

Untersuchungen zum Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Ing. Antje Kuntzsch
geb. am 26.04.1972 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. F. Röpke, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. habil. K. Neubert, Halle (Saale)
3. PD Dr. habil. W. Schäfer, Freiburg (Breisgau)

Halle (Saale) im Sommer 2000

Bibliographische Beschreibung

Kuntzsch Antje:

Untersuchungen zum Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau.

108 S., 25 Abb., 12 Tab., 122 Lit.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, Labor für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Tumordiagnostik, Dissertation, 2000.

Kurzreferat

Eine Sterilität stellt für betroffene Paare ein ernstes Problem mit großen sozialen und psychischen Belastungen dar. In manchen Fällen sind gegenwärtig die Ursachen nicht nachweisbar. Als mögliche Ursache dieser sogenannten idiopathischen Sterilität werden bei der Frau in zunehmendem Maße endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt diskutiert. Die Analytik zur Erfassung der Anreicherung von chlorierten Kohlenwasserstoffen, Alcyphenolen und Phytoestrogenen in humanen Geweben normofertiler und steriler Frauen, erfolgte unter Verwendung einer hochauflösenden GC-MS. Die inhibitorische Wirkung von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium, wurde im kompetitiven Radioliganden Bindungs-Assay bestimmt. Die Expositionsuntersuchungen ergaben, dass etwa 70 % der Gesamtbelastung humaner Gewebe auf p,p'-DDE entfällt. Im Zielgewebe estrogener Wirkungsfähigkeit, dem humanen Endometrium, konnte gegenüber dem Serum eine Anreicherung von β -HCH und p,p'-DDE bei normofertilen und bei sterilen Frauen festgestellt werden. Die Konzentrationen beider Verbindungen in der sterilen Probandinnengruppe lagen jedoch deutlich unter denen der normofertilen Probandinnenauswahl. Die nichtcoplanaren PCB wurden im Endometrium beider Gruppen in etwa den gleichen Konzentrationen nachgewiesen. Aus den Kompetitionsuntersuchungen ging hervor, dass endokrin wirksame Verbindungen durchaus in der Lage sind die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium zu beeinträchtigen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass p,p'-DDE, β -HCH und die nichtcoplanaren PCB den zyklusgerechten Aufbau der Uterusschleimhaut beeinflussen. In Konzentrationen entsprechend der Belastung in humanem Endometrium waren alle drei Verbindungen in der Lage, die Steroid-Rezeptor-Bindung zu inhibieren. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Verbindungen die Fertilität der Frau beeinträchtigen.

Schlagwörter

Sterilität, Fertilität, Steroidrezeptor, Inhibitor, Exposition, endokrin, Endometrium, Myometrium, Myomknoten, Serum, Fettgewebe, Uterus, DDT, DDE, DDD, HCH, PCB, 4-tert-Octylphenol, Coumestrol, Genistein, GC-MS, SR1, Radioimmunoassay, Radioliganden-Bindungs-Assay

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole

1.	Einleitung	1
1.1.	Zielstellung.....	1
1.2.	Grundlagen zum zyklischen Aufbau des humanen Endometriums.....	2
1.2.1.	Bildung und Wirkung von Estrogenen sowie Gestagenen.....	3
1.3.	Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt.....	6
1.3.1.	Polychlorierte Biphenyle.....	9
1.3.2.	Insektizide.....	10
1.3.3.	Alcylphenole.....	13
1.3.4.	Phytoestrogene.....	14
2.	Probandinnen, Materialien und Methoden	16
2.1.	Chemikalien und Testsubstanzen.....	16
2.2.	Expositionsuntersuchungen.....	17
2.2.1.	Probandinnenkollektive.....	17
2.2.2.	Untersuchungsmaterial und Untersuchungsparameter.....	19
2.2.3.	Probenentnahme und Probentransport.....	20
2.2.4.	Quantitativer Nachweis von LH, FSH, 17 β -Estradiol, Progesteron, Testosteron und SHBG im Serum.....	21
2.2.5.	Quantitativer Nachweis von 17 β -Estradiol, Progesteron und der Steroidrezeptoren in humanen Geweben.....	23
2.2.6.	Quantitative Bestimmung von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol in humanen Geweben mittels hochauflösender GC-MS.....	31
2.3.	Kompetitionsuntersuchungen.....	35
2.3.1.	Untersuchungsparameter.....	35
2.3.2.	Gewebe.....	36
2.3.3.	Gewebepräparation.....	36
2.3.4.	Bestimmung des Einflusses von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung	37
2.3.5.	Bestimmung des Einflusses von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen auf die Dissoziationskonstante der Steroidrezeptoren.....	40
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Expositionsuntersuchungen.....	43
3.1.1.	Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt im Fettgewebe, in uterinen Geweben und im Serum von normofertilen Frauen.....	43

3.1.2.	Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in Endometrium und Serum von Sterilitätpatientinnen.....	50
3.1.3.	Direkter Vergleich der Belastung normofertiler und steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt.....	54
3.1.4.	Hormonelle Parameter und endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in Serum und uterinen Geweben.....	56
3.2.	Kompetitionsuntersuchungen.....	58
3.2.1.	Kompetitive Hemmung der Steroidbindung am Estrogen- und Gestagen- rezeptor durch endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt.....	58
3.2.2.	Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Steroid-Rezeptor-Bindung entsprechend der Belastung im Geweb	66
4.	Diskussion	72
4.1.	Zielstellung.....	72
4.2.	Probandinnen.....	73
4.3.	Methoden.....	74
4.4.	Fragebogen.....	75
4.5.	Expositionsuntersuchungen.....	75
4.5.1.	Belastungssituation von Serum und Fettgewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt.....	76
4.5.2.	Belastungssituation in uterinen Geweben.....	80
4.5.3.	Vergleich der Belastung normofertiler und steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt.....	84
4.5.4.	Hormonelle Parameter und endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in Serum und uterinen Geweben.....	86
4.6.	Kompetitionsuntersuchungen.....	89
4.6.1.	Estrogenrezeptoren.....	90
4.6.2.	Gestagenrezeptoren.....	94
5.	Zusammenfassung	97
6.	Literaturverzeichnis	100
7.	Anhang	I – XII

Thesen

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AH-Rezeptor	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AP	Alcylphenol
AP1EO	Alcylphenol Monoethoxylat
AP2EO	Alcylphenol Diethoxylat
APE	Alcylphenol Polyethoxylate
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CKW	chlorierte Kohlenwasserstoffe
cpm	counts per minute
DDD	Dichloro-(p-chlorophenyl)-ethane
DDE	Bis-(chlorphenyl)-2,2,-dichlorethylen
DDT	Bis-(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichlorethan
DES	Diethylstilbestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
ER α	Estradiolrezeptor α
ER β	Estradiolrezeptor β
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Gl.	Gleichung
HCB	Hexachlorbenzol
HCH	Hexachlorcyclohexan
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
IC ₂₀	Inhibitorkonstante, bei der 20 % der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt wird
IC ₅₀	Inhibitorkonstante, bei der 50 % der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt wird
IC ₈₀	Inhibitorkonstante, bei der 80 % der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt wird
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	kilo Dalton
LH	Luteinisierendes Hormon

NPE	Nonylphenol Ethoxylate
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OP	4-tert-Octylphenol
ORG2058	16 α -Ethyl-21-hydroxy-19-norpregn-4-ene-3,20-dione
PCB	polychlorierte Biphenyle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SHBG	sexualhormonbindendes Globulin
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
TGF- α	Transforming growth factor- α
Tracer	spezifisch radioaktiv markiertes Steroidhormon
U	Units
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Weitere Abkürzungen werden im Text bei ihrer Verwendung erklärt.

1. Einleitung

1.1. Zielstellung

Ungewollte Kinderlosigkeit stellt für betroffene Paare ein ernstzunehmendes Problem mit großen sozialen und psychischen Belastungen dar, deren Schwere gemeinhin weit unterschätzt wird. Derzeit wird davon ausgegangen, dass bis zu 15 % aller Ehepaare ungewollt kinderlos bleiben (*Leyendecker 1997*). Die Ursachen der ungewollten Kinderlosigkeit dieser Paare liegen zu 45 % bei der Frau und zu 40 % beim Mann. Bei 15 % der Fälle bleibt die Zuordnung ungeklärt. In den vergangenen Jahren häuften sich die Hinweise, die eine Zunahme der Zahl der infertilen Paare nahelegen (*Strowitzki 1996*). Für den Rückgang der Fertilität werden soziologische, ökonomische und medizinische Faktoren diskutiert. Dazu zählen die Zunahme des durchschnittlichen Alters der Erstgebärenden, die Verschlechterung der andrologischen Befunde und in zunehmendem Maße Umweltfaktoren (*Schwartz et al. 1982; Carlsen et al. 1992; Auger et al. 1994; James et al. 1993; Van Waeleghem et al. 1994; Schirren et al. 1995*).

Die Fertilität der Frau kann von einer Fülle verschiedenster Faktoren negativ beeinflusst werden. Nur in Ausnahmefällen liegt der Sterilität eine einzige Ursache zugrunde. Bei ca. 85 % der sterilen Frauen kann die Fertilitätsstörung eindeutig diagnostiziert werden. Das können Ovulationsstörungen, Störungen während der Follikelreifung, eine Endometriose, tubare oder zervikale Faktoren sein. Bei 15 % der Frauen kann die Ursache der Sterilität nicht gefunden werden. In diesen Fällen handelt es sich um eine sogenannte idiopathische Sterilität. Als mögliche Ursache weiblicher idiopathischer Sterilität werden in zunehmendem Maße endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt diskutiert. Die Bedeutung solcher Substanzen ist unter diesen Gesichtspunkten noch nicht umfassend analysiert worden (*Strowitzki et al. 1996*). Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in der Lage sind, die Fortpflanzung und Frühgravidität negativ zu beeinflussen (*Beier 1988; Fischer 1987*). Die Kenntnisse über reproduktionstoxische Effekte beim Menschen sind spärlich und resultieren aus wenigen epidemiologischen Erhebungen.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen die Frage zu beantworten, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt tatsächlich für Störungen der weiblichen Fertilität verantwortlich gemacht werden können. Es wurden zwei Schwerpunkte gesetzt:

1. Zunächst sollte geklärt werden, ob endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in der Lage sind, mit endogenen Hormonen um die Bindung an humanen uterinen Steroidrezeptoren zu konkurrieren. Bisher existieren entsprechende Ergebnisse nur aus tierexperimentellen Untersuchungen. Die Frage, inwieweit diese Erkenntnisse auf den

Menschen übertragen werden können, und somit für diesen relevant sind, blieb unbeantwortet.

2. Weiterhin sollte die Belastung humaner uteriner Gewebe normofertiler und steriler Frauen untersucht werden. Diese Untersuchungen sind erforderlich, da die alleinige Kenntnis der Bindungsaffinität einzelner ökologisch relevanter Wirkstoffe an den humanen uterinen Steroidrezeptoren nicht ausreicht, um solche als reproduktionstoxisch zu bewerten. Das Wissen um die Belastung des humanen Endometriums steriler Frauen soll helfen, die Substanzen aus der Vielzahl ökologisch relevanter endokrin wirksamer Verbindungen herauszufiltern, die für reproduktionstoxikologische Untersuchungen von besonderem Interesse sind. Außerdem können die Konzentrationsbereiche, in denen nach Effekten in humanem Endometrium gesucht werden sollte, klar definiert werden. Die direkte Gegenüberstellung der Belastung steriler und normofertiler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt ergibt möglicherweise Hinweise auf Substanzen, die im Zusammenhang mit Fertilitätsstörungen besonders beachtet werden sollten.

1.2. Grundlagen zum zyklischen Aufbau des humanen Endometriums

Der zyklusgerechte Aufbau des Endometriums ist für die Implantation der Blastozyste, als Beginn einer Schwangerschaft, von entscheidender Bedeutung. In Abhängigkeit von Menge und Wirkungsdauer der Steroidhormone zeigt das Endometrium typische zyklische Veränderungen, die in ihrem zeitlichen Ablauf so charakteristisch sind, dass nach ihrer Morphologie eine zeitliche Einteilung möglich ist. Histologisch lassen sich vier Phasen des zyklischen Endometriums unterscheiden: die Proliferation, die Sekretion, die Desquamation und die Regeneration.

In der Proliferationsphase fördern Estrogene aus der Basalschicht des Endometriums die Bildung einer neuen Funktionalis, die zum Zeitpunkt der Ovulation eine Dicke von 3,5 mm erreicht. Zu Beginn der Proliferation sind die Drüsen des Endometriums spärlich vorhanden, eng und gestreckt. Im weiteren Verlauf wird das Volumen der Drüsen weiter gestellt. Am Ende der Proliferationsphase verlängern und schlängeln sich die Drüsenschläuche. Epithel- und Stromazellen zeigen bis zum Zeitpunkt der Ovulation eine zunehmende Mitosenzahl und Mehrreihigkeit der Kerne in den Drüsenepithelien. Zudem proliferieren die Spiralarterien. Am Ende der Proliferationsphase erreicht die Zahl der Estrogenrezeptoren ihr Maximum.

Die sekretorische Umwandlung des Endometriums erfolgt unter dem Einfluß von Progesteron. Sie ist jedoch nur nach vorheriger Estrogenwirkung möglich. Als frühestes Zeichen der beginnenden Sekretion weisen die basalen Anteile des Drüsenepithels eine basale Vakuolenbildung auf. Zu diesem Zeitpunkt werden die Drüsenschläuche weiter, zeigen ein zunehmend sägeförmiges Muster und sezernieren in das Drüsenlumen Glykogen und Proteine, die der Ernährung des Embryo dienen könnten (z.B. Uteroglobulin). Auch Prostaglandine werden gebildet. Zudem wird die Gliederung in Spongiosa und Kompakta ausgeprägter und im bindegewebigen Stroma kommt es zur Ausbildung eines Ödems. In den Stromazellen steigt die Mitosenrate erneut an. Die Progesteronrezeptoren nehmen zu, die Estrogenrezeptoren werden weniger. Die zur Umwandlung von Estron in Estradiol erforderliche 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase verliert an Aktivität. Um die Spiralarterien herum tritt zuerst eine pseudodeziduale und leukozytäre Reaktion ein.

Bei einer Rückbildung des Gelbkörpers, dies ist der Fall wenn keine Schwangerschaft eingetreten ist, kommt es durch Progesteron-Estrogenentzug zunächst zu starken Gefäßreaktionen mit Kontraktionen, Dilatationen, Zellauswanderung und Blutaustritten aus den Arteriolen. Das Endometrium kann hormonell nicht mehr erhalten werden und schrumpft. Die Kompakta und Spongiosa werden abgestoßen und die Menstruation setzt als Entzugsblutung ein (Desquamationsphase).

Die Blutstillung entsteht durch Kontraktionen der Spiralarterien und Thrombosierung der Gefäße sowie Kontraktionen des Uterus unter lokaler Prostaglandinwirkung. Am dritten Tag der Regelblutung setzt dann die Epithelisierung des Endometriums von der Basalis her ein (Regeneration) (Göretzlehner *et al.* 1992).

1.2.1. Bildung und Wirkung von Estrogenen sowie Gestagenen

Das Grundgerüst der Steroidhormone ist das Cyclopentanperhydrophenantren-Ringsystem, auch Steran-Ringsystem genannt. Durch Substitution von Methylgruppen, Sauerstofffunktionen in Form von Hydroxy- und Oxogruppen bzw. Dehydrierung entstehen Hormone unterschiedlichster biologischer Wirkung. Der Hauptvertreter der Estrogene ist das biologisch aktive 17 β -Estradiol. Das wichtigste Gestagen ist Progesteron (Abb. 1).

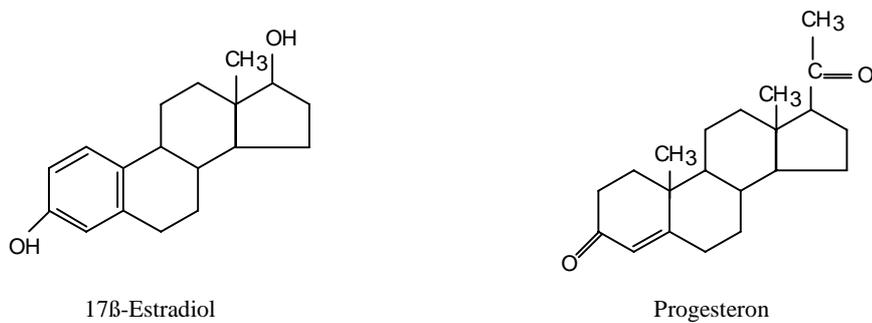


Abb. 1: Natürliche Liganden des Estradiol- und Progesteronrezeptors, 17β-Estradiol und Progesteron.

Die Bildung der Estrogene und Gestagene im weiblichen Organismus erfolgt in den Ovarien, der Nebennierenrinde, im peripheren Fettgewebe und während der Schwangerschaft auch in der Plazenta (*Pollow 1990*).

In den Ovarien erfolgt die Bildung des Estradiols in den Granulosazellen des reifenden Primärfollikels. Dabei werden in den Thekazellen aus Cholesterin über eine Reihe von Zwischenstufen, unter dem Einfluß von luteinisierendem Hormon (LH) der Hypophyse, Androstendion und Testosteron gebildet. Beide Hormone werden in die Granulosazellen eingeschleust und dort mit Hilfe des Enzymsystems „Aromatase“ in Estradiol (aus Testosteron) und Estron (aus Androstendion) umgewandelt. Die Aktivität der Aromatase und der Granulosazellen wird durch das von der Hypophyse gebildete follikelstimulierende Hormon (FSH) gesteuert. Die Progesteronsynthese erfolgt hauptsächlich unter dem regulatorischen Einfluß von LH im Corpus luteum nach der Ovulation. Unterbleibt die Ovulation, kann kein Corpus luteum gebildet werden und die Progesteronsynthese bleibt unzureichend.

Im Fettgewebe erfolgt die Bildung von Estron aus Androstendion, wenn das Fettgewebe das Enzymsystem Aromatase enthält. Das Androstendion entstammt der Nebennierenrinde und den Thekazellen des Ovars. Aus den Thekazellen kann es aber nur dann in den Blutkreislauf gelangen, wenn die Follikelreifung gestört ist (*Husmann 1996*).

Die Zielorgane der Estrogene und Gestagene im weiblichen Organismus sind insbesondere der Uterus, das Zervixepithel, die Vagina, die Vulva, die Tuben, die Brustdrüse, die Blase und die Urethra (*Göretzlehner et al. 1992; Pollow 1990*). An die Zielorgane gelangen sie über die Blutbahn, gebunden an Transportproteine. Die Steroidhormone werden an der Zellmembran von den Transportproteinen abgekoppelt und gelangen entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle (*Abb.2*). Biologisch aktiv sind nur die freien, nicht proteingebundenen Steroide (*Pollow 1990*).

Ihre biologische Wirkung entfalten die Estrogene und Gestagene über ihre spezifischen Rezeptoren. Steroidrezeptoren liegen unter physiologischen Bedingungen als heteromere

Komplexe vor. Sie enthalten steroidbindende Proteineinheiten, die mit anderen Proteinen verbunden sind. Progesteronrezeptoren zählen zu den heterodimeren Steroidrezeptoren mit zwei steroidbindenden Proteinen. Das Protein A hat ein Molekulargewicht von 80 – 95 kDa, das Protein B 110 - 120 kDa (*Adashi et al. 1996; Daxenbichler 1981*). Die Estrogenrezeptoren sind monomere Phosphoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass zwei Subtypen von Estrogenrezeptoren, ER α und ER β , existieren (*Mosselman et al. 1996*). 17 β -Estradiol bindet an beiden Subtypen mit ähnlicher Affinität (*Witkowska et al. 1997*). Über funktionelle Unterschiede beider Subtypen ist noch wenig bekannt. Estrogen- sowie Progesteronrezeptoren sind in den uterinen Geweben (Endometrium, Myometrium), den Ovarien, der Lunge, dem Herzen, dem Hypothalamus und der Hypophyse lokalisiert (*Daxenbichler 1981; Saunders et al. 1997; Shughure et al. 1998; Enmark et al. 1997*).

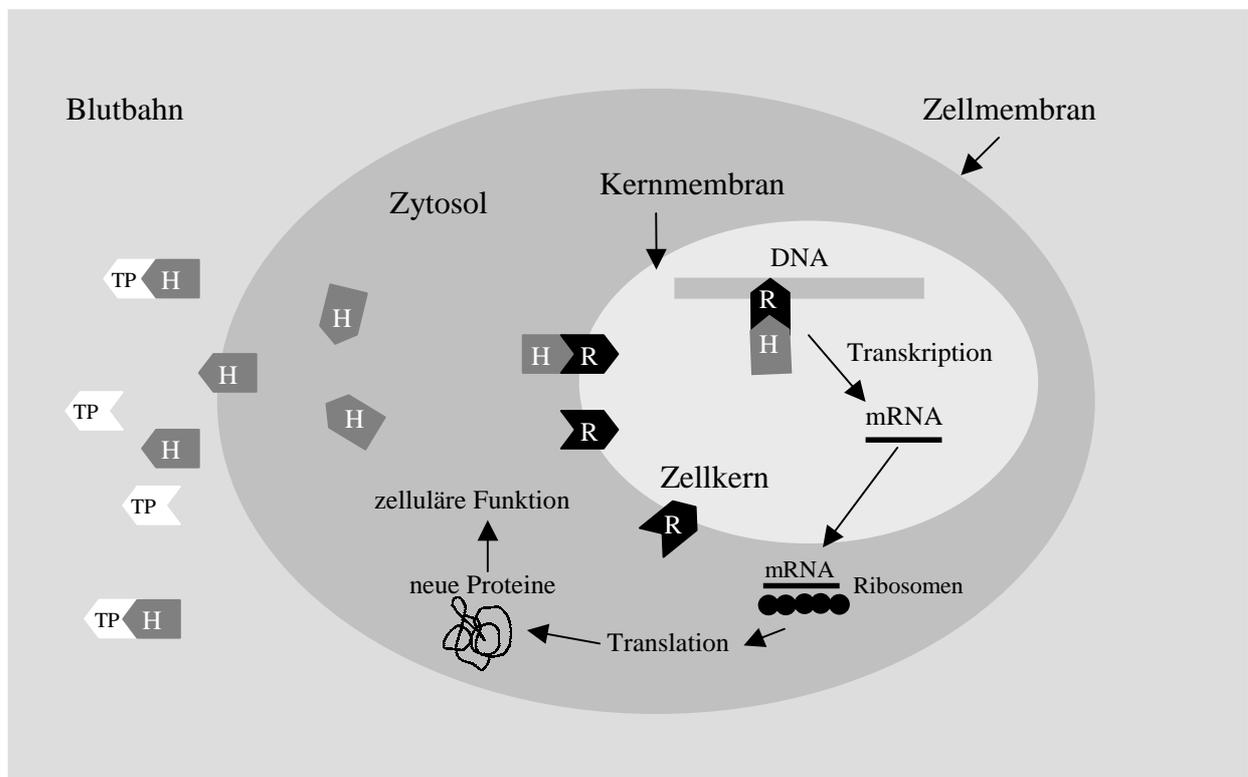


Abb. 2: Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen (TP: Transportprotein; H: Steroidhormon; R: Rezeptor).

Entgegen früherer Vorstellungen, dass die Steroidrezeptoren im Cytoplasma lokalisiert sind, haben immunhistochemische Untersuchungen gezeigt, dass Estrogen- und Progesteronrezeptoren ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Die unbesetzten Rezeptoren sind locker mit dem Nukleus assoziiert (*King et al. 1984*). Estrogen- und Progesteronrezeptoren weisen verschiedene funktionelle Domänen auf. Das sind die Hormonbindungsdomänen und die DNA-

Bindungsdomänen (*Struve et al. 1994*). Die Bindung der Steroidhormone an den Rezeptoren ist hochaffin und reversibel. Sie bewirkt eine Konformationsänderung der Rezeptoren und den Transport der Steroid-Rezeptor-Komplexe zum Chromatin (Abb. 2). Hier bindet der Steroidhormon-Rezeptor-Komplex mit einem spezifischen Molekülbereich am Chromatin, dem sogenannten nuklearen Akzeptorbezirk, der komplementär zu einer Molekülregion des Steroidhormon-Rezeptor-Komplexes ist.

Im Anschluß an diese Bindung wird die DNA-Doppelhelix im Bereich des regulierenden Gens entspiralisiert und die genetische Information ablesbar. Eine RNA-Polymerase synthetisiert ein entsprechendes Transkript, eine Prä-mRNA (Prä-messenger Ribonukleinsäure), die nach Abspaltung von Introntranskripten als reife mRNA den Zellkern verläßt.

Im Zytosol verbindet die mRNA sich mit Untereinheiten der Ribosomen zu Polysomen und löst die Translation aus (*Husmann 1996*). Die Bindung von Estradiol an seinem Rezeptor bewirkt die Synthese verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- α , EGF, IGF-1), die über auto- und parakrine Mechanismen die Proliferation des Endometriums stimulieren. Estradiol stimuliert außerdem die Hochregulation seines eigenen Rezeptors und die Expression der Progesteronrezeptoren. Damit wird das Endometrium sensitiv für Progesteron (*O'Malley et al. 1991*).

Progesteron bewirkt eine Hemmung der Bildung von Estradiolrezeptoren und kann somit als ein natürliches Antiestrogen betrachtet werden. Zudem ist Progesteron in der Lage, estradiolabbauende Enzyme, wie z.B. die 17 β -ol-Dehydrogenase, zu aktivieren. Auf diese Weise wird der proliferierende Effekt von Estradiol auf das Endometrium antagonisiert (*Pollow et al. 1978; Keck et al. 1997*).

Nach der Bindung der Steroidhormone an den Rezeptoren und der Übermittlung der Information werden sie in strukturell veränderter Form aus der Bindung wieder freigesetzt, aus der Zelle ausgeschleust und schließlich über die Nieren mit dem Harn oder über die Leber, mit der Galle in den Intestinaltrakt ausgeschieden (*Husmann 1996*).

1.3. Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt

Als endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt werden Chemikalien synthetischer und natürlicher Herkunft bezeichnet, die in hormonelle Regelkreise eingreifen können. Dabei sind sie entweder in der Lage, wie körpereigene Hormone (agonistisch) zu wirken oder deren Wirkung abzuschwächen (zu antagonisieren) (*Degen et al. 1999*).

Die menschliche Gesundheit, bzw. die anderer Lebewesen, kann durch diese endokrin wirksamen Verbindungen sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden. So führten weltweit hohe Konzentrationen dieser Substanzen in Seen und Flüssen zu erheblichen

Reproduktions- und Entwicklungsstörungen an Schnecken, Muscheln, Fischen, Vögeln und Reptilien (*Fry 1995; Guilette et al. 1995 und 1996; Lech et al. 1996; Purdom et al. 1994*). Ein bekanntes Beispiel ist der Apopka-See in Florida, in den bei einem Unfall hohe Mengen des Bis-(p-chlorphenyl)-2,2,2-trichlorethan (DDT) haltigen Insektizids Dicofol gelangten. Es fiel auf, dass an diesem See viele Alligatoreier unbefruchtet blieben und die Alligatormännchen einen kleineren Penis hatten (*Guilette et al. 1994 und 1996*). Die Feminisierung der männlichen Alligatoren wurde anfangs auf die estrogenen Eigenschaften von DDT-Isomeren zurückgeführt. Inzwischen ist für den persistierenden Metaboliten p,p'-DDE eine ausgeprägte antiandrogene Wirkung nachgewiesen worden (*Kelce et al. 1995*).

Die Erfahrung einer möglichen Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch synthetische Hormone brachte die Verabreichung von Diethylstilbestrol (DES) an schwangere Frauen bis Anfang der Siebziger Jahre mit sich. Man war damals der Annahme, dass dieses oral stark wirksame Estrogen Fehlgeburten verhindern könne. In tierexperimentellen Studien und in ausgedehnten epidemiologischen Untersuchungen wurde jedoch inzwischen bewiesen, dass pharmakologische Dosen von DES in der Schwangerschaft die Entwicklung des Fötus schwerwiegend beeinträchtigen können (*Newbold 1995*). So traten bei den sogenannten DES-Töchtern in zunehmendem Maße Adenokarzinome der Scheide bzw. der Zervix, vaginale Adenose und andere, nicht-tumorigene Veränderungen des Genitaltraktes auf (*Herbst 1981; Melnick et al. 1987*). In der Gruppe der DES-Mütter wurde eine geringe, aber statistisch signifikante Erhöhung der Brustkrebs-Inzidenz gefunden, die erst nach einer langen zeitlichen Latenz auftrat (*Greenberg et al. 1984*). Bei den männlichen Nachkommen der mit DES behandelten Frauen wurden Epididymis-Zysten, Kryptorchismus und andere Genitaltraktanomalitäten viel häufiger festgestellt als bei nicht exponierten Vergleichspersonen (*Gill et al. 1987*).

Wie bereits einleitend erwähnt, können endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt auch positive Effekte auslösen. Diese Tatsache belegen die Arbeiten von *Cassidy et al. (1994, 1995); Ferguson et al. (1981)* und *Adlercreutz (1995)*. *Cassidy et al.* zeigten 1995, dass die tägliche Aufnahme von 60 g Sojaprotein bei jungen Frauen zu einer Verlängerung der folliculären Phase im ovariellen Zyklus führte. In der Follikelphase ist die Zellteilungsrate in der Brustdrüse niedriger als in den übrigen Zyklusphasen (*Ferguson et al. 1981*). Für Frauen mit einem längeren Zyklus wird ein niedrigeres Brustkrebsrisiko erwartet (*Cassidy et al. 1994*). In Japan zum Beispiel, wo der Verzehr von Sojaprodukten im Vergleich zu den USA 30 – 50 mal höher ist, sind die Brustkrebsraten niedriger. Sojaprodukte bzw. die darin enthaltenen Phytoestrogene haben also möglicherweise eine Schutzwirkung. Diese Vorstellung wird durch Befunde in verschiedenen tierexperimentellen Tumormodellen gestützt (*Adlercreutz 1995; Cassidy 1995*).

Der Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt auf die weibliche Fertilität und deren reproduktionstoxische Wirkungen beim Menschen sind bislang unzureichend erforscht. In diesem Zusammenhang sind Stoffe mit estrogenen oder antiestrogenen Wirkung (Xenoestrogene) von besonderem Interesse. Dazu zählen klassische Pestizide (z.B. DDT und Metabolite, Hexachlorcyclohexan [HCH], Aldrin, Dieldrin), Industriechemikalien (Alcylphenole, Bisphenol A, Phthalate, Metabolite der Polychlorierten Biphenyle) aber auch zahlreiche Naturstoffe aus Pflanzen und Pilzen (*Nelson 1974; Soto et al. 1992; Colborn et al. 1993; Jobling et al. 1995;).* Eine Belastung des Organismus durch Xenoestrogene könnte möglicherweise die Gesundheit gefährden. Besonders kritisch ist die Embryonalphase im ersten Schwangerschaftsdrittel, in dem die sexuelle Differenzierung erfolgt. Aber auch bei einer Anreicherung solcher Verbindungen im Endometrium, einem der wichtigsten estrogenen Zielorgane, sind Zyklusstörungen und eine gestörten Fruchtbarkeit als Folge nicht auszuschließen (*Safe 1995; Davis et al. 1993; Toppari et al. 1995, Schäfer et al. 1995).*

Innerhalb der Diskussion um mögliche Ursachen einer idiopathischen Sterilität ist die Anreicherung von Xenoestrogenen in den Reproduktionsorganen von Mann und Frau von besonders großem Interesse. So fanden *Ensslen et al. (1990)* im Ejakulat idiopathisch steriler Männer höhere Konzentrationen an PCB, Hexachlorbenzol (HCB) und HCH, als in dem von Männern mit organisch verursachter Sterilität. Andere Autoren fanden im Serum und in der Follikelflüssigkeit von Frauen mit idiopathischer Sterilität höhere Konzentrationen an chlorierten Kohlenwasserstoffen (CKW) als bei Frauen, bei denen organische Sterilitätsursachen zu definieren waren oder die bereits schwanger waren (*Wagner et al. 1990; Van der Ven et al. 1991).* *Zahradnik et al. (1998)* und *Kloth (1998)* konnten CKW in humanen uterinen Geweben nachweisen. Demnach ist nicht auszuschließen, dass Xenoestrogene in diesen Geweben in die regulatorischen Mechanismen weiblicher Sexualsteroiden eingreifen und somit die Fertilität der Frau beeinträchtigen können.

In keiner der beiden Arbeiten, die die Belastung humaner uteriner Gewebe untersuchten, wurde in der Probandinnenauswahl in normofertile und sterile Frauen unterschieden. Somit liegen derzeit keine Daten vor, die klären, ob im Endometrium von sterilen Frauen höhere Konzentrationen an CKW nachgewiesen werden können als in dem von normofertilen Frauen. Es ist zudem unklar, inwieweit die bisher bekannten, meist niedrigen Konzentrationen dieser Stoffe in Lebensmitteln, Umwelt und humanen Geweben relevant sind, ob sie also unter realistischen Belastungsbedingungen tatsächlich eine schädigende Wirkung beim Menschen auslösen können. Diese Frage wird derzeit von Wissenschaftlern sehr unterschiedlich diskutiert. Dies hängt damit zusammen, dass eine Risikoabschätzung gerade in Bezug auf ein so komplexes System wie das Endometrium sehr schwierig ist und dazu noch Forschungsbedarf besteht (*Degen et al. 1999).*

1.3.1. Polychlorierte Biphenyle

Polychlorierte Biphenyle (PCB) sind den umwelt- und humantoxikologisch relevanten Industriechemikalien zuzuordnen. Sie entstehen durch die Chlorierung von Biphenylen (Abb. 3), wobei sich 209 verschiedene Isomere mit unterschiedlichen Eigenschaften und Chlorierungsgrad bilden können (*Moll 1987*).

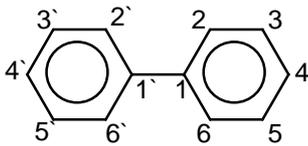


Abb. 3: Grundgerüst der PCB, Biphenytring.

Mit zunehmendem Grad der Chlorierung nehmen die Wasserlöslichkeit, die Flüchtigkeit und die Transformationstendenz der Isomere ab. Demgegenüber erhöhen sich die Lipidlöslichkeit, die Bio- und Geoakkumulationstendenz und die Persistenz. Wegen ihrer physikalischen Eigenschaften und der chemischen Beständigkeit werden bzw. wurden PCB als Transformatorenöl, als Kondensatorenwachs, als Hydrauliköl, als Schmieröl, als flammenhemmender Zusatz und als Weichmacher verwendet. Seit 1976 ist der Einsatz von PCB in Deutschland nur noch in geschlossenen Systemen erlaubt (*Moll 1987*).

Ihre außergewöhnliche Stabilität gegenüber physikalisch-chemischen und biologischen Transformationsreaktionen und ihre weite Verbreitung, insbesondere die der höher chlorierten Biphenyle, sind maßgebliche Ursachen für ihre Ubiquität in nahezu allen Strukturen von Hydro-, Pedo-, Atmos- und Biosphäre (*Koch et al. 1989*). Während Wasser und Atmosphäre als die maßgeblichen Transport- und Verteilungsprinzipien für PCB anzusehen sind, erfolgt die Aufnahme dieser Verbindungen durch den Menschen vorzugsweise über tierische Nahrungsmittel, die Luft und die Haut. Obwohl die täglich aufgenommene, durchschnittliche Menge an PCB-Isomeren in den Industrieländern auf nur etwa 1 µg geschätzt wird, muß beachtet werden, dass bei spezifischen Ernährungsgewohnheiten, wie hohem Fischkonsum, durchaus tägliche Aufnahmen von bis zu 100 µg und mehr möglich sind (*Moll 1987 und Koch et al. 1989*).

Die Lipidlöslichkeit der PCB sowie der Konzentrationsgradient begünstigen eine schnelle Resorption und den Transport mit dem Blut in alle Gewebe- und Organstrukturen des Körpers. Die Verteilung der Stoffe im Organismus wird maßgeblich von biophysikalischen Parametern wie dem Gewebavolumen, dem Gewebe-Blut-Verteilungsverhältnis, der Sorptionstendenz an Proteine und der Perfusionsgeschwindigkeit bestimmt. Leber und Muskeln sind die bevorzugten

Organe der PCB-Akkumulation. Die Ausscheidung der Stoffe erfolgt nahezu ausschließlich in Form von polaren Metaboliten, da die Exkretionsmechanismen als polare Systeme nicht zur Ausscheidung der stark lipophilen Moleküle befähigt sind. Der Stoffmetabolismus erfolgt durch mischfunktionelle Oxidasen der Leber, wie Cytochrom P-448 und P-450. Infolge sterischer Behinderung sowohl durch den Biphenylrest als auch die jeweils vorhandenen Chloratome sind die Moleküle die bevorzugten Angriffspunkte für Metabolisierungsreaktionen. Verbunden mit einer Hydroxidbildung und Konjugation werden die Stoffe über den Urin ausgeschieden (*Koch et al. 1989*).

Im Zusammenhang mit der Langzeitexposition des Menschen kommt der chronisch-toxischen Wirkung von PCB, einschließlich der genotoxischen Wirkung primäre Bedeutung als Risikofaktor zu. Dabei charakterisieren Wirkungen auf die Aktivität mikrosomaler Enzyme, das endokrine System, das Immunsystem und die im Tierexperiment nachgewiesene Kanzerogenität Möglichkeiten einer Gefährdung des Menschen. Von reproduktionsmedizinischer Relevanz ist die nachgewiesene Plazentapassage mit nachfolgender Akkumulation im fetalen oder embryonalen Organismus sowie der Stofftransfer über die Muttermilch, der mit einer direkten Exposition des Säuglings verbunden ist (*Koch et al. 1989*).

Estrogene Effekte wurden bisher nur für niedrigchlorierte und hydroxylierte PCB-Isomere beschrieben (*Ryan et al. 1990*).

1.3.2. Insektizide

1.3.2.1. DDT

Der Term DDT bezeichnet die chemische Verbindung 1,1-Bis-(p-chlorphenyl)-2,2,2-trichlorethan (p,p'-DDT) (Abb. 4). Im allgemeinen Sprachgebrauch charakterisiert diese Abkürzung ein technisches Produkt, welches neben p,p'-DDT (77,1 %) noch o,p'-DDT (14,9 %), p,p'-DDE (4,0 %), p,p'-DDD (0,3 %), o,p'-DDE (0,1 %) und ca. 3,5 % nicht weiter identifizierte chemische Stoffe enthält (Abb. 4) (*Koch et al. 1989*).

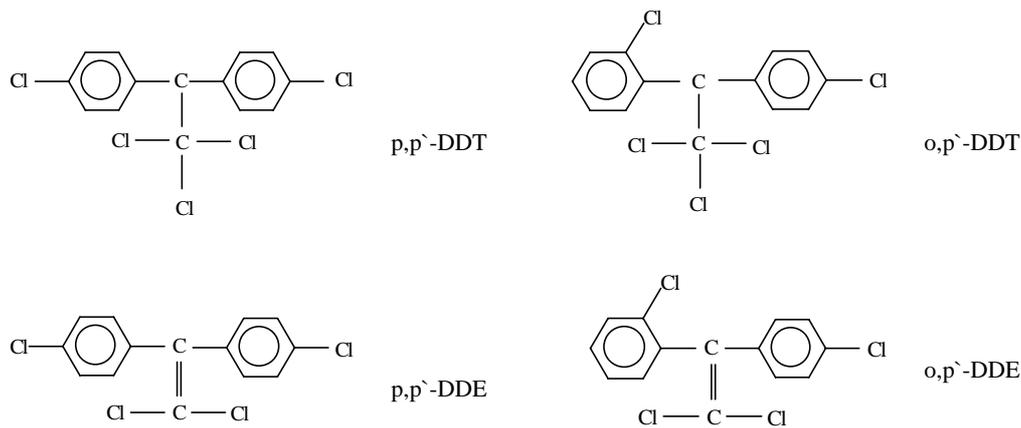


Abb. 4: DDT und Metabolite.

1948 erhielt der Schweizer Chemiker Paul Müller den Nobelpreis für die Entdeckung der insektiziden Eigenschaften des DDT. Wenige Jahre nach dem Masseneinsatz des DDT als Insektizid nahm die Widerstandsfähigkeit der Insekten trotz Anwendung ständig steigender Dosen schnell zu. Anfang der Siebziger Jahre wurde der Einsatz von DDT in den meisten westlichen Industriestaaten, einschließlich der BRD, wegen gesundheitlicher Schäden verboten. In der DDR und anderen osteuropäischen Staaten wurde DDT noch bis Ende der 80er Jahre eingesetzt (Schäfer *et al.* 1995). Die Pestizide werden immer noch in großen Mengen in die Entwicklungsländer exportiert, auch wenn sie bei uns längst verboten sind (Moll 1987).

DDT wird praktisch nicht abgebaut. Durch Licht, Luft und Wasser wird es nicht in seine anorganischen Ausgangsprodukte CO_2 , HCl und Wasser zerlegt. Zum Teil wird es umgewandelt in Bis-(chlorphenyl)-2,2-dichlorethylen (DDE), Dichloro-(p-chlorophenyl)-ethane (DDD) und andere chlororganische Verbindungen, die ebenfalls toxisch sind. Durch die hohe Bio- und Geoakkumulationstendenz von DDT und seinen Metaboliten kommt es zu einer stetigen Anreicherung dieser Verbindungen in der Biosphäre (Moll 1987).

Die Aufnahme von DDT und seinen Metaboliten durch den Menschen erfolgt zu einem Großteil über die Nahrung, gefolgt von Luft und Wasser. Infolge der hohen Lipophilie erfolgt eine schnelle Resorption inkorporierten DDT's im Organismus, die mit einer hohen Bioakkumulation in Fettgewebe bzw. lipoidreichen Organstrukturen verbunden ist. Der Stoffmetabolismus erfolgt in nahezu allen Organismen unter Dehydrochlorierung und Bildung von DDD. Im Säugerorganismus wird DDD über weitere Zwischenstufen bis zu Dichlordiphenyllessigsäure abgebaut, welche in Form von Konjugaten ausgeschieden wird. Darüber hinaus wurden phenolische Metabolite und Methylsulfone nachgewiesen (Koch *et al.* 1989).

Neben morphologischen Veränderungen der Leber sowie Veränderungen der Aktivität mikrosomaler Enzyme manifestieren sich chronische Intoxikationen mit hoher Wahrscheinlichkeit in immunsuppressiven Wirkungen (Koch *et al.* 1989). Einige DDT-Metabolite besitzen hormonelle Wirkungen, wobei für o,p`-DDT und o,p`-DDE estrogene Effekte und für p,p`-DDE antiandrogene Effekte beschrieben wurden (Nelson 1974; Soto *et al.* 1992; Kupfer *et al.* 1982; Stancel *et al.* 1980; Kelce *et al.* 1995).

1.3.2.2. Hexachlorcyclohexan

Hexachlorcyclohexan entsteht durch Photochlorierung von Benzol. Das technische HCH enthält verschiedene Isomere (α , β , δ , γ). Nur die γ -Form wird als Insektizid verwendet (Abb. 5). Es ist im technischen HCH zu 15 % enthalten und muß durch Kristallisation von den anderen Isomeren abgetrennt werden, die für den Menschen toxisch sind.

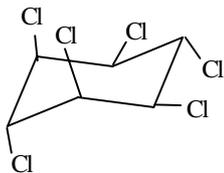


Abb. 5: Lindan, γ -HCH.

Lindan ist der gebräuchliche Handelsname für ein Produkt, welches mindestens 99 % des γ -Isomers von 1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan enthält. Die Verwendung von technischem HCH als Pflanzenschutzmittel ist in Deutschland seit 1978 verboten. Nach dem Verbot von DDT sollte Lindan an seine Stelle treten. Es wird schneller abgebaut und ist schon in geringeren Dosen wirksam (Moll 1987; Koch *et al.* 1989).

Reines Lindan wird im Fettgewebe von Mensch und Tier nicht so schnell angereichert, es enthält aber noch etwa 1 % von Isomeren. In den Entwicklungsländern wird aus Kostengründen das ungereinigte Lindan verwendet. Als Inhaltsstoffe von Lebens- und Futtermitteln gelangen Lindan und seine Isomere dann schließlich in die Industriestaaten zurück.

Die HCH-Isomere werden zum größten Teil über die Nahrung, über die Luft und über die Haut aufgenommen. Im Körperfett und fettreichen Organen werden die Isomere deponiert, die β -Isomere darüber hinaus kumuliert. Die akute Toxizität für Menschen äußert sich in Störungen des zentralen Nervensystems bei γ -HCH und δ -HCH. Für β -HCH und δ -HCH wurde eine depressive Wirkung beschrieben (Moll 1987; Koch *et al.* 1989).

Über hormonelle Wirkungen liegen widersprüchliche Daten vor. So wurden in Ratten, die gegenüber HCH exponiert waren, sowohl estrogenere als auch antiestrogenere Effekte beobachtet (*Cooper et al. 1989*). *Steinmetz et al. (1996)* konnten eine estrogenere Wirkung für β -HCH nachweisen. Eine Rezeptorbindung konnten weder *Steinmetz et al. (1996)* noch *Faria et al. 1984* feststellen. Daher wird von den Autoren davon ausgegangen, dass β -HCH seine estrogenere Wirkung auf nichtklassischem Wege entfaltet.

1.3.3. Alcylphenole

Alcylphenol-Polyethoxylate (APE) sind nichtionische Tenside, welche in Reinigungslösungen, Lebensmittelölen, Farbstoffen, Kosmetika, in Pestiziden und anderen Produkten zu finden sind (*Schäfer et al. 1995*). Nonylphenol-Ethoxylate (NPE) sind die gebräuchlichsten APE, doch werden auch Octylphenol-Ethoxylate verwendet. Tenside sind amphiphil, besitzen also einen hydrophoben und einen hydrophilen Teil. Die Tensid-Aktivität wird durch den Alcylphenolrest bewirkt. Die parasubstituierte Kette sich wiederholender Ethylenoxid-Einheiten unterschiedlicher Länge bildet den hydrophilen Teil (*Giger et al. 1984*).

In Kläranlagen werden sie mikrobiell nur unvollständig abgebaut. In einem ersten, schnellen Schritt werden die Ethoxylatreste hydrolytisch abgespalten und die Metabolite Alcylphenol (AP), Alcylphenol-Monoethoxylat (AP1EO) und Alcylphenol-Diethoxylat (AP2EO) gebildet. Diese sind toxischer als die Ursprungssubstanzen. Die weitere Biodegradation erfolgt wegen der hydrophoben Eigenschaften des aromatischen Restes wesentlich langsamer. Der langsamere oder gar fehlende zweite Abbauschritt und die Tatsache, dass die Metabolite lipophiler als die Ausgangsprodukte sind führt dazu, dass sich diese Zwischenprodukte in Klärschlamm und Sediment anreichern (*Giger et al. 1984; Ahel et al. 1994a*). Schätzungsweise etwa 50 % der APE-Menge im Abwasser gelangt als Alcylphenol in den Klärschlamm (*Brunner et al. 1988*). Aufgrund des freiwilligen Verzichts der Industrie werden APE seit 1986 nicht mehr in Waschmitteln verwendet.

Nichtionische Tenside sind für aquatische Organismen stärker toxisch als für Säuger. Die Toxizität von APE steigt mit sinkender Anzahl Ethoxylat-Einheiten und steigender hydrophober Kettenlänge. Daher ist die Toxizität der Ursprungssubstanzen geringer als die der Abbauprodukte AP, AP1EO und AP2EO. *Ahel et al.* konnten 1993 in Fischen Konzentrationen an AP nachweisen (2 μ M), die etwa eine Größenordnung tiefer als die halbmaximalen Effektkonzentrationen von AP (16 μ M) im in-vitro Assay von *Jobling et al. (1993)* bzw. in einem in-vivo Experiment von *Nimrod und Benson (1995)* lagen.

Nonylphenol und Octylphenol (Abb. 6) wurden als schwach estrogen-wirksam beschrieben (*Soto et al. 1992; Toppari et al. 1995; Mueller et al. 1978, White et al. 1994*). Ihre estrogene Wirksamkeit ist jedoch höher als die der meisten anderen Umwelttestrogene.



Abb. 6: 4-Nonylphenol und 4-tert-Octylphenol, estrogen wirksame mikrobielle Abbauprodukte von APE.

1.3.4. Phytoestrogene

Phytoestrogene sind Pflanzeninhaltsstoffe, die estrogen oder antiestrogen wirksam sein können (*Kitts et al. 1983; Perel et al. 1970, Noteboom et al. 1963*). Die bekanntesten Phytoestrogene sind Isoflavone und Coumarine. Zu den Isoflavonen zählen Biochanin-A, Daidzein, Formonetin und Genistein (Abb. 7). Der Gruppe der Coumarine ist Coumestrol zuzuordnen (Abb. 7).

Roter Klee, Luzerne, Tofu und Sojabohnen sind besonders reich an Phytoestrogenen. Die Diskussion um die Wirkung von Phytoestrogenen begann, nachdem bewiesen wurde, dass sie für die verminderte Fertilität von Schafen und Kühen verantwortlich zu machen sind (*Bennetts et al. 1946; Kallela 1964*). Im Gegensatz zu anderen endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt, werden den Phytoestrogenen auch positive Eigenschaften zugeschrieben (siehe Kap. 1.3.). So sind sie bekannt dafür, dass sie die Entwicklung von Mammakarzinomen inhibieren können (*Adlercreutz et al. 1995; 1996; Ingram et al. 1997*).

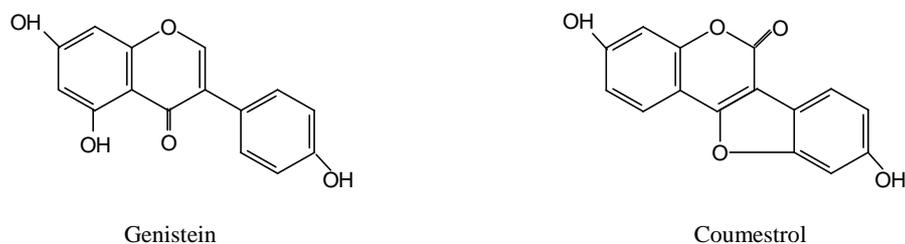


Abb. 7: Phytoestrogene: Genistein und Coumestrol.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zahlreiche klinische Studien, mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen, durchgeführt. Molekular- und zellbiologisch sowie tierexperimentell konnte einigen Phytoestrogenen estrogenagonistische sowie partial antagonistische Wirkungen zugeschrieben werden (*Fotsis et al. 1995; 1997; Liu et al. 1994; Mäkelä et al. 1995; Markaverich et al. 1995; Shelby et al. 1996*). Diese Befunde fanden erst eine Erklärung, als man begann organspezifische Wirkungen von Estrogenen zu verstehen. Dabei spielte die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptors (ER β) durch *Mosselmann et al. (1996)* eine entscheidende Rolle. Es stellte sich heraus, dass sich die beiden Estrogenrezeptoren ER α und ER β in unterschiedlichen Organen in unterschiedlicher Menge nachweisen ließen. Einzelne Zellen können dabei durchaus auch beide Rezeptorsubtypen exprimieren (*Saunders et al. 1997; Shughure et al. 1998; Enmark et al. 1997*). Zudem binden Genistein und Daidzein stärker am ER β als am ER α (*Wuttke et al. 1999*). Der natürliche Ligand 17 β -Estradiol bindet an beiden Rezeptoren mit derselben Affinität (*Witkowska et al. 1997*). Die Möglichkeit, dass endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt an einem der Estrogenrezeptorsubtypen mit höherer Affinität binden können, ist somit nicht auszuschließen. Zudem muß davon ausgegangen werden, dass beide Rezeptoren unterschiedliche endokrine Wirkungen auslösen.

2. Probandinnen, Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien und Testsubstanzen

Chemikalien / Substanzen	Hersteller / Lieferant
Estradiolverdünner (SR1-Estradiol-Diluent)	BioChem ImmunoSystems, Freiburg
Estradiol MAIA	BioChem ImmunoSystems, Freiburg
Progesteron MAIA	BioChem ImmunoSystems, Freiburg
[2,4,6,7- ³ H]17 β -Estradiol	Amersham Buchler GmbH & Co.KG
16 α -Ethyl-21-hydroxy-19-nor[6,7- ³ H]pregn-4-ene-3,20-dione	Amersham Buchler GmbH & Co.KG
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan p.a.	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
Ethylenediaminetetraacetic Acid p.a.	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
Dithioerythritol	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
HCl	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
Norit A	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
Dextran T70	Pharmacia LKB, Biotechnology AG
Rinderserumalbumin	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck KgaA, Darmstadt
NaOH	Merck KgaA, Darmstadt
CuSO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumtartrat-2-hydrat	Merck KgaA, Darmstadt
H ₂ O dest.	Pharmacia & Upjohn AS Norwegen
Diethylether p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
Petrolether p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
Ethanol reinst	Merck KgaA, Darmstadt
Szintillationscocktail	Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
Diethylstilbestrol	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
16 α -Ethyl-21-hydroxy-19-norpregn-4-ene-3,20-dione	Amersham Buchler GmbH & Co.KG
17 β -Estradiol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
Progesteron	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl	Promochem GmbH, Wesel
3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl	Promochem GmbH, Wesel
2,4-Bis-[p-chlorphenyl]-2,2,2-trichlorethane	SUPELCO Inc. Bellefonte USA
1,1-Bis-[p-chlorphenyl]-2,2,2-trichlorethane	ALDRICH Chemie, Steinheim
2,4-Bis-[chlorphenyl]-2,2-dichlorethylen	SUPELCO Inc. Bellefonte USA
1,1-Bis-[4-chlorphenyl]-2,2-dichlorethylene	ALDRICH Chemie, Steinheim

Chemikalien / Substanzen	Hersteller /Lieferant
β-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan	Promochem GmbH, Wesel
γ-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
1,1,3,3-tetramethylbutyl-phenol	Fluka AG, Neu-Ulm
Coumestrol	ACROS Organics New Jersey USA
Genistein	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid zur Szintillationsmessung	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH
Toluol p.a.	Merck KgaA, Darmstadt
SR1 Testküvetten	BioChem ImmunoSystems, Freiburg
SR1 Kalibrierungskit	BioChem ImmunoSystems, Freiburg
SR1 Universalreagenzien	BioChem ImmunoSystems, Freiburg

2.2 Expositionsuntersuchungen

2.2.1. Probandinnenkollektive

2.2.1.1. Normofertile Patientinnengruppe

In diese Gruppe eingeschlossen waren Frauen, die sich aufgrund gutartiger Erkrankungen, wie Uterus myomatosus, Dysmenorrhoe oder Hypermenorrhoe, einer operativen Entfernung des Uterus (Hysterektomie) unterziehen mußten.

Der Gesamtumfang dieser Gruppe betrug 15 Probandinnen mit einem durchschnittlichen Alter von 41,8 Jahren (27 Jahre – 54 Jahre). Einschlußkriterien waren Fertilität und ein Body-mass Index < 30 kg / m². Patientinnen, deren Anamnese eine Sterilitätsbehandlung einschloß, konnten dieser Gruppe nicht zugeordnet werden.

Bei 12 der Frauen wurde eine Hysterektomie wegen eines Uterus myomatosus durchgeführt. Die übrigen operativen Eingriffe erfolgten auf Grund von Dysmenorrhoe oder Hypermenorrhoe. Der durchschnittliche Body-mass Index dieser Gruppe lag bei 25,2 kg / m² (21 kg / m² – 29,2 kg / m²). Vier der 15 Probandinnen hatten in ihrer Anamnese eine Lebendgeburt. Die restlichen 11 Patientinnen hatten zwei Lebendgeburten. Bei 3 der Frauen kam es in der Anamnese zu einem Abort und bei einer Patientin zu einer Totgeburt.

Zwei der normofertilen Frauen befanden sich zum Zeitpunkt der Operation bereits im Klimakterium. Von den übrigen nichtklimakterischen Probandinnen hatten zwei einen normalen Zyklus, wobei die Hormonwerte und der histologische Befund den Zykluszeitpunkt bestätigten. Bei einer Probandin entsprach der histologische Befund nicht der angegebenen Zyklusphase, die

Hormonwerte bestätigten diese jedoch. Von den übrigen Frauen, bei denen weder die Hormonwerte noch der histologische Befund dem klinischen Zyklustag entsprachen, hatten 7 einen regelmäßigen Zyklus und 3 litten unter einer Oligomenorrhoe.

12 der Patientinnen nahmen mindestens 3 Monate vor der Operation keine Kontrazeptiva zu sich. Die übrigen nahmen bis zum Zeitpunkt der Operation Kontrazeptiva.

Die Patientinnen wurden im Vorfeld in einem Gespräch mit dem behandelnden Arzt über die Entnahme von Gewebeproben im Rahmen der Hysterektomie informiert und gaben dafür Ihre schriftliche Einverständniserklärung. Außerdem wurde von jeder Patientin ein Fragebogen ausgefüllt (siehe Kap. 2.2.1.4. und Anhang).

2.2.1.2. Gruppe der Sterilitätspatientinnen

Bei dieser Gruppe handelt es sich um Patientinnen, die sich im Rahmen der Sterilitätsdiagnostik einer Strichkürretage zur Gewinnung einer kleinen Endometriumprobe unterziehen mußten.

Der diagnostische Eingriff erfolgte vorzugsweise in Zyklusmitte. Der Gesamtumfang dieser Gruppe betrug 20 Probandinnen mit einem durchschnittlichen Alter von 29,3 Jahren (24 Jahre – 42 Jahre). Der durchschnittliche Body-mass Index lag bei 22,1 kg / m² (17,5 kg / m² – 34 kg / m²).

Unter einer primären Sterilität litten 9 der Frauen. Die übrigen Patientinnen waren sekundär steril. In der Anamnese hatten 5 der Frauen eine Lebendgeburt, 4 einen Abort, 2 eine Extrauterin gravidität und 1 eine Abruption.

Von allen Probandinnen hatten 5 einen normalen Zyklus mit Übereinstimmung von Hormonwerten, histologischem Befund und klinischem Zyklustag. Bei 4 Frauen entsprach der histologische Befund nicht dem angegebenen Zykluszeitraum. Bei den übrigen Patientinnen waren die Hormonwerte nicht zyklusgerecht, wobei der histologische Befund bei 7 dieser Probandinnen dem klinischen Zyklustag entsprach.

Keine der Sterilitätspatientinnen nahm in den 3 Monaten vor der Strichkürretage Kontrazeptiva.

Die Patientinnen wurden im Vorfeld in einem Gespräch mit dem behandelnden Arzt über die Entnahme der Gewebeproben im Rahmen der Strichkürretage informiert und gaben dafür Ihre schriftliche Einverständniserklärung. Außerdem wurde von jeder Patientin ein Fragebogen ausgefüllt (siehe Kap. 2.2.1.4. und Anhang).

2.2.1.3. Votum der Ethikkommission

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stimmte der Durchführung aller Untersuchungen im Rahmen dieses Forschungsvorhabens in vollem Umfang zu.

2.2.1.4. Fragebogen

Der von allen Probandinnen auszufüllende Fragebogen sollte möglichst kurz, präzise und verständlich gestaltet werden. Gleichzeitig sollten sich aus ihm Informationen zu möglichen Ursachen für auffällige Belastungsbefunde ableiten lassen.

Der Fragebogen umfaßte Angaben der Frauen zur allgemeinen Anamnese, zu Ernährungsgewohnheiten, zu Wohnverhältnissen, zu Freizeitbeschäftigungen, zum Rauchen und zum Arbeitsplatz (siehe Anhang).

2.2.2. Untersuchungsmaterial und Untersuchungsparameter

Den Frauen aus der Gruppe der normofertilen Probandinnen wurden Serum, Fettgewebe, Myometrium und Endometrium entnommen. Außerdem konnten von 9 dieser Frauen die Myomknoten in die Untersuchungen mit aufgenommen werden.

Allen Frauen aus der Gruppe der Sterilitätspatientinnen wurden Serum und Endometrium entnommen.

In den gesammelten Serumproben erfolgte der quantitative Nachweis von LH, FSH, 17β -Estradiol, Progesteron, Testosteron und des sexualhormonbindenden Globulin (SHBG) (siehe Kap. 2.2.4.).

In den Gewebeproben der normofertilen Frauen (Endometrium, Myometrium, Myomknoten, Fett) wurden 17β -Estradiol und Progesteron quantitativ radioimmunologisch bestimmt (siehe Kap. 2.2.5.). Im Endometrium, Myometrium und Myomknoten erfolgte zudem der quantitative biochemische Nachweis der Estradiol- und Progesteronrezeptoren (siehe Kap. 2.2.5.).

Alle gesammelten Seren und Gewebeproben aus der normofertilen Patientinnengruppe und der Gruppe der Sterilitätspatientinnen wurden in Hinblick auf ihre Belastung mit:

- PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-Hexachlorbiphenyl),
- PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl),
- PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl),

- PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorbiphenyl),
- β -HCH (β -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan),
- γ -HCH (γ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan; Lindan),
- o,p`-DDD (1,1-dichloro-2-[p-chlorophenyl]-2-[o-chlorophenyl]ethane),
- p,p`-DDD (1,1-dichloro-2,2-bis[p-chlorophenyl]ethane),
- o,p`-DDE (2,4-Bis-[chlorphenyl]-2,2-dichlorethylen),
- p,p`-DDE (1,1-Bis-[4-chlorphenyl]-2,2-dichlorethylene),
- o,p`-DDT (2,4-Bis-[p-chlorophenyl]-2,2,2-trichlorethan),
- p,p`-DDT (1,1-Bis-[p-chlorophenyl]-2,2,2-trichlorethane),
- 4-tert-Octylphenol (1,1,3,3-tetramethylbutyl-phenol) und
- Coumestrol (3,9-Dihydroxy-6H-benzofuro[3,2-c][1]-benzopyran-6-one)

untersucht (siehe Kap. 2.2.6.). Auf die Analyse von Coumestrol im Fettgewebe wurde aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Phytoestrogens verzichtet.

2.2.3. Probenentnahme und Probentransport

Die Blutentnahme erfolgte für alle Probandinnen einen Tag vor dem operativen Eingriff. Dabei wurden den Patientinnen drei Blutproben zu je 10 ml in Serummonovetten (Sarstedt 92 mm x 16,5 mm) entnommen. Diese wurden anschließend 5 min bei 4000 rpm in einer Jouan C312 zentrifugiert. Vom Serum wurden 1 ml in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 4°C bis zur Analyse der Hormone und Transportproteine, innerhalb von 24 h, gelagert. Das übrige Serum wurde in 25 ml Duranflaschen pipettiert und bei -70°C tiefgefroren.

Während der operativen Entfernung des Uterus wurde Fettgewebe aus dem Omentum majus entnommen. Ein Teilstück, ca. 1 g, wurde in eine 25 ml Duranflasche überführt und bei -70°C gelagert. Ein zweites Teilstück, ca. 0,5 g, wurde in Aluminiumfolie bis zur Analyse der Steroidhormone ebenfalls bei -70°C tiefgefroren.

Die Gewinnung von Endometrium, Myometrium und Myomknoten erfolgte unmittelbar nach der operativen Entfernung des Uterus. Der Uterus wurde längs gespalten und das Cavum uteri eröffnet. Mit einer Kürette wurde aus dem Cavum Endometrium gewonnen. Ein Teil, ca. 0,5 g, wurde in eine 25 ml Duranflasche überführt und bei -70°C gelagert. Ein zweiter Teil, ca. 0,3 g, wurde in Aluminiumfolie für die Rezeptor- und Hormonbestimmung bei -70°C aufbewahrt. Aus dem Uterus wurde außerdem je ein ca. 3 g schweres Stück Myometrium und gegebenenfalls Myomknoten entnommen, in 25 ml Duranflaschen überführt und bei -70°C tiefgefroren. Je ein zweites Stück, ca. 1 g, wurde in Aluminiumfolie für die Rezeptor- und Hormonbestimmung bei -70°C gelagert.

Bei einer Strichkürretage zur Sterilitätsdiagnostik wurde ein ca. 0,1 g schweres Stück Endometrium entnommen, in eine 25 ml Duranflasche überführt und bei -70°C tiefgefroren.

Die Duranflaschen wurden von der Firma ERGO Forschungsgemeinschaft mbH Hamburg vorbehandelt geliefert. Alle in Duranflaschen aufbewahrten Proben wurden mittels Übernacht-Kurier in gefrorenem Zustand nach Hamburg zur ERGO Forschungsgemeinschaft mbH transportiert und dort bis zum Zeitpunkt der Analyse der CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol tiefgefroren.

2.2.4. Quantitativer Nachweis von LH, FSH, 17β -Estradiol, Progesteron, Testosteron und SHBG im Serum

Der quantitative Nachweis von LH, FSH, 17β -Estradiol, Progesteron, Testosteron und SHBG im Serum erfolgte im SR1 Testsystem der Firma BioChem ImmunoSystems aus Freiburg.

Als Bestimmungsmethode kam für alle Parameter ein Enzymimmuno-Assay zur Anwendung. Das Prinzip dieser Methode wird im Kapitel 2.2.4.1. beschrieben. Die quantitative Ergebniskalkulation basierte auf einem internen Kalibratorabgleich anhand einer gespeicherten Standardkurve.

Die Qualität der Ergebnisse wurde zum einen durch die Teilnahme unseres Labors an Ringversuchen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie e.V. und zum anderen durch die Mitführung von Kontrollseren in jeder Bestimmungsreihe gewährleistet.

2.2.4.1. Testprinzip

Das SR1-Testsystem besteht aus vier Elementen:

- Testküvetten, die neben den Probenaufnahmeröhrchen auch die testspezifischen Reagenzien enthalten
- Kalibrierungskit, zur Kalibrierung des jeweiligen Tests,
- Universalreagenzien, die für alle Tests verwendet werden können
- SR1-Analysengerät, zur Bearbeitung der Proben in den Testküvetten und zur Berechnung der Ergebnisse.

In allen SR1-Testmethoden werden zwei hochaffine monoklonale oder polyklonale Antikörper eingesetzt. Die Inkubationszeiten und Reagenzienvolumina werden über ein assayspezifisches Softwareprotokoll bestimmt.

Den Proben, Kontrollen und Standards wird eine bekannte Menge von enzymmarkierten und fluoresceinmarkierten Antikörpern zugefügt. Während einer Inkubation bei 37°C bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe.

Für die Bestimmung von 17β-Estradiol werden die Antikörper in zwei getrennten Schritten zugeführt. Zunächst erfolgt die Zugabe einer bekannten Menge von fluoresceinmarkierten Antikörpern zu den Proben, Kontrollen und Standards und eine anschließende Inkubation bei 37°C. Dabei bindet das darin vorhandene Steroidhormon am zugefügten Antikörper. Danach wird eine bekannte Menge von enzymmarkiertem Hormon zugefügt und erneut bei 37°C inkubiert. Dabei konkurriert das weibliche Sexualhormon in den Proben, Kontrollen und Standards mit dem enzymmarkierten Hormon um die Bindung an den Antikörpern.

Nach den jeweiligen Inkubationsschritten wird ein Anti-Fluorescein-Antikörper im Überschuß zugefügt. Dieser bindet schnell und spezifisch an den monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörper-Komplex und wird dann unter dem Einfluß eines Magnetfeldes sedimentiert. Nach dem Absaugen der flüssigen Phase und nach Waschen wird ein Enzymsubstrat, Phenolphthalein-monophosphat, zugefügt und bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit wird durch die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase Phenolphthalein gebildet (Abb. 8).

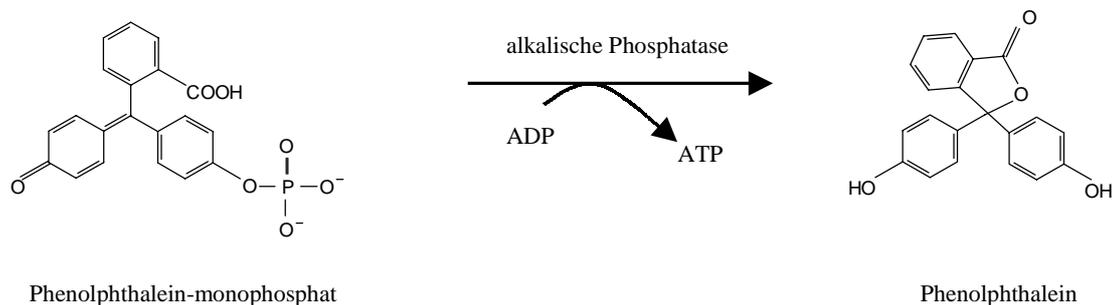


Abb. 8: Farbreaktion der alkalischen Phosphatase im SR1-Testsystem.

Danach wird die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung beendet und die entstandene Farbintensität photometrisch bestimmt.

Das durch die Enzymreaktion entstandene Phenolphthaleinkonzentrat (Abb. 8) ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Antigens. Die Konzentrationen der Hormone und des SHBG in den Patientenproben und Kontrollen werden durch Interpolation mit Hilfe einer gespeicherten Standardkurve ermittelt.

Die Methode erfasst ohne Verdünnung einen Meßbereich für:

- LH von 0,5 – 200 mIU / ml,
- FSH von 0,5 – 150 mIU / ml,
- 17 β -Estradiol von 0 – 3000 pg / ml (0 – 11 nmol / l),
- Testosteron von 0,1 – 17 ng / ml (0,3 – 59 nmol / l) und
- Progesteron von 0,2 – 40 ng / ml (0,64 – 127 nmol / l).

Mit On-line-Verdünnungen kann sie für Proben in einem Konzentrationsbereich von 0,02 – 300 nmol / l SHBG eingesetzt werden. Die Standards für LH und FSH waren gegen die 1.IRP 68 / 40 (WHO) bzw. gegen 2.IRP 78 / 549 (WHO) für humanes hypophysäres LH bzw. FSH standardisiert (*SRI Assayhandbuch der Firma BioChem ImmunoSystems GmbH, Freiburg 1998; Storrington P.L. et al. 1978*).

2.2.5. Quantitativer Nachweis von 17 β -Estradiol, Progesteron und der Steroidrezeptoren in humanen Geweben

2.2.5.1. Gewebepreparation

Die Präparation der Gewebeproben zur Bestimmung der Steroidhormone und ihrer Rezeptoren erfolgte nach einer Methode von *Seliger et al. (1987)*.

Etwa 0,3 g Endometrium, 0,5 g Myometrium oder 0,5 g Myomknoten wurden mittels Skalpell mechanisch zerkleinert und anschließend in 10 ml Puffer mittels Ultra-Turax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA[®]-Labortechnik Staufen) in 3 Desintegrationsschritten von jeweils 10 s Dauer (45 s Zwischenkühlung) homogenisiert. Danach wurde das Homogenat in einer K23 (Janetzki, VEB MLW Labortechnik Ilmenau) 30 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein zweites mal 1 h bei 100 000 g und 4°C in einer Ultrazentrifuge (Hitachi, himac CS120) zentrifugiert. Man erhielt somit eine Zytosolfraktion, die als Ausgangsmaterial für die Bestimmung von 17 β -Estradiol, Progesteron und der Steroidrezeptoren eingesetzt wurde (siehe Kap. 2.2.5.2. und 2.2.5.3.).

Die Fettproben wurden im Mörser unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend quantitativ in ein verschließbares Reagenzglas überführt. Dort wurden sie in 2,5 ml Puffer aufgenommen und 20 min geschüttelt (THYS 2, VEB MLW Labortechnik Ilmenau). Diese Fettlösungen wurden für die Bestimmung von 17 β -Estradiol und Progesteron als Ausgangsmaterial verwendet (siehe Kap. 2.2.5.2.).

Puffer: 10 mmol / l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,5 mmol / l Ethylenediaminetetraacetic Acid
1 mmol / l Dithioerythritol
pH 7,4 - eingestellt mit 1 n HCl

2.2.5.2. Quantitative radioimmunologische Bestimmung von 17 β -Estradiol und Progesteron in humanen Geweben

2.2.5.2.1. Extraktion von 17 β -Estradiol und Progesteron aus den Gewebeproben

Die Extraktion der Sexualsteroiden aus den Gewebeproben erfolgte nach einer Methode von *Eiletz et al. (1980)*.

Für die Bestimmung von 17 β -Estradiol wurden je 1 ml Protein- oder Fettlösung in 4 ml Diethylether 30 min geschüttelt (THYS 2, VEB MLW Labortechnik Ilmenau). Im Anschluß daran wurde je zweimal 1 ml der organischen Phase eingeeengt und in 200 μ l Estradiolverdünner aufgenommen. Bei dem Verdünner handelte es sich um eine von BioChem ImmunoSystems angebotene synthetische Matrix, die die im Serum vorliegenden Verhältnisse simuliert.

Für die Extraktion von Progesteron aus den Gewebeproben wurden je 1 ml Protein- oder Fettlösung in 3 ml Petrolether 30 min geschüttelt (THYS 2, VEB MLW Labortechnik Ilmenau). Zweimal 0,5 ml Extrakt aus den Proteinlösungen oder zweimal 1 ml Extrakt aus den Fettlösungen wurden eingeeengt und in 200 μ l progesteronfreiem Serum aufgenommen. Bei dem verwendeten progesteronfreien Serum handelte es sich um einen Humanserumpool aus der Routineanalytik, in dem ein Progesteronspiegel kleiner als 0,64 nmol / l am SR1 Testsystem (BioChem ImmunoSystems, Freiburg) gemessen wurde.

Die weitere quantitative Bestimmung der extrahierten Steroide erfolgte unter Verwendung eines Radioimmunoassays mit Magnettrenntechnik der Firma BioChem ImmunoSystems (siehe Kap. 2.2.5.2.2.).

2.2.5.2.2. Radioimmunoassay - Prinzip und Durchführung

Der Radioimmunoassay der Firma BioChem ImmunoSystems für die Bestimmung von 17 β -Estradiol (Estradiol MAIA) und Progesteron (Progesteron MAIA) in humanem Serum, basiert auf einer Konkurrenzreaktion zwischen markierten und unmarkierten Antigenen um eine begrenzte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Jeder Test enthält den entsprechenden Tracer

(spezifisch radioaktiv markiertes Steroidhormon), das Antiserum, Trennreagenz, die Standards und Kontrollen.

Für den Nachweis der Steroidhormone wurden 50 µl (Doppelbestimmung) der Standards, Proben und Kontrollen in die Teströhrchen pipettiert. Je 50 µl (Doppelbestimmung) des Nullstandards wurden in die Röhrchen für B₀ („0“-Konzentration des unmarkierten Antigens) und NSB (unspezifische Bindung) pipettiert. In die Teströhrchen für NSB wurden zusätzlich 100 µl destilliertes Wasser (H₂O dest.) gegeben. In alle Standards, Proben, Kontrollen, B₀, NSB und TA (Totalaktivität) wurden je 100 µl MAIA Tracer pipettiert. Anschließend wurde in alle Teströhrchen, außer in die für TA und NSB, 100 µl MAIA Antiserum gegeben. Die Ansätze wurden gut geschüttelt und im Wasserbad bei 37°C für 1 h inkubiert.

In dieser Zeit bildet das markierte und unmarkierte Antigen mit dem Antiserum Antigen-Antikörper-Komplexe. Diese Komplexbildung verhält sich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz und strebt ein Gleichgewicht an.

Nach der Inkubation erfolgte die Trennung von freiem und gebundenem Antigen mit einem 2. Antikörper. Dieser war kovalent an magnetisierbare Partikel gebunden. Dies ermöglichte eine schnelle Trennung von gebundenem und freiem Antigen mit Hilfe einer einfachen Magnetplatte. Dazu wurde in alle Teströhrchen, außer in die für die Totalaktivität, 1 ml Estradiol MAIA Trennreagenz pipettiert, gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Teströhrchen auf die Magnetplatte gestellt und nach 10 min der Überstand aus allen Röhrchen (außer Teströhrchen für die Totalaktivität) dekantiert.

Die Radioaktivität der in den Teströhrchen verbliebenen Präzipitate wurde 1 min im ¹²⁵I-Kanal eines Gamma-Counters (1261 MultiGamma-Counter mit 10 Detektoren, LKB Wallac, Turku, Finnland) in cpm (counts per minute) gemessen. Aus den gemessenen Standardwerten wurde eine Eichkurve erstellt und daraus die Konzentration in den Gewebeproben ermittelt (siehe Kap. 2.2.5.2.3.).

2.2.5.2.3. Auswertung der Meßergebnisse

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm MultiCalc Advanced, Version 2.0 (Wallac Oy, Turku, Finnland). Die Darstellung der Eichkurve erfolgte semilogarithmisch.

Von allen Standards, Proben und Kontrollen wurden die Mittelwerte berechnet und davon der Mittelwert für die unspezifische Bindung subtrahiert. Die unspezifische Bindung stellt die in Abwesenheit vom Antikörper unspezifisch an die Teströhrchen gebundene Radioaktivität dar und wird aus diesem Grund als Leerwert benutzt.

Anschließend wurde aus den korrigierten Mittelwerten für jeden Standard, für jede Kontrolle und Gewebeprobe die prozentuale Bindung bezogen auf den Nullstandard berechnet (Gl. 1). Da der Nullstandard (B_0) neben Antikörper nur radioaktiv markiertes Antigen enthält, war hier von einer 100 % igen Bindung des Tracers an den Antikörper-Bindungsstellen auszugehen.

$$\text{Bindungsrate} [\%] = \frac{B}{B_0} \cdot 100 \quad \text{Gl. 1}$$

B	=	gebundene Radioaktivität des jeweiligen Standard-, Kontroll- und Probenwertes
B_0	=	in Abwesenheit von Standardantigen (Nullstandard) am Antikörper gebundene Radioaktivität
B / B_0	=	Bindungsrate

Die so errechneten relativen Bindungsraten der Standards wurden semilogarithmisch gegen ihre entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Mit Hilfe der Standardkurve konnten nun die Werte der unbekanntes Gewebeprobe auf der Abszisse direkt abgelesen werden.

Die Angabe der Konzentrationen für 17 β -Estradiol und Progesteron erfolgte entsprechend der Gewebeeinwaage in $\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht.

2.2.5.3. Quantitative Bestimmung der Steroidrezeptoren in Endometrium, Myometrium und Myomknoten

2.2.5.3.1. Testprinzip und Durchführung

Die Bestimmung der Steroidrezeptoren im Zytosol von Endometrium, Myometrium und Myomknoten erfolgte nach einer Methode von *Seliger et al. (1987)*.

Dazu wurden je 200 μl Zytosol der Gewebeprobe auf 20 μl Radioligandenlösung pipettiert. Als Radioligand, zur quantitativen Erfassung des Estrogenrezeptors, wurde tritiummarkierter 17 β -Estradiol-Tracer ($[2,4,6,7\text{-}^3\text{H}]17\beta\text{-Estradiol}$ in Ethanol) in 4 Konzentrationen zwischen 1 nM bis 8 nM eingesetzt.

Für die quantitative Bestimmung des Gestagenrezeptors wurde ORG2058-Tracer (16 α -Ethyl-21-hydroxy-19-nor $[6,7\text{-}^3\text{H}]$ pregn-4-ene-3,20-dione in Ethanol) eingesetzt. Da Progesteron selbst während der Assayprozedur zur Degradation neigt, wurde zur Progesteronrezeptorbestimmung der synthetische Ligand verwendet (*Struve et al. 1994*). Der ORG2058-Tracer kam in 4 Konzentrationen, zwischen 2 nM und 17 nM, zur Anwendung.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung im Zytosol wurden zu jeder Konzentration des markierten Liganden Parallelansätze mitgeführt, die zusätzlich zum radioaktiven Liganden einen

Überschuß an unmarkierten Liganden enthielten. In diesen Parallelansätzen wurde durch das nichtradioaktive Hormon eine so hohe Isotopenverdünnung des markierten Hormons herbeigeführt, dass in Anbetracht der geringen Hormonbindungskapazität der Zytosole eine Bindung des radioaktiven Steroids an Rezeptoren nicht mehr meßbar war (*Struve et al. 1994*).

Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung am Estrogenrezeptor wurde unmarkiertes DES in 500-fachem Überschuß eingesetzt. Der natürliche Ligand des Estrogenrezeptors, 17 β -Estradiol, ist in der Lage, sowohl am Rezeptorprotein als auch am SHBG zu binden. Der Überschuß an DES verdrängt selektiv den 17 β -Estradiol-Tracer aus den Estrogenrezeptorbindungsstellen, da der synthetische Ligand ausschließlich am Estrogenrezeptor und zugleich mit höherer Affinität als der natürliche Ligand am Rezeptorprotein bindet (*Daxenbichler 1981*).

Für den Nachweis der unspezifischen Bindung an den Gestagenrezeptoren wurde den Parallelansätzen ein 100-facher Überschuß an unmarkiertem ORG2058 (16 α -Ethyl-21-hydroxy-19-norpregn-4-ene-3,20-dione) zugefügt.

Die entsprechenden Mengen an unmarkiertem DES bzw. ORG2058, welche jeweils in Ethanol gelöst waren, wurden eingeengt und anschließend im Zytosol der Gewebeproben gelöst in die Röhrchen für die unspezifische Bindung pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 4°C war das Reaktionsgleichgewicht erreicht. Danach wurde die Fraktion der freien Liganden von der rezeptorgebundenen Fraktion getrennt. Zur Absorption der ungebundenen Steroide wurde den Ansätzen 500 μ l dextranbeschichtete Aktivkohle-Suspension zugegeben. Die Ansätze zur Bestimmung des Estrogenrezeptors wurden vor dem Zentrifugationsschritt zunächst 5 min bei 4°C inkubiert. Für die quantitative Erfassung der Gestagenrezeptoren war dieser Inkubationsschritt nicht erforderlich. Somit wurden die Ansätze sofort 10 min bei 4000 g und 4°C in einer Jouan S.A. CR422 zentrifugiert.

Aliquote Teile des Überstandes (500 μ l) wurden mit einem Szintillationscocktail (5 ml Aquasafe 300 Plus, Flashpoint > 120°C) versetzt. Nach 20 min wurde die am Zytosolprotein gebundene Radioaktivität 1 min am Liquid Scintillation Analyser Wallac 1410 (Wallac Oy, Turku Finnland) in cpm gemessen.

Die Angabe der maximalen Rezeptorbindungsstellen (B_{max}) im Endometrium, Myometrium und Myomknoten erfolgte in der Dimension fmol / mg Zytosolprotein oder in μ g / kg Feuchtgewicht. Die Auswertung der Meßergebnisse wird im Kapitel 2.2.5.3.2. genauer beschrieben.

Die Proteinbestimmung in den Zytosolen erfolgte nach der Methode von *Lowry et al. (1951)* (siehe Kap. 2.2.5.3.3.).

Die Qualität der Ergebnisse für die Bestimmung der Steroidrezeptoren in humanem Gewebe wurde durch die Teilnahme unseres Labors an Ringversuchen des Institutes für Onkologische Chemie Düsseldorf gewährleistet.

Aktivkohle-Suspension:	480	mg	Norit A
	48	mg	Dextran T70
	150	ml	Puffer (siehe Kap. 2.2.5.1.)

2.2.5.3.2. Auswertung der Meßergebnisse

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm MultiCalc Advanced, Version 2.0 (Wallac Oy, Turku, Finnland). Für die Bestimmung der Rezeptorkonzentrationen im Zytosol wurde der Scatchard Plot verwendet (*Scatchard 1949*).

Der Scatchard Plot ist ein Verfahren zur Linearisierung von Bindungsdaten. Er basiert auf den Verfahren von Eady und Hofstee (*Hofstee et al. 1952*) aus der Enzymkinetik und dem von Scatchard (*Scatchard 1949*) für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen. Dem Scatchard Plot liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$\frac{B_{\text{spez}}}{F} = - \frac{1}{K_D} B_{\text{spez}} + \frac{1}{K_D} B_{\text{max}} \quad \text{Gl. 2}$$

$B_{\text{spez.}}$	=	spezifisch gebundene Radioligandenkonzentration
F	=	ungebundene Radioligandenkonzentration
B_{max}	=	maximale Rezeptorbindungsstellen
K_D	=	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden am Rezeptor

Den Scatchard Plot erhält man durch die Auftragung der Konzentration des spezifisch gebundenen Radioliganden ($B_{\text{spez.}}$) am Rezeptorprotein gegen den Quotienten von spezifisch gebundenem und freiem Radioliganden ($B_{\text{spez.}} / F$) (Abb. 9).

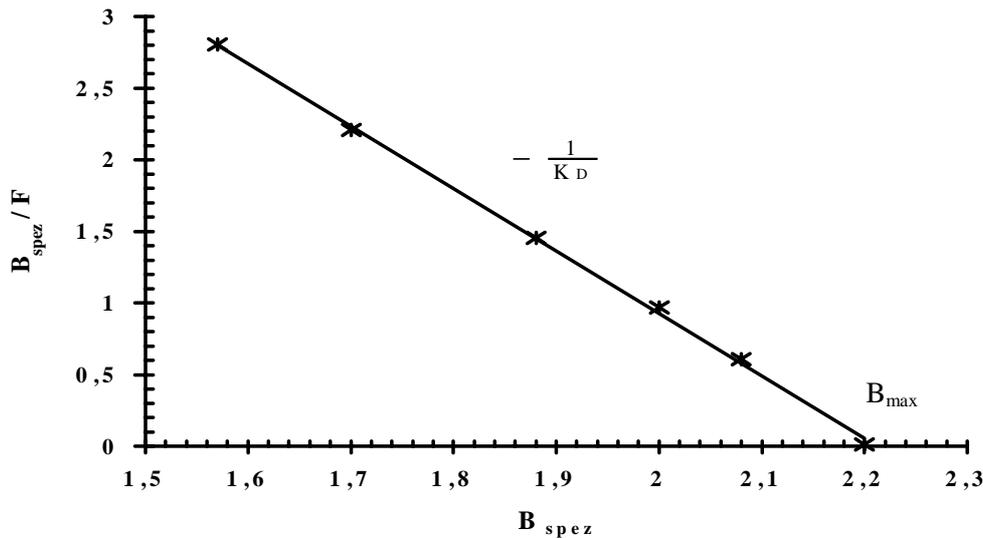


Abb. 9: Scatchard Plot - zur Ermittlung der maximalen Rezeptorbindungsstellen im Endometrium, Myometrium und Myomknoten.

Die Neigung der Geraden ergibt den negativen reziproken Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ($-1 / K_D$). Ihr Schnittpunkt mit der Abszisse ($B_{spez} / F = 0$) entspricht der Menge an maximalen Rezeptorbindungsstellen (B_{max}) im Gewebe (Repke et al. 1987).

Die spezifische Bindung (B_{spez}) des Radioliganden am Rezeptorprotein ergibt sich aus der Differenz der Gesamtbindung des Radioliganden im Zytosol (B) und der unspezifischen Bindung (NSB) im Ansatz (Gl. 3). Den Werten für B und NSB liegt der arithmetische Mittelwert aus den entsprechenden Doppelbestimmungen zugrunde.

$$B_{spez} = B - NSB \quad \text{Gl. 3}$$

- B_{spez} = spezifisch gebundene Radioligandenkonzentration
- B = Gesamtbindung des Radioliganden im Zytosol
- NSB = unspezifische Bindung des Radioliganden

Die Menge an freien Radioliganden (F) berechnet sich aus der Differenz der sich im Ansatz befindenden Totalaktivität (R_{Total}) und dem spezifisch gebundenen Radioliganden (B_{spez}) (Gl. 4). Als Berechnungsgrundlage wurden auch hier die entsprechenden arithmetischen Mittelwerte aus den Mehrfachbestimmungen verwendet.

$$F = R_{\text{Total}} - (B - \text{NSB}) = R_{\text{Total}} - B_{\text{spez}} \quad \text{Gl. 4}$$

F	=	ungebundene Radioligandenkonzentration
R _{Total}	=	im Ansatz eingesetzte Gesamtmenge an Radioliganden
B	=	Gesamtbindung des Radioliganden im Zytosol
NSB	=	unspezifische Bindung des Radioliganden im Zytosol
B _{spez}	=	spezifisch gebundene Radioligandenkonzentration

2.2.5.3.3. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry basiert auf einer Kombination der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex. Dieser unterstützt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form ihrer Heteropolyphosphorsäuren eingesetzt werden (Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz). Dabei wird Cu²⁺ im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu⁺ reduziert, das dann mit dem Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz reagiert. Aufgrund der zusätzlichen Farbreaktion ist die Sensitivität gegenüber dem reinen Biuret-Assay enorm gesteigert. Die resultierende blaue Färbung wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen (*Lottspeich et al. 1998*).

Für die Proteinbestimmung wurden 100 µl Puffer, 100 µl BSA (2 mg Rinderserumalbumin / ml Puffer) und 50 µl Probe in je ein Röhrchen pipettiert (Dreifachbestimmung). Die Röhrchen mit den Proben wurden zusätzlich mit jeweils 50 µl Puffer versehen. In alle Teströhrchen wurden anschließend 2 ml einer Lösung A pipettiert, die Ansätze gut geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz in die Röhrchen gegeben, die Ansätze gut durchmischt und wiederum 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Extinktion in den Röhrchen bei 578 nm (Spekol 11, Carl Zeiss Jena) gemessen.

Eine Eichkurve wurde mit BSA gelöst in Puffer aufgenommen und die gemessenen Extinktionen gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Die Eichkurve war im Bereich von 0,25 mg / ml BSA bis 3 mg / ml BSA linear. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnten die Werte für die unbekanntenen Proben direkt auf der Abszisse abgelesen werden.

Lösung A:	50	ml	2 % Na ₂ CO ₃ in 0,1 n NaOH
	0,5	ml	1 % CuSO ₄
	0,5	ml	2 % Natriumtartrat-2-hydrat
	50	ml	H ₂ O dest.

2.2.6. Quantitative Bestimmung von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol in humanen Geweben mittels hochauflösender GC-MS

Die Analytik der CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol erfolgte im Labor der ERGO Forschungsgemeinschaft mbH in Hamburg. Das umweltanalytische Labor nimmt in regelmäßigen Abständen an Ringversuchen für den Nachweis von CKW in humanen Geweben der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. erfolgreich teil.

Die Methoden zur Bestimmung der CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol im humanen Gewebe werden in den Kapiteln 2.2.6.1. bis 2.2.6.4. beschrieben. Die verwendeten Chemikalien bezog ERGO von den Firmen Promochem GmbH Wesel und Merck KGaA Darmstadt. Alle Lösungsmittel besaßen einen Reinheitsgrad für die Ultraspurenanalytik.

Die Angabe der Konzentrationen für die CKW, für 4-tert-Octylphenol und für Coumestrol erfolgte durch ERGO im Endometrium, Myometrium und Myomknoten in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Feuchtgewicht. In den Serumproben war die Bezugsgröße $\mu\text{g}/\text{l}$ und im Fettgewebe $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fett. Im Fall vom PCB 169 erfolgte die Angabe der Konzentrationen in ng/kg Feuchtgewicht, ng/l oder ng/kg Fett.

2.2.6.1. Quantitative Bestimmung von CKW und von 4-tert-Octylphenol in humanem Endometrium, Myometrium, Myomknoten und Fettgewebe

Die Einwaage der Gewebe für die quantitative Bestimmung der CKW und 4-tert-Octylphenol richtete sich nach der vorhandenen Probenmenge. Bei Fettproben wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 0,3 g Gewebe im Mörser eingewogen wurde. Für einen entsprechenden Vergleichsansatz wurde parallel die durchschnittliche Menge an Na_2SO_4 abgewogen. Die Gewebeproben und der Vergleichsansatz wurden mit einigen Tropfen 0,05 M H_2SO_4 angesäuert, homogenisiert und ca. 1 h ruhen gelassen.

Alle Proben wurden in 6 ml Hexan aufgenommen, in 20 ml Ampullen überführt und geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel zur Trocknung auf eine Na_2SO_4 Carbopacksäule (3 g Na_2SO_4) gegeben und in einen 25 ml Spitzkolben überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde noch zweimal wiederholt. Das trockene Lösungsmittel vereinigte man in einem gemeinsamen Spitzkolben.

Zur Extraktion von 4-tert-Octylphenol aus der organischen Phase wurden die Proben dreimal mit 0,2 M NaOH ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase überführte man in Schraubdeckelreagenzgläser.

Die organische Phase verblieb im Kolben. Beide Phasen wurden nun zum einen für die Bestimmung von 4-tert-Octylphenol (wäßrige Phase) und zum anderen für die Bestimmung der CKW (organische Phase) getrennt voneinander aufgearbeitet:

wäßrige Phase:

Als interner Standard wurde den Proben 10 µl Pentachlorphenol (10 µg / ml, C¹³) zugegeben. Die Proben wurden noch einmal mit 50 % iger H₂SO₄ angesäuert und dreimal mit je 3 ml Hexan extrahiert. Die organische Phase wurde auf einer Na₂SO₄ Carbopacksäule (3 g Na₂SO₄) getrocknet und danach in einen 20 ml Spitzkolben überführt.

Die Proben wurden mit 2 ml Toluol versetzt und anschließend auf 1-2 ml am Rotationsverdampfer eingengt. Mittels Stickstoffstrom wurde das Volumen bis auf 100 µl minimiert. An dieser Stelle erfolgte die Injektion von 2 µl Probe in eine hochauflösende GC-MS (Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie). Als GC-MS kam ein VG Autospec Gaschromatograph HP 5890 mit Autosampler HP 7673 zum Einsatz.

organische Phase:

Als interner Standard wurde den Proben 10 µl eines Gemisches von p,p'-DDT, p,p'-DDE, β-HCH, γ-HCH (0,1 µg / ml, C¹³) und 10 µl eines Gemisches von PCB 28 (2,4,4'-Trichlorobiphenyl), PCB 52 (2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl), PCB 101 (2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl), PCB 138, PCB 153, PCB 180, PCB 169 (0,1 µg / ml, C¹³) zugegeben.

Zur Fettbestimmung wurde die organische Phase im Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingengt. Die fettreiche Fraktion wurde auf eine Na₂SO₄ Carbopacksäule (3 g Na₂SO₄) zum trocknen gegeben und in einen vorgewogenen 25 ml Spitzkolben überführt. Die Fettbestimmung erfolgte auf diesem Wege gravimetrisch.

Anschließend wurden die Proben auf mit Hexan unter N₂-Druck konditionierte Kieselgelsäulen (Na₂SO₄ / 3 g unbehandeltes Kieselgel / Na₂SO₄ Carbopacksäule) gegeben. Die Säulen wurden zweimal mit je 2 ml Hexan nachgespült und schließlich die Proben mit 20 ml Hexan / Toluol (70 / 30, v / v) eluiert.

Die Eluate wurden mittels Rotationsverdampfer auf ca. 1-2 ml eingengt, in ein Insert überführt und dort mittels Stickstoffstrom auf 100 µl minimiert. Je 2 µl der Proben wurden in eine hochauflösende GC-MS (siehe oben) injiziert und analysiert.

Für die Messung der coplanaren PCB (PCB 169) im Gewebe wurde nach Detektion der CKW, die restliche Probe noch einmal auf eine mit schwefelsaurem Kieselgel / Zäsiumsilikat (0,75 g / 0,35 g) und auf eine mit Aluminiumoxid (3,65 g) gepackte Säule gegeben. Diese beiden Säulen waren hintereinander geschaltet und mit Hexan konditioniert. Nach Auftragen der Proben wurden die Säulen einmal mit 8 ml und einmal mit 7 ml Hexan gespült. Danach wurde noch

einmal mit 6 ml Hexan / Dichlormethan (98 / 2, v / v) gespült und anschließend die Proben mit 25 ml Hexan / Dichlormethan (50 / 50, v / v) eluiert.

Die Eluate wurden am Rotationsverdampfer bis ca. 1 – 2 ml eingeengt, in ein Insert überführt und dort mittels Stickstoffstrom getrocknet. Die Proben wurden in 10 µl 1,2,3,4-tetrachlordibenzo-p-dioxin (1,2,3,4-TCDD; 0,1 µg / ml C¹³) gelöst und mittels hochauflösender GC-MS (siehe oben) analysiert.

2.2.6.2. Quantitative Bestimmung von CKW und von 4-tert-Octylphenol in humanem Serum

Zu Versuchsbeginn wurde für die quantitative Bestimmung der CKW und 4-tert-Octylphenol je 1 g Serum und 1 g Wasser als Blank eingewogen.

Anschließend wurde den Proben und dem Blank 1 ml Ethanol zugegeben. Als interner Standard wurden 10 µl eines Gemisches von p,p'-DDT, p,p'-DDE, β-HCH, γ-HCH (0,1 µg / ml, C¹³) und 10 µl eines Gemisches von PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 180, PCB 169 (0,1 µg / ml, C¹³) zu den Proben pipettiert.

Die Ansätze wurden mit 0,5 ml 0,05 M H₂SO₄ angesäuert und anschließend zweimal mit je 5 ml und zweimal mit je 4 ml Hexan / Ether (10 / 1, v / v) extrahiert. Die jeweilige organische Phase wurde in 25 ml Spitzkolben überführt und dreimal mit je 2 ml 0,2 M NaOH ausgeschüttelt. Die NaOH-Phase (wässrige Phase) überführte man in Schraubendeckelreagenzgläser und behandelte sie ab diesem Zeitpunkt getrennt von der organischen Phase für die Analyse von 4-tert-Octylphenol. Die organische Phase verblieb im Kolben.

Der weitere Verlauf der Analytik von wässriger und organischer Phase entsprach der Beschreibung im Kapitel 2.2.6.1..

2.2.6.3. Quantitative Bestimmung von Coumestrol in humanem Endometrium, Myometrium und Myomknoten

Die Gewebeproben für die Bestimmung von Coumestrol wurden im Mörser nach Zugabe von 10 µl Daidzein (10 µg / ml) als internen Standard homogenisiert. Parallel zu jeder Präparation wurde ein Blank aufgearbeitet, welcher mit 10 µl Coumestrol versetzt wurde.

Die homogenisierten Proben wurden quantitativ mit 5 ml 0,2 mol / l Natriumacetat-Lösung pH 5 in 20 ml Ampullen überführt und mit 15 µl Enzym-Lösung (7,5 mg β-Gluconidase / 50 µl Sulfatase) versehen. Die Ampullen wurden verschlossen und 16 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Nach der hydrolytischen Spaltung extrahierte man die Proben zweimal je 30 min mit 15 ml von einem Methanol / Wasser Gemisch (20 / 10, v / v, Reinstwasser mit H₂SO₄ auf pH 3 eingestellt) auf dem Schüttelblock. Die Gewebeproben wurden anschließend 5 min bei 3000 U / min zentrifugiert und der Überstand unter Verwendung von Gaschromatographiewatte filtriert. Die Gaschromatographiewatte wurde im Anschluß mit dem Methanol / Wasser Gemisch (20 / 10, v / v) nachgespült.

Die filtrierten Proben wurden zweimal mit Hexan ausgeschüttelt und die wäßrige Phase am Rotationsverdampfer auf 1 – 2 ml eingengt. Die wäßrigen Gewebeproben wurden nun durch Octadecyl endcapped Säulen (C18, T.J.Baker, 200 mg Füllung, 3 ml) gesaugt. Diese waren zuvor mit 6 ml Hexan, 6 ml Aceton und 12 ml Reinstwasser (mit H₂SO₄ auf pH 3 eingestellt) konditioniert worden. Die Kolben wurden noch einmal mit Reinstwasser pH 3 nachgespült und die Säulen anschließend mittels Stickstoffstrom getrocknet. Die Proben eluierte man von den Säulen ohne Druck, unter Verwendung von 7 ml Methanol.

Das jeweilige Eluat wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 0,5 ml eingengt, quantitativ in ein Insert überführt und unter Stickstoff getrocknet. Für die Derivatisierung von Coumestrol wurden die Proben in 40 µl Hexan und 50 µl Sylierungsreagenz gelöst. Parallel wurde den Proben 10 µl Zearalenon-Standard (10 µg / ml) zugegeben. Die Proben wurden 60 min bei 60°C im Trockenschrank inkubiert und anschließend mittels hochauflösender GC-MS (siehe Kap. 2.2.6.1.) analysiert.

2.2.6.4. Quantitative Bestimmung von Coumestrol in humanem Serum

Je 5 g Serum, 5 g Wasser als Blank und zusätzlich noch einmal 5 g Serum, von der Probe mit dem größtem Probenvolumen, wurden für die Bestimmung von Coumestrol im Serum in 20 ml Ampullen eingewogen. Alle Proben und Blank wurden mit 20 µl Daidzein-Lösung (10 µg / ml) als internen Standard versetzt. Die doppelt eingewogene Probe wurde zusätzlich mit 10 µl Coumestrol-Standard (20 µg / ml) versehen.

Alle Proben wurden mit 5 ml Natriumacetat-Lösung pH 5,5 und 50 µl Enzymlösung (β-Gluconidase / Sulfatase) versetzt und 16 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der hydrolytischen Spaltung wurden 10 ml Natriumphosphatpuffer pH 7 auf die Serumproben pipettiert und anschließend der pH-Wert überprüft. Unter Verwendung von Extrelut Säulen (Merck KGaA Darmstadt) wurde den Proben das Wasser entzogen. Die Ampullen wurden mit wenig Natriumphosphat-Lösung nachgespült und die Säulen mit den Proben etwa 15 min inkubiert. Die Serumproben wurden mit 60 ml Ethylacetat von den Säulen eluiert.

Die Proben wurden auf ca. 3 ml eingengt, und über Na₂SO₄-Säulen (Carbopacksäule mit ca. 3 g feinem Na₂SO₄) in 25 ml Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Die Proben wurden in den Kolben mit 0,5 ml Ethylacetat aufgenommen und in 10 ml Ampullen überführt. Die Kolben wurden dreimal mit je 0,5 ml Ethylacetat nachgespült und ebenfalls in die 10 ml Ampullen überführt.

Die Serumproben wurden wiederum mit Stickstoff getrocknet, eingengt und anschließend in 2 ml Hexan / Toluol (50 / 50, v / v) aufgenommen. Die Proben wurden mit je 2 ml 0,5 M Ammoniumhydroxid versetzt, geschüttelt und 5 min bei 3000 U / min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend abgezogen und in eine zweite 10 ml Ampulle überführt. Zu der verbleibenden organischen Phase wurde nochmals 2 ml 0,5 M Ammoniumhydroxid gegeben, erneut geschüttelt und wieder 5 min bei 3000 U / min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zu der vorherigen gegeben und die organische Phase wurde verworfen.

Die erhaltenen wässrigen Proben wurden mit 200 µl Eisessig angesäuert, der pH-Wert überprüft und anschließend dreimal mit je 2 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über eine Na₂SO₄-Säule (Carbopacksäule mit ca. 3 g feinem Na₂SO₄) in 25 ml Spitzkolben überführt. Das Ethylacetat wurde am Rotationsverdampfer auf etwa 2 ml eingengt und anschließend unter Stickstoff getrocknet.

Die Proben wurden in Hexan aufgenommen, in ein Insert überführt und unter Stickstoff getrocknet. Die Derivatisierung und Analytik mittels hochauflösender GC-MS erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.2.6.3..

2.3. Kompetitionsuntersuchungen

2.3.1. Untersuchungsparameter

Für die Bestimmung des Einflusses von CKW (PCB 153, PCB 169, o,p`-DDT, p,p`-DDT, o,p`-DDE, p,p`-DDE, β-HCH, γ-HCH), von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen (Coumestrol und Genistein [4',5,7-Trihydroxyisoflavone]) auf die Steroid-Rezeptor-Bindung wurden Kompetitionsversuche durchgeführt.

Diese Kompetitionsversuche erfolgten zunächst an den Steroidrezeptoren aus Kalbsuteri. Die Verbindungen, die sich im in-vitro Tiermodell als Inhibitoren der Radioligandenbindung zum Estrogen- oder Gestagenrezeptor erwiesen hatten, wurden anschließend in analogen Testansätzen an den Rezeptoren aus humanen uterinen Geweben untersucht. Als Vergleichsverbindungen kamen dabei 17β-Estradiol, Progesteron und ORG2058 zum Einsatz.

Für die Klärung der Frage, inwieweit CKW, 4-tert-Octylphenol und Phytoestrogene die Dissoziationskonstante der Steroidrezeptoren beeinflussen können, wurden die Substanzen untersucht, die in der Lage waren, die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium zu inhibieren. Außerdem waren in diese Untersuchung die Verbindungen eingeschlossen, die eindeutig in humanem Endometrium nachgewiesen werden konnten.

2.3.2. Gewebe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kalbsuteri wurden vom Fleischzentrum Lausitz in Kassel-Golzsig bei Luckau zur Verfügung gestellt. Unmittelbar nach der Entnahme der inneren Organe aus den Kälbern wurde der Uterus von den übrigen Organteilen getrennt, in Aluminiumfolie gewickelt und in Trockeneis tiefgefroren. Der Transport vom Fleischzentrum Lausitz in das Labor für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Tumordiagnostik in Halle erfolgte am Tag der Entnahme ohne Unterbrechung der Kühlkette. Die Kalbsuteri wurden bis zum Tag der Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

Humanes Endometrium, Myometrium und Myomknoten wurden nach der operativen Entfernung des Uterus gewonnen. Die Aufklärung der Patientinnen, die Operation, die Entnahme der Gewebeproben und die Lagerung erfolgten entsprechend der Beschreibungen in den Kapiteln 2.2.1. und 2.2.3..

2.3.3. Gewebepräparation

Für die Präparation der Kalbsuteri wurden ca. 2 – 3 Uteri gewogen und anschließend mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Die Gewebemenge wurde zur Berechnung des Volumen für den Puffer (siehe Kap. 2.2.5.1.), in dem die Uteri mittels Ultra-Turax T25 (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA[®]-Labortechnik Staufen) bei 4°C homogenisiert wurden, mit drei multipliziert.

Anschließend wurde das Homogenat in einer K23 (Janetzki, VEB MLW Labortechnik Ilmenau) 30 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Zur Gewinnung des Zytosols wurde der Überstand ein zweites mal 1 h bei 100 000 g und 4°C in einer Sorvall RC28S (Institut für Pflanzenbiochemie Halle / Saale) zentrifugiert. Die Zytosolfraktion wurde in aliquote Teile (5 ml) aufgeteilt und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage von Wirtis (Genesis, Forschungsgerätevertrieb München, Institut für Pflanzenbiochemie Halle / Saale) lyophilisiert.

Die Lyophilisate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C tiefgefroren. Am Tag der Durchführung von Kompetitionsuntersuchungen wurden die Lyophilisate in 5 ml H_2O dest. homogenisiert und anschließend mit Puffer bis zu der entsprechend gewünschten Rezeptormenge verdünnt. Somit stand für eine Reihe von Kompetitionsuntersuchungen eine homogene Rezeptorpräparation zur Verfügung.

Die Präparationen von Endometrium, Myometrium und Myomknoten erfolgten entsprechend der Beschreibung im Kapitel 2.2.5.1.. Die humanen Gewebe wurden für jeden einzelnen Kompetitionsansatz frisch aufgearbeitet.

Die Proteinbestimmung in den Zytosolen erfolgte nach der Methode von *Lowry et al. (1951)* (siehe Kap. 2.2.5.3.3.).

2.3.4. Bestimmung des Einflusses von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung

Das für die Bestimmung des Einflusses von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung verwendete radiochemische Testsystem, basiert auf der Fähigkeit von synthetischen oder natürlichen Verbindungen, mit Radioliganden um die Bindungsstellen an Rezeptoren zu konkurrieren (*Repke et al. 1987*).

Dabei kommt es im Fall einer kompetitiven Hemmung durch eine Erhöhung der Konzentration einer unmarkierten Verbindungen im Testansatz, bei konstanter Radioligandenkonzentration, zu einer Verminderung der spezifischen Bindung des Radioliganden am Rezeptor. Die Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindungen erstrecken sich dabei im Testansatz über einen weiten ansteigenden Konzentrationsbereich (mehrere Zehnerpotenzen). Die für jede Konzentration der unmarkierten Testverbindung gemessene spezifische Bindung des Radioliganden wird in [%] des Ausgangswertes ohne Testverbindung (Basiswert = 100 %) in einer sogenannten Hemmungskurve dargestellt. Aus dieser Hemmungskurve lassen sich Inhibitorkonstanten für jede Substanz ablesen. Eine Inhibitorkonstante gibt die Konzentration einer Testverbindung an, welche in der Lage ist, die spezifische Bindung des Radioliganden um einen bestimmten Prozentsatz zu hemmen (*Repke et al. 1987*).

2.3.4.1. Testdurchführung

Als Radioligand zur quantitativen Erfassung der Bindung am Estrogenrezeptor wurde tritiummarkierter 17 β -Estradiol-Tracer ([2,4,6,7-³H]17 β -Estradiol in Ethanol) in einer Konzentration von 5 nM verwendet.

Für die quantitative Bestimmung der Bindung am Gestagenrezeptor wurde ORG2058-Tracer (16 α -Ethyl-21-hydroxy-19nor[6,7-³H]pregn-4-ene-3,20-dione in Ethanol) eingesetzt. Der ORG2058-Tracer wurde in einer Konzentration von 10 nM verwendet. Je 20 μ l Tracer (Doppelbestimmung) wurden in die Röhren für die Gesamtbindung, für die unspezifische Bindung und für die Testverbindungen pipettiert.

Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde in die entsprechenden Röhren ein Überschuß an unmarkierten Ligand gegeben (siehe Kap. 2.2.5.3.1.).

Die CKW, 4-tert-Octylphenol und die Phytoestrogene wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,48 nM bis maximal 20 mM im Kompetitionsansatz untersucht. Alle Verbindungen waren in Ethanol gelöst, außer PCB 153 und PCB 169. Diese beiden Substanzen waren in Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. in einem DMSO / Toluol Gemisch gelöst. Die entsprechenden Konzentrationen wurden in je 20 μ l in die dafür vorgesehenen Teströhren pipettiert. Entsprechende Parallelansätze für die Gesamtbindung und unspezifische Bindung mit jeweils 20 μ l Lösungsmittel wurden mitgeführt und als Basiswerte für die Berechnung der spezifischen Bindung des Radioliganden verwendet.

Die Konzentrationen der übrigen in Ethanol gelösten Testverbindungen und auch die für die Messung der unspezifischen Bindung verwendeten Substanzen, wurden in Glasröhren eingengt und in 600 μ l Zytosol gelöst. Anschließend wurden von jeder Konzentration 200 μ l in jedes Teströhren pipettiert.

Die Inkubation, die Trennung der freien Liganden von der rezeptorgebundenen Fraktion und die Vorbereitung der Proben für die Messung am Liquid Scintillation Analyser erfolgten nach der bereits im Kapitel 2.2.5.3.1. beschriebenen Vorgehensweise.

2.3.4.2. Auswertung der Meßergebnisse

Die Auswertung der Meßergebnisse und die Berechnung der spezifischen Bindung der Radioliganden an den Steroidrezeptoren erfolgte mit dem Softwareprogramm MultiCalc Advanced, Version 2.0 (Wallac Oy, Turku, Finnland).

Die spezifische Bindung (B_{spez}) wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.2.5.3.2. berechnet. Die für jede Konzentration der unmarkierten Testverbindungen gemessene

spezifische Radioligandenbindung wurde bezogen auf den Basiswert ohne Testverbindung und im entsprechendem Prozentsatz ausgedrückt (Gl. 5).

$$B_{\text{spez}} [\%] = \frac{B_{\text{spez}}}{B_0} \cdot 100 \quad \text{Gl. 5}$$

- $B_{\text{spez}} [\%]$ = Prozentualer Anteil der spezifischen Bindung der Radioliganden in Anwesenheit der Testverbindungen bezogen auf den Basiswert ohne Testverbindungen
- B_{spez} = spezifisch gebundene Radioligandenkonzentration
- B_0 = Basiswert der spezifisch gebundenen Radioligandenkonzentration ohne Testverbindung

Anschließend wurden die Werte für $B_{\text{spez}} [\%]$ in einer semilogarithmischen Darstellung gegen die Konzentrationen der jeweiligen Testverbindung in nM aufgetragen. Die sich daraus ergebende sogenannte Hemmungskurve wurde im Softwareprogramm Microsoft Excel 97 erstellt (Abb. 10). Die Regression der berechneten Meßpunkte erfolgte mit dem Softwareprogramm Jandel Scientific Table Curve 2D Version 4.

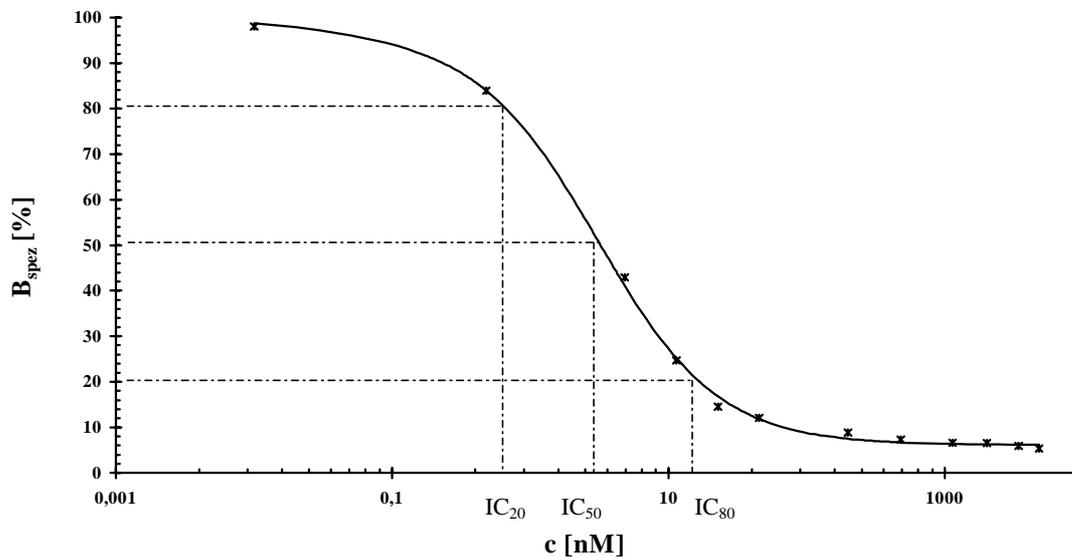


Abb. 10: Hemmungskurve zur Ermittlung der Inhibitorkonstanten von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen.

Aus den Hemmungskurven der Testverbindungen wurden der IC_{20} (Inhibitorkonstante, bei der 20 % der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt wird), der IC_{50} (Inhibitorkonstante,

bei der 50 % der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt wird) und der IC_{80} (Inhibitor konstante, bei der 80 % der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt wird) graphisch ermittelt (Abb. 10).

2.3.5. Bestimmung des Einflusses von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen auf die Dissoziationskonstante der Steroidrezeptoren

2.3.5.1. Testdurchführung

Die Bestimmung des Einflusses von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen auf die Dissoziationskonstante der Steroidrezeptoren erfolgte anhand von Sättigungskurven.

Die Radioliganden zur quantitativen Erfassung der Steroidrezeptoren wurden in 9 Konzentrationen im Sättigungsansatz eingesetzt. Für den Estrogenrezeptor lag der Konzentrationsbereich des eingesetzten 17β -Estradiol-Tracers zwischen 0,46 nM und 8 nM, für den Progesteronrezeptor lag der verwendete Konzentrationsbereich des ORG-Tracers zwischen 1 nM und 17 nM.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung an den Rezeptoren wurden zu jeder Konzentration des markierten Liganden Parallelansätze mitgeführt, die zusätzlich zum radioaktiven Liganden einen Überschuss an unmarkierten Liganden enthielten (siehe Kap. 2.2.5.3.1.).

Die Sättigungsansätze wurden in Anwesenheit der Testverbindung, entsprechend ihrer Konzentrationen in humanem Endometrium, durchgeführt. Parallel wurde jeweils ein Ansatz ohne Testverbindung als Basiswert für die Dissoziationskonstante mitgeführt.

Die Durchführung der Sättigungsexperimente entsprach der im Kapitel 2.2.5.3.1. beschriebenen Vorgehensweise für die quantitative Steroidrezeptorbestimmung in humanen Geweben. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten in den Sättigungsansätzen wird im Kapitel 2.3.5.2. ausführlicher erläutert.

2.3.5.2. Ermittlung der Dissoziationskonstanten

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm MultiCalc Advanced, Version 2.0 (Wallac Oy, Turku, Finnland). Für die Ermittlung der maximalen Rezeptorbindungsstellen im Zytosol aus Kalbsuteri wurde der Scatchard Plot verwendet

(Abb. 9). Die Darstellung und Auswertung nach diesem Linearisierungsverfahren erfolgte mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel 97.

Die Berechnung der spezifischen Bindung (B_{spez}) erfolgte entsprechend der Beschreibung im Kapitel 2.2.5.3.2.. Die Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) erfolgte aus der Sättigungskurve der spezifischen Radioligandenbindung an den Steroidrezeptoren. Die Sättigungskurve erhält man durch die Auftragung der eingesetzten Radioligandenkonzentrationen (R_{Total}) auf der Abszisse gegen die spezifische Bindung der Radioliganden an den Rezeptoren (B_{spez}) (Abb. 11).

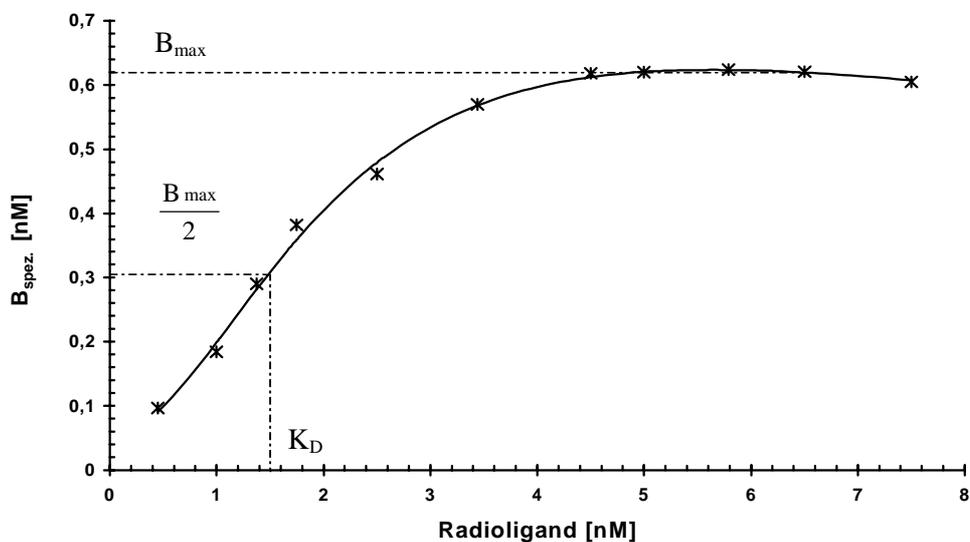


Abb. 11: Sättigungskurve zur Ermittlung der Dissoziationskonstante.

Der Sättigungskurve liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$B_{\text{spez}} = \frac{B_{\text{max}} \cdot R_{\text{Total}}}{K_D + R_{\text{Total}}} \quad \text{Gl. 6}$$

- B_{spez} = spezifisch gebundene Radioligandenkonzentration
- B_{max} = maximale Rezeptorbindungsstellen
- R_{Total} = im Ansatz eingesetzte Gesamtmenge an Radioliganden
- K_D = Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden am Rezeptor

Daraus lässt sich ableiten, wenn $B = \frac{B_{\max}}{2}$ ist, dann entspricht die eingesetzte Radioligandenkonzentration (R_{TOTAL}) auf der Abszisse der Dissoziationskonstante K_D (*Repke et al. 1987*).

Die auf diese Weise ermittelten Dissoziationskonstanten in den Sättigungsansätzen mit und ohne Testverbindung wurden gegenübergestellt und verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Expositionsuntersuchungen

Im Mittelpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluß ökologisch relevanter Wirkstoffe auf die Fertilität der Frau stand eine genaue Einschätzung der Belastung humaner uteriner Gewebe, einer normofertilen und einer sterilen Probandinnengruppe, mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt.

3.1.1. Endokrin wirksame Verbindungen im Fettgewebe, in uterinen Geweben und im Serum von normofertilen Frauen

Die normofertile Patientinnengruppe umfaßte 15 Frauen, bei denen aufgrund gutartiger Erkrankungen der Uterus entfernt werden mußte (siehe Kap. 2.2.1.1.).

3.1.1.1. Fettgewebe

CKW sind lipophile Verbindungen. Demnach war ihre Anreicherung im Fettgewebe erwartungsgemäß hoch (Tab. 1).

Tab. 1: CKW und 4-tert-Octylphenol (OP) im Fettgewebe einer normofertilen Probandinnengruppe ($\mu\text{g} / \text{kg}$ Fett, PCB 169 in ng / kg Fett, n.n.: nicht nachweisbar, n.a.: nicht auswertbar, NG: Nachweisgrenze, S: Standardabweichung).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β -HCH	Lindan	o,p`-DDD	p,p`-DDD	o,p`-DDT	p,p`-DDT	o,p`-DDE	p,p`-DDE	OP
1	129	168	45	85	124	2,4	0,3	12,8	0,93	60	n.n.	1488	n.n.
2	187	252	82	140	107	13,3	0,12	5,1	1,47	35	n.n.	1964	n.n.
3	153	197	107	125	104	5,1	n.n.	0,5	1,91	32	0,3	695	n.n.
4	126	203	125	86	154	n.n.	n.n.	1,3	2,57	56	0,54	1949	n.n.
5	119	152	51	118	114	1,8	0,3	4,2	1,2	41	n.n.	1376	n.n.
6	205	285	164	163	186	4,2	0,3	16,3	3,32	80	0,5	2251	n.n.
7	145	200	104	123	138	2,9	0,14	4,3	1,08	21	n.n.	1283	n.n.
8	143	176	98	100	100	6,9	0,4	5,5	1,69	53	0,24	2365	n.n.
9	188	232	118	93	196	15,2	n.n.	2,4	8,27	147	0,72	2908	n.n.
10	233	352	134	227	128	n.a.	0,18	3,8	1,5	49	0,17	2676	n.n.
11	251	328	108	133	194	2,6	3	80	13	293	0,56	4991	n.n.
12	111	135	49	59	65	3,5	2,17	94	6	199	0,66	2166	n.n.
13	123	167	79	87	125	6,3	1,5	19	4,97	58	0,35	1896	n.n.
14	192	270	125	132	210	2,3	1,63	64	4,45	149	0,34	4489	n.n.
15	153	235	144	135	165	1,3	0,46	18	1,31	58	1,36	988	n.n.
$\bar{\sigma}$	163,9	223,5	102,2	120,4	140,7	4,8	0,7	22,1	3,6	88,7	0,38	2232,3	n.n.
NG	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	10 - 100
S	43,2	64,1	49,1	40,2	42,1	4,2	0,97	30,8	3,4	75,9	0,3	1187,6	-

Den größten Anteil an der Gesamtbelastung hatte p,p'-DDE, ein DDT-Metabolit, mit 74,4 %. p,p'-DDE wurde in einer durchschnittlichen Konzentration von 2232,3 µg/kg Fett nachgewiesen. Die übrigen DDT Metabolite wurden in deutlich geringeren Mengen im Fettgewebe bestimmt. Die Konzentrationen nahmen in der Reihenfolge p,p'-DDT, p,p'-DDD, o,p'-DDT, o,p'-DDD und o,p'-DDE ab. Der prozentuale Anteil aller DDT Metabolite an der Gesamtbelastung des Fettgewebes durch die analytisch erfaßten endokrin wirksamen Verbindungen lag bei 78,2 %.

Die übrigen Anteile entfielen vorrangig auf die nichtcoplanaren polychlorierten Biphenyle PCB 153 mit 7,4 %, PCB 138 mit 5,5 % und PCB 180 mit 4,0 %. In allen Fettproben konnte auch das coplanare PCB 169 nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Konzentration dieser Verbindung lag mit 102,2 ng/kg Fett aber deutlich unter der seiner Isomere. Damit entsprach der prozentuale Anteil von PCB 169 an der Gesamtbelastung im Fettgewebe noch nicht einmal 0,01 %.

Neben den DDT Metaboliten und den PCB wurde im Fettgewebe β-HCH in einer durchschnittlichen Konzentration von 140,7 µg/kg Fett bestimmt. Das als Lindan bekannte γ-HCH konnte nicht in allen Proben nachgewiesen werden. Somit entfiel nur 0,16 % der Gesamtbelastung auf Lindan und 4,7 % auf β-HCH.

4-tert-Octylphenol wurde in keiner Probe nachgewiesen.

3.1.1.2. Serum

Im Serum der Normalgruppe konnte eindeutig in allen Proben p,p'-DDE, PCB 138, PCB 153, PCB 180 und β-HCH nachgewiesen werden (Tab. 2). Die Konzentrationen dieser Verbindungen lagen jedoch mehrere Zehnerpotenzen unter den Werten im Fettgewebe (Tab. 1).

Der Hauptteil der gesamten Belastung des Serums durch CKW entfiel mit 75,1 % wiederum auf p,p'-DDE. Diese Verbindung wurde in einer durchschnittlichen Konzentration von 10,4 µg/l im Serum der normofertilen Probandinnen bestimmt.

Tab. 2: CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol im Serum einer normofertilen Probandinnengruppe ($\mu\text{g} / \text{l}$, PCB 169 in ng / l , n.n.: nicht nachweisbar, n.a.: nicht auswertbar, NG: Nachweisgrenze, S: Standardabweichung).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β -HCH	Lindan	o,p`-DDD	p,p`-DDD	o,p`-DDT	p,p`-DDT	o,p`-DDE	p,p`-DDE	OP	Coumestrol
1	0,64	0,78	n.n.	0,42	0,6	n.n.	n.n.	0,1	n.n.	0,4	n.n.	6,1	n.n.	n.n.
2	0,8	1	n.n.	0,6	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,2	n.n.	12,2	n.n.	n.n.
3	0,6	0,8	n.n.	0,6	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,17	n.n.	3,6	n.n.	n.n.
4	0,8	1	n.n.	0,6	0,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,23	n.n.	9,4	n.n.	n.n.
5	0,7	0,8	n.n.	0,6	0,7	n.n.	n.n.	0,1	n.n.	0,72	n.n.	10,1	n.n.	n.n.
6	1,7	1,7	n.n.	0,9	1,2	1,1	n.n.	0,2	n.n.	0,8	n.n.	17,5	n.n.	n.n.
7	0,6	0,9	n.n.	0,5	0,6	n.n.	n.n.	0,2	n.n.	0,12	n.n.	6,1	n.n.	n.n.
8	1,3	1,3	n.n.	0,6	1,1	1,5	n.n.	0,1	n.n.	0,7	n.n.	10,1	n.n.	n.n.
9	0,7	0,8	n.n.	0,4	0,6	n.n.	n.n.	0,1	n.n.	0,4	n.n.	15,6	n.n.	n.n.
10	0,88	1,31	n.n.	0,8	0,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,24	n.n.	13,9	n.n.	n.n.
11	0,78	0,97	n.n.	0,45	0,71	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,7	n.n.	15,3	n.n.	n.n.
12	0,43	0,57	n.n.	0,28	0,28	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,68	n.n.	8	n.n.	n.a.
13	0,4	0,53	n.n.	0,34	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,87	n.n.	n.n.
14	0,71	1	n.n.	0,49	1,02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,56	n.n.	19,1	n.n.	n.n.
15	0,49	0,71	n.n.	0,39	0,51	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,21	n.n.	n.n.
\emptyset	0,77	0,94	n.n.	0,53	0,65	0,17	n.n.	n.n.	n.n.	0,39	n.n.	10,4	n.n.	n.n.
NG	0,1	0,21	1	0,21	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	10 - 150	0,2
SD	0,33	0,3	-	0,17	0,27	0,43	-	-	-	0,28	-	5	-	-

Die übrigen prozentualen Anteile an der Gesamtbelastung entfielen auf PCB 153 mit 6,8 %, PCB 138 mit 5,5 %, PCB 180 mit 3,8 % und auf β -HCH mit 4,7 %

Oberhalb der Nachweisgrenze konnte in der Mehrzahl der Serumproben p,p`-DDT bestimmt werden. Damit ging diese Verbindung mit 2,8 % in die Gesamtbelastung ein. In vereinzelt Proben und zudem nur nahe der Nachweisgrenze konnte p,p`-DDD bestimmt werden. In zwei Serumproben wurde Lindan in Konzentrationen gefunden, die deutlich oberhalb der Nachweisgrenze lagen.

In keiner Serumprobe der Normalgruppe wurde PCB 169, o,p`-DDD, o,p`-DDT, o,p`-DDE, 4-tert-Octylphenol oder Coumestrol nachgewiesen.

3.1.1.3. Myometrium

Im Muskelgewebe des Uterus, dem Myometrium, wurden deutlich geringere Konzentrationen an CKW als im Serum der Probandinnen gefunden (Tab. 2 und 3).

Oberhalb der Nachweisgrenzen konnten eindeutig in allen Myometriumproben p,p`-DDE und β -HCH bestimmt werden. Der größte Anteil der Gesamtbelastung entfiel auch in diesem Gewebe auf p,p`-DDE mit 78,9 %. β -HCH ging mit 8,4 % in die Gesamtbelastung ein.

Tab. 3: CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol im Myometrium einer normofertilen Probandinnengruppe ($\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht, PCB 169 in ng / kg Feuchtgewicht, n.n.: nicht nachweisbar, n.a.: nicht auswertbar, NG: Nachweisgrenze, S: Standardabweichung).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β -HCH	Lindan	o,p`- DDD	p,p`- DDD	o,p`- DDT	p,p`- DDT	o,p`- DDE	p,p`- DDE	OP	Coumestrol
1	0,17	0,17	n.n.	0,1	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,46	n.n.	n.n.
2	0,36	0,47	n.n.	0,26	0,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,55	n.n.	n.n.
3	0,12	0,14	n.n.	0,07	0,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,87	n.n.	n.n.
4	0,29	0,37	n.n.	0,18	0,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,37	n.n.	n.n.
5	0,24	n.a.	n.n.	0,19	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,16	n.n.	n.a.
6	0,27	0,48	n.n.	0,16	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,58	n.n.	n.a.
7	0,26	0,35	n.n.	0,18	0,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,19	n.n.	n.n.
8	0,17	0,23	n.n.	0,06	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,17	n.n.	n.n.
9	0,43	0,48	n.n.	0,21	0,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	10,05	n.n.	n.n.
10	0,6	1,1	n.n.	0,5	1,3	0,2 (0,2)	n.n.	n.n.	n.n. (0,3)	n.n. (0,3)	n.n.	10,4	n.n.	n.n.
11	0,41	0,55	n.n.	0,24	1,25	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	10,7	n.n.	n.a.
12	0,11	0,12	n.n.	0,1	0,22	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,37	n.n.	3,85	n.n.	n.n.
13	0,27	0,29	n.n.	0,17	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,46	n.n.	n.n.
14	0,4	0,6	n.n.	0,29	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,25	n.n.	10,9	n.n.	n.a.
15	0,3	0,3	n.n.	0,2	1	n.n.	n.n. (0,2)	n.n. (0,2)	n.n. (0,7)	n.n. (1)	n.n. (0,2)	2,4	n.n.	n.a.
\bar{x}	0,29	0,4	n.n.	0,19	0,58	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,47	n.n.	n.n.
NG	0,1	0,1	1 - 3	0,1	0,1	0,1 - 0,3	0,1	0,1	0,1 - 0,2	0,1 - 0,2	0,1	0,2	10 - 500	0,5 - 40
SD	0,13	0,25	-	0,11	0,4	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-

Neben p,p`-DDE und β -HCH konnten im Myometrium die nichtcoplanaren PCB nahe der Nachweisgrenzen bestimmt werden. PCB 153 ging somit zu 5,8 %, PCB 138 zu 4,2 % und PCB 180 zu 2,7 % in die Gesamtbelastung des Myometriums ein.

In vereinzelt Myometriumpuben wurden p,p`-DDT und Lindan ebenfalls in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenzen bestimmt.

Es konnte jedoch weder PCB 169, o,p`-DDD, p,p`-DDD, o,p`-DDT, o,p`-DDE, 4-tert-Octylphenol noch Coumestrol nachgewiesen werden.

3.1.1.4. Myomknoten

Myomknoten sind gutartige Wucherungen des Uterus mit estrogenabhängigem Wachstum. Die Belastung der Myomknoten mit CKW lag noch unter der des gesunden Muskelgewebes (Tab. 3 und 4). Die prozentuale Verteilung der in Myomknoten nachgewiesenen CKW entsprach in etwa der im Myometrium (siehe Kap. 3.1.1.3.).

p,p`-DDE hatte mit 79,5 % wiederum den größten Anteil an der Belastung von Myomknoten mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt. Die übrigen prozentualen Anteile entfielen auf β -HCH mit 8,8 %, auf PCB 153 mit 5,1 %, auf PCB 138 mit 4,0 % und auf PCB 180 mit

2,6 %. Die durchschnittlichen Konzentrationen der nichtcoplanaren PCB lagen im Myomknoten nur nahe der Nachweisgrenzen.

Tab. 4: CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol in Myomknoten einer normofertilen Probandinnengruppe ($\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht, PCB 169 in ng / kg Feuchtgewicht, n.n.: nicht nachweisbar, NG: Nachweisgrenze, S: Standardabweichung).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β -HCH	Lindan	o,p`-DDD	p,p`-DDD	o,p`-DDT	p,p`-DDT	o,p`-DDE	p,p`-DDE	OP	Coumestrol
1	0,22	0,3	n.n.	0,16	0,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,2	n.n.	n.n.
2	0,12	0,2	n.n.	0,13	0,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,3	n.n.	n.n.
3	0,14	0,18	n.n.	0,1	0,4	0,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,5	n.n.	n.n.
4	0,21	0,26	n.n.	0,16	0,7	0,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,5	n.n.	n.n.
5	0,21	0,24	n.n.	0,12	0,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,1	n.n.	2,7	n.n.	n.n.
6	0,21	0,26	n.n.	0,11	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,2	n.n.	6,6	n.n.	n.n.
7	0,19	0,26	1,5	0,1	0,6	0,1	n.n.	n.n.	n.n.	0,2	n.n.	3,8	n.n.	n.n.
8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,9	n.n.	n.n.
9	0,29	0,39	n.n.	0,22	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,8	n.n.	n.n.
\emptyset	0,18	0,23	n.n.	0,12	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,6	n.n.	n.n.
NG	0,1	0,1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	10	2
S	0,09	0,1	-	0,06	0,18	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-

In vereinzelt Myomknoten konnten Lindan und p,p`-DDT in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenzen analysiert werden. In einem Myomknoten wurde PCB 169 in einer Konzentration von 1,5 ng / kg Feuchtgewicht bestimmt.

In keinem der Myomknoten wurde o,p`-DDD, p,p`-DDD, o,p`-DDT, o,p`-DDE, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol nachgewiesen.

3.1.1.5. Endometrium

Es wurde einleitend ausgeführt, dass die zyklischen Veränderungen des Endometriums Resultate komplexer steroidabhängiger Regulationsmechanismen sind (siehe Kap. 1.2.1.). Eine Belastung des Endometriums mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt könnte zu Zyklusstörungen führen und somit die Fertilität der Frau negativ beeinflussen (Schäfer *et al.* 1995).

Im Endometrium der normofertilen Frauen konnten p,p`-DDE, β -HCH, PCB 138, PCB 153 und PCB 180 eindeutig nachgewiesen werden (Tab. 5). Die Belastung des Endometriums mit diesen Verbindungen lag eindeutig über der im Myometrium (Tab. 3 und 5). p,p`-DDE hatte auch im Endometrium mit 80,5 % den größten Anteil an der Gesamtbelastung. β -HCH ging mit 8,9 %, 47

PCB 153 mit 3,9 %, PCB 138 mit 3,6 % und PCB 180 mit 3,0 % in die Belastung des Endometriums mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt ein.

Tab. 5: CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol im Endometrium einer normofertilen Probandinnengruppe ($\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht, PCB 169 in ng / kg Feuchtgewicht, n.n.: nicht nachweisbar, n.a.: nicht auswertbar, NG: Nachweisgrenze, S: Standardabweichung).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β -HCH	Lindan	o,p`-DDD	p,p`-DDD	o,p`-DDT	p,p`-DDT	o,p`-DDE	p,p`-DDE	OP	Coumestrol
1	0,4	0,4	n.n.	0,3	1,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6,8	n.n.	n.n.
2	0,7	0,8	n.n.	0,5	1,1	0,5 (0,5)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	12,9	n.n.	n.n.
3	0,4	0,4	n.n.	0,4	0,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.	n.n.
4	0,6	0,7	n.n.	0,4	1,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	8	n.n.	n.n.
5	0,3	n.a.	n.n.	0,7	1,5	n.n.	n.n. (0,7)	n.n. (0,9)	n.n. (17)	n.n. (5)	n.n.	19,2	n.n.	n.n.
6	1,1	1	n.n.	0,6	0,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,8	n.n.	17,3	n.n.	n.n.
7	0,8	0,9	n.n.	0,6	3,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,6	n.n.	13,7	n.n.	n.n.
8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,6	n.n.	n.n.
9	0,4	0,6	n.n.	0,3	0,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	17,6	n.n.	n.n.
10	n.n.(10)	n.n.(10)	n.n.	n.n.(10)	n.n.(5)	n.n.(5)	n.n.(1)	n.n.(1)	n.n.	n.n.	n.n.(1)	17	n.n.	n.n.
11	0,72	1	n.n.	0,4	2,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	18	n.a.	n.n.
12	0,84	0,22	n.n.	0,49	0,67	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	19	n.a.	n.n.
13	0,48	0,67	n.n.	0,84	0,64	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5	n.a.	n.a.
14	1,1	1,2	n.n.	1,1	3,7	n.n.	n.n.(1)	n.n.(1)	n.n.	n.n.(3)	n.n.(1)	29	n.a.	n.a.
15	n.n.(20)	n.n.(20)	n.a.	n.n.(10)	n.n.(15)	n.n.(25)	n.n.(5)	n.n.(5)	n.n.(10)	n.n.(15)	n.n.(5)	11	n.a.	n.a.
\emptyset	0,6	0,66	n.n.	0,51	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	13,5	n.n.	n.n.
NG	0,2	0,2	2 - 10	0,2	0,5	0,5 - 2	0,1 - 0,3	0,5	0,5 - 2	1 - 2	0,1 - 0,3	0,2	30 - 500	2 - 40
S	0,32	0,29	-	0,23	1,1	-	-	-	-	-	-	7,1	-	-

In nur zwei Proben konnte p,p`-DDT eindeutig oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt werden. Lindan wurde nur in einer Endometriumprobe nahe der Nachweisgrenze analysiert.

In keiner Endometriumprobe wurde PCB 169, o,p`-DDD, p,p`-DDD, o,p`-DDT, o,p`-DDE, 4-tert-Octylphenol oder Coumestrol nachgewiesen.

Ein großes Problem innerhalb der Analytik der CKW und ganz besonders beim Nachweis von 4-tert-Octylphenol und Coumestrol im Endometrium, waren die zum Teil sehr geringen Probenmengen. Die Nachweisgrenzen der zu detektierenden Verbindungen verhielten sich umgekehrt proportional zu den entsprechenden Probenmengen. Das heißt, je geringer die Probenmengen, desto höher die Nachweisgrenzen. Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, wie weit diese auf Grund der so unterschiedlichen Probenmengen auseinander lagen und somit die Auswertung der Ergebnisse erheblich erschwerten. Für 4-tert-Octylphenol und Coumestrol lagen die Nachweisgrenzen weit über den zu erwartenden Belastungen in humanem Gewebe.

3.1.1.6. Synopsis

Aus den Untersuchungen der normofertilen Probandinnengruppe waren PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p'-DDE als die Verbindungen hervorgegangen, die sich eindeutig im Fett, Serum, Myometrium, Myomknoten und Endometrium nachweisen ließen (Tab. 1 - 5).

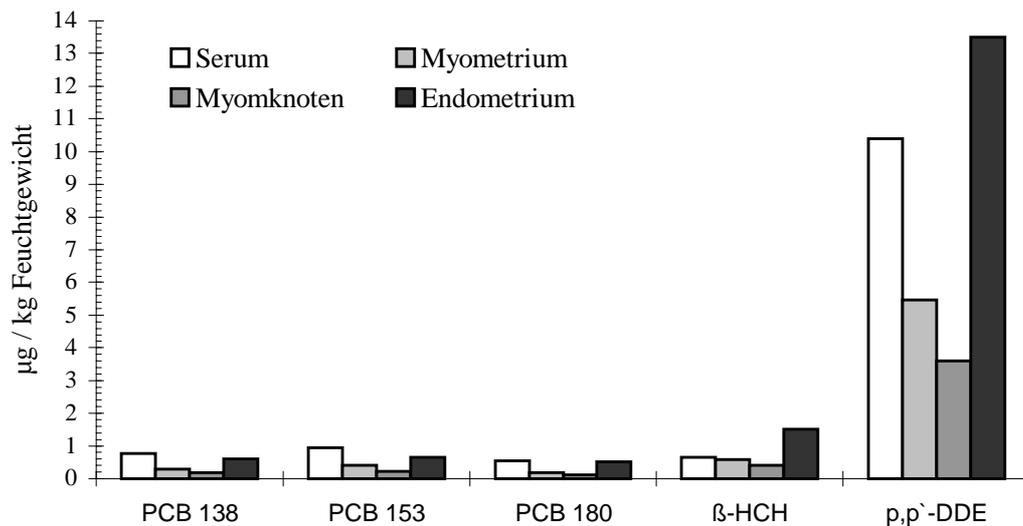


Abb. 12: Gegenüberstellung der Konzentrationen von PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p'-DDE im Serum, Myometrium, Myomknoten und Endometrium einer normofertilen Probandinnengruppe.

Die Darstellung der Konzentrationen der einzelnen CKW im Serum, Myometrium, Myomknoten und Endometrium in Abbildung 12 zeigt, dass die Konzentrationen der Verbindungen im Serum deutlich über denen im Myometrium und Myomknoten lagen. Im Myomknoten wurden durchgängig geringere Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB, β -HCH und p,p'-DDE gemessen als im Myometrium.

Bezieht man nun das Endometrium in die Betrachtungen mit ein, so zeigt sich, dass in der Uterusschleimhaut der Normalgruppe höhere Konzentrationen an p,p'-DDE und β -HCH gemessen wurden als im Serum, Myometrium und Myomknoten. Die Konzentrationen der nichtcoplanaren PCB im Endometrium lagen geringfügig unter denen im Serum, aber deutlich über denen im Myometrium und Myomknoten.

3.1.2. Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in Endometrium und Serum von Sterilitätspatientinnen

Die Gruppe der Sterilitätspatientinnen umfaßte 20 Frauen, die sich im Rahmen der Sterilitätsdiagnostik einer Strichkürretage unterziehen mußten (siehe Kap. 2.2.1.2.). Zur Einschätzung der Belastung dieser Probandinnen mit CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol standen Serum und Endometrium zur Verfügung (siehe Kap. 2.2.2.).

3.1.2.1. Serum

In allen Serumproben konnten eindeutig oberhalb der Nachweisgrenzen p,p'-DDE, β -HCH, PCB 138, PCB 153 und PCB 180 bestimmt werden (Tab. 6). Die Absolutwerte lagen für alle bestimmten CKW unter den entsprechenden Werten im Serum der normofertilen Frauen (Tab. 2 und 6).

Tab. 6: CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol im Serum einer sterilen Patientinnengruppe ($\mu\text{g} / \text{l}$, PCB 169 in ng / l , n.n.: nicht nachweisbar, n.a.: nicht auswertbar, NG: Nachweisgrenze, S: Standardabweichung).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β -HCH	Lindan	o,p'-DDD	p,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT	o,p'-DDE	p,p'-DDE	OP	Coumestrol
1	0,52	0,75	n.n.	0,38	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,17	n.n.	5,63	n.n.	n.n.
2	0,31	0,4	n.n.	0,21	0,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,15	n.n.	3,31	n.n.	n.n.
3	0,39	0,55	n.n.	0,27	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,22	n.n.	5,09	n.n.	n.n.
4	0,86	1,19	n.n.	0,65	0,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,48	n.n.	9,3	n.n.	n.n.
5	0,41	0,58	n.n.	0,32	0,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,15	n.n.	3,03	n.n.	n.n.
6	0,24	0,38	n.n.	0,2	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,15	n.n.	3,06	n.n.	n.n.
7	1,64	1,72	n.n.	0,9	0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,33	n.n.	6	n.n.	n.n.
8	0,17	0,29	n.n.	0,17	0,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,12	n.n.	1,66	n.n.	n.n.
9	0,58	0,85	n.n.	0,35	0,35	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,18	n.n.	6,73	n.n.	n.n.
10	0,5	0,69	n.n.	0,38	0,36	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,14	n.n.	n.n.
11	0,21	0,31	n.n.	0,16	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,17	n.n.	n.n.
12	0,43	0,66	n.n.	0,44	0,27	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,5	n.n.	n.n.
13	0,18	0,24	n.n.	0,08	0,16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,35	n.n.	n.n.
14	1,17	2	n.n.	1,19	0,41	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,21	n.n.	n.a.
15	0,66	0,88	n.n.	0,42	0,75	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,13	n.n.	6,41	n.n.	n.a.
16	0,25	0,39	n.n.	0,2	0,22	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,16	n.n.	2,13	n.n.	n.n.
17	0,23	0,24	n.n.	0,06	2,56	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,24	n.n.	7,35	n.n.	n.n.
18	0,39	0,34	n.n.	0,12	0,15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,1	n.n.	2,68	n.n.	n.n.
19	0,31	0,45	n.n.	0,22	0,23	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,72	n.n.	n.n.
20	0,37	0,51	n.n.	0,2	0,16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,13	n.n.	3,77	n.n.	n.n.
\bar{x}	0,49	0,67	n.n.	0,35	0,42	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,13	n.n.	4,1	n.n.	n.n.
NG	0,1	0,1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	20 - 50	0,2
SD	0,36	0,47	-	0,28	0,52	-	-	-	-	0,12	-	2,1	-	-

p,p'-DDE stellte mit 66,5 % im Serum der sterilen Frauen, wie in dem der normofertilen Frauen, den Hauptanteil der Belastung mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt. Die

übrigen prozentualen Anteile entfielen mit 10,9 % auf PCB 153, mit 7,9 % auf PCB 138, mit 5,7 % auf PCB 180 und mit 6,8 % auf β -HCH.

Gegenüber der Normalgruppe war der prozentuale Anteil von p,p'-DDE an der Gesamtbelastung des Serums in der Gruppe der Sterilitätspatientinnen geringer (siehe Kap. 3.1.1.2.). Die Anteile der PCB und von β -HCH an der Gesamtbelastung des Serums mit CKW lagen in der Gruppe der Sterilitätspatientinnen deutlich über denen in der Normalgruppe.

Nicht in allen Serumproben und nahe der Nachweisgrenze konnte p,p'-DDT mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,13 $\mu\text{g} / \text{l}$ bestimmt werden. Damit war diese Verbindung zu 2,1 % an der Gesamtbelastung des Serums beteiligt.

In keiner der Serumproben konnten PCB 169, Lindan, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, o,p'-DDE, 4-tert-Octylphenol oder Coumestrol nachgewiesen werden.

3.1.2.2. Endometrium

Der Nachweis von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol im Endometrium der Sterilitätspatientinnen sowie die Auswertung der Ergebnisse gestalteten sich als äußerst schwierig.

Der Grund dafür waren die sehr geringen Probenmengen, die mittels Strickkürretage entnommen werden konnten. Die geringen Probenmengen führten, wie im Kapitel 3.1.1.5. bereits erläutert, zu so hohen Nachweisgrenzen, dass diese weit über den zu erwartenden Belastungsmengen im Endometrium lagen.

Nur die Gewebemenge einer Endometriumprobe reichte aus, um PCB 138 mit 2,2 $\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht, PCB 153 mit 2,2 $\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht und PCB 180 mit 0,9 $\mu\text{g} / \text{kg}$ Feuchtgewicht eindeutig zu detektieren. Damit waren die Konzentrationen von PCB 138 und PCB 153 im Endometrium dieser sterilen Probandin in etwa dreimal so hoch, wie die durchschnittlichen Konzentrationen im Endometrium der normofertilen Frauen (Tab. 5). Im Serum derselben Probandin wurden Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB gefunden, die über den durchschnittlichen Konzentrationen im Serum der sterilen und normofertilen Probandinnenauswahl lagen (Tab. 2 und Patientin 4 in Tab. 6). Der Fragebogen dieser Probandin lieferte keinen Hinweis für Ursachen der erhöhten Belastung. So fiel diese Frau keineswegs dahingehend auf, dass sie beruflich oder privat gegenüber PCB exponiert sein könnte. Auch verzehrte diese Frau nur selten Fisch. Ein hoher Fischverzehr zählt zu den häufigsten Expositionsursachen des Menschen gegenüber PCB.

In 12 Endometrien der sterilen Frauen gelang es trotz geringster Probenmengen p,p`-DDE eindeutig nachzuweisen. Die durchschnittliche Konzentration an p,p`-DDE in diesen Endometrien war 5,2 µg / kg Feuchtgewicht.

Keine der übrigen Verbindungen konnte auf Grund der geringen Probenmengen in den einzelnen Endometriumproben nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Endometrien der Patientinnen 13 – 20 der Gruppe der Sterilitätspatientinnen (Tab. 6) zu einem Endometriumpool zur Bestimmung von CKW, von 4-tert-Octylphenol und von Coumestrol vereinigt. Um eine ausreichende Gewebemenge von 0,5 g zu erhalten, war es notwendig zusätzlich zwei Gewebeproben von sterilen Frauen einzubeziehen, deren Serumbelastungen nicht aufgenommen werden konnte.

Tab. 7: CKW, 4-tert-Octylphenol und Coumestrol im Endometriumpool einer sterilen Probandinnengruppe (µg / kg Feuchtgewicht, PCB 169 in ng / kg Feuchtgewicht, n.n.: nicht nachweisbar, NG: Nachweisgrenze).

Pat.	PCB 138	PCB 153	PCB 169	PCB 180	β-HCH	Lindan	o,p`-DDD	p,p`-DDD	o,p`-DDT	p,p`-DDT	o,p`-DDE	p,p`-DDE	OP	Coumestrol
Pool	0,6	0,76	n.n.	0,46	0,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,3	4,9	n.n.	n.n.
NG	0,2	0,2	1	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	10	5

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. p,p`-DDE wurde im Endometriumpool in einer Konzentration von 4,9 µg / kg Feuchtgewicht bestimmt. Damit lag dieser Wert nur geringfügig unter der durchschnittlichen Konzentration der 12 Endometrien der sterilen Probandinnen (siehe oben und Tab. 7). Im Endometriumpool der sterilen Probandinnen entfiel der größte Anteil der Belastung mit CKW, wie auch schon in den übrigen Geweben, auf p,p`-DDE mit 65,2 %. Die übrigen Anteile stellten PCB 138 mit 8,0 %, PCB 153 mit 10,1 %, PCB 180 mit 6,1 %, β-HCH mit 6,6 % und o,p`-DDE mit 4,0 %.

Die prozentualen Anteile von p,p`-DDE und β-HCH an der Gesamtbelastung des Endometriumpools mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt waren im Vergleich zu denen im Endometrium normofertiler Frauen deutlich geringer (siehe Kap. 3.1.1.5.). Einen höheren prozentualen Anteil an der Gesamtbelastung des Endometriums hatten die nichtcoplanaren PCB (siehe Kap. 3.1.1.5.).

Der Endometriumpool war die einzige Probe neben dem Fettgewebe, in der o,p`-DDE nahe der Nachweisgrenze bestimmt werden konnte.

Im Endometriumpool wurde weder PCB 169, Lindan, o,p`-DDD, p,p`-DDD, o,p`-DDT, p,p`-DDT, 4-tert-Octylphenol noch Coumestrol nachgewiesen.

3.1.2.3. Synopsis

Aus den Untersuchungen zur Belastung steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt gingen PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p`-DDE als die Verbindungen hervor, die eindeutig im Serum und Endometriumpool nachgewiesen werden konnten (Tab. 6 und 7).

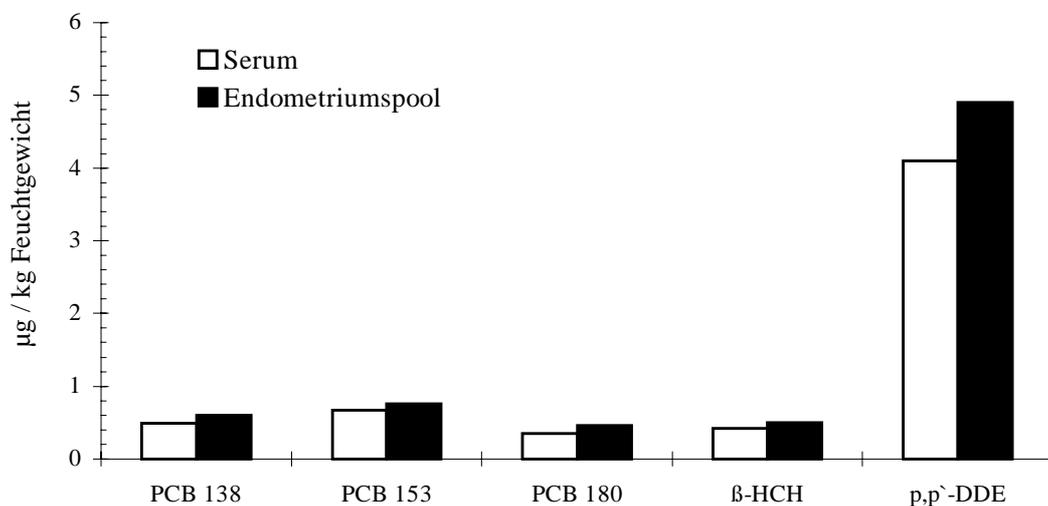


Abb. 13: Gegenüberstellung der Konzentrationen von PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p`-DDE im Serum und Endometriumpool einer sterilen Probandinnengruppe.

Die Konzentrationen aller in Abbildung 13 dargestellten CKW im Endometriumpool lagen über denen im Serum. In der Normalgruppe waren die Konzentrationen der nichtcoplanaren PCB im Endometrium geringer, als die im Serum (Abb. 12). Dagegen zeichnet sich in der Gruppe der Sterilitätspatientinnen eine höhere Konzentration an nichtcoplanaren PCB im Endometriumpool gegenüber dem Serum ab (Abb. 13). Die Anreicherung von β -HCH und p,p`-DDE im Endometrium gegenüber dem Serum in der normofertilen Probandinnengruppe war jedoch deutlich stärker als die bei sterilen Frauen (Abb. 12 und 13).

3.1.3. Direkter Vergleich der Belastung normofertiler und steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt

Um eine Aussage über einen möglichen Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität von Frauen treffen zu können, wurde die Belastung normofertiler und steriler Probandinnen untersucht.

Für den direkten Vergleich der Konzentrationen von ökologisch relevanten Wirkstoffen beider Probandinnengruppen standen Serum und Endometrium zu Verfügung, wobei die Werte des Endometriums der Sterilitätspatientinnen durch die Poolbestimmungen repräsentiert werden (siehe Kap. 3.1.1. und Kap. 3.1.2.).

3.1.3.1. Serum

Im Serum der normofertilen und der sterilen Probandinnen konnte im überwiegenden Teil der Proben PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH, p,p'-DDT und p,p'-DDE nachgewiesen werden (Tab. 2 und 6).

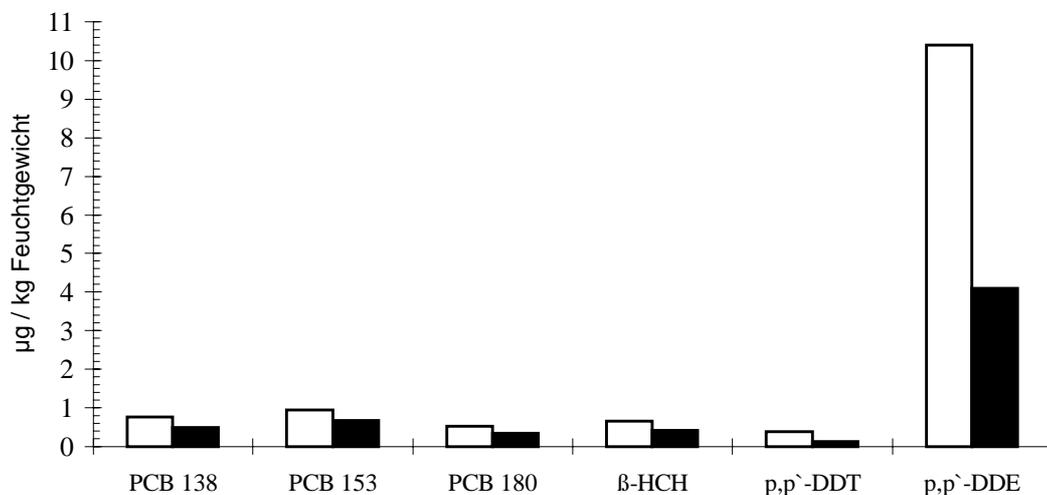


Abb. 14: PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH, Lindan, p,p'-DDT und p,p'-DDE im Serum einer normofertilen (□) und einer sterilen (■) Probandinnengruppe.

Abbildung 14 zeigt, dass die Konzentrationen an CKW in den Seren steriler Frauen geringer waren als in denen normofertiler Frauen. Dabei lagen die Werte der PCB und die von β -HCH im Serum der Gruppe der Sterilitätspatientinnen in etwa um den Faktor 1,5 unter denen der

Normalgruppe. Die Belastungsunterschiede beider Gruppen waren für p,p`-DDT und p,p`-DDE deutlich höher. Hier lagen die Werte im Serum der sterilen Probandinnen um das 2-3 fache niedriger, als in den Seren der normofertilen Probandinnen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit die Belastung der Seren steriler Frauen eindeutig unter der normofertiler Frauen lag. Die Unterschiede in der Belastung beider Gruppen waren für die nichtcoplanaren PCB und β -HCH geringer einzuschätzen als für p,p`-DDT und p,p`-DDE.

3.1.3.2. Endometrium

Im Endometrium beider Gruppen waren PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p`-DDE eindeutig nachweisbar (Tab. 5 und 7).

Im Endometrium zeigt sich gegenüber dem Serum ein überraschend anderes Bild in der Belastung normofertiler und steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt (Abb. 15).

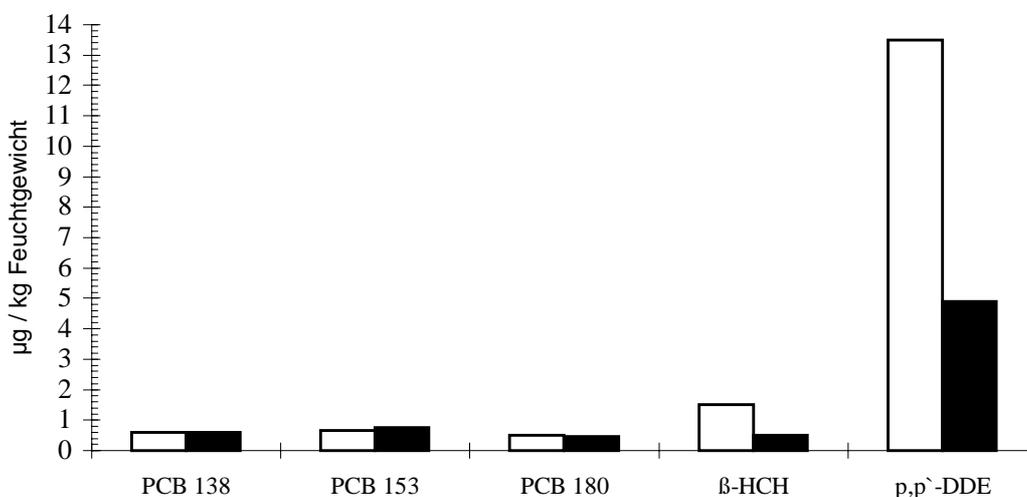


Abb. 15: PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p`-DDE im Endometrium einer normofertilen (□) und einer sterilen (■) Probandinnengruppe.

Entsprechend der Situation im Serum lagen die Konzentrationen von β -HCH und p,p`-DDE im Endometriumpool der sterilen Probandinnen unter denen der normofertilen Frauen im selben

Gewebe. Die Unterschiede in der Belastung beider Gruppen hinsichtlich β -HCH und p,p'-DDE entsprachen denen im Serum (siehe Kap. 3.1.3.1.).

Dagegen wurden die nichtcoplanaren PCB, PCB 138 und PCB 153, im Endometriumpool der sterilen Frauen und im Endometrium der normofertilen Probandinnen in den selben Konzentrationen nachgewiesen. Der Wert für PCB 153 im Endometriumpool der sterilen Patientinnen lag sogar leicht über den durchschnittlichen Konzentrationen im Endometrium der Normalgruppe.

3.1.4. Hormonelle Parameter und endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in Serum und uterinen Geweben

Für die Beurteilung der Belastung humaner Gewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt, als mögliche Ursache für weibliche Sterilität, sollten die nachgewiesenen Konzentrationen denen endogener Hormone und Hormonbindungsstellen gegenübergestellt werden.

Für eine solche Gegenüberstellung wurden die Konzentrationen der endokrin wirksamen Verbindungen, der Hormone und der Hormonbindungsstellen aller untersuchter Seren und uterinen Gewebe zusammengefaßt, ohne diese in eine normofertile und sterile Probandinnengruppe zu unterteilen.

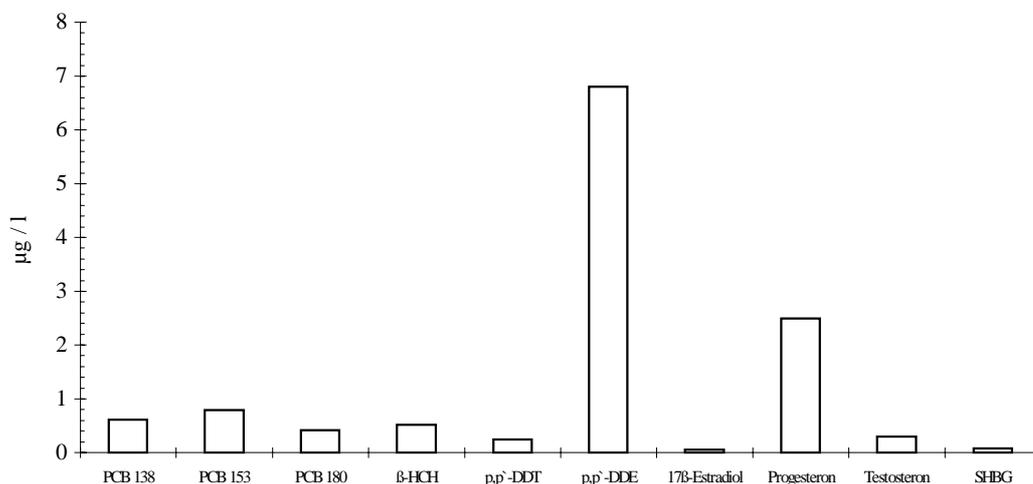


Abb. 16: Durchschnittliche Konzentrationen an CKW, 17 β -Estradiol, Progesteron, Testosteron und SHBG in humanem Serum.

In der vorliegenden Arbeit wurden die CKW im Serum in Konzentrationen bestimmt, die eindeutig über denen von 17 β -Estradiol und SHBG lagen (Abb. 16).

Der Testosteronspiegel lag zwischen den durchschnittlichen Konzentrationen von p,p`-DDT und β -HCH.

Progesteron wurde in einer Konzentration bestimmt, die eindeutig unter der Belastung des Serums mit p,p`-DDE lag. Der Progesteronspiegel war jedoch höher als die Serumbelastung mit nichtcoplanaren PCB, β -HCH und p,p`-DDT.

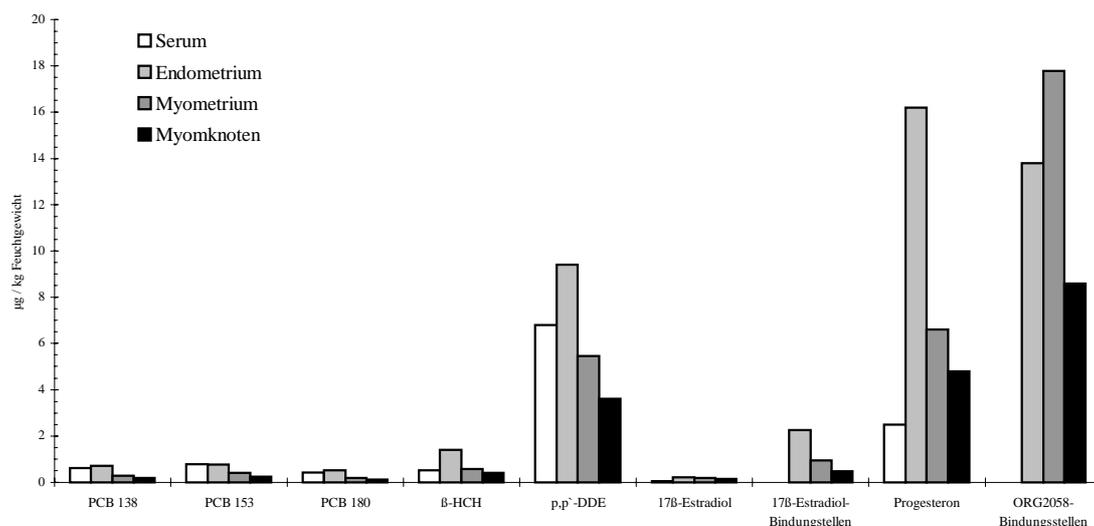


Abb. 17: Durchschnittliche Konzentrationen von CKW, 17 β -Estradiol, Progesteron, 17 β -Estradiol-Bindungsstellen und ORG2058-Bindungsstellen in humanen uterinen Geweben und Serum bezogen auf das Feuchtgewicht der Gewebeprobe.

Wie im Serum wurden auch in den uterinen Geweben Belastungen mit CKW gemessen, die eindeutig über den Konzentrationen von 17 β -Estradiol lagen (Abb. 17). Dabei konnte in den uterinen Geweben ein deutlicher Überschuß an 17 β -Estradiol-Bindungsstellen gegenüber 17 β -Estradiol bestimmt werden. Die durchschnittlichen Konzentrationen der Estrogenrezeptor-Bindungsstellen lagen über der Belastung uteriner Gewebe mit β -HCH, aber eindeutig unter der mit p,p`-DDE.

Entgegen den Ergebnissen im Serum, wurde Progesteron in den uterinen Geweben in Konzentrationen bestimmt, die höher waren als die Belastung mit CKW. Ein Überschuß an Progesteronrezeptor-Bindungsstellen gegenüber Progesteron konnte nur im Myometrium und in den Myomknoten bestimmt werden. Im Endometrium lag Progesteron gegenüber den

Progesteronrezeptor-Bindungsstellen im Überschuß vor. Die Konzentrationen der Progesteronrezeptor-Bindungsstellen in uterinen Geweben lagen über der Belastung mit CKW.

3.2. Kompetitionsuntersuchungen

3.2.1. Kompetitive Hemmung der Steroidbindung am Estrogen- und Gestagenrezeptor durch endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt

3.2.1.1. In-vitro Tiermodell

Zur Einschätzung der reproduktionstoxischen Potenz von CKW (PCB 153, PCB 169, o,p`-DDT, p,p`-DDT, o,p`-DDE, p,p`-DDE, β -HCH, γ -HCH), von 4-tert-Octylphenol und von Phytoestrogenen (Genistein und Coumestrol) wurde ihre hemmende Wirkung auf die Bindung von Steroidhormonen an den Steroidrezeptoren untersucht. Alle oben aufgeführten Substanzen wurden zunächst unter Verwendung einer lyophilisierten zytosolischen Rezeptorfraction aus Kalbsuteri, im in-vitro Tiermodell getestet (siehe Kap. 2.3.3.).

Der Einsatz von Kalbsuteri brachte erhebliche Vorteile mit sich. Zum einen stand ausreichend Material zur Herstellung eines homogenen Ausgangspräparates zur Verfügung und zum anderen war das Gewebe reich an Estrogen- und Progesteronrezeptoren mit hoher Spezifität. Durch die präparierte homogene Fraction war es möglich, eine Vielzahl von Testverbindungen unter einheitlichen Bedingungen zu untersuchen. Daraus resultierten Ergebnisse mit sehr guter Reproduzierbarkeit.

3.2.1.1.1. Estrogenrezeptor

Als Inhibitoren der Steroidbindung an den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri erwiesen sich Coumestrol, Genistein, o,p`-DDE und 4-tert-Octylphenol (Abb. 18). Die konzentrationsabhängige Zunahme der inhibitorischen Wirkung ließ sich in klassischen Hemmungskurven darstellen.

Als Vergleichskurve wurde die Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden durch unmarkiertes 17 β -Estradiol bestimmt. Aus der Hemmungskurve ließ sich ein IC₅₀ von 3,2 nM ermitteln.

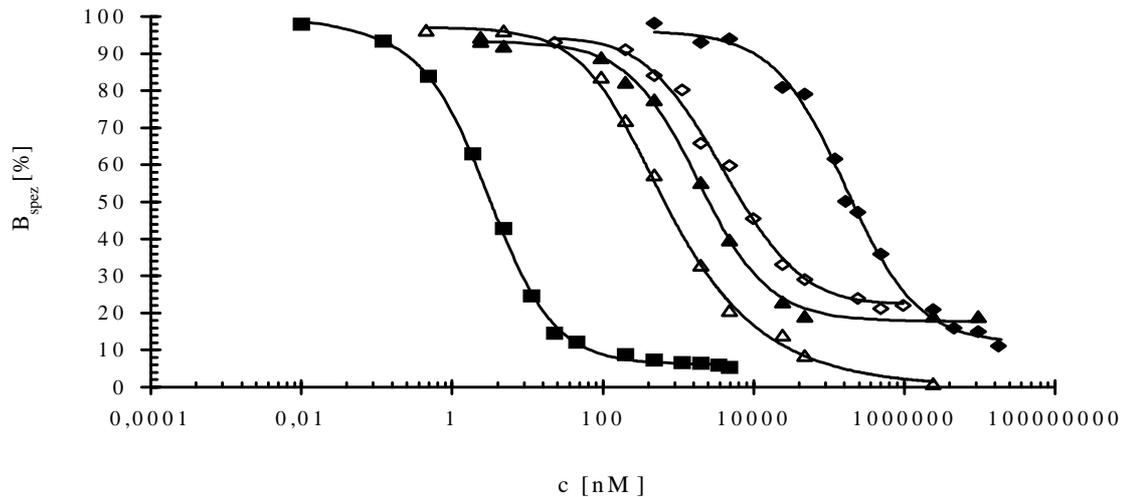


Abb. 18: Hemmung der Bindung von [³H]-17β-Estradiol zum Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri durch 17β-Estradiol (■), Coumestrol (△), Genistein (▲), o,p`-DDE (◇) und 4-tert-Octylphenol (◆).

Als stärkster Inhibitor der Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung erwies sich Coumestrol mit einem IC₅₀ von 0,66 μM. Genistein war nach Coumestrol die wirksamste Verbindung, gefolgt von o,p`-DDE und 4-tert-Octylphenol. Die Werte der Inhibitorkonstanten der Kompetitoren sind in Tabelle 8 aufgeführt. o,p`-DDE, ein Metabolit vom DDT, war nicht in der Lage, die Steroidbindung am Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri um 80 % zu hemmen.

Tab. 8: Inhibitorkonstanten (IC₂₀, IC₅₀ und IC₈₀) von 17β-Estradiol, Coumestrol, Genistein, o,p`-DDE und 4-tert-Octylphenol am Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri.

	IC ₂₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]	IC ₈₀ [μM]
17β-Estradiol	0,00063	0,0032	0,017
Coumestrol	0,1	0,66	6,82
Genistein	0,35	2,5	98,2
o,p`-DDE	0,78	6,8	-
4-tert-Octylphenol	34	200	1880

Die übrigen getesteten CKW konnten die Steroidbindung am Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri nur geringfügig beeinflussen. Nach anfänglicher Hemmung ließ sich die inhibitorische Wirksamkeit nur noch geringfügig steigern. In Abb. 19 sind die Unterschiede der inhibitorischen Aktivität bei einem Einsatz der einzelnen Verbindungen entsprechend der IC₅₀-Konzentration

von Coumestrol und dem etwa 300-fachen Einsatz (IC_{50} von 4-tert-Octylphenol) im Testansatz dargestellt.

Bemerkenswert ist β -HCH, dass bei 0,66 μ Molarem Einsatz ein stärkerer Inhibitor als Genistein, o,p'-DDE und 4-tert-Octylphenol war, ohne bei weiterer Konzentrationssteigerung, eine 50 % ige Hemmung herbeiführen zu können.

Die polychlorierten Biphenyle PCB 153 und PCB 169 hatten keinen Einfluß auf die Bindung von 17 β -Estradiol zum Estrogenrezeptor.

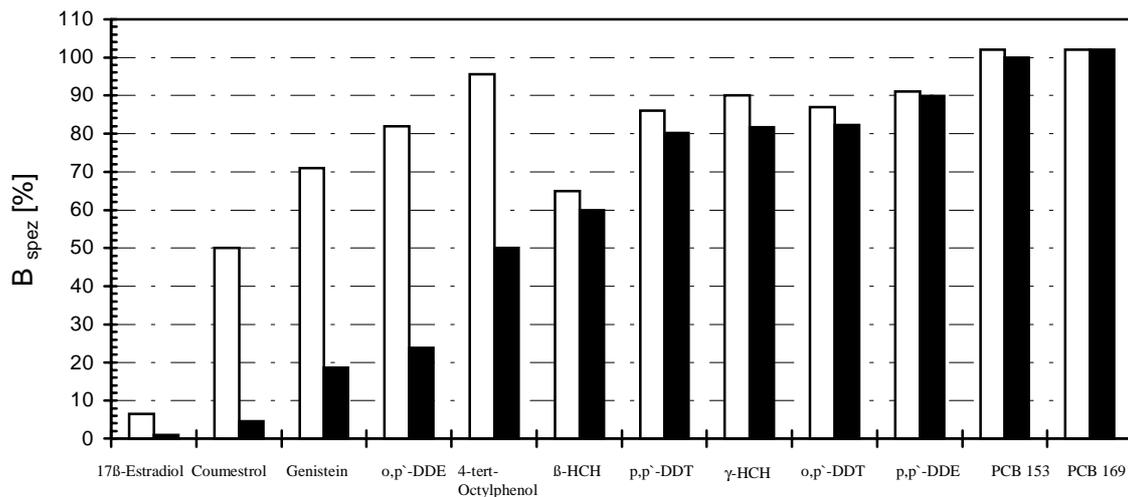


Abb. 19: Hemmung der Bindung von [³H]-17 β -Estradiol am Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri durch 17 β -Estradiol, Coumestrol, Genistein, 4-tert-Octylphenol, β -HCH, γ -HCH, o,p'-DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDE, p,p'-DDE, PCB 153 und PCB 169 bei einer Konzentration entsprechend dem IC_{50} von Coumestrol (\square 0,66 μ M) und dem IC_{50} von 4-tert-Octylphenol (\blacksquare 200 μ M).

3.2.1.1.2. Gestagenrezeptor

Als einzige Verbindung der untersuchten Substanzen erwies sich 4-tert-Octylphenol als Inhibitor der Steroid-Progesteronrezeptor-Bindung aus Kalbsuteri (Abb. 20). Die inhibitorische Wirkung von 4-tert-Octylphenol ($IC_{50} = 280 \mu$ M) lag deutlich unter der des natürlichen Liganden Progesteron ($IC_{50} = 46 \text{ nM}$) und der des synthetischen Liganden ORG2058 ($IC_{50} = 8,3 \text{ nM}$).

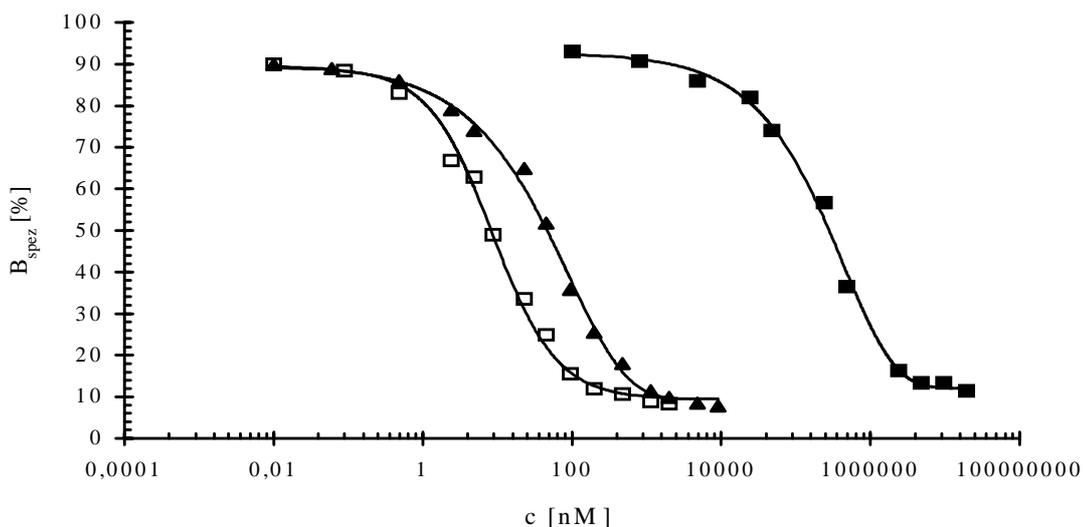


Abb. 20: Hemmung der Bindung von [³H]-ORG2058 zum Progesteronrezeptor aus Kalbsuteri durch ORG2058 (□), Progesteron (▲) und 4-tert-Octylphenol (■).

4-tert-Octylphenol war somit die einzige Substanz von allen untersuchten Verbindungen, die sowohl die Bindung der Radioliganden zum Estrogen- als auch die zum Gestagenrezeptor gemäß einer Hemmungskurve inhibieren konnte (Abb. 18 und 20). Vergleicht man die Inhibitorkonstanten von 4-tert-Octylphenol, die in den Kompetitionsansätzen am Estrogen- und Gestagenrezeptor aus Kalbsuteri ermittelt wurden, so weichen diese nur geringfügig voneinander ab (Tab. 8 und 9).

Tab. 9: Inhibitorkonstanten (IC₂₀, IC₅₀ und IC₈₀) von ORG2058, Progesteron und 4-tert-Octylphenol am Progesteronrezeptor aus Kalbsuteri.

	IC ₂₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]	IC ₈₀ [μM]
ORG2058	0,0011	0,0083	0,055
Progesteron	0,00242	0,046	0,33
4-tert-Octylphenol	26,7	280	1670

Die Chlorierten Kohlenwasserstoffe und die Phytoestrogene hatten nur einen geringen Einfluß auf die Steroid-Progesteronrezeptor-Bindung. Mit steigender Konzentration im Kompetitionsansatz über einen großen Konzentrationsbereich konnten die CKW und

Phytoestrogene nur eine geringe Abnahme der Ligand-Progesteronrezeptor-Bindung herbeiführen (Abb. 21).

Auch hier war die relativ starke Hemmung der Steroid-Rezeptor-Interaktion durch β -HCH bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen (IC_{50} von Progesteron) bemerkenswert. β -HCH war bei dieser Konzentration ein stärkerer Inhibitor als 4-tert-Octylphenol. Auch o,p`-DDE, p,p`-DDT, γ -HCH, p,p`-DDE, o,p`-DDT und Genistein zeigten hier vergleichbare Effekte.

PCB 169, eine Verbindung aus der Gruppe der coplanaren PCB, hatte keinen Einfluß auf die Bindung von ORG2058 zum Gestagenrezeptor.

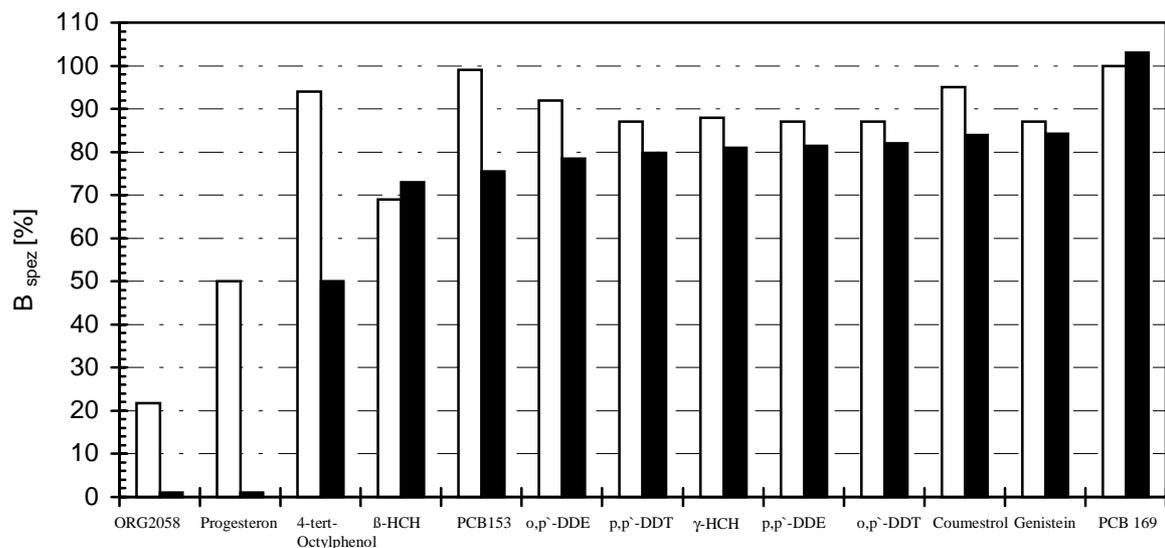


Abb. 21: Hemmung der Bindung von [3 H]-ORG2058 am Progesteronrezeptor aus Kalbsuteri durch ORG2058, Progesteron, Coumestrol, Genistein, 4-tert-Octylphenol, β -HCH, γ -HCH, o,p`-DDT, p,p`-DDT, o,p`-DDE, p,p`-DDE, PCB 153 und PCB 169 bei einer Konzentration entsprechend dem IC_{50} von Progesteron (\square 46 nM) und 4-tert-Octylphenol (\blacksquare 280 μ M).

3.2.1.2. Humane uterine Gewebe

Im Anschluß an die Untersuchungen an den Steroidrezeptoren aus Kalbsuteri wurden Wettbewerbsversuche an den Steroidrezeptoren aus humanen uterinen Geweben durchgeführt.

Als Kompetitoren wurden Verbindungen getestet, die aus den Versuchen im in-vitro Tiermodell als Inhibitoren der Rezeptorbindung hervorgegangen waren.

Die Inhibitorkonstanten, die im in-vitro Tiermodell ermittelt wurden, sollten mit denen in humanen Geweben ermittelten verglichen werden. Daraus sollten Rückschlüsse in Hinblick auf

die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Wettbewerbsversuchen im in-vitro Tiermodell auf humanes uterines Gewebe gezogen werden.

Die Wettbewerbsversuche wurden an den zytosolischen Rezeptorfractionen aus humanem Endometrium und Myometrium durchgeföhrt (siehe Kap. 2.2.5.1.). Die Untersuchungen am Progesteronrezeptor erfolgten zusätzlich an den zytosolischen Rezeptorfractionen von Myomknoten, da dort ebenfalls eine ausreichende Menge an Gestagenrezeptoren bestimmt werden konnte (Abb. 17).

3.2.1.2.1. Estrogenrezeptor

Die hemmende Wirkung von Coumestrol, Genistein und 4-tert-Octylphenol konnte an den Estrogenrezeptoren aus humanem Endometrium (Abb. 22) und Myometrium bestätigt werden.

Dagegen war die inhibitorische Wirkung von o,p`-DDE auf die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung in humanen Geweben deutlich geringer als an den Rezeptoren aus Kalbsuteri (Abb. 18 und 22). o,p`-DDE erwies sich an den Rezeptoren aus humanen uterinen Geweben als so schwacher Inhibitor, dass eine Hemmung der Steroid-Rezeptor-Bindung um 50 % nicht erreicht werden konnte. An den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri hatte die inhibitorische Wirkung dieser Verbindung auf die Steroid-Rezeptor-Bindung noch über der von 4-tert-Octylphenol gelegen (Abb. 18).

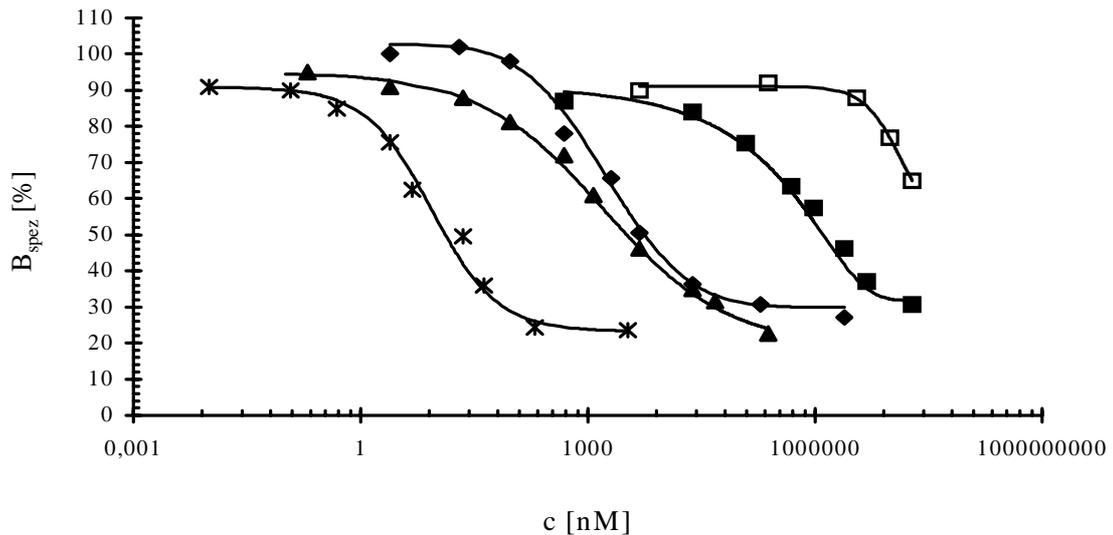


Abb. 22: Hemmung der Bindung von [³H]-17β-Estradiol zum Estrogenrezeptor aus humanem Endometrium durch 17β-Estradiol (▲), Coumestrol (✱), Genistein (◆), o,p`-DDE (□) und 4-tert-Octylphenol (■).

Um 50 % der Radioligandenbindung am Estrogenrezeptor in humanem Endometrium und Myometrium zu hemmen, waren höhere Konzentrationen an 17β-Estradiol, Coumestrol, Genistein und 4-tert-Octylphenol notwendig als an den selben Rezeptoren aus Kalbsuteri (Tab. 10, Abb. 18 und 22). Eine Ausnahme bildete 4-tert-Octylphenol in humanem Myometrium. Hier waren deutlich geringere Konzentrationen dieser Verbindung erforderlich, um den IC₅₀ an den Estrogenrezeptoren zu erreichen als in Kalbsuteri und Endometrium.

Die Bindungsaffinität der Radioliganden an den Estrogenrezeptoren in humanem Endometrium und humanem Myometrium war stärker als die in Kalbsuteri.

Tab. 10: Dissoziationskonstanten und IC₅₀ von 17β-Estradiol, Coumestrol, Genistein, o,p`-DDE und 4-tert-Octylphenol an den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri, humanem Endometrium und humanem Myometrium (n.e.: nicht erreicht; n.d.: nicht durchgeführt).

IC ₅₀ [μM]	Kalbsuteri	Endometrium	Myometrium
17β-Estradiol	0,0032	0,013	0,0062
Coumestrol	0,66	3,2	11
Genistein	2,5	5,8	n.d.
o,p`-DDE	6,8	n.e.	n.d.
4-tert-Octylphenol	200	1263,6	21,7
K _D [nM]	0,53	0,23	0,19

3.2.1.2.2. Gestagenrezeptor

An den Gestagenrezeptoren aus humanem Endometrium, Myometrium und Myomknoten konnte die inhibitorische Wirkung von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Rezeptor-Bindung, die im in-vitro Tiermodell ermittelt wurde, bestätigt werden (Abb. 23 und Tab. 11). Die inhibitorische Wirkung des AP lag wie im in-vitro Tiermodell in allen humanen uterinen Geweben deutlich unter der des natürlichen und des synthetischen Liganden.

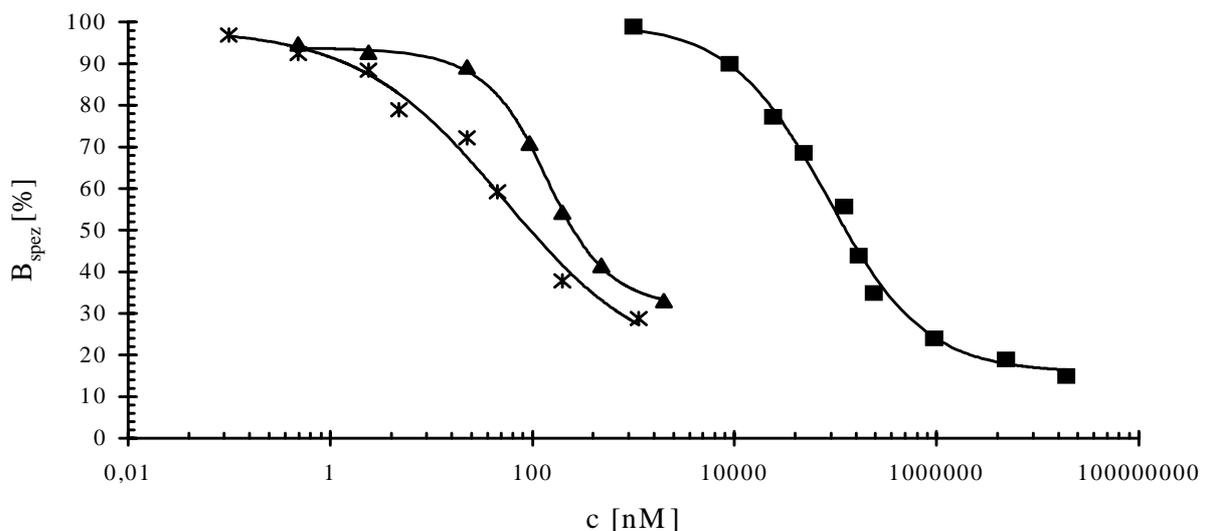


Abb. 23: Hemmung der Bindung von [3 H]-ORG2058 zum Progesteronrezeptor aus humanem Endometrium durch ORG2058 (★), Progesteron (▲) und 4-tert-Octylphenol (■).

Um 50 % der Steroidbindung am Progesteronrezeptor in humanen uterinen Geweben zu inhibieren, waren geringere Konzentrationen an 4-tert-Octylphenol erforderlich als in Kalbsuteri (Tab. 11). Wie auch schon an den Estrogenrezeptoren war das AP an den Gestagenrezeptoren in humanem Myometrium am wirksamsten (Tab. 10 und 11).

Demgegenüber benötigten ORG2058 und Progesteron in den humanen uterinen Geweben im Vergleich zu Kalbsuteri höhere Konzentrationen, um 50 % der Radioligandenbindung zum Gestagenrezeptor zu inhibieren.

Die Bindungsaffinität des Radioliganden am Progesteronrezeptor war in humanem Endometrium am stärksten und in humanem Myomknoten am schwächsten. In humanem Myometrium und Kalbsuteri war die Stärke der Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung in etwa gleich.

Tab. 11: Dissoziationskonstanten und IC₅₀ von ORG2058, Progesteron und 4-tert-Octylphenol an den Progesteronrezeptoren aus Kalbsuteri, humanem Endometrium, humanem Myometrium und humanem Myomknoten.

IC ₅₀ [µM]	Kalbsuteri	Endometrium	Myometrium	Myomknoten
ORG2058	0,0083	0,09	0,034	0,043
Progesteron	0,046	0,52	0,91	0,73
4-tert-Octylphenol	280	124,3	61,1	98,2
K _D [nM]	1,35	0,75	1,55	2,7

4-tert-Octylphenol war die einzige Verbindung, die die Radioligandenbindung am Estrogen als auch am Progesteronrezeptor gemäß einer klassischen Hemmungskurve inhibieren konnte (Abb. 22 und 23).

In humanem Endometrium konnte ein Zusammenhang zwischen dem IC₅₀ von 4-tert-Octylphenol und der Bindungsaffinität des Radioliganden am Steroidrezeptor gefunden werden. Bekanntermaßen ist die 17β-Estradiol-Rezeptor-Bindung deutlich stärker als die Progesteron-Rezeptor-Bindung. Demnach war zu erwarten, dass am Estrogenrezeptor höhere Konzentrationen an 4-tert-Octylphenol als am Progesteronrezeptor benötigt wurden, um den IC₅₀ zu erreichen (Tab. 10 und 11).

Im humanen Myometrium war trotz deutlich stärkerer Bindungsaffinität des Radioliganden am Estrogenrezeptor gegenüber dem Gestagenrezeptor eine geringere Konzentration an 4-tert-Octylphenol am Estradiolrezeptor erforderlich, um den IC₅₀ zu erreichen.

3.2.2. Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Steroid-Rezeptor-Bindung entsprechend der Belastung im Gewebe

Aus den Untersuchungen zur Belastung humaner Gewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt (siehe Kap. 3.1.) waren β-HCH, p,p'-DDE und die nichtcoplanaren PCB als die Substanzen hervorgegangen, die in allen untersuchten humanen Geweben eindeutig nachgewiesen werden konnten.

Dabei war PCB 153 von den nichtcoplanaren PCB die Verbindung, die in den humanen Geweben am stärksten akkumuliert wurde (Abb. 12 und 13).

4-tert-Octylphenol, Coumestrol und Genistein hatten sich in den Kompetitionsuntersuchungen an den Steroidrezeptoren aus humanem Endometrium als Inhibitoren der Steroid-Rezeptor-Bindung erwiesen (siehe Kap. 3.2.1.2.).

Alle oben genannten Verbindungen sollten dahingehend untersucht werden, inwieweit sie in der Lage sind, entsprechend der Belastung im Gewebe die Steroid-Rezeptor-Bindung zu beeinflussen.

β -HCH, p,p'-DDE und PCB 153 wurden entsprechend ihrer Konzentrationen im Endometrium einzeln und additiv getestet. Die durchschnittliche Konzentration von β -HCH im Endometrium der normofertilen und sterilen Probandinnen lag bei 1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, die von p,p'-DDE bei 9,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und die von PCB 153 bei 0,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bezogen auf das Feuchtgewicht der Endometriumpuben (siehe Kap. 3.1.1.5. und 3.1.2.2.). Diese Konzentrationen entsprechen im Rezeptoransatz 144,4 pM für β -HCH, 887 pM für p,p'-DDE und 64 pM für PCB 153.

Eine Belastung von humanem Endometrium mit Coumestrol und 4-tert-Octylphenol kann aufgrund der hohen Nachweisgrenzen für diese Substanzen, nicht ausgeschlossen werden (siehe Kap. 3.1.1.5.). Coumestrol und 4-tert-Octylphenol wurden deshalb in Konzentrationen entsprechend ihrer Nachweisgrenzen im Endometrium untersucht.

Die Nachweisgrenze für Coumestrol im Endometrium lag zwischen 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tab. 5 und 7), die für 4-tert-Octylphenol lag zwischen 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tab. 5 und 7). Zur Ermittlung des Einflusses dieser beiden Verbindungen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in Konzentrationen entsprechend dem Fall einer Belastung von humanem Endometrium wurden für Coumestrol 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (559 pM) und für 4-tert-Octylphenol 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (7,3 nM) im Rezeptoransatz gewählt.

Genistein war in die Untersuchungen zur Belastung uteriner Gewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt nicht mit eingeschlossen. *Zahradnik et al. (1998)* berichteten jedoch vom Nachweis des Phytoestrogens in einer humanen Endometriumprobe in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Der Nachweis dieser Verbindung konnte in humanem Endometrium bisher in keiner zweiten Probe bestätigt werden. Dennoch sollte Genistein in diesem Konzentrationsbereich (2,2 nM) untersucht werden.

3.2.2.1. Kompetitionsuntersuchungen an den Steroidrezeptoren aus Kalbsuteri und humanem Endometrium

Zunächst wurde die inhibitorische Wirkung endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt entsprechend ihrer Konzentrationen in humanem Endometrium in Kompetitionsansätzen an den Steroidrezeptoren aus Kalbsuteri und humanem Endometrium untersucht.

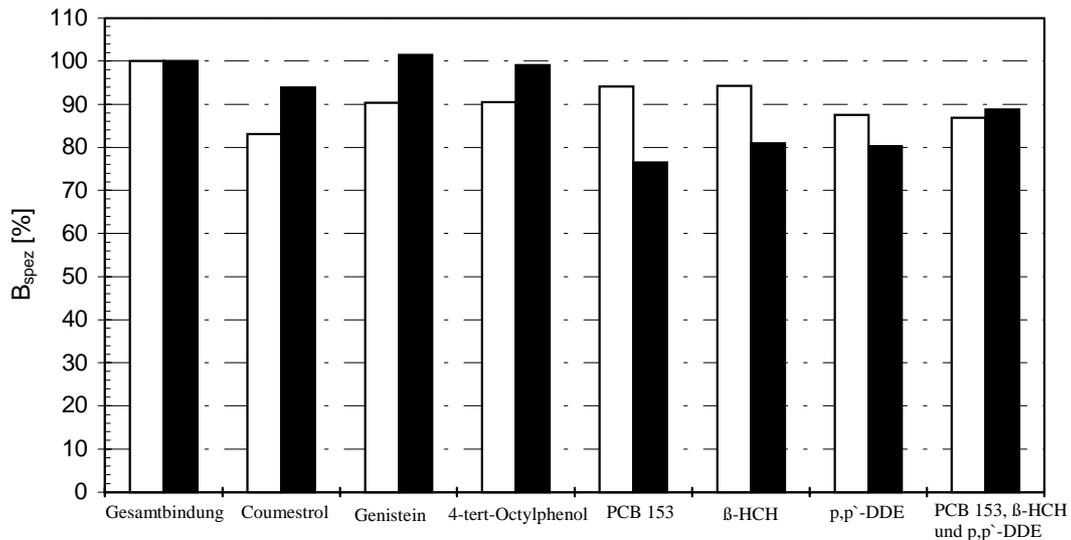


Abb. 24: Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen auf die Bindung von [³H]-17β-Estradiol am Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri (□) und humanem Endometrium (■) entsprechend der Belastung im Endometrium bzw. für Coumestrol und 4-tert-Octylphenol entsprechend ihrer Nachweisgrenze in humanem Endometrium.

An den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri erwiesen sich Coumestrol gefolgt von p,p'-DDE im Vergleich zu den übrigen getesteten Verbindungen als stärkste Inhibitoren der Radioligandenbindung am Estradiolrezeptor (Abb. 24).

An den selben Rezeptoren aus humanem Endometrium hatten die CKW gegenüber den Phytoestrogenen und 4-tert-Octylphenol einen erheblich stärkeren Einfluß auf die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung. Dabei konnte PCB 153 die Radioligandenbindung zum Rezeptorprotein auf 76 % reduzieren. Die CKW waren damit in der Lage, im Endometrium die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung stärker zu inhibieren als in Kalbsuteri. Dagegen hatten Genistein, Coumestrol und 4-tert-Octylphenol einen geringeren Einfluß auf die Bindung von 17β-Estradiol am Rezeptorprotein aus humanem Endometrium gegenüber dem in Kalbsuteri.

Diese Ergebnisse unterstreichen die höheren Konzentrationen an Phytoestrogenen und 4-tert-Octylphenol die erforderlich waren, um im Endometrium gegenüber Kalbsuteri 50 % der Radioligandenbindung zum Estrogenrezeptor zu inhibieren (Tab. 10).

Eine additive Wirkung der CKW in einem gemeinsamen Wettbewerbsansatz konnte weder an den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri noch an denen aus humanem Endometrium beobachtet werden (Abb. 24). Die inhibitorische Wirkung der einzelnen Verbindungen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung konnte in einem gemeinsamen Wettbewerbsansatz nicht übertroffen werden.

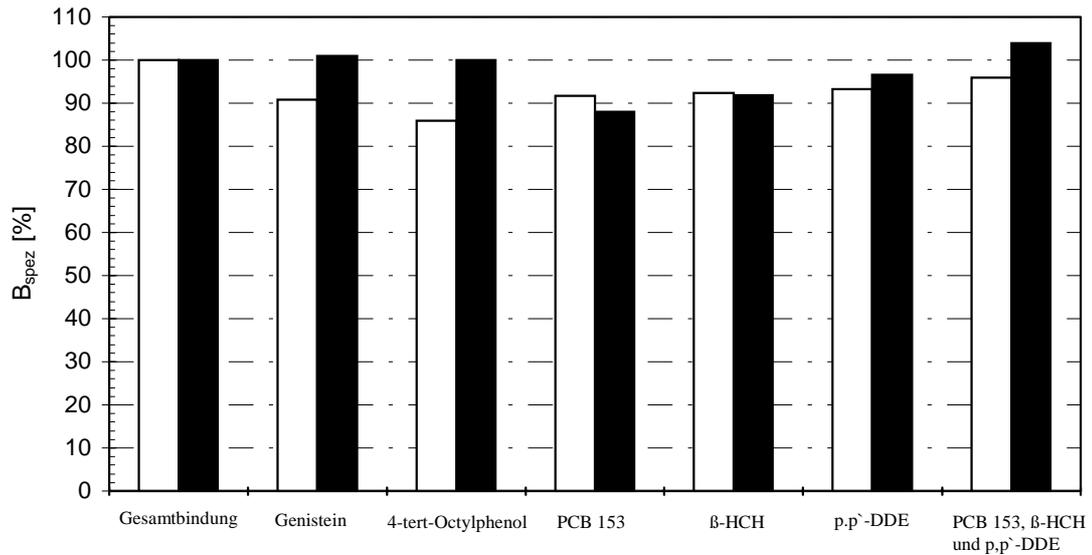


Abb. 25: Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen auf die Bindung von [³H]-ORG2058 am Gestagenrezeptor aus Kalbsuteri (□) und humanem Endometrium (■) entsprechend der Belastung im Endometrium bzw. für 4-tert-Octylphenol der Nachweisgrenze in humanem Endometrium.

4-tert-Octylphenol konnte die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung in Kalbsuteri im Vergleich zu den übrigen getesteten Verbindungen am stärksten inhibieren (Abb. 25).

Wie auch schon an den humanen Estrogenrezeptoren hatten die CKW auch an den Gestagenrezeptoren einen stärkeren Einfluß auf die Steroid-Rezeptor-Bindung als Genistein und 4-tert-Octylphenol (Abb. 24 und 25). Dabei konnte auch hier PCB 153 die Radioligandenbindung am Rezeptorprotein am stärksten beeinträchtigen. PCB 153 war in der Lage in humanem Endometrium die Gesamtbindung auf 88 % zu reduzieren.

Die alleinige inhibitorische Wirkung der CKW auf die Gestagenrezeptor-Bindung konnte in einem gemeinsamen Kompletionsansatz weder an den Bindungsproteinen aus Kalbsuteri noch an denen aus humanem Endometrium gesteigert werden. In humanem Endometrium wurde die inhibitorische Wirkung der einzelnen Verbindungen in einem gemeinsamen Kompletionsansatz abgeschwächt.

3.2.2.2. Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Bindungsaffinität der Steroidrezeptoren

Die Stärke der Bindung von Steroidhormonen an ihren Rezeptoren ist ausschlaggebend für ihre biologische Aktivität. Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität der Bindung von Steroidhormonen an ihren Rezeptoren. Eine hohe Affinität äußert sich in einer niedrigen Dissoziationskonstante und ist Voraussetzung dafür, dass bei niedrigen Hormonkonzentrationen eine ausreichende Bindungsrate und somit eine Steroidaktivität zustande kommt (*Struve 1994*).

Innerhalb der Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt auf die Steroid-Rezeptor-Bindung war es von großem Interesse, inwieweit solche Substanzen in Konzentrationen entsprechend der Belastung im Gewebe in der Lage sind, die Affinität der Steroide an den Steroidrezeptoren zu beeinflussen. Wird die Bindungsstärke des natürlichen Liganden am Rezeptor durch CKW, AP oder Phytoestrogene verändert, ist ein Einfluß auf die biologische Aktivität der Steroidhormone nicht auszuschließen.

Die Untersuchungen zum Einflusses endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt auf die Dissoziationskonstante der Steroidrezeptoren erfolgten im in-vitro Tiermodell. Die Durchführung dieser Versuche an den Rezeptoren aus humanen Geweben war nicht möglich, da diese Gewebe zum einen nur in geringen Mengen zur Verfügung standen und zudem in ihrer Rezeptivität zyklischen Schwankungen unterliegen (*Seliger et. al. 1987*).

Tab. 12: Einfluß von CKW, AP und Phytoestrogenen in Konzentrationen entsprechend der Belastung humaner Gewebe auf die Dissoziationskonstante der Steroidrezeptoren aus Kalbsuteri.

	Konzentration im Sättigungsansatz [nM]	K_D [nM] Estradiolrezeptor	K_D [nM] Progesteronrezeptor
Kalbsuteri	0	0,53	1,35
Coumestrol	0,56	0,54	n.d.
Genistein	2,2	0,52	1,25
4-tert-Octylphenol	7,3	0,48	1,35
PCB 153	0,064	0,48	1,35
β-HCH	0,14	0,53	1,35
p,p`-DDE	0,89	0,61	1,2

Die in Tabelle 12 dargestellten K_D -Werte sind Mittelwerte von jeweils 3 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsansätzen.

Die Unterschiede in der Bindungsaffinität waren sichtlich gering aber dennoch reproduzierbar.

Die Dissoziationskonstante des Estrogenrezeptors war in Anwesenheit von 4-tert-Octylphenol oder PCB 153 in Konzentrationen entsprechend der Belastung in humanem Gewebe immer niedriger als im Kontrollansatz. In Anwesenheit von p,p`-DDE nahm die Dissoziationskonstante in allen drei Versuchen zu.

Die Dissoziationskonstante des Progesteronrezeptors war in Anwesenheit von Genistein und p,p`-DDE niedriger als im Kontrollansatz.

Bei der bekannten Variationsbreite der Steroidaffinität zum Rezeptor des zyklischen Endometriums ist von diesen Abweichungen jedoch keine wesentliche Modulation der biologischen Aktivität zu erwarten.

4. Diskussion

4.1. Zielstellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten die viel diskutierte Frage zu beantworten, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in der Lage sind, die Fertilität der Frau zu beeinflussen.

Hintergrund ist die wiederholt verbreitete Auffassung, dass in den vergangenen Jahren die Zahl der sterilen Paare zugenommen hat.

Eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Exposition von Nagetieren gegenüber endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt zu erheblichen Fertilitätsstörungen führen kann (*Beier 1988; Fischer 1987*). Zu solchen endokrin wirksamen Verbindungen zählen PCB, Insektizide, Alcyphenole und Phytoestrogene. Eine Exposition des Menschen gegenüber diesen Substanzen erfolgt in besonderem Maße über die Nahrung und die Luft. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt nicht nur im Fettgewebe, in der Leber, in der Muttermilch und im Serum anreichern können sondern auch in der Follikelflüssigkeit und im Uterus der Frau (*Wagner et al. 1990; Van der Ven et al. 1991; Zahradnik et al. 1998, Kloth 1998*). Es ist damit nicht auszuschließen, dass endokrin wirksame Verbindungen, im besonderen die mit estrogener oder antiestrogener Wirkung, in regulatorische Prozesse des zyklischen Endometriums eingreifen und somit die Fertilität der Frau beeinträchtigen können.

Bisher war unbekannt ob und welche endokrin wirksamen Substanzen aus der Umwelt sich in der Uterusschleimhaut steriler Frauen anreichern können. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Belastung des humanen Endometriums steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt untersucht. Mit der Gegenüberstellung der Belastung normofertiler und steriler Frauen sollte untersucht werden, ob es Substanzen gibt, die bei sterilen Frauen in stärkerem Maße angereichert werden als in der Vergleichsgruppe.

Da aus tierexperimentellen Untersuchungen bekannt ist, dass eine Reihe von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt mit Steroidhormonen um die Bindungsstellen an den Steroidrezeptoren konkurrieren können, wurde immer wieder die Frage aufgeworfen, ob eine solche Konkurrenzreaktion auch in humanem Endometrium erfolgt (*Nelson 1974; Soto et al. 1992; Colborn et al. 1993; Jobling et al. 1995*).

Die vorliegende Arbeit liefert nun erstmalig konkrete Anhaltspunkte dafür, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in der Lage sind, mit den Steroidhormonen um die Bindungsstellen an den humanen uterinen Steroidrezeptoren zu konkurrieren.

4.2. Probandinnen

Für die Untersuchungen zur Belastung normofertiler und steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt standen zwei Probandinnengruppen zur Verfügung (siehe Kap. 2.2.1.). Das waren zum einen die Vergleichsgruppe, die normofertilen Frauen, und zum anderen die Zielgruppe, die sterilen Frauen.

Beide Probandinnengruppen wurden anhand von Ein- und Ausschlußkriterien rekrutiert (siehe Kap. 2.2.1.). Es ergaben sich zwei Probandinnenkollektive, die sich keinesfalls allein in den Parametern steril und normofertil voneinander unterscheiden ließen.

Von entscheidender Bedeutung für die Bewertung der Belastung beider Probandinnengruppen waren die Unterschiede im durchschnittlichen Alter. *Lehnert et al. (1994)* hatten eine altersabhängige Zunahme der Serumbelastung bei 285 Bundesbürgern nachweisen können. Da die normofertilen Probandinnen mit einem Durchschnitt von 41,8 Jahren wesentlich älter als die sterilen Frauen ($\bar{x} = 29,3$ Jahre) waren, mußte von einer höheren Grundbelastung der Vergleichsgruppe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt ausgegangen werden. Es stellt sich die Frage, warum nicht versucht wurde, zwei Probandinnengruppen mit gleichem Durchschnittsalter zu rekrutieren?

An dieser Stelle trifft man auf die Grenzen humantoxikologischer sowie epidemiologischer Untersuchungen. Es ist ethisch nicht vertretbar, gesunde fertile Frauen im reproduktiven Alter zu kürretieren, nur um so eine ideale Vergleichsgruppe für die sterile Probandinnengruppe zu bilden. Man ist somit auf junge, fertile Frauen angewiesen, denen der Uterus aufgrund gutartiger Erkrankungen entfernt werden muß. Bei jungen Frauen ist die Entfernung des Uterus immer die letzte verbleibende therapeutische Möglichkeit und wird somit entsprechend selten praktiziert, da bei ihnen die Erhaltung der Fertilität im Vordergrund steht.

Weiterhin waren die rekrutierten Gruppen in sich selbst sehr heterogen. So handelt es sich bei den sterilen Frauen nicht ausschließlich um Probandinnen, bei denen keine Sterilitätsursache diagnostiziert werden konnte. Zur Gruppe gehören außerdem Frauen, bei denen ein Tubenverschluß, Ovulationsstörungen, eine Endometriose oder Myomknoten festgestellt wurden. Solche Befunde sind bekannte Ursachen für Fertilitätsstörungen. Es stellt sich aber die Frage, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt an der Ausbildung von Endometriose, an Ovulationsstörungen oder am Wachstum von Myomknoten beteiligt sein könnten. All diese Krankheitsbilder entstehen unter estrogenem Einfluß. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Schadstoffe aus der Umwelt mit estrogenen Wirkung, die sich in den uterinen Geweben anreichern, die Bildung von Endometriose oder Myomknoten begünstigen und somit auf diesem Wege die Fertilität der Frau beeinflussen. Die Ursachen für die Entstehung der Endometriose und von Myomknoten sind weitgehend unerforscht.

In der vorliegenden Arbeit kam es darauf an, Verbindungen aus der Vielzahl von endokrin wirksamen Substanzen aus der Umwelt herauszufiltern, die für reproduktionsbiologische Untersuchungen von Bedeutung sein könnten. Für eine solche Bewertung stellt die sterile Probandinnengruppe durchaus eine repräsentative Auswahl dar.

4.3. Methoden

Wie auch aus Kapitel 4.2. zu entnehmen ist, steht humanes uterines Gewebe für Forschungszwecke nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung. Eine aussagekräftige quantitative Bestimmung von Spurensubstanzen ist nur von einem zertifizierten Umweltlabor zu erwarten, das bereits methodische Erfahrungen vorweisen kann.

Die Wahl fiel auf die ERGO Forschungsgemeinschaft mbH in Hamburg, da in diesem Labor neben dem Nachweis von CKW auch die Bestimmung von Coumestrol und 4-tert-Octylphenol in humanen Gewebeproben etabliert war. Da bisher nur wenige Daten vorliegen, die eine Belastung humaner uteriner Gewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt belegen, war es zudem von entscheidender Bedeutung die Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen direkt vergleichen zu können. *Zahradnik et al. (1998)* hatten ihre Endometriumproben ebenfalls im Labor der ERGO Forschungsgemeinschaft mbH in Hamburg analysieren lassen.

Die Untersuchungen zum Einfluß von CKW, AP und Phytoestrogenen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium, und somit möglicherweise auf die Fertilität der Frau, erfolgten in-vitro anhand des kompetitiven Radioliganden-Bindungs-Assays.

Untersuchungen in-vivo, die einen Einfluß dieser Verbindungen auf die estrogene sowie gestagene Wirkung in humanem Endometrium eindeutig belegen könnten, waren nicht realisierbar, da keine humane Endometriumzelllinie existiert, in der funktionstüchtige Steroidrezeptoren nachgewiesen werden können.

Derzeit wird an unserer Einrichtung an der Etablierung einer epithelialen Endometriumprimärzellkultur gearbeitet, wobei die Erhaltung der funktionellen Steroidrezeptoren von besonderem Interesse ist. Könnte die Funktionstüchtigkeit der Steroidrezeptoren in einer solchen Primärkultur erhalten werden, wären Untersuchungen möglich, die einen Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt auf estrogene sowie gestagene Regulationsmechanismen in humanem Endometrium eindeutig belegen oder ausschließen könnten.

4.4. Fragebogen

Der Fragebogen, der von jeder Probandin ausgefüllt wurde, sollte helfen, individuelle Ursachen einer Belastung der uterinen Gewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt zu erkennen.

Die Exposition des Menschen gegenüber endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt erfolgt hauptsächlich über die Nahrung, die Luft und die Haut (siehe Kap. 1.3.). Es kam darauf an, den Fragebogen so zu gestalten, dass sich daraus Hinweise auf eine mögliche alltagsbedingte Belastungsursache der Frau ergeben.

Im allgemeinen sind solche Fragebögen sehr umfangreich (*Evers et al. 1995*). Es sollte hier ein aussagekräftiger Fragebogen eingesetzt werden, der so kurz wie möglich zu halten war, um die Frauen, insbesondere die aus der Sterilitätssprechstunde, nicht zusätzlich zu beunruhigen.

Die Auswertung der verwendeten Fragebögen ergab keine Hinweise, die im konkreten Fall Aufschluß über Ursachen für die erhöhte Belastung einzelner Probandinnen bringen könnten (siehe Kap. 3.1.2.2.). Die Faktoren, die bei der Ablagerung von PCB, Insektiziden oder Phytoestrogenen in humanen Geweben eine Rolle spielen sind sehr komplex. Untersuchungen, die sich auf diesem Wege mit den Ursachen einer erhöhten Belastung humaner Gewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt beschäftigen, sollten deshalb zum einen eine weit größere Probandinnengruppe umfassen und sich zum anderen auf ein bis maximal zwei Umweltfaktoren beschränken. Somit könnte der Fragebogen zielgerichteter ausgelegt werden. Außerdem wäre es einfacher aus einer sehr großen Probandinnenauswahl homogene repräsentative Gruppen zusammenstellen, in denen dann möglicherweise Unterschiede in der Belastung zu messen sind. Komplexe Fragebögen verleiten leicht zu einer Überbewertung von einzelnen Hinweisen. Zusammenhänge lassen sich nicht oder wesentlich schwerer erkennen.

4.5. Expositionsuntersuchungen

Das endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt die Fertilität verschiedener Spezies erheblich beeinträchtigen können, wurde einleitend ausführlich beschrieben (siehe Kap. 1.3.).

Bisher liegen jedoch keine Daten vor, die die Anreicherung solcher Verbindungen in der Uterusschleimhaut steriler Frauen belegen oder ausschließen. Die vorliegende Arbeit vergleicht erstmalig die Belastung von humanem Endometrium mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt von normofertilen und sterilen Frauen. Daraus könnten sich erste Hinweise auf Verbindungen ergeben, die innerhalb reproduktionstoxikologischer Untersuchungen von besonderem Interesse sind.

Außerdem kann die Kenntnis der Konzentrationsbereiche, in denen endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in humanem Endometrium angereichert werden dazu beitragen, endokrine, mutagene oder kanzerogene Effekte solcher Substanzen in diesem Gewebe besser einzuschätzen.

4.5.1. Belastungssituation von Serum und Fettgewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt

4.5.1.1. Fettgewebe

In der Literatur wurde mehrfach über die Belastung von humanem Serum und Fettgewebe mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt aufgrund der relativ einfachen Gewinnung dieser Gewebe berichtet (*Scheele 1998; Kloth 1998; Zahradnik et al. 1998; Waliszewski et al. 1996; Burgaz et al. 1995 und 1994; Lehnert et al. 1994*). Immer wieder wird die Frage aufgeworfen, inwieweit die Exposition des Menschen beispielsweise gegenüber DDT und β -HCH überhaupt noch aktuell ist, da der Einsatz dieser Substanzen in Westeuropa zum Teil schon seit mehreren Jahrzehnten verboten ist (*Moll 1987; Koch et al. 1989*).

Dass die Ablagerung dieser Verbindungen in der Umwelt, wie auch die Exposition des Menschen gegenüber diesen Substanzen, auch heute noch in großem Maße erfolgt, belegen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen hohen Konzentrationen im Serum und im Fettgewebe der Frauen (Tab. 1; 2 und 6).

Alle untersuchten CKW (siehe Kap. 2.2.2.) konnten im Fettgewebe der normofertilen Frauen nachgewiesen werden (Tab. 1). Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der CKW waren die Konzentrationen im Fettgewebe gegenüber denen im Serum erwartungsgemäß hoch (Tab. 1; 2 und 6).

Ähnliche Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB und β -HCH konnte auch *Kloth (1998)* im Fettgewebe von Frauen nachweisen. Eine Arbeit, die parallel zu der von *Kloth (1998)* entstand, fand ebenfalls Konzentrationen an PCB 153 im Fettgewebe von Frauen, die den Werten der vorliegenden Arbeit entsprachen (*Zahradnik et al. 1998*). Dagegen berichteten *Zahradnik et al. (1998)* von Konzentrationen an β -HCH, die um die Hälfte unter den Werten von *Kloth (1998)* und denen der vorliegenden Arbeit lagen. Die Übereinstimmung der Konzentrationen an β -HCH der vorliegenden Arbeit mit der Studie von *Kloth (1998)*, und die entsprechenden Unterschiede zu der Studie von *Zahradnik et al. (1998)*, könnten eventuell auf regionale Unterschiede bei der Probandinnenrekrutierung zurückzuführen sein. *Kloth (1998)* hatte ebenfalls Frauen aus Sachsen-Anhalt untersucht.

Lindan, ein Insektizid, welches derzeit in den westeuropäischen Ländern noch Anwendung findet, konnte *Kloth (1998)* im Fettgewebe in Konzentrationen nachweisen, die doppelt so hoch waren wie die Werte der vorliegenden Arbeit.

Ursache dafür könnten zum einen labortechnische Unterschiede bei der Analyse der CKW beider Arbeiten sein, zum anderen eine verminderte Belastung von Nahrungsmitteln mit Lindan. Nahrungsmittel werden als eine der Hauptquellen für eine Belastung humaner Gewebe mit Insektiziden angesehen. Eine Studie aus Italien berichtete über verminderte Konzentrationen an Lindan in Fisch und Rindermuskel in den Jahren 1994 und 1995 gegenüber 1993 (*Binato et al. 1996*). Berücksichtigt man den früheren Probennahmezeitraum der Arbeit von *Kloth (1998)* gegenüber der vorliegenden Studie, so ist als Ursache der verminderten Belastung der Fettgewebe mit Lindan eine geringere Exposition der Frauen gegenüber diesem Insektizid nicht auszuschließen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Arbeiten von *Kloth (1998)* und von *Zahradnik et al. (1998)* hinsichtlich DDT bzw. seiner Metabolite, so fanden beide Autoren Konzentrationen dieser Verbindungen, die um das 2-3-fache unter den Werten der vorliegenden Studie lagen.

Die Bestimmung der CKW in humanen Geweben der Arbeitsgruppe von *Zahradnik et al. (1998)* erfolgte im selben umweltanalytischen Labor wie die der vorliegenden Arbeit. Demnach sind die Ergebnisse beider Studien direkt miteinander vergleichbar. Die regionalen Unterschiede bei der Probandinnenrekrutierung für die geringeren Konzentrationen an DDT-Metaboliten und β -HCH in Probandinnen aus Baden-Württemberg gegenüber Probandinnen aus Sachsen-Anhalt ursächlich sein können, wird durch eine Studie von *Schlebusch et al. (1991)* gestützt. Die Autoren berichteten von deutlich höheren Konzentrationen an β -HCH und Lindan in Muttermilchproben aus Bitterfeld/Wolfen im Vergleich zu den Proben aus Baden-Württemberg. Allerdings werden in dieser Arbeit starke lokale Schwankungen innerhalb Sachsens-Anhalts deutlich. Die Konzentrationen der gleichen Verbindungen in Muttermilchproben aus Merseburg lagen nur noch geringfügig über den Werten aus Baden-Württemberg.

Eine weitere Ursache für die signifikanten Unterschiede der DDT-Konzentrationen der vorliegenden Studie gegenüber der von *Zahradnik et al. (1998)* könnte sein, dass sowohl in der damaligen DDR als auch den anderen osteuropäischen Ländern noch bis Ende der 80er Jahre DDT als Insektizid verwendet wurde (*Schäfer et al. 1995*). In der Bundesrepublik Deutschland war der Einsatz von DDT bereits 1972 verboten worden (*Moll 1987*). Unerklärbar bleibt allerdings, warum dann die Konzentrationen an DDT, die *Kloth (1998)* im Fettgewebe von Frauen aus Sachsen-Anhalt fand, nicht besser mit denen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen und eher zu den von *Zahradnik et al. (1998)* ermittelten Bereichen tendieren.

In der Arbeit von *Binato et al. (1996)*, die sich mit der Verunreinigung von tierischen Nahrungsmitteln durch Insektizide in den Jahren 1993 bis 1995 beschäftigt, wurde gezeigt, dass die Konzentrationen an DDT in Milch, Rinderfett, Rindfleisch, Schweinefleisch und Fisch im Jahr 1995 gegenüber 1993 deutlich zugenommen haben. Diese Entwicklung begründen die Autoren mit der hohen chemischen Stabilität und Bioakkumulation von chlorierten Kohlenwasserstoffen in der Umwelt. *Schechter et al. (1997)* berichteten von signifikant höheren Konzentrationen an DDE in Fisch gegenüber Schwein, Rind, Milch und Eiern. In Anbetracht dessen könnten die höheren Konzentrationen an DDT-Metaboliten in der vorliegenden Arbeit gegenüber den Daten von *Kloth (1998)* und *Zahradnik et al. (1998)* auf die veränderte Belastung von Nahrungsmitteln, die in Deutschland konsumiert werden, zurückzuführen sein.

Besonders ein gesteigener Konsum von frischem Obst pro Kopf der Bevölkerung in Deutschland (*Gedrich et al. 1996*), verbunden mit einem gestiegenen Importanteil an Obst aus Ländern, in denen der Einsatz von DDT und technischem HCH bis zum heutigem Zeitpunkt nicht verboten ist, könnte eine Ursache für die nachgewiesenen hohen Konzentrationen dieser Substanzen in den Geweben der vorliegenden Studie sein.

Aus den vorliegenden Ergebnissen sowie den Arbeiten von *Kloth (1998)* und *Zahradnik et al. (1998)* geht übereinstimmend hervor, dass die Belastung von humanen Fettgeweben in Deutschland, im Vergleich zu der in anderen Ländern, geringer einzuschätzen ist. So wurden beispielsweise in den USA, im Iran, in der Türkei und in Mexiko deutlich höhere Konzentrationen an DDT bzw. seiner Metabolite als auch β -HCH in humanen Fettgeweben nachgewiesen (*Scheele 1998; Burgaz et al. 1994 und 1995; Waliszewski et al. 1996*).

Die vorliegenden Ergebnisse belegen eindeutig, dass nach wie vor in humanen Fettgeweben eine Ablagerung von PCB, DDT bzw. dessen Metabolite und HCH erfolgt. Dabei scheint die Exposition des Menschen gegenüber Lindan rückläufig zu sein, die gegenüber DDT jedoch zuzunehmen.

4.5.1.2. Serum

Die Belastung des Serums mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt spiegelt im Vergleich zu der des Fettgewebes, welches als Speichergewebe fungiert und in dem sich somit lipophile Substanzen über einen längeren Zeitraum anreichern können, die akute Expositionslage der Organe wider.

In der vorliegenden Arbeit konnten in der Mehrzahl der untersuchten Seren eindeutig PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH, p,p'-DDT und p,p'-DDE nachgewiesen werden (Tab. 2 und 6). Lindan wurde nur in zwei Serumproben eindeutig oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt. In

vereinzelt Serumproben der normofertilen Frauen konnte p,p'-DDD in Konzentrationen entsprechend der Nachweisgrenze detektiert werden.

Lehnert et al. (1994) beschäftigten sich mit der Belastung von Serum mit PCB bei 285 Bundesbürgern aus drei verschiedenen Regionen Deutschlands. Die Autoren fanden im Serum der Frauen, das Anfang der 90er Jahre in Süddeutschland, im Rhein-Main-Gebiet und in Schleswig-Holstein gesammelt wurde, PCB 138, PCB 153 und PCB 180 in Konzentrationen, die etwas über denen der normofertilen Probandinnen aus der vorliegenden Studie lagen. Zudem konnten die Autoren eine altersabhängige Zunahme der PCB-Konzentrationen im Serum feststellen. Im Serum jüngerer Probanden wurden geringere Konzentrationen an PCB gemessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Serum der Sterilitätspatientinnen eindeutig geringere Konzentrationen an CKW gefunden als im Serum der normofertilen Frauen (Abb. 14). Die Gruppe der Sterilitätspatientinnen umfaßte mit einem durchschnittlichen Alter von 29,3 Jahren ein weit jüngeres Probandinnenkollektiv als die Gruppe der normofertilen Frauen mit 41,8 Jahren (siehe Kap. 4.2.). Somit können die Unterschiede beider Gruppen durchaus mit einer altersabhängigen Zunahme der Belastung humaner Gewebe begründet werden.

Eine weitere Arbeit berichtete über Konzentrationen an Gesamt-PCB im Serum infertiler Frauen, die der Summe an PCB in der normofertilen Probandinnengruppe der vorliegenden Arbeit entsprach (*Van der Ven et al. 1991*). *Kloth (1998)* berichtete von Serumkonzentrationen an PCB und Gesamt-DDT, die unter den hier veröffentlichten Werten lagen. Im Serum seiner Probandinnen stellten entsprechend den hier diskutierten Ergebnissen DDT und, von den PCB, PCB 153 den höchsten Anteil an der Belastung.

Lindan fand *Kloth (1998)* im Serum seiner Probandinnen in doppelt so hohen Konzentrationen wie sie in der vorliegenden Arbeit in der Normalgruppe bestimmt werden konnten. Die Konzentrationen für β -HCH lagen nur geringfügig über den hier beschriebenen Ergebnissen.

Auffällig ist, dass die Konzentrationen an PCB im Fettgewebe und Serum unterschiedlicher Studien im Vergleich zu den Insektiziden weniger stark voneinander abweichen. Ursache dafür könnte sein, dass bei all diesen Arbeiten Probanden aus Deutschland untersucht worden waren.

In Deutschland ist der Einsatz von PCB seit 1976 nur noch in geschlossenen Systemen erlaubt. Dennoch werden PCB auch heute noch in erheblichen Mengen, unter anderem im Sediment von Flüssen, nachgewiesen. Beispielsweise durch Hochwasser können diese Verbindungen auf Wiesen, Weiden oder Äcker gelangen und somit in der Nahrungskette angereichert werden. Besonders in Fischen und fischfressenden Vögeln kommt es in Folge der Gewässerverschmutzung zu einer starken Akkumulation dieser Verbindungen. Die Aufnahme

von PCB durch den Menschen erfolgt in besonderem Maße durch die Nahrung, die Haut aber auch durch die Luft, wobei die PCB an Staubpartikeln absorbiert sind (*Koch et al. 1989*).

Die hier diskutierten Daten belegen die Tatsache, dass obwohl der Einsatz von PCB und der von Insektiziden in Deutschland erheblich eingeschränkt wurde, eine Exposition des Menschen gegenüber diesen Verbindungen nach wie vor in signifikanten Konzentrationen gemessen werden kann. Dabei scheint entsprechend den Ergebnissen im Fettgewebe auch hier die Exposition gegenüber Lindan rückläufig zu sein, gegenüber DDT zuzunehmen und gegenüber PCB sowie β -HCH im Vergleich zu Arbeiten, die zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt wurden, keine signifikanten Unterschiede aufzuweisen.

4.5.2. Belastungssituation in uterinen Geweben

Bis heute sind nur zwei Arbeiten publiziert worden, die sich mit der Ablagerung von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt in humanen uterinen Geweben beschäftigten. Das sind die Arbeiten von *Kloth (1998)* und die von *Zahradnik et al. (1998)*.

In beiden Studien untersuchten die Autoren humanes Endometrium einer heterogenen Auswahl von Frauen, bei denen aufgrund gutartiger Erkrankungen der Uterus entfernt werden mußte. *Kloth (1998)* bestimmte zudem die Anreicherung ökologisch relevanter Wirkstoffe im Myometrium und stellte sie der im Endometrium und Serum gegenüber.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem humanen Endometrium und Myometrium erstmalig auch die Myomknoten (siehe Kap. 3.1.1.4.) auf ihre Belastung mit endokrin wirksamen Verbindungen untersucht. Hintergrund dafür war die Tatsache, dass die Ursache für die Bildung von Myomknoten bisher noch weitgehend ungeklärt ist. Da das Wachstum dieser gutartigen Wucherungen im Uterus estrogenabhängig ist, könnten auch Xenoestrogene bei ihrer Entstehung eine Rolle spielen.

Erstmalig wurde mit der vorliegenden Arbeit gezielt die Anreicherung von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt im Endometrium von Sterilitätspatientinnen untersucht.

In fast allen uterinen Gewebeproben konnten eindeutig oberhalb der Nachweisgrenzen PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p'-DDE bestimmt werden (Tab. 3 – 5 und 7). Den höchsten Anteil an der Gesamtbelastung der untersuchten humanen Gewebe, einschließlich Serum und Fettgewebe, hatte p,p'-DDE mit ca. 70 % (siehe Kap. 3.1.1. und 3.1.2.). Von den PCB war PCB 153 das Isomer, welches in allen humanen Geweben in den höchsten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 3.1.1. und 3.1.2.). In keinem der uterinen Gewebe, in

keinem Serum und in keinem Fettgewebe der normofertilen und der sterilen Frauen konnte 4-tert-Octylphenol oder Coumestrol bestimmt werden (Tab. 1 – 7).

Der Nachweis von 4-tert-Octylphenol in humanen Geweben, einschließlich Serum und Fettgewebe, wurde vor allem durch die hohen Reagenzienblindwerte, die sich durch die weite Verbreitung von Alcyphenolen (AP) in Labormaterialien ergeben, erheblich beeinträchtigt. Zudem ist eine unbegrenzte Erhöhung der Ausgangsmenge, um Nachweisgrenzen entsprechend denen von PCB, HCH und DDT-Metaboliten zu garantieren, für die Bestimmung von 4-tert-Octylphenol in humanen Geweben nicht möglich. Eine Belastung humaner Gewebe mit 4-tert-Octylphenol kann somit bis zum heutigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Auch der Nachweis von Coumestrol in uterinen Geweben wurde durch die geringen Probenmengen erheblich beeinträchtigt (siehe Kap. 3.1.1 und 3.1.2.). Die Nachweisgrenzen dieser Substanz stiegen dadurch so stark an, dass auch hier eine Belastung von uterinen Geweben mit Coumestrol nicht ausgeschlossen werden kann (Tab. 3 - 5 und 7). Von einer Belastung humaner Seren normofertiler sowie steriler Frauen mit Coumestrol muß nicht ausgegangen werden, da hier für diese Verbindung Nachweisgrenzen erreicht wurden, die denen der CKW entsprachen (Tab. 2 und 6).

Die Arbeitsgruppe um *Zahradnik et al. (1998)* konnte in keiner der von ihnen untersuchten Endometriumproben Coumestrol bestimmen. Sie erreichten Nachweisgrenzen in humanem Endometrium, die deutlich unter denen der vorliegenden Arbeit im entsprechenden Gewebe lagen. Demnach konnten sie mit einer höheren Sicherheit die Belastung des Endometriums mit Coumestrol ausschließen. Geht man davon aus, dass alle CKW, die in den uterinen Geweben bestimmt werden konnten, auch im Serum der Probandinnen nachzuweisen waren, so ist im Analogschluß eine Belastung der humanen uterinen Gewebe der vorliegenden Arbeit mit Coumestrol nicht zu erwarten.

In der Literatur wurde darüber berichtet, dass die Belastung humaner Gewebe mit Phytoestrogenen sehr stark von den Ernährungsgewohnheiten abhängig ist (*Degen et al. 1999*). Beispielsweise verzehren Japanerinnen 30 – 50 mal mehr Sojaprodukte als amerikanische Frauen. Im Serum der japanischen Frauen wurde eine entsprechend höhere Isoflavon-Konzentration nachgewiesen (*Adlercreutz 1995*).

Phytoestrogene sind ein Beispiel dafür, dass endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt das humane endokrine System durchaus auch positiv beeinflussen können. *Adlercreutz (1995)* macht die erhöhten Konzentrationen an Isoflavonen für das verminderte Brustkrebsrisiko von Japanerinnen gegenüber Amerikanerinnen verantwortlich (siehe Kap. 1.3.).

4.5.2.1. Myometrium und Myomknoten

Der Vergleich der Belastung von Myometrium und Myomknoten sollte einen ersten Ansatz für weiterführende Untersuchungen zur Pathogenese des Uterus myomatosus liefern. Aus der Arbeit von *Kloth (1998)* ging hervor, dass CKW im Myometrium in höheren Konzentrationen gemessen werden können als im Serum.

Die vorliegenden Untersuchungen führten zu generell niedrigeren Konzentrationen an CKW in Myometrium und Myomknoten im Vergleich zum Serum, wobei die Belastung der Myomknoten deutlich unter der im Myometrium lag (Abb. 12).

Myomknoten werden in der Regel kaum durchblutet. Daher fällt der Eintrag von CKW über das Blut in dieses Gewebe deutlich geringer aus. Die verminderte Belastung der Myomknoten gegenüber dem Myometrium war somit leicht einzusehen.

β -HCH war der einzige Vertreter aus der Gruppe der Xenoestrogene, welcher in den Myomknoten eindeutig nachgewiesen werden konnte. Ob die Konzentration in der β -HCH in den Myomknoten und im Myometrium bestimmt wurde jedoch ausreicht, um eine estrogene Wirkung in diesen Geweben, und somit beispielsweise das Wachstum von Myomknoten unterstützen könnte, bleibt offen. Zudem ist nicht auszuschließen, dass die Konzentrationen an CKW, die in den Myomknoten und im Myometrium gemessen wurden, nicht im Gewebe selbst, sondern in dem dort zirkulierenden Blut bestimmt wurden.

Es bleibt unklar inwieweit die Arbeit von *Kloth (1998)* mit der vorliegenden Arbeit verglichen werden kann, da die Analytik der CKW in unterschiedlichen Laboratorien erfolgte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben keine eindeutigen Hinweise darauf, dass eine Ablagerung endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt ursächlich für das Wachstum von Myomknoten im Uterus sein könnte.

4.5.2.2. Endometrium

Sowohl im Endometrium normofertiler als auch steriler Frauen wurden PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p'-DDE eindeutig oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt (Tab. 5 und 7).

Aufgrund der stärkeren Durchblutung des Endometriums war eine höhere Konzentration der CKW gegenüber dem Myometrium durchaus zu erwarten (Abb. 12).

Die Belastung des Endometriums der normofertilen sowie der sterilen Frauen mit β -HCH und p,p'-DDE lag eindeutig über der im Serum (Abb. 12 und 13). Somit kommt es im Endometrium in beiden Probandinnengruppen zu einer Anreicherung von estrogen wirksamem β -HCH und antiandrogen wirksamem p,p'-DDE.

Im Endometrium steriler Frauen konnten außerdem höhere Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB als im Serum bestimmt werden. Bei den normofertilen Probandinnen konnte trotz erhöhter Belastung des Serums mit PCB gegenüber den sterilen Frauen anhand der durchschnittlichen Konzentrationen keine Anreicherung dieser Verbindungen im Endometrium gegenüber dem Serum beobachtet werden. Betrachtet man jedoch einzelne Endometriumproben aus der Normalgruppe, beispielsweise die Patientinnen Nr. 7; 11; 13 und 14, so erfolgte auch hier eine Anreicherung von PCB 138, PCB 153 und PCB 180 gegenüber dem Serum (Tab. 2 und 5).

Die Arbeitsgruppe um *Zahradnik et al. (1998)* untersuchte ebenfalls die Belastung von humanem Endometrium mit CKW. Vergleicht man beide Studien, so fanden *Zahradnik et al. (1998)* im Endometrium nur halb so hohe durchschnittliche Konzentrationen an β -HCH und p,p'-DDE, wie sie in der vorliegenden Arbeit in der normofertilen Probandinnengruppe gemessen werden konnten. Im Fettgewebe dieser Frauen bestimmten sie ebenfalls entsprechend niedrigere Konzentrationen an β -HCH und p,p'-DDE. Demnach kann von einer generell verminderten Belastung der Gewebeproben der Freiburger Arbeitsgruppe gegenüber der vorliegenden Probandinnenauswahl hinsichtlich β -HCH und p,p'-DDE ausgegangen werden (siehe Kap. 4.2.1.1.).

Die Arbeitsgruppe um *Zahradnik et al. (1998)* bestimmte im Endometrium Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB, die doppelt so hoch waren, wie die Konzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit im Gewebe normofertiler Frauen gemessen wurden. Im Fettgewebe waren die Konzentrationen von PCB 153 in beiden Studien fast identisch. Leider liegen keine Daten der Freiburger Arbeitsgruppe zur Serumbelastung vor. Somit bleibt die Frage offen, inwieweit Unterschiede in der akuten Aufnahme von PCB beider Probandinnenkollektive vorliegen, und somit der Eintrag von PCB in die Uterusschleimhaut über die Blutbahn der Freiburger Probandinnen in stärkerem Maße erfolgt sein könnte. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Belastung könnte sein, dass die Gebiete um Freiburg im Breisgau in stärkerem Maße von Überschwemmungen betroffen sind als Sachsen Anhalt. Dadurch gelangen die PCB aus den Flußsedimenten möglicherweise über die Weiden und Äcker wieder in die Nahrungskette.

Kloth (1998) konnte in seiner Arbeit eine Anreicherung von PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH, Lindan und DDT im Endometrium gegenüber Serum nachweisen. Diese Befunde können anhand der vorliegenden Ergebnisse für β -HCH, für p,p'-DDE, und in einzelnen Endometrien für PCB, bestätigt werden.

Lindan konnte in der vorliegenden Arbeit nur in einer Endometriumprobe der Normalgruppe entsprechend der Nachweisgrenze bestimmt werden. Diese Endometriumprobe konnte keiner der Probandinnen zugeordnet werden, in deren Serum eindeutig Lindan oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt wurde (Tab. 2 und 5). Diese Ergebnisse stehen in einem starken Widerspruch zu der Arbeit von *Kloth (1998)*. Er hatte im Endometrium Lindan in 22 mal höheren Konzentrationen bestimmen können als im Serum. Hier kann zum heutigen Zeitpunkt wie bei der Bestimmung im Myometrium nur auf die methodischen Unterschiede verwiesen werden.

Erstmalig konnten in der vorliegenden Arbeit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt, wie beispielsweise das in die Gruppe der Xenoestrogene einzuordnende β -HCH, im Endometrium steriler Frauen nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl im Endometrium normofertiler als auch in dem steriler Frauen eine Anreicherung von β -HCH und p,p'-DDE erfolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass es im Endometrium auch zu einer Anreicherung von nichtcoplanaren PCB kommen kann.

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob diese Substanzen in den gemessenen Konzentrationsbereichen in der Lage sind, in hormonelle Regulationsmechanismen einzugreifen.

4.5.3. Vergleich der Belastung normofertiler und steriler Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt

Aus tierexperimentellen Untersuchungen geht hervor, dass endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in der Lage sind, die Reproduktion entscheidend zu beeinträchtigen (*Frey 1995; Guilette et al. 1995 und 1996*). Die Frage, inwieweit diese Erkenntnisse auf den Menschen, und in besonderem Maße auf die Fertilität der Frau, übertragen werden können, ist äußerst schwierig zu beantworten. Dabei könnten Unterschiede, die in der Belastung von sterilen gegenüber normofertilen Frauen zu finden sind, von entscheidender Bedeutung sein.

Das eine erhöhte Belastung von sterilen gegenüber normofertilen Frauen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt vorliegen kann, belegt die Arbeit von *Wagner et al. (1990)*. Die Autoren konnten in der Follikelflüssigkeit idiopathisch steriler Frauen gegenüber Frauen mit organisch faßbarer Sterilität erhöhte Konzentrationen an PCB, DDT-Metaboliten, β -HCH und Lindan nachweisen. *Van der Ven et al. (1991)* berichteten von extrem hohen Konzentrationen an CKW in der Follikelflüssigkeit vereinzelter Patientinnen mit idiopathischer Sterilität gegenüber anderen Probandinnen aus der Sterilitätssprechstunde. *Ensslen et al. (1990)* fanden dagegen in der Follikelflüssigkeit idiopathisch steriler Frauen keine erhöhten Konzentrationen an PCB, HCB und Lindan gegenüber Frauen mit begründeter organischer Sterilität.

Am Anfang der vorliegenden Arbeit stand die Frage, ob Sterilität und Belastung des Endometriums mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt miteinander korrelieren.

Die Belastung des Serums der sterilen Probandinnen mit CKW lag unter der normofertiler Frauen (Abb. 14). Ursache für die verminderte Belastung des Serums steriler Frauen könnte das geringere Durchschnittsalter gegenüber den normofertilen Probandinnen sein. Die Rekrutierung einer normofertilen Probandinnengruppe mit einem Durchschnittsalter von etwa 30 Jahren, in der Serum und Endometrium untersucht werden kann, ist kaum möglich (siehe Kap. 4.2.). Demnach kann anhand der vorliegenden Ergebnisse eine erhöhte Belastung des Serums steriler Frauen gegenüber gleichaltrigen normofertilen Frauen nicht ausgeschlossen werden.

Im Endometriumpool der sterilen Frauen wurden in der vorliegenden Arbeit, in Analogie zu den Ergebnissen im Serum, verminderte Konzentrationen an β -HCH und p,p'-DDE gegenüber der normofertilen Vergleichsgruppe gefunden (Abb. 15). Die Belastungsunterschiede der sterilen gegenüber den normofertilen Frauen waren im Serum und Endometrium für beide Verbindungen identisch (siehe Kap. 3.1.3.).

Auch im Endometrium kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass in einer gleichaltrigen Vergleichsgruppe niedrigere Konzentrationen an β -HCH und p,p'-DDE gemessen werden können, als in der sterilen Probandinnenauswahl gemessen wurden. Somit sollte auf keinen Fall versäumt werden, den Einfluß von β -HCH und p,p'-DDE, in den entsprechend relevanten Konzentrationsbereichen, auf estrogene und gestagene Regulationsmechanismen im zyklischen Endometrium zu untersuchen. Solche Untersuchungen sollten vor dem Hintergrund erfolgen, dass β -HCH in der Vergangenheit bereits als estrogen wirksam eingestuft wurde (*Steinmetz et al. 1996*).

Die nichtcoplanaren PCB wurden sowohl im Endometriumpool der sterilen als auch im Endometrium der normofertilen Frauen in den gleichen Konzentrationsbereichen bestimmt. Im Serum der Sterilitätspatientinnen wurden jedoch im Vergleich zu der normofertilen Probandinnenauswahl eindeutig geringere Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der Altersabhängigkeit, die *Lehnert et al. (1994)* fanden, ist es auffällig, dass die PCB trotz des geringeren Durchschnittsalters der entsprechenden Probandinnenauswahl in so hohen Konzentrationen im Endometriumpool gefunden werden konnten (Abb. 15). Dass die im Endometrium der sterilen Frauen nachgewiesenen PCB einen Einfluß auf die Fertilität ausüben könnten, kann somit nicht ausgeschlossen werden, da sie aufgrund der Serumbelastung nicht in so hohen Konzentrationen im Endometrium zu erwarten waren.

Diese Ergebnisse sollten beachtet werden, da aus der Literatur bekannt ist, dass PCB die Fertilität weiblicher Ratten signifikant beeinträchtigen können (*Sager 1994*).

Da sich die Aussagen dieser Arbeit betreffs der Belastung von humanem Endometrium steriler Frauen ausschließlich auf einen Endometriumpool beziehen, der die Uterusschleimhaut von 10 Frauen umfaßte, verbietet sich eine Signifikanzbetrachtung. Innerhalb dieser Arbeit war es nicht möglich, mehrere Gewebepools steriler Frauen zu untersuchen, um unsere Aussagen zu bekräftigen. Dennoch lassen die hier vorgestellten Ergebnisse in Hinblick auf die Belastung des Endometriums steriler Frauen mit CKW Vergleiche zu. Im Kapitel 3.1.2. wurde darüber berichtet, dass in 12 einzelnen Endometrien steriler Frauen eindeutig p,p'-DDE in einer durchschnittlichen Konzentration von 5,2 µg / kg Feuchtgewicht bestimmt werden konnte. Betrachtet man die Konzentration an p,p'-DDE im Endometriumpool von 4,9 µg / kg, so kann von einem realistischen Querschnitt im Gewebepool ausgegangen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf die Konzentrationsbereiche hin, in denen nach Effekten von β-HCH und p,p'-DDE in humanem Endometrium zu suchen ist. Außerdem ergeben sich aus dieser Arbeit Hinweise darauf, dass es im Endometrium steriler Frauen zu erhöhten Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB kommen kann, die dem Altersdurchschnitt dieser Probandinnenauswahl entsprechend nicht zu erwarten waren. Ob die PCB in diesen Konzentrationen die weibliche Fertilität beeinflussen können, kann beim heutigen Wissensstand nicht beurteilt werden. An dieser Stelle sollten die Untersuchungen fortgesetzt werden, um die Frage, ob PCB innerhalb der weiblichen Fertilitätsproblematik eine Rolle spielen könnten, nicht unbeantwortet zu lassen. Für die Aufklärung von möglichen Ursachen weiblicher idiopathischer Sterilität wäre zudem eine Analysentechnik für CKW wünschenswert, die einen Nachweis in Gewebemengen von 0,1 g ermöglicht. Dadurch könnte die Belastung von humanem Endometrium idiopathisch steriler Frauen und von Frauen, bei denen organische Sterilitätsursachen zu definieren waren, getrennt voneinander betrachtet werden.

4.5.4. Hormonelle Parameter und endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in Serum und uterinen Geweben

Innerhalb der Diskussion um die Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung ist es unstrittig, dass diese Stoffe in hormonell gesteuerte Prozesse eingreifen können. Somit besteht die Möglichkeit, dass Entwicklung und Reproduktion beeinflusst werden können. Die Frage, inwieweit die bisher bekannten, meist niedrigen Konzentrationen dieser Stoffe in Lebensmitteln und Umwelt biologisch relevant sind, um unter realistischen Belastungsbedingungen tatsächlich schädigende Wirkungen bei Mensch und Tier auslösen zu können, wird derzeit von einer Reihe von Wissenschaftlern kontrovers diskutiert. Besonders für ein so komplexes System wie das Endometrium sind solche Risikoabschätzungen äußerst schwierig (*Degen et al. 1999*).

In der vorliegenden Arbeit erfolgt erstmalig eine direkte Gegenüberstellung von endogenen und exogenen hormonellen Parametern in humanen Geweben. Eine solche Gegenüberstellung kann auf mögliche Wirkungskapazitäten von Umwelthormonen in einzelnen Geweben hinweisen.

Für die Beurteilung der von einer endokrin wirksamen Substanz aus der Umwelt ausgehenden „Gefahr“ wird die gemessene Belastung der Wirkstärke der Verbindung gegenübergestellt. Im Vergleich zu körpereigenen oder synthetischen Estrogenen ist die Wirkstärke der Umwelthormone im allgemeinen um Größenordnungen geringer. Um eine den körpereigenen Estrogenen vergleichbare Aktivität zu erreichen, müßten die Gewebekonzentrationen der Chemikalien daher entsprechend höher liegen (*Degen et al. 1999*).

Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass β -HCH seine estrogene Wirkung, hinsichtlich des Tumorwachstums in Mausuteri, nicht über die Bindung am Estrogenrezeptor entfaltet, sondern einem nichtklassischen Mechanismus folgt (*Steinmetz et al. 1996*). Dabei liegt die Wirkungsfähigkeit von β -HCH um das 3fache unter der von 17β -Estradiol. β -HCH konnte in der vorliegenden Arbeit im Serum in einer Konzentration nachgewiesen werden, die 10mal so hoch war wie die Konzentration von 17β -Estradiol im Serum (Abb. 16). Im Endometrium entsprach der Überschuß von β -HCH gegenüber dem natürlichen Estrogen nur noch dem 6fachen Wert (Abb. 17). Im Myometrium und Myomknoten war die Belastung gegenüber 17β -Estradiol nur noch dreimal so hoch. In Anbetracht dessen, dass im Endometrium ein 6facher und im Serum ein 10facher Überschuß des Xenoestrogens gegenüber dem natürlichen Estrogen gemessen werden konnte, kann eine Wirkung von β -HCH in diesen Geweben nicht ausgeschlossen werden. Im Serum erreichte β -HCH zudem einen 6fachen Überschuß gegenüber SHBG und einen 2fachen Überschuß gegenüber Testosteron (Abb. 16). Inwieweit β -HCH in die Regelkreise von SHBG und Testosteron einzugreifen vermag ist derzeit völlig unklar.

p,p'-DDE, ein weiterer Vertreter der Gruppe endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt, wurde von *Kelce et al. (1995)* als antiandrogen wirksam eingestuft. Seit dieser Zeit wird diese Verbindung für die Auswirkungen auf die Alligatorpopulation im Apopka See (Florida / USA) verantwortlich gemacht (siehe Kap. 1.3.). Der Einfluß dieser Verbindung auf das endokrine System wurde bisher vorrangig an männlichen Tieren beobachtet und untersucht (*Kelce et al. 1995; Laws et al. 1995; Gray et al. 1996*).

Inwieweit p,p'-DDE den endokrinen Regelkreis der Frau beeinflussen kann, ist bislang unklar. Im Allgemeinen stimulieren Androgene bei Frauen den Haarwuchs im Bereich der Axillen und der Pubes, wirken Libido-steigernd, nehmen Einfluß auf die Größe der Klitoris und der großen Labien. Zudem modulieren sie die Produktion und Sekretion der Gonadotropine im Hypophysenvorderlappen (*Pollow 1990*).

Da Androgene, wie alle Steroidhormone, über spezifische intrazelluläre Rezeptoren wirken, kann es beispielsweise durch eine Blockierung der Androgenrezeptoren durch p,p'-DDE dazu kommen, dass diese Verbindung die Gonadotropin-Sekretion beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde p,p'-DDE in humanen Geweben in Konzentrationen nachgewiesen, die weit über denen von 17 β -Estradiol lagen (Abb. 17). Im Serum lag die Konzentration dieser Verbindung um das 120fache über der durchschnittlichen Konzentration von 17 β -Estradiol (Abb. 16), im Endometrium betrug der Überschuß in etwa das 40fache und im Myometrium sowie Myomknoten wurde ein 30facher Überschuß ermittelt (Abb. 17). Gegenüber Progesteron konnte von allen untersuchten humanen Geweben nur im Serum ein 3facher Überschuß an p,p'-DDE gemessen werden. In den uterinen Geweben lag der durchschnittliche Progesteronspiegel über der Belastung mit p,p'-DDE. Gegenüber SHBG erreichte p,p'-DDE im Serum einen 80fachen Überschuß und gegenüber Testosteron einen 20fachen Überschuß. Bisher wurde p,p'-DDE nicht als estrogen wirksam eingestuft. Daher ist trotz der hohen Belastung humaner uteriner Gewebe und humaner Seren mit dieser Verbindung kein Einfluß auf estrogenen Wirkmechanismen zu erwarten. Ein Einfluß auf androgene Regulationsmechanismen im Organismus der Frau ist jedoch nicht auszuschließen, da diese Substanz im Serum in deutlich höheren Konzentrationen gemessen werden konnte als Testosteron.

Eine Einschätzung, inwieweit einzelne PCB-Isomere in der Lage sind, in das endokrine System der Frau einzugreifen ist schwierig. PCB wurden zwar in der Literatur mehrfach als endokrin wirksam beschrieben, jedoch erfolgten die meisten dieser Untersuchungen unter Verwendung der technischen Produkte Arochlor bzw. Clophen (Cooke *et al.* 1996; Nelson 1974). Deren Isomerenzusammensetzung ist jedoch sehr breit und kann zudem von Fall zu Fall sehr unterschiedlich sein. Somit sind Rückschlüsse auf die endokrine Wirkungsfähigkeit einzelner Isomere schwer möglich.

Im Zusammenhang mit der Massenvergiftung durch PCB in Japan 1968 (Yusho Krankheit) und der Reisölkatastrophe in Taiwan 1979 fand man bei Kindern ein vermindertes Wachstum und bei den Jungen einen kleineren Penis als bei einer nichtexponierten Vergleichsgruppe (Guo *et al.* 1995; Hsu *et al.* 1985). Als Ursache dafür wurden von den Autoren hormonelle Effekte der PCB diskutiert, da Parallelen zu Tierversuchen zu beobachten waren. Inwieweit PCB 138, PCB 153 und PCB 180 im Einzelnen endokrin bzw. estrogen wirksam sein können, ist bisher nicht bekannt.

Für niedrigchlorierte und hydroxylierte PCB konnte eine estrogenen Wirkungsfähigkeit nachgewiesen werden (Crews *et al.* 1995; Korach *et al.* 1988). Zudem wurden vor allem die coplanaren PCB als besonders toxisch eingestuft. Deutlich wird diese Toxizität in ihrer Fähigkeit, die Monooxygenasen Cytochrom P450 und P448 zu induzieren und am Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AH-Rezeptor), der auch als Dioxinrezeptor bezeichnet wird, zu binden. Die Bindung der coplanaren PCB am AH-Rezeptor bewirkt die Bildung von spezifischen Genen und die Synthese von Enzymen. Auf diesem Wege sind die coplanaren PCB in der Lage, verschiedenste regulatorische Mechanismen innerhalb der Reproduktion zu beeinflussen (Schmidt *et al.* 1996; Peterson *et al.* 1993). Der AH-Rezeptor wurde von Küchenhoff *et al.* (1999) in humanem Endometrium nachgewiesen.

Die nichtcoplanaren PCB wurden im Serum der Probandinnen im Durchschnitt mit einem 10fachen Überschuß gegenüber 17 β -Estradiol nachgewiesen (Abb. 16). In humanem Endometrium erreichte PCB 153 maximal einen 4fachen Überschuß gegenüber 17 β -Estradiol (Abb. 17). Ein größerer Überschuß an PCB wurde in keinem der untersuchten uterinen Gewebe erreicht. Gegenüber SHBG hatte PCB 153 im Serum einen 10fachen Überschuß. Die übrigen PCB wurden in geringeren Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 16; Tab. 2 und 6). Testosteron wurde im Serum der Frauen in Konzentrationen bestimmt, die in etwa um den Faktor 3 unter den Belastungen mit PCB 153 lagen. Inwieweit die Konzentrationen in den einzelnen Geweben ausreichen, um in die spezifischen hormonellen Regelkreise einzugreifen, ist zum heutigen Zeitpunkt unklar.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich wichtige Hinweise für experimentelle Aufgabenstellungen, die sich mit der Wirkungsfähigkeit endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt im humanen System beschäftigen. Aus der Kenntniss der realen hormonellen Gesamtsituation im Organismus der Frau, welche endogene und exogene Faktoren beinhaltet, können anhand der vorliegenden Daten erstmalig Untersuchungen erfolgen, die die Verhältnisse in-vivo exakter simulieren. Daraus könnten sich völlig neue Erkenntnisse ergeben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine endokrine Wirkung von β -HCH, p,p'-DDE und der nichtcoplanaren PCB im Organismus der Frau entsprechend ihrer Konzentrationen in Serum und uterinen Geweben nicht auszuschließen ist. Besonders der Einfluß von p,p'-DDE auf das endokrine System der Frau sollte genauer untersucht werden, da diese Verbindung in deutlich höheren Konzentrationen in den Geweben detektiert werden konnte als beispielsweise 17 β -Estradiol, SHBG oder Testosteron (Abb. 16 und 17). Zudem entfielen mindestens 70 % der Belastung der untersuchten Gewebe mit CKW auf p,p'-DDE (siehe Kap. 3.1.1. und 3.1.2.).

4.6. Kompetitionsuntersuchungen

Die endokrine Wirkung von Verbindungen aus der Umwelt wurde in der Vergangenheit an einer Reihe von Modellsystemen getestet und beschrieben. Innerhalb der Diskussion um den Einfluß solcher Substanzen auf die Fertilität der Frau ist deren Auswirkung auf die Steroid-Rezeptor-Bindung von besonderem Interesse. Eine ungestörte Hormonbindung am Rezeptor in humanem Endometrium ist eine Grundvoraussetzung für die biologische Wirkung der Steroidhormone und somit für den zyklusgerechten Aufbau der Uterusschleimhaut (siehe Kap. 1.2.).

In der Literatur wurde mehrfach darüber berichtet, dass DDT bzw. seine Metaboliten, PCB, AP und Phytoestrogene die Steroid-Rezeptor-Bindung in verschiedenen in-vitro Tiermodellen negativ beeinflussen können (*Tran et al. 1996; Lundholm 1988; McBlain 1987; Müller et al. 1978; Nelson 1974; Shutt et al. 1971*). Außerdem wurde nachgewiesen, dass DDT,

Phytoestrogene und AP in der Lage sind, die Bildung von Genen sowie Proteinen, die in der Regel durch die Bindung von 17 β -Estradiol an den Estradiolrezeptoren induziert werden, zu aktivieren (Vollmer 1998; Robinson et al. 1984). Somit ist nicht auszuschließen, dass es im Fall der Anreicherung einer dieser Verbindungen in humanem Endometrium, zu einer Beeinflussung der Steroid-Rezeptor-Bindung kommt. Infolgedessen könnte der Aufbau der Uterusschleimhaut gestört werden, was wiederum zu einer Beeinträchtigung der Fertilität führen kann (siehe Kap. 1.2.).

Daten die belegen, dass eine dieser endokrin wirksamen Substanzen die Bindung von Steroidhormonen an den Rezeptoren aus humanem Endometrium beeinflussen kann, liegen bisher jedoch nicht vor. Ein solcher Beleg ist innerhalb der Diskussion um die Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus tierexperimentellen Studien auf den Menschen nicht nur im reproduktionsbiologischen Bereich von ausschlaggebender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig gezeigt, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanen uterinen Geweben beeinflussen können. In Kombination mit den Ergebnissen aus den Expositionsuntersuchungen hinsichtlich der Belastung von humanem Endometrium wurden die entsprechenden Substanzen in den jeweiligen Gewebekonzentrationen in-vitro untersucht.

4.6.1. Estrogenrezeptoren

Die Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung erfolgten in Kompetitions- und in Sättigungsansätzen an den Steroidrezeptoren aus Kalbsuteri und humanen uterinen Geweben (siehe Kap. 2.3.).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass Coumestrol, Genistein, o,p`-DDE und 4-tert-Octylphenol in dieser Reihenfolge die Bindung von [³H]17 β -Estradiol zu den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri gemäß einer klassischen Hemmungskurve inhibieren konnten (Abb. 18). Verschiedene Arbeiten, bei denen unterschiedliche in-vitro Testverfahren verwendet wurden, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse dahingehend, dass Phytoestrogene gegenüber 4-tert-Octylphenol stärker in der Lage waren, in Estrogenrezeptor vermittelte Prozesse einzugreifen (Kuiper et al. 1997; Hopert et al. 1998, Milligan S.R. et al. 1998; Makela S. 1995).

β -HCH, p,p`-DDT, Lindan, o,p`-DDT und p,p`-DDE hatten ebenfalls einen negativen Einfluß auf die Bindungsaffinität von 17 β -Estradiol zum Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri (Abb. 19). Die Wirksamkeit dieser Verbindungen lag bei einer Konzentration entsprechend dem IC₅₀ von Coumestrol (0,66 μ M) über der von 4-tert-Octylphenol. β -HCH konnte in dieser Konzentration die Radioligandenbindung zum Rezeptor im in-vitro Tiermodell sogar stärker beeinflussen als Genistein. Bei einer Konzentrationssteigerung der Verbindungen im Kompetitionsansatz auf den

IC₅₀ von 4-tert-Octylphenol (200 µM) konnte die inhibitorische Wirkung von β-HCH, p,p`-DDT, Lindan, o,p`-DDT und von p,p`-DDE nur noch geringfügig gesteigert werden. Sie lag in dieser Konzentration deutlich unter der von 4-tert-Octylphenol. Die in diese Untersuchungen eingeschlossenen PCB-Isomere konnten die Radioligandenbindung zum Estrogenrezeptor im in-vitro Tiermodell nicht beeinflussen.

An den Rezeptoren aus humanem Endometrium und Myometrium konnte die inhibitorische Wirkung von Coumestrol, Genistein, o,p`-DDE sowie 4-tert-Octylphenol, die im in-vitro Tiermodell gemessen wurde, bestätigt werden (Abb. 22 und Tab. 10). Um jedoch den IC₅₀ am Estrogenrezeptor aus humanem Endometrium und Myometrium zu erreichen, waren höhere Konzentrationen an Coumestrol, Genistein, o,p`-DDE und 4-tert-Octylphenol erforderlich als im in-vitro Tiermodell. Ursächlich dafür könnte die höhere Affinität von [³H]17β-Estradiol zum Rezeptorprotein in humanem Endometrium und Myometrium gegenüber der in Kalbsuteri sein.

Eine Ausnahme bildete die Wirkung von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Myometrium. Um den IC₅₀ am Rezeptorprotein aus humanem Myometrium zu erreichen war eine deutlich geringere Konzentration dieser Verbindung erforderlich als in Endometrium und in Kalbsuteri. Ob die unterschiedliche Wirkungsfähigkeit dieser Verbindung im Zusammenhang mit der Rezeptorkapazität der einzelnen Gewebe zu suchen ist (Abb. 17), oder auf das Vorhandensein verschiedener Subtypen von Steroidrezeptoren zurückzuführen ist, sollte in künftigen Arbeiten genauer untersucht werden. *Mosselman et al. (1996)* hatten über die Existenz eines zweiten Estrogenrezeptors, des sogenannten beta-Estrogenrezeptors, berichtet (siehe Kap. 1.2.1.).

4-tert-Octylphenol hemmte die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung in humanem Gewebe 55 000 mal schwächer als 17β-Estradiol. Die inhibitorische Wirkung von Coumestrol lag in etwa um den Faktor 250, die von Genistein in etwa um den Faktor 600 unter der von 17β-Estradiol an den humanen Estrogenrezeptoren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Phytoestrogene etwa 100 bis 1000 mal schwächer an den Estrogenrezeptoren agieren als das körpereigene Hormon (*Micsicek R.J. 1994*). Somit lassen sich die vorliegenden Ergebnisse gut in die aus der Literatur bekannten Daten einordnen. Die höhere inhibitorische Wirksamkeit von Coumestrol gegenüber Genistein, die *Shutt et al. (1971)* in Kompetitionsuntersuchungen an Estrogenrezeptoren aus Schafsuteri zeigten, konnte ebenfalls an den humanen Rezeptoren bestätigt werden.

Die inhibitorische Wirkung von o,p`-DDE am Estrogenrezeptor aus humanem Endometrium lag deutlich unter der am selben Rezeptorprotein aus Kalbsuteri (Abb. 18 und 22). Im in-vitro Tiermodell konnte diese Verbindung die Ligand-Estrogenrezeptor-Bindung noch in stärkerem Maße beeinflussen als 4-tert-Octylphenol. In humanem Endometrium erreichte o,p`-DDE in

Konzentrationen, die weit über denen von 4-tert-Octylphenol im Kompetitionsansatz lagen, den IC_{50} am Estrogenrezeptor nicht. Der IC_{50} , den *Nelson (1974)* für o,p`-DDE an den Rezeptorproteinen aus Rattenuteri messen konnte entsprach dem, der in der vorliegenden Arbeit am Estrogenrezeptor aus Kalbsuteri bestimmt wurde (Tab. 8). Im in-vitro Tiermodell war o,p`-DDE in etwa 2 000 mal schwächer als der natürliche Ligand am Estrogenrezeptor. In der Literatur wurde beschrieben, dass Industriechemikalien bzw. Pestizide 1 000 bis 100 000 mal schwächer an den Estrogenrezeptoren agieren als der natürliche Ligand (*Gaido et al. 1997*).

Im Zusammenhang mit der Fragestellung, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanen uterinen Geweben, und im speziellen Fall in humanem Endometrium, beeinflussen können, waren die Verbindungen, die eindeutig in der Uterusschleimhaut normofertiler und steriler Frauen nachgewiesen werden konnten, von besonderem Interesse (siehe Kap. 3.1.1.5. und 3.1.2.2.). Zu diesen Verbindungen zählten β -HCH, p,p`-DDE und in besonderem Maße die nichtcoplanaren PCB, da diese im Endometrium steriler Frauen in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden konnten als zu erwarten war (siehe Kap. 4.5.2.). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass PCB die Fertilität der Frau beeinträchtigen. Da PCB 153 von den analysierten PCB in der höchsten Gewebekonzentration auftrat, wurde sein Einfluß auf die Steroid-Rezeptor-Bindung untersucht.

Aus dem Kapitel 4.5.2. geht hervor, dass beim heutigen Stand der Analysetechnik eine Belastung humaner Gewebe mit 4-tert-Octylphenol sowie eine Anreicherung von Coumestrol und Genistein bei spezifischen Ernährungsgewohnheiten nicht auszuschließen ist. Zudem waren 4-tert-Octylphenol und die Phytoestrogene aus der vorliegenden Arbeit als die stärksten Inhibitoren der Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung hervorgegangen (siehe oben). Daher waren diese Verbindungen in die Untersuchungen die zeigen, inwieweit die Konzentrationen in denen endokrin wirksame Verbindungen in humanem Endometrium nachgewiesen werden können ausreichen, um die Steroid-Rezeptor-Bindung signifikant zu beeinträchtigen, mit eingeschlossen. Dabei lagen den Konzentrationen, in denen die einzelnen Verbindungen getestet wurden die Nachweisgrenzen in humanem Endometrium zugrunde (siehe Kap. 3.2.2.).

Coumestrol konnte in einer Konzentration, die der Nachweisgrenze in humanem Endometrium entsprach, die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung im selben Gewebe nur um 5 % reduzieren (Abb. 24). Genistein und 4-tert-Octylphenol hatten im Vergleich dazu keinen signifikanten Einfluß auf die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung in humanem Endometrium. Weder die Phytoestrogene noch 4-tert-Octylphenol konnten trotz stärkerer Beeinträchtigung der Estrogenrezeptor-Bindung in Kalbsuteri gegenüber der in humanem Endometrium die Bindungsaffinität des Estrogenrezeptors im in-vitro Tiermodell beeinflussen (Abb. 24 und Tab. 12).

Im Vergleich dazu waren p,p'-DDE, β -HCH und PCB 153 in der Lage, in einer Konzentration, die der Belastung in humanem Endometrium entsprach, die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung in diesem Gewebe um etwa 20 % zu reduzieren. Obwohl die Wirkung von p,p'-DDE auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in Kalbsuteri geringer einzuschätzen war, konnte die Bindungsaffinität des Radioliganden zum Rezeptorprotein im in-vitro Tiermodell leicht abgeschwächt werden (Tab.12). β -HCH war nicht in der Lage, die Bindungsaffinität des Estrogenrezeptors aus Kalbsuteri gegenüber seinen Radioliganden zu beeinträchtigen. PCB 153 konnte ebenfalls keinen signifikanten Einfluß auf die Bindungsaffinität des Estrogenrezeptors gegenüber seinen natürlichen Liganden im in-vitro Tiermodell ausüben. Ob die geringe Schwächung oder Stärkung der Steroidaffinität zum Estrogenrezeptor sowie die Reduzierung der Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung durch CKW die Steroidaktivität in humanem Endometrium signifikant beeinträchtigen kann, bleibt unklar. Vor diesem Hintergrund wäre es angebracht, p,p'-DDE, β -HCH sowie PCB 153 in einer Konzentration, die der Belastung in humanem Endometrium entspricht, in biologischen Testverfahren zu untersuchen, die eine Estrogenrezeptor vermittelte Aktivität eindeutig belegen oder ausschließen könnten. Solche Untersuchungen sind wichtig, da alle drei Verbindungen eindeutig in humanem Endometrium normofertiler und steriler Frauen nachgewiesen werden konnten und gleichzeitig in der Lage waren die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung zu beeinflussen (siehe Kap. 3.1.1.6. und 3.1.2.3.). Die Untersuchungen könnten wichtige Hinweise auf das reproduktionstoxikologische, kanzerogene sowie mutagene Wirkungspotential dieser Verbindungen entsprechend der Gewebelastung liefern. Zudem haben tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt, dass die Wirkstärken endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt in-vivo oftmals deutlich über den in-vitro bestimmten Aktivitäten liegen (*Degen et al. 1999*). Es wurde außerdem bisher kein grundlegender Zusammenhang zwischen der relativen Bindungsaffinität endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt an den Steroidrezeptoren und deren biologischer Wirkung gefunden (*Vollmer 1998*).

Eine additive Wirkung der im humanen Endometrium nachgewiesenen CKW konnte nicht festgestellt werden. Weder an den Estrogenrezeptoren aus Kalbsuteri noch an den Estrogenrezeptoren aus humanem Endometrium konnte eine höhere inhibitorische Wirkung, im Vergleich zu den einzelnen Verbindungen, bestimmt werden (Abb. 24).

Somit geht aus den vorliegenden Ergebnissen hervor, dass endokrin wirksame Verbindungen in der Lage sind, die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung in humanem Endometrium zu beeinflussen. Sie weisen darauf hin, dass der Einfluß von Phytoestrogenen sowie AP in humanem Endometrium geringer, der der CKW stärker einzuschätzen ist als im in-vitro Tiermodell. In Verbindung mit den Ergebnissen aus den Expositionsuntersuchungen wurde gezeigt, dass ein Einfluß der Phytoestrogene sowie von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung und somit auf die estrogene Wirkung im zyklischen Endometrium nicht zu erwarten ist.

Die sich in humanen uterinen Geweben anreichernden CKW konnten die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung in der Uterusschleimhaut der Frau entsprechend ihrer Gewebekonzentration geringfügig inhibieren. Inwieweit dies zu einer Beeinflussung der Wirkung von Estrogenen führen kann, sollte in-vivo genauer untersucht werden da bekannt ist, dass die in-vivo Aktivität solcher Substanzen oftmals deutlich über der in-vitro ermittelten Wirkung liegt. Somit kann ein Einfluß von p,p`-DDE, von β -HCH und von nichtcoplanaren PCB auf das zyklische Endometrium, und somit auf die Fertilität der Frau, nicht ausgeschlossen werden.

4.6.2. Gestagenrezeptoren

Die Untersuchungen an den Gestagenrezeptoren ergaben, dass von allen getesteten endokrin wirksamen Verbindungen nur 4-tert-Octylphenol die Bindung des Radioliganden zum Rezeptorprotein aus Kalbsuteri gemäß einer klassischen Hemmungskurve inhibieren konnte (Abb. 20).

Tran et al. (1996) hatten ebenfalls ein inhibitorisches Wirkungspotential von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung in Hefe nachweisen können. Zudem konnten die Autoren eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität des Progesteronrezeptors durch 4-tert-Octylphenol feststellen.

Von den übrigen getesteten Verbindungen hatte β -HCH, nach 4-tert-Octylphenol, den stärksten Einfluß auf die Ligand-Gestagenrezeptor-Bindung im in-vitro Tiermodell (Abb. 21). Bei einer Konzentration, die dem IC₅₀ von Progesteron entsprach, konnte β -HCH die Ligand-Gestagenrezeptor-Bindung stärker inhibieren als 4-tert-Octylphenol. Dieser Effekt wurde im in-vitro Tiermodell auch für o,p`-DDE, p,p`-DDT, Lindan, p,p`-DDE, o,p`-DDT und Genistein beobachtet. Ein Anstieg der Konzentration dieser Verbindungen im Kompetitionsansatz auf den IC₅₀ von 4-tert-Octylphenol konnte die inhibitorische Wirkung nur noch geringfügig steigern. Entsprechend dieser Konzentration (280 μ M) war PCB 153 in der Lage, die Ligand-Gestagenrezeptor-Bindung auf 76 % zu reduzieren. PCB 169 hatte keinen Einfluß auf die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung. *Lundholm (1988)* hatte ebenfalls eine inhibitorische Wirkung von p,p`-DDE, o,p`-DDE und PCB auf die Gestagenrezeptor-Bindung nachweisen können. Er fand jedoch an den Rezeptoren aus Kaninchen und Geflügel einen stärkeren Einfluß dieser Verbindungen als in der vorliegenden Arbeit an den Rezeptoren aus Kalbsuteri gemessen werden konnte.

Die inhibitorische Wirkung von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung konnte an den Rezeptoren aus humanen Geweben bestätigt werden (Abb. 23). Um die Bindung von [³H]-ORG2058 zum Gestagenrezeptor um 50 % zu hemmen, waren an den humanen Rezeptoren geringere Konzentrationen an 4-tert-Octylphenol erforderlich als im in-vitro

Tiermodell (Tab. 11). Im Myometrium konnte 4-tert-Octylphenol den IC_{50} am Progesteronrezeptor am schnellsten erreichen. Die Bindungsaffinität der Gestagenrezeptoren aus dem humanen Myometrium entsprach in etwa der im in-vitro Tiermodell gemessenen. Demnach war die inhibitorische Wirkung von 4-tert-Octylphenol auch an den Gestagenrezeptoren, wie auch schon an den Estrogenrezeptoren beobachtet werden konnte, unabhängig von der Stärke der Bindung des Radioliganden zum Rezeptorprotein. Die Frage, inwieweit verschiedene Subtypen von Progesteronrezeptoren dabei eine Rolle spielen könnten, kann anhand des heutigen Erkenntnisstandes nicht beantwortet werden. *Viville et al. (1997)* hatten in Myometrium und Myomknoten eine A- und eine B- Form des Progesteronrezeptors nachweisen können. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass 4-tert-Octylphenol einen dieser Subtypen in seiner inhibitorischen Wirkung bevorzugt und dieser in höheren Konzentrationen im humanen Myometrium lokalisiert ist als in den übrigen untersuchten uterinen Geweben.

Weder 4-tert-Octylphenol noch Genistein waren in der Lage, in einer Konzentration entsprechend der Nachweisgrenze oder Belastung im Gewebe in humanem Endometrium die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung zu inhibieren (Abb. 25). In Kalbsuteri konnte das AP im selben Konzentrationsbereich die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung auf 86 % reduzieren. Genistein konnte im in-vitro Tiermodell die Steroidbindung um fast 10 % reduzieren. 4-tert-Octylphenol konnte die Bindungsaffinität des Progesteronrezeptors aus Kalbsuteri gegenüber seinem Radioliganden nicht beeinflussen (Tab. 12). Demgegenüber konnte sie durch Genistein geringfügig gesteigert werden.

Da p,p'-DDE, β -HCH und PCB 153 in humanem Endometrium nachgewiesen wurden waren diese Substanzen die interessantesten Verbindung hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung (siehe Kap. 3.1.1.5. und 3.1.2.2.). Entsprechend der Konzentrationen in humanem Endometrium waren weder p,p'-DDE noch β -HCH in der Lage sowohl in Kalbsuteri als auch in humanem Endometrium die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung um 10 % zu reduzieren (Abb. 25).

PCB 153 konnte in Konzentrationen entsprechend der Belastung im Endometrium die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung um 12 % reduzieren. Von allen drei CKW konnte nur p,p'-DDE die Bindungsaffinität des Gestagenrezeptors gegenüber seinem Radioliganden beeinflussen (Tab. 12).

Von einer additiven Wirkung der in humanem Endometrium nachgewiesenen CKW an den Progesteronrezeptoren muß nicht ausgegangen werden. Die inhibitorische Wirkung der einzelnen Verbindungen konnte in einem gemeinsamen Kompetitionsansatz weder in Kalbsuteri noch in humanem Endometrium gesteigert werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass endokrin wirksame Verbindungen in der Lage sind, die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung in humanem Endometrium zu beeinträchtigen. Zudem waren, um dieselbe inhibitorische Wirkung zu erreichen, an den humanen Gestagenrezeptoren geringere Konzentrationen an 4-tert-Octylphenol erforderlich als im in-vitro Tiermodell. Es muß jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass 4-tert-Octylphenol im Fall einer Anreicherung in humanem Endometrium die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung beeinträchtigt. Ob jedoch die inhibitorische Wirkung auf die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung der sich im Endometrium anreichernden CKW oder die von Genistein ausreicht, um die gestagene Wirkung im Endometrium zu beeinflussen, kann nur in-vivo untersucht werden. Besonders der Einfluß der nichtcoplanaren PCB ist dabei von besonderem Interesse, da im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den Expositionsuntersuchungen nicht auszuschließen ist, dass sie ursächlich für das Auftreten von Fertilitätsstörungen im Organismus der Frau sein könnten (siehe Kap. 4.2.3.).

5. Zusammenfassung

Sterilität stellt für betroffene Paare ein ernstes Problem mit großen sozialen und psychischen Belastungen dar. Die Ursachen sind vielfältig und können nur in Ausnahmefällen einem einzigen Faktor zugeordnet werden. Bei etwa 15 % der Frauen bleibt die Ursache der Sterilität ungeklärt. In diesen Fällen handelt es sich um eine idiopathische Sterilität, wobei als Ursache in zunehmendem Maße endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt diskutiert werden. Zu diesen Verbindungen zählen Polychlorierte Biphenyle (PCB), Insektizide, Alcyphenole (AP) sowie Phytoestrogene. Für die Fertilität der Frau ist die ungestörte hormonelle Steuerung von Aufbau und Funktion des Endometriums eine wesentliche Grundvoraussetzung. Der Aufbau der Uterusschleimhaut erfolgt vorrangig über rezeptorvermittelte Prozesse von Estrogenen und Gestagenen. Der Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium wird vermutet, konnte bisher jedoch nicht bewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt erstmalig ein direkter Vergleich der Belastung des Endometriums normofertiler und steriler Frauen mit Chlorierten Kohlenwasserstoffen (CKW), AP und Phytoestrogenen. Parallel dazu wurde untersucht, inwieweit endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanen uterinen Geweben beeinflussen können.

Für die Untersuchungen standen zwei Probandinnengruppen zur Verfügung. Die normofertile Vergleichsgruppe rekrutierte sich aus Frauen, bei denen aufgrund gutartiger Erkrankungen der Uterus entfernt werden mußte. Die sterile Probandinnenauswahl umfaßte Frauen aus der Sterilitätssprechstunde, die sich einer Strichkürretage unterziehen mußten.

Der Nachweis der CKW, AP und Phytoestrogene erfolgte im umweltanalytischen Labor der ERGO Forschungsgemeinschaft mbH in Hamburg unter Anwendung einer hochauflösenden GC-MS. Die Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt auf die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanen uterinen Geweben erfolgten in-vitro anhand des kompetitiven Radioliganden-Bindungs-Assays.

Im Fettgewebe der normofertilen Frauen konnten alle untersuchten CKW eindeutig nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der im Serum bestimmten CKW lagen deutlich unter denen im Fettgewebe. Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass obwohl der Einsatz von PCB sowie der von DDT und β -HCH in Deutschland erheblich eingeschränkt wurde, eine Belastung des Menschen durch diese Substanzen nach wie vor meßbar ist. Dabei scheint die Exposition gegenüber Lindan rückläufig zu sein, gegenüber DDT zuzunehmen und sich gegenüber PCB sowie β -HCH zu stabilisieren.

In allen uterinen Geweben konnten PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p'-DDE eindeutig oberhalb der Nachweisgrenzen bestimmt werden. Dabei wurden im Endometrium die höchsten und in den Myomknoten die niedrigsten Konzentrationen nachgewiesen. Eine Anreicherung dieser Verbindungen in Myometrium und Myomknoten gegenüber Serum konnte nicht beobachtet werden. Dagegen konnte eine Anreicherung von CKW im Endometrium steriler und normofertiler Frauen nachgewiesen werden. Erstmals erfolgte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von PCB, β -HCH und p,p'-DDE in der Uterusschleimhaut steriler Frauen.

Eine Belastung humaner Gewebe mit 4-tert-Octylphenol kann beim heutigen Stand der Analysetechnik nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da die hohen Reagenzienblindwerte, die sich durch die weite Verbreitung von AP in Labormaterialien ergeben, die Analytik erheblich beeinträchtigen. Bei spezifischen Ernährungsgewohnheiten kann eine Belastung von humanen uterinen Geweben mit Phytoestrogenen ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Im Serum der sterilen Frauen wurden geringere Konzentrationen an CKW bestimmt als im Serum der normofertilen Frauen. Entsprechend der Belastungsunterschiede im Serum wurden auch im Endometrium steriler Frauen geringere Konzentrationen an β -HCH und p,p'-DDE bestimmt. Dagegen wurden im Endometrium beider Probandinnengruppen die gleichen Konzentrationen an nichtcoplanaren PCB bestimmt. Unter Berücksichtigung der Unterschiede im Altersdurchschnitt beider Gruppen kann ein Einfluß von p,p'-DDE, von β -HCH und von nichtcoplanaren PCB auf die Fertilität der Frau beim heutigen Erkenntnisstand nicht ausgeschlossen werden.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Fragebogen zu den allgemeinen Lebensgewohnheiten der Probandinnen sollte Hinweise auf mögliche Ursachen einer erhöhten Belastung einzelner Probandinnen liefern. Dem verwendeten Fragebogen konnten im konkreten Fall jedoch keine entscheidenden Hinweise über die Ursachen einer erhöhten Belastung einzelner Probandinnen entnommen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Gegenüberstellung der Konzentrationen von endogenen Hormonen mit endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt in humanen Geweben könnte dazu beitragen, in Zukunft die in-vivo Verhältnisse an geeigneten Modellsystemen exakter simulieren zu können. Daraus könnten sich neue Erkenntnisse in Hinblick auf die Wirkungsfähigkeit ökologisch relevanter Wirkstoffe in humanen Geweben ergeben. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine endokrine Wirkung von β -HCH, von p,p'-DDE und von nichtcoplanaren PCB im Organismus der Frau entsprechend ihrer Konzentrationen im Serum und uterinen Geweben nicht auszuschließen ist. Besonders der Einfluß von p,p'-DDE auf das endokrine System der Frau sollte genauer untersucht werden, da diese Verbindung in

deutlich höheren Konzentrationen in den Geweben detektiert werden konnte als beispielsweise 17β -Estradiol, SHBG und Testosteron. Zudem entfielen bei den untersuchten Geweben etwa 70 % der Belastung mit CKW auf p,p' -DDE.

Die Ergebnisse der Kompletionsuntersuchungen weisen darauf hin, dass endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt in der Lage sind, die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanen uterinen Geweben zu beeinflussen. Der Einfluß von Coumestrol, Genistein und 4-tert-Octylphenol auf die Bindung von Estrogenen an ihren Rezeptor kann mit einer klassischen Hemmungskurve beschrieben werden. Zudem war 4-tert-Octylphenol, als einzige der untersuchten Verbindungen in der Lage, die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung in humanem Endometrium gemäß einer Hemmungskurve zu inhibieren.

Der Einfluß von Phytoestrogenen und von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Estrogenrezeptor-Bindung ist in humanem Endometrium geringer, der von CKW stärker einzuschätzen als im in-vitro Tiermodell. Die Steroid-Gestagenrezeptor-Bindung in humanem Endometrium konnten PCB 153 und β -HCH in stärkerem Maße beeinträchtigen als im in-vitro Tiermodell. p,p' -DDE, 4-tert-Octylphenol und Genistein hatten an den humanen Gestagenrezeptoren, im Vergleich zum in-vitro Tiermodell, einen schwächeren Einfluß.

Betrachtet man die in den Expositionsuntersuchungen ermittelten Belastungen kann nicht davon ausgegangen werden, dass Coumestrol, Genistein oder 4-tert-Octylphenol die Steroid-Rezeptor-Bindung, und somit die rezeptorvermittelte Wirkung der Steroidhormone in humanem Endometrium, beeinflussen. Ein Einfluß dieser Verbindungen auf die Fertilität der Frau ist deshalb nicht zu erwarten.

Dagegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass p,p' -DDE, β -HCH und die nichtcoplanaren PCB den zyklusgerechten Aufbau der Uterusschleimhaut beeinflussen. In Konzentrationen entsprechend der Belastung in humanem Endometrium waren alle drei Verbindungen in der Lage, die Steroid-Rezeptor-Bindung zu inhibieren. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass p,p' -DDE, β -HCH und die nichtcoplanaren PCB die Fertilität der Frau beeinträchtigen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adashi, E.Y.; Rock, J.A.; Rosenwaks, Z. (1996): „Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology.“ Lippincott-Raven Publishers – Philadelphia, New York (ISBN 0-7817-0203-8).
2. Adlercreutz, H.; Goldin, B.R.; Gorbach, S.L.; Höckerstedt, K.A.V.; Watanabe, S. (1995): „Soybean phytoestrogen intake and cancer risk.“ *J. Nutr.* **125**: 7575-7705.
3. Adlercreutz, H. (1996): „Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection.“ *Environ. Health Perspect.* **103**: 103-112.
4. Ahel, M.; McEvoy, J.; Giger, W. (1993): „Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms.“ *Environ. Pollut.* **79**: 243-248.
5. Ahel, M.; Giger, W.; Koch, M. (1994): „Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment I. Occurrence and transformation in sewage treatment.“ *Wat. Res.* **28**: 1131-1142.
6. Auger, J.; Czyglik, F.; Kunstmann, J.M.; Jouannet, P. (1994): „Significant decrease of semen characteristics of fertile men from the Paris area during the last 20 years.“ *Hum. Reprod.* **9**: Suppl. 4, 72.
7. Beier, H.M. (1988): „Umweltbelastungen und Fortpflanzung.“ *Sexualmed.* **17**: 315.
8. Bennetts, H.W.; Underwood, E.J.; Shier, F.L. (1946): „A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia.“ *Aust. Vet. J.* **22**: 2.
9. Binato, G.; Angeletti, R.; Piro, R. (1996): „Pesticides contamination in animal tissue and foods, monitoring results 1993-1994-1995.“ *X Symposium Pesticide Chemistry – Pesticide Residues in the Environment*: 473-481.
10. Brunner, P.H.; Capri, S.; Marcomini, A.; Giger, W. (1988): „Occurrence and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment.“ *Wat. Res.* **22**: 1465-1472.
11. Burgaz, S.; Afkham, B.L.; Karakaya, A.E. (1994): „Organochlorine pesticide contaminants in human adipose tissue collected in Ankara (Turkey) 1991-1992.“ *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **53**: (in press).
12. Burgaz, S.; Afkham, B.L.; Karakaya, A.E. (1995): „Organochlorine pesticide contaminants in human adipose tissue collected in Tebriz (Iran).“ *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**: 546-553.
13. Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E. (1992): „Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.“ *Br. Med. J.* **305**: 609-613.
14. Cassidy, A.; Bingham, S.; Setchell, K.D.R. (1994): „Biological effects of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women.“ *Am. J. Clin. Nutr.* **60**: 333-340.

15. Cassidy, A.; Bingham, S.; Setchell, K.D.R. (1995): „Biological effects isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products.“ *Brit. J. Nutr.* **74**: 587-601.
16. Colborn, F.S.; Vom Saal, A.M.; Soto, A.M. (1993): „Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans.“ *Environ. Health Perspect.* **101**: 378-384.
17. Colborn, T.; Dumanoski, D.; Myers, J.P. (1996): „Our stolen future. Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? – A scientific detective story. Penguin Books USA.
18. Colburn, T.; Clement, C.E. (1992): „Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife / human connection Princeton Scientific.“ Publ. Co. New Jersey.
19. Cooke, P.S.; Zhao, Y.; Hansen, L.G. (1996): „Neonatal Polychlorinated Biphenyl Treatment Increases Adult Testis Size and Sperm Production in the Rat.“ *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**: 112-117.
20. Cooper, R.L.; Chadwick, R.W.; Rehnberg, G.L. (1989): „Effect of lindane on hormonal control of reproductive function in the female rat.“ *Toxicol. Appl. Pharm.* **99**: 384-394.
21. Crews, D.; Bergeron, J.M.; McLachlan, J.A. (1995): „The Role of Estrogen in Turtle Sex Determination and the Effect of PCBs.“ *Environ. Health Perspect.* **103(7)**: 73-77.
22. Davis, D.L.; Bradlow, H.L.; Wolff, M.; Woodruff, T.; Hoel, D.G.; Anton-Culver, H. (1993): „Medical Hypothesis: Xenoestrogens as preventable cause of breast cancer.“ *Environ. Health Perspect.* **101**: 372-377.
23. Daxenbichler, G. (1981): „Steroidhormon-Rezeptoren: Wirkungsmechanismus und Nachweismethoden.“ *Med. Lab.* **11**: 278-285.
24. Degen, G.H.; Foth, H.; Kahl, R.; Kappus, H.; Neumann, H.G.; Oesch, F.; Schulte-Hermann, R. (1999): „Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoestrogene - Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT.“ *DGPT-Forum* **24**: 30-36.
25. Eiletz, J.; Genz, T.; Pollow, K.; Schmidt-Gollwitzer, M. (1980). „Sex Steroid Levels in Serum, Myometrium, and Fibromyomata in Correlation with Cytoplasmic Receptors and 17 β -HSD Activity in Different Age-Groups and Phases of the Menstrual Cycle.“ *Arch. Gynecol.* **229**: 13-28.
26. Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjold, M.; Gustafsson, J.A. (1997): „Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern.“ *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82(12)**: 4258-65.
27. Ensslen, S.Ch.; Riedel, H.-H.; Blüthgen, H.; Heeschen, W.; Grillo, M. (1990): „Chlorkohlenwasserstoffe in Follikelflüssigkeit und Sperma.“ *Fertil.* **6**: 119-122.

28. Faria, T.N.; Matos, M.; Tavares, M.C.F.; Carvalho, A.P. (1984): „Study of the effects of some neuroleptics and insecticides on estrogen-receptor binding of estrogen.“ *Molec. Cell. Biol.* **9**: 233-243.
29. Ferguson, D.J.P.; Anderson, T.J. (1981): „Morphological evaluation of cell turnover in relation to menstrual cycle in the resting human breast.“ *Brit. J. Cancer* **44**: 177-181.
30. Fischer, B. (1987): „Umweltbelastungen und Fortpflanzung: Reproduktionsbiologische und embryotoxikologische Aspekte.“ *Wiss. Umwelt* **2**: 63.
31. Fotsis, T.; Pepper, M.S.; Adlercreutz, A.; Hase, T.; Montesano, R. (1995): „Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis.“ *J. Nutr.* **125**: 790S-797S.
32. Fotsis, T.; Pepper, M.S.; Aktas, E.; Breit, S.; Rasku, S. (1997): „Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis.“ *Canc. Res.* **57**: 2916-2921.
33. Fry, M. (1995): „Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial Chemicals.“ *Environ.Health.Persp.* **103**: 165-171.
34. Gaido, K.W.; Leonard, L.S.; Lovell, S.; Gould, I.C.; Babai, D.; Portier, C.J.; McDonnell, D.P. (1997): „Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Tox. Appl. Pharmacol.* **143**: 205-212.
35. Gedrich, K.; Steinel, M.; Karg, G. (1996): „Ernährungssituation in der Bundesrepublik Deutschland: Lebensmittel- und Nährstoffzufuhr.“ *Ernährungsbericht 1996* (<http://www.bmggesundheits.de/forsch/leit/forsch/23/ubersi2.htm>)
36. Giger, W.; Brunner, P.H.; Schaffner, C. (1984): „4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants.“ *Scien.* **225**: 623-625.
37. Gill, W.B.; Schuhmacher, F.B.; Bibbo, M.; Strauss, F.H.; Schoenberg, H.W. (1987): „Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoptasia and semen abnormalities.“ *J. Urol.* **122**: 36-39.
38. Göretzlehner, G.; Lauritzen, C. (1992): „Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie.“ Walter de Gruyter – Berlin, New York (ISBN 3-11-012293-6).
39. Gray, L.E.; Kelce, W.R. (1996): „Latent effects of pesticides and toxic substances on sexual differentiation of rodents.“ *Toxicol. Industr. Health* **12(3-4)**: 515-531.
40. Greenberg, E.R.; Barnes, A.B.; Ressegue, L. (1984): „Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy.“ *N. Engl. J. Med.* **311**:1393-1398.
41. Guillette, L.J.; Gross, T.S.; Masson, G.R.; Matter, J.M.; Percival, H.F.; Woodward, A.R. (1994): „Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida.“ *Environ. Health Perspect.* **102**: 680-688.

42. Guillette, L.J.; Gross, T.S.; Gross, D.A.; Rooney, A.A.; Percival, H.F. (1995): „Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes.“ *Environ. Health Perspect.* **103**: 31-36.
43. Guillette, L.; Pickford, D.E.; Crain, D.A.; Rooney, A.A.; Percival, H.F. (1996): „Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment.“ *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**: 32-34.
44. Guo, Y.L.; Lambert, G.H.; Hsu, C.C. (1995): „Growth Abnormalities in the Population Exposed in Utero and Early Postnatally to Polychlorinated Biphenyls and Dibenzofurans.“ *Environ. Health Persp.* **103**: 117-122.
45. Herbst, A.L (1981): „Clear cell adenocarcinoma and the current status of DES-exposed females.“ *Cancer* **48**: 484-488.
46. Hofstee, B.H.J. (1952): „On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions.“ *Science* **116**: 329.
47. Hopert, A.-C.; Beyer, A.; Frank, K.; Strunck, E.; Wünsche, W.; Vollmer, G. (1998): „Characterization of Estrogenicity of Phytoestrogens in an Endometrial- derived Experimental Model.“ *Environ. Health Persp.* **106(9)**: 581-586.
48. Husmann, F. (1996): „Climacterium feminine – Pathogenese Früh- und Spät komplikationen Therapie.“ Novo Nordisk Neue Stalling – Oldenburg.
49. Ingram, D.; Sanders, K.; Kolybaba, M.; Lopez, D. (1997): „Case-control study of phytoestrogens and breast cancer.“ *Lancet* **350**: 990-994.
50. James, W.H. (1993): „Secular trend in reported sperm counts.“ *Androlog.* **12**: 381-388.
51. Jobling, S.; Sumpter, J.P. (1993): „Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.“ *Aquatic. Toxicol.* **27**: 361-372.
52. Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. (1995): „A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic.“ *Environ. Health Perspect.* **103**: 582-587.
53. Kallela, K. (1964): „The incidence of plant oestrogens in Finnish pasture and fodder plants with special reference to their possible effects in cases of sterility in ruminants.“ Thesis – Helsinki p132.
54. Keck, C.; Neulen, J.; Breckwoldt, M.; Karck, U.; Schuth, W. (1997): „Endokrinologie Reproduktionsmedizin Andrologie.“ Georg Thieme Verlag – Stuttgart, New York (ISBN 3-13-107161-3).
55. Kelce, W.R.; Stone, C.R.; Laws, S.C.; Gray, L.E.; Kemppainen, J.A.; Wilson, E.M. (1995): „Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist.“ *Nature* **375**: 581-585.

56. King, W.J.; Greene, G.L. (1984): „Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in nuclei of target cells.“ *Nature* **307**: 745-747.
57. Kitts, W.D.; Newsome, F.E.; Runeckles, V.C. (1983): „The estrogenic and antiestrogenic effects of coumestrol and zearalanol on the immature rat uterus.“ *Can. J. Anim. Sci.* **63**: 823-824.
58. Kloth, Ch. (1998): „Vergleichende Bestimmung von polychlorierten Kohlenwasserstoffen im Serum, Fettgewebe, Myometrium und Endometrium.“ Halle, Univ. Diss.
59. Koch, R.; Wagner, B.O. (1989): „Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Genz- und Richtwerte, Umweltverhalten.“ VCH Verlagsgesellschaft – Weinheim (ISBN 3-527-26902-9).
60. Korach, K.S.; Sarver, P.; Chae, K.; McLachlan, J.A.; McKinney, J.D. (1988): „Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: Conformationally restricted structural probes.“ *Molec. Pharmacol.* **33**: 120-126.
61. Küchenhoff, A.; Seliger, G.; Klonisch, Th.; Tscheudschilsuren, G.; Kaltwaßer, P.; Seliger, E.; Buchmann, J.; Fischer, B. (1999): „Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium.“ *Fert. Steril.* **71(2)**: 354-360.
62. Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. (1997): „Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.“ *Endocrin.* **138(3)**: 863-70.
63. Kupfer, D.; Bulger, W.H. (1982): „Estrogenic actions of chlorinated hydrocarbons.“ In: (Ed.) Chambers, J.E.; Yarbrough, J.D. „Effects of chronic exposures to pesticides on animal systems.“ Raven Press – New York: 121-146.
64. Lech, J.J.; Lewis, S.K.; Ren, L. (1996): „In vivo estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout.“ *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**: 229-232.
65. Lehnert, G.; Angerer, J.; Göen, Th.; Schaller, K.-H. (1994): „Referenzwerte für persistente Gefahrstoffe am Beispiel der Konzentrationen an Polychlorierten Biphenylen im Humanserum.“ *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* **29**: 454-458.
66. Leyendecker, G. (1997): „Sterilität – Informationen zu IVF, ICSI, MESA und TESE.“ Demeter Verlag im Spitta Verlag GmbH – Balingen.
67. Liu, H.; Wormke, M.; Safe, S.H.; Bjeldanes, L.F. (1994): „Indolo[3,2-b]carbazole: a dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity.“ *J.Natl. Canc. Inst.* **86**: 1758-1765.
68. Lottspeich, F.; Zorbas, H. (1998): „Bioanalytik.“ Spektrum Akademischer Verlag – Heidelberg, Berlin (ISBN 3-8274-0041-4).
69. Lowry, O.; Rosebrough, N.J.; Lewis Farr, A.; Randall, R.J. (1951): „Protein measurement with the folin phenol reagent.“ *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

70. Lundholm, C.E. (1988): „The effect of DDE, PCB and Chlordane on the binding of progesterone to its cytoplasmic receptor in the eggshell gland mucosa of birds and the endometrium of mammalian uterus.“ *Comp. Biochem. Physiol.* **89C(2)**: 361-369.
71. Makela, S.; Poutanen, M.; Lehtimäki, J.; Kostian, M.L.; Santti, R.; Vihko, R. (1995): „Estrogen-specific 17-beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens.“ *Proceed.Societ. Exp. Biol.Med.* **208(1)**: 51-59.
72. Mäkelä, S.I.; Pylkkänen, L.H.; Santti, R.S.S.; Adlercreutz, H. (1995): „Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice.“ *J. Nutr.* **125**: 437-445.
73. Markaverich, B.M.; Webb, B.; Densmore, C.L.; Gregory, R.R. (1995): „Effects of coumestrol on estrogen receptor function and uterine growth in ovariectomized rats.“ *Environ. Health Perspect.* **103**: 574-581.
74. Melnick, S.; Cole, P.; Anderson, D.; Herbst, A. (1987): „Rates and risks of diethylstilbestrol-related clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix.“ An update. *N. Engl. J. Med.* **316**: 514-516.
75. Micsicek, R.J. (1994): „Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen-receptor.“ *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **49**: 153-160.
76. Moll, W.L.H. (1987): „Taschenbuch für Umweltschutz IV: Chemikalien in der Umwelt.“ Ernst Reinhardt Verlag – München, Basel (ISBN 3-497-01123-1).
77. Mosselmann, S.; Polman, J.; Dijkema, R. (1996): „ER beta: identification and characterization of an novel human estrogen receptor.“ *FEBS Lett.* **392(1)**: 49-53.
78. Mueller, G.; Kim, U.H. (1978). „Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols.“ *Endocrinol.* **102**: 1429-1435.
79. Nelson, J.A. (1974): „Effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) analogs and polychlorinated biphenyls (PCB) mixtures on 17β-[H-3] estradiol binding to rat uterine receptor.“ *Biochem. Pharmacol.* **23**: 447-451.
80. Newbold, R. (1995): „Cellular and molecular effects of the developmental exposure to diethylstilbestrol: Implications for other environmental estrogens.“ *Environm. Health Perspect.* **103(Suppl 7)**: 83-87.
81. Nimrod, A.C.; Benson, W. (1995): „Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).“ In Hinton, D.E. (Ed.) *eight International Symposium „Pollutant Responses in Marine Organisms.“* (PRIMO (8), (pp. Abstract). Pacific Grove, CA, USA: School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA, USA.
82. Noteboom, W.D.; Gorski, J. (1963): „Estrogenic effect of genistein and coumestrol diacetate.“ *Endocrinol.* **73**: 736-739.
83. O`Malley, B.W. (1991): „Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor.“ *Recent Progr. Hormon. Res.* **47**: 1-24.

84. Perel, E.; Lindner, H.R. (1970): „Dissociation of uterotrophic action from implantation-inducing activity in two non-steroidal oestrogens (coumestrol and genistein).“ *J. Reprod. Fertil.* **21**: 171-175.
85. Peterson, R.E.; Theobald, H.M.; Kimmel, G.L. (1993): „Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons.“ *Crit. Rev. Toxicol.* **23**: 283-335.
86. Pollow, K.; Sinnecker, G.; Boguoi, E.; Pollow, K. (1978): „In vitro conversion of estradiol 17 β into estrone in normal human myometrium and leiomyoma.“ *J. clin. Chem. clin. Biochem.* **16**: 493-502.
87. Pollow, K. (1990): „Leitfaden der Reproduktions-Endokrinologie – Biochemische und physiologische Grundlagen, Basisdiagnostik.“ Boehringer Mannheim GmbH.
88. Purdom, C.E.; Hardiman, P.A.; Bye, V.J.; Eno, N.C.; Tyler, C.R.; Sumpter, J.P. (1994): „Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works.“ *Chem. Ecology* **8**: 275-285.
89. Repke, H.; Liebmann, C. (1987): „Membranrezeptoren und ihr Effektorsysteme.“ Akademie Verlag – Berlin.
90. Robinson, A.K.; Mukku, V.R.; Spalding, D.M.; Stancel, G.M. (1984): „The Estrogenic Activity of DDT: The in Vitro Induction of an Estrogen-Inducible Protein by o,p'-DDT.“ *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **76**: 537-543.
91. Ryan, J.J.; Gasiewicz, T.A.; Brown, J.F. (1990): „Human body burden of polychlorinated dibenzofurans associated with toxicity based on the Yusho and Yucheng incidents.“ *Fund. Appl. Toxicol.* **15**: 722-731.
92. Safe, S.H. (1995): „Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem?“ *Environ. Health Perspect.* **103**: 346-351.
93. Saunders, P.T.; Maguire, S.M.; Gaughan, J.; Millar, M.R. (1997): „Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissue visualised by immunohistochemistry.“ *J. Endocrinol.* **154(3)**: R13-6.
94. Scatchard, G. (1949): „The attraction of protein for small molecules and ions.“ *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**: 660-672.
95. Schäfer, W.R.; Zahradnik, H.P.; Frijus-Plessen, N.; Schneider, K. (1995): „Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung: Auswahl von expositionsrelevanten Xenoestrogenen.“ *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, Forschungsbericht.*
96. Schechter, A.; Cramer, P.; Boggess, K.; Stanley, J.; Olson, J.R. (1997): „Levels of Dioxins, Dibenzofurans, PCB and DDE Congeners in Pooled Food Samples Collected in 1995 at Supermarkets Across the United States.“ *Chemosph.* **34(5-7)**: 1437-1447.
97. Schirren, C.; Leidenberger, F.; Frick-Bruder, V.; Hirsch, G.E.; Rudolf, K.; Schütte, B. (1995): „Unerfüllter Kinderwunsch.“ DÄV – Köln.

98. Schlebusch, H.; Wagner, U.; Seeber, B.; Köpernik, H.; Krebs, D. (1991): „Belastung der Muttermilch mit chlorierten Kohlenwasserstoffen in Bitterfeld / Wolfen – Analyse und Bewertung.“ Forschungsbericht 287-294.
99. Schmidt, J.V.; Bradfield, C.A. (1996): „Ah receptor signaling pathways.“ *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**: 55-89.
100. Schwartz, D.; Mayaux, M.J. (1982): „Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands.“ *Federation CECOS. N. Engl. J. Med.* **18**: 404-406.
101. Seliger, E.; Seifert, B.; Rothe, K.; Nickel, I.; Bettzieche, H. (1987): „Die Bestimmung der Estradiolrezeptoren im Endometrium – ein Beitrag zur Diagnostik der funktionellen Sterilität.“ *Zent.bl. Gynäkol.* **109**: 493-500.
102. Shelby, M.D.; Newbold, R.R.; Tully, D.B.; Chae, K.; Davis, V.L. (1996): „Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays.“ *Environ. Health Perspect.* **104**: 1296-1300.
103. Shughure, P.J.; Lane, M.V.; Scrimo, P.J.; Merchenthaler, I. (1998): „Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract.“ *Steroids* **63(10)**: 498-504.
104. Shutt, D.A.; Cox, R.I. (1971): „Steroid and Phyto-Estrogen Binding to Sheep Uterine Receptor in vitro.“ *J. Endocr.* **53**: 299-310.
105. Soto, A.M.; Lin, T.M.; Justicia, H.; Silvia, R.M.; Sonnenschein, C. (1992): „An „in culture“ bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN). In: (Ed.) Colborn, T.; Clement, C. „Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife / human connection. Advances in modern environmental toxicology.“ *Princ. Scien. Publi. Princeton N.J.*: 295-309.
106. SR 1 Assay-Handbuch (1998): BioChem ImmunoSystems GmbH - Freiburg.
107. Stancel, G.M.; Ireland, J.S.; Mukku, V.R.; Robinson, A.K. (1980): „The estrogenic activity of DDT: In vivo and in vitro induction of a specific estrogen inducible uterine protein by o,p`-DDT.“ *Live Scien.* **27**: 1111-1117.
108. Steinmetz, R.; Young, P.C.M.; Caperell-Grant, A.; Gize, E.A.; Madhukar, B.V.; Ben-Jonathan, N.; Bigsby, R.M. (1996): „Novel Estrogenic Action of the Pesticide Residue β -Hexachlorocyclohexane in Human Breast Cancer Cells.“ *Canc. Res.* **56**:5403-5409.
109. Storrang, P.L.; Bangham, D.R.; Cotes, P.M.; Gaines, R.E.; Jeffcoate, S.L. (1978): „The international reference preparation of human pituitary luteinizing hormone for immunoassay.“ *Acta Endokrinol.* **88**: 250-259.
110. Strowitzki, T.; Korell, M.; Thaler, C.J.; Wolff, H. (1996): „Ungewollte Kinderlosigkeit – Diagnostik und Therapie von Fertilitätsstörungen.“ Gustav Fischer Verlag – Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm (ISBN 3-437-21128-5).

- 111.** Struve, I.; Vockel, A. (1994): „Östrogen- und Progesteronrezeptoren.“ Forum Abbott GmbH.
- 112.** Toppari, J.; Larsen, J.C.; Christiansen, P. (1995): „Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects.“ (Report No. 290 for the Danish Environmental Protection Agency) Danish Environ. Protect. Agenc.
- 113.** Tran, D.Q.; Klotz, D.M.; Ladlie, B.L.; Die, C.F.; McLachlan, J.A.; Arnold, S.F. (1996): „Inhibition of progesterone receptor activity in yeast by synthetic chemicals.“ *Bioch. Bioph. Res.Com.* **229(2)**: 518-523.
- 114.** Van der Ven, H.; Van der Ven, K.; Wagner, U.; Schlebusch, H.; AlHasani, S.; Diedrich, K.; Krebs, D. (1991): „Chlorinated hydrocarbon content in serum and genital tract fluids of infertility patients and pregnant women.“ 7th World Congress on IVF and Assisted Procreations.
- 115.** Van Waelegem, K.; De Clerq, N.; Vermeulen, L.; Schoonjans, F.; Comhaire, F. (1994): „Deterioration of sperm quality in young Belgian men during recent decades.“ *Hum. Reprod.* **9**: Suppl. 4, 73.
- 116.** Viville, B.; Charnock, J.D.S.; Sharkey, A.M.; Wetzka, B.; Smith, S.K. (1997): „Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum. Reprod.* **12(4)**: 815-22.
- 117.** Wagner, U.; Schlebusch, H.; Van der Ven, H.; Van der Ven, K.; Diedrich, K.; Krebs, D. (1990): „Accumulation of Pollutants in the Genital Tract of Sterility Patients.“ *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **28**: 683-688.
- 118.** Waliszewski, S.M.; Pardio, S.V.T.; Chantiri, P. J. N.; Aguirre, G. A. A. (1996): „Organochlorine pesticide levels in young Mexicans.“ *Fresen. Environ. Bull.* **5 (5/6)**: 357-360.
- 119.** White, R.; Jobling, S.; Hoare, S.A.; Sumpter, J.P.; Parker, M.G. (1994): „Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic.“ *Endocrinol.* **135**: 175-182.
- 120.** Witkowska, H.E.; Carlquist, M.; Engstrom, O.; Carlsson, B.; Bonn, T.; Gustafsson, J.A.; Shackleton, C.H. (1997): „Characterization of bacterially expressed rat estrogen receptor beta ligand binding domain by mass spectrometry: structural comparison with estrogen receptor alpha.“ *Steroids* **62(8-9)**: 621-631.
- 121.** Wuttke, W.; Jarry, H.; Seidlová, D. (1999): „Endocrine Disrupters.“ *Reproduktionsmed.* **15**: 173-178.
- 122.** Zahradnik, H.P.; Schäfer, W.R.; Herrmann, T.; Deppert, W.; Meinhold, I. (1998): „Interaktion von Xenoöstrogenen, Phytoöstrogenen und Mykotoxinen mit den Fortpflanzungsfunktionen der Frau.“ Forschungsbericht <http://bwplus.fzk.de>.

7. Anhang

Fragebogen zu Umweltbedingungen

I. Medizinische Angaben (vom Arzt auszufüllen)

A: Allgemeine Anamnese

Barcode-Etikett:

Alter:

Größe / Gewicht: /

Diagnose:

.....

operativer Eingriff (Datum):

Menstruation

Menarche (Alter):

Regelabstand (d): / Dauer (d):

Beginn der letzte Regel (Datum):

Parität (Jahr):

Lebendgeburten

Totgeburten

Aborte

Abruptiones

Allgemeine Erkrankungen (Jahr):

.....

.....

Kontrazeptiva:

Haben Sie jemals ja

Kontrazeptiva eingenommen? nein

wenn ja:

IK wann (Jahr):

IUP von - bis (Jahr):.....welche:.....

Pille von - bis (Jahr):..... welche:.....

Liegt die Einnahme von Kontrazeptiva
länger als 3 Monate zurück? ja
nein

Allergien:
.....
.....

Wird oder wurde die Patientin im Zusammenhang mit einer
Sterilitätsproblematik behandelt?

ja
nein

Medikamente (einschließlich Gn-RH-Analoga u.ä.,
Kosmetika - besondere „Kuren“):

Art des Medikaments Einnahme	regelmäßig	sporadisch	seit
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Amalgam - Füllungen ja nein

Frühere Operationen ja nein

Welche (Jahr)?
.....
.....

Datum / Unterschrift vom Arzt:

II. Allgemeine Angaben

A: Wohnung

Wir bitten Sie um einige Angaben zu Ihren Wohnbedingungen:

Sind Sie innerhalb der letzten 12 Monate
umgezogen? ja

nein

Wenn ja, geben Sie bitte Ihre Wohnbedingungen in Ihrer
vorherigen Wohnung an!

Wohnen Sie in:

Gebäude / Bauweise

Beton / Hohlblock
Backsteine
Holz
Fachwerk
Fertighaus

Können Sie in etwa sagen, wann Ihr Haus gebaut wurde?

Ortsgröße:

Stadt, weniger als 100 000 Einwohner
Stadt, mehr als 100 000 Einwohner
Dorf

Charakter des Wohngebietes:

reines Wohngebiet
reines Mischgebiet
reines Gewerbegebiet

Straße vor dem Haus:

stark befahren
nur Stoßzeiten- Verkehr
verkehrsberuhigte Zone
Park-, Gartengebiet

Freie Holzflächen an Wand und Decke

viel
einige
wenige
keine

Möbel

Spanplatten
Massivholz

Bodenbelag

Parkett
Spannteppich
Linoleum
Betonestrich
Fliesen

B: Freizeitsport

Üben Sie eine Sportart aus? ja
nein

Welche?

.....

Befinden Sie sich dabei in

- einer Turnhalle
- Sportstudio
- im Wald / Park
- im Stadtgebiet
- in ländlicher Umgebung

C: Heimwerken / Hobby

Beschäftigen Sie sich mit Heimwerken? / Haben Sie ein Hobby?

- ja
- nein

Womit? / Welches?

Haben bzw. hatten Sie Kontakt zu:

	häufig	selten	kein
Holzschutzmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Farben / Lacke	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Unkrautvernichtungsmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schädlingsbekämpfungsmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

D: Ernährung

Wir bitten Sie um einige Angaben zu Ihren Ernährungsgewohnheiten.

Wie häufig essen Sie Obst und Gemüse?

- täglich
- wöchentlich
- selten

Essen Sie das	Obst	frisch	gekocht	beides
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Gemüse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Bevorzugen Sie Obst und Gemüse aus

- biologischem Anbau
- Markt / Obstladen
- eigenem Garten

Verwenden Sie Schädlings- bzw. Unkrautvernichtungsmittel? ja
nein

gemischt

Wie oft essen Sie:

	täglich	wöchentlich	selten	nie
Schweinefleisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Rindfleisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schaffleisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pferdefleisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wild	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Geflügelfleisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wurst	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schmalz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Milch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Butter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Magarine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quark	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Käse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eier	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sind Sie Vegetarier ? ja nein

wenn ja:

Nehmen Sie ausschließlich pflanzliche Nahrungsmittel zu sich ?

Nehmen Sie nicht nur pflanzliche Nahrungsmittel zu sich ?

Was sind das für nichtpflanzliche Lebensmittel?

.....

E: Rauchen

Haben Sie einmal geraucht ? ja nein

wenn ja: Von wann bis wann?

Rauchen Sie derzeit ? ja nein

AnzahlZigaretten / Tag

.....Zigarren / Tag

Wird in Ihrer näheren Umgebung geraucht?

am Arbeitsplatz

in der Familie

in der Freizeit

F: Arbeitsplatz

Erlerner Beruf:

.....

Ausgeübte Tätigkeiten:

1.....Betrieb:von - bis:.....

2.....Betrieb:von - bis:.....

3.....Betrieb:von - bis:.....

Welchen Einwirkungen waren bzw. sind Sie in Ihrer Berufstätigkeit ausgesetzt?

	stark	gering	gar nicht	weiß nicht
Asbest	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kohle / Teer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Strahlung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Metalle	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Staubbelastung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Schädlingsbekämpfungsmittel
Chemikalien wenn bekannt

welche:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
andere	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Entfernung zum Arbeitsplatz (km):

Welche Verkehrsmittel benutzen oder benutzten Sie auf dem Weg zum Arbeitsplatz hauptsächlich?

- Bahn / S-Bahn
- Straßenbahn
- Bus
- Auto
- Fahrrad
- Fußmarsch

Führt Ihr Arbeitsweg im wesentlichen durch:

- eine Großstadt
- eine Kleinstadt
- ein Dorf
- Fernstraßen / Autobahn

Liegt oder lag Ihr Arbeitsplatz in

- einem Industriegebiet
- einem Mischgebiet
- einem Wohngebiet
- einer Feld- / Waldregion

Gibt es in der näheren Umgebung (5 km) Ihrer Arbeitsstelle

- eine Mülldeponie
- eine Müllverbrennung
- eine stark befahrene Straße
- eine Autobahn
- einen Flugplatz
- ein Heizkraftwerk
- anderes:

Thesen zur Dissertation

„Untersuchungen zum Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau“

Antje Kuntzsch

1. Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt, so zum Beispiel PCB, DDT, HCH, Alcyphenole und Phytoestrogene, sind in der Lage, die Fertilität verschiedener Tierspezies erheblich zu beeinträchtigen. Es ist unklar inwieweit sich diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen.
2. Die in Fettgewebe und Serum gemessenen Konzentrationen an Chlorierten Kohlenwasserstoffen weisen darauf hin, dass obwohl der Einsatz von PCB sowie der von DDT und β -HCH in Deutschland erheblich eingeschränkt wurde, eine Belastung des Menschen durch diese Substanzen nach wie vor gegeben ist.
3. Die Exposition des Menschen gegenüber Lindan scheint rückläufig zu sein, sie scheint gegenüber DDT zuzunehmen und sich gegenüber PCB sowie β -HCH zu stabilisieren.
4. In uterinen Geweben erfolgt eine Anreicherung von PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -HCH und p,p'-DDE. Das Endometrium ist dabei im Vergleich zu Myometrium und Myomknoten am stärksten mit CKW belastet.
5. Auch im Endometrium steriler Frauen reichern sich Chlorierte Kohlenwasserstoffe an.
6. In humanen uterinen Geweben, Serum und Fettgewebe entfallen etwa 70 % der Belastung durch CKW auf p,p'-DDE.
7. Die Belastung von humanem Endometrium steriler und normofertiler Frauen mit CKW liegt über der im Serum.
8. Eine Belastung des Menschen durch 4-tert-Octylphenol kann nicht ausgeschlossen werden.
9. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass sich bei spezifischen Ernährungsgewohnheiten Phytoestrogene im Endometrium anreichern.

10. Die Belastung von Serum steriler Frauen liegt unter der normofertiler Frauen, wenn das Durchschnittsalter der sterilen Probandinnenauswahl jünger ist als das der normofertilen Probandinnenauswahl.
11. Die Belastungsunterschiede zwischen normofertilen und sterilen Frauen, die im Serum für β -HCH und p,p`-DDE gemessen werden können, lassen sich auch im Endometrium nachweisen.
12. Nichtcoplanare PCB werden trotz geringer Belastung im Serum steriler Frauen im Endometrium beider Probandinnengruppen in den selben Konzentrationen angereichert.
13. Eine endokrine Wirkung von β -HCH, von p,p`-DDE und von nichtcoplanaren PCB im Organismus der Frau, entsprechend ihrer Konzentrationen im Serum und in uterinen Geweben, kann nicht ausgeschlossen werden.
14. Endokrin wirksame Verbindungen aus der Umwelt sind in der Lage, die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium zu beeinflussen.
15. Der Einfluß von Phytoestrogenen und von 4-tert-Octylphenol auf die Steroid-Rezeptor-Bindung ist in humanem Endometrium geringer, der von CKW stärker einzuschätzen als im in-vitro Tiermodell.
16. Es muß nicht davon ausgegangen werden, dass Coumestrol, Genistein oder 4-tert-Octylphenol in Konzentrationen entsprechend einer möglichen Belastung in humanem Endometrium die Steroid-Rezeptor-Bindung in humanem Endometrium beeinträchtigen.
17. Ein Einfluß von p,p`-DDE, von β -HCH und von den nichtcoplanaren PCB auf die Steroidwirkung in humanem Endometrium, und somit auf die Fertilität der Frau, kann nicht ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Arbeit entstand im Labor für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Tumordiagnostik der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. habil. F. Röpke (Direktor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin) und Herrn Prof. Dr. habil. K. Neubert (Dekan des Fachbereiches Biochemie / Biotechnologie) für die Überlassung des interessanten Themas und das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit herzlich danken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. E. Seliger (Leiter des Labors für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Tumordiagnostik) bin ich für seine stete Unterstützung und Förderung der Untersuchungen, seine von Vertrauen geprägte Zusammenarbeit sowie seiner Kritik bei der Abfassung der Arbeit besonders dankbar.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, hier im Besonderen Frau OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer, Frau OÄ Dr. med. A. Herrmann und Schwester Ursel, für die großzügige Unterstützung bei der Gewinnung der Gewebeproben.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Tumordiagnostik für ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Spieß für seine großzügige Hilfe bei der Durchführung der radiochemischen Testverfahren bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Herrmann (ERGO Forschungsgesellschaft mbH, Hamburg) für die gute kooperative Zusammenarbeit bei der Analyse der endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt in humanen Geweben.

Zudem danke ich dem Diplombiochemiker Herrn Michael Spinka (Institut für Biochemie, Abteilung Enzymologie) für seine Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse der Rezeptorbindungsstudien.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Torsten ganz herzlich für sein Verständnis, seine Kritik bei der Abfassung und Gestaltung der Arbeit und seine motivierende Unterstützung danken.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, dem Fachbereich Biochemie / Biotechnologie und am Universitätsklinikum Freiburg dem Endokrinologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik vorgelegt.

Antje Kuntzsch

alle (Saale), den 17.03. 2000

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname: Kuntzsch, Antje
geboren am / in: 26.04.1972 / Halle (Saale)
Anschrift: Heinrich Heine Str. 2, 06114 Halle (Saale)
Tel.: 0345 / 522 18 91
e-mail: antje.kuntzsch@medizin.uni-halle.de
Familienstand: ledig

SCHULAU SBILDUNG

1978 – 1988 Polytechnische Oberschule, Gutenberg
1988 – 1990 Erweiterte Oberschule Thomas Münzer, Halle (Saale)
1990 Abitur

HOCHSCHULAU SBILDUNG

09/90 Studium an der Technischen Hochschule Köthen,
Fachrichtung Biotechnologie.
09/92 Vordiplom
09/94 Diplomprüfung an der Otto von Guericke Universität Magdeburg,
Außenstelle Köthen
10/94 – 12/94 Praktikantin am National Defence Research Establishment Umeå
(Schweden), Department of NBC Defence
Thema: „Biologische Reinigung ölkontaminierter Böden“
01/95 – 09/95 Diplomandin am Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale),
Abteilung Hormonforschung
Thema: „Reinigung und Charakterisierung einer Hydroperoxid-Lyase aus
Gerste (Hordeum vulgare L. cv. Salome)“
09/95 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Ingenieurin für
Biotechnologie
10/95 - 12 /95 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie
Halle (Saale), Abteilung Hormonforschung
Thema: „Analyse von Metaboliten des Lipoxygenase-Reaktionsweges in
Gerste (Hordeum vulgare L. cv. Salome)“

seit 1996 Doktorandin im Labor für Gynäkologische Endokrinologie,
Reproduktionsmedizin und Tumordiagnostik an der Klinik und Poliklinik
für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther Universität
Halle-Wittenberg
Thema: „Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Verbindungen
aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau“

PRAKTIKA

10/99 Praktikum im UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,
Sektion Chemische Ökotoxikologie
Thema: „Zelltoxikologie“

10/97 Praktikum im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPB Gatersleben, Arbeitsgruppe In vitro Differenzierung
Thema: „Grundlagen der Säuger-Zellbiologie und der tierischen Zell- und
Gewebekultur“

03/93 – 09/94 studentische Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale),
Abteilung Hormonforschung
Thema: „Jasmonatstoffwechsel“

02/91 - 03/91 Praktikantin im Bereich Bioingenieurtechnik der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
Thema: „Behandlung hochkontaminierter Grundwässer im Wirbelbett-
Biofilm-Reaktor“