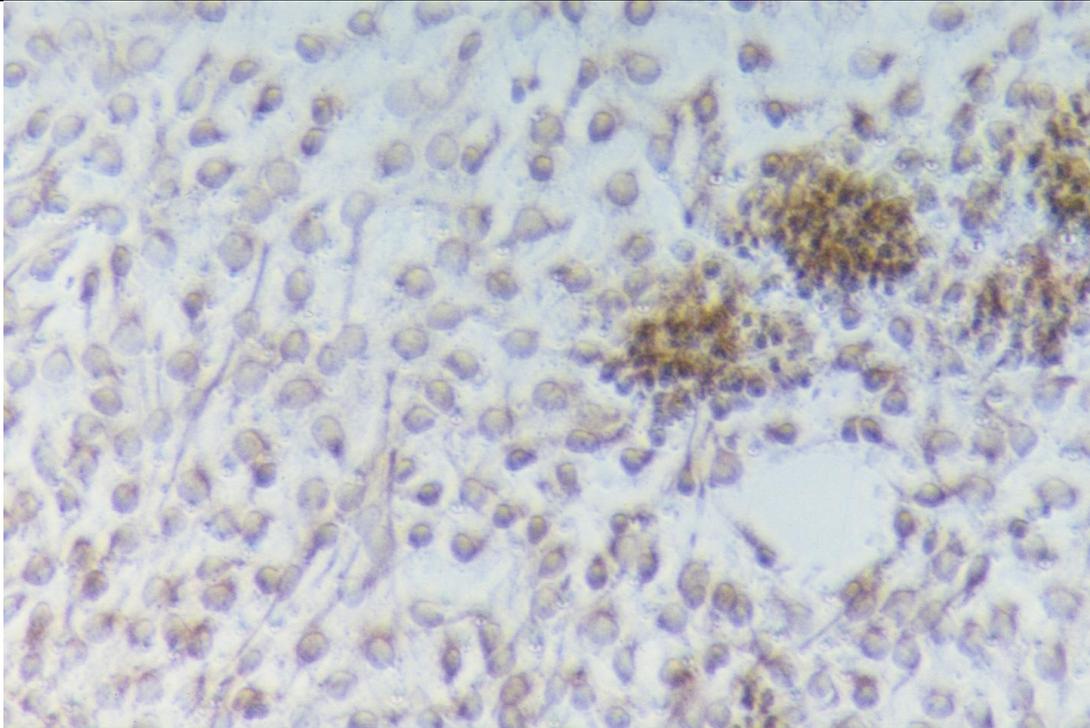


Abb. 4a: Durch Anfärbung des intermediären Filamentproteins Vimentin konnte hier eine Reinheit der Sertoli-Zellkultur von annähernd 90 - 95 % nachgewiesen werden.

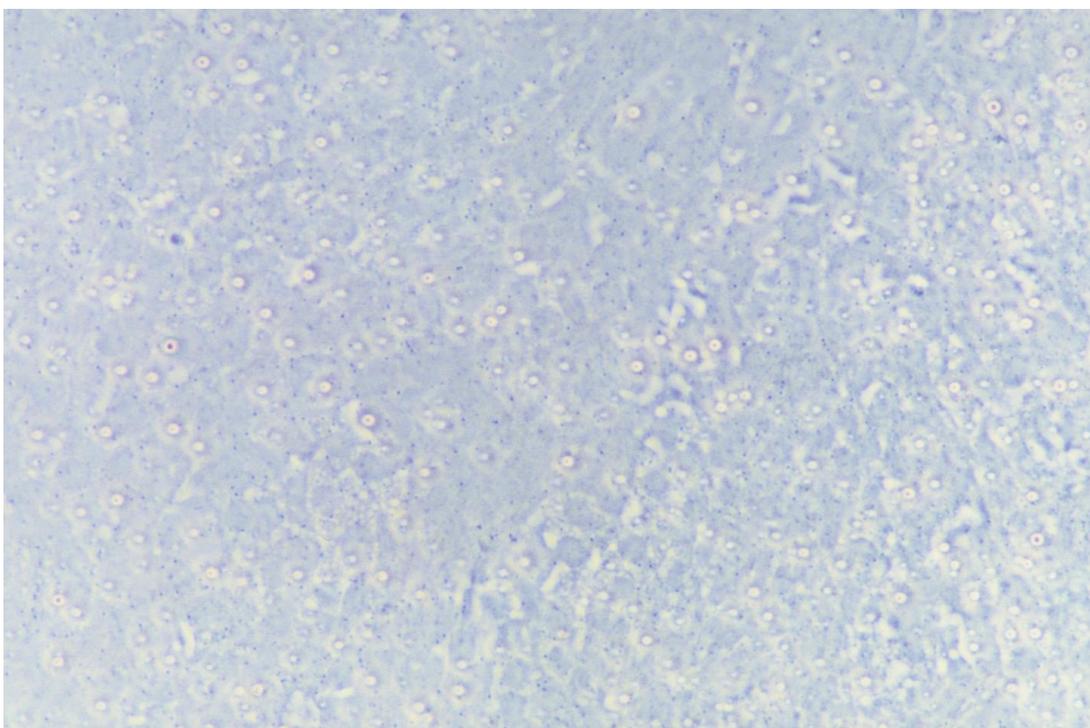
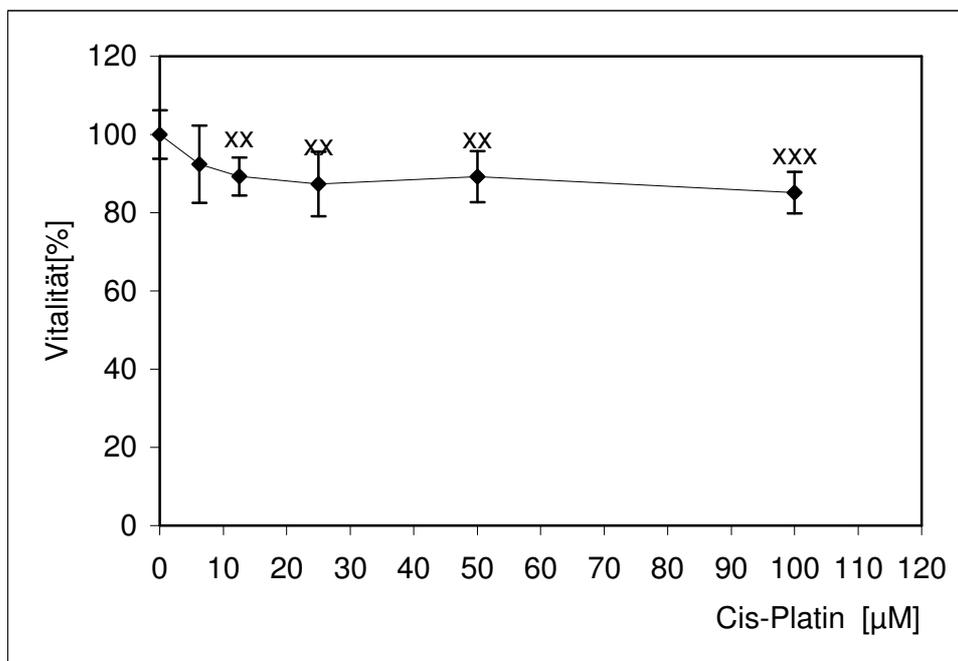


Abb. 4b: Vimentinkontrolle

IV. e: Vitalität der Sertoli-Zellen nach Zugabe der Noxe

Insgesamt gesehen reduzieren Quecksilberdinitrat und Cis-Platin die Vitalität der Sertoli-Zellen merklich, während Kupfersulfat und Kaliumnitrat nur einen geringen Einfluß auf die Vitalität der Sertoli-Zellen ausüben.

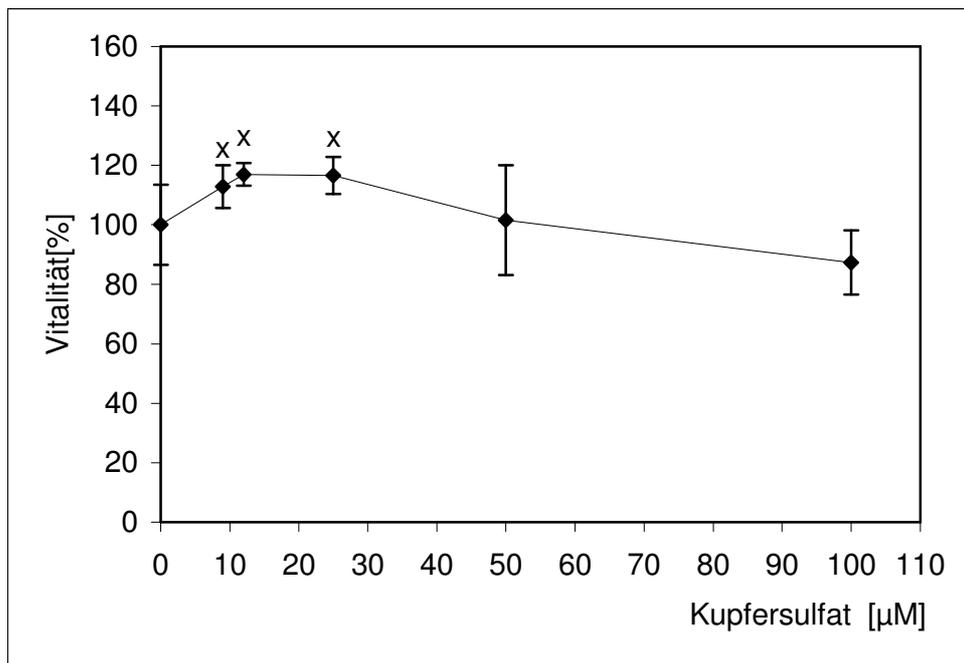
Eine signifikante Abnahme der Vitalität erfolgte bei einer Cis-Platinkonzentration ab 12,5 μM (Abb.5). Bei höheren Cis-Platinkonzentrationen verringerte sich die Vitalität der Zellen um 11% (50 μM) und um 15% bei einer Konzentration von 100 μM (Abb.5).



N=8

Abb.5: Vitalität der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Cis-Platin. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

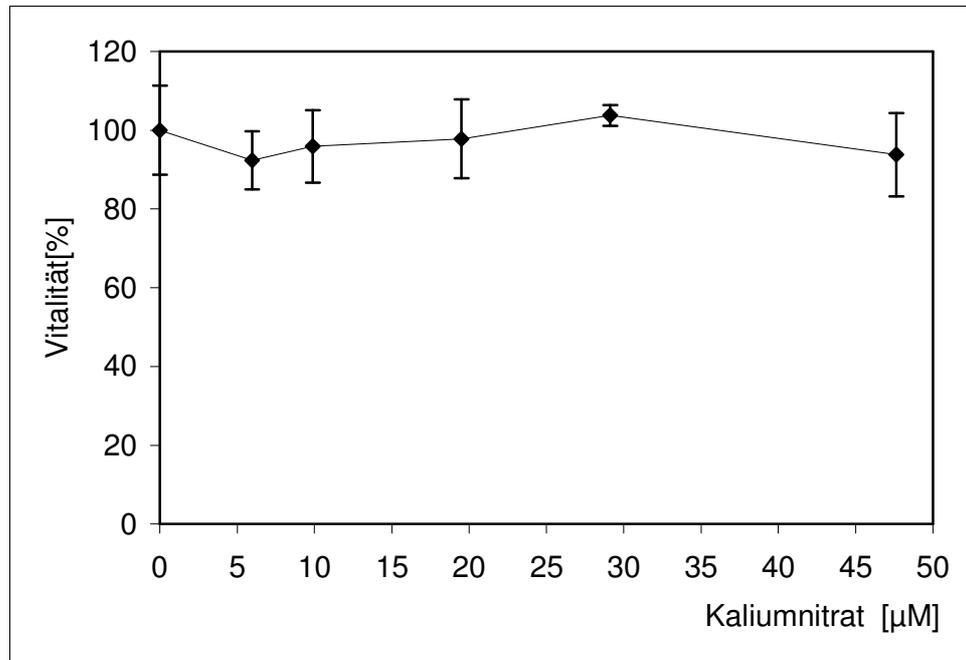
Wurden die Zellen mit Kupfersulfat inkubiert, so zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bei einer Konzentration von 10-30 μM (\rightarrow zelluläre Streßreaktion). Danach erfolgte eine geringe aber nicht signifikante Abnahme der Vitalität auf 90 % bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 μM Kupfersulfat (Abb.6).



N=8

Abb.6: Vitalität der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kupfersulfat. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Kaliumnitrat dagegen zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Vitalität der Sertoli-Zellen (Abb.7).

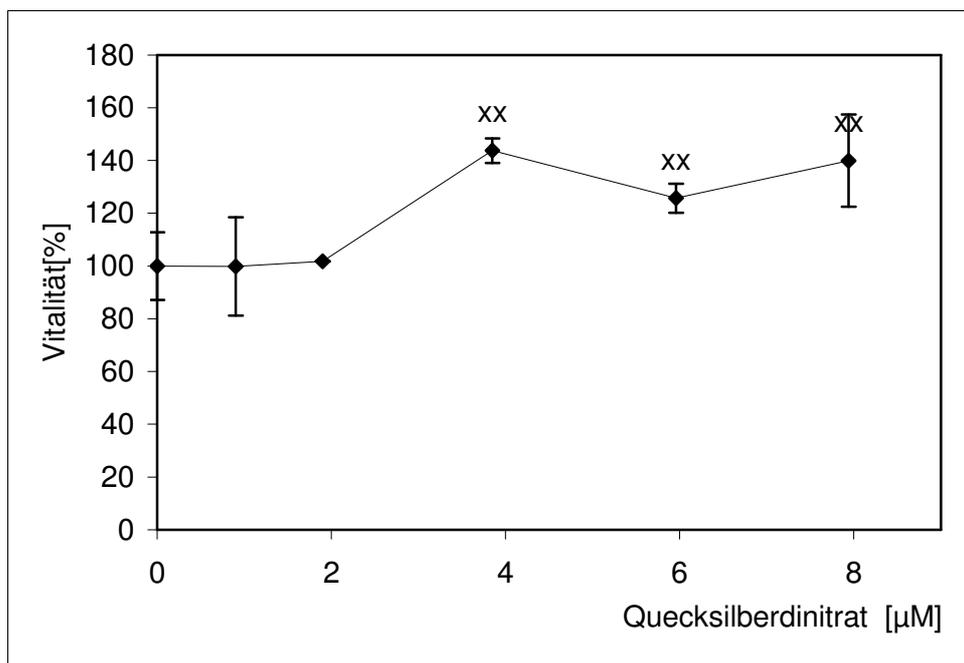


N=8

Abb.7: Vitalität der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kaliumnitrat. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Quecksilberdinitrat weist die höchste Zytotoxizität der hier getesteten Metallionen auf.

Allerdings kam es bei geringen Quecksilberdinitrat-Konzentrationen zu einer leichten Induktion der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase (Abb.8) um bis zu 40% gegenüber der Kontrolle, was ein Zeichen für zellulären Streß darstellt.

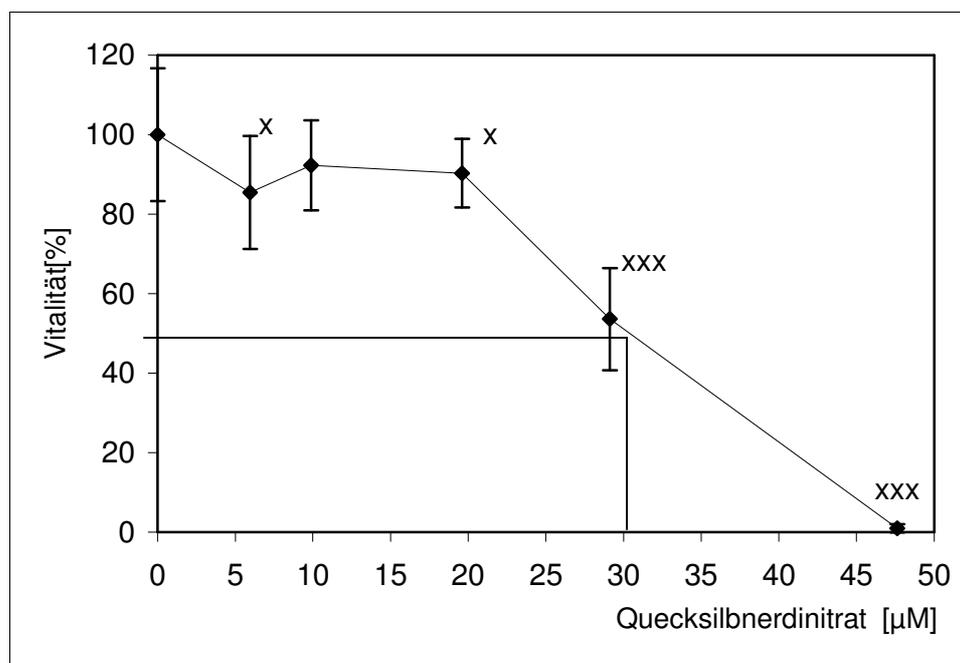


N=8

Abb.8: Vitalität der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat (niedriger Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Höhere Quecksilberdinitrat-Konzentrationen über 20 μM (19,6 μM) hemmten dagegen signifikant die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und induzierten somit ein Absterben der Zellen (Abb.9). Ab einer Noxenkonzentration von 30,5 μM war die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase auf die Hälfte der Kontrolle reduziert, der sogenannte halbmaximale Effekt liegt also bei $\text{EC}_{50} = 30,5 \mu\text{M}$. Der EC_{50} -Wert entspricht derjenigen Schadstoffkonzentration, bei der eine Abnahme der Meßgröße auf 50% des Kontrollwertes (unbehandelte Probe) beobachtet wurde. Dieser Wert wurde durch graphische Extrapolation aus den entsprechenden Konzentrations-Diagrammen ermittelt.

Bei den höchsten hier getesteten Konzentrationen von 47,62 μM Quecksilberdinitrat kam es zum vollständigen Absterben aller Sertoli-Zellen.

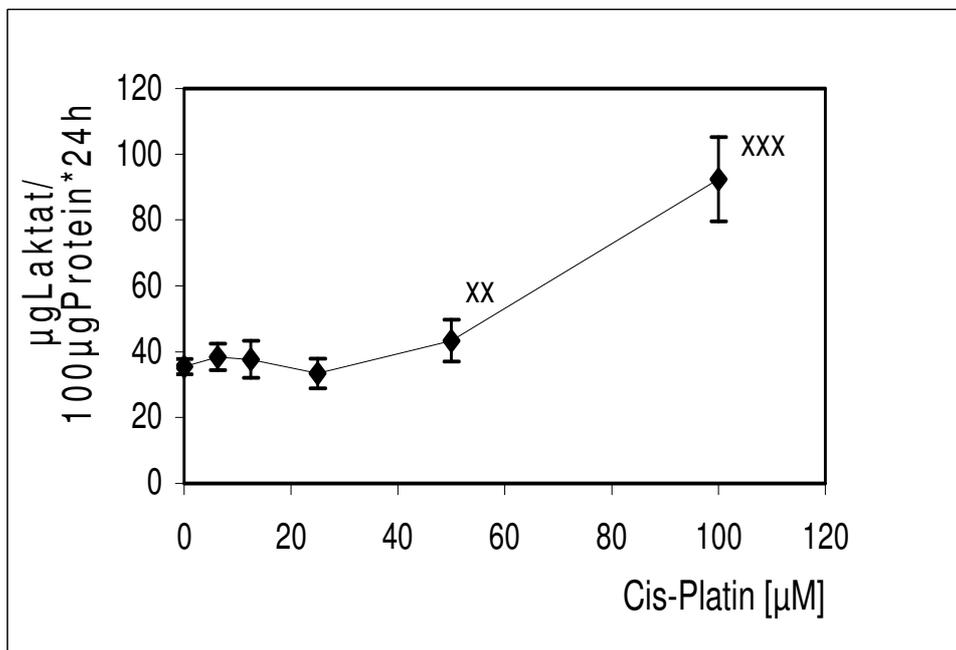


N=8

Abb.9: Vitalität der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat (hoher Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$). Der sogenannte halbmaximale Effekt (EC_{50}) liegt bei 30,5 μM .

IV. f: Die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der Noxe

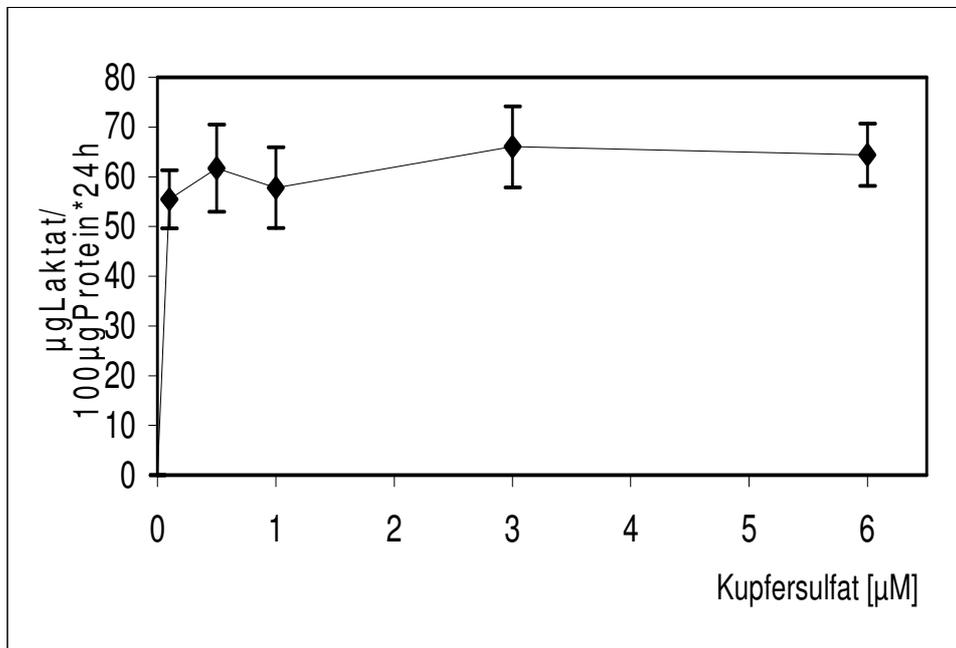
Bei Cis-Platin-Konzentrationen bis 50 μM konnte man keine Erhöhung der Laktatsekretion beobachten. Bei einer Konzentration von 50 μM kam es zu einer signifikanten 1,2-fachen Erhöhung der Laktatkonzentration. Nach der Inkubation mit Cis-Platin stieg die Laktatsekretion signifikant um das 2,6-fache bei einer Cis-Platin- Konzentration von 100 μM (Abb. 10)



N=12

Abb.10: Laktatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Cis-Platin. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=12). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Nach einer Inkubation der Sertoli-Zellen mit niedrigen Kupfersulfatkonzentrationen kommt es zu keiner signifikanten Änderung der Laktatproduktion (Abb. 11).

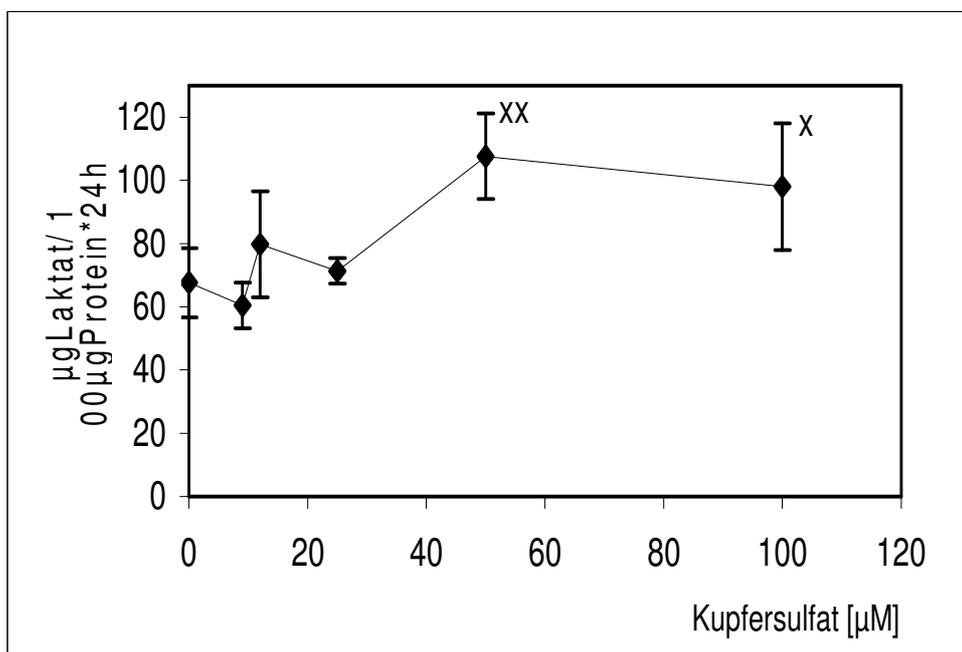


N=8

Abb.11: Laktatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kupfersulfat (niedriger Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Werden die Zellen mit höheren Kupfersulfatkonzentrationen inkubiert, so ändert sich die Laktatausschüttung der Zellen im Konzentrationsbereich bis 25 μM nur wenig. Ab einer Konzentration von 50 μM stieg die Laktatsekretion dagegen signifikant um das 1,6-fache auf 107 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g Protein} \cdot 24 \text{ h}$ (Abb.12).

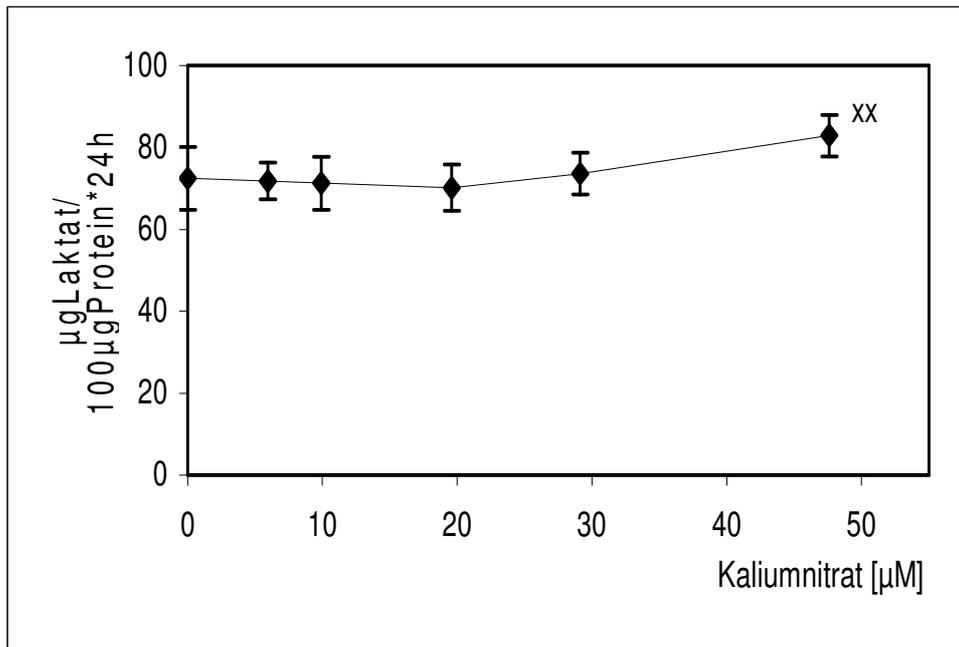
Bei einer Kupfersulfatkonzentration von 100 μM kam es zu einer schwachen Reduktion der Laktatausschüttung. Dies könnte auf die normale Varianz der Meßreihe zurückzuführen sein (Abb.12).



N=8

Abb.12: Laktatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kupfersulfat (hoher Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

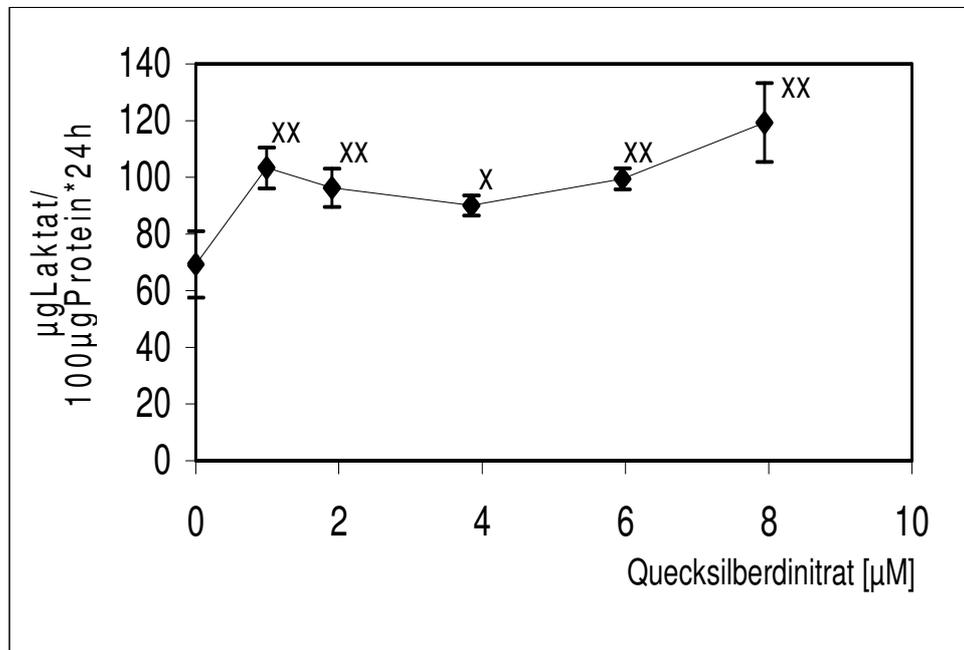
Die Zugabe von Kaliumnitrat bis zu einer Konzentration von 29,12 μM hatte keinen Einfluß auf die Laktatsekretion der Zellen. Erst ab einer Kaliumnitratkonzentration von 47,62 μM kam es zu einer geringfügigen Erhöhung um 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g Protein} \cdot 24 \text{ h}$, dies entspricht einer Steigerung um 11,45% (Abb.13).



N=10

Abb.13: Laktatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kaliumnitrat. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=10). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

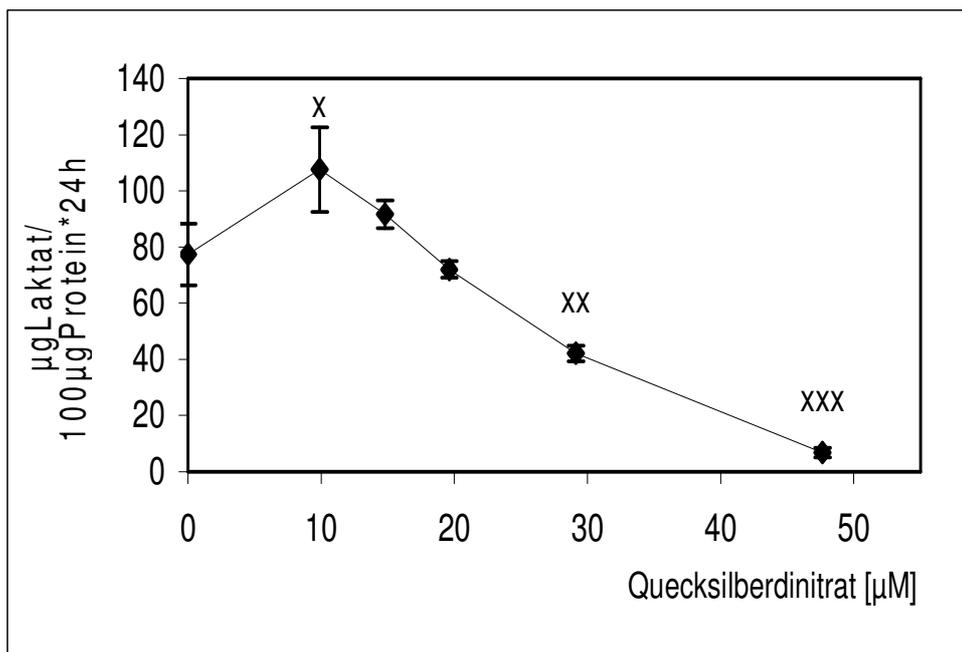
Durch niedrige Quecksilberdinitratkonzentrationen bis 9,9 μM wurde die Laktatproduktion signifikant erhöht (Abb.14).



N=5

Abb.14: Laktatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat (niedriger Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=5). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Lag Quecksilberdinitrat in höheren Konzentrationen vor, so kam es zu einer starken signifikanten Abnahme der Laktatsekretion (Abb.15). Diese Abnahme scheint in direktem Zusammenhang mit der Abnahme der Zellvitalität zu stehen, die im MTT-Assay gemessen wurde. Bei einer Konzentration von 47,62 μM Quecksilberdinitrat ging die gemessene Laktatkonzentration auf null zu (Abb.15).



N=6

Abb.15: Laktatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat (hoher Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=6). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

IV. g: Die Pyruvatproduktion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der Noxe

Nach der Zugabe von Cis-Platin veränderte sich die Pyruvatsekretion der Zellen kaum. Erst ab einer Cis-Platin-Konzentration von 100 μM erhöhte sich die Pyruvatproduktion signifikant um das fünffache (Abb.16).

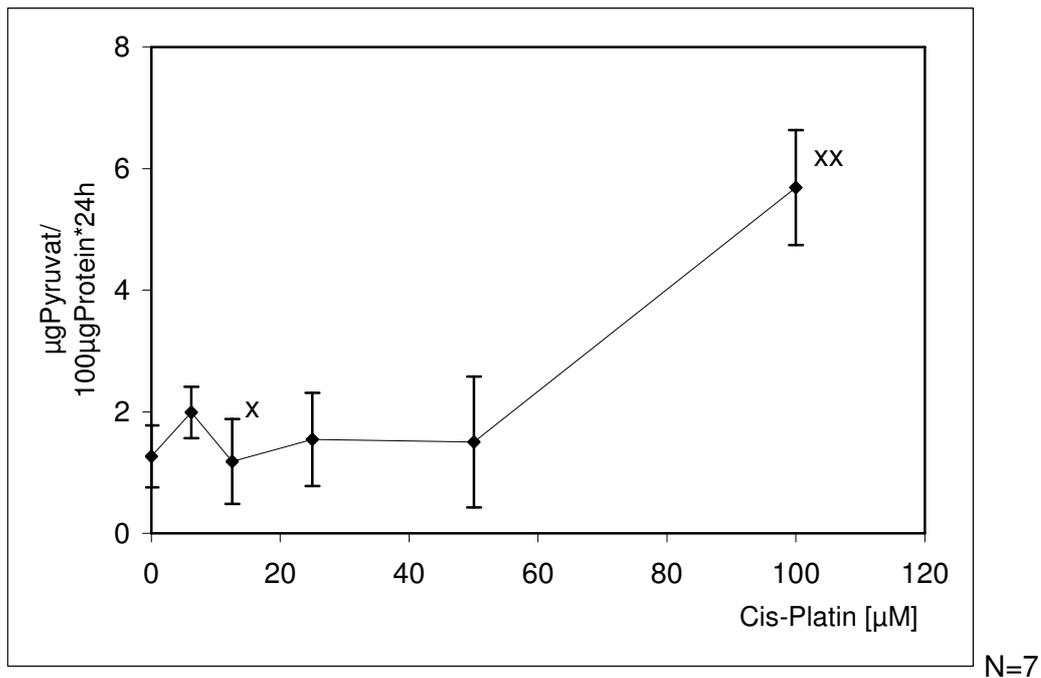
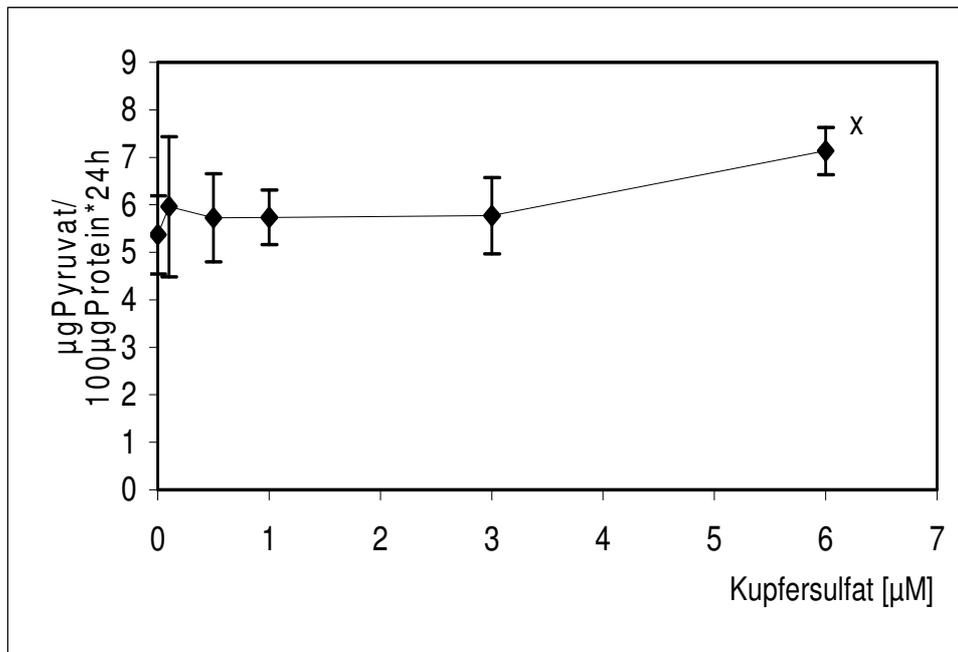


Abb.16: Pyruvatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Cis-Platin. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=7). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

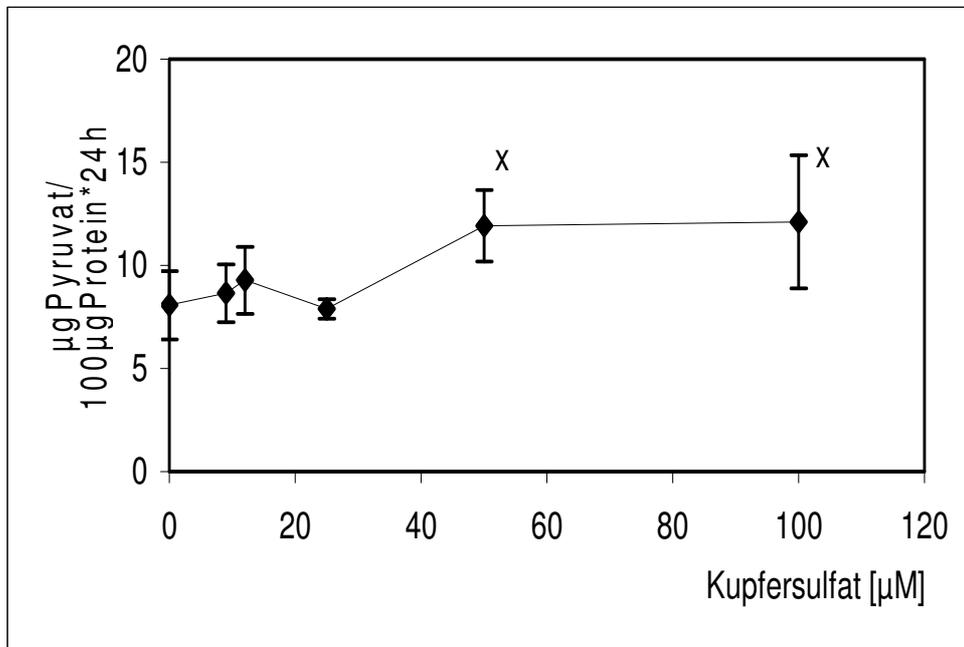
Nach einer Inkubation der Sertoli-Zellen mit niedrigen Kupfersulfatkonzentrationen (bis 6 μM) kam es erst ab einer Kupfersulfatkonzentrationen von 6 μM zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung der Pyruvatproduktion.



N=4

Abb.17: Pyruvatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kupfersulfat (niedriger Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=4). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

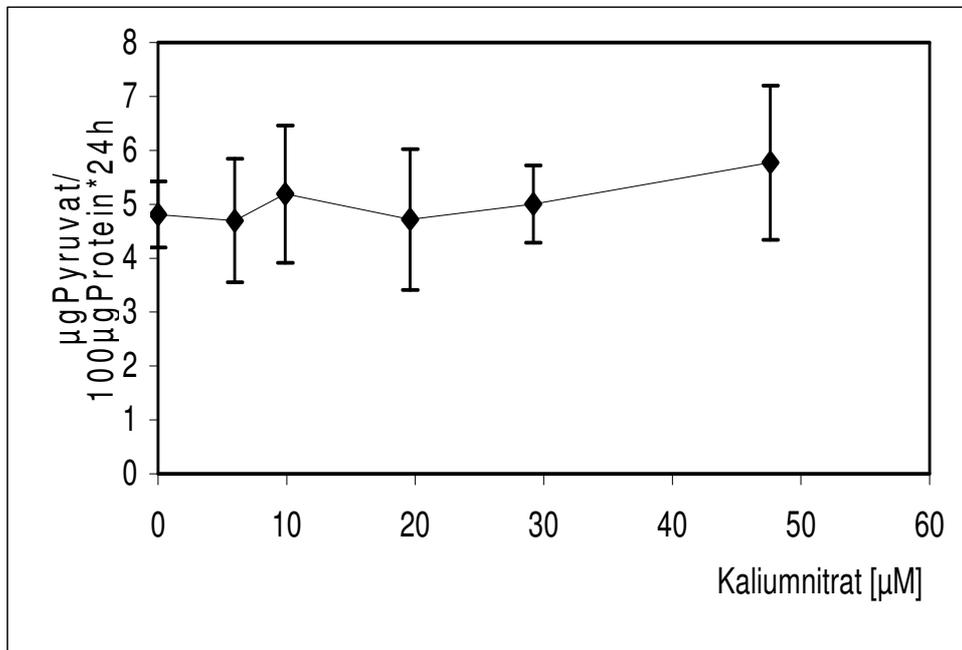
Wurden die Zellen mit hohen Kupfersulfatkonzentrationen inkubiert, so nahm die Pyruvatsekretion erst ab einer Konzentration von 50 μM signifikant zu (Abb.18). Dies entspricht einer Steigerung der Pyruvatsekretion um 48,8 %.



N=4

Abb.18: Pyruvatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kupfersulfat (hoher Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=4). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

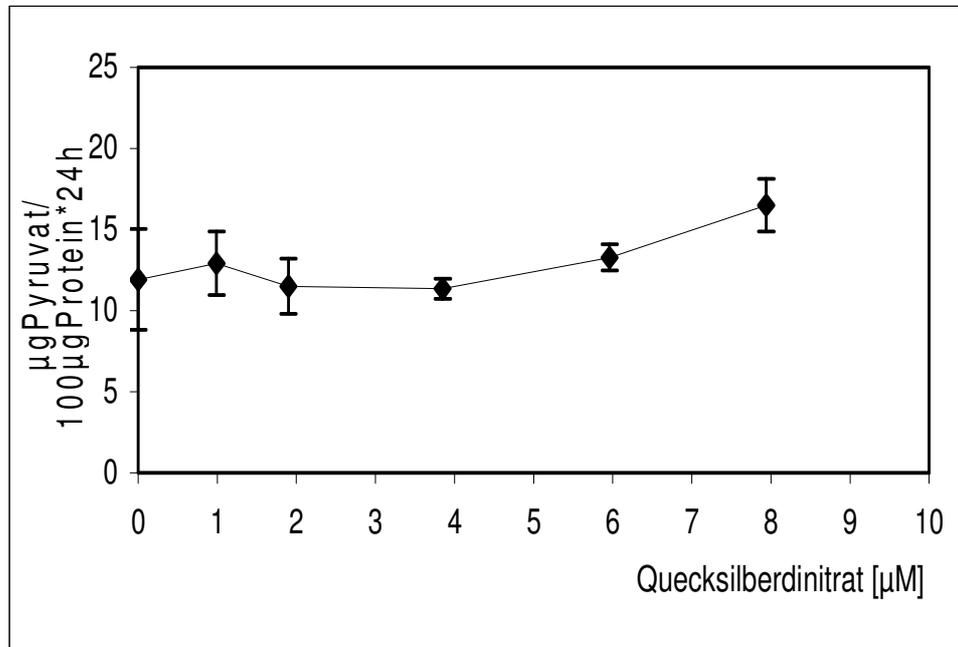
Kaliumnitrat hatte dagegen im getesteten Konzentrationsbereich keinen signifikanten Einfluß auf die Pyruvatsekretion (Abb.19).



N=8

Abb.19: Pyruvatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kaliumnitrat. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8).

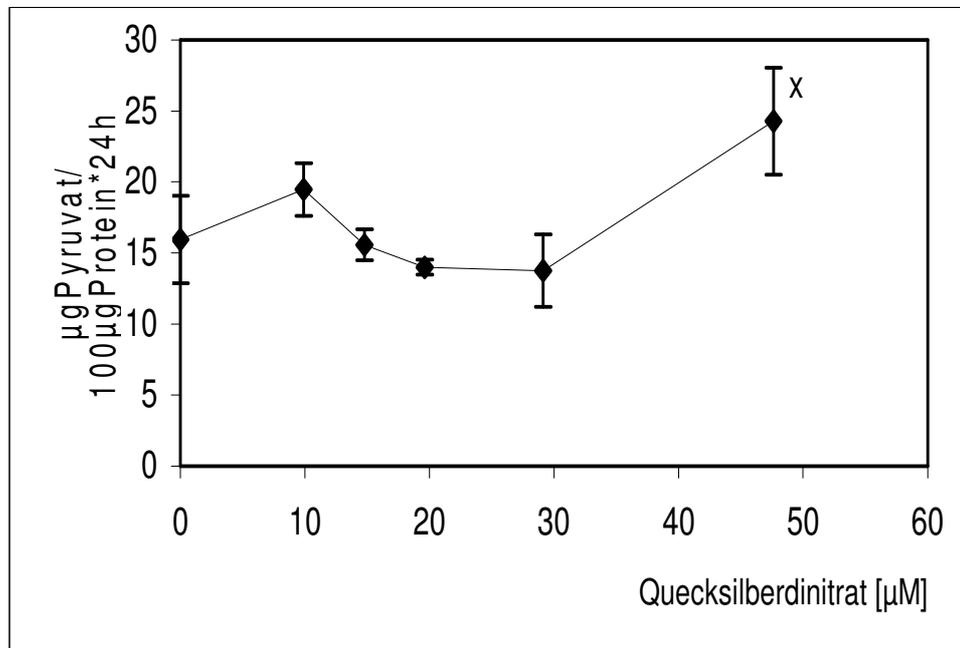
Nach der Inkubation der Zellen mit niedrigen Quecksilberdinitratkonzentrationen erhöhte sich die Pyruvatausschüttung leicht ab einer Konzentration von 7,94 μM Quecksilberdinitrat (Abb.20).



N=4

Abb.20: Pyruvatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat (niedriger Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=4).

Zu einer signifikanten Steigerung der Pyruvatsekretion kam es erst bei einer Konzentration von 47,62 μM (Abb:21).



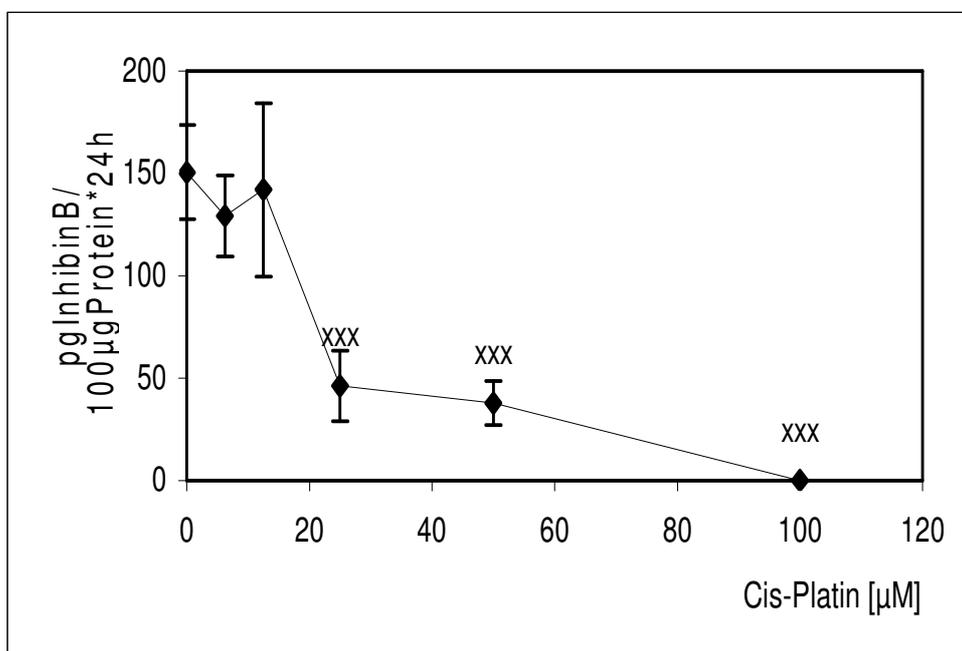
N=4

Abb.21: Pyruvatproduktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat (hoher Konzentrationsbereich). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=4). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

VI. h: Die Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der Noxe

Ab einer Cis-Platin-Konzentration von 25 μM reduzierte sich die Inhibin-B Produktion signifikant ($p < 0,001$) um 68 %. Bei einer Cis-Platin-Konzentration von 100 μM erfolgte eine vollständige Hemmung der Inhibin-B Sekretion (Abb.22).

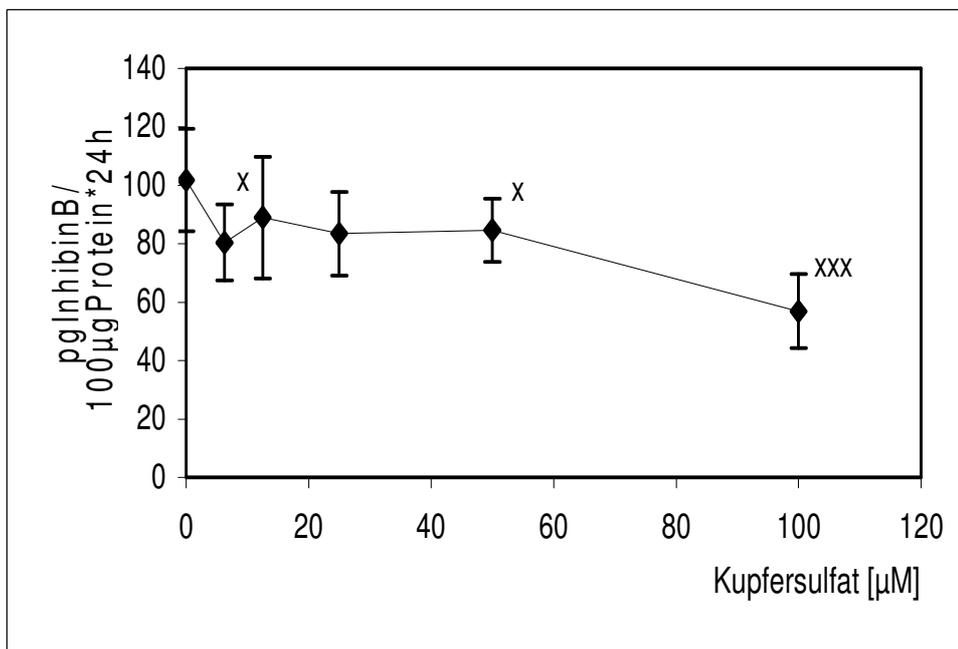
Vergleicht man den Rückgang der Vitalität der Zellen (Abb.5) mit der Reduktion der Inhibin-B Produktion (Abb.22), so sieht man, daß die Inhibin-B Produktion schon zurückging, bevor die Zellen ernsthaft geschädigt wurden.



N=8

Abb.22: Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Cis-Platin. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

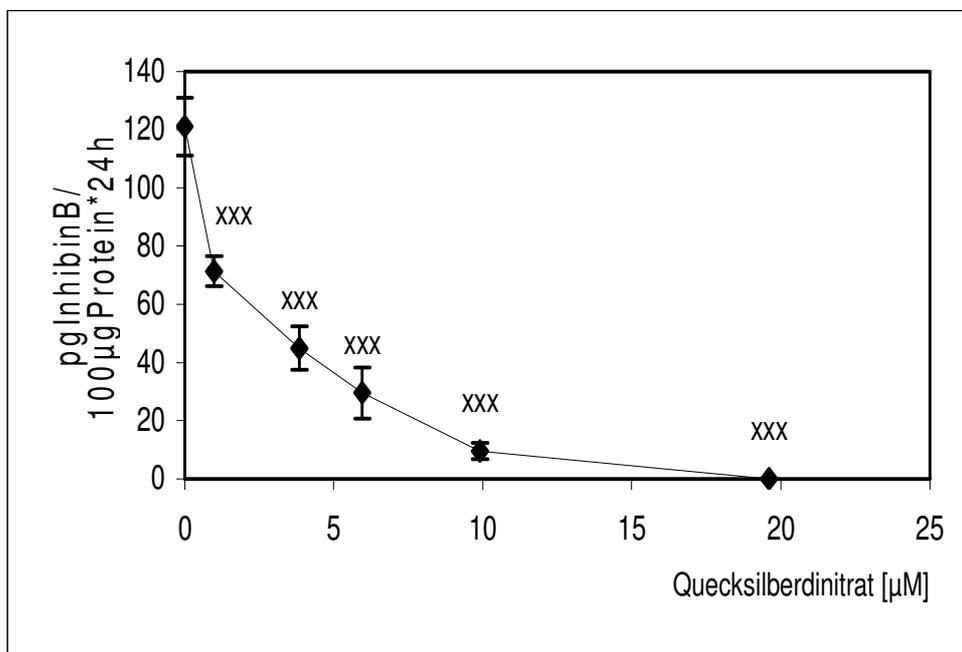
Die Zugabe von Kupfersulfat führte ebenfalls zu einer Reduktion der Inhibin-B Produktion. Allerdings fiel diese Reduktion wesentlich geringer aus, als bei Cis-Platin. Selbst bei einer hohen Kupfersulfatkonzentration (100 μM) kam es nicht zur Hemmung der Inhibin-B Produktion; es erfolgte lediglich ein Rückgang der Inhibin-B Sekretion um 45% ausgehend von der Kontrolle ohne Noxe (Abb. 23).



N=8

Abb.23: Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Kupfersulfat. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=8). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

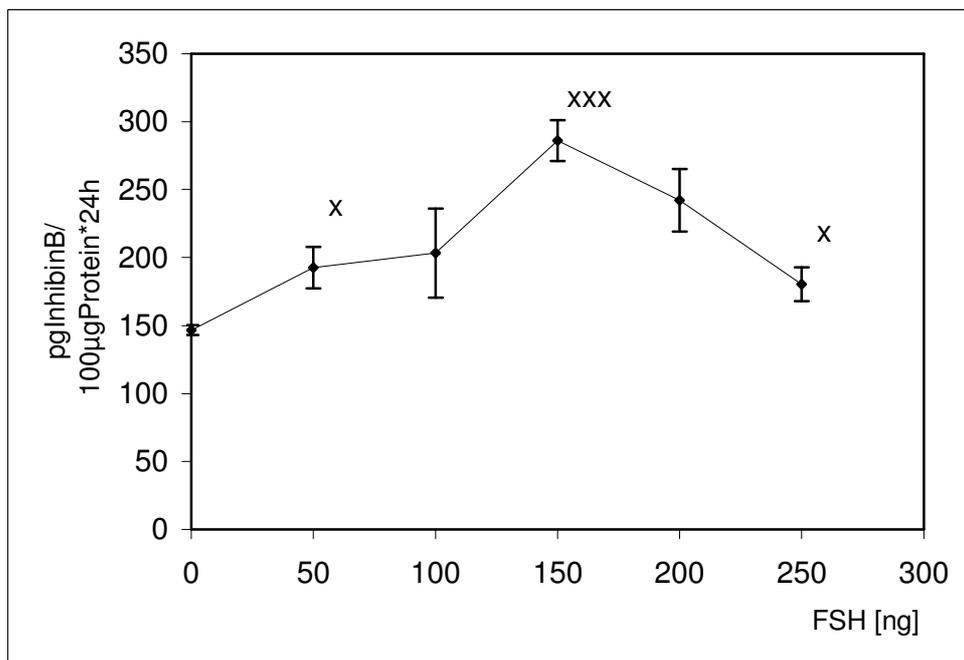
Quecksilberdinitrat hemmte wesentlich stärker als Kupfersulfat die Inhibin-B Produktion. Schon im nanomolaren Konzentrationsbereich kam es zu einer signifikanten Reduktion der Inhibin-B Sekretion. Bei einer Konzentration von 19,6 μM Quecksilberdinitrat geht die Inhibin-B Produktion im Vergleich zur Kontrolle (ohne Quecksilberdinitrat) gegen Null (Abb.24). Bei einem Vergleich des Vitalitätsrückganges der Sertoli-Zellen (Abb.9) und der Reduktion der Inhibin-B Sekretion (Abb.24) zeigt sich, wie bei Cis-Platin, daß die Inhibin-B Produktion schon reduziert wurde, bevor es zu einer ernsthaften Zellschädigung kam.



N=7

Abb.24: Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit Quecksilberdinitrat. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=7). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

Als Positivkontrolle wurde das Hormon FSH (follikelstimulierendes Hormon) eingesetzt, das viele Funktionen der Sertoli-Zelle stimuliert. FSH führte zu einer markanten Steigerung der Inhibin-B Sekretion. Die Inhibinproduktion in Abhängigkeit von der FSH-Konzentration zeigte den Verlauf einer Optimumskurve. Das Maximum dieser Kurve lag bei einer FSH-Konzentration von 150 ng (Abb.25).



N=4

Abb.25: Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zelle nach 24 h Inkubation mit FSH. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (N=4). (xxx), (xx), und (x) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) und ($p < 0,05$).

V.: Diskussion

Bei der Diskussion der Untersuchungen dieser Arbeit muß sowohl eine Reflexion über die Versuchsergebnisse, als auch über die angewendeten Testverfahren erfolgen. Im vorangegangenen Kapitel IV. „Zielsetzung“ wurden diese beiden Punkte als wichtige Fragestellungen dieser Arbeit formuliert.

Insgesamt gesehen kann man sagen, daß die in dieser Arbeit ermittelten Versuchsergebnisse die anfangs auf gestellten Hypothesen bestätigten: Quecksilberdinitrat hat die stärkste Wirkung auf die Funktion und Vitalität der Sertoli-Zellen. Ordnet man die getesteten Noxe nach ihrem Einfluß auf die Funktion und Vitalität der Sertoli-Zellen, so folgt als nächstes in dieser Reihe Cis-Platin, anschließend Kupfersulfat und als letztes Kaliumnitrat mit der geringsten Zytotoxizität. Dies ist natürlich eine stark vereinfachte und verkürzte Darstellung der Versuchsergebnisse. Es soll lediglich zu Anfang der Diskussion ein grober Überblick über die Ergebnisse gegeben werden.

Einfluß von Quecksilberverbindungen auf die männliche Fertilität

Werden die Sertoli-Zellen mit Quecksilberdinitrat inkubiert, so wird die Funktion der Sertoli-Zellen stark beeinträchtigt, außerdem weist Quecksilberdinitrat die größte Zytotoxizität der hier untersuchten Metallsalze auf. Da die Anzahl der Sertoli-Zellen in einer direkten Korrelation zur Spermienanzahl im Ejakulat eines Mannes steht, könnte Quecksilberdinitrat somit die männliche Fertilität vermindern.

Die Toxizität von Quecksilberverbindungen wurde in zahlreichen Studien hinreichend untersucht (z. B.: Bakir et al., 1973; Hendry et al., 1990; Summer und Halbach, 1996). Im folgendem soll der Schwerpunkt auf Studien gelegt werden, in denen der Einfluß von Quecksilberverbindungen auf die männliche Fertilität untersucht wurde.

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben über den Einfluß von Quecksilberverbindungen auf die männliche Fertilität.

Eggert-Kruse et al. (1992) stellten mit Hilfe eines in-vitro-Spermien- Zervikalmucus-Penetrationstest fest, daß Quecksilber in Form von HgCl_2 in Konzentrationen von 0,005- 0,5 mmol/l einen starken Effekt auf die Spermienfunktion hat. Bei Erreichen einer Konzentration von 0,5 mmol/l im Sperma waren die Spermien aller untersuchten Proben nicht mehr in der Lage, den Zervixschleim zu penetrieren. Auch wenn hier keine Sertoli-Zellen, sondern Spermien untersucht wurden, lassen sich die beiden Studien insofern vergleichen, als daß in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich eines Quecksilbersalzes bereits negative Auswirkungen auf Penetrationstiefe der Spermien und die Spermienmotilität festgestellt wurden. Allerdings ist der in der Studie von Eggert-Kruse et al. (1992) untersuchte Konzentrationsbereich um ein zehnfaches größer, als der in dieser Arbeit untersuchte Bereich von 0,99-47,62 μM $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, da Spermien vollständig ausdifferenziert sind und daher ein höhere Konzentrationsbereich von Quecksilber in Form von HgCl_2 untersucht werden mußte. Dabei kam es bei Quecksilberdinitratkonzentrationen über 20 μM (19,6 μM) zu einer deutlichen Hemmung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase, gefolgt vom Absterben der Zellen. Dies führte zu morphologischen Änderungen (Schrumpfen) der Zellen, gefolgt von einem Ablösen von der Zellkulturschale; wie die mikroskopische Beobachtung zeigte. Ab einer Noxenkonzentration von 30,5 μM war die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase auf die Hälfte der Kontrolle reduziert, der sogenannte halbmaximale Effekt lag also bei $\text{EC}_{50} = 30,5 \mu\text{M}$. Bei Konzentrationen von 47,62 μM Quecksilberdinitrat kam es zu einer vollständigen Einstellung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase.

Im Gegensatz dazu kam es bei geringen Quecksilberdinitratkonzentrationen zu einer signifikanten Induktion der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase um bis zu 40% gegenüber der Kontrolle. Diese Induktion ist auf eine zelluläre Streßreaktion zurückzuführen. Durch die Einwirkung der Noxe kommt es zu einem erhöhten Energiebedarf. Die Sertoli-Zelle versucht diesen erhöhten Energiebedarf dadurch auszugleichen, indem sie über die oxidative Phosphorylierung (Atmungskette) mehr Energie in Form von ATP produziert. Mit dem hier durchgeführten MTT-Assay konnte die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase ermittelt und somit Rückschlüsse auf die Energiegewinnungsaktivität

der Zelle gezogen werden. Bei geringen Noxenkonzentrationen kam es zuerst aus den oben genannten Gründen zu einer Erhöhung der Aktivität, bei höheren Quecksilberdinitratkonzentrationen (über 19,6 μM) erfolgte eine Abnahme der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase. Aus dieser Beobachtung läßt sich folgern, daß es bei höheren Quecksilberdinitratkonzentrationen zu einem Sertolizellsterben kam.

Hanf et al. (1996) hingegen fanden keinen Zusammenhang zwischen Quecksilberkonzentrationen im Urin oder im Ejakulat und der Spermienmotilität, der Anzahl der mißgebildeten Spermien sowie der Spermiedichte. Für ihre Studie ermittelten Hanf et al. (1996) die Quecksilberkonzentration im Morgenurin und im Ejakulat von 80 Ehemännern, deren Frauen bei einer Infertilitätsbehandlung vorstellig wurden. Zusätzlich wurde die Anzahl der vorhandenen Amalgamfüllungen dokumentiert. Es wurde ein Routine-Spermiogram bei den Probanden durchgeführt, von diesem ausgehend wurde ein "Fertilitäts Index" (Spermienmotilität, Anzahl der mißgebildeten Spermien, Spermiedichte) errechnet. Es wurde weder ein Zusammenhang zwischen Quecksilberkonzentrationen im Urin oder im Ejakulat und der Qualität der Spermien deutlich, noch eine Korrelation zwischen der Anzahl der zahnärztlichen Amalgamfüllungen und der Fertilität der Männer gefunden (Hanf et al. 1996). Eine von Schuurs (1999) zusammen gestellte Literaturübersicht über experimentelle Tierstudien, epidemiologische Studien und Fallstudien zum Thema „reproduktive Toxizität durch berufliche Quecksilberbelastung“ legt die Vermutung nahe, daß die mit Amalgamfüllungen versorgte Bevölkerung weniger durch Quecksilberbelastung gefährdet ist, als das zahnärztliche Personal. Doch ist es unwahrscheinlich, daß es zu ernsthaften Schädigungen kommt. Es sei denn, daß durch unsachgemäßen Umgang mit Amalgam in den Zahnarztpraxen es zu einer Überschreitung der zulässigen zeitlichen Quecksilberbelastung kommt. Dann kann es zu Fertilitätsstörungen kommen, wie z.B. spontane Aborte, Fehlgeburten, Unfruchtbarkeit, negative Einflüsse auf die Ovulation und den Eisprung, sowie kongenitale Mißbildungen. Der unterschiedliche Einfluß eines sorgsameren Umgangs mit Quecksilber bei der Amalgamanmischung und einem weniger vorsichtigem Umgang mit Amalgam arbeitet besonders die folgende von Schuurs(1999) vorgestellte Studie heraus.

In der Studie von Rowland (1994) wurde die Fertilität von Zahnarthelferinnen untersucht, die bei der Anfertigung von 30 Amalgamfüllungen pro Woche assistierten und schon Kinder geboren hatten. Bei diesen Frauen erniedrigte sich die Wahrscheinlichkeit der Konzeption während eines Menstruationszykluses bei schlechter Quecksilberhygiene auf 63% im Vergleich zur Kontrolle. Bei sorgsamem Umgang mit Quecksilber erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit der Konzeption auf 132% im Vergleich zur Kontrolle (Schuurs, 1999; Rowland, 1994). Mangelnde Quecksilberhygiene ist besonders auf eine Anmischung der Amalgamlegierung in offenen Mörsern, defekte Amalgamanmischgeräte und unsachgemäße Lagerung zurückzuführen. Die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) beträgt für Quecksilber $0,01 \text{ ml/m}^3 = 0,1 \text{ mg/m}^3$. Nach Schätzungen der WHO (1991) werden täglich 3,8-21 Mikrogramm Hg aus Amalgamfüllungen aufgenommen.

Donat et al. (1990) sehen hingegen einen Zusammenhang zwischen der Zunahme der Konzentration von organischen Quecksilberverbindungen am Arbeitsplatz und der Reduktion der Fruchtbarkeit. Allerdings untersuchten sie nur 21 Personen, die quecksilberhaltigen Herbiziden ausgesetzt waren, auf ihre Fertilität. Alcser et al. (1989) führte eine ähnliche epidemiologische Studie mit wesentlich mehr Studienteilnehmern durch. In dieser Studie wurden 247 Arbeiter, die auf einer Plantage gearbeitet hatten, auf der Quecksilber eingesetzt wurde, nach Fertilitätsproblemen und nach Mißbildungen oder Krankheiten der Kinder befragt. Die Quecksilberbelastung dieser Arbeiter wurde durch den Hg-Gehalt im Urin nachgewiesen. Zum Vergleich wurden 255 nicht Quecksilberbelastete Arbeiter untersucht. Bei der vergleichenden Betrachtung der Befragungen dieser beiden Personengruppen zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen Quecksilberexposition und einer Abnahme der Fertilität.

Orisakwe et al. (2001) führten Mäusen über das tägliche Trinkwasser Quecksilber in niedrigen Dosen (4 ppm) zu. Sie stellten dabei fest, daß dadurch bei den Mäusen eine Abnahme des Hodengewichtes, eine Verringerung der Spermienanzahl ausgelöst wurde. Histologische Untersuchungen ergaben eine vermehrte degenerative Veränderung der testikulären Zellen (Orisakwe et al., 2001). Wurde den Mäusen neben Quecksilber Zink über das Trinkwasser zuge-

führt, so traten die oben beschriebenen pathologischen Befunde nicht auf. Orsakwe et al. (2001) stellten daher die These auf, daß Zink vor möglichen Schäden der Hoden schützen kann, die durch eine vermehrte Belastung mit anorganischen Quecksilberverbindungen auftreten können.

Es gibt sichere Beweise, die nahe legen, daß das sogenannte Young's-Syndrom eine Spätkomplikation einer Quecksilberintoxikation in der Kindheit ist (Hendry et al.; 1990). Unter dem Young's-Syndrom versteht man eine Azoospermie infolge einer Verstopfung des Nebenhodens durch zähes Sekret; häufig treten gleichzeitig chronische Infekte der Lungen und Nasennebenhöhlen auf. Wie diese Untersuchung zeigt, kann eine Quecksilberintoxikation in der Kindheit zu einer Beeinträchtigung der Spermatogenese führen.

Für die große Differenz der Ergebnisse der einzelnen Studien gibt es mehrere mögliche Gründe:

- Die Toxizität der einzelnen getesteten Quecksilberverbindungen ist unterschiedlich. Schon 1975 zeigten Lee und Dixon, daß HgCl_2 Spermatogonien und prämeiotische Zellen schädigen können, aber daß die Substanz geringere Auswirkungen auf die Zellen hat als CH_3HgOH , einer Methylquecksilberverbindung. Organische Quecksilberverbindungen (z.B. Methylquecksilber $\text{Hg}(\text{CH}_3)^+$) sind somit wesentlich toxischer als anorganische Quecksilberverbindungen und haben damit eine wichtige Bedeutung bei der Beeinträchtigung der Gesundheit der Männer (Lee und Dixon, 1975).

Massenvergiftungen mit organischen Quecksilberverbindungen ereigneten sich mehrfach, In Minamata und Niigata (Japan 1953-1960) durch quecksilberhaltige Industrieabwässer. Sowie in Entwicklungsländern (Irak, Pakistan) durch den Verzehr von Saatgetreide, das mit quecksilberhaltigen Beizen behandelt worden war (Bakir et al., 1973).

Quecksilber wird durch aquatische Mikroorganismen zu Methylquecksilber umgesetzt und in der Nahrungskette angereichert. Der Mensch nimmt es dann z. B. durch Fischkonsum auf. Die enterale Resorption liegt bei über 80%. Im Blut liegt Methyl-Hg zu über 90% an Erythrocyten gebunden vor, so kann es sich über den gesamten Körper verteilen. Da diese Verbindung sehr lipophil ist, werden bei Exposition mit Stäuben etwa 80 % über die

Lunge resorbiert (Summer und Halbach, 1996). Methylquecksilber wird hauptsächlich im Gehirn gespeichert. Daneben wird Methyl-Hg bevorzugt in der Leber und zu einem geringen Teil in der Niere angereichert. Die biologische Halbwertszeit von Methylquecksilber beträgt 70 Tage (Summer und Halbach, 1996). Hauptquelle für die Aufnahme von Quecksilberverbindungen ist für den Menschen die Nahrung. Erwachsene (70 kg Körpergewicht) sollten wöchentlich nicht mehr als 200 µg Methylquecksilber bzw. 300 µg Gesamtquecksilber mit der Nahrung aufnehmen (WHO, 1990).

Auch aus dem Trinkwasser können Quecksilberverbindungen aufgenommen werden. Der höchstzulässige Quecksilbergehalt im Trinkwasser beträgt 0,001 mg Hg/l (Trinkwasser-Verordnung vom 5.12.1990 BGBl. I, 1990, S. 2612). Menschen können also aus verschiedenen Quellen Quecksilberverbindungen aufnehmen. Bei epidemiologischen Studien, die die Auswirkungen der Quecksilberbelastung am Arbeitsplatz untersuchen, ist es deshalb schwierig genau zu differenzieren, ob die Quecksilberbelastungen wirklich durch die berufliche Quecksilberexposition oder durch andere Einflüsse, wie z.B. erhöhten Fischkonsum, entstanden sind.

- Wenn man verschiedene Studien miteinander vergleicht, sollte man beachten, daß verschiedene Arten von Studien vorliegen (u.a. epidemiologischen Studien, in vitro Untersuchungen von Zellen, Tierversuche, etc.). Ein Vergleich ist schwierig, da sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres von einer Versuchsdurchführung auf eine andere übertragen lassen.
- Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien ist die unterschiedliche Auffassung, wann eine Schädigung durch Quecksilberverbindungen vorliegt.

Einfluß von Nitraten auf die männliche Fertilität

Die Sertoli-Zellen wurden neben dem oben diskutierten Quecksilberdinitrat in dieser Arbeit auch mit Kaliumnitrat (KNO_3) inkubiert. Nitrat (NO_3^-) ist das Gegenion zu Quecksilber in der hier untersuchten Verbindung Quecksilberdinitrat ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$). Es sollte überprüft werden, ob der toxische Effekt von Quecksilber-

dinitrat vom in der Verbindung enthaltenen Nitrat hervorgerufen wurde oder der Quecksilberanteil dafür verantwortlich war.

Kaliumnitrat ist ein Alkalimetallsalz und findet seine hauptsächlichste Verwendung als Düngemittel, Pökelsalz sowie zur Herstellung von Schießpulver. Mengen von 10-30 g Kaliumnitrat können beim Erwachsenen zu lokaler Reizung, durch Wasserentzug unter blutigem Erbrechen zu Durchfällen führen (Wirth et al., 1994). Nitrat selber kann nicht als zytotoxisch bezeichnet werden. Es kann aber im Verdauungstrakt durch Bakterien zu Nitrit (NO_2^-) reduziert werden, welches dann durch Reaktion mit sekundären Aminen in Nitrosamine umgewandelt werden kann. Nitrosamine sind hingegen als karzinogen einzustufen. Weiterhin führt Nitrit beim Menschen, speziell beim Säugling, zur Methämoglobinbildung (Streit, 1991). Methämoglobin unterscheidet sich von Hämoglobin dadurch, daß es anstelle von zweiwertigem Eisen das Eisen in dreiwertiger Oxidationsstufe enthält. Das Methämoglobin kann Sauerstoff nicht reversibel binden und scheidet deshalb für dessen Transport aus, was letztlich zu einem O_2 -Mangel in den Geweben führt. Bei ausgeprägter Methämoglobinämie besteht Zyanose (Wirth et al., 1994). Nitrit ist somit toxischer als Nitrat. Es gibt nur wenige Studien, die sich mit der Auswirkung von Nitratverbindungen auf die männliche Fertilität beschäftigen. Colomina et al. (1993) untersuchte die Wirkung von Galliumnitrat, da dieses als Chemotherapeutikum in der Krebstherapie eingesetzt wird. Männlichen Mäusen wurden Dosen von 0 (Kontrolle), 24, 48 und 96 mg/kg pro Tag subkutan injiziert. Anschließend wurden sie mit fertilen Weibchen zusammen gebracht. Die Fertilität und reproduktive Leistung unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle. Die Spermienanzahl der mit dem Medikament behandelten Gruppe war mit der Spermienanzahl der unbehandelten Gruppe vergleichbar. Histologische Untersuchungen ergaben, daß die Hoden der behandelten Tiere keine Veränderungen aufwiesen. Dieselbe Forschergruppe führte 1995 eine ähnliche Studie durch. Männliche Mäuse wurden diesmal mit Aluminiumnitrat intraperitoneal behandelt. Die Dosen betragen hier 0 (Kontrolle), 50, 100 und 200 mg/kg Aluminiumnitrat pro Tag. Es wurden ähnliche Untersuchungen wie in der zuvor beschriebenen Studie durchgeführt. Es zeigte sich diesmal, daß die Schwangerschaftsrate der weiblichen Mäuse, deren

Männchen mit 100 oder 200 mg/kg Aluminiumnitrat behandelt wurden, abnahm. Bei der Spermienanzahl kam es wie zuvor zu keiner Reduktion. Die histologischen Untersuchungen ergeben allerdings Veränderungen im Hoden der Männchen, die mit Dosen von 100 oder 200 mg/kg Aluminiumnitrat behandelt wurden (Llobet et al., 1995). Es ist aber hier davon auszugehen, daß hier der Aluminiumanteil dieser Verbindung wirkt. Aluminium ist eine starke Kationensäure, die Einfluß auf die Akrosomreaktion und die Motilität der Spermatozoen hat (Henkel et al., 2002)

Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß Kaliumnitrat keinen Einfluß auf die Vitalität der Sertoli-Zellen hatte. Kaliumnitrat führte erst ab einer Konzentration von 47,62 µM zu einer ganz geringfügigen Erhöhung der Laktatsekretion der Sertoli-Zellen. Die Pyruvatproduktion wurde ebenfalls ab einer Kaliumnitratkonzentration von 47,62 µM leicht gesteigert. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß wie vermutet der Quecksilberanteil und nicht Nitrat für die toxische Wirkung von Quecksilberdinitrat auf Sertoli-Zellen verantwortlich war.

Einfluß von Cadmiumverbindungen auf die männliche Fertilität

Bei der Diskussion des Einflusses von Quecksilberverbindungen auf die männliche Fertilität sollte man auch den Einfluß von Cadmium und seinen Verbindungen betrachten. Cadmium und Quecksilber befinden sich im Periodensystem in derselben Nebengruppe (12), weshalb sie sich in ihren chemischen Eigenschaften sehr ähnlich sind. Zudem tragen diese beiden Schwermetalle wesentlich zur Umweltbelastung bei. Cadmium kommt zum Beispiel in Batterien, Farben und Tabakrauch vor (Eggert-Kruse et al., 1992).

Eggert-Kruse et al. (1992) stellten mit Hilfe eines in-vitro-Spermien-Zervikalmukus-Penetrationstest fest, daß Cadmium in Form von CdCl_2 (0,05-10 mmol/l) ähnlich wie das ebenso in dieser Studie getestete Quecksilberchlorid zu einer signifikanten ($P = 0,0001$) Verminderung der quantitativen und qualitativen Penetrationsfähigkeit der Spermien führt.

Chia et al. (1992) untersuchten 35 Männer, die alle auf Grund schlechter Spermienparameter in Behandlung waren. Für diese Fertilitätsstörungen gab es keine bekannten medizinischen Gründe. Bei den Probanden wurde nun die

Konzentration von Blei, Quecksilber, Kupfer, Zink und Cadmium gemessen. Es fiel dabei auf, daß die Cadmiumkonzentration bei diesen Probanden erhöht war. Dies läßt vermuten, daß eine erhöhte Cadmiumkonzentration zur Beeinträchtigung der Spermienqualität führt (Chia et al., 1992).

Einfluß von Cis-Platin auf die männliche Fertilität

Da, wie in der Einleitung schon erwähnt, Cis-Platin in der Therapie von Hodenkrebs eingesetzt wird, gibt es zahlreiche Studien über die Beeinflussung der männlichen Fertilität durch Cis-Platin. Bei den meisten Studien wurde eine reversible Schädigung von Zellen oder Organe, die für die Reproduktion wichtig sind, gefunden. Werden männliche Ratten mit Cis-Platin (2, 4, 8 mg/kg Körpergewicht) behandelt, so reduziert sich eine Woche nach der Behandlung mit Cis-Platin das Gewicht der Reproduktionsorgane, die Spermienanzahl, die Spermienmotilität, die Fertilität und die Mengen an Testosteron, LH und FSH (Kinkead et al., 1992). Pogach et al. (1989) setzten Ratten einer Cis-Platin Dosis von 10 mg/kg (intraperitoneal) aus. Sie stellten dabei fest, daß es zu einer Beeinflussung der morphologischen und biochemischen Eigenschaften der Sertoli-Zellen kam und schlossen daraus, daß diese Änderungen in der Funktion der Sertoli-Zelle verantwortlich für die Beeinträchtigung der Spermatogenese durch Cis-Platin ist (Pogach et al., 1989). Beim Menschen kommt es meistens nach ungefähr zwei bis drei Jahren nach erfolgter Cis-Platin-Therapie zu einer Normalisierung der Spermatogenese und damit zur Wiedererlangung der Fertilität (Drasga, 1983; Johnson, 1984; Fossa, 1985; Cullen, 1996; Schrader et al., 2001). Einige Studien widersprechen der Auffassung, daß Cis-Platin lediglich eine reversible Schädigung der männlichen Fertilität hervorrufen kann. Eine Cis-Platin Behandlung in der Kindheit kann zu späteren Störungen der Spermatogenese führen (Wallace et al., 1989). Zirkulierendes Cis-Platin kann noch zwanzig Jahre nach der Behandlung im Plasma nachgewiesen werden (Oliver, 2001). Dagegen wurden Langzeitschäden im Erwachsenenalter nur in einzelnen Studien beobachtet (Hansen, 1990; Ondrus, 1986). Allerdings muß man beachten, daß eine Reihe von Patienten bereits durch die Hodenkrebs Erkrankung infertil waren.

Um einen schädigenden Einfluß von Cis-Platin auf die männliche Fertilität zu vermeiden, muß die bei der Behandlung eingesetzte Dosis so gering wie möglich sein. Liegt die kummulative Dosis von Cis-Platin über $0,6 \text{ g (=600 mg)/m}^2$ Körperoberfläche, so droht bei mehr als 50% der Patienten eine Langzeit-Infertilität (Schrader et al., 2001, 2002). Bei einer Dosis unter 400 mg/m^2 Körperoberfläche ist es dagegen unwahrscheinlich, daß Langzeitauswirkungen auf die Spermienproduktion und die endokrine Funktion auftreten (Cullen, 1996 (100 mg/m^2 3x wöchentlich); Pont et al., 1997, De Santis et al., 1999).

Bei den hier beschriebenen Versuchsdurchführungen wurden die Sertoli-Zellen Cis-Platin-Konzentrationen von $6,25\text{-}100 \mu\text{M}$ ausgesetzt, dabei verringerte sich die Vitalität der Sertoli-Zellen um 15% bei einer Cis-Platin-Konzentration von $100 \mu\text{M}$. Zum Vergleich: die oben erwähnte Cis-Platin Dosis von $0,6 \text{ g (=600 mg)/m}^2$ Körperoberfläche beim Menschen, kann durch die Einnahme von $1,1 \text{ g}$ Cis-Platin beim Menschen erreicht werden.

Köhn et al. (1995) untersuchten die Auswirkungen einer weiteren Platinverbindung auf die Fertilität der Männer. Menschliche Spermien von gesunden Probanden ($n=7$) wurden Hexachloroplatinsäurekonzentrationen von 5, 50, 500 oder 1000 mM ausgesetzt. Diese Untersuchungen zeigten, daß Hexachloroplatinsäure weder die Motilität noch die Entwicklung oder die Vollständigkeit der Membranintegrität der Spermien beeinflusst. Hexachloroplatinsäure verursacht allerdings eine Akrosomenreaktion nach einer Inkubationszeit von drei Stunden, noch bevor es zu zytotoxischen Effekten kommt (Köhn et al., 1995).

Einfluß von Kupferverbindungen auf die männliche Fertilität

Werden die Sertoli-Zellen mit Kupfersulfat inkubiert, so reduzierte sich nach den hier durchgeführten Untersuchungen der Prozentsatz der vitalen Zellen um 13-22%. Die Zytotoxizität von Kupfersulfat gegenüber primären Sertoli-Zellen ist demnach wesentlich geringer als die von Quecksilberdinitrat.

In der Literatur fanden sich relativ wenig Angaben über die zytotoxische Wirkung von Kupferverbindungen auf Zellen, die bei der männlichen Fertilität eine wichtige Rolle spielen. Es wurde in sehr vielen Studien die Wirkung von Kupfer als Bestandteil von Intrauterinpressaren (Nidationshemmer) in der weiblichen

Gebärmutter untersucht. Kupfer gilt in seiner metallischen Form als wesentlicher Co-Faktor bei der kontrazeptiven Wirkung von Intrauterinpressaren (Chang et al., 1970). Es konnte aber schon in den siebziger Jahren nachgewiesen werden, daß die Spiegel, die notwendig waren, um die Penetration der Spermien durch den Schleim *in vitro* zu hemmen, deutlich höher waren als die, die von einem Kupfer-IUP freigesetzt wurden (Elstein et al., 1973; Jecht et al., 1973; Rush et al., 1974; Eggert-Kruse et al., 1992). Auch bei männlichen Säugern führt die Einpflanzung von metallischen Kupferpartikeln zu reversibler Infertilität (Xu et al., 1985). Kapur et al. (1984) setzten Rhesusaffen intravasale Kupfer-*in-vitro*-Vorrichtungen ein, die zu einem Anstieg von abgestorbenen Spermien im Ejakulat um 23-52,3% führten. Zudem war ein Rückgang der motilen Spermien um 10-30% zu verzeichnen.

Weiterhin gibt es eine Reihe von Studien (z.B. Stanwell-Smith R et al.1983; Valsa J et al. 1994; Wong WY et al., 2001) die sich mit Kupfer als essentielles Spurenelement befassen. Dabei wurde u.a. untersucht, welche Rolle Kupfer bei der Reproduktion spielt. Schwache Korrelationen zwischen der Kupferkonzentration im Blutplasma und der Spermienmotilität wurden gefunden. Insgesamt aber läßt sich sagen, daß obwohl Kalzium, Magnesium, Zink und Kupfer eine wichtige Rolle in der Spermatogenese und bei der Fertilität spielen, es keinen Unterschied zwischen den ermittelten Blut- und Seminalplasmakonzentrationen infertiler und fertiler Männer gibt (Wong et al., 2001). Valsa et al. (1994) fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Kupfermenge im Ejakulat und irgendeinem der untersuchten Spermaparametern. Jockenhövel et al. (1990) stellten dagegen signifikante Korrelationen zwischen der Konzentration von Kupfer im Sperma und der Spermienkonzentration, dem Prozentsatz der beweglichen Spermien und der normalen Morphologie der Spermien fest. Allerdings unterscheidet sich die Konzentration von Kupfer im Sperma von infertilen und fertilen Männern nicht signifikant (Jockenhövel et al., 1990).

In der bei der Betrachtung der Zytotoxizität von Quecksilberdinitrat erwähnten Studie von Eggert-Kruse et al. (1992) übte Kupfersulfat in den getesteten Konzentrationen (0,0001-10 mmol/l = 0,1-10.000 µM) keinen so starken Einfluß auf das Sperma aus wie die beiden anderen untersuchten Substanzen (HgCl₂ und

CdCl₂). Bei den hier beschriebenen Versuchsdurchführungen wurden die Sertoli-Zellen Kupfersulfat-Konzentrationen von 6,25-100 µM ausgesetzt. Dabei wurde ein signifikanter Rückgang der Anzahl der vitalen Sertoli-Zellen um 13-22% beobachtet.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß Kupferverbindungen keinen großen schädigenden Einfluß auf Zellen oder Organe haben, die für die Reproduktion wichtig sind.

Wirkung von Noxen (insbesondere Metalle und deren Verbindungen) auf Sertoli-Zellen

Raychoudhury et al. (1995) beobachteten, daß das Östrogen 4-tert-octylphenol direkt toxisch auf die Spermien produzierenden Zellen und Sertolizellkultur wirkt. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß dieser toxische Effekt in Sertoli-Zellen durch Ca²⁺-abhängige Apoptose ausgeübt wird. Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod von Zellen mit deren nachfolgender Phagozytose oder Abbau (lysosomal-enzymatisch). Apoptose ist ein irreversibler Vorgang, der zum Untergang der Zelle führt. Die Apoptose findet in einzelnen Zellen statt, hat keine Entzündungsreaktionen zur Folge und wird durch einen Stimulus (endogene Proteine und Hormone, jedoch auch Fremdstoffe, oxidativer Streß, Anoxie, γ -Strahlen) induziert.

Eine Zellnekrose hingegen tritt nie unter physiologischen Bedingungen auf, denn sie ist eine generelle Folge von schweren Zellschäden. Es kommt zu einer Schwellung (Vakuolisierung) der Zelle mit anschließenden mitochondrialen Veränderungen und damit zu Stoffwechselstörungen, als Folge daraus resultiert der Zelltod und die Zerstörung der Zelle. Reader et al. (1990) beobachtete bei Sertoli-Zellen nach der Zugabe von 100 µM 3,4-Dinitrotoluol eine extensive Vakuolisierung der Sertoli-Zellen. Eine ähnliche Beobachtung wurde nach der Inkubation von Sertoli-Zellen mit PCBs und Cadmiumacetat (24 Stunden) gemacht: die Sertoli-Zellen beginnen sich zu runden, werden blasig und lösen sich von ihrem Substrat (Syed et al., 1997). Dies könnte auf eine folgende Nekrose hindeuten. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann man

vermuten, daß die Noxen, die auf Sertoli-Zellen einwirken sowohl eine Nekrose, als auch eine Apoptose auslösen können.

Mechanismen der Zellschädigung durch Metalle und Metallverbindungen

Da in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Metallsalzen untersucht wurde, soll hier nun näher darauf eingegangen werden, wie Metalle und Metallverbindungen Zellen schädigen können.

Die Schädigung von Zellen durch Metalle erfolgt in Stufen. Eine wichtige Rolle spielen dabei zuerst die Metallothioneine (MT). Metallothioneine sind intrazelluläre metallbindende Proteine. Physiologisch sind die Metalle Zn(II) und Cu(II) an die im Cytosol der Zelle liegenden MTs gebunden, die aber durch eine Reihe anderer zweiwertiger Metall-Ionen von z.B. Cd, Hg, Pb, Bi, Sn, Co, Ni ersetzt werden können, wenn diese in erhöhter Konzentration auftreten. Dadurch ist ihre Entgiftung möglich. Es gibt einen physiologischen Anteil an MTs und einen durch Streßfaktoren (z.B. erhöhte Schwermetallkonzentrationen) induzierbaren Anteil. Diese Induktion dauert natürlich eine gewisse Zeit. Toxische Effekte können sich damit in der Zeitspanne bis zum Vorliegen genügender MT-Konzentrationen ergeben. Ist eine Metallkonzentration zudem höher als jene, die durch MT gebunden werden kann, führt dies zur Schwermetall-Toxizität (Fent, 1998). Die nicht durch MTs abgefangenen Schwermetallionen können nun in verschiedener Weise die Zellen schädigen.

Laktat

Die toxische Wirkung von anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen z.B. beruht auf der Reaktivität gegenüber Thiol- und Amino-Gruppen in Proteinen, Enzymen etc. Dies führt zur Beeinträchtigung einer Vielzahl von enzymatischen Synthese- und Transportprozessen, insbesondere dann, wenn die Funktionsweise der Enzyme aktive Zentren mit freien SH-Gruppen voraussetzt (Fent, 1998).

So hemmen Schwermetalle wie z.B. Quecksilber- und Blei-Ionen die Na^+/K^+ -ATPase, wobei ursächlich die oben erwähnte große Affinität der Schwermetalle zu funktionellen SH-Gruppen im Vordergrund steht. Die Na^+/K^+ -ATPase ist die

für die Zelle wichtigste Ionenpumpe. Zwischen Zellinnerem und –äußeren bestehen Gradienten unterschiedlicher Ionenkonzentrationen, diese werden durch aktive, energieverbrauchende Ionenpumpen eingestellt und aufrechterhalten (Fent, 1998). Kommt es nun zu der oben beschriebene Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase so wird das zelluläre Ionengleichgewicht gestört, das für den Ablauf der oxidativen Phosphorylierung nötig ist. Schwermetalle hemmen somit die oxidative Phosphorylierung (Atmungskette). Sie inhibieren damit die Energieproduktion der Mitochondrien, die im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung ATP produzieren. Die meisten Zellen des Körpers gewinnen ATP sowohl über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung als auch über die Glykolyse. Vermutlich kommt es durch die Schwermetalle zu einer Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, so daß eine vermehrte Energiegewinnung der Zelle durch die Glykolyse stattfindet. Pyruvat wird unter anaeroben Bedingungen in der Glykolyse zu Laktat überführt. Anaerobe Bedingungen herrschen z.B. im kontrahierten Muskel oder durch die Wirkung von Giften auf die Zelle. Dies wäre eine Erklärung für die hier beobachtete vermehrte Laktatausschüttung bei hohen Noxenkonzentrationen (bei Quecksilberdinitrat, Cis-Platin, Kupfersulfat). Bei der Untersuchung der Laktatsekretion der Zellen zeigte sich, daß sich die Ausschüttung des Laktats mit zunehmender Noxenkonzentration und zunehmender Zytotoxizität der untersuchten Metallsalze steigerte. So kam es bei Quecksilberdinitrat-Konzentrationen von $9,9 \mu\text{M}$ bereits zu einer signifikanten Erhöhung der Laktatsekretion, während es nach der Inkubation mit Kupfersulfat erst ab einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Steigerung kam.

Die vermehrte Laktatsekretion bei zunehmenden Noxenkonzentrationen könnte aber auch darauf zurückzuführen sein, daß die Membran der sterbenden oder toten Zellen durchlässig wird. Dann kann z.B. das Enzym LDH aus der Zelle austreten und ebenfalls vorhandenes Pyruvat (z.B. aus dem Cytosol) in Laktat umwandeln.

Batarseh et al. (1986) setzten Sertoli-Zellen Bleiazetatkonzentrationen von $0,001$; $0,05$ und $0,10 \mu\text{M}$ (für 3, 6, 9 und 12 Stunden) aus und beobachteten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Laktatproduktion, während die Prote-

inbiosynthese signifikant zurückging. Wurden Sertoli-Zell-Kulturen für 24 Stunden mit PCB's inkubiert, so stieg die Laktatsekretion ebenfalls signifikant an und 20-45 % der Sertoli-Zellen starben ab (Raychoudhury, 2000).

Die vermehrte Sekretion von Laktat wirkt wiederum toxisch (Monsees et al., 1998). Es bleibt allerdings unklar, in welcher Weise die Zunahme der Sekretion des Nährstoffes Laktat toxisch auf die Keimzellen wirkt. Während der Produktion von Laktat im Rahmen der Glykolyse entstehen jedoch Protonen. Um ihre innere pH-Homöostase aufrecht zu erhalten, kommt es nun zu einer Protonenausscheidung der Sertoli-Zellen. Die daraus resultierende Versäuerung der äußeren Umgebung kann eventuell zu einem Keimzellschaden führen oder die Anheftung der Keimzellen reduzieren (Monsees et al., 1998).

Andererseits unterstützen Sertoli-Zellen die Spermatogenese durch Stoffwechselprodukte. Laktat ist eines dieser Substrate. Es wird bevorzugt von Spermatozyten metabolisiert. Beattie et al. (1984) fanden heraus, daß 2-Methoxyethanol und Methoxy-Säure keine Auswirkung auf die Vitalität der Zellen haben, aber die Laktatproduktion hemmen. Sie erklärten damit die hemmende Wirkung dieser Noxe auf die Spermatogenese (Beattie et al., 1984). Dieser Hemmungsmechanismus trifft sicherlich nicht auf die toxische Wirkung der hier untersuchten Schwermetallsalze zu.

Die Laktatproduktion nimmt nach Inkubation mit Quecksilberdinitrat-Konzentrationen von 14,78 μM und höher zwar rapide ab. Jedoch scheint diese Abnahme in direktem Zusammenhang mit der Abnahme der Zellvitalität zu stehen, die im MTT-Assay gemessen wurde.

Pyruvat

Neben der Bestimmung der Laktatproduktion wurde die Messung eines weiteren Produktes der Glykolyse durchgeführt. Pyruvat entsteht durch den Abbau von Glucose in der Glykolyse unter aeroben Bedingungen. Herrschen anaerobe Verhältnisse, so wird es, wie oben erwähnt, zu Laktat überführt. In der vorliegenden Arbeit kam es nach der Inkubation der Zellen mit Quecksilberdinitrat-Konzentrationen von 47,62 μM zu einer signifikanten Steigerung der Pyruvatsekretion. Nach der Zugabe von Kupfersulfat-Konzentrationen von 50 μM stei-

gerate sich die Pyruvatsekretion ebenfalls signifikant. Wurden die Zellen mit Cis-Platin inkubiert, so erhöhte sich die Pyruvatproduktion der Sertoli-Zellen erst ab einer Konzentration von 100 μM .

Insgesamt läßt sich sagen, daß die Zunahme der Pyruvatsekretion deutlich schwächer ausfällt als die Steigerung der Laktatsekretion und es erst bei höheren Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung kommt.

Bei anderen Studien wurden ähnlich Beobachtungen gemacht. Wurden Sertoli-Zellen mit Dinitrofluoräthylbenzol inkubiert, so stieg die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen signifikant an, während die Pyruvatsekretion nicht bei allen Isomeren dieser Noxe deutlich ansteigt (Reader und Foster, 1990). Williams und Foster (1988) beobachten nach der Inkubation von Sertoli-Zellen mit 1,3-Dinitrobenzol und Mono-2-Ethylhexyl-Phthalat eine signifikante Steigerung der Laktatsekretion, die Pyruvatproduktion stieg jedoch nur nach 1,3-Dinitrobenzen-Inkubation. Daraus kann geschlossen werden, daß die Messung der Laktatsekretion sich wahrscheinlich besser als Marker für die Funktion der Sertoli-Zelle eignet, als die Messung der Pyruvatsekretion.

Inhibin

Ein weiterer in dieser Arbeit gemessener Parameter der Zellfunktion der Sertoli-Zelle ist Ausschüttung von Inhibin-B.

Beim Mann wird das Hormon Inhibin hauptsächlich durch die Sertoli-Zellen produziert. Inhibin besteht aus zwei verschiedenen durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten (α -Untereinheit und entweder βA -Untereinheit oder βB -Untereinheit). Die α -Kette ist bei beiden Inhibin-Formen identisch; die β -Kette unterscheidet Inhibin-A und Inhibin-B. Hier wurde ausschließlich die Inhibin-B Produktion der Sertoli-Zellen ermittelt, da bei Männern Inhibin-B die physiologisch relevantere Form von Inhibin ist (Illingworth et al., 1996).

Berensztein et al. (2000) untersuchten Sertoli-Zellkulturen von verstorbenen Jungen im Alter von 10 Tagen, 1-9 Monaten und 12-84 Monaten. Die Sertoli-Zellen besitzen Rezeptoren für FSH, das zu einer Stimulation der Inhibin-B Sekretion in Sertoli-Zellkulturen führt. Das follikelstimulierende Hormon FSH wird im

Hypophysenvorderlappen gebildet und gelangt über das Blut zum Hoden. Bei den Untersuchungen von Berensztein et al. (2000) wurden die Sertoli-Zellen durch Zugabe von FSH zur Inhibin-B-Sekretion stimuliert, dabei stellte er fest, daß die Sertoli-Zellkulturen von 10 Tage alten Kindern am meisten Inhibin-B ausscheiden. Die gemessene Inhibin-B-Sekretion nahm in den ersten Lebensjahren (bis zu einem Alter von 84 Monaten) stetig ab. Bei dieser Studie wurden keine Messungen bei älteren Jungen durchgeführt.

Eigene Untersuchungen bestätigen ebenfalls, daß FSH zu einer Steigerung der Inhibin-B-Produktion führt. Die Inhibinproduktion in Abhängigkeit von der FSH-Konzentration zeigte den Verlauf einer Optimumskurve. Übereinstimmung mit der Literatur herrscht dahingehend, daß ein niedriger Inhibinspiegel durch FSH gesteigert werden kann.

Da Inhibin in Abhängigkeit von FSH gebildet wird, und selber die FSH-Sekretion hemmt, zeigt ein erhöhter FSH-Spiegel beim Mann immer eine (prognostisch ungünstige) Sertoli-Zellschädigung an (Aumüller, 1991). Über die Gründe der weniger starken Inhibinproduktion bei hohen FSH-Konzentrationen kann nur spekuliert werden. Normalerweise sieht man eine Sättigungskurve, da die FSH-Rezeptoren nur eine bestimmte Anzahl von FSH binden können.

Aufgrund der oben beschriebenen bedeutsamen Rolle, die Inhibin für die physiologische Funktion der Sertoli-Zelle hat, ist es von Interesse zu untersuchen, wie die hier getesteten Noxen auf die Inhibin-Sekretion der Sertoli-Zellen wirken.

Ab einer Cis-Platin-Konzentration von 25 μM reduzierte sich die Inhibin-B Produktion signifikant ($p < 0,001$). Bei einer Cis-Platin-Konzentration von 100 μM erfolgte eine vollständige Hemmung der Inhibin-B Sekretion. Bei einem Vergleich des Vitalitätsrückganges der Sertoli-Zellen und der Reduktion der Inhibin-B Sekretion zeigte sich, daß die Inhibin-B Produktion schon reduziert wurde, bevor es zu einer ernsthaften Zellschädigung kam.

Die Zugabe von Kupfersulfat führte ebenfalls zu einer Reduktion der Inhibin-B Produktion. Allerdings fiel diese Reduktion etwas geringer aus, als bei Cis-Platin. Selbst bei einer hohen Kupfersulfatkonzentration (100 μM) kam es nicht

zur vollständigen Hemmung der Inhibin-B Produktion, sondern die Inhibin-B Sekretion verringerte sich deutlich um 45%.

Quecksilberdinitrat hemmte wesentlich stärker als Kupfersulfat die Inhibin-B Produktion. Schon im nanomolaren Konzentrationsbereich kam es zu einer signifikanten Reduktion der Inhibin-B Sekretion. Bei einer Konzentration von 19,6 μM Quecksilberdinitrat ging die Inhibin-B Produktion im Vergleich zur Kontrolle (ohne Quecksilberdinitrat) gegen Null. Vergleicht man den Rückgang der Zellviabilität mit der Reduktion der Inhibin-B Produktion, so zeigt sich wie bei Cis-Platin, daß die Inhibin-B Produktion schon reduziert wurde, bevor die Sertoli-Zellen ernsthaft geschädigt wurden (Monsees et al., 2000).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten anderer Studien überein. Eine Hemmung der Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen wurde durch die Metallionen Hexachloroplatinsäure und Bleiazetat hervorgerufen (Monsees et al., 1998). Kadmiumdichlorid hemmt ebenfalls die Inhibinsekretion von Sertoli-Zellkulturen (Jancecki et al., 1992). Das neben Thyroxin wichtigste Schilddrüsenhormon Trijodthyronin stimuliert dagegen die Produktion von immunreaktiven, als auch bioaktiven Inhibin durch Sertoli-Zellen. Dies wurde durch die reduzierte FSH Konzentration deutlich (van Haaster, 1993).

Die Inhibin-Bestimmung ist eine sehr sensitive Methode zur Einschätzung der Reproduktions-Toxizität von Schadstoffen, mit der die Bestimmung des Einflusses subtoxischer Schadstoff-Konzentrationen möglich ist. Neben der Laktatbestimmung, eignet sich die Messung der Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen besser als Marker für die Sertoli-Zell-Funktion, als die Bestimmung der Pyruvatsekretion.

Schlußbetrachtung

Insgesamt gesehen läßt sich aber sagen, daß alle hier verwendeten und oben vorgestellten Parameter für die physiologische Funktion der Sertoli-Zelle sich zur Bestimmung des Einflusses einer reproduktionstoxikologischen (subtoxischen) Schadstoffkonzentration auf bestimmte Funktionen der Sertoli-Zellen eignen.

Zudem konnte durch die Verwendung von Zellkulturen bei den hier vorgestellten Versuchsdurchführungen ein Großteil der sonst bei anderen Studien vorhandenen Störfaktoren (z.B. gleichzeitige Aufnahme anderer Noxen, Grunderkrankungen u.ä.) vermieden werden. Es war somit durch die Verwendung von Zellkulturen eine genauere Untersuchung der einzelnen Noxen auf ihre Toxizität möglich, als bei epidemiologischen Studien oder Tierversuchen.

Ausblick

Da die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen statistisch signifikante Werte aufweisen und reproduzierbar sind, eignet sich das angewendete Testverfahren für die Prüfung anderer Noxen, von denen vermutet wird, daß sie ein reproduktionstoxikologisches Potential haben.

VI. Zusammenfassung

Sertoli-Zellen sind für den physiologischen Ablauf der Spermatogenese von großer Bedeutung, weshalb Noxen, die diese Zellen schädigen, somit auch die Fertilität des Mannes negativ beeinflussen können. Bei der Beurteilung der reproduktionsbiologischen Toxizität verschiedener Schadstoffe spielt die Sertoli-Zelle somit eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung verschiedener Metallsalze (Quecksilberdinitrat, Cis-Platin, Kupfersulfat und Kaliumnitrat) auf die Sertoli-Zelle getestet. Die Laktat-, Pyruvat- und Inhibinsekretion der Sertoli-Zelle diente dabei als Indizes für den Einfluß der Noxen auf die Funktion der Sertoli-Zelle. Neben diesen metabolischen und hormonellen Parametern wurde die Zytotoxizität der Metallsalze auf die Sertoli-Zelle getestet.

Quecksilberdinitrat hat die stärkste Wirkung auf die Funktion und Vitalität der Sertoli-Zellen. Ordnet man die getesteten Noxen nach ihrem Einfluß auf die Funktion und Vitalität der Sertoli-Zellen, so folgt als nächstes in dieser Reihe Cis-Platin, anschließend Kupfersulfat und als letztes Kaliumnitrat mit der geringsten Zytotoxizität.

Quecksilberdinitrat reduzierte die Vitalität der Sertoli-Zellen merklich, bei der höchsten getesteten Konzentration von 47,62 μM kam es zum vollständigen Erliegen der Zellvitalität. Bei Cis-Platin und Kupfersulfat verringerte sich die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase, die hier als Marker der Zellvitalität diente, wesentlich schwächer (bei einer Cis-Platin Konzentration von 100 μM um 15% ausgehend von der Kontrolle; bei einer Kupfersulfat Konzentration von 100 μM um 10%). Kaliumnitrat hatte einen noch geringeren Einfluß auf die Vitalität der Sertoli-Zellen, als Cis-Platin und Kupfersulfat.

Durch Quecksilberdinitratkonzentrationen bis 9,9 μM wurde die Laktatproduktion signifikant erhöht. Lag Quecksilberdinitrat in höheren Konzentrationen vor, so kam es zu einer signifikanten Abnahme der Laktatsekretion. Diese Abnahme scheint aber in direktem Zusammenhang mit der Abnahme der Zellvitalität zu stehen, die im MTT-Assay gemessen wurde. Nach Inkubation der Sertoli-Zellen

mit Cis-Platin erhöhte sich die Laktatausschüttung signifikant ab einer Konzentration von 50 μM . Die Inkubation mit Kupfersulfat führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Laktatsekretion ab einer Konzentration von 50 μM , allerdings ist diese Steigerung weniger ausgeprägt, als bei Cis-Platin. Die Zugabe von Kaliumnitrat hatte so gut wie keinen Einfluß auf die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen.

Bei den hier beschriebenen Versuchsdurchführungen kam es nach der Inkubation der Zellen mit Quecksilberdinitrat-Konzentrationen von 47,62 μM zu einer signifikanten Steigerung der Pyruvatsekretion. Wurden die Zellen mit Cis-Platin inkubiert, so erhöhte sich die Pyruvatproduktion der Sertoli-Zellen erst ab einer Cis-Platin-Konzentration von 100 μM . Nach der Zugabe von Kupfersulfat-Konzentrationen von 50 μM steigerte sich die Pyruvatsekretion signifikant. Kaliumnitrat hatte so gut wie keinen Einfluß auf die Pyruvatsekretion, erst ab einer Konzentration von 47,62 μM kam es zu einer ganz leichten Steigerung der Pyruvatproduktion.

Ab einer Cis-Platin-Konzentration von 25 μM reduzierte sich die Inhibin-B Produktion hochsignifikant ($p < 0,001$). Bei einer Cis-Platin-Konzentration von 100 μM erfolgte eine vollständige Hemmung der Inhibin-B Sekretion. Bei einem Vergleich des Vitalitätsrückganges mit der Reduktion der Inhibin-B Sekretion kann man feststellen, daß die Inhibin-B Sekretion schon reduziert wurde, bevor es zu einer deutlichen Zellschädigung kam.

Die Zugabe von Kupfersulfat führte ebenfalls zu einer Reduktion der Inhibin-B Produktion. Allerdings fiel diese Reduktion etwas geringer aus, als bei Cis-Platin. Selbst bei einer hohen Kupfersulfatkonzentration (100 μM) kam es nicht zu einer Hemmung der Inhibin-B Produktion, sondern es erfolgte eine markante Reduktion der Inhibin-B Sekretion um 45% ausgehend von der Kontrolle.

Quecksilberdinitrat hemmte wesentlich stärker als Kupfersulfat die Inhibin-B Produktion. Schon im nanomolaren Konzentrationsbereich kam es zu einer signifikanten Reduktion der Inhibin-B Sekretion. Bei einer Konzentration von 19,6 μM Quecksilberdinitrat geht die Inhibin-B Produktion im Vergleich zur Kontrolle (ohne Quecksilberdinitrat) gegen Null. Vergleicht man den Rückgang der Zellvitalität mit der Reduktion der Inhibin-B Produktion, so zeigt sich wie bei Cis-

Platin, daß die Inhibin-B Sekretion schon reduziert wurde, bevor die Sertoli-Zellen ernsthaft geschädigt wurden.

Insgesamt gesehen läßt sich sagen, daß alle hier verwendeten und oben vorgestellten Parameter für die physiologische Funktion der Sertoli-Zelle, sich eignen, um den Einfluß subtoxischer Konzentrationen reproduktionstoxikologischen Substanzen auf die Sertoli-Zelle zu bestimmen. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen wiesen statistische Signifikanz auf und waren reproduzierbar. Die hier bei der Sertoli-Zelle angewendeten Testverfahren eignen sich somit zur Überprüfung von Noxen bei denen ein reproduktionstoxikologisches Potential vermutet wird.

VII.: Literaturverzeichnis

- Alcser KH, Brix KA, Fine LJ, Kallenbach LR, Wolfe RA (1989) Occupational mercury exposure and male reproductive health. *Am J Ind Med.* 15: 517-529
- Allenby G, Sharpe RM, Foster PMD (1990) Changes in Sertoli cell function in vitro induced by nitrobenzene. *Fundam, Appl. Toxicol.* 14, 364-375
- Aumüller G, (1991) Anatomisch und physiologische Grundlagen; in „Andrologie“, (Krause W und Rothauge CF, Hrsg.) Enke Verlag, Stuttgart
- Aumüller G, Schulze C, Viebahn C (1992). Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech* 20: 50-72.
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science.* 181: 230-241
- Bataineh H, Al-Hamood MH, Elbetieha AM (1998) Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts. *Hum Exp Toxicol.* 17: 570-576
- 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
- Beattie PJ, Welsh MJ, Brabec MJ (1984) The effect of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on Sertoli cell lactate production and protein synthesis in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 76: 56-61
- Berensztein E, Saraco N, Belgorosky A, Rivarola MA (2000) Secretion of inhibin B by human prepubertal testicular cell in culture. *Eur J Endocrinol.* 142: 481-485
- Bundesgesetzblatt I. (1990) Trinkwasserverordnung vom 5.12.1990: 2612
- Chang CC, Tatum HI, Kincl FA (1970) The effect of intrauterine copper and other metals on implantation in rats and hamsters. *Fertil. Steril* 21: 274-278

- Chia SE, Ong CN, Lee ST, Tsakok FH (1992) Blood concentrations of lead, cadmium, mercury, zinc, and copper and human semen parameters. *Arch Androl.* 29: 177-183
- Colomina MT, Llobet JM, Sirvent JJ, Domingo JL, Corbella J (1993) Evaluation of the reproductive toxicity of gallium nitrate in mice. *Food. Chem. Toxicol.* 31: 847-851
- Cullen MH, Stenning SP, Parkinson MC, Fossa SD, Kaye SB, Horwich AH, Harland SJ, Williams MV, Jakes R (1996) Short-course adjuvant chemotherapy in high-risk stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: a Medical Research Council report. *J Clin Oncol.* 14: 441-448
- Czok R, Lamprecht, W (1974) Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat. Bergmeyer H. u. ed., Hrsg., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida: 1491-1496
- De Santis M, Albrecht W, Holtl W, Pont J (1999) Impact of cytotoxic treatment on long-term fertility in patients with germ cell cancer. *Int J Cancer.* 83: 864-865
- Donat H, Matthies J, Schwarz I (1990) Fertility of workers exposed to herbicides and pesticides. *Andrologia* 22: 401-407
- Drasga RF, Einhorn LH, Williams SD, Patel DN, Stevens EE (1983) Fertility after chemotherapy for testicular cancer. *J Clin Oncol.* 1: 179-183
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Jochum R, Adolph M, Runnebaum B (1992) The effect of heavy metals on the in vitro interaction between human sperm and cervical mucus. *Deutsche Med Wochenschr.* 117: 1383-1389
- Elstein M, Ferrer K (1973) The effect of a copper-releasing intrauterine device on sperm penetration in human cervical mucus in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 32: 109-144
- Esposito G, Keramidas M, Mauduit C, Feige JJ, Morera AM, Benahmed M (1991) Direct regulating effects of transforming growth factor-beta 1 on lactate production in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology.* 128: 1441-1449

- Fent K (1998) Ökotoxikologie. Thieme Stuttgart; New York
- Fossa SD, Aass N, Ous S, Waehre H (1991) Long-term morbidity and quality of life in testicular cancer patients. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 138: 241-246
- Fossa SD, Ous S, Abyholm T, Norman N, Loeb M (1985) Post-treatment fertility in patients with testicular cancer. II. Influence of cis-platin-based combination chemotherapy and of retroperitoneal surgery on hormone and sperm cell production. *Br J Urol.* 57: 210-214
- Franke WW, Schmid E, Vandekerckhove J, Weber K (1980) A permanently proliferating rat vascular smooth muscle cell with maintained expression of smooth muscle characteristics including actin of the smooth muscle type. *J Cell Biol* 87: 594-600
- Galdieri M, Ziparo E, Palombi F, Russo MA, Stefani M (1981) Pure Sertoli cells cultures: a new model for the study of somatic- germ cell interactions. *J Androl* 5: 249-254
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather J and McNeilly AS (1996) Measurement of dimeric Inhibin-B throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endo. Methab.* 81: 1400-1405
- Hadley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M (1985) Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J. Cell. Biol.* 101: 1511-1522
- Hanf V, Forstmann A, Costea JE, Schieferstein G, Fischer I, Schweinsberg F (1996) Mercury in urine and ejaculate in husbands of barren couples. *Toxicol Lett.* 88: 227-231
- Hansen SW, Berthelsen JG, von der Maase H (1990) Long-term fertility and Leydig cell function in patients treated for germ cell cancer with cisplatin, vinblastine, and bleomycin versus surveillance. *J Clin Oncol.* 8: 1695-1698
- van Haaster LH, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG (1993) High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology.* 133: 755-760

- Hendry WF, Levison DA, Parkinson MC, Parslow JM, Royle MG (1990) Testicular obstruction: clinicopathological studies. *Ann R Coll Surg Engl.* 72: 396-407
- Henkel R, Teichmann U, Schill W-B (2002) Influence of different heavy metals on acrosome reaction and motility of human spermatozoa. *Andrologia* 34: 131-132
- Illingworth PJ, Groome N P, Byrd W, Rainey W E, McNeilly A S, Mather J P, Bremner W J (1996) Inhibin-B: A Likely Candidate for the Physiologically Important Form of Inhibin in Men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81: 1321-1325
- Janecki A, 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
- Jecht EW, Bernstein GS (1973) The influence of copper on the motility of human spermatozoa. *Contraception.* 7: 381-401
- Jockenhoevel F, Bals-Pratsch M, Bertram HP, Nieschlag E (1990) Seminal lead and copper in fertile and infertile men. *Andrologia.* 22: 503-511
- Johnson D H, Hainsworth JD, Linde RB, Greco FA (1984) Testicular function following combination chemotherapy with cis-platin, vinblastine, and bleomycin. *Med Pediatr Oncol.* 12: 233-238
- Kapur MM, Mokkalapati S, Farooq A, Ahsan RK, Laumas KR (1984) Copper intravas device (IVD) and male contraception. *Contraception.* 29: 45-54
- Kinkead T, Flores C, Carboni AA, Menon M, Seethalakshmi L (1992) Short term effects of cis-platinum on male reproduction, fertility and pregnancy outcome. *J Urol.* 147: 201-206
- Köhn FM, Schuppe HC, Schill WB, Jeyendran RS (1995) Hydrogen hexachloroplatinate induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl.* 18: 321-325

- Lee IP, Dixon RL (1975) Effects of mercury on spermatogenesis studied by velocity sedimentation cell separation and serial mating. *J Pharmacol exp Ther.* 194: 171-181
- Leonhardt H (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.* 8., überarbeitete und erweiterte Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Lobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, Domingo JL, Corbella J (1995) Reproductive toxicology of aluminum in male mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 25: 45-51
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr L, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275
- Monsees TK, Winterstein U, Schill W-B, Miska W (1998) Influence of gossypol on the secretory function of cultured rat sertoli cells. *Toxicol.* 36: 813-816
- Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill W-B, Hayatpour J (2000) Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia.* 32: 239-246
- Mullaney B, Rosselli M, Skinner M (1994) Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PmodS. *Molekular and Cellular Endocrinology* 104: 67-73
- Nieschlag E, Weinbauer GF, Cooper TG (1992) *Reproduktion. Physiologie.* Deetjen P und Speckmann EJ, Hrsg., Urban & Schwarzenberg Verlag, München- Wien- Baltimore 1992;S.476-78
- Noll F (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed) 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach / Florida, Basel. vol. VI: 582-588
- Oliver RT (2001) Testicular cancer. *Curr Opin Oncol.* 13: 191-198
- Ondrus D, Vrabec J (1986) Testikular dysfunctions in patients after cytostatic treatment of nonseminomatous testis tumors. *Czech Med.* 9: 34-37
- Onoda M, Suarez-Quian CA, Djakiew D, 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
- Onoda M, Djakiew D (1990) Modulation of Sertoli cell secretory function by rat round spermatid protein(s). *Mol. Cell. Endocrinol.* 73: 35-44
 - Orisakwe OE, Afonne OJ, Nwobodo E, Asomugha L, Dioka CE (2001) Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 95: 92-96
 - Pogach LM, Lee Y, Gould S, Giglio W, Meyenhofer M, Huang HF (1989) Characterization of cis-platinum-induced Sertoli cell dysfunction in rodents. 98: 350-361
 - Pont J, Albrecht W (1997) Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancer. *Fertil steril.* 68: 1-5
 - Raychoudhury SS, Blake CA, Millette CF (1999) Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157: 192-202
 - Raychoudhury SS, Flowers AF, Millette CF, Finlay MF (2000) Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cultured rat Sertoli cells. *J. Androl.* 21: 964-973
 - Reader SC, Foster PM (1990) The in Vitro Effects of Four Isomers of Dinitrotoluene on Rat Sertoli and Sertoli-Germ Cell Cocultures: Germ Cell Detachment and Lactate and Pyruvate Production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106: 287-294
 - Rowland AS (1994) The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. *Occupational Environment Medicine.* 51: 28-34
 - Rush F, Elstein M (1974) The effect of incubating a copper releasing intrauterine device on sperm penetration and the physical properties of cervical mucus. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Cwlth.* 81: 483-485
 - Russel IM, Voute PA, Weyerman ME, Vos A (1993) Local treatment of hemangioma of the urogenital tract. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 10: 207-209
 - Russel LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater FL.

- Schrader M, Muller M, Straub B, Miller K (2002) Testicular sperm extraction in azoospermic patients with gonadal germ cell tumors prior to chemotherapy—a new therapy option. *Asian J Androl.* 4: 9- 15
- Schrader M, Muller M, Straub B, Miller K (2001) The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol.* 15: 611-617
- Schrader M, Heicappell R, Muller M, Straub B, Miller K (2001) The impact of chemotherapy on male fertility. *Onkologie.* 24: 326-330
- Schuurs AH (1999) Reproductive toxicity of occupational mercury. *J Dent.* 27: 249-256
- Stanwell-Smith R, Thompson SG, Haines AP, Ward RJ, Cashmore G, Stedronska J, Hendry WF (1983) A comparative study of zinc, copper, cadmium, and lead levels in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 40: 670-677
- Streit, B (1991) *Lexikon Ökotoxikologie.* VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, Germany: 449-451
- Summer KH, Halbach S (1996) Metalle. erschienen in „Toxikologie“ Grein H, Deml E, Hrsg.; VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, Germany: 463-478
- Syed V, Gu W, Hecht NB (1997) Sertoli cells in culture and mRNA differential display provide a sensitive early warning assay system to detect changes induced by xenobiotics. *J. Androl.* 18: 264-273
- Tung PS, Fritz IB (1990) Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: α -smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biol Reprod* 42: 351-365
- Valsa J, Gusani PH, Skandhan KP, Modi HT (1994) Copper in split and daily ejaculates. *J Reprod med.* 39: 725-728
- 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
- Weber MA, Gross S, Aumüller G, Konrad L (2002) Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. *Andrologia.* 34: 41-54

- Whorton MD, Krauss RM, Marshall S, Milby TH (1977) Infertility in Male Pesticide Workers. *Lancet*. 2: 1259-1261
- Whorton MD (1987) Milieu- und berufsbedingte Gefahren für die Fortpflanzung. Swanson JM, Forrest KA, Hrsg., Deutscher Ärzte-Verlag, Köln: 161-167
- Williams J, Foster PMD (1988) The production of lactate and pyruvate as sensitive indices of altered rat Sertoli cell funktion in vitro following the addition of various testicular toxicants. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 94: 160-170
- Wirth W, Wirth KE, Gloxhuber C (1994) *Toxikologie*. Thieme; Stuttgart, New York; Herausgeber Gloxhuber C; 5. Auflage
- Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkels DW, Thomas CM, Copius-Peereboom JH, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP (2001) The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol.* 15: 131-136
- Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995) Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell Tissue Res* 279: 277-289
- Wrobel KH, Bickel D, Kujat R (1995) Distribution pattern of F-actin, vimentin and alpha-tubulin in the bovine testis during postnatal development. *Acta. Anat.(Basel)* 153: 263-272
- Xu Y, Xiao FL, Xu N, Qian SZ (1985) Effects of intra-epididymal injection of copper levels in rats. *Int J Androl.* 8: 168-174

Lebenslauf

I. Persönliche Daten

Name: Gebhardt
Vorname: Swantje
Straße: Im Dorfe 24
Wohnort: 23701 Süsel-Bockholt
Telefon: 04521/74446
Geburtsdatum: 22.12.1972
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig
Tochter: Johanna Gebhardt, geb. am 18.2.2002
Lebenspartner: Uwe Hoffmann, geb. am 18.7.1961
selbständiger Landwirt
Vater: Horst Gebhardt, geb. am 15.2.1941
Diplom Ingenieur Elektrotechnik
Mutter: Michaele Gebhardt, geborene Schneider, geb. am 15.3.1943
technische Lehrerin
Schwester: Henrike Gebhardt, geb. am 23.9.1974
Biotechnologin

II. Schullaufbahn

1979 - 1981 Grundschule Warmbronn bei Leonberg
1981 - 1983 Städtische Graf-Spee-Grundschule in Essen
1983 - 1992 Städtisches Gymnasium Grashofstraße in Essen

III. Studium

1992 - 1995 Studium der Zahnmedizin an der privaten Universität Witten / Herdecke
12.11.1993 Vorphysikum
29.07.1995 Physikum
1995 - 2000 Studium der Zahnmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
06.07.2000 Staatsexamen

IV. Berufliche Laufbahn

01.10.2000 Beginn der Assistenzzeit bei Dr. D. Walter in Eutin
16.06.2003- Assistenzzeit bei Dr. W. Vorkauf in Neustadt
31.08.2003

Bockholt, den 15.12.2003

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich beim Direktor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie Herrn Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Thomas Monsees für die Überlassung des Themas, für die intensive Betreuung des praktischen und theoretischen Teil der Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Ralf Henkel danke ich für die Betreuung der Promotion und seine hilfreichen Ratschläge zur Korrektur der Promotionsniederschrift.

Frau Gaby Thiele möchte ich danken für ihre kompetente Hilfe bei den Vorbereitungen der Zellkulturen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Labors für ihre Ratschläge, hilfreichen Diskussionen und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein Dank gilt natürlich auch meinem Freund Uwe, unserer Tochter Johanna und meinen Eltern; sowie allen die mich während der Zeit der Promotion unterstützt, begleitet und ermuntert haben.