

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. F.Röpke)



Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Umweltchemikalien auf die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Solveig Köller

geboren am 22.3.1970 in Merseburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Röpke, Halle
2. Prof. Dr. H. Foth, Halle
3. Prof. Dr. H. Segner, Bern

Verteidigung am 9.September 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004109

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004109>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Chlororganische Verbindungen zählen zu den globalen Umweltkontaminanten. Ihre starke Lipophilie und biologische Stabilität sind die Ursache für ihre Präsenz in allen Bereichen der Natur. Seit Jahren beobachtet man auch eine Anreicherung dieser Substanzen in den Reproduktionsorganen von Menschen und Tieren. Erkenntnisse über Fertilitätsstörungen bei Tieren, die verschiedenen halogenierten Kohlenwasserstoffen ausgesetzt waren, mehrten die Diskussion über ein reproduktionstoxisches Potential einiger dieser Chemikalien. Beim Menschen werden sie als mögliche Ursache der idiopathischen Sterilität vermutet.

Im humanen Endometrium konnten PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE nachgewiesen werden. Die Wirkung dieser halogenierten Kohlenwasserstoffe auf Zellen der Gebärmutter Schleimhaut sollte untersucht werden. Als Modellsysteme dienten die Primärzellkultur des humanen Endometriums und die MCF-7-Zellen. Die Zellen beider Kultursysteme wurden mit der jeweiligen Substanz für 24, 48 und 72 Stunden exponiert. Dabei entsprach die niedrigste Testkonzentration der expositionsrelevanten Konzentration. Nach der Expositionszeit wurde mit der Neutralrotmethode die Menge der lebenden Zellen ermittelt. Bemerkenswert ist, daß alle drei Substanzen in den niedrigen Konzentrationen zur Zellproliferation in beiden Zellsystemen führten. Die Proliferation war bei den MCF-7 Zellen bereits nach 24 Stunden Exposition nachweisbar bei den Primärzellen erst nach 72 Stunden. PCB 153 löste bei den Primärzellen die stärkste Proliferation aus, gefolgt von β -HCH und p,p'-DDE. Bei den MCF-7 Zellen war die Reihenfolge der Wirksamkeit entgegengesetzt. Hier löste p,p'-DDE die stärkste Proliferation aus. In der 10.000fachen Menge der physiologischen Konzentration der Substanzen war die Zellproliferation deutlich rückläufig und stagnierte. Es kam zur Degeneration der Zellen vermutlich durch Inaktivierung der gap junction.

In der Primärzellkultur konnten immunhistochemisch der Estrogen-, Progesteron- und Arylhydrocarbonrezeptor nachgewiesen werden. Ob die beobachtete Zellproliferation über die genannten Rezeptoren vermittelt wird, bleibt noch unklar.

Sicher ist, daß PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE bereits in expositionsrelevanten Konzentrationen modifizierend auf kultivierte Endometriumzellen wirken. Sie sind in der Lage endokrine Regelkreise zu beeinflussen. Die Beeinträchtigung physiologischer Abläufe des Aufbaus des Endometriums und damit der Nidation des frühen Embryos durch chlororganische Verbindungen stellt damit eine mögliche Ursache für Fertilitätsstörungen dar.

Köller, Solveig: Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Umweltchemikalien auf die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2002

| Inhaltsverzeichnis | | Seite |
|---------------------------|--|-------|
| 1. | Einführung in die Thematik | 1 |
| 1.1 | Zielstellung | 2 |
| 1.2 | Endokrin wirksame Umweltchemikalien | 2 |
| 1.3 | Der histologische Aufbau der Gebärmutterschleimhaut | 7 |
| 1.4 | Biologische Wirkung der Estrogene und Gestagene | 8 |
| 1.5 | Chemische Charakterisierung der chlorierten Kohlenwasserstoffe | 10 |
| 1.5.1 | Polychlorierte Biphenyle | 10 |
| 1.5.2 | Bis-(Chlorphenyl)-2,2-Dichlorethylen | 11 |
| 1.5.3 | Hexachlorcyclohexan | 12 |
| 2. | Materialien und Methoden | 13 |
| 2.1 | Substanzen und Chemikalien | 13 |
| 2.2 | Chemikalien und Substanzen für die Immunhistochemie | 14 |
| 2.3 | Lösungen | 15 |
| 2.4 | Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums | 17 |
| 2.4.1 | Präparation der Primärzellen des Endometriums | 17 |
| 2.4.2 | Kulturbedingungen der Primärzellen | 20 |
| 2.4.3 | Zellzahlbestimmung | 20 |
| 2.5 | MCF-7 Ziellinie | 21 |
| 2.5.1 | Kulturbedingungen | 21 |
| 2.5.2 | Passagieren und Zellzahlbestimmung | 21 |
| 2.6 | Expositionsversuche | 22 |
| 2.6.1 | Exposition der Primärzellen | 22 |
| 2.6.2 | Exposition der MCF-7 Zellen | 23 |
| 2.7 | Statistische Datenanalyse | 23 |
| 2.8 | Quantitative Neutralrotmethode | 24 |
| 2.9 | Tetrazolium(MTT-)-Test | 25 |
| 2.10 | Immunhistochemische Methode | 25 |
| 3. | Ergebnisse | 29 |
| 3.1 | Die Etablierung der Primärzellkultur | 29 |
| 3.1.1 | Die Morphologie | 29 |
| 3.1.2 | Vergleich der Kultivierung auf Kunststoff und Kollagen | 30 |
| 3.1.3 | Vergleich der Kultivierung mit und ohne Lösungsmittel | 30 |
| 3.2 | MCF-7 Zellen | 31 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.1 | Morphologie und Wachstumsverhalten | 31 |
| 3.2.2 | Vergleich der Kultivierung mit und ohne Lösungsmittel | 32 |
| 3.3 | Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der Primärzellkultur | 33 |
| 3.4 | Ergebnisse des MTT-Tests | 39 |
| 3.5 | Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen | 40 |
| 3.5.1 | Exposition der Primärzellkultur | 41 |
| 3.5.2 | Exposition der MCF-7 Ziellinie | 45 |
| 3.5.3 | Vergleichende Betrachtung der Exposition zwischen Primärzellen und MCF-7 Zellen | 49 |
| 4. | Diskussion | 51 |
| 4.1 | Zielstellung | 51 |
| 4.1.1 | Modellsystem Zellkultur | 51 |
| 4.1.2 | Testsubstanzen: PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE | 53 |
| 4.2 | Etablierung der Primärzellkultur | 55 |
| 4.2.1 | Kulturbedingungen der Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums | 55 |
| 4.2 | Die immunhistochemischen Untersuchungen | 57 |
| 4.3 | Expositionsuntersuchungen | 60 |
| 4.3.1 | Vergleich des Lösungsmiteleinflusses auf Primärzellen und auf MCF-7 Zellen | 60 |
| 4.3.2 | Methoden zum Nachweis der Viabilität | 61 |
| 4.3.3 | Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen | 62 |
| 5. | Schlußfolgerungen und Ausblick | 67 |
| 6. | Zusammenfassung | 69 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 71 |
| 8. | Thesen | 79 |

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|-------------------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AhR | Arylhydrocarbon Rezeptor |
| Ak | Antikörper |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumine) |
| DDT | Dichlordiphenyltrichlorethan |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EGTA | Ethylen Glycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| ER | Estrogenrezeptor |
| FKS | fetales Kälberserum |
| HCH | Hexachlorocyclohexan |
| HEPES | N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure] |
| ITS | Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Media Supplement |
| Kap. | Kapitel |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| PBS | phosphatgepufferte Salzsäure |
| PCB | polychlorierte Biphenyle |
| PGF _{2α} | Prostaglandin F _{2α} |
| p,p'-DDE | Bis-(Chlorphenyl)-2,2-Dichlorethylen |
| PR | Progesteronrezeptor |
| rpm | rounds per minutes |
| SDS | Laurylsulfat |

1. Einführung in die Thematik

1.1 Zielstellung

Chlororganische Verbindungen werden seit mehreren Jahrzehnten weltweit als Insektizide oder Industriechemikalien genutzt (55). So wurden bereits Ende der zwanziger Jahre polychlorierte Biphenyle (PCB) industriell produziert. Seit dem zweiten Weltkrieg kamen Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und seit den fünfziger Jahren Hexachlorcyclohexan (HCH) als Insektizide zur Anwendung.

Nachdem in den sechziger Jahren *Risebrought et al.* über die Anreicherung chlorierter Kohlenwasserstoffe in der Umwelt berichtete (55), folgten viele Untersuchungen zur Akkumulation derartiger Substanzen im globalen Ökosystem. Die starke Lipophilie und biologische Stabilität ist ursächlich für die Persistenz dieser Stoffe zu sehen (105). Obwohl ihre Produktion und Anwendung in den industrialisierten Ländern Europas und Nordamerikas in den siebziger und achtziger Jahren eingestellt wurde (54), zählen sie noch heute zu den globalen Umweltkontaminaten. Sie lassen sich nicht nur im Boden, in der Luft, in Pflanzen (97) und im Wasser (51, 73), sondern auch in Tieren, so zum Beispiel in Krabben (103), Fischen (84), Eiderenten (71), in Eiern von Wasservögeln (80) oder im Gewebe von Meeressäugern (64, 84) nachweisen. Dabei spielen Tiere am Ende der Nahrungskette eine besondere Rolle (60).

Auch der Mensch wird mit diesen Substanzen konfrontiert. In verschiedenen menschlichen Geweben ließen sich chlorierte Kohlenwasserstoffe nachweisen, unter anderem im Serum (50, 95, 106, 110), im Fettgewebe (95), in der Muttermilch (45, 67, 68, 75, 93), im Zervixschleim (22, 106), in der Follikelflüssigkeit (106, 107) und im Sperma (22, 106, 107).

Blieben Ende der fünfziger Anfang der sechziger Jahre in der BRD noch ca. 7 bis 8% aller frisch geschlossenen Ehen ungewollt kinderlos sind es heute ca. 15% aller Paare (53). Ausgehend von dieser Tatsache stellt sich die Frage, inwieweit die zunehmende Umweltbelastung mit Industriechemikalien und Pestiziden als Ursache für einen Teil der Sterilitäten verantwortlich zu machen ist (101). Ein reproduktionstoxisches Potential für chlorierte Kohlenwasserstoffe wird seit Jahren kontrovers diskutiert.

Im Rahmen eines BMBF-Projektes an unserer Klinik wurde die Konzentration endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt in humanen uterinen Geweben und im Serum fertiler und steriler Frauen bestimmt (48). In fast allen uterinen Gewebeproben konnten eindeutig PCB 138, PCB 153, PCB 180, β -Hexachlorcyclohexan (β -HCH) und p,p'-Bis-(Chlorphenyl)-2,2-Dichlorethylen (p,p'-DDE) quantitativ nachgewiesen werden. Den höchsten Anteil an der

Gesamtbelastung der untersuchten humanen Gewebe, einschließlich Serum und Fettgewebe, hatte p,p'-DDE mit ca. 70%. Von den polychlorierten Biphenylen war PCB 153 das Kongener, welches in allen humanen Geweben in den höchsten Konzentrationen vorlag. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeiten festgestellt werden, daß β -HCH, PCB 153 und p,p'-DDE in den Konzentrationen, die im Gewebe nachgewiesen wurden, in der Lage sind, die Steroid-Rezeptor-Bindung zu beeinflussen. Die Bedeutung dieser Ergebnisse resultiert aus der Tatsache, daß eine Bindung der Sexualsteroiden an ihren Rezeptoren wesentliche Signale für die Proliferation und Transformation des Endometriums darstellt.

Aus diesen Ergebnissen wurde die Fragestellung für die vorliegende Dissertation abgeleitet. Wird die Gebärmutter Schleimhaut in ihrem Aufbau durch die im Endometrium nachgewiesenen Substanzen beeinflusst?

Eine Veränderung des Aufbaus der Gebärmutter Schleimhaut könnte die Nidation der befruchteten Eizelle stören und damit einen Einfluß auf die Fertilität der Frau ausüben. Als geeignetes Modellsystem für die geplanten Untersuchungen wurde die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums ausgewählt, um der in-vivo-Situation des Gewebes nahe zu kommen (111).

Darüber hinaus sollte in der Arbeit die Wirkung der betreffenden polychlorierten Kohlenwasserstoffe auf die MCF-7 Zelllinie dargestellt werden, um die Beeinflussung dieser estrogensensitiven Zellen mit den an Endometriumzellen zu beobachtenden Veränderungen zu vergleichen.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. die Etablierung der Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums
2. die immunhistochemische Charakterisierung der Zellkultur
3. Expositionsuntersuchungen mit PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE an Primärzellen des humanen Endometriums und an MCF-7 Zellen

1.2 Endokrin wirksame Umweltchemikalien

Störungen der sexuellen Entwicklung und der Fortpflanzungsfähigkeit bei Säugern, Fischen, Reptilien und Vögeln werden weltweit beobachtet. Die Diskussion um die mögliche Bedeutung von Umweltfaktoren als Grund für die Kinderlosigkeit von Paaren mit Kinderwunsch basiert auf toxikologischen Erkenntnissen zu verschiedenen Substanzen, die in der Umwelt vorkommen (94).

Unter diesen Umweltchemikalien finden sich auch Chemikalien synthetischer oder natürlicher Herkunft, welche sowohl als „endocrine disruptors“ als auch als „Umwelthormone“

bezeichnet werden, die entweder wie körpereigene Hormone (agonistisch) wirken oder deren Wirkung abschwächen (antagonisieren) können (21).

Bereits 1949 äußerte *Singer* den klinischen Verdacht über den Zusammenhang zwischen der Exposition mit Pestiziden und dem Versagen der Spermienproduktion bei Arbeitern, welche bei der Herstellung der Pestizide Kontakt mit den chemischen Verbindungen hatten (zitiert in 79, 105).

In dem 1962 veröffentlichten Buch „Silent Spring“ von *Rachel Carson*, machte die Autorin die Anwendung von Pestiziden (vorrangig DDT) für eine merkliche Abnahme der Singvogelpopulation im Osten der USA verantwortlich (25). Es stellte sich jedoch später heraus, daß nicht DDT sondern dessen Metabolit DDE toxisch für die Vögel war. DDT wurde als Pestizid gegen Schadkäfer eingesetzt, gelangte mit dem Regen in die Erde und wurde dort von Regenwürmern aufgenommen. In den Regenwürmern kam es zur Bioakkumulation des Metaboliten DDE. Rotkehlchen und anderen Singvögeln nahmen mit den Regenwürmern DDE teilweise in letalen Dosen auf. Aber nicht nur über erhöhte Letalität wurde berichtet, sondern auch über reduzierte Fertilität mit eingeschränkter Eibildung, dem Legen von Eiern mit zu dünnen Schalen, Eierschalenbrüchen, reduzierte Ausbrütbarkeit der Eier, schwächliche Küken mit einer hohen Mortalitätsrate (25, 60).

Ebenfalls bekannt geworden ist die Wirkung synthetischer Chemikalien bei Alligatoren in den Everglades Lake Apopka in Florida. Hier war bei einem Chemieunfall das DDT-haltige Pestizid Dicofol in den See gelangt. Es fiel auf, daß an diesem See viele Alligatoreneier unbefruchtet blieben und die Alligatormännchen einen kleineren Penis hatten (21, 94). Auch hier ist die Wirkung auf den persistierenden Metaboliten p,p'-DDE zurückzuführen, für den antiandrogene Wirkungen nachgewiesen wurden (37).

1968 hatte mit Kanechlor 400 (polychlorierte Biphenyle) verunreinigtes Reisöl zum Kochen die Yuscho-Katastrophe ausgelöst. Betroffene Personen zeigten vorrangig akute Symptome, die sich an der Haut manifestierten, wie akneiforme Eruptionen und Hyperpigmentation. Bezüglich der Reproduktion war die Schwangerschaftsrate der Frauen, die diese Katastrophe miterlebt hatten, nicht erniedrigt (94), aber es waren Wirkungen auf die Nachkommen klinisch auffälliger Mütter nachzuweisen. Es handelte sich dabei häufig um „small-for-date-babies“ (hypotrophe Reifgeborene) mit Hyperpigmentation der Haut und Schleimhäute, Zahnfleischhyperplasien sowie vorzeitige Zahnentwicklung (76).

Die Existenz chemischer Substanzen, welche fähig sind die hormonelle Homeostasis zu verändern, ist also schon seit vielen Jahren bekannt (79). Zu den Stoffen mit estrogenen und antiestrogenen Wirkung zählen klassische Pestizide (z.B. DDT und seine Metabolite, Hexachlorcyclohexan [HCH], Aldrin, Dieldrin), Industriechemikalien (z.B. Alkylphenole,

Bisphenol A, Phthalate, polychlorierte Biphenyle) aber auch zahlreiche Naturstoffe aus Pflanzen und Pilzen (17, 35, 69, 99).

Obwohl in den meisten industrialisierten Ländern Europas und Nordamerikas mittlerweile ein Anwendungsverbot für persistierende Chlorkohlenwasserstoffe erlassen wurde (54), kommen sie vermutlich in Afrika, Asien und Südamerika immer noch zur Anwendung (25).

Auf Grund ihrer Persistenz und langen Halbwertszeit lassen sie sich im Boden, im Wasser und in Pflanzen nachweisen. Sie können sich in der Nahrungskette anreichern und finden sich in Spuren praktisch überall wieder (21). Vorrangig während der Nahrungsaufnahme aber auch über die Haut und die Atmung gelangen die chlorierten Kohlenwasserstoffe in den tierischen Organismus und auch in den Menschen. Spezies, die am Ende der Nahrungskette stehen, sind auf Grund der Akkumulation besonders mit den Substanzen belastet (54, 60).

So findet man zum Beispiel einen Zusammenhang zwischen DDT und anderen chlororganischen Pestiziden und der Akkumulation der Stoffe in Raubvögeln. Die Substanzen gelangen aus dem Boden in das Sediment und Wasser von Flußmündungen und es resultiert eine Anreicherung in Fischen und schließlich in den Fisch fressenden Raubvögeln (25).

Auch *Runs et al.* (84) konnte diese Bioakkumulation innerhalb der Nahrungskette feststellen. Er untersuchte in norwegischen Gewässern den Gehalt bestimmter chlororganischer Verbindungen (polychlorierte Biphenyle, Hexachlorbenzen, Hexachlorcyclohexan, p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDD, Oxychlorane, Transnonachlor) in Garnelen, Fischen und Robben und fand eine zunehmende Akkumulation von hochchlorierten Biphenylen, p,p'-DDE und Oxychlorane zum Ende der Nahrungskette.

Tabelle 1 zeigt PCB Konzentrationen in der Nahrungskette des Genfer Sees (81).

| Untersuchte Probe | PCB Konzentration in ppm/Trockenmasse |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Sediment | 0,02 |
| Wasserpflanzen | 0,04-0,07 |
| Plankton | 0,39 |
| Muscheln | 0,6 |
| ganze Fische | 3,2-4,0 |
| Eier von Haubentauchern | 56 |

Tabelle 1

Da es sich bei den chlororganischen Verbindungen um lipophile Stoffe handelt, erfolgt die Ablagerung im Organismus zu einem großen Teil im Fettgewebe. Durch Verlust von Körperfett kommt es zur Umlagerung in andere Gewebe und Körperflüssigkeiten (71). Dies ist zum Beispiel auch während der Stillphase der Frau der Fall. Hier werden lipophile Stoffe mobilisiert und mit der Muttermilch aus dem Körper ausgeschieden (76). Das erklärt den

verhältnismäßig hohen Gehalt an chemischen Verbindungen aus der Umwelt in der Muttermilch. Drei neuere Studien aus verschiedenen Regionen kamen zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des Schadstoffgehalts der Muttermilch. *Nasir et al. (68)* untersuchte 411 Frauenmilchproben in Jordanien, *Polder et al. (75)* 30 Milchproben in Murmansk und Monchegorsk und *Nakagawa et al. (67)* 125 Milchproben japanischer Frauen. Alle drei analysierten unter anderem chlorhaltige Pestizide wobei p,p'-DDE und β -HCH, die in den höchsten Konzentrationen nachgewiesenen Substanzen waren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *Schlebusch et al. (93)*, der vor ca. 10 Jahren 94 Muttermilchproben aus Mitteldeutschland (Region Bitterfeld, Merseburg) untersuchte und ebenfalls erhöhte Konzentrationen von β -HCH, γ -HCH und DDT in den Bitterfelder Proben fand.

Unabhängig vom Körperfettverlust lassen sich die Stoffe auch in anderen Organen und Körperflüssigkeiten nachweisen.

Im Rahmen der Diskussion über ein reproduktionstoxisches Potential der chlorierten Kohlenwasserstoffe interessierte ihre mögliche Akkumulation in Geweben und Körperflüssigkeiten des Reproduktionstraktes. *Lindenau et al. (55)* fütterte weibliche Kaninchen mit PCB, DDT oder γ -HCH enthaltenden Futter und stellte fest, daß nach 12 bis 15 Wochen eine Anreicherung dieser Stoffe in Ovarien, Eileitern, Follikelflüssigkeit und uterinem Sekret nachweisbar war.

Im Vordergrund der Untersuchungen über die Anreicherung von Umweltchemikalien im menschlichen Reproduktionstrakt standen zum einen die Pestizide α -, β - und γ -HCH, DDT mit seinen Isomeren und Metaboliten und Hexachlorbenzol, sowie zum anderen Industriechemikalien wie die PCB-Kongenerie PCB 138, PCB 153 und PCB 180. Die Anreicherung dieser Substanzen in der Follikelflüssigkeit war niedriger als im Serum (*106*). Während *Ensslen et al. (22)* keine Unterschiede in der Konzentration der chlorierten Kohlenwasserstoffe bei Frauen mit fertilisierten oder nicht fertilisierten Eizellen fand, stellten *Fry et al. (25)* erhöhte Konzentrationen bei Patientinnen mit idiopathischer Sterilität fest. Auch die Konzentration im Sperma lag bei Männern mit idiopathischer Sterilität höher als bei Männern mit organischer Sterilität bei gleichem Spermogrammbezug (*22*).

Wagner et al. (107) und *van der Veen et al. (106)* konnten 10 bis 20 fach höhere Konzentrationen der Substanzen im Zervixschleim im Vergleich zu anderen Geweben und Flüssigkeiten des Reproduktionstraktes feststellen.

Zahradnik et al. (113), *Kloth (43)* und *Seliger et al. (95)* wiesen chlorierte Kohlenwasserstoffe in uterinen Geweben nach, wobei *Seliger et al. (95)* im Endometrium höhere Konzentrationen als im Myometrium fanden.

Der Einfluß der Substanzen auf die Reproduktionsfähigkeit von Säugetieren wurde in verschiedenen Tierversuchen seit den siebziger Jahren untersucht. Eine der frühesten Veröffentlichungen aus dem Jahr 1972 von *Ringer et al.* (78) zeigte eine abnehmende Fertilität bei Nerzen, die mit PCB belasteten Fischen gefüttert wurden.

1976 wurde bei der Ringelrobbe aus der Ostsee ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Fertilität und dem PCB und DDT Gehalt des Meeres festgestellt. Nur 27% der geschlechtsreifen Weibchen der Ostsee waren trächtig, im Vergleich zu 85-90% der gleichen Spezies im Ochotskischen Meer. Der Schwangerschaftstest wurde 4 Monate vor der Wurfzeit durchgeführt. Bei den nicht schwangeren Weibchen fanden sich signifikant höhere DDT und PCB Konzentrationen sowie Hinweise auf abgelaufene Aborte (33).

Ein Rückgang der Implantation von Embryonen bei Mäusen, ebenfalls durch PCB verursacht, wurde von *Orberg et al.* beschrieben (1). Fütterte man junge Ratten mit PCB so trat die Pubertät verfrüht auf, Uteruswachstum wurde ausgelöst und im Erwachsenenalter zeigten die Tiere eine Anovulation (26). Nach Gabe von PCB über zwei Rattengenerationen wurde die Schwangerschaftszahl reduziert, die Wurfgröße nahm ab, die Zahl der Totgeburten stieg und die geborenen Nachkommen waren untergewichtig, was mit einer erhöhten Mortalität der Neugeborenen verbunden war (57). Die Ergebnisse deckten sich mit denen von *Brezner et al.* (11), allerdings wurde hier kein Einfluß auf die Ovulation festgestellt. Bei den Kaninchen, die von *Lindenau et al.* (55) mit β -HCH und DDT gefüttert wurden ließen sich ebenfalls Ovulationsstörungen nachweisen. *Loeber et al.* (59) berichtet über eine Studie mit Ratten, welche nachdem sie 13 Wochen mit 250 mg β -HCH/kg Futter gefüttert wurden, Anovulation und Endometriumhyperplasie entwickelten. Eine Dosis von 50 mg/kg Futter über 5 Tage gegeben führte bereits zur Zunahme des Uterusgewichtes.

1976 arbeiteten *Barsotti et al.* (3) und *Allen et al.* (1) mit Rhesusaffen, welche mit Futter, das PCB enthielt, gefüttert wurden, und konnten bei den weiblichen Tieren veränderte Menstruationszyklen, niedrige Konzeptionsrate sowie einen erhöhten Prozentsatz an Aborten feststellen.

Hinweise auf Reproduktionsstörungen durch Umweltchemikalien beim Menschen sind, neben dem schon erwähnten Nachweis von chlorierten Kohlenwasserstoffen in Geweben und Flüssigkeiten des Reproduktionstraktes auch der beobachtete Zusammenhang von Aborten und dem Nachweis von chlororganischen Verbindungen im Serum der betroffenen Frauen.

Je höher die Konzentration von DDT im Blut schwangerer Frauen um so kürzer war die Schwangerschaftsdauer (26,2 ppb in 25 Fällen einer ausgetragenen Schwangerschaft, 140,8 ppb in 15 Fällen von Frühgeburt, 393,8 ppb bei 10 Aborten) stellten *Saxena et al.* (87) fest. *Leoni et al.* (52) untersuchte das Blut von 120 Frauen mit missed abortion und 120

Frauen mit ausgetragener Schwangerschaft und fand bei den Frauen mit missed abortion höhere PCB Spiegel als bei der Kontrollgruppe. DDT und Hexachlorbenzen waren dagegen ohne Konzentrationsunterschiede in beiden Gruppen nachweisbar. Auch *Bercovici et al.* (4) konnte erhöhte PCB Spiegel bei Frauen mit missed abortion feststellen.

Der schädigende Einfluß von polychlorierten Biphenylen auf präimplantative Kaninchenembryonen konnte von *Lindenau et al.* (56) gezeigt werden. Hier wurden 3 Tage alte Morulae von Kaninchen kultiviert und mit Arochlor 1260 (technisches PCB Gemisch) in verschiedenen Konzentrationen (0,5µg, 5µg, 50µg) behandelt. Bei der höchsten Konzentration kam es zur kompletten Degeneration der Embryonen. Bei der mittleren Konzentration konnten sich nur 16% zur Blastozyste weiterentwickeln. Die mit der niedrigsten Konzentration behandelten Morulae zeigten keine oder nur eine leichte Beeinflussung der Entwicklung. Außerdem ließ sich beobachten, daß nach einer 14 tägigen Behandlung von trächtigen weiblichen Kaninchen mit PCB, sich dieses in den 6 Tage alten Blastozysten anreicherte und zu einem Absterben kurz vor der Implantation führte.

All diese Beobachtungen mehren die Vermutungen und Spekulationen, daß auch der Mensch in Hinblick auf die Fertilität von den endokrin wirksamen Umweltchemikalien negativ beeinflusst wird. Schlüssige Beweise für die Verschlechterung der menschlichen Fertilität durch Umweltchemikalien gibt es nicht, nur Hinweise, die ein Risiko nicht ausschließen und durch weitere Untersuchungen geklärt werden müssen (91).

1.3 Der histologische Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut

Das gesamte Cavum uteri ist mit Endometrium ausgekleidet, dessen Oberfläche von einem einschichtigen, prismatischen Epithel gebildet wird. Dieses Oberflächenepithel besteht aus Zellen mit Kinozilien und sezernierenden Zellen mit Mikrovilli (92).

Das Endometrium gliedert sich in das Stratum basale und Stratum funktionale.

Das Stratum basale ist etwa 1 mm hoch und bildet die unterste Schicht, welche während der Menstruation nicht abgestoßen wird. Es ist reich an Bindegewebe und geht kontinuierlich in das myometriale Bindegewebe über (92). Außerdem enthält es die verzweigten Endabschnitte der Drüsen des Endometrium. Vom Stratum basale geht in der Proliferationsphase der Aufbau des Stratum funktionale aus.

Das Stratum funktionale unterliegt den zyklischen Veränderungen der geschlechtsreifen Frau und wird während der Menstruation abgestoßen. Es besteht aus zellreichem, faserarmem Bindegewebe, dem Stroma endometrii, und enthält Drüsen, die Glandulae uterinae, sowie Gefäße und vereinzelt Nervenfasern.

Das Stroma endometrii ist mesenchymartig und bildet die Lamina propria mucosa. Zu den Bindegewebszellen gehören ortsständige Zellen, die Fibroblasten, und freie, mobile Zellen, die Mastzellen, Granulozyten, Plasmazellen, Lymphozyten und Chromatophoren. Die Fibroblasten sind spindelförmige, mäßig verzweigte Zellen mit länglichem Kern. Zwischen den Zellen spannt sich ein Netzwerk aus kollagenen und retikulären Fasern. Die Grundsubstanz des Bindegewebes enthält Glykoproteine.

Die exokrinen Glandulae uterinae sind tubulär und haben ihren Ursprung im Stratum basale, wo sie sich verzweigen können. Der Drüsenschlauch ist mit Epithelzellen ausgekleidet (82). Das Drüsenepithel besteht im wesentlichen aus sezernierenden Zellen, aber auch aus Flimmerzellen (92).

Die Gefäße im Stratum funktionale verlaufen stark gewunden und werden auch als Spiralarterien bezeichnet. Sie entspringen aus Arteriolen und bilden ein oberflächliches Kapillarnetzwerk.

Mit Beginn der Geschlechtsreife setzen zyklische Veränderungen der Gebärmutter Schleimhaut ein, die sich in einem Rhythmus von ungefähr 28 Tagen wiederholen und der direkten hormonellen Steuerung des Ovars unterliegen. Dabei kommt es zum Aufbau des Stratum funktionale in der Proliferations- und Sekretionsphase. Die Gebärmutter Schleimhaut wird auf die Nidation der befruchteten Eizelle vorbereitet. Ist im ablaufenden Zyklus keine Befruchtung der Eizelle erfolgt, so wird das Stratum funktionale in der Desquamationsphase abgestoßen. Zum Ende der Menstruation besteht das Endometrium aus dem Stratum basale, welches sich epithelisiert.

1.4 Biologische Wirkung der Estrogene und Gestagene

Zielorgane von Estrogenen und Gestagenen bei der Frau sind Uterus, Tuben, Vagina, Vulva, Mammae sowie Urethra, Harnblase (28), Hypophyse und Hypothalamus (102). Die Wirkung der Sexualsteroiden wird über spezifische Rezeptoren, die in den Zielorganen lokalisiert sind, vermittelt. Dabei diffundieren die lipophilen Hormone vorerst ins Zytoplasma, werden dort an einem Rezeptorprotein gebunden und wandern dann in den Zellkern (38). Nach Bindung des Liganden an der Hormonbindungsdomäne des Rezeptors verändert der

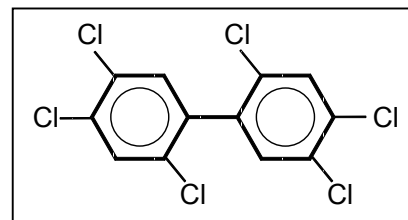
Hormon-Rezeptor-Komplex seine Struktur und kann mit seiner DNA-bindenden Domäne an der DNA angreifen. Die DNA mRNA-Transkription wird induziert. Es kommt zur vermehrten Bildung von mRNA. Diese induziert in den Ribosomen die Bildung spezifischer Proteine, die zur Zellantwort führen (96). Kürzlich erfolgte beim Estrogenrezeptor die Entdeckung eines α -Estrogenrezeptors und β -Estrogenrezeptors. Beide Rezeptorsubtypen unterscheiden sich in ihrer C-terminalen Ligandenbindungsdomäne und in ihrer N-terminalen Transaktivationsdomäne (47), dabei wird der α -Estrogenrezeptor als der klassische Rezeptor bezeichnet (104). Es wird angenommen, daß die Hauptaufgabe des β -Estrogenrezeptors darin besteht, die estrogene Wirkung zu vermitteln (104) und Effekte des α -Estrogenrezeptors zu modulieren (109).

Im Organismus lösen Estrogene durch die Induktion der Synthese verschiedener Wachstumsfaktoren (36) proliferative Prozesse mit Zell- und Organwachstum aus (Wachstum von Uterus, Vagina, kleinen Labien in der Pubertät, Entwicklung der Mammæ, Ausbildung der typischen Beckenform und weiblicher Schambehaarung, zyklische Proliferation des Endometrium während der Geschlechtsreife). Außerdem bewirken sie die zyklischen Veränderungen der Zervixschleimkonsistenz, stimulieren die Motilität der Tuben und die Bildung des Tubensekrets, fördern den Befruchtungsvorgang, induzieren die Synthese von Progesteron- und Prolaktinrezeptoren. Sie führen zur Wasser- und Natriumretention, fördern die Prolaktinsynthese und -sekretion, regulieren die endometriale Prostaglandinsynthese und -freisetzung im Zusammenspiel mit Progesteron, senken den Gesamt- und LDL-Cholesterinspiegel und beeinflussen die vegetative Reaktionslage im parasymphotischen Sinn (28, 36, 38).

Die Hauptaufgabe des Progesterons (als wirksamstes Gestagen) ist es, den Genitaltrakt der Frau für die Aufnahme und Reifung der befruchteten Eizelle vorzubereiten und die Schwangerschaft zu erhalten (96). Die Wirkung des Progesterons kann nur eintreten, wenn sich zuvor durch estrogene Stimulation Progesteronrezeptoren gebildet haben (102). Es vermittelt den Umbau der Gebärmutter Schleimhaut in der Sekretionsphase des Zyklus, um die Implantation der Zygote zu ermöglichen. Es reduziert die Myometriumaktivität, der Tonus des Myometriums wird niedriger, der Uterus wird in der Schwangerschaft ruhig gestellt (102). Auch der Tonus der glatten Muskulatur außerhalb des Uterus wird herabgesetzt (102). Es verändert die Konsistenz des Schleimpfropfes. In der Brust wird durch Progesteron und andere Hormone (Prolaktin, Somatostatin) die Entwicklung des Milchgangsystems stimuliert (96). Zusätzlich hat Progesteron thermostimulierende Eigenschaften und führt am Ovulationszeitpunkt zu einem Anstieg der Basaltemperatur um 0,4 bis 0,6°C (38). Es wirkt auf das Vegetativum in sympathikotoner Hinsicht.

1.5 Chemische Charakterisierung der chlorierten Kohlenwasserstoffe

1.5.1 Polychlorierte Biphenyle (PCB)



PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl) ist eines der 209 Isomeren und homologen Vertreter der polychlorierten Biphenyle (76), die sich je nach Chlorgehalt unterscheiden, und die mit der nach Ballschmiter und Zell benannten BZ-Nummer charakterisiert werden können. In der Praxis sind es in der Regel schwer trennbare Gemische mit einem Chlorgehalt von 30%-60%. Es sind farblose Flüssigkeiten mäßiger bis hoher Viskosität, die in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löslich sind, in Wasser, Glycerin und Glykolen aber kaum. Sie sind lipophil und hydrophob. PCB werden in der Umwelt nur sehr langsam abgebaut. Es wird eine biologische Halbwertszeit von 10 bis 100 Jahren diskutiert.

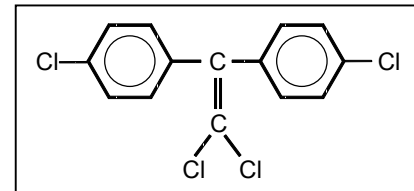
Sie finden nach ihrer Herstellung Anwendung in der Industrie und Landwirtschaft und werden und wurden verwendet als Kühl- und Isolierflüssigkeiten in Transformatoren, als Weichmacher für Lacke, Klebstoffe und Kunststoffe, als Schmierstoffe, als hydraulische Flüssigkeiten, als Flammschutz- und Imprägnierungsmittel in der Textilindustrie, als Papierbeschichtungsmittel und in Pestiziden. Weltweit wurden seit 1929 750000 t PCB, mit einem Maximum von 70000 t PCB im Jahr 1970, produziert und unter Warenzeichen wie Aroclor, Clophen, Kanechlor, Phenochlor u.a. eingesetzt.

Der Einsatz der PCB wurde durch EG-Richtlinien von 1976 stark eingeschränkt. Der Grund hierfür war nicht nur ihre Toxizität, sondern vor allem ihre Persistenz, zumal die PCBs als Chloraromaten ebenso wie DDT u.a. Chlorkohlenwasserstoffe heute zu den globalen Umweltkontaminanten zählen. In den USA wurde die Produktion 1977 eingestellt. In der BRD durften PCB seit 1972 nur noch in geschlossenen Systemen eingesetzt werden und seit 1983 wurde auch hier die Produktion eingestellt (76). Weltweit wurde der Anteil der PCB-Immission bis 1970 auf 30000 t in der Atmosphäre, 60000 t in Oberflächengewässern und 300000 t in Böden geschätzt. Man geht von einer Produktlebensdauer der offenen Systeme, wie sie vor 1972 verwendet wurden, von 10 bis 20 Jahren und der geschlossenen Systeme von 20 bis 50 Jahren aus (76). 1966 wurden erstmals in der Umwelt polychlorierte Biphenyle von Jensen et al. nachgewiesen (11). PCB-haltige Abfälle gelten heute als Sondermüll.

PCB sind Komponenten des globalen Ökosystems. Sie kommen in der Luft, im Wasser, im Boden, in Tieren und im menschlichen Gewebe vor (85). Auf Grund ihrer Lipophilie, der Anreicherung in der Nahrungskette und der Persistenz kumulieren sie im Körperfett von Tier

und Mensch. Dabei werden vor allem die giftigen hochchlorierten Verbindungen abgelagert, während die niedrig chlorierten zum Beispiel mit der Muttermilch ausgeschieden werden. Bei Vergiftungen mit PCB treten unter anderem Chlorakne, Porphyrie, Schäden an der Leber und dem Nervensystem sowie Veränderungen im Blutbild auf (81).

1.5.2 Bis-(Chlorphenyl)-2,2-Dichlorethylen (DDE)



DDE ist der Hauptmetabolit von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und besitzt selbst keine insektizide Wirkung mehr. DDT ist ein breit wirksames nicht systemisches Insektizid mit lang anhaltender Kontakt- und Fraßgiftwirkung. Ein weiterer Hauptmetabolit ist Dichlor-(p-Chlorphenyl)-Ethan (DDD), das in Insekten und Warmblütern nachgewiesen werden konnte (81).

Bei der industriellen Herstellung von DDT entsteht ein Gemisch von ca. 70% p,p'-DDT und ca. 20% o,p'-DDT. Im Gegensatz zu p,p'-DDT ist o,p'-DDT nur schwach insektizid.

DDT wurde 1874 von Othmar Zeidler erstmals im Labor synthetisiert, seine insektizide Wirkung wurde aber erst 1939 von Paul Müller entdeckt. Die hohe Insekten- und geringe Warmblütertoxizität verhalfen dem Stoff schnell zur Anwendung in der medizinischen Hygiene während des Zweiten Weltkrieges und in der Nachkriegszeit. Durch Bekämpfung der Vektoren (bzw. Erreger) konnten Erkrankungen wie Malaria, Fleckfieber, Typhus und Cholera wirksam eingedämmt werden. Allerdings haben manche Insektenarten eine Resistenz gegen DDT entwickelt. Man vermutet, daß diese Insekten ein Enzym bilden können, das DDT zu DDE abbaut.

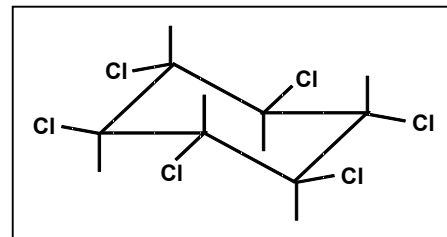
Nach Aufnahme von ca. 300-500 mg treten beim Menschen erste Krankheitssymptome wie Schweißausbrüche, Parästhesien an Lippen und Zunge, Kopfschmerzen und Übelkeit auf. Erst bei Dosen von über 1 g kommt es zu Gleichgewichtsstörungen, Verwirrtheit, Tremor, Krämpfen und Herzrhythmusstörungen. Chronische Vergiftungen sind nicht bekannt.

DDT war jahrelang das wichtigste Insektizid, 1963 wurden fast 100000 t weltweit produziert. Die Angst vor Anreicherung in der Umwelt und der Nachweis im Fettgewebe von Warmblütern, sowie die nicht einschätzbare Wirkung auf Mensch und Tier führten dazu, daß die Produktion und Anwendung von DDT Anfang der 70-er Jahre nach und nach in allen Industrieländern verboten wurde. In der BRD gilt seit 1972 das DDT-Gesetz. In der DDR und anderen osteuropäischen Staaten wurde DDT noch bis Ende der 80-er Jahre eingesetzt (91).

Auch Entwicklungsländer schlossen sich diesen Restriktionen an, was dazu führte, daß die Zahl der Malariaerkrankungen wieder drastisch zunahm. Vielerorts wird DDT nun wieder zur

Bekämpfung der Malaria-übertragenden Anophelesmücke eingesetzt, da es zur Zeit keine wirksamere und preiswertere Alternative gibt (81).

1.5.3 Hexachlorcyclohexan (HCH)



Das technische HCH enthält 65-70% α -HCH, 7-10% β -HCH, 14-15% γ -HCH, 7% δ -HCH, 1-2% ϵ -HCH sowie 1-2% sonstige Verbindungen wie Heptachloro- und Octachlorocyclohexan. Durch Extraktion mit Methanol wird γ -HCH aus dem Isomerengemisch isoliert. γ -HCH findet als Lindan Anwendung als Insektizid bevorzugt gegen Bodenschädlinge (in Form von Saatgutbehandlungsmittel) und gegen rindenbewohnende Forstschädlinge. Es ist Bestandteil von Holzschutzmitteln und findet im außereuropäischen Bereich bei der Bekämpfung von Parasiten an Nutztieren Verwendung, außerdem wird es gegen Vorratsschädlinge, Wanzen in Kakao- und Schadkäfer in Kaffee-Plantagen angewendet (81).

1825 entdeckte Faraday die Bildung von HCH aus Benzol und Chlor, 1912 wurden die Isomere α , β , γ , δ von van der Linden isoliert. Auf die insektizide Wirkung wurde erstmals 1933 von Bender hingewiesen. 1950 wurde Lindan in der Landwirtschaft eingeführt und dort anstatt des technischen HCH eingesetzt. In der BRD wurde zwischen 1974 und 1978 die Anwendung des technischen HCH in der Landwirtschaft, in der Veterinärmedizin, im Forst- und Holzschutz verboten.

α -HCH und γ -HCH verteilen sich in der Umwelt wegen ihrer besseren Wasserlöslichkeit und ihres höheren Dampfdruckes leichter als β -HCH und δ -HCH. Der Abbau erfolgt durch Mikroorganismen und Sonnenlicht. Von den vier genannten Isomeren wird Lindan am schnellsten abgebaut, die Halbwertszeit beträgt etwa ein halbes Jahr.

Bezüglich der Toxizität bestehen zwischen den einzelnen HCH-Isomeren deutliche Unterschiede. Während α - und γ -HCH das Zentralnervensystem stimulieren, verursachen β - und δ -HCH eine depressive Stimmungslage. Die akute Toxizität von Lindan ist höher als die von α - und β -HCH, bei der chronischen Toxizität verhält es sich wegen der besseren Wasserlöslichkeit von Lindan genau entgegengesetzt. Allerdings konnte auch nach langjähriger Exposition bei Arbeitern in der HCH- und Lindan Produktion, deren Blut etwa 100mal mehr α -, β - und γ -HCH enthält als das der Normalbevölkerung, keine Gesundheitsgefährdung festgestellt werden (81).

2. Materialien und Methoden

2.1 Substanzen und Chemikalien

| Substanzen/Chemikalien | Hersteller/Lieferant |
|--|--|
| Dulbecco's Medium ohne Phenolrot - mit Natrium Pyruvat, - mit 1000mg/l Glucose, - mit Pyridoxin | GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Ham's F-12 Medium (1x) ohne Phenolrot - mit 1,176 g/l NaHCO ₃ - ohne L-Glutamin | BIOCHROM KG, Berlin |
| RPMI 1640 Medium - Dutch Modifikation - ohne L-Glutamin | GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Fötales Rinderserum (FKS) | GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Media Supplement (ITS) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Penicillin/Streptomycin 10000 IE / 10000 µg/ml | Biochrom KG seromed, Berlin |
| L-Glutamin (200 mM) | Biochrom KG seromed, Berlin |
| Amphotericin B Lösung | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | Biochrom KG, Berlin |
| Trypsin vom Rinderpancreas | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| EGTA (Ethylen Glycol-bis(β-Aminoethyl- ether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Collagenase Typ: CLS II | Biochrom KG, Berlin |
| Hyaluronidase Typ : I-S : vom Rinderhoden | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Protease | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Hühnerserum | GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Deoxyribonuclease I (DNase I) vom Rinderpancreas | SERVA Feinbiochemica, Heidelberg |
| HBSS Hanks 1x (Hank's balanced salt solution) | GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Pancreatin 4xNF | GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Rinderserumalbumin (BSA) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Neutralrot (3-Amino-7-Dimethylamino-2- Methylphenazin Hydrochlorid) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| MTT (Thiazolylblau) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Triton X-100, reduzierte Form | Fluka AG, Neu-Ulm |
| Laurylsulfat (SDS) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Ethanol 96%, reinst | Merck KGaA, Darmstadt |

| | |
|--|-------------------------------|
| Essigsäure 100% | Laborchemie Apolda GmbH |
| Ultrareines Wasser, steril | Biochrom KG, Berlin |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Trypanblau 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung | Biochrom KG, Berlin |
| Natriumchlorid | VK Labor- und Feinchemikalien |
| Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O) | VEB Laborchemie Apolda |
| D(+)-Glucose-Monohydrat | Merck KGaA, Darmstadt |
| HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'- [2-Ethansulfonsäure]) | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| Kaliumchlorid | VEB Laborchemie Apolda |
| 17β-Estradiol | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH |
| β-1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexan (β-HCH) | Promochem GmbH, Wesel |
| 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 153) | Promochem GmbH, Wesel |
| 1,1-Bis-[4-Chlorphenyl]-2,2-Dichlorethylen (p,p'-DDE) | ALDRICH Chemie, Steinheim |

2.2 Chemikalien und Substanzen für die Immunhistochemie

| Substanzen/Chemikalien | Hersteller/Lieferant |
|--|---|
| DAKO LSAB 2 Kit Peroxidase | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg |
| Methanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Formaldehyd 4,5%, neutral gepuffert | Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken |
| MAYERS Hämalaunlösung | Merck KGaA, Darmstadt |
| Aquatex | Merck KGaA, Darmstadt |
| Monoclonal Anti-Keratin (NCL-5D3) | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege |
| Monoclonal Anti-Vimentin (Mouse) | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege |
| MIB 1: Monoclonaler Antikörper gegen das Ki-67 | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg |
| Maus Anti-Human Progesteron-Rezeptor, Clon PgR 636 | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg |
| Maus Anti-Human Estrogen-Rezeptor, 1D5 | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg |
| Maus Anti-Human Desmin, D33 | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg |
| Anti-Ah (Dioxin) Receptor (Maus Polyclonal Ascites) | dianova GmbH, Hamburg |

2.3 Lösungen

a. zur Kultivierung der Primärzellkultur:

| | | |
|----------|-------------------------------------|-----|
| Medium A | Dulbecco's Medium/Ham's F-12 Medium | 1:1 |
| | FKS | 10% |
| | L-Glutamin | 1% |
| | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | Amphotericin B | 1% |
| Medium B | Dulbecco's Medium/Ham's F-12 Medium | 1:1 |
| | ITS | 10% |
| | L-Glutamin | 1% |
| | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | Amphotericin B | 1% |

b. zur Kultivierung der MCF-7 Zellen:

| | | |
|--------|-------------------------|-----|
| Medium | RPMI 1640 Medium | |
| | FKS | 10% |
| | L-Glutamin | 1% |
| | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | Amphotericin B | 1% |

c. Puffer für die Präparation der Primärzellen:

| | | |
|--------|--|---------|
| Puffer | Natriumchlorid | 1600 mg |
| | HEPES | 1190 mg |
| | D(+)-Glucose-Monohydrat | 400 mg |
| | Kaliumchlorid | 74,6 mg |
| | Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O | 25 mg |

gelöst in 200 ml destilliertem Wasser, sterilfiltriert

d. zur Dissoziation bei der Präparation der Primärzellen:

| | | |
|----------------------|--------------------|--------|
| Kollagenase-Lösung A | Collagenase CLS II | 50 mg |
| | BSA | 80 mg |
| | DNase I | 0,5 ml |

gelöst in 20 ml Puffer, sterilfiltriert

| | | |
|----------------------|--------------------|--------|
| Kollagenase-Lösung C | Collagenase CLS II | 25 mg |
| | Protease | 6 mg |
| | Hyaluronidase | 6 mg |
| | DNase I | 1 ml |
| | Hühnerserum | 100 µl |

| | | | |
|--|---|--|--------|
| | gelöst in 6 ml HBSS Hank's 1x, sterilfiltriert | | |
| Pancreatin-Lösung | Pancreatin 4xNF | | 2 ml |
| | gelöst in 18 ml Puffer | | |
| <u>e. zur Zellzahlbestimmung bei Primärzellen:</u> | | | |
| Trypsin 0,05%/EGTA 0,02%-Lösung | Trypsin | | 10 mg |
| | EGTA | | 4 mg |
| | gelöst in 20 ml PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , sterilfiltriert | | |
| <u>f. zur Zellzahlbestimmung bei MCF-7 Zellen:</u> | | | |
| Trypsin 0,25%- Lösung | Trypsin | | 25 mg |
| | gelöst in 10 ml PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , sterilfiltriert | | |
| <u>g. für die Neutralrotmethode:</u> | | | |
| Neutralrotlösung | Neutralrot | | 1 mg |
| | gelöst in 20 ml Medium, sterilfiltriert | | |
| Solubilisierungslösung = Ethanol/Eisessigmischung | | | |
| | Ethanol | | 50 ml |
| | Essigsäure | | 1 ml |
| | destilliertes Wasser | | 49 ml |
| <u>h. für den MTT-Test:</u> | | | |
| MTT-Lösung | MTT | | 25 mg |
| | gelöst in 5 ml PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | | |
| Solubilisierungslösung | SDS | | 10 g |
| | Essigsäure | | 0,6 ml |
| | gelöst in 99,4 ml DMSO | | |
| <u>i. für immunhistochemische Untersuchungen</u> | | | |
| Permeabilisierungslösung | PBS | | 500 ml |
| | Triton-X-100 | | 125 µl |
| Verdünnungslösung für Primärantikörper | | | |
| | BSA | | 400 mg |
| | Triton-X-100 | | 10 µl |
| | gelöst in 40 ml PBS | | |

2.4 Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums

2.4.1 Präparation der Primärzellen des Endometriums

Das Endometrium stammte von Frauen im fertilen oder prämenopausalen Alter. Es handelte sich um Patientinnen, die sich wegen eines Uterus myomatosus einer Hysterektomie unterzogen, oder um Patientinnen der Kinderwunschsprechstunde, bei denen eine diagnostische Laparoskopie bei primärer oder sekundärer Sterilität durchgeführt wurde. Bei zwei Patientinnen war eine Metroplastik im Rahmen der Sterilitätsbehandlung notwendig.

Am Tag vor der Operation wurden die Patientinnen über die geplante Gewebeentnahme informiert und ihr Einverständnis dafür schriftlich eingeholt.

Die Präparation folgte mit einigen Modifikationen der erprobten Arbeitsanleitung einer Arbeitsgruppe an der Universitätsfrauenklinik Tübingen (persönliche Mitteilung von Frau Dr. Mappes).

Die Gewebeentnahme nach Hysterektomie erfolgte noch im Op-Trakt unter sterilen Bedingungen. Der Uterus wurde mit einem Skalpell von der Portio vaginalis uteri beginnend bis zum Fundus uteri längs eröffnet, bis das Cavum uteri vollständig sichtbar war. Danach konnte mit einer kleinen scharfen Kürette die Entnahme des Endometriums analog einer Kürettage durchgeführt werden. Das Gewebe wurde nur aus dem Cavum uteri und nicht aus der Cervix uteri entnommen.

Bei der diagnostischen Laparoskopie wurde vor dem Einlegen des Spülkatheters in das Cavum uteri eine Strickkürettage zur Endometriumgewinnung durchgeführt. Die Gewebeentnahme diente primär der funktionellen Zyklusdiagnostik durch den Histopathologen.

Im Rahmen der Metroplastik konnte etwas Endometrium nach Eröffnung des Cavum uteri intraoperativ vom Operateur entnommen werden.

Alle für die Zellkultur vorgesehenen Gewebeproben mußten sofort in warmes Nährmedium überführt werden, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Das Material wurde in einem sterilen 50 ml Falconröhrchen mit 10 bis 15 ml 37°C warmen Medium A (siehe Kap. 2.3) zum Labor transportiert. Dort erfolgte während der Vorbereitung des Arbeitsplatzes bis zum Beginn der Präparation die Lagerung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Alle bei der Präparation verwendeten Lösungen und Materialien waren steril. Die Lösungen wurden vor Anwendung auf 37°C erwärmt.

Zu Beginn der Aufarbeitung erfolgte das 2-3malige Waschen der Gewebeprobe mit Puffer, um vorhandenes Blut zu entfernen. Das Gewebe wurde auf eine sterile Petrischale gegeben und dort sorgfältig mit einer kleinen Präparierschere zerkleinert. Die dadurch entstandenen Partikel sollten möglichst eine Größe von 1-2 mm³ haben, da dies die enzymatische Dissoziation wesentlich verbessert. Das Gewebe wurde in 50 ml Röhrchen mittels Pipette in Medium A (ca. 5-10 ml) resuspendiert und dann 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 20 ml Kollagenase-Lösung A eine Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Man erhält eine trübe Lösung, die mit der Pipette aufgewirbelt und dann 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert wurde. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die zweite enzymatische Dissoziation in 20 ml Pancreatin-Lösung für 6 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad. Nach der Dissoziation wurde zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm) und der Überstand verworfen. Um nun die Dissoziationsenzyme gründlich zu entfernen, wurde die Probe zweimal mit Puffer gewaschen. Dabei erwies es sich als hilfreich, die Gewebesuspension kräftig mit der Pipette aufzuwirbeln, da so die bisherige Wirkung der Dissoziationsenzyme mechanisch unterstützt werden konnte.

Die auf die Weise erhaltene Zellsuspension enthält größtenteils Stroma- und Epithelzellen. Um beide Zellarten voneinander zu trennen, wurde die Zellsuspension zweimal filtriert. Die erste Filtration erfolgte durch einen Falcon-Filter mit einer Maschenweite von 70µm und die zweite Filtration ebenfalls durch einen Falcon-Filter mit einer Maschenweite von 40µm. Das Filtrat enthielt Stromazellen sowie Blutzellen. Im Filtrerrückstand befanden sich die Epithelzellaggregate mit einer geringen Kontamination an Stromazellen. Der Filter wurde nun sorgfältig mit Puffer abgespült und die Suspension bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Pufferüberstand wurde abgenommen und das Pellet mittels der Kollagenase-Lösung C bei 37°C für 30 Minuten im Schüttelwasserbad zum dritten Mal enzymatisch dissoziiert. Danach wurde wieder zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm) und der Überstand verworfen. Nach diesem dritten Dissoziationsschritt mußten die Enzyme wieder gründlich durch zweimaliges Waschen mit Medium A entfernt werden. Die Zellen wurden in 10 ml Medium A aufgenommen und in eine Petrischale überführt. Die Petrischale blieb für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, damit sich die Epithelzellen absetzen konnten. Nach 10 Minuten wurden etwa 8 ml Überstand abgenommen, um damit nochmals Stromazellen zu entfernen. Auf dem Boden der Petrischale befanden sich die Epithelzellen, die sich teilweise bereits angeheftet hatten, so daß sie mit Trypsin abgelöst und in der doppelten Menge Medium A aufgenommen wurden. Das Trypsin wurde abzentrifugiert und die Zellen in 5 bis 20 ml Medium A (je nach Größe des Pellet) aufgenommen. Dieser Schritt der Präparation (das Absetzenlassen der Epithelzellen in der Petrischale) wurde ab Kultur 16/99 nicht mehr durchgeführt, da die Gewebemenge, von da an vorrangig bei der diagnostischen Laparoskopie gewonnen, sehr gering war und durch diesen

Präparationsschritt nicht noch zusätzlich verkleinert werden sollte. Durch eine sehr gute vorherige Präparation waren letztlich die Kulturen beider Methoden gleichwertig.

Nach Bestimmung der Zellkonzentration in einer Neubauerzählkammer mußte die vorhandene Zellsuspension mit Medium A verdünnt werden. Für die 24-Lochkulturplatte wurde mit einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml gearbeitet. Dabei sind 1 ml Zellsuspension/Vertiefung sinnvoll. In den 96-Lochkulturplatten reichte eine Zelldichte von $1,5$ bis $1,8 \times 10^5$ Zellen/ml bei $200 \mu\text{l}$ Zellsuspension/Vertiefung aus.

Es erfolgte die Aussaat von Epithelzellen mit einem geringen Anteil an Stromazellen. Diese Mischkultur entspricht eher den in vivo Bedingungen als eine Monokultur.

Eine Übersicht der Präparation ist in Abbildung 1 dargestellt:

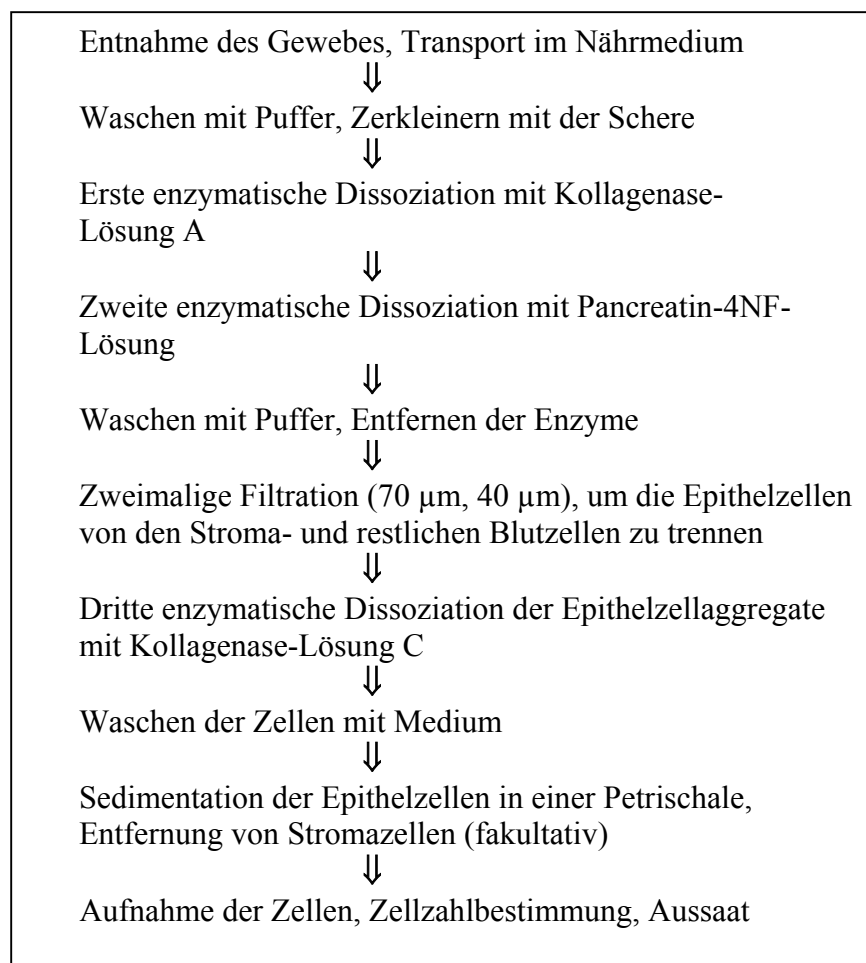


Abb.1: Präparation der Epithelzellen des humanen Endometriums

2.4.2 Kulturbedingungen der Primärzellen

Nach erfolgter Präparation wurden Einzelzellen oder auch kleine Zellhaufen in Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden über die ersten 4 Tage im Medium A mit fetalem Kälberserum (siehe Kap. 2.3) kultiviert. Der Präparationstag entsprach dem Tag 0. Ab dem 4. Tag wurde dann auf Medium B ohne fetales Kälberserum (siehe Kap. 2.3) übergegangen. Dieses Medium mußte alle 3 Tage gewechselt werden.

Kultiviert wurde bei 37°C und 5% CO₂.

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Neubauer Zählkammer (58).

Die Zellen wurden am Ende der Präparation gezählt, um die richtige Konzentration der Zellsuspension für die Zellaussaat zu ermitteln. Hier war es wichtig, nur die lebenden Zellen zu zählen. Dazu wurden von der Zellsuspension 100 µl entnommen und 1:1 mit Trypanblau gemischt. Nach kurzer Zeit dringt Trypanblau in tote Zellen ein, da deren Membran durchlässig geworden ist und färbt diese blau. Dabei ist zu beachten, daß Trypanblau selbst zytotoxisch ist und bei zu langer Inkubation mit diesem Stoff die Zellen absterben. Die Zellzählung der lebenden Zellen wurde viermal wiederholt. Der sich ergebende Mittelwert wurde verdoppelt, um den Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen. Durch Multiplikation des Zahlenwertes mit 10⁴ ergab sich die Zellkonzentration pro Milliliter.

Bei der Zellzahlbestimmung der kultivierten Zellen wurde die Kulturfläche der 24-Zellkulturplatte nach Entfernen des Mediums zunächst mit 1 ml PBS gespült. Um alle Mediumreste zu entfernen, sollte das PBS bis zu 5 Minuten auf dem Zellrasen verbleiben. Die Zellen wurden im Anschluß daran mit 200 µl Trypsin/EGTA-Lösung (siehe Kap. 2.3) abgelöst. Bei älteren Kulturen (Kulturdauer 8 Tage und mehr) dauerte dies mehrere Minuten, da die Zellen fester an der Kulturfläche haften. Ist dies der Fall, sollten die Kulturschalen während der Trypsin-Behandlung kurze Zeit in den Brutschrank gestellt werden. Bei einem sehr dichten Zellrasen wurde die Trypsin-Zellsuspension in 200 µl Medium überführt. Bei nur geringer Zellmenge wurde auf die Mediumzugabe verzichtet und die Zellen direkt in der Trypsinlösung gezählt. Die Zählung erfolgte wie oben beschrieben mit der Neubauerkammer, aber ohne Trypanblau, da durch das anfängliche Spülen die toten Zellen bereits entfernt wurden. Multiplizierte man den Mittelwert mit 10⁴, ergab sich die Zellmenge in der Gesamtsuspension.

2.5 MCF-7 Zelllinie

Die MCF-7 Zellen sind eine Zelllinie des Mammakarzinoms, welche Estrogenrezeptor-positiv ist, das heißt die Zellen sind gegenüber Estrogen empfindlich (77, 91, 100). Wenn die zu untersuchenden Substanzen ihre Wirkung über den Estrogenrezeptor entfalten, so läßt sich dies gut an den MCF-7 Zellen demonstrieren.

Die Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe Professor Dr. Rudolph vom Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

2.5.1 Kulturbedingungen

Die MCF-7 Zellen wurden in kleinen Kulturflaschen (25 cm², Greiner) kultiviert. Für die Expositionsversuche wurden unbeschichtete 96-Lochkulturplatten verwendet. Zur Kultivierung wurde RPMI 1640 Medium (siehe Kap. 2.3) verwendet.

Die Häufigkeit des Mediumwechsels richtete sich nach der ausgesäten Zellmenge sowie nach dem Verbrauch an Nährstoffen. Da das RPMI Medium Phenolrot enthält, war der Verbrauch an Glucose am Farbumschlag von rot zu gelb sichtbar. Im Durchschnitt erfolgte der Mediumwechsel alle 3 Tage. Für jede Flasche wurden 5 ml Medium benötigt. Kultiviert wurde bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt der Luft von 5%.

2.5.2 Passagieren und Zellzahlbestimmung

Nachdem sich in der Kulturflasche ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurde die Kultur passagiert. Dazu wurden die Zellen abgelöst und ein Teil in eine neue Kulturflasche übertragen. Zusätzlich wurden Zellen für die Expositionsversuche ausgesät.

Zunächst wurde die Kultur für 5 Minuten mit PBS gespült. Nach Entfernen des PBS ließen sich die Zellen mit Hilfe einer 0,25% Trypsinlösung (siehe Kap. 2.3) (1ml/Kulturflasche) vom Kulturboden ablösen. Die Effektivität der enzymatischen Wirkung erhöhte sich, in dem die Behandlung mit der Trypsinlösung für eine Minute im Brutschrank bei 37°C erfolgte. Danach mußte die Lösung schnell abgesaugt werden, um eine schädigende Wirkung auf die Zellen zu vermeiden. Das Ablösen des Zellrasens war bei senkrecht stehender Kulturflasche gut sichtbar. Die Zellen wurden nun mit frischem Medium (3-5 ml) vom Kulturboden gespült. Von der entstandenen Zellsuspension wurden ca. 100-200 µl entnommen und zur

Bestimmung der Zellzahl eingesetzt. Dies erfolgte ohne Trypanblau mit der Neubauer- oder Thoma-Zählkammer.

Multiplizierte man die ermittelte Zellkonzentration/ml mit der vorhandenen Menge an Zellsuspension (3-5 ml), so erhielt man die Gesamtzellzahl. Von dieser Gesamtzellmenge wird ein entsprechender Teil entnommen und in eine neue Flasche mit insgesamt 5 ml Medium eingebracht. Die Aussaat erfolgte in Konzentrationen von 10000 bis 20000 Zellen/cm², so daß sich bei einer 25 cm² großen Kulturfläche in der kleinen Flasche 250000 bis 500000 Zellen/Flasche befanden. Für die 96-Zellkulturplatten wurden 40000 Zellen/cm² benötigt, dies bedeutete bei einer Fläche von 0,32 cm²/Vertiefung 12800 Zellen/Vertiefung. Nach der Aussaat der Zellen wurden die Kulturgefäße 12 bis 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, damit sich die Zellen am Boden gut anheften konnten.

2.6 Expositionsversuche

Anhand von Expositionsversuchen sollte der Einfluß von chlorierten Kohlenwasserstoffen auf die Zellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums untersucht werden.

Als chlorierte Kohlenwasserstoffe wurden β -HCH, p,p'-DDE und PCB 153 verwendet (siehe Kap. 1.1).

Die Expositionstests erfolgten in 96-Lochkulturplatten. Alle drei Stoffe wurden in 5 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Dabei entsprach die höchste Verdünnung in etwa der Konzentration, in welcher die entsprechende Substanz im humanen Endometrium nachgewiesen wurde (48). Es wurden um den Faktor 10 aufsteigende Konzentrationsreihen hergestellt.

Da es sich bei allen 3 Stoffen um nicht wasserlösliche Chemikalien handelt, wurden für β -HCH und p,p'-DDE Ethanol und für PCB 153 DMSO als Lösungsmittel verwendet. Die entsprechenden Stammlösungen wurden so hergestellt, daß nach Zugabe der Stammlösung zum Inkubationsmedium, das Medium 0,2% des Lösungsmittels enthielt .

2.6.1 Exposition der Primärzellen

Nach der Aussaat mit einer Zelldichte von 1,5 bis 1,8x10⁵ Zellen/ml bei 200 μ l Zellsuspension/Vertiefung wurde wie üblich bis zum 4. Kulturtag in Medium A (siehe Kap. 2.3) kultiviert. Am 4. Tag erfolgte der erste Mediumwechsel mit Medium B (ohne FKS, siehe Kap. 2.3). Bei den Expositionstests enthielt Medium B die entsprechenden Testsubstanzen

(wie unter Kap. 2.6 beschrieben). Es wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Dem direkten Vergleich diente der 0,2%ige Zusatz des jeweiligen Lösungsmittels zum Medium B. Der Ansatz mit dem originären Medium B sollte eventuelle Besonderheiten der eingesetzten individuellen Zellen in der Primärkultur aufdecken.

Die Expositionszeit betrug 24, 48 und 72 Stunden. Zur Auswertung erfolgte die quantitative Bestimmung lebender Zellen mittels Neutralrotmethode.

2.6.2 Exposition der MCF-7 Zellen

Die Aussaat der Zellen in die 96-Lochkulturplatten erfolgte mit einer Konzentration von 40000 Zellen/cm² (siehe Kap. 2.5.2). Am zweiten Kulturtag nach ca. 40 Stunden hatten sich die Zellen gut angeheftet und waren zu kleinen Zellinseln mit etwa 4 bis 20 Zellen pro Zellinsel ausgewachsen. Nun erfolgte die Exposition mit den chlorierten Kohlenwasserstoffen wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Expositionsmedium war das RPMI-Medium mit FKS. Die Lösungsmittelkonzentration betrug auch hier 0,2%. Als Kontrollen dienten das RPMI-Medium mit 0,2% Lösungsmittel ohne chlorierte Kohlenwasserstoffe, sowie die Kultivierung im normalen RPMI-Medium. Die Zellen wurden über 24, 48 und 72 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Danach wurde die Menge lebender Zellen ebenfalls mit der Neutralrotmethode bestimmt.

2.7 Statistische Datenanalyse

Bei den durchgeführten statistischen Analysen erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung wobei von normalverteilten Zufallsgrößen ausgegangen wurde. Die statistischen Tests basieren auf dem F-Test, einem Signifikanztest, bzw. dem Verhältnis der F-Test-Werte für die einzelnen Gruppen. Dabei wurden Zellart, Konzentration und Zeitdauer als Gruppen miteinander verglichen.

Zur Anwendung kamen der Brown-Forsythe-Test (Vergleich der Varianzen), der ANOVA Test (bei gleichen Varianzen), der Welch ANOVA Test (bei nicht gleichen Varianzen), der Shapiro-Wilk-Test (Test auf Normalverteilung), der Tukey-Kramer's HSD Test und Fisher LSD Test (Multipler Mittelwertvergleich).

Beim Tukey-Cramer HSD-Test ist eine statistische Sicherheit der Aussage von 95% gegeben. Beim Fisher LSD-Test werden alle möglichen Gruppenpaare einem T-Test unterworfen. Mit

zunehmender Anzahl der zu vergleichenden Gruppen sinkt die statistische Sicherheit der Aussage (2 Gruppen=95%, 3 Gruppen=81,45%, 5 Gruppen=59,87%).

Es wurde das Statistische Software Paket: JMP Version 3.2.5 verwendet.

2.8 Quantitative Neutralrotmethode

Die Methode beruht darauf, daß nur lebende Zellen den Farbstoff Neutralrot (3-Amino-7-dimethyl-amino-2-methylphenazin Hydrochlorid) aufnehmen, während tote Zellen nicht gefärbt werden. Man kann die Farbvesikel nach entsprechender Inkubationszeit im Zytoplasma der lebenden Zellen mikroskopisch nachweisen (Abb.2).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gründlich mit PBS gespült. Die Zellwände lysiert man mittels einer Ethanol/Eisessiglösung wodurch der Farbstoff extrahiert wird. Der Gehalt an Farbstoff kann photometrisch bestimmt werden (58, 111).

Die Neutralrotmethode diente bei den Expositionsuntersuchungen zur Ermittlung der Menge lebender Zellen, um so eine Aussage über den Einfluß der Substanzen auf die Zellmenge bzw. die Viabilität der Zellen treffen zu können. Dabei wurden die Extinktionswerte der exponierten Zellen als Prozent der unbehandelten Kontrollzellen (kultiviert in Medium B +Lösungsmittel, siehe Kap. 2.6) (= 100%) ermittelt.

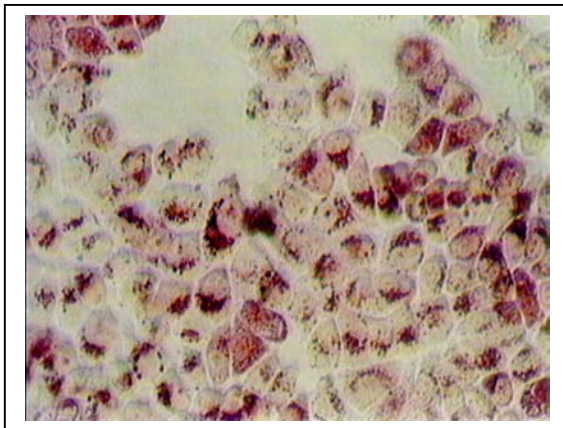


Abb.2: MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Neutralrot Lebende Zellen nehmen den Farbstoff auf. (200-fach vergrößert)

Spezieller Ablauf

Die Expositionstests und damit auch die Neutralrotmethode wurden in 96-Lochkulturplatten durchgeführt. Der Farbstoff Neutralrot wurde im Nährmedium B gelöst (siehe Kap. 2.3), sterilfiltriert und im Brutschrank vorinkubiert. Nach beendeter Exposition wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 200 µl Neutralrotlösung/Vertiefung auf die Kulturflächen aufgebracht. Die Zellen wurden mit der Neutralrotlösung 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂

inkubiert. Danach wurde das Neutralrotmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig dreimal mit PBS gespült. Die Extraktion des Farbstoffes erfolgte durch 100 µl Ethanol/Eisessiglösung/Vertiefung (siehe Kap. 2.3) für 15 Minuten auf dem Schüttler. Die Extinktion wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

2.9 Tetrazolium(MTT)-Test

Der Test dient dem Nachweis der Stoffwechselaktivität der Mitochondrien und damit der Lebensfähigkeit der Zelle. Beim MTT-Test dringt das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in die Zelle ein, sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgespalten und es entsteht das dunkelblaue, alkohollösliche Formazan. Eine Lösung (siehe Kap. 2.3) bestehend aus DMSO, Laurylsulfat (SDS) und Essigsäure lysiert anschließend die Zellen und setzt das Formazan frei. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden (58, 65, 111).

Spezieller Ablauf

Die Methode wurde an Zellen, welche in 24-Lochkulturplatten kultiviert wurden, angewandt. Zum gewünschten Untersuchungszeitpunkt wurde dem Medium 100 µl sterile MTT-Lösung /1 ml Medium zugegeben. Nachdem es gut durchgemischt wurde, erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 2 Stunden. Danach wurde das Medium mit der MTT-Lösung abgesaugt und 500 µl Solubilisierungslösung zugegeben. Nach etwa 5 Minuten wurden die Platten für 5 Minuten geschüttelt. Danach wurde photometrisch die Extinktion ermittelt.

2.10 Immunhistochemische Methode

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der Primärzellkultur mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Bei allen angewandten immunzytochemischen Methoden wurde das Immunperoxidase Verfahren benutzt. Als Färbemethode diente die Avidin-Biotin-Methode. Diese beruht auf der Tatsache, daß das Eiweißglykoprotein Avidin 4 Bindungsstellen für das Vitamin Biotin besitzt. Jedoch binden auf Grund der molekularen Konfiguration in der Regel weniger als 4 Biotinmoleküle am Avidin. Es gibt zwei verschiedenen Avidin-Biotin-Färbungen. Das ist einmal die Avidin-Biotin-Komplexmethode und zum anderen die markierte Avidin-Biotintechnik (labelled

avidin-biotin technique). Für beide Verfahren benötigt man einen biotinylierten Sekundärantikörper, der kovalent gebundenes Biotin trägt.

Bei den Untersuchungen zur immunhistochemischen Charakterisierung der Endometriumzellkultur wurde mit der "labelled avidin biotin technique" gearbeitet. Dafür wurden 4 Reagenzien benötigt: der Primärantikörper, der Sekundärantikörper konjugiert mit Biotin, ein Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex sowie ein Farbstoff zur Sichtbarmachung. Der Primärantikörper stammte von der Maus. Der Sekundärantikörper war ein Ziege-anti-Maus-Antikörper. Der Primärantikörper bindet spezifisch am gesuchten Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet am Primärantikörper. Das dann zugegebene Meerrettichperoxidase-konjugierte Streptavidin hat am Avidin noch freie Bindungsstellen für Biotin und bindet somit am Biotin des Sekundärantikörpers. Im letzten Schritt erfolgte die Peroxidase katalysierte Oxidation des Farbstoffes 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) und damit eine Rotfärbung der vom Antikörper besetzten Areale.

Aufgrund der überaus starken Affinität von Avidin gegenüber Biotin sowie das empfindliche System der LAB-Färbung besitzt diese Technik eine sehr hohe Sensitivität (8).

Spezieller Ablauf

Die immunzytochemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Kit der Firma DAKO durchgeführt, welcher bis auf den Primärantikörper alle anderen Reagenzien bereits enthielt.

Die auf den Kulturplatten gewachsenen Zellen wurden zunächst, nachdem das Medium entfernt wurde, zweimal für 5 Minuten mit PBS gespült und anschließend luftgetrocknet. Danach erfolgte die Fixation der Zellen mit -20°C kaltem 100%igen Methanol bei Raumtemperatur über 10 Minuten oder für den Rezeptornachweis mit 4,5% Formaldehyd-Lösung über 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Spülen für 5 Minuten mit PBS wurden nun die endogenen Peroxidasen mit einer 3%igen H_2O_2 -Lösung blockiert. Die Lösung verblieb 5 Minuten auf den Zellen. Anschließend wurde dreimal mit einer PBS/Triton-X-100-Lösung (siehe Kap. 2.3) gespült, um die Zellwände zu permeabilisieren. Danach erfolgte die Zugabe des jeweiligen Primärantikörpers, der in PBS, Triton-X-100 und Rinderserumalbumin (siehe Kap. 2.3), gelöst war oder als Fertiglösung der Firma DAKO verwendet wurde. Parallel wurde der Kontrollansatz ohne Primärantikörper nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel in einer Schale durchgeführt. Die Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C und 5% CO_2 dauerte 30 Minuten bis 24 Stunden, je nach Primärantikörper. Der überschüssige Primärantikörper wurde durch dreimaliges gründliches Waschen mit PBS wieder entfernt. Die nun folgende Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers wurde ebenfalls in der feuchten Kammer bei 37°C und 5% CO_2 für 30 Minuten durchgeführt. Danach wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen, um den ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Nun erfolgte nochmals für 30 Minuten die Inkubation mit

der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung. Dabei kam es zur Bindung des Sekundärantikörper-Biotins am Avidin der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung. Diese Inkubation konnte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Anschließend wurde nach dreimaligem Spülen mit PBS das Chromogen zugegeben. Auch dieses war mit der entsprechenden Verdünnungslösung im Kit enthalten. Bereits nach zwei bis drei Minuten war eine Rotfärbung der Antigen-enhaltenden Zellen sichtbar. Die Einwirkzeit betrug insgesamt 10 Minuten. Danach wurden die Kulturflächen mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schalen wurden mit Aquatex eingedeckelt und mit Parafilm luftdicht verschlossen. Zur Dokumentation wurde die Panasonic GL 700 Kamera des Nikon Diaphot 300 Mikroskop verwendet.

Folgende Primärantikörper wurden zur Charakterisierung der Primärzellkultur verwendet:

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1.) Cytokeratin-Antikörper | 1 : 10 verdünnt (siehe Kap. 2.3) |
| 2.) Vimentin-Antikörper | 1 : 75 verdünnt (siehe Kap. 2.3) |
| 3.) Desmin-Antikörper | Fertiglösung von DAKO |
| 4.) Monoklonaler Ak gegen Ki-67 | Fertiglösung von DAKO |
| 5.) Estrogen-Rezeptor-Antikörper | Fertiglösung von DAKO |
| 6.) Progesteron-Rezeptor-Antikörper | Fertiglösung von DAKO |
| 7.) Arylhydrocarbon-Rezeptor-Antikörper | 1 : 100 verdünnt (siehe Kap. 2.3) |

Charakterisierung der Primärantikörper

1. Der Cytokeratin-Antikörper

Cytokeratin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts. Es sind die Intermediärfilamente der Klasse I und der Klasse II. Man unterteilt saure und basische Cytokeratine. Sie kommen in Epithelien, sowie in Derivaten der Haut (z.B. Haare, Nägel) vor. Sie dienen dem mechanischen Schutz der Epithelien, sowie dem Schutz vor Wasserverlust und vor Hitze (92).

Mit dem Cytokeratin-Antikörper kann man typischerweise die Epithelzellen des Endometriums nachweisen (6, 15, 49, 62).

2. Der Vimentin-Antikörper

Auch Vimentin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und zählt zu den Intermediärfilamenten der Klasse III. Es ist ein schwer lösliches einheitliches Protein, welchem eine strukturerhaltende Rolle zukommt.

Vimentin findet man vorrangig in Zellen mesenchymalen Ursprungs, in embryonalen Zellen und undifferenzierten Zellen aber auch in den Endothelzellen der Blutgefäße und in den weißen Blutzellen (6, 92).

Mit dem Vimentin-Antikörper sind die Stromazellen aber auch die Epithelzellen dedektierbar, wobei die Farbintensität bei den Epithelzellen stärker ist (15, 49).

3. Der Desmin-Antikörper

Desmin gehört, wie Vimentin zu der Klasse III der Intermediärfilamente als Bestandteil des Zytoskeletts.

Desmin kommt in den Z-Scheiden der Skelett- und der Herzmuskulatur, aber auch in glatten Muskelzellen vor (92), so daß sich mit dem Antikörper die Myometriumszellen nachweisen lassen (63).

4. Der monoklonale Antikörper gegen Ki-67

Dieser Antikörper weist das nukleäre proliferationsassoziierte Antigen Ki-67 nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Das heißt, in der G 1 und G 0 Phase des Zellzyklus kann Ki-67 nicht nachgewiesen werden, während in der G 2 und M Phase der Nachweis positiv ist (15, 27).

Mit Hilfe dieses Antikörpers wird somit die mitotische Aktivität der Zelle dargestellt. Die proliferierenden Zellen zeigen eine starke Kernfärbung.

5. Die Steroidhormon-Rezeptor-Antikörper

Die Steroidrezeptoren sind der Progesteronrezeptor und der Estrogenrezeptor (siehe Kap. 1.4). Es wurden entsprechende Antikörper gegen diese Rezeptoren verwendet. Der Estrogen-Rezeptor-Antikörper eignete sich nicht zur Differenzierung von α - und β -Estrogenrezeptor.

6. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor-Antikörper

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist ein lösliches Protein, welches intrazellulär vorkommt und in verschiedenen menschlichen Geweben nachgewiesen wurde (z.B. Lunge, Leber, Nebenniere, Herz, Pancreas, Plazenta) (86). An ihm binden halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. chlorierte Dibenzodioxine, polychlorierte Dibenzofurane, polychlorierte Biphenyle, polychlorierte aromatische Hydrocarbone), aromatische Amine, Indolcarbazol sowie viele heterozyklische Ringsysteme pflanzlichen Ursprungs (7, 32). Der natürliche Ligand ist bisher unbekannt.

Der relativ neu entwickelte Antikörper ermöglicht den immunhistochemischen Nachweis des Arylhydrocarbon-Rezeptors (46).

3. Ergebnisse

3.1 Die Etablierung der Primärzellkultur

3.1.1 Die Morphologie

Nach Präparation und Aussaat der Zellen wurden die Zellen in den ersten vier Tagen in Medium A kultiviert. Diese Zeit benötigten die Epithelzellen, um sich auf der Kulturfläche anzuheften und um größere und kleinere Zellinseln zu bilden (Abb. 3). Es wuchsen etwa 35 % der ausgesäten Zellmenge auf der Kunststoffoberfläche an. Trotz Wechsel auf FKS freies Medium proliferierten die Zellen etwa bis zum 8. Tag weiter. Die Zellinseln konfluieren und bildeten einen Zellrasen (Abb. 4). Der Zellrasen nahm selten die ganze Kulturfläche ein. Aber im Zentrum der Kulturplatte befanden sich immer konfluent wachsende Epithelzellen. Ab etwa dem 8. Tag schien die Kultur in ihrer Proliferation zu stagnieren und in diesem Stadium unterschiedlich lang auszuharren.

Der Zellrasen war durch Heterogenität gekennzeichnet, die Zellen waren verschieden groß und unterschiedlich geformt.

Die Degeneration der Zellen konnte bereits nach 14 Tagen einsetzen (Abb. 5). Die Zellmenge nahm anfangs sehr allmählich ab, während später ab einer bestimmten Konzentration sehr viele Zellen pro Tag abstarben. Die meisten Kulturen bestanden etwa 3 bis 4 Wochen.

Während sich das Wachstum der Zellen an den ersten 8 bis 12 Tagen relativ uniform verhielt, hing der weitere Verlauf doch sehr von individuellen Bedingungen ab.

Eine Passagierung der Zellen war nicht möglich, da schon nach ein oder zwei Passagen die Epithelzellen zugrunde gehen und nur die Fibroblasten weiter wachsen (42, 63).

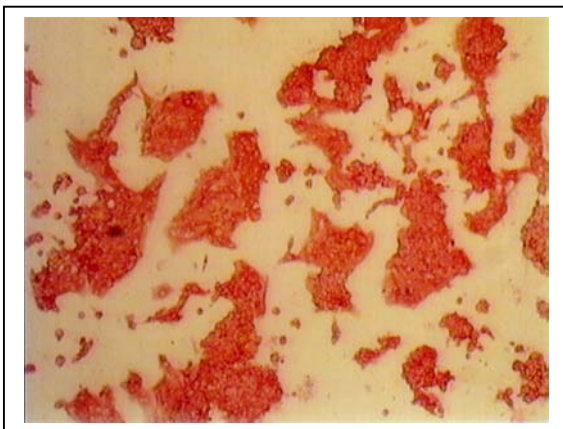


Abb.3: Primärzellen, Kultur 9/99, 3. Tag
Cytokeratin-positive Epithelzellen bilden Zellinseln.
(32fache Vergrößerung)

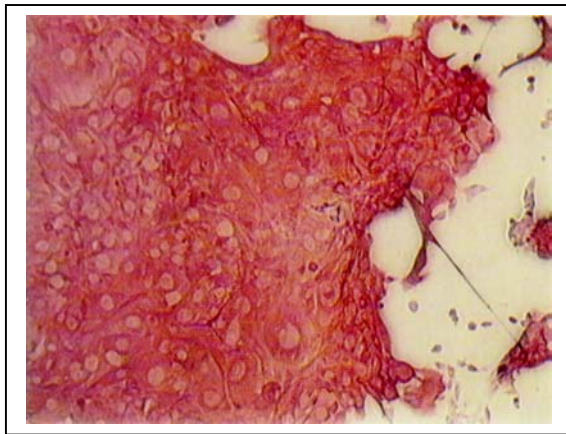


Abb.4: Primärzellen, Kultur 10/99, 6. Tag
Cytokeratin-positive Epithelzellen
wachsen als Zellrasen.
(63fache Vergrößerung)

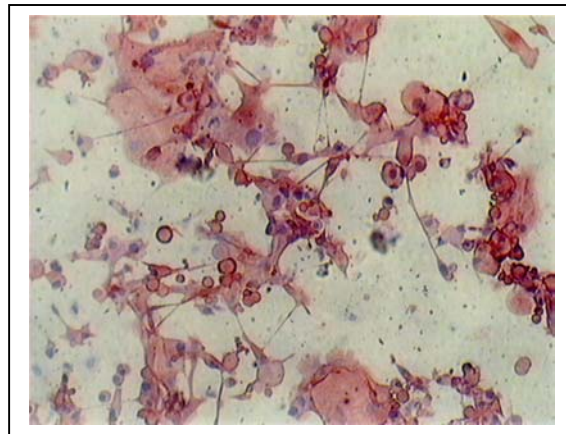


Abb.5: Primärzellen, Kultur 3/99, 20. Tag
Cytokeratin-positive Epithelzellen
werden kugelförmig und lösen sich ab,
die Degeneration setzt ein.
(63fache Vergrößerung)

3.1.2 Vergleich der Kultivierung auf Kunststoff und Kollagen

Vergleicht man das Wachstumsverhalten der Zellen auf Kunststoffuntergrund mit dem auf Kollagen-beschichteten Platten, so zeigten die Zellen auf Kollagen ein stabileres Wachstum. Die Zellen hefteten sich wesentlich leichter an und wuchsen in den ersten vier Tagen schneller, so daß bereits am 2. oder 3. Tag größere Epithelzellinseln unter dem Mikroskop zu sehen waren. Der Zellverlust bis zum 4. Tag war bei den auf Kollagen kultivierten Zellen geringer, als bei denen auf Kunststoff kultivierten Zellen. Er betrug etwa 50 %. Zwischen dem 4. und 6. Kulturtag hatten die Zellen, die auf Kollagen wuchsen, einen starken Proliferationsschub, so daß die Zellmenge in der Kultur höher war, als bei den auf Kunststoff kultivierten Zellen. Die Degeneration der Kultur verhielt sich ähnlich. Die auf Kollagen-kultivierten Kulturen bestanden ebenfalls 3 bis 4 Wochen.

3.1.3 Vergleich der Kultivierung mit und ohne Lösungsmittel

Bei allen Expositionsuntersuchungen betrug der Lösungsmittelanteil im Medium 0,2 %.
In Vorversuchen zur Lösungsmittelkonzentration im Medium wurde Ethanol in 0,2%, 0,5%, 1% und 2% im Medium getestet. Setzte man die relative Zellzahl im Medium B ohne Ethanol 100 % so erniedrigte sich die Zellmenge wie folgt: bei 2 % Ethanol auf 67 %, bei 1 % Ethanol auf 98,6 %, bei 0,5 % Ethanol auf 100 % und bei 0,2% Ethanol auf 100,15%.
Der Zusatz von 0,2% DMSO zum Medium B erhöhte die Zellmenge auf 106%

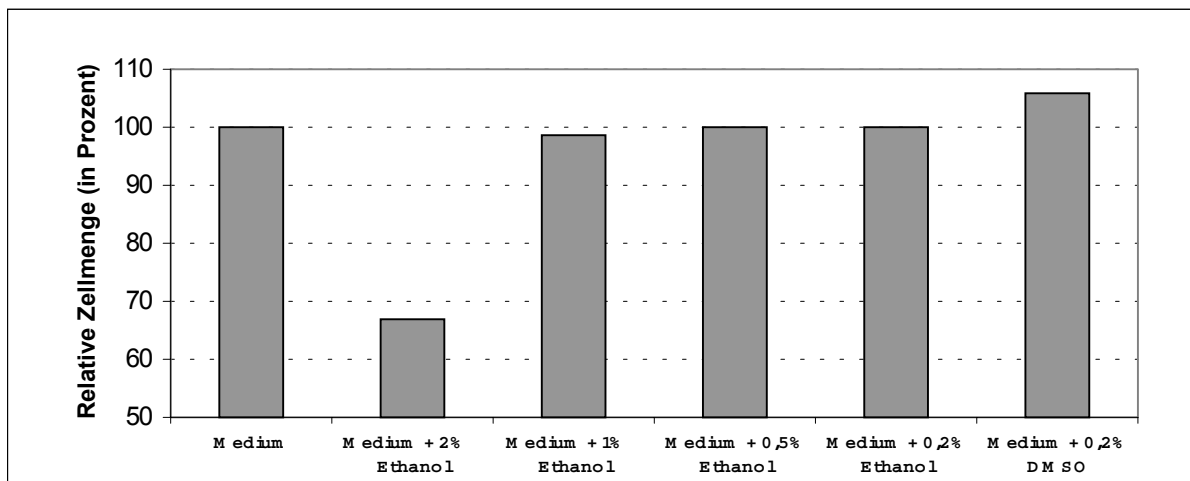


Abb.6: Vergleich der Primärzellkultivierung mit und ohne Lösungsmittel

Sowohl 0,2 % Ethanol, als auch 0,2 % DMSO haben damit praktisch keinen Einfluß auf die Zellrate.

3.2 MCF-7 ZELLEN

3.2.1 Morphologie und Wachstumsverhalten

Die MCF-7 Zelllinie wächst in der Kulturflasche oder auf der Kulturplatte zu einem Monolayer. Dieser Monolayer war sehr homogen. Die Zellen waren in ihrer Gestalt uniform. Da es sich um transformierte Zellen handelt, ist ihre Lebensdauer unbegrenzt und ihr Proliferationsverhalten ist durch eine exponentielle Zellvermehrung gekennzeichnet. Bei einer Aussaatkonzentration von $10000 \text{ Zellen/cm}^2$ war nach etwa einer Woche die Kulturfläche der Flasche vollständig mit Zellen bedeckt. Nach Erreichen des konfluenten Zellrasens kam es nicht wie bei den Primärzellen zu einer sog. Kontakthemmung, sondern die MCF-7 Zellen bildeten übereinanderliegende Zellaggregate.

Ebenfalls typisch für transformierte Zellen ist die verringerte Adhäsionsfähigkeit, welche sich im leichten Ablösen des Zellrasens äußerte. Dies war in bezug auf den Umgang mit der Kultur ein wichtiger Unterschied im Vergleich zu den Primärzellen.

Abbildungen 7 und 8 zeigen die MCF-7 Zellen am 3. und 4. Tag nach Aussaat.

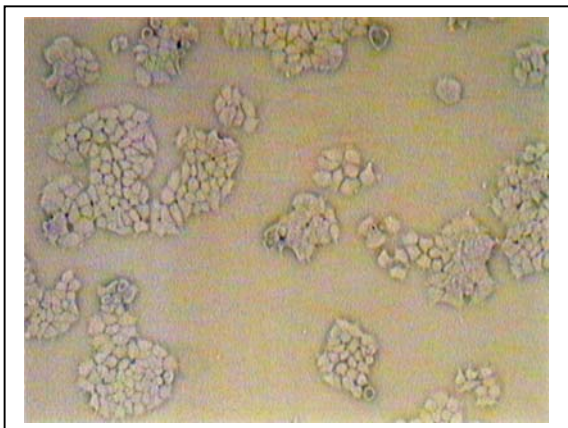


Abb.7: MCF-7 Zellen, 3. Tag

Es haben sich bereits Zellinseln gebildet.
(63fache Vergrößerung)

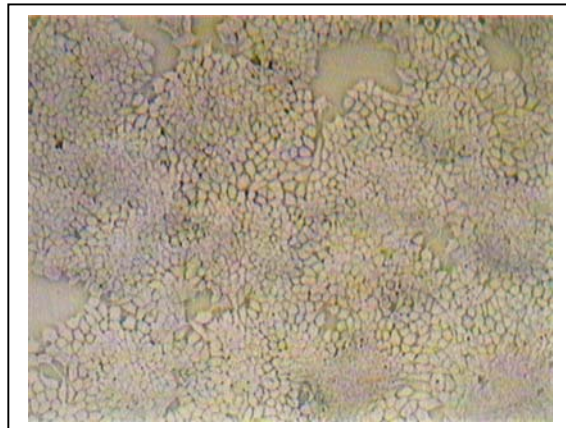


Abb.8: MCF-7 Zellen, 4. Tag

Die Zellinseln konfluieren zu einem
Zellrasen.
(63fache Vergrößerung)

3.2.2 Vergleich der Kultivierung mit und ohne Lösungsmittel

Ausgehend von den Erkenntnissen zum Einfluß der Lösungsmittelkonzentration auf das Proliferationsverhalten der Primärzellen, wurde auch bei den Versuchen mit den MCF-7 Zellen mit einem Lösungsmittelgehalt von 0,2% gearbeitet. Um die Wirkung des Lösungsmittels auf die Proliferation der transformierten Zellen zu ermitteln, wurde zusätzlich zum Kontrollansatz (Medium + 0,2% Lösungsmittel ohne Testsubstanz) eine zweite Kontrolle mit nur im Medium kultivierten Zellen durchgeführt. So konnte bei jedem Testansatz die Wirkung des Lösungsmittels auf die Zellproliferation ermittelt werden. Relativiert man nach dem Neutralrottest die gemessenen Extinktionen, indem die Extinktion der mit normalem Medium kultivierten Zellen 100% gesetzt wurde und die Extinktion der mit 0,2% Lösungsmittel im Medium kultivierten Zellen darauf bezog, so ließ sich feststellen, daß Ethanol als Lösungsmittel die Zellmenge auf 85% herabsetzte, während 0,2% DMSO im Medium mit einer Zellzahl von 99,9% quasi keinen Einfluß auf die Zellmenge hatte.

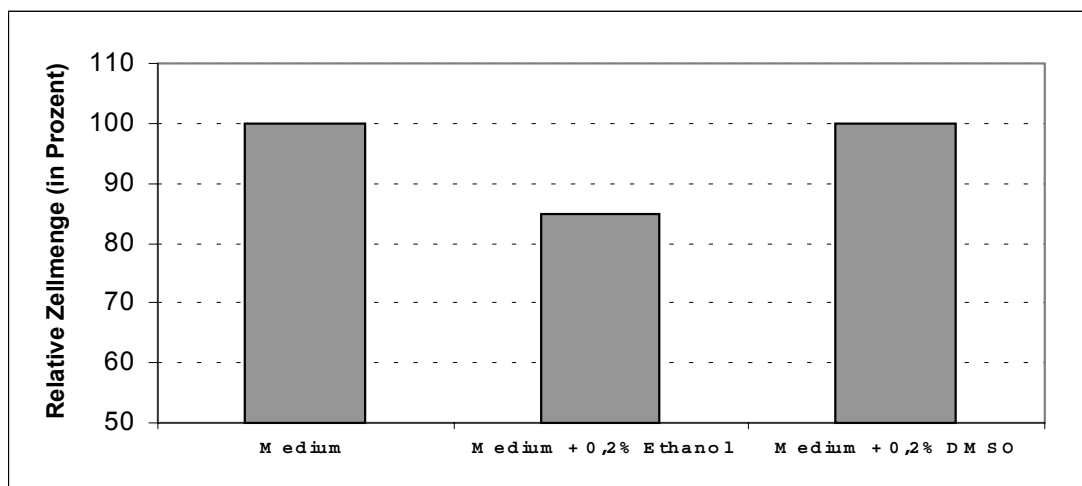


Abb.9: MCF-7 Zellkultivierung mit und ohne Lösungsmittel

3.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der Primärzellkultur

Die Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen war die Etablierung einer Epithelzellkultur des humanen Endometriums. Sie bildete daher auch den ersten Schwerpunkt der Arbeit.

Anfangs mußte geklärt werden, ob es sich nach Präparation und Aussaat der Zellen bei dem erhaltenen Zellrasen um die gewünschte Epithelzellkultur handelte. Dies wurde mit der immunhistochemischen Färbung untersucht.

Die dabei verwendeten Antikörper richteten sich gegen Strukturen des Zytoskeletts (siehe Kap. 2.10). Dabei lassen sich mit dem Cytokeratin-Antikörper nur die Epithelzellen nachweisen. Mit dem Vimentin-Antikörper können sowohl die Stromazellen als auch die Epithelzellen dargestellt werden. Mit dem Desmin-Antikörper sind die Myometriumzellen nachweisbar.

Die mit dem **Cytokeratin-Antikörper** nachgewiesenen Epithelzellen waren polymorph gestaltete, große teilweise kuboidale Zellen, die typischerweise immer in Inseln zusammenwuchsen. Diese Inseln enthielten wenige bis sehr viele Zellen. Häufig hatten diese Inseln vor allem zu Beginn der Kulturzeit ein „Wirbel ähnliches“ Aussehen. Im Verlauf der Kultivierung vergrößerten sich diese Inseln und konfluieren teilweise. Oft bildeten die Zellen untereinander über relativ lange Entfernung feine dünne zytoplasmatische Ausläufer, die wie Dendriten der Nervenzellen erschienen (Abb.10 und 4 in Kap. 3.1.1).

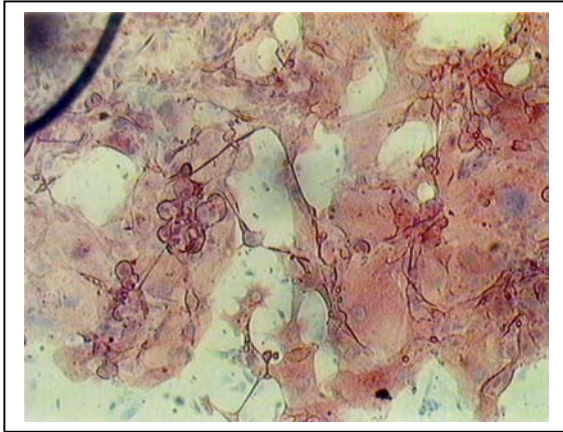


Abb.10: Primärzellen, Kultur 4/99, 10. Tag

Cytokeratin-positive Epithelzellen bilden lange dünne Ausläufer zwischen den Zellen.
(63fache Vergrößerung)

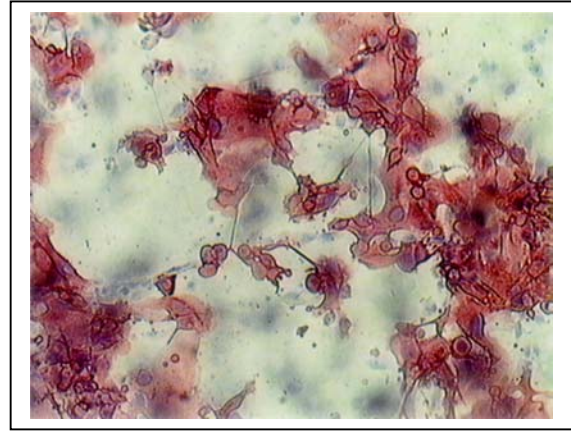


Abb.11: Primärzellen, Kultur 3/99, 26. Tag

Cytokeratin-positive Epithelzellen degenerieren, indem sie rund und kugelförmig werden.
(63fache Vergrößerung)

Die Lebensdauer der Epithelzellen in der Primärzellkultur war sehr unterschiedlich. Sie betrug etwa 3-4 Wochen. Die vermehrte Degeneration der Zellen konnte um den 20. Kulturtag beobachtet werden. Bevor sich eine Zelle ablöste, wurde sie ganz rund und kugelförmig (Abb.11). Damit war die Haftung an der Kulturfläche nicht mehr optimal.

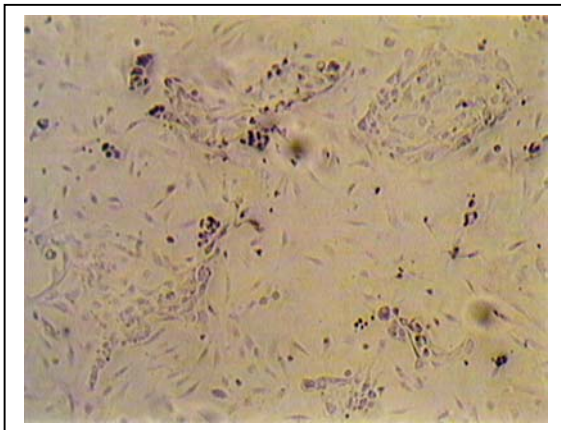


Abb.12: Primärzellen, Kultur 9/99, 3. Tag

Negativkontrolle mit der Verdünnungslösung für Cytokeratin- und Vimentin-Antikörper zeigte ungefärbte Zellen.
(32fache Vergrößerung)

Als Ausnahme wurde ab und zu in einzelnen Kulturschalen beobachtet, daß nach etwa 2 bis 3 Wochen die Epithelzellen stark proliferierten und einen dichten Rasen bildeten, wobei die Zellen kleiner und uniform wurden. So konnte bei der Kultur 8/99 noch nach 53 Tagen Kulturzeit ein dichter Epithelzellrasen nachgewiesen werden (Abb.13).



Abb.13: Primärzellen, Kultur 8/99, 53. Tag

Cytokeratin-positive Epithelzellen
Bilden einen dichten Zellrasen.
Vermutlich kam es zur Transformation
der Zellen.
(32fache Vergrößerung)

Mit dem **Vimentin-Antikörper** lassen sich die Epithelzellen ebenfalls nachweisen, aber, und dies ist das Entscheidende, auch all die Zellen, die um die Epithelzellinseln wachsen. Dies sind die Stromazellen oder Fibroblasten. Die Farbintensität bei der immunhistochemischen Färbung war für die Stromazellen geringer als für die Epithelzellen.

Die Stromazellen sind anfangs gut dissoziierte Einzelzellen von schmaler, länglicher Gestalt. Fibroblasten sind sehr uniform. Ihre Lebensdauer in der Primärkultur betrug ebenfalls in etwa 4 Wochen. Es wurde keine Kultur beobachtet, bei der auf Grund der Kulturdauer Epithelzellen degenerierten und die Kulturfläche gleichzeitig mit Fibroblasten überwachsen war.

Wenn man beide Zellarten als Einheit der Primärzellkultur betrachtete, so ließ sich feststellen, daß sich im Zentrum der Kulturfläche die Epithelzellen ansiedelten und die Dichte der Stromazellen zum Rand hin deutlich zunahm (Abb.14, Abb.15; Negativkontrolle Abb.12)

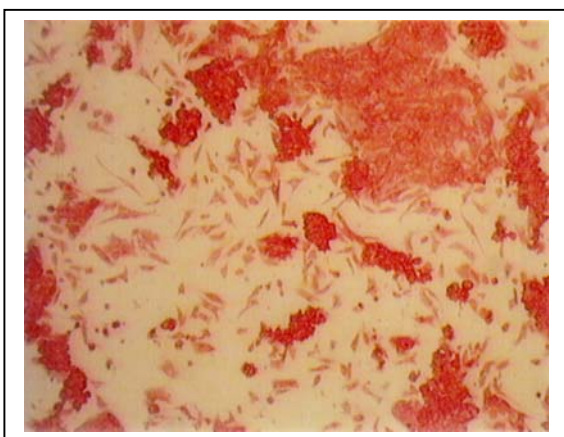


Abb.14: Primärzellen, Kultur 9/99, 3. Tag

Vimentin-positive Zellen im Zentrum der Kulturschale. Es finden sich nur vereinzelt Stromazellen (schwach gefärbt).
(stark gefärbt: Epithelzellen)
(32fache Vergrößerung)

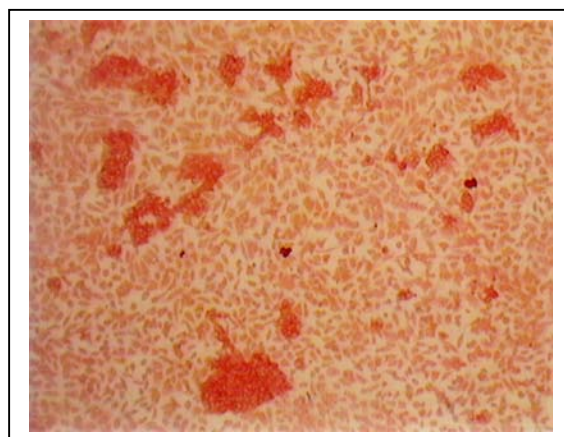


Abb.15: Primärzellen, Kultur 9/99, 3. Tag

Vimentin-positive Zellen am Rand der Kulturschale. Hier befinden sich viele Stromazellen (schwach gefärbt).
(stark gefärbt: Epithelzellen)
(32fache Vergrößerung)

Der Epithelzellrasen, der sich in der ersten Kulturwoche bildete, erstreckt sich vom Zentrum der Kulturfläche bis zum Rand. Er nahm 2/3 der Fläche oder auch die ganze Kulturschale ein. Bei einigen Kulturen konnte beobachtet werden, daß sich nach ca. 14 Tagen Kulturdauer septenartige Stränge durch die Kultur zogen, die den Zellrasen scheinbar in einzelne Kompartimente unterteilten. Es ließ sich immunhistochemisch nicht eindeutig klären, ob es sich hierbei um Stromazellen oder Epithelzellen handelte. Morphologisch schien es sich um eine zweite Zellschicht zu handeln, die über dem ursprünglichen Zellrasen wuchs (Abb.16).

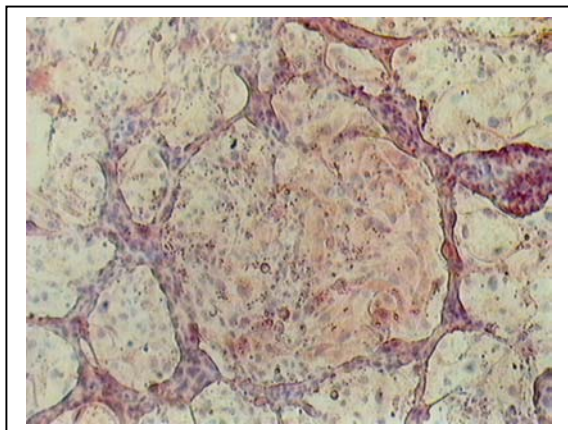


Abb.16: Primärzellen, Kultur 3/99, 16. Tag

Cytokeratin-positive Zellen, Nach längerer Kulturdauer bildeten sich septenartige Stränge, die den Zellrasen in einzelne Kompartimente unterteilten. (63fache Vergrößerung)

Ebenfalls zur Charakterisierung der Zellarten wurde der **Desmin-Antikörper** eingesetzt. Es fanden sich in der Kultur nur sehr vereinzelt Desmin-positive Zellen (Abb.17). Da es sich beim Desmin um Skelettin handelt, mußte es sich bei den Desmin-positiven Zellen um Myometriummzellen handeln.

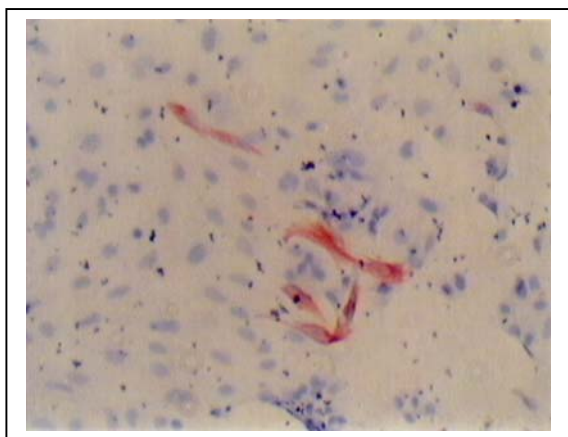


Abb.17: Primärzellen, Kultur 5/99, 5. Tag

Vereinzelt vorkommende Desmin-positive Myometriummzellen (rot) (100fache Vergrößerung)

Nachdem die Zellcharakterisierung der Zellkultur erfolgt war, war es nun von Interesse den **Steroid-Hormon-Rezeptor-Status** zu untersuchen.

Zunächst wurde bei der Kultur 5/99 und 6/99 die immunhistochemische Färbung genauso durchgeführt wie zum Nachweis der Strukturen des Zytoskeletts. In beiden Fällen war weder

der Estrogen-Rezeptor (ER) noch der Progesteron-Rezeptor (PR) nachweisbar. Erst nachdem die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper von 30 Minuten auf 24 Stunden ausgedehnt wurde, gelang der Nachweis der Steroidrezeptoren in den Zellen. Von da an wurden beide Rezeptoren in allen getesteten Zellkulturen zu verschiedenen Kulturzeiten immer nachgewiesen. Der früheste Nachweis erfolgte am 3. Kulturtag bis hin zum 21. und sogar am 53. Kulturtag.

Um die immunhistochemischen Ergebnisse zu optimieren, wurde neben der Methanolfixierung der Zellen (-20°C Methanol für 10 Minuten) auch die Fixierung 4,5% Formaldehyd (wie es zur Fixation von Operationspräparaten verwendet wird) für 15 Minuten durchgeführt. Im Vergleich beider Fixationsmethoden mußte festgestellt werden, daß beide gleichrangig waren und gute Ergebnisse zeigten (Abb.18-21; Negativkontrollen Abb. 22,23).

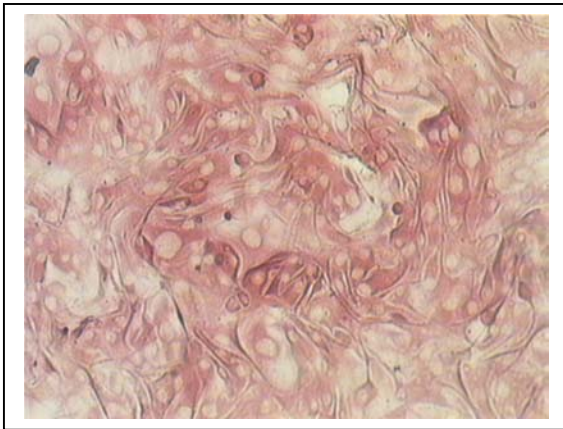


Abb.18: Primärzellen, Kultur 10/99, 6. Tag

mit Formaldehyd fixiert Verwendung des PR-Antikörpers, rot gefärbte Zellen sind PR positiv.
(100fache Vergrößerung)

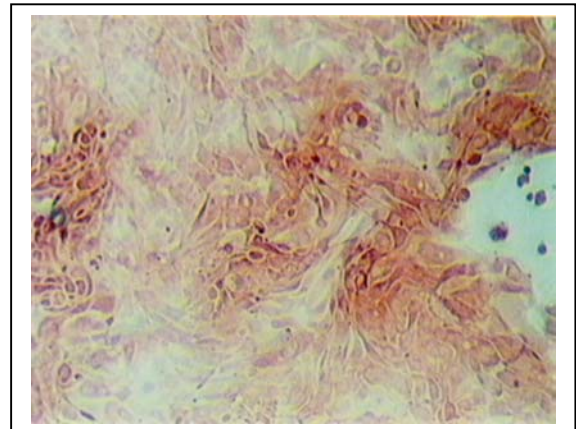


Abb.19: Primärzellen, Kultur 7/99, 11. Tag

mit Methanol fixiert Verwendung des PR-Antikörpers, rot gefärbte Zellen sind PR positiv.
(63fache Vergrößerung)

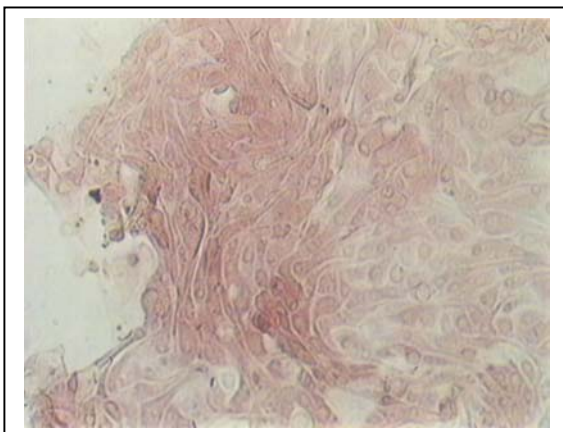


Abb.20: Primärzellen, Kultur 7/99, 11. Tag

mit Formaldehyd fixiert Verwendung des ER-Antikörpers, rot gefärbte Zellen sind ER positiv.
(100fache Vergrößerung)

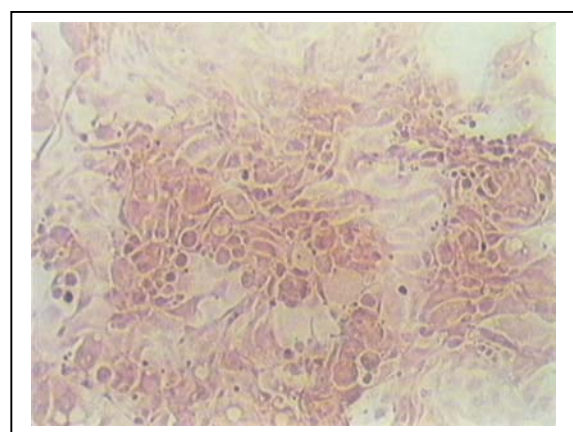


Abb.21: Primärzellen, Kultur 7/99, 11. Tag

mit Methanol fixiert Verwendung des ER-Antikörpers, rot gefärbte Zellen sind ER positiv.
(63fache Vergrößerung)

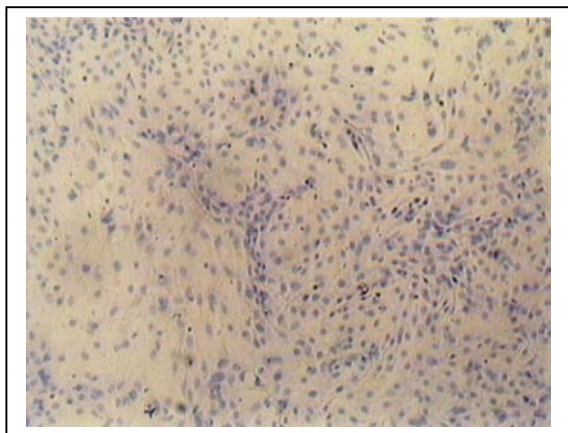


Abb.22: Primärzellen, Kultur 3/99, 4. Tag

Negativkontrolle für den ER-Antikörper,
keine Färbung der Zellen
(32fache Vergrößerung)

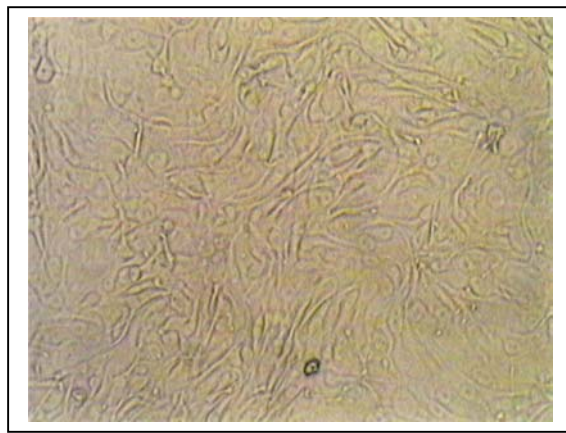


Abb.23: Primärzellen, Kultur 10/99, 6. Tag

Negativkontrolle für den PR-Antikörper,
keine Färbung der Zellen
(100fache Vergrößerung)

Die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises der Steroidrezeptoren war mit dem Nachweis des **Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR)** vergleichbar. Auch dieser war bei einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden in allen getesteten Kulturen nachweisbar. Die Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert (Abb.24, 25; Negativkontrolle Abb.26).

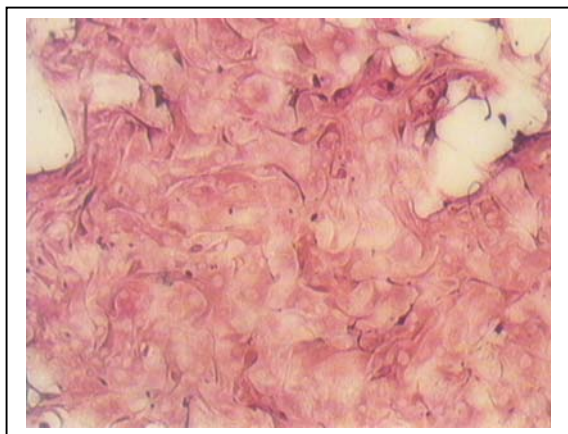


Abb.24: Primärzellen, Kultur 7/99, 11. Tag

Verwendung des AhR-Antikörpers,
AhR positive Zellen sind rot gefärbt.
(100fache Vergrößerung)

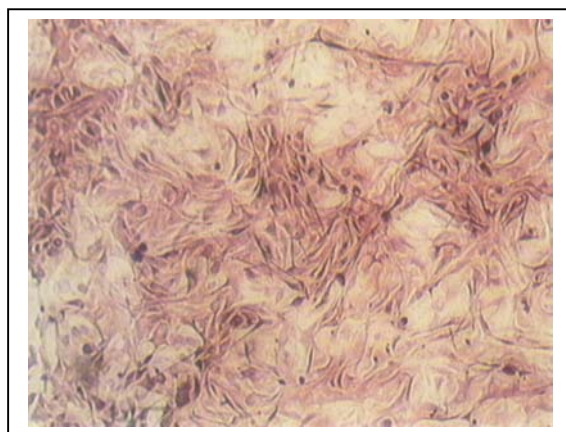


Abb.25: Primärzellen, Kultur 10/99, 6. Tag

Verwendung des AhR-Antikörpers,
AhR positive Zellen sind rot gefärbt.
(63fache Vergrößerung)

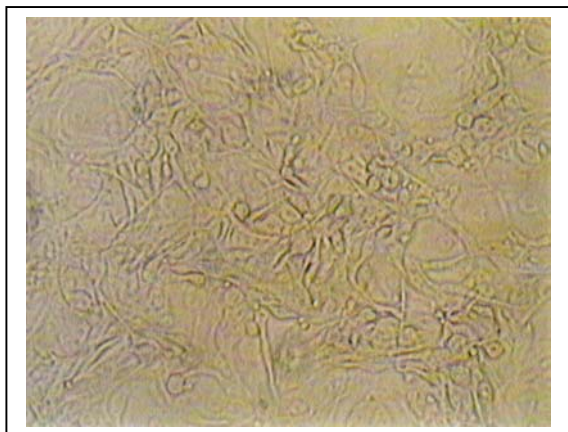


Abb.26: Primärzellen, Kultur 10/99, 6. Tag

Negativkontrolle für den AhR-Antikörper,
keine Färbung der Zellen
(100fache Vergrößerung)

Interessant war das Ergebnis bei Kultur 13/99. Bei dieser Kultur konnte aus technischen Gründen der erste Mediumwechsel erst am 5. Tag erfolgen. Schon am Proliferationsverhalten und am mikroskopischen Bild war festzustellen, daß die empfindlichen Epithelzellen abstarben, während die Stromazellen zum Großteil überlebten. Am 13. Kulturtag wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Cytokeratin-Antikörper, dem Vimentin-Antikörper und dem Arylhydrocarbon-Rezeptor-Antikörper durchgeführt. Während die mit dem Vimentin-Antikörper behandelten Zellen eine Färbung zeigten, war das Ergebnis mit dem Cytokeratin-Antikörper und dem Arylhydrocarbon-Rezeptor-Antikörper negativ. Es handelte sich also um eine Stromazellkultur ohne vorhandenen Arylhydrocarbon-Rezeptor.

Der dritte Schwerpunkt, der mittels Immunhistochemie untersucht wurde, war die Proliferation der Zellen. Primärzellkulturen zeigen ein völlig anderes Proliferationsverhalten als Langzeitkulturen. Während die Zellproliferation der Langzeitkultur einem exponentiellen Kurvenverlauf folgt, ist die Zuwachsrate bei der Primärzellkultur sehr gering oder stagniert sogar. Da die Zellproliferation der Primärzellen ca. ab dem 8. Tag mikroskopisch nicht mehr beobachtbar war, bestanden zu Beginn Zweifel an der Vermehrungsfähigkeit der kultivierten Primärzellen. Mit Hilfe des **Ki-67 Antikörpers** kann die DNA-Synthese in den Zellkernen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Ki-67 wird nur in der aktiven Phase des Zellzyklus exprimiert. Proliferierende Zellen konnten am 21. und sogar noch am 53. Kulturtag dargestellt werden (Abb.27). Damit war eindeutig bewiesen, daß die primär kultivierten Endometriumzellen auch noch nach dem 8. Kulturtag DNA synthetisieren.

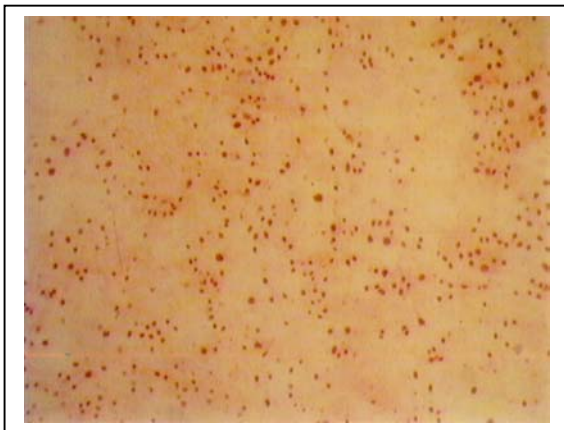


Abb.27: Primärzellen, Kultur 8/99, 21. Tag

Verwendung des Ki-67-Antikörpers,
Ki-67 positive Zelle zeigen rot gefärbte
Kerne, welche gerade DNA synthetisieren.
(32fache Vergrößerung)

3.4 Ergebnisse des MTT-Tests

Zu Beginn der Etablierung der Kultivierung der Epithelzellen des humanen Endometrium sollte auch die Stoffwechselaktivität der Zellen nachgewiesen werden. Um den Stoffwechsel nachzuweisen kann die Aktivität der Mitochondrien mit Hilfe des MTT-Tests analysiert werden (siehe Kap. 2.9). Es wurden verschiedene Kulturen an verschiedenen Kulturtagen

diesem Test unterzogen. Vergleicht man die ermittelten Extinktionswerte in Bezug auf den Kulturtag, so läßt sich feststellen, daß zunächst mit zunehmendem Alter der Kultur auch die Extinktionswerte stiegen. Die Steigerung war bis zum 8. Tag zu verzeichnen. Das war zu erwarten, da in diesem Zeitraum der Hauptanteil der Zellproliferation stattfand (siehe Kap. 3.1.1). Somit war die Zunahme der Extinktion mit einer Zunahme der Mitochondrienzahl zu erklären. Ab dem 8. Kulturtag blieb die Zellzahl zwar noch für einige Zeit konstant, aber die Stoffwechselaktivität nahm bereits ab. Dies verdeutlicht sich durch die sinkenden Extinktionswerte.

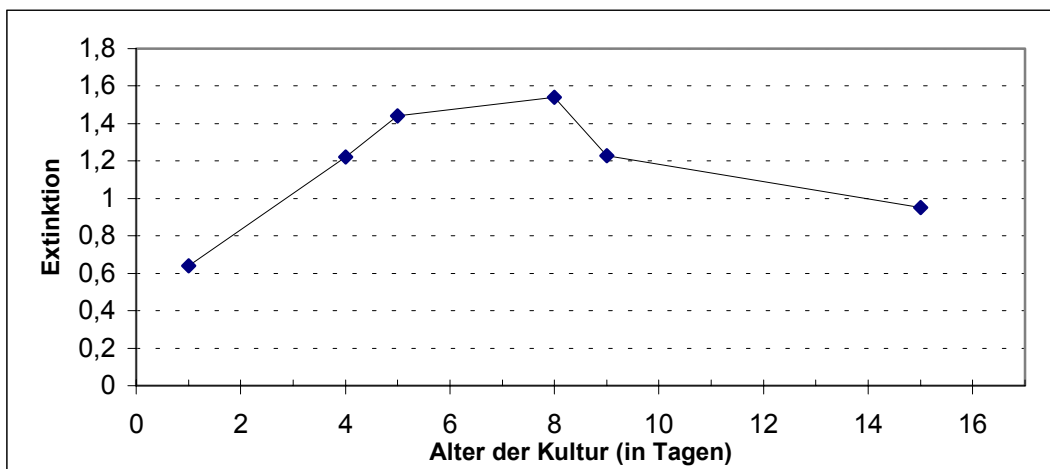


Abb.28: Extinktionswerte des MTT-Tests in Bezug auf den Kulturtag der Primärzellkultur

3.5 Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen

Die bei den Expositionstests eingesetzten Konzentrationen im Medium waren für

PCB 153: 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M
 β -HCH: 200 pM, 2 nM, 20 nM, 200 nM, 2 μ M
 p,p'-DDE: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M.

Dabei korrelierte die jeweils niedrigste Testkonzentration mit der von Antje Kuntzsch (48) nachgewiesenen Substanzkonzentration im humanen Endometrium.

Wie beschrieben (siehe Kap. 2.6 und 2.8), erfolgte die Quantifizierung der Zellzahl mit der Neutralrotmethode. Es erfolgte pro Konzentration innerhalb einer Substanz und je Expositionszeit eine Fünffachbestimmung.

3.5.1 Exposition der Primärzellkultur

(a) PCB 153

Nach der Exposition der Primärzellen mit PCB 153 hatte sich nach den ersten 24 Stunden die Zellmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert. Sie schwankte zwischen 97% (1 μM) und 102,4% (100 pM) (Abb.29).

Nach 48 Stunden war es zu einer geringen Zunahme der Zellzahl gekommen, welche bei 1 nM PCB 153 mit 109,1% begann, bei 10 nM PCB 153 mit 110,3% am größten war und bei der höchsten Konzentration von 1 μM PCB 153 107% betrug.

Nach 72 Stunden durchlief die Proliferationsrate der exponierten Proben ein Maximum bei 10 nM (121,7%). In den hohen Konzentrationen von 100 nM und 1 μM PCB 153 im Medium war diese Proliferation nur noch mäßig (111,9% bei 100 nM) bis gar nicht mehr (102,5% bei 1 μM) nachweisbar. Die Zellmengen nach 24h Exposition unterschieden sich signifikant von den Zellmengen nach 72h Exposition ($p=0,008$; $\alpha=0,01$; Turkey's HSD-Test).

Den stärksten Effekt auf die Zellproliferation hatten 1 nM und 10 nM PCB 153 im Medium nach einer Kulturzeit von 72 Stunden.

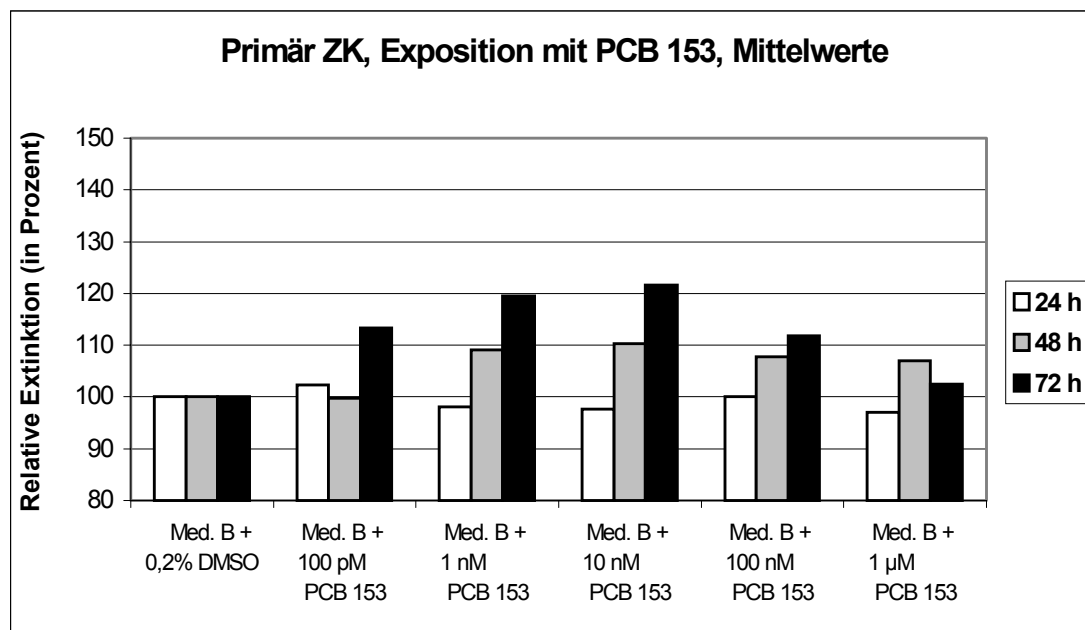


Abb.29: Exposition der Primärzellen mit PCB 153

(b) β -HCH

In den ersten 24 Stunden blieb die Zellzahl nach einer Exposition mit β -HCH in den drei niedrigsten Konzentrationen gleich und bewegte sich zwischen 98,1% (20 nM) und 104,5% (200 pM). Bei den beiden höchsten Konzentrationen von β -HCH im Medium fand man eine mäßige Proliferationszunahme auf 109,5% (200 nM) und 110,8% (2 μ M) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.30).

Nach 48 Stunden hatten sich die Zellmengen in allen Proben angeglichen und bewegten sich auf dem Ausgangsniveau.

Erst nach einer Expositionszeit von 72 Stunden kam es bei den drei niedrigsten Substanzkonzentrationen von β -HCH im Medium zu einer Zunahme der Zellmenge um 12,1% (200 pM) und 15,7% (2 nM) gegenüber den Kontrollansätzen. Dabei war sie bei 2 nM β -HCH im Medium am größten. Bei den höheren Konzentrationen kam es zum Stagnieren der Zellmenge. Auffallend ist auch hier, daß die stärkste Proliferation erst nach 72 Stunden bei den Zellen, die mit den niedrigsten Testkonzentrationen kultiviert wurden, zu beobachten war.

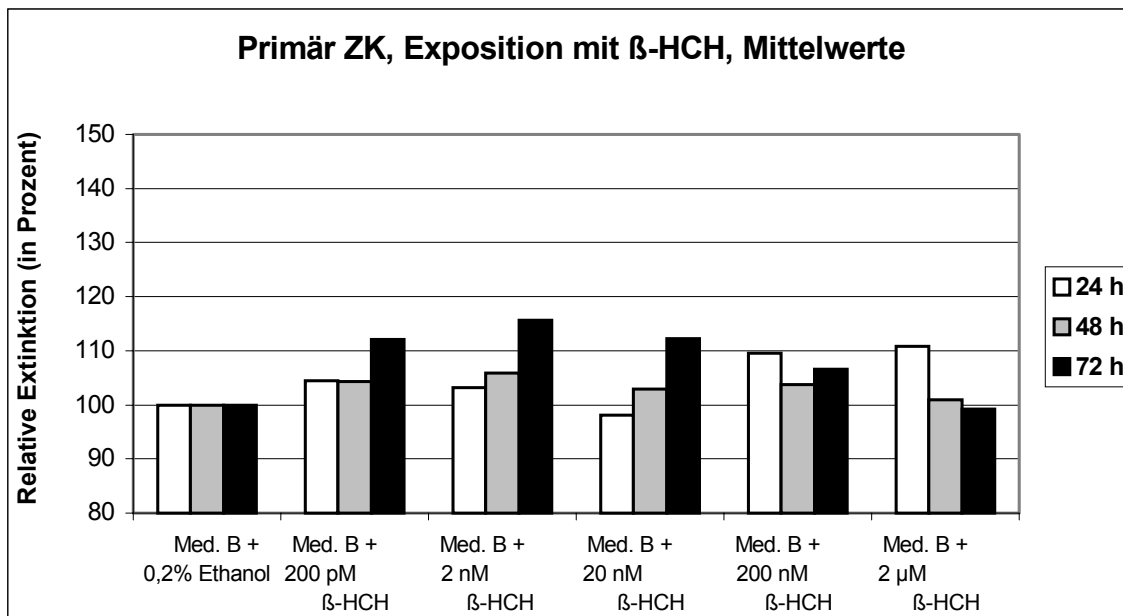


Abb.30: Exposition der Primärzellen mit β -HCH

(c) p,p'-DDE

Nach 24 Stunden Exposition mit p,p'-DDE fand sich das gleiche Ergebnis wie bei der Exposition mit β -HCH. Nur bei den höchsten Konzentrationen war eine erhöhte Zellmenge von 104% (1 μ M) und 107,8% (10 μ M) zu beobachten (Abb.31).

Wie bei β -HCH hatte sich auch nach 48 Stunden die Zellzahl kaum verändert. Mit steigender Konzentration nahm die Zellmenge bis auf 107% (10 μ M) der Zellmenge der Kontrollgruppe zu. In den niedrigen Substanzmengen war zu diesem Zeitpunkt noch keine Zunahme der Proliferation zu verzeichnen.

Erst nach 72 Stunden war jetzt eine mäßige Steigerung der Zellproliferation um maximal 12,9% im Vergleich zur Zellmenge der Kontrollzellkultur zu beobachten. Die stärkste Proliferation war bei den Zellen, die mit der niedrigsten p,p'-DDE-Konzentration kultiviert wurden, festzustellen. Mit steigender Konzentration nahm die Anzahl der Zellen ab.

Nach einer Exposition der Primärzellen mit 1 nM p,p'-DDE im Medium über 72 Stunden war also die größte Zellzahlzunahme von 12,9% zu verzeichnen. Die Zellmengen nach 72 Stunden Exposition waren in Bezug auf die Zellmengen nach 24 und 48 Stunden Exposition signifikant unterschiedlich ($p=0,03$; $\alpha=0,05$; Fischer LSD-Test).

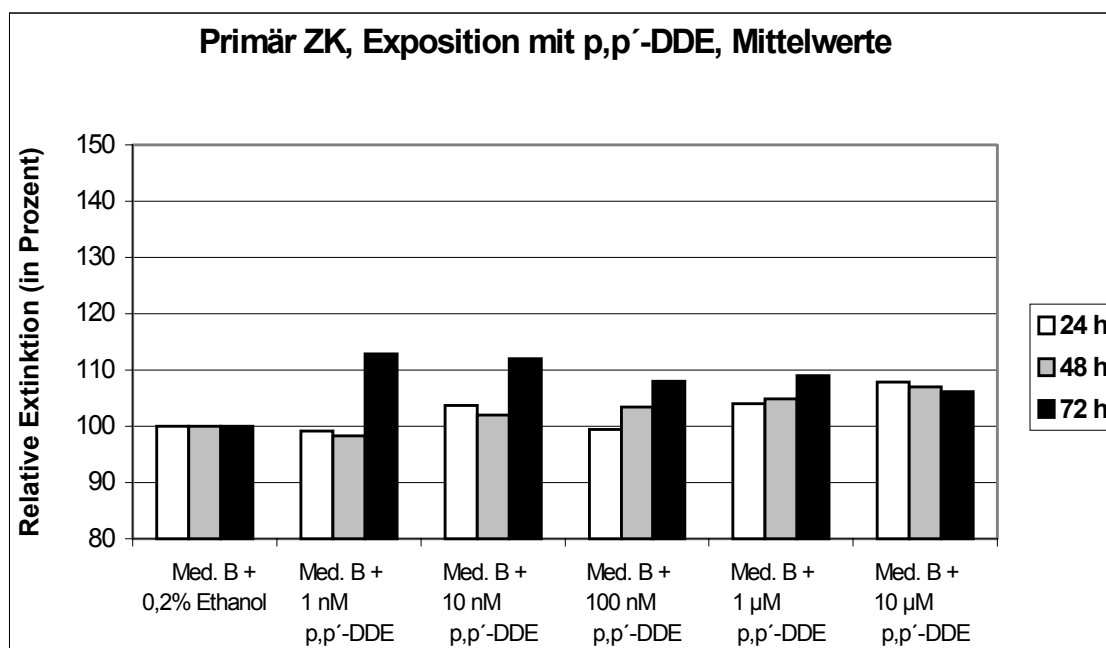


Abb.31: Exposition der Primärzellen mit p,p'-DDE

(d) Zusammenfassung der Ergebnisse der Expositionsversuche mit Primärzellen

Werden der Primärzellkultur des humanen Endometriums die halogenierten Kohlenwasserstoffe PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE zugesetzt, haben sie eine proliferationsfördernde Wirkung. Dieses Ergebnis überrascht und steht im Gegensatz zum erwarteten zellschädigenden Effekt. Die Zellproliferation war abhängig von der Expositionsdauer und der Expositionskonzentration.

Die Zellvermehrung ist am stärksten nach 72 stündiger Exposition. Für PCB-153 und p,p'-DDE ist die Zunahme der Zellzahl gegenüber den Kontrollkulturen nach 72 Stunden Exposition statistisch signifikant, wobei die statistische Sicherheit für PCB 153 bei 99% und für p,p'-DDE bei 95% liegt. Der größte Zuwachs der Zellmenge wurde bei den niedrigsten eingesetzten Konzentrationen gefunden. Bemerkenswert dabei ist, daß es sich um Konzentrationen handelt, wie sie im humanen Endometrium nachgewiesen werden konnten (48). PCB 153 hatte den stärksten Einfluß auf die Proliferation, mit 21,7% Zellmenge über dem Kontrollwert bei 10 nM Substanz im Medium, gefolgt von β -HCH mit 15,7% bei 2 nM β -HCH im Medium. Den geringsten Einfluß hatte p,p'-DDE mit mäßigem 12,9% Zellzuwachs bei einer Konzentration von 1 nM im Medium.

Auffallend war auch, daß mit steigender Expositionskonzentration die Zellzahl innerhalb der 72 Stunden Inkubation zurück ging. Nach 24 Stunden war in den höchsten Konzentrationen, die eingesetzt wurden, bei einer Kultivierung mit β -HCH und p,p'-DDE im Medium eine mäßige Proliferation festzustellen (2 μ M β -HCH = 110,8%; 10 μ M p,p'-DDE = 107,8%), während dies bei PCB 153 nicht der Fall war. Je länger nun die Zellen mit den entsprechenden polychlorierten Kohlenwasserstoffen kultiviert wurden und je höher die Substanzkonzentrationen waren, um so geringer war die Zellmenge im Vergleich zu den niedrig exponierten Proben.

3.5.2 Exposition der MCF-7 Zelllinie

(a) PCB 153

Bereits nach 24 Stunden Exposition der MCF-7 Zellen mit PCB 153 proliferierten die Zellen mäßig bis auf 111,2% (1 nM) des Kontrollansatzes mit Ausnahme der Zellen, die mit der höchsten Substanzkonzentration (1 μ M) im Medium kultiviert wurden. Dort blieb die Zellmenge unverändert (Abb.32).

Innerhalb der nächsten 24 Stunden bekamen die Zellen einen Wachstumsschub, so daß nach 48 Stunden in Abhängigkeit von der Konzentration bis 10 nM die Zellmenge bis auf 122,2% im Vergleich zur Kontrollkultur anstieg. Auch bei 100 nM PCB 153, der nächst höheren Konzentration lag die Zunahme der Zellmenge mit 121,3% im gleichen Bereich.

Nach 72 Stunden konnte keine weitere Zunahme der Zellmenge beobachtet werden. Sie lag aber immer noch zwischen 110,3% (1 μ M) und 118,5% (100 nM) im Vergleich zur Zellzahl der Kontrollgruppe. Die Zellproliferation, der mit 1nM, 10nM und 100nM PCB 153 kultivierten Zellen, ist im Vergleich zum Kontrollansatz signifikant ($p=0,01$; $\alpha=0,01$; Fisher LSD-Test) erhöht.

Die Zellmengen der mit der höchsten Konzentration von 1 μ M kultivierten Ansätze waren zu denen mit 100 nM, 10 nM und 1 nM PCB 153 kultivierten Zellen signifikant unterschiedlich ($p=0,01$; $\alpha=0,05$; Fisher LSD Test).

Das Maximum der Zellproliferation wurde also nach 48 Stunden Kultivierung mit 10 nM und 100 nM PCB 153 im Medium verzeichnet.

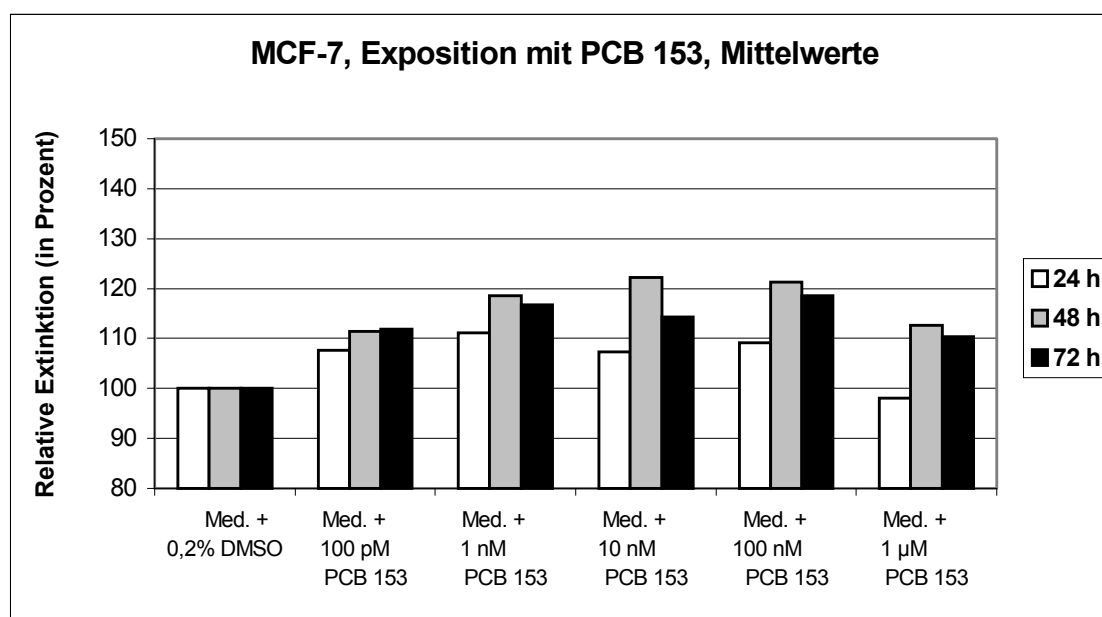


Abb.32: Exposition der MCF-7 Zellen mit PCB 153

(b) β -HCH

Bis zu 19,9% Zellzuwachs im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24 Stunden Exposition ohne Abhängigkeit von der Konzentration von β -HCH waren nachzuweisen. Dieser Zuwachs ist statistisch signifikant ($p < 0,001$; $\alpha = 0,01$). Dabei unterschieden sich die Zellmengen der einzelnen Konzentrationen kaum. Nur bei 2 μ M β -HCH im Medium, der höchsten Konzentration war die Zellzahl nach 24 Stunden Exposition auf etwa 96% der Kontrollgruppe leicht abgesunken (Abb.33).

Nach 48 und 72 Stunden fand man in den vier niedrigsten Konzentrationen eine fast unveränderte Zellmenge. Nur bei 2 μ M β -HCH war nach 48 Stunden zunächst eine erhöhte Zellmenge von 109,4% festzustellen, die aber nach 72 Stunden nicht mehr nachzuweisen war. Es war ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen nach Exposition mit 2 μ M β -HCH im Vergleich zu allen anderen Expositionskonzentrationen festzustellen ($p < 0,001$; $\alpha = 0,01$).

Das Maximum der Zellproliferation nach einer Kultivierung mit β -HCH war also bereits nach 24 Stunden erreicht und ließ sich bis zu einer Konzentration von 100 nM β -HCH auch noch nach 72 Stunden nahezu unverändert feststellen. Die Steigerungsraten lagen zwischen 16% und fast 20%.

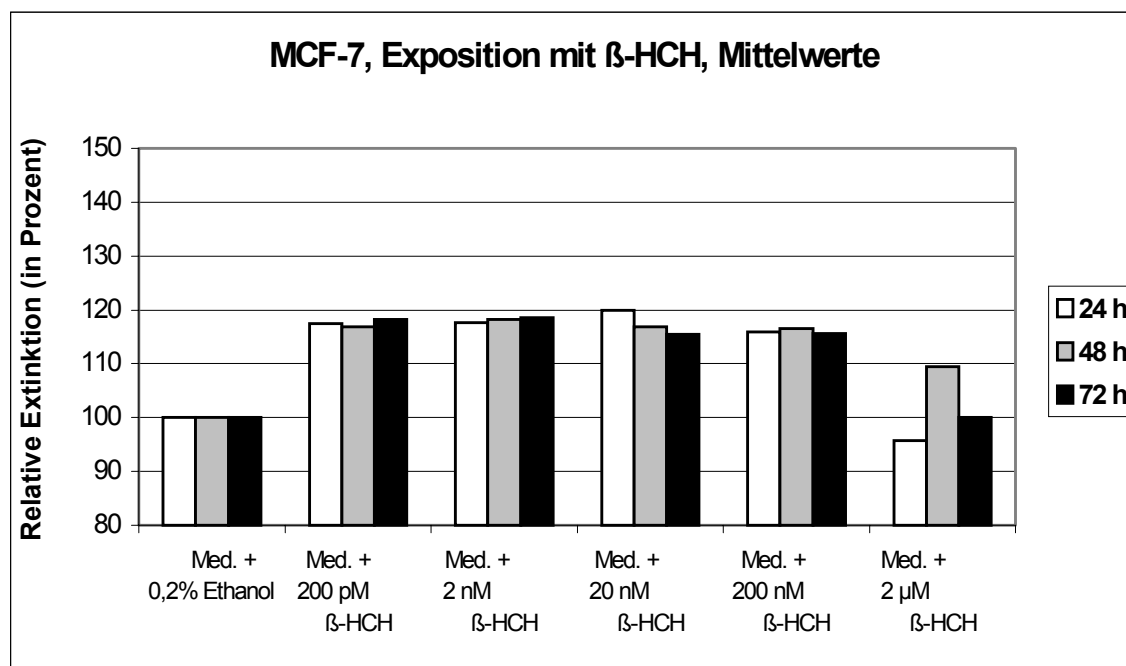


Abb.33: Exposition der MCF-7 Zellen mit β -HCH

(c) p,p'-DDE

Bei der Exposition mit p,p'-DDE hatte sich die Zellmenge nach 24 Stunden in Abhängigkeit von der Konzentration von p,p'-DDE im Medium bereits auf 128,1% (1 nM) bzw. 138,6% (1 µM) erhöht. Bei 10 µM eingesetzter Substanzmenge war zwar die geringste Zellmenge zu finden, aber dennoch mit 123,3% zur Kontrollgruppe noch eine starke Zellproliferation festzustellen (Abb.34). Die Zellproliferation nach 24 Stunden Exposition war im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,001$; $\alpha = 0,01$)

Nach 48 Stunden ist dieser proliferative Effekt zunächst leicht rückläufig, aber nach 72 Stunden kam es nochmals zu einer Zunahme der Zellmenge auf bis zu 147,8% (1 µM). Die generelle Zunahme war auch hier wieder bei der höchsten Konzentration von 10 µM mit 128,5% am geringsten.

Ähnlich den Ergebnissen der Expositionsversuche mit β -HCH war der Hauptanteil der Proliferation bereits nach 24 Stunden Exposition mit p,p'-DDE erreicht. In den folgenden 48 Stunden setzte aber noch einmal eine deutliche Steigerung um jeweils ca. 5-10% ein.

Abweichende Ergebnisse stellten sich wieder bei der höchsten eingesetzten Wirkstoffkonzentration dar und waren in Bezug auf die Konzentrationen von 1 µM, 100 nM und 10 nM sowie zur Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$; $\alpha = 0,01$; Fisher LSD Test).

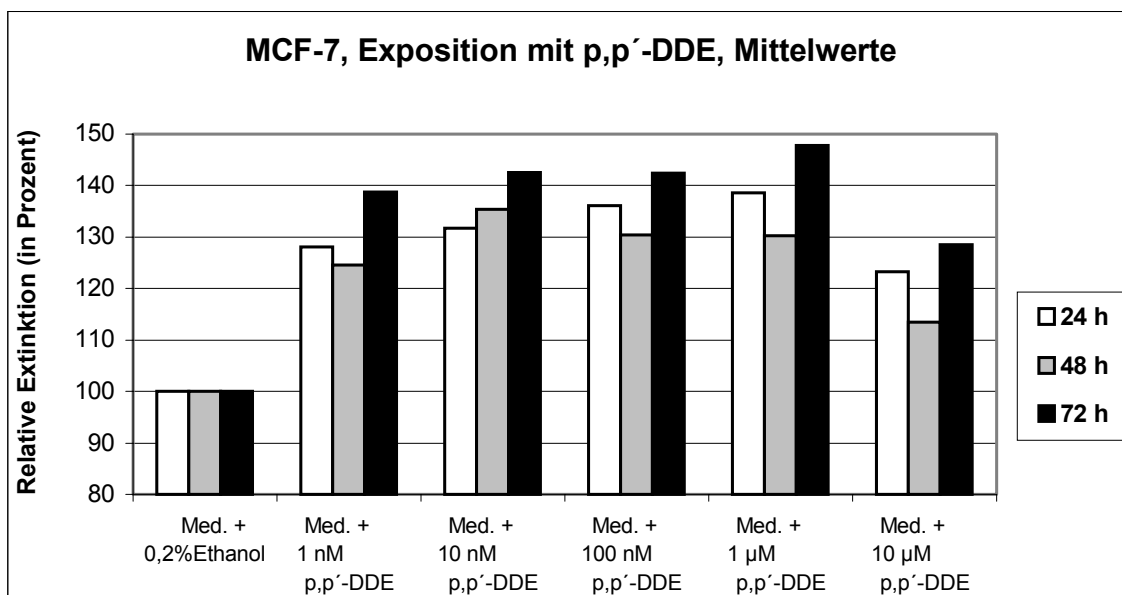


Abb.34: Exposition der MCF-7 Zellen mit p,p'-DDE

(d) Zusammenfassung der Ergebnisse der Expositionsversuche der MCF-7 Zellen

Betrachtet man die Exposition der MCF-7 Zellen mit PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE in ihrer Gesamtheit, ist festzustellen, daß die Substanzen auch hier die Zellproliferation stimulieren. Der Hauptanteil der Proliferation war bereits nach 24 Stunden erfolgt, außer bei der Exposition mit PCB 153, hier benötigten die Zellen 48 Stunden zu Proliferation.

Während die Zellmenge nach der Exposition mit p,p'-DDE nach 48 Stunden leicht rückläufig war, blieb sie nach einer Behandlung mit β -HCH stabil und erfuhr unter PCB 153 Einfluß noch eine Steigerung.

Dafür waren die Zellen, die mit p,p'-DDE kultiviert wurden, in den folgenden 24 Stunden nochmals zur Proliferation fähig, während die Zellen, die den anderen beiden Substanzen ausgesetzt waren, nicht mehr proliferierten. Unter PCB 153 Exposition sank die Zellzahl in diesem Zeitintervall.

Insgesamt vermehrten sich die Zellen unter p,p'-DDE Einfluß am stärksten (signifikanter Unterschied mit einer statistischen Sicherheit von 99%). Hier erreichte die Zellmenge nach 24 Stunden Werte zwischen 128,1% (1 nM) und 138,6% (1 μ M) gegenüber der Kontrollgruppe. Dies steigerte sich noch einmal, nach 72 Stunden wurden bis zu 47,8% (1 μ M) Zellzuwachs zur Kontrollgruppe erreicht.

Geringere aber signifikante Effekte waren bei der β -HCH und PCB 153 Exposition zu beobachten (unter β -HCH-Exposition bezogen auf den Kontrollwert mit einer Sicherheit von 99%, bei der Exposition mit 1nM und 100nM PCB 153 im Vergleich zum Kontrollwert mit einer statistischen Sicherheit von 95%). Für alle anderen Konzentrationen PCB 153 kann nur von einem Trend bezüglich eines Unterschieds zum Kontrollwert ausgegangen werden. Die größten Effekte lagen bei 19,9% über der Kontrollgruppe bei 20 nM β -HCH nach 24 Stunden Exposition und bei 22,2% über dem Vergleichswert nach 48 Stunden Exposition mit 10 nM PCB 153.

Die proliferativen Effekte jeder Substanz durchliefen ein Maximum, das bei den einzelnen Substanzen aber sehr unterschiedlich ausgeprägt war.

Bezüglich des Zellrückgangs bei den höchsten Expositionskonzentration läßt sich ein signifikanter Unterschied zu den vorangehenden Konzentrationen bei allen Substanzen feststellen. Dieser Unterschied ist bei β -HCH mit großer statistischer Sicherheit (99%) nachzuweisen. Für PCB 153 und p,p'-DDE kann von einem erkennbaren Trend gesprochen werden, da hier die statistische Sicherheit bei ca. 60% liegt (Fisher LSD Test).

3.5.3 Vergleichende Betrachtung der Exposition von Primärzellen und MCF-7 Zellen mit polychlorierten Kohlenwasserstoffen in der Zellkultur

Zwischen beiden Zellarten bestanden bezüglich der Exposition mit β -HCH und p,p'-DDE signifikante Unterschiede in den Expositionscurven (β -HCH $p=0,006$, p,p'-DDE $p<0,0001$; $\alpha=0,01$)

(a) PCB 153

24 Stunden Exposition mit PCB 153 zeigte in der Primärzellkultur keine Wirkung auf die Zellzahl, während die MCF-7 Zellen bereits eine mäßige Proliferation besonders in den drei mittleren Konzentrationen zeigten.

Nach 48 Stunden proliferierten die Primärzellen außer in der niedrigsten Konzentration mäßig. Die MCF-7 Zellen hatten nach 48 Stunden ihrer maximale Zellmenge erreicht. Den größten Zellzuwachs zeigten die drei mittleren Konzentrationsbereiche, wobei sich die Zellmenge zwischen 118,6% (1 nM) und 122,2% (10 nM) im Vergleich zur Kontrollgruppe bewegte.

Während die Zellen der Zelllinie in den nächsten 24 Stunden kein Wachstum mehr zeigten, konnten für die Primärzellen nach 72 Stunden die höchsten Zellmengen beobachtet werden. Die im Medium mit 1 nM PCB 153 kultivierten Primärzellen erreichten Zuwachsraten von 19,6% und die Zellen im Medium mit 10 nM PCB 153 21,7% in Bezug auf die Kontrollzellen.

Beide Zellsysteme erreichten die gleichen maximalen Zellmengen nach Exposition mit PCB 153, allerdings brauchten die MCF-7 Zellen dafür nur 48 Stunden, während die Primärzellen 72 Stunden zur Proliferation benötigten.

Bei beiden Zellarten hatten die niedrigste und die höchste Expositionskonzentration den geringsten Einfluß auf die Zellmenge.

(b) β -HCH

Die Exposition mit β -HCH bewirkte bei den MCF-7 Zellen mit Ausnahme der höchsten Konzentration bereits in den ersten 24 Stunden maximale Zellproliferation, wobei die Zellzahl um 19,9% (20 nM) über dem Kontrollwert lag. Bei den Primärzellen waren es die Zellen in den beiden höchsten Konzentrationen, die sich nach 24 Stunden zu einer mäßigen

Proliferation fähig zeigten, während in den drei niedrigsten Konzentrationen keine Veränderung festzustellen war.

Auch nach 48 Stunden hatte sich bei den Primärzellen, die in den niedrigen Konzentrationen mit β -HCH exponiert wurden, die Zellzahl nicht verändert. In den beiden Ansätzen mit hohen Wirkstoffkonzentrationen war sie rückläufig. Die MCF-7 Zellen blieben in ihrer Zellmenge nach 48 Stunden stabil. Die Zellen unter dem Einfluß der höchsten Konzentration proliferierten nun sogar mäßig.

Für die Zellen der Zelllinie veränderte sich die Zellzahl auch nach 72 Stunden Exposition kaum. Nur die Zellzahl, der bei höchster Konzentration kultivierten Zellen verringerte sich wieder. Die Primärzellen waren nun nach 72 Stunden Exposition zu einer Proliferation bis 15,7% (2 nM) über den Kontrollwert fähig, allerdings nicht in den beiden höchsten Konzentrationen. Die im Medium mit 2 nM β -HCH kultivierten Zellen erreichten damit fast den gleichen Zellzuwachs wie die Zellen der Zelllinie.

Mediumzusätze von 200 pM, 2 nM und 20 nM β -HCH führten bei beiden Zellarten zu einer Zellproliferation. Die MCF-7 Zellen erreichten ihre maximale Zellmenge bereits nach 24 Stunden, die Primärzellen benötigten dazu 72 Stunden. Während eine Konzentration von 200 nM β -HCH im Medium die Primärzellen mäßig bis gar nicht beeinflusste, proliferierten die MCF-7 Zellen. Die höchste Konzentration von 2 μ M β -HCH erhöhte die Zellmenge der Primärzellen nach 24 Stunden und der MCF-7 Zellen nach 48 Stunden mäßig, hatte aber nach 72 Stunden auf keine der beiden Zellarten einen Einfluß.

(c) p,p'-DDE

Der Unterschied zwischen den beiden Kultursystemen bezüglich der Beeinflussung der Proliferation war durch die Exposition mit p,p'-DDE am stärksten. Während die Primärzellen sich nach 24 und 48 Stunden kaum von der Anwesenheit von p,p'-DDE im Medium beeinflussen ließen und sich auch nach 72 Stunden nur eine mäßige Proliferation der Zellen im mit niedriger p,p'-DDE Konzentration versetzten Medium zeigte, hatte p,p'-DDE auf die Proliferation der MCF-7 Zellen einen großen Einfluß. Dieser Effekt war bei Konzentrationen von 10 nM bis 1 μ M am stärksten. Bereits nach 24 Stunden fanden sich Zellzuwachsraten von bis zu 38,6% (1 μ M), die sich nach 72 Stunden auf 47,8% (1 μ M) über dem Kontrollwert steigerten.

Bei beiden Zellarten hatte die höchste Konzentration von p,p'-DDE den geringsten proliferativen Effekt.

4. Diskussion

4.1 Zielstellung

Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren die Etablierung der Primärzellkultur der humanen Endometriumzellen, die immunhistochemische Charakterisierung der Zellen mit dem Nachweis des Estrogen-, Progesteron- und Ah-Rezeptors sowie Untersuchungen zur Wirkung polychlorierter Kohlenwasserstoffe auf die Wachstumsdynamik der kultivierten Zellen der Gebärmutter Schleimhaut. Die ausgewählten Substanzen waren in vorangegangenen Untersuchungen nicht nur im Endometrium nachgewiesen worden, es wurde auch partiell eine Anreicherung in diesem Gewebe gegenüber anderen uterinen Arealen und den im Blut zirkulierenden Konzentrationen festgestellt (43, 48, 95, 113).

Der regelrechte Aufbau der Gebärmutter Schleimhaut unter dem Einfluß der Estrogene und Gestagene ist Grundvoraussetzung für die Implantation der Zygote (23). Störungen in der Hormon-Rezeptor-Interaktion mit Folgen auf die Genexpression sowie agonistische oder antagonistische Effekte von endokrin wirksamen Substanzen aus der Umwelt können die Nidation erschweren oder gar verhindern.

Im Zellkulturmodell sollte überprüft werden, ob die im humanen Endometrium nachgewiesenen Konzentrationen der ausgewählten polychlorierten Kohlenwasserstoffe meßbare Effekte auslösen können.

4.1.1 Modellsystem Zellkultur

Warum wurde als geeignetes Modell die Primärzellkultur gewählt ?

Der Ansatz, in Tierversuchen die Folgen der Exposition in vivo zu beobachten, ist fragwürdig. Zeigten doch die Kompetitionsversuche der vorangegangenen Arbeiten wesentliche Unterschiede bei der Rezeptorbindungsaffinität einzelner Verbindungen zwischen eingesetzten Kalbsuteri und dem humanen Endometrium (48).

Es war also nach einem geeigneten Modellsystem zu suchen. Dafür bot sich die Primärzellkultur von Zellen der Gebärmutter Schleimhaut an.

Die Forschung am humanen Endometrium in der Zellkultur begann zu Anfang dieses Jahrhunderts. 1926 wurde das Wachstum der Endometriumzellen in Kultur beschrieben (zitiert in 42). Seit dem haben sich die Erfahrungen mit der Primärzellkultur des Endometrium stetig weiter entwickelt.

Während es sich bei einer Langzeitkultur um transformierte Zellen also „Tumorzellen“ mit unbegrenztem Wachstum handelt, werden die Primärzellen direkt nach Entnahme aus dem

Organismus kultiviert. Dadurch sind Primärkulturen zunächst meist noch heterogen und verfügen in der Regel über gewebespezifische Enzymaktivitäten (111). Mit der Primärzellkultur hat man am ehesten die Möglichkeit unter in vivo ähnlichen Bedingungen zu arbeiten.

Nachteil der Primärzellkultur von humanen Gewebe ist, daß die Zellen nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen. Da die kultivierten Zellen nur eine kurze Lebensdauer haben und die Zellvermehrung gering ist, stehen nur die bei der Präparation gewonnenen Zellen zur Verfügung. Dem zufolge lassen sich nur eine begrenzte Anzahl an Versuchen mit einer Kultur durchführen.

Ein spezifisches Merkmal der Endometriumzellen sind ihre Sexualsteroidrezeptoren. Unter dem Einfluß der Steroidhormone proliferiert und differenziert sich das humane Endometrium. Viele Studien haben sich mit der Wachstumsstimulation der primären Endometriumkultur durch Zugabe von Estradiol zum Medium beschäftigt. *Kirk et al.* (39) konnte nach Zugabe von 10 nM Estradiol keinen eindeutigen Effekt auf die Proliferation der Epithelzellen in Kultur feststellen. *Chaminadas et al.* (13) und *Haining et al.* (31) fanden eine leichte Stimulation der Proliferation nach Estradiolgabe, welche aber nicht signifikant war.

Die DNA Synthese mit Hilfe des [³H]-Thymidin Einbaus wurde von *Marshburn et al.* (61) nach Zugabe von 10 nM Estradiol gemessen. Er stellte keine Unterschiede im [³H]-Thymidin Einbau im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Allerdings betrug hier die Inkubation mit dem Steroid nur 22 Stunden.

Bezüglich des Estradiol-Rezeptor-Levels gelang *Fleming et al.* (24) eine bemerkenswerte Feststellung. Er kultivierte Endometriumzellen über 10 Tage in normalem Medium und gab dann für zwei weitere Tage Estradiol in verschiedenen Konzentrationen zu. Gleichzeitig bestimmte er die Estradiol-Rezeptor Konzentration. Am zweiten Tag nach Steroidgabe kam es zur dosisabhängigen Steigerung der Rezeptormenge mit Höchstwerten bei 100 nM Estradiolgabe. Dieser Effekt war bei den Stromazellen in stärkerem Maße nachzuweisen, als bei den Epithelzellen. Es konnte damit gezeigt werden, das Epithel- und Stromazellen in der Kultur auf Steroide reagierten.

1997 gelang *Classen-Linke et al.* (15) neben dem immunhistochemischen Nachweis der Steroidrezeptoren auch der Nachweis der mRNA-Transskripte der Steroidrezeptoren mittels RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction). Die Kultivierung der humanen Endometriumzelle erfolgte auf Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) im Zwei-Kammer-System. Nach der Adhäsion der Zellen wurden ab dem zweiten Kulturtag 10 nM Estradiol dem Medium zugesetzt. Am 14. Kulturtag wurde die RT-PCR durchgeführt und die mRNA Transkripte der Steroidrezeptoren dargestellt. Mit dieser Studie konnten physiologisch intakte Endometriumzellen in der Zellkultur nachgewiesen werden.

Bereits Mitte der achtziger Jahre berichteten einige Autoren über den Nachweis der Estrogen-Sensitivität der Endometriumprimärzellen durch die Bestimmung des Prostaglandins $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (12, 88, 89, 90). Die Synthese und Sekretion von uterinen $PGF_{2\alpha}$ wird physiologisch von Estrogenen und Progesteron reguliert (88). *Casslen et al.* (12) und *Schatz et al.* (88, 89, 90) konnten zeigen, daß es nach Inkubation mit Estradiol (10 pM bis 100 nM) zur vermehrten $PGF_{2\alpha}$ -Sekretion ins Medium kam. Die Steigerung der Sekretion erwies sich als dosisabhängig (12). *Schatz et al.* (90) wies nach, daß die vermehrte $PGF_{2\alpha}$ -Produktion bei Estradiolgabe nicht von einem vermehrten Zellwachstum der Zellkultur begleitet wird. Somit bleibt unklar, ob der Effekt auf die $PGF_{2\alpha}$ -Synthese Rezeptor-vermittelt ist, da durch die Bindung des Estradiol am ER auch eine Zellproliferation ausgelöst werden müßte.

Eine andere Möglichkeit die Wirkung der Estrogene zu untersuchen, besteht im Nachweis von Peroxidase. *Okada et al.* (72) zeigte die Induktion der Peroxidasesynthese, nachdem kultivierte Endometriumzellen 12 Stunden mit 100 nM Estradiol inkubiert wurden. Auch hier konnte nicht nachgewiesen werden, ob es sich um eine Rezeptor abhängige Wirkung handelt. All diese Ergebnisse zeigen, daß die kultivierten Endometriumzellen hormonsensibel sind und man in dieser Beziehung von in vivo nahen Bedingungen bei der Primärzellkultur ausgehen kann.

Um gezielt die Wirkung der polychlorierten Kohlenwasserstoffe bei bekannter Estrogensensitivität und sicher positivem Estrogen-Rezeptor-Status untersuchen zu können, kann auf Zelllinien, die diese Eigenschaften stabil besitzen, zurückgegriffen werden. Solche Estrogen-Rezeptor positiven Zelllinien sind z.B. MCF-7, T47D oder ZR-75. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MCF-7 Zelllinie eines Mammakarzinoms ausgewählt. Mit dieser Zelllinie wurden schon viele Untersuchungen mit endokrin wirksamen Umweltchemikalien bezüglich ihrer estrogenen Potenz durchgeführt (E-SCREEN) (21, 79, 94). Bei Untersuchungen an MCF-7 Zellen können die Zellproliferation, die Induktion des Progesteron Rezeptors oder die Synthese und Sekretion von Zell-typischen Proteinen bestimmt werden. Dabei gilt die Induktion der Zellproliferation als das Merkmal der estrogenen Stimulation (79).

4.1.2 Testsubstanzen: PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE

Die Auswahl speziell dieser 3 halogenierten Kohlenwasserstoffe ergab sich aus Ergebnissen der bereits erwähnten Arbeit von Antje Kuntzsch (48). Im Rahmen dieser Studie wurde die Belastung von Endometrium, Myometrium, Myomknoten, Fettgewebe und Serum mit

PCB 138, PCB 153, PCB 169, PCB 180, β -HCH und γ -HCH (β - und γ -Hexachlorocyclohexan); o,p'-DDD (1,1-Dichlor-2-[p-chlorphenyl]-2-[o-chlorphenyl]-ethan); p,p'-DDD (1,1-Dichlor-2,2-bis-[p-chlorphenyl]-ethan); o,p'-DDE (2,4-bis-[Chlorphenyl]-2,2-dichlorethylen); p,p'-DDE (1,1-bis-[4-Chlorphenyl]-2,2-dichlorethylen); o,p'-DDT (2,4-bis-[p-Chlorphenyl]-2,2,2-trichlorethan); p,p'-DDT (1,1-bis-[p-Chlorphenyl]-2,2,2-trichlorethan); 4-tert-Octylphenol (1,1,3,3-Tetramethylbutylphenol) und Coumestrol untersucht. Dabei wurden sowohl Ergebnisse bei einer fertilen Probandinnengruppe als auch einer sterilen Probandinnengruppe erhalten. Von den oben genannten Substanzen konnten PCB 138, PCB 153, PCB 180, p,p'-DDE und β -HCH in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden.

Auch bei Untersuchungen an Geweben von Fischen (84), Krabben (103), Wasservögeln (71), Wildtieren (15) oder Menschen (44, 45, 67, 68, 75, 93, 95, 107, 110), fiel auf, daß fast immer die drei PCB-Kongenere PCB 138, PCB 153 und PCB 180, sowie der Pestizid-Metabolit p,p'-DDE und das HCH-Isomer β -HCH nachweisbar waren.

Dies verwundert nicht, wenn man bedenkt, daß zum Beispiel DDT noch heute in vielen Entwicklungsländern als Pestizid eingesetzt wird und auch in den Industrieländern jahrelang eines der wichtigsten Insektizide war (81). Das Abbauprodukt DDE konnte sich in der Umwelt anreichern und wird dort nur langsam abgebaut.

Auch das technische HCH als Isomerengemisch (siehe Kap. 1.5.3) wurde jahrelang als Insektizid in Europa verwendet, bevor es durch γ -HCH (Lindan) abgelöst wurde. Es ist zwar so, daß α -HCH und γ -HCH sich leichter in der Umwelt verteilen, als β -HCH und δ -HCH, aber der Abbau von α -HCH und γ -HCH erfolgt auch schneller. Die Halbwertszeiten von β -HCH und δ -HCH sind länger. Außerdem sind sie lipophil, so daß sie sich gut in fettreichem Gewebe ablagern.

Hinsichtlich der Exposition mit den polychlorierten Biphenylen verhält es sich ähnlich, da auch sie viele Jahre in großem Umfang in der Industrie eingesetzt wurden (siehe Kap. 1.5.1).

Zu Beginn der Expositionsversuche der kultivierten Zellen stellte sich die Frage, ob die Testsubstanzen überhaupt über das Medium in die Zielzelle eindringen können. Substanzen können auf verschiedenen Wege in die Zelle gelangen. Die Transfervorgänge an der Zellmembran werden als aktiver und passiver Transfer unterschieden. Der aktive Transport erfolgt über ATP (Adenosintriphosphat) verbrauchende Pumpen. Es werden Substanzen gegen ein Konzentrationsgefälle angereichert. Passiver Transfer erfolgt durch Diffusion über Proteine oder über die Phospholipid-Doppelschicht. Er ermöglicht den Ausgleich von Konzentrationen (74).

Bei allen drei Testsubstanzen handelt es sich um lipophile Stoffe, die vermutlich mittels Diffusion über die Phospholipid-Doppelschicht in die Zelle gelangen, also passiv. (96). Es konnte davon ausgegangen werden, daß die Substanzen ohne weitere Hilfsmittel in die Zellen gelangten und ihre entsprechende Wirkung entfalten konnten.

4.2 Etablierung der Primärzellkultur

4.2.1 Kulturbedingungen der Primärzellkultur von Epithelzellen des humanen Endometriums

Bei der Kultivierung der Primärzellen des humanen Endometriums wurde teilweise auf die Erfahrungen einer Arbeitsgruppe aus Tübingen zurückgegriffen (*persönliche Mitteilung*), die in vielen Punkten den in der Literatur veröffentlichten Daten glichen.

Die Wahl der Kulturbedingungen wurde durch die Expositionsuntersuchungen mit p,p'-DDE, β -HCH und PCB 153 bestimmt. Da diese Stoffe als Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung (91) bekannt sind, waren sowohl toxische Effekte, aber auch der Hormonwirkung ähnliche Phänomene zu erwarten.

Um bei der Untersuchung dieser Wirkungen andere Einflußgrößen auszuschließen, wurde bei der Kultur auf fetales Kälberserum (FKS) und Phenolrot aus folgenden Gründen verzichtet.

FKS enthält wie alle Seren eine Vielzahl von Inhaltsstoffen zu denen auch Hormone und Wachstumsfaktoren gehören. Die genaue inhaltliche Zusammensetzung sowie die Mengenverteilung der einzelnen Substanzen unterliegen der individuellen Variationsbreite und entziehen sich mehr oder weniger der Einflußmöglichkeit des Herstellers (58).

Besonders Primärzellen sind normalerweise unter Kulturbedingungen auf die Anwesenheit von FKS angewiesen, um in Kultur zu wachsen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärzellen an den ersten vier Tage nach Aussaat in serumhaltigen Medium kultiviert. In dieser Zeit kam es zur Anheftung und beginnenden Proliferation der Zellen. Am 4. Tag begann die Exposition mit den zu testenden Substanzen dabei erfolgte die Umstellung auf serumfreie Kultivierung. Um den Verlust von FKS auszugleichen, wurde als Ersatz Insulin, Transferrin und Selenit als kombiniertes Gemisch (ITS) dem Medium zugesetzt.

Diese Vorgehensweise deckt sich mit anderen Arbeiten über Steroid-Hormonrezeptor Wechselwirkungen an der Primärzellkultur des humanen Endometriums, bei denen ebenfalls auf FKS als Zusatz zum Medium verzichtet wurde (12, 15, 31, 49, 62). Andere Autoren (39, 88, 90, 108) arbeiteten mit 2 bis 10% FKS, nachdem sie das Serum mit Dextran beschichteter

Kohle behandelt hatten. Während dieses Absorptionsvorganges werden die endogenen Steroide des Serums extrahiert (39). *Marshburn et al. (61)*, der mit FKS im Medium kultivierte, berichtet, daß mittels Radioimmunassay weder 17β -Estradiol noch Progesteron in dem von ihm verwendeten Serum nachgewiesen wurden.

Dennoch scheint der Ersatz des FKS der sicherste Weg, zumal auch die Elimination von im Serum vorhandener Wachstumsfaktoren sinnvoll ist und die Kultur dies gut toleriert.

Ein weiterer nicht unwesentlicher Effekt des Serums ist, daß es das unerwünschte Wachstum von Fibroblasten in der Primärkultur begünstigt (58, 63). In serumfreien Kulturen wird die Fibroblastenproliferation unterdrückt (12).

Obwohl die verwendeten Primärzellkultur immer einen geringen Anteil an Stromazellen enthielten, kam es nie zu einem „Überwachsen“ der Epithelzellen durch die Stromazellen.

Als pH-Indikator sind die meisten Medien mit **Phenolrot** versetzt. Phenolrot ändert seine Farbe von rot zu gelb, wenn der pH-Wert sich ins saure Milieu verschiebt. Dies geschieht, wenn die Zellen Glukose aus dem Medium zu Lactat umsetzen (58). Mit Hilfe des Phenolrots kann der Mediumverbrauch während der Kultivierung gut nachvollzogen werden. Da bei der Primärkultur der Mediumverbrauch bei bestimmter Aussaatdichte bekannt war und so der Rhythmus des Mediumwechsels feststand, konnte auf Phenolrot verzichtet werden.

Phenolrot enthält Estrogen-ähnliche Domänen und bindet am Estrogenrezeptor (12). Nur *Classen-Linke et al. (15)* und *Casslen et al. (12)* berichten ebenfalls, daß sie ohne Phenolrot arbeiteten und bei *Watson et al. (108)* war die Phenolrotkonzentration sehr gering. Alle drei beschäftigten sich mit den Wechselwirkungen zwischen den Steroiden und ihren Rezeptoren. Leider ging aus den anderen Arbeiten nicht hervor, ob Phenolrot verwendet wurde oder nicht.

Obwohl die Kultivierung der Primärzellen auf der Kunststoffoberfläche der Kulturschalen gute Erfolge zeigte, wie auch die immunhistochemischen Untersuchungen beweisen (siehe Kap. 3.3), wurde im Laufe der Etablierung der Zellkultur ab Kultur 21/99 auf Kulturplatten mit einer **extrazellulären Matrix** (ECM) übergegangen. *Lindl et al. (58)* halten dies bei der Kultivierung adhärenter Zellen unter serumfreien Bedingungen für sehr wichtig. Der Zellkontakt mit Komponenten der extrazellulären Matrix begünstigt zudem die Zellproliferation (61).

Es gibt verschiedene Varianten der extrazellulären Matrix. *Classen-Linke et al. (15)* und *Marshburn et al. (61)* verwendeten Matrigel, welches Laminin, Kollagen, Proteoglykane sowie Wachstumsfaktoren enthält und ein Harnstoffextrakt des Engelbreth-Holm-Swarm Tumor ist, *Birkenfeld et al. (6)* benutzte Rinderhornhautepithelzellen und *Kirk et al. (40)* und *Casslen et al. (12)* arbeiteten mit Rattenschwanzkollagen beschichteten Kulturflächen.

Das Kollagen hat für organotypische Kulturen von Hepatozyten und Epithelzellen besondere Bedeutung erlangt (111), zudem ist es wirtschaftlicher als komplexe Matrixpräparate wie das Matrigel. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit Kollagen beschichteten Kulturplatten gearbeitet. Kollagen besteht aus verschiedenen Proteinen, die ein Maschenwerk bilden und quantitativ den Hauptanteil der Basalmembran ausmachen (12). Außer *Mervil et al.* (61), der bei Verwendung von ECM keine Vorteile gegenüber Kunststoff feststellen konnte, wird bei Verwendung von extrazellulärer Matrix über ein besseres Proliferationsverhalten der Zellen (6, 12, 61), über die Beibehaltung der Zytoarchitektur und Zellmorphologie (12, 61) und über möglichst in vivo nahe metabolische Aktivität (12) berichtet. Die kultivierten Zellen gleichen mehr ihren in vivo „Ebenbildern“ bezüglich der Kernmorphologie, des Wachstums und der Reaktion auf Hormone und Medikamente (10). Bei Verwendung von Matrigel kann sogar ein polarisierter Monolayer (15, 61) mit drüsenartigen Strukturen (15) entstehen.

Die positiven Auswirkungen von ECM auf die Proliferation konnten auch wir feststellen. Günstig machte sich die bessere Adhäsion der Zellen mit einem geringeren Zellverlust nach der Aussaat bemerkbar, besonders in Hinblick auf den Umstand, daß wenig Material zur Verfügung stand. Außerdem erwiesen sich die Kulturen als stabiler, was in einigen Kulturen mit der später einsetzenden Degeneration der Zellen zum Ausdruck kam (siehe Kap. 3.1.2).

4.2.2 Die immunhistochemischen Untersuchungen

a) Zelldifferenzierung

Eine Aufgabe bei der Etablierung der Primärzellkultur bestand in der strukturellen Charakterisierung der Kultur. Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich, bestimmte Proteine einer Zelle, die für den morphologischen Aufbau typisch sind, nachzuweisen.

Die Präparation der Epithelzellen für die Primärzellkultur erfolgte aus einem Gewebeverband verschiedener Zellarten heraus. Durch die Filtrationsschritte (siehe Kap. 2.4.1) ließ sich der überwiegende Teil an Stroma- und Blutzellen entfernen. Da aber der Filtrerrückstand immer noch einige unvollständig dissoziierte Zellaggregate enthielt, die noch einmal mit Kollagenase C dissoziiert wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß noch einige Stromazellen am Ende der Präparation in der Zellsuspension vorhanden waren. Da die Zellen im kultivierten Zustand nicht mehr eindeutig ihrem histologischen Ursprung zuzuordnen waren, war es schwierig, ohne Hilfsmittel die vorliegende Zellart zu bestimmen.

Deshalb wurde die Immunhistochemie anfangs zur Differenzierung von Epithel- und Stromazellen herangezogen. Auch *Birkenfeld et al.* (6), *Classen-Linke et al.* (15), *Haining et al.* (31), *Laird et al.* (49), *Marshburn et al.* (61), *Matthews et al.* (62) und *Mervil et al.* (63)

fürten diese Differenzierung durch. Mit Hilfe des Cytokeratin-Antikörpers, des Vimentin-Antikörpers und des Desmin-Antikörpers wurde sichtbar, daß es sich nach der beschriebenen Präparation nicht um eine reine Epithelzellkultur handelte, sondern um eine Epithelzellkultur mit einem geringen Anteil an Stromazellen. Diese Form der Mischkultur hat den Vorteil, daß die Kultur den in vivo Bedingungen mehr ähnelt als die Monokultur der Epithelzellen. Die wenigen Stromazellen behinderten das Wachstum der Epithelzellen nicht. Hinsichtlich der Morphologie der Zellen in Kultur konnten die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden. Es wird von wirbelartigen Ansammlungen der mehr rundlichen Epithelzellen (6, 61, 62) mit Ausprägung von zytoplasmatischen Ausläufern (Abb.4 und 5 in Kap. 3.1.1, Abb.10 in Kap.3.3) sowie von elongierten Stromazellen (62, 63) berichtet. Desmin-positive Zellen (Abb.17 in Kap. 3.3) in geringer Zahl konnten auch von *Mervil et al.* (63) nachgewiesen werden. Nach drei bis fünf Tagen waren 50% der Epithelzellen konfluent (105).

b) Rezeptorexpression und Zellproliferation

Den **Nachweis der Steroidrezeptoren** an Primärzellkulturen mittels Immunhistochemie führten *Mervil et al.* (63) und *Classen-Linke et al.* (15) durch, wobei er bei *Mervil et al.* (63) negativ und bei *Classen-Linke et al.* (15) positiv ausfiel. *Mervil et al.* (63) führte das auch von *Berthon et al.* (5) und *Cussenot et al.* (19) beobachtete Fehlen der Hormonrezeptoren in vitro auf einen Teil der Dedifferenzierung der Zellen während der Kultivierung zurück.

In den eigenen Versuchen konnte festgestellt werden, daß der Nachweis entscheidend von der Inkubationszeit mit dem Primärantikörper abhängt. Die Zeitspanne der Inkubationszeit des Primärantikörpers für strukturelle oder hormonelle Antigene erstreckt sich von 30 Minuten (61, 62) bis zu 48 Stunden (31). Im Durchschnitt inkubierten aber die meisten Autoren für ein bis zwei Stunden (6, 15, 49, 63). Die kurze Inkubationszeit von 30 Minuten reicht auf jeden Fall aus, um die Strukturen des Zytoskeletts mit dem Cytokeratin-Antikörper, Vimentin-Antikörper und Desmin-Antikörper darzustellen. Der Nachweis der Rezeptoren gelang aber nach 30 Minuten Inkubation nicht. *Mervil et al.* (63) konnte nach einer Stunde Inkubation mit dem Primärantikörper die Steroidrezeptoren nicht nachweisen, während (*Classen-Linke et al.* (15) den Primärantikörper zwei Stunden einwirken ließ und der Nachweis positiv war. *Küchenhoff et al.* (46), die allerdings den immunhistochemischen Nachweis des Ah-Rezeptors am histologischen Schnitt durchführten, inkubierten 24 Stunden. Um nun sicher zu gehen, daß die Zeit für die Antigen-Antikörper-Reaktion ausreichend war, wurde für den Nachweis der Rezeptoren die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper ebenfalls auf 24 Stunden ausgedehnt. Unter diesen Bedingungen war die Darstellung der Steroid- und des Ah-Rezeptors immer positiv (Abb.18 bis 26 in Kap. 3.3).

Der **Ah-Rezeptor** wurde 1999 erstmals von *Küchenhoff et al.* (46) im humanen Endometrium am histologischen Schnitt nachgewiesen. Mit der vorliegende Arbeit konnte nun dieser

Nachweis auch in der Primärzellkultur erbracht werden. Der Ah-Rezeptor wurde in allen getesteten Kulturen gefunden.

Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung bei der Kultur 13/99, bei der es sich ab dem 6. Tag um eine Stromazellkultur handelte, ist besonders interessant. In dieser nachgewiesenen Stromazellkultur (Vimentin positive Zellen, Cytokeratin negative Zellen) war der Ah-Rezeptor nicht mehr darstellbar. Das spricht dafür, daß der Ah-Rezeptor nur in den Epithelzellen vorkommt. Dieser Befund stimmt zum einen mit dem Ergebnis von *Küchenhoff et al. (46)* überein und zum anderen ist eine Erklärung für den Kulturerfolg der AhR-positiven Epithelzellen gegeben.

Es muß erwähnt werden, daß die immunhistochemische Methode als Nachweisform der Rezeptoren in der Kultur ihre Grenzen hat, die sich aus der Methode selbst ergeben. Mittels der Antikörper werden Proteine nachgewiesen, die typisch sind für bestimmte Strukturen. Der Nachweis der Proteine eines Rezeptors weist zwar auf dessen Vorhandensein hin, er läßt aber keine Aussage zur Aktivität des Rezeptors zu. Die Anwesenheit der Steroid-Rezeptoren und des Ah-Rezeptors in der Zellkultur ist somit nicht gleichbedeutend mit ihrer Funktionstüchtigkeit.

Anders verhielt es sich beim **Nachweis der Zellproliferation**. Dies ist immunhistochemisch mit dem Ki-67 Antikörper möglich und wurde auch von *Classen-Linke et al.* durchgeführt (15).

Mit dem Ki-67 Antikörper werden nur die Zellen, die sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befinden, nachgewiesen (9). Alle positiv gefärbten Zellen sind demnach proliferierende, aktive Zellen. Proliferierende Zellen konnten am 21. und sogar noch am 53. Kulturtag dargestellt werden (Abb.27 in Kap. 3.3). Der Beweis der DNA-Synthese in den kultivierten Zellen war wichtig, da sich die Zellzahl der Primärzellen nur mäßig veränderte und somit anfangs Zweifel über die Proliferationsfähigkeit der Zellen bestanden.

c) **Methodische Aspekte der Fixierung**

Voraussetzung für die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung, ist die **Fixierung** in der Kulturschale oder auf einem Objektträger wachsender Zellen, damit sie sich bei den vielen Waschschrinen nicht ablösen. Das Fixieren kann mit Methanol (6, 61, 62) oder mit Formaldehyd (15, 31) oder mit einer Kombination von Methanol und/oder Formaldehyd mit Aceton (49, 63) durchgeführt werden. Generell erzielt man mit der Methanolfixierung gute Ergebnisse, es ließen sich alle Antigene damit nachweisen. Die von *Mervil et al. (63)* und *Classen-Linke et al. (15)* benutzte Formaldehydfixierung für den Nachweis der Steroidrezeptoren wurde bei den Kulturen 7/99 und 9/99 für die Darstellung der Steroid- und des Ah-Rezeptors mit der Methanolfixierung verglichen. Es konnte kein Unterschied bei der Verwendung beider Stoffe festgestellt werden (Abb. 18 bis 21 in Kap. 3.3). Allerdings war der

Nachweis des Ah-Rezeptors mit Formaldehyd farbintensiver, als bei der Methanolfixierung (Abb. 24 und 25 in Kap. 3.3). Aceton konnte nicht benutzt werden, da Aceton die von uns verwendeten Polyesterol-Kulturschalen anlöst, was sich in einer Trübung der Kulturschale bemerkbar macht.

Die immunhistochemische Charakterisierung der primär kultivierten Zellen des humanen Endometrium war mit dem Cytokeratin-, Vimentin-, Desmin-, Estrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, Ah-Rezeptor- und Ki-67-Antikörper umfassend erfolgt. Es konnte dargestellt werden, daß die Etablierung einer funktionell aktiven Primärzellkultur von Epithelzellen der humanen Endometrium erfolgreich durchgeführt wurden war.

Damit war das erste Ziel dieser Arbeit erreicht und die Voraussetzung für die Durchführung der Expositionsuntersuchungen geschaffen.

4.3 Expositionsuntersuchungen

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung der chlorierten Kohlenwasserstoffe (PCB 153, β -HCH, p,p'-DDE) auf die Epithelzellen des Endometriums zu untersuchen. Die Exposition der Zellen erfolgte in jeweils 5 Konzentrationen, welche sich um den Faktor 10 unterschieden. Die niedrigste Konzentration des jeweiligen Stoffes entsprach dem Durchschnitt der Konzentrationen, die im humanen Endometrium ermittelt wurden (48). So wurden sowohl der Effekt relevanter Konzentrationen auf das Endometrium getestet als auch ein breiter Konzentrationsbereich mit maximaler Exposition in diese Beobachtungen einbezogen.

4.3.1 Vergleich des Lösungsmittelseinflusses auf Primärzellen und auf MCF-7 Zellen

Bei der Untersuchung des Einflusses wasserunlöslicher Testsubstanzen ist die Verwendung eines Lösungsmittels unumgänglich. Um die Wirkung der Testsubstanz von der des Lösungsmittels zu unterscheiden, ist es notwendig, die Wirkung der Lösungsmittels vorher separat zu ermitteln und die Konzentration des Lösungsmittels so gering wie möglich zu halten (40, 42).

Da zunächst nur mit **Primärzellen** gearbeitet wurde, wurde die optimale Lösungsmittelkonzentration auch an diesen Zellen bestimmt. Als Lösungsmittel kamen Ethanol und DMSO zur Anwendung (siehe Kap. 2.6). Der zu Beginn eingesetzte Anteil von 2% Ethanol im Medium führte zu einer Reduzierung der Zellmenge um 33% (siehe Kap. 3.1.3).

Dies unterstreicht den toxischen Einfluß dieser Ethanolkonzentration. Der negative Effekt verringerte sich, je geringer die Alkoholkonzentration im Medium wurde. Obwohl schon 0,5% Ethanol keinen negativen Einfluß auf die Vitalität der Primärzellen hatte, erwies sich eine Konzentration von 0,2% Ethanol im Medium als optimal. Dieser Anteil lag im Bereich der in der Literatur verwendeten Konzentrationen. *Kirk et al. (39)*, *Kleinman et al. (42)* und *Neulen et al. (70)* überschritten bei ihren Untersuchungen mit Steroidhormonen nicht 0,5% Ethanolkonzentration im Medium und *Holinka et al. (34)*, *Kirk et al. (40)* und *Schatz et al. (88)* arbeiteten sogar nur mit 0,1% Ethanol im Medium.

0,2% Lösungsmittel im Versuchsansatz wurden nun auch für den Einsatz von DMSO getestet und zeigten auch hier bei den Primärzellen keine negativen Auswirkungen auf die Zellproliferation (Abb. 31). *Yang et al. (112)* setzte 0,1% DMSO ein, als er die Wirkung von 2,3,7,8 Tetrachlordibenzodioxin auf Stromazellen untersuchte.

Der Lösungsmiteleinfluß wurde im Anschluß auch an der verwendeten **MCF-7 Zelllinie** überprüft. Um möglichst die gleichen Versuchsbedingungen zu realisieren, wurden hier die selben Lösungsmittelkonzentrationen eingesetzt. Dabei mußte festgestellt werden, daß sich die transformierten Zellen sehr viel empfindlicher gegenüber Alkohol zeigten als die Primärzellen. 0,2% Ethanol im Medium der MCF-7 Zellen setzte die Zellmenge um 15% herab. Im Gegensatz dazu wird die MCF-7 Zellmenge durch DMSO als Lösungsmittel nicht negativ beeinflusst (Abb. 35).

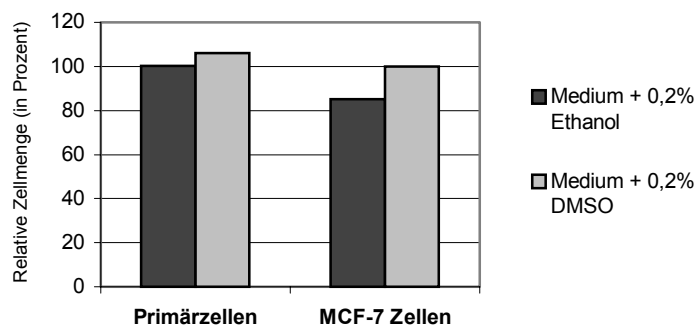


Abb.35: Vergleich des Lösungsmiteleinflusses auf Primärzellen und MCF-7 Zellen

Um die Wirkung der eingesetzten Testsubstanzen bei den Expositionsuntersuchungen quantifizieren zu können, wurden alle gemessenen Extinktionswerte auf die Extinktionswerte eines Kontrollansatzes (Medium + 0,2% Lösungsmittel) bezogen. Damit wurde ein eventueller Effekt des Lösungsmittels eliminiert.

4.3.2 Methoden zum Nachweis der Viabilität

Im Rahmen der Untersuchungen kamen zwei Methoden zur Anwendung, mit denen die Lebensfähigkeit einer Zellkultur quantitativ einschätzbar ist. Es handelte sich hierbei um Farbreaktionen, die für Zytotoxizitätsanalysen eingesetzt werden (111).

Die erste Methode war der **Neutralrottest**, bei dem sich durch die aktive Farbstoffaufnahme der Zellen aus dem Medium, der Anteil lebender Zellen in der Kultur gut quantifizieren läßt. Die Extinktionswerte wurden innerhalb einer Kultur in Bezug auf den Kontrollansatz relativiert. Ohne großen technischen Aufwand ließen sich mit Hilfe dieser Methode viele Expositionsuntersuchungen durchführen. Für jede Substanzkonzentration konnte pro Kultur und Testzeit so eine 5-fach Bestimmung erfolgen.

Die zweite Methode ist der **Tetrazolium(MTT)-Test**, mit dem sich Zytotoxizität, Proliferation und Aktivierung von Zellen messen lassen. Es ist ebenfalls eine Farbreaktion, mit der die Aktivität der Mitochondrien in der Zelle nachgewiesen werden kann, ohne das die Zelle zu dem Zeitpunkt DNA synthetisieren muß (65). Wie beim Neutralrottest läßt sich auch hier der Anteil an lebenden Zellen in der Kultur bestimmen. Dieser Test ist ohne großen Aufwand schnell an einer großen Probenzahl durchführbar. Außerdem kann wie beim Neutralrottest auf radioaktive Substanzen verzichtet werden (65). Im Rahmen der Etablierung der Primärzellkultur diente die Methode dem Charakterisieren der Kultur und dem Nachweis für erfolgreiches Kultivieren.

4.3.3 Ergebnisse der Expositionsuntersuchungen

Ziel der Expositionsuntersuchungen war es, den Einfluß ausgewählter Substanzen auf zwei verschiedene Zellsysteme zu untersuchen.

Es ist augenfällig, daß bei beiden Zellarten die Zellmenge zunahm, wenn die Kultivierung in Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen der polychlorierten Kohlenwasserstoffe erfolgte. Dies gilt bei den Primärzellen für PCB 153 (100 pM bis 10 nM), für β -HCH (200 pM bis 20 nM) und für p,p'-DDE (1 nM, 10 nM). Bei den MCF-7 Zellen wird die Zellproliferation durch PCB 153 (1 nM bis 100 nM) und durch β -HCH (200 pM bis 20 nM) stimuliert. p,p'-DDE löst bei den MCF-7 Zellen in allen Konzentrationen eine starke Proliferation aus. Der proliferative Effekt in den niedrigen Konzentrationen steigert sich dosisabhängig.

Zellproliferation geht mit der Steigerung der DNA-Synthese einher und führt zur Gewebeproliferation. *Tiemann et al.*, der den Einfluß von DDT, Methoxychlor (MXC) und γ -HCH auf die DNA-Synthese kultivierter Epithel- und Stromazellen der Gebärmutter-schleimhaut von Färsen mit Hilfe des [3 H]-Thymidin-Einbaus untersuchte, konnte

eine Stimulierung der DNA-Synthese nach Inkubation mit niedrigen Konzentrationen der Pestizide feststellen (105). Im in vivo Tierversuch mit Ratten wurde nach Gabe von β -HCH eine Endometriumhyperplasie nachgewiesen, und so der uterotrophe Effekt von β -HCH dargestellt (59). Dies bestätigt die Zellproliferation nach Exposition mit polychlorierten Kohlenwasserstoffen.

Im Gegensatz dazu führte die Exposition mit den höchsten Konzentrationen aller Substanzen (1 μ M PCB 153, 2 μ M β -HCH, 10 μ M p,p'-DDE) nach 72 Stunden zu einem Rückgang der Zellmenge. Ausnahme bildete nur 10 μ M p,p'-DDE bei den MCF-7 Zellen. Hier wurde auch noch nach 72 Stunden eine erhöhte Zellmenge, die aber niedriger als die Zellmenge der mit den niedrigen Konzentrationen von p,p'-DDE behandelten Zellen lag, gefunden. Den selben Effekt stellte *Tiemann et al.* (105) in Bezug auf die DNA-Synthese der Epithel- und Stromazellen des Endometrium der Färsen fest. In dieser Studie kam es zu einer signifikanten Abnahme der DNA-Synthese in den hohen Testkonzentrationen von 1,45 μ g Pestizid/100 μ l Inkubationsvolumen. Die Reduktion der DNA-Synthese bei den hohen Konzentrationen der Pestizide kann zu einer Abnahme des Zellwachstums, zum Zelltod oder zu Schäden an den DNA Strängen führen. *Tiemann et al.* (105) vermutete, daß der Verlust der Lebensfähigkeit mit der Bindung der Pestizide an der hydrophoben Areal der gap junction-Proteine zusammenhängt. Diese Bindung kann die gap junction Untereinheiten verändern und die Blockierung des Zell-Zell-Kanals auslösen.

Die gap junction als Zell-Zell-Verbindungen ermöglichen die „interzelluläre Kommunikation“. Benachbarte Zellen liegen hier so eng beieinander, daß ihre Zellmembranen enge transmembrane Tunnel von Zelle zu Zelle bilden. Der Tunnel wird von 6 Untereinheiten aus Connexin Proteinen gebildet (74). Dabei ist Connexin 43 das Hauptprotein, welches exprimiert wird (40). Die gap junction sind für die Regulation der zellulären Homeostase, für die Differenzierung der Zellfunktionen und für die Wachstumskontrolle im adulten Gewebe wichtig (41). *Klauning et al.* (41) stellte darüber hinaus fest, daß eine Unterbrechung dieser interzellulären Verbindungen durch chemische Substanzen zu einer subletalen Reaktion führt. Er untersuchte die Wirkung von Phenobarbital, DDT und Lindan auf die gap junction von Maus-Hepatozyten und fand, daß alle drei Substanzen die interzellulären Verbindungen in der Hepatozytenkultur dosis- und zeitabhängig inhibieren, wobei es nach Beenden der Exposition zu einer Wiederherstellung der gap junction kam.

In Rattenleberepithelzellen (WB-F 344) kam es nach einer 30-minütigen Inkubation mit 50 μ M Lindan zu einer Unterbrechung des Stoffaustausches zwischen den Zellen, und nach 4 Stunden Behandlungszeit zum Verlust der gap junction und der Connexin 43-Proteine. Erst die Langzeitinkubation (1 bis 14 Tage) mit Lindan reduzierte auch die Connexin 43mRNA. Diese Effekte waren ebenfalls dosisabhängig und nahmen mit steigender Dosis Lindan zu (29).

Auch DDT inhibierte die interzellulären Verbindungen in WB-F 344 Rattenleberepithelzellen. Die Reduktion der gap junction korrelierte dosisabhängig und zeitabhängig mit einer Abnahme der Stoffaustausches zwischen den Zellen (83).

Die Ergebnisse der Arbeiten von *Tiemann et al.* (105), *Loeber et al.* (59), *Klauning et al.* (41), *Guan et al.* (29) und *Ruch et al.* (83) stehen im Einklang mit den eigenen Beobachtungen, welche aber noch durch weiterführende Untersuchungen mit molekularbiologischen Methoden ausgebaut werden sollten.

Beim Vergleich der Wirkung chlorierter Kohlenwasserstoffe auf Primärzellkultur und Zelllinie zeigte sich, daß diese in den beiden verschiedenen Zellkultursystemen vergleichbar war. Unterschiede ergaben sich bei der Betrachtung der drei Testsubstanzen innerhalb eines Zellsystems bezüglich ihrer Wirkungsstärke. p,p'-DDE führt bei den MCF-7 Zellen zu einer sehr starken Zellproliferation, während die Wirkung auf die Primärzellen am schwächsten ist. Bei der Substanz PCB 153 verhält es sich genau entgegengesetzt. Während PCB 153 bei den Primärzellen den größten positiven Effekt auf die Zellproliferation hervorrief, war der Effekt auf MCF-7 Zellen im Vergleich zu β -HCH und p,p'-DDE am geringsten. Dabei ist die absolute Steigerung der Proliferation durch PCB 153 in beiden Zellkulturen nahezu gleich. Diese Unterschiede könnten durch das Zeitraster, das heißt, daß die MCF-7 Zellen dieses Maximum bereits nach 48 Stunden erreicht hatten, während die Primärzellen 72 Stunden dazu benötigten, erklärt werden. Der auffällige Unterschied in der Wirkung von PCB 153 auf beide Zellsysteme könnte in folgendem seine Ursache haben.

PCB 153 gehört mit 6 Chloratomen an den beiden Phenylringen zu den hochchlorierten Biphenylen. Im Organismus werden die hochchlorierten PCB bevorzugt abgelagert, während die niedrig chlorierten PCB eher wieder ausgeschieden werden. Bezüglich der estrogenen Wirkung werden den niedrig chlorierten PCB höhere Potenzen zugeschrieben. Dies wird auf die strukturelle Ähnlichkeit der phenolischen Metabolite mit estrogenen Steroiden zurück geführt (54). Auch die hydroxylierten PCB haben stärkere estrogenen Eigenschaften als die nicht hydroxylierten PCB. Zur Hydroxylierung kommt es während der Metabolisierung im Organismus (54, 98). Es ist nicht bekannt, ob ein polychloriertes Biphenyl Kongener seine estrogenen Potenz bereits bei Aufnahme in den Organismus besitzt, oder erst durch die Hydroxylierung im Körper bekommt (98).

Es ist durchaus denkbar, daß die Bereitstellung von PCB 153 als Ligand in den Primärzellen und den MCF-7 Zellen in unterschiedlichen Umfang erfolgte. Vielleicht läuft dies auch durch verschiedene Enzymmuster ab. Ein Hinweis darauf ist die unterschiedliche Sensibilität gegenüber Ethanol bei beiden Zellarten.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Extinktionswerte nach Exposition mit allen drei Substanzen in den unteren drei Konzentrationsbereichen, so fällt im Vergleich zwischen den

Kultursystemen auf, daß bei den Primärzellen die stärkste Zellproliferation erst nach 72 Stunden festzustellen war, während bei den MCF-7 Zellen bereits nach 24 Stunden der Hauptanteil an Proliferation erfolgte, und im weiteren Verlauf nur noch eine geringe Zunahme der Zellmenge zu verzeichnen war.

Dies könnte mit dem von *Fleming et al. (24)* festgestellten Verhältnis der Estrogenrezeptor-Menge in primär kultivierten Epithelzellen des humanen Endometrium zusammen hängen. In dieser Studie wurde bei Kultivierung von Endometriumzellen ohne zusätzliche Estradiolgabe aber mit 10% fetalem Kälberserum im Medium täglich über eine Woche die Estrogenrezeptor-Menge gemessen, indem die Konzentration von rezeptorgebundenem [³H]-Estradiol bestimmt wurde. 24 Stunden nach Aussaat der Zellen waren die Estrogenrezeptoren, die bei der Aussaat nachzuweisen waren, nicht mehr darzustellen. Ab dem vierten Kulturtag kam es dann wieder zum Ansteigen der funktionellen Rezeptormenge mit einem Maximum am fünften und sechsten Tag. Die Rezeptormenge war jetzt sogar größer als zum Zeitpunkt der Aussaat. Ab dem achten Kulturtag sank die Zahl der Rezeptoren wieder. Dieses Ergebnis zeigte, daß es hier nach einer gewissen Kultivierungszeit zur Reaktivierung oder Induktion der Rezeptoren, welche wahrscheinlich durch die aggressive Präparation geschädigt wurden, kam.

Das Ansteigen der Rezeptormenge im zeitlichen Verlauf würde auch die erst nach 72 Stunden zu verzeichnende Proliferation der Primärzellen erklären, wenn man davon ausgeht, daß die Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren, und diese wiederum durch Aktivierung an den Steroidrezeptoren vermittelt wird. Die verzögerte Proliferation der Primärzellen könnte also auf die zeitabhängige Induktion der Estrogenrezeptoren zurückzuführen sein, während die MCF-7 Zellen als spezielle Estrogenrezeptor-tragende Zellen diese Veränderungen der Rezeptorsynthese nicht durchlaufen und damit auch bereits nach 24 Stunden den Hauptanteil der Proliferation zeigen.

Die Frage, ob estrogene Eigenschaften chlorierter Kohlenwasserstoffe rezeptorvermittelten Prozessen zugrunde liegen, wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert.

Steinmetz et al. (100) stellt in Bezug auf die Proliferation durch Umwelchemikalien den klassischen Reaktionsweg über die Estrogenrezeptorbindung in Frage. In einer Studie über β -HCH und o,p'-DDT konnte er eine dosisabhängige Steigerung der Zellproliferation und Expression von pS2mRNA (Estrogen induziertes spezifisches Gen der MCF-7 Zellen) in Estrogenrezeptor positiven Zelllinien MCF-7 und T47D nach 8 Tagen Exposition feststellen. In Rezeptorbindungsstudien konnte aber gezeigt werden, daß β -HCH gar nicht am Estrogenrezeptor bindet. Ebenfalls keine Bindungsaffinität für β -HCH am Estrogenrezeptor fand *Coosen et al. (18)*. So ist es möglich, daß es für die Auslösung der Zellproliferation noch einen anderen, vom Estrogenrezeptor unabhängigen Weg gibt. Zu einem ähnlichen Ergebnis

kommen *Uphouse* und *Williams*, welche über γ -HCH und den Estrogenrezeptor in Rattenhirn und Uterus berichteten (107).

Auch bezüglich der Bindung von p,p'-DDE am Estrogenrezeptor finden sich widersprüchliche Aussagen. Zum einen werden p,p'-DDE antiestrogene Eigenschaften zugeschrieben (91) dabei konkurriert es mit Dihydrotestosteron um den Androgenrezeptor (20, 79). Zum anderen wurde eine Bindung von p,p'-DDE am humanen Estrogenrezeptor von *Chen et al.* (14) mit der Progesteronrezeptor-Expression und der Estrogenrezeptor-down-Regulation in MCF-7 Zellen nachgewiesen.

Der Zweifel an der Gültigkeit zumindest der derzeit gängigen Vorstellung zum Mechanismus steroidrezeptorinduzierter Abläufe besteht auch hinsichtlich der eigenen Ergebnisse zur proliferationsfördernden Wirkung verschiedener chlorierten Kohlenwasserstoffe, wenn die Rezeptorbindungsstudien der Arbeitsgruppe unserer Klinik (48) mit betrachtet werden. Weder PCB 153, noch β -HCH und p,p'-DDE zeigten eine konzentrationsabhängige, kompetitive Hemmung der ER-Bindung als Zeichen dafür, daß sie in der Lage sind, den natürlichen Liganden aus seinem Bindungszentrum zu verdrängen. Diese Hemmung war am stärksten durch PCB 153 und etwas schwächer durch p,p'-DDE und β -HCH. Wenn dies in Verbindung mit den Zellkulturstudien betrachtet wird, bei denen p,p'-DDE in der MCF-7 Kultur die stärkste und in den Primärzellen die schwächste Reaktion auslöste, und PCB 153 sich genau entgegengesetzt verhält, obwohl die absoluten Konzentrationswerte in beiden Zellkultursystemen die gleichen sind, wird der Bedarf an weiteren Untersuchungen zwingend. Es ist durchaus denkbar, daß der scheinbare Widerspruch nur die Reaktion auf völlig unterschiedliche Bedingungen im beobachteten System ist. Wie in allen Zellkulturversuchen haben wir uns auch um ein Minimum an Estrogenen im Kulturansatz bemüht. Bindungsstudien stellen aber Modelle dar, bei denen der natürliche Ligand in Sättigungskonzentrationen vorhanden ist.

Wie interagiert ein (fast) steroidfreier Rezeptor mit dem chlorierten Kohlenwasserstoff ? Welche Rolle kann er im Prozeß der bekannten ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung (positive Kooperativität) spielen?

Zur Auslotung dieser Fragen muß auch ein mögliches, völlig unterschiedliches Bindungsverhalten am α - und β -Estrogenrezeptor in Betracht gezogen werden.

5. Schlußfolgerungen und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an einer Primärzellkultur humanen Endometriums gezeigt, daß chlorierte Kohlenwasserstoffe in der Lage sind, endokriner Steuerung unterliegende Prozesse im Sinne einer Zunahme biologischer Aktivität zu beeinflussen. Es war besonders wichtig die relevanten Konzentrationen der Chemikalien, die im humanen Endometrium nachgewiesen wurden (PCB 153, β -HCH, p,p'-DDE), einzusetzen (48). Denn nur in diesen Konzentrationen sind die ausgelösten Wirkungen im Gewebe von Bedeutung. Es handelte sich bei den ermittelten Substanzkonzentrationen um Durchschnittswerte, individuelle Schwankungen, bedingt durch Nahrungsaufnahme, Lebensraum, Arbeitsbedingungen aber auch durch physiologische Eigenheiten kommen vor.

Betrachtet man die Ergebnisse in Bezug auf die relevanten Konzentrationen, die immer der niedrigsten Testkonzentration entsprachen, so findet man für p,p'-DDE bei beiden Zellsystemen bereits in der niedrigsten Konzentration von 1 nM eine Zunahme der Zellmenge. Bei einer Exposition mit β -HCH genügen bereits 200 pM, um eine Zellproliferation auszulösen. Bei den Primärzellen verstärkt eine Steigerung der Konzentration auf 2 nM β -HCH noch diesen Effekt. Für 100 pM PCB 153 ist das gleiche wie für β -HCH zu beobachten, jedoch tritt hier nicht nur bei den Primärzellen sondern auch bei MCF-7 Zellen eine Steigerung der Proliferation mit steigender Konzentration ein.

Dies zeigt, daß die untersuchten Substanzen in physiologisch relevanten Mengen durchaus in die natürlichen Abläufe des Aufbaus des Endometriums eingreifen können. Somit ist eine Beeinflussung des empfindlichen Wechselspiels zwischen befruchteter Eizelle und Gebärmutter Schleimhaut denkbar. Die Nidation der Eizelle könnte beeinträchtigt werden und damit die Fertilität der Frau. Ob die Wirkung der Umweltchemikalien über eine Steroidrezeptor-vermittelte Reaktion ausgelöst wird, läßt sich zu diesem Zeitpunkt nicht klären.

Hohe Konzentrationen der chlorierten Kohlenwasserstoffe wirken auf die Endometriumzellen durch Störung der Zell-Zell-Interaktionen. Es kommt zum Untergang der Zellen und damit zur Gewebedegeneration.

Es lassen sich zusammenfassen: die Etablierung und Charakterisierung einer Primärzellkultur humaner endometrialer Epithelzellen und die Feststellung, daß die Anwesenheit geringer Konzentrationen von polychlorierten Kohlenwasserstoffen im expositionsrelevanten Bereich modifizierend auf Zellkulturen wirken.

Die Technik, Primärkulturen von Endometrien aus Op-Präparaten anzulegen, stellt die Grundlage für alle geplanten weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe dar, die sich mit der Frage der Auswirkung verschiedener ökologisch relevanter Chemikalien auf die Nidation früher Embryonen befassen.

Die Tatsache, daß von PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE sowohl in der Primärzellkultur, als auch bei der MCF-7 Zelllinie eine Zellzunahme hervorgerufen wird, ist in diesem Zusammenhang ein erster wichtiger Befund. Der Mechanismus bleibt beim gegenwärtigen Erkenntnisstand noch unklar. Speziell die Berücksichtigung der Ergebnisse von *Kuntzsch et al. (48)*, daß für keine der getesteten Substanzen eine Bindung am Estrogenrezeptor feststellbar ist, die Bindung des physiologischen Liganden aber meßbar gehemmt wird, macht die Notwendigkeit einer komplexen weiteren Untersuchung deutlich. Dabei sollte zunächst der Nachweis verschiedener Rezeptor-Subtypen (RT-PCR und immunhistochemisch) in humanen Endometrium, Myometrium, Endometrioseherden und Myomknoten erfolgen. Im Mittelpunkt zukünftiger Untersuchungen muß die Frage nach dem regulatorischen Einfluß von endokrin wirksamen Chemikalien auf primär kultivierte Endometriumzellen, deren Rezeptorexpression im Rahmen der Exposition, sowie der quantitative Nachweis spezifischer Transkripte der Steroid- bzw. Ah-Rezeptor Signalkette (Prolaktin, Prostaglandine, Calcitonin, humanes Kallikrein 3, pS2-Protein, Cytochrom P, Wachstumsfaktoren) stehen. Als Rezeptoren interessieren Estrogenrezeptor α und β , Progesteronrezeptor A und B und der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor.

Es soll Gegenstand der weiteren Untersuchungen sein, Wirkungsmechanismen zu analysieren und die Bedeutung der beobachteten Veränderungen als Ursache von Nidationsstörungen und somit als Sterilitätsursache aufzudecken.

6. Zusammenfassung

Halogenierte Kohlenwasserstoffe wurden in den letzten 80 Jahren hergestellt und in Industrie und Landwirtschaft in riesigen Mengen weltweit eingesetzt. Auf Grund ihrer Lipophilie und Persistenz müssen wir uns noch über lange Zeit mit ihnen auseinandersetzen. Zahlreiche Untersuchungen zur Akkumulation der halogenierten Kohlenwasserstoffe in der Umwelt zeigten, daß sie zu den globalen Umweltkontaminanten zu zählen sind.

Unter den halogenierten Kohlenwasserstoffen befinden sich Substanzen, welche die Wirkung von Hormonen antagonisieren oder agonisieren können, die Synthese und Metabolisierung der endogenen Hormone verändern oder die Hormonrezeptormengen beeinflussen (98). Sie werden als endokrin wirksame Umweltchemikalien bezeichnet.

Es wird vermutet, daß endokrin wirksame Umweltchemikalien mit der Abnahme der Fertilität und der Zunahme der sexuellen Dysfunktion bei Wildtieren assoziiert sind (17, 30). So zeigen zum Beispiel Fische, die PCB oder DDT ausgesetzt sind, kleinere Gonaden, reduzierte Rogenmenge, veränderte Plasmakonzentrationen der Sexualhormone und eine größere Embryomortalität (2).

Untersuchungen beim Menschen lassen einen Zusammenhang von Pestiziden (DDT und seine Metabolite) und polychlorierten Biphenylen mit Spontanaborten und Frühgeburten vermuten (4, 52, 87). Auch die Akkumulation verschiedener halogener Kohlenwasserstoffe im Reproduktionstrakt des Menschen (22, 43, 95, 106, 107, 113) weisen auf ein reproduktionstoxisches Potential der endokrin wirksamen Umweltchemikalien hin.

PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE wurden im Endometrium der Frau nachgewiesen (48). Ob sie die Fertilität der Frau negativ beeinflussen ist nicht geklärt.

Gegenstand dieser Arbeit war es, die Wirkung dieser halogenierten Kohlenwasserstoffe im Endometrium der Frau in relevanten Konzentrationsbereichen zu überprüfen. Voraussetzung für diese Untersuchungen war ein geeignetes Modellsystem, das in der Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums zu sehen ist. Die Etablierung der Primärzellkultur war der erste Schwerpunkt der Arbeit. Immunhistochemischen Untersuchungen an der Primärzellkultur bildeten den zweiten Teil.

Unter Verwendung verschiedener Antikörper (Ak), die gegen Strukturen der Zytoskeletts gerichtet waren (Cytokeratin-Ak, Vimentin-Ak, Desmin-Ak), konnte die Zellkultur des Endometriums als eine Epithelzellkultur mit einem geringen Anteil an Stromazellen charakterisiert werden.

Die immunhistochemische Darstellung der DNA-synthetisierenden Zellkerne mit dem Ki-67-Ak zeigte, daß es sich um eine aktive Kultur mit proliferierenden Zellen handelte. Ein Charakteristikum des Endometriums sind die Steroidrezeptoren. Estrogen- und Progesteronrezeptor wurden nach einer 24stündigen Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper in allen Zellkulturen nachgewiesen.

In den letzten Jahren gewann der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), an welchem halogenierte Kohlenwasserstoffe binden, als möglicher Vermittler zwischen Umweltchemikalien und Veränderungen im Organismus, immer mehr an Bedeutung. Mit Hilfe der AhR-Ak konnte in der vorliegenden Arbeit der Rezeptor erstmals in primär kultivierten Zellen des humanen Endometriums nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, daß der Rezeptor nur in den Epithelzellen und nicht in den Stromazellen lokalisiert ist.

Der dritte Schwerpunkt der Arbeit bestand in den Expositionsuntersuchungen mit PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE. Mit den im humanen Endometrium nachgewiesenen Substanzen (48) wurden die Primärzellen und die MCF-7 Zellen exponiert.

Bemerkenswert ist, daß es in den niedrigen physiologisch relevanten Expositionskonzentrationen zur Proliferation der Endometriumzellen und der MCF-7 Zellen kam. Dieser Effekt wurde in der Primärzellkultur am stärksten durch PCB 153, gefolgt von β -HCH und p,p'-DDE ausgelöst. Bei den MCF-7 Zellen ist p,p'-DDE die Substanz, welche den größten proliferationsfördernden Effekt auf die Zellen hat. Ein zweiter wesentlicher Unterschied zwischen beiden Zellsystemen bestand im zeitlichen Verlauf der Expositionscurven. Während die Zellproliferation bei den MCF-7 Zellen bereits nach 24 Stunden Exposition nachweisbar war, benötigten die Primärzellen 72 Stunden.

Die höchsten Testkonzentrationen, die eingesetzt wurden, entsprachen dem 10000fachen der nachgewiesenen Konzentration im Gewebe. In dieser hohen Substanzkonzentration war der proliferative Effekt in beiden Zellsystemen rückläufig, es kam zur Degeneration der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bereits bei normaler Lebensweise durchschnittlich aufgenommene Konzentrationen von Umweltchemikalien modifizierend auf Zellkulturen wirken. Eine Beeinflussung des regelrechten Aufbaus der Gebärmutter Schleimhaut und somit eine Beeinträchtigung der Fertilität der Frau durch halogenierte Kohlenwasserstoffe können deshalb nicht ausgeschlossen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Allen J R, Barsotti D A: The effects of transplacental and mammary movement of PCBs on infant rhesus monkeys. *Toxicology* 6 (1976) 331-340
2. Arnold S F, Robinson M K, Notides A C, Guillette Jr. L J, McLachlan J A: A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 (5) (1996) 544-548
3. Barsotti D A, Marlar R J, Allen J A: Reproductive dysfunction in rhesus monkeys exposed to low levels of polychlorinated biphenyls (aroclor 1248). *Fd Cosmet. Toxicol.* 14 (1976) 99-103
4. Bercovici B, Wassermann M, Cucos S, Ron M, Wasserman D, Pines A: Serum levels of polychlorinated biphenyls and some organochlorine insecticides in women with recent and former missed abortions. *Environ. Res.* 30 (1983) 169-174
5. Berthon P, Pancino G, De Cremoux P, Gespach C, Calvo F: Growth and differentiation of human mammary epithelial cells. Propagation and characterization of normal cells arising from primary cultures. *In Vitro* 52 (1992) 92-97
6. Birkenfeld A, Ezra Y, Ron N, Navot D, Granovsky S, Schenker J G, Levij I S, Vlodaysky I: Indication of selective growth of human endometrial epithelial cells on extracellular matrix. *In vitro cellular and Developmental Biologie* 24 (12) (1988) 1188-1192
7. Bock K W: Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: Biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123 (1993) 1-42
8. Boenisch T: Färbemethoden. In: Naish S J (Hrsg): *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden*. DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 1997, S. 22-28
9. Borenfreund E, Puerner J A: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24 (1985) 119-124
10. Boyd J A, Rinehart C A, Walton L A, Siegal G P, Kaufman D G: Ultrastructural characterization of two new human endometrial carcinoma cell lines and normal human endometrial epithelial cells cultured on extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26 (1990) 701-708
11. Brezner E, Terkel J, Perry A S: The effect of aroclor 1254 (PCB) on the physiology of reproduction in the female rat. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C (1) (1984) 65-70
12. Casslén B G, Harper J K: Human endometrial epithelial cells grown on collagen in serum-free medium. Estrogen responsiveness and morphology. *Acta Endocrinol.* 125(1) (1991) 101-108
13. Chaminadas G, Propper A Y, Avallet O, Agnani G, Adessi G L: Oestrone sulphate metabolism in normal human endometrium grown in organ culture. *Exp. Clin. Endocrinol.* 90 (2) (1987) 199-205

14. Chen C W, Hurd C, Vorojeikine D P, Arnold S F, Notides A C: Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and metabolites in yeast and MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 53 (8) (1997) 1161-1172
15. Classen-Linke I, Kusche M, Knauth R, Beier H M: Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res* 287 (1997) 171-185
16. Cocco P L: Environmental exposure to p,p'-DDE and human fertility. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59 (1997) 677-680
17. Colborn T, vom Saal F S, Soto A M: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife humans. *Environ. Health Perspect.* 101 (1993) 378-384
18. Coosen R, Velsen van F L: Effects of β -isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101 (1989) 310-318
19. Cussenot O, Teillac P, Le Duc A, Ketels F, Calvo F: Culture de cellules normales et tumorales de prostate humaine. *Ann. Urol.* 23 (1989) 533-537
20. Danzo B J: Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect* 105 (3) (1997) 294-301
21. Degen G H, Foth H, Kahl R, Kappus H, Neumann H G, Oesch F, Schulte-Hermann R: Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoestrogene – Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT. *DGPT-Forum* 24 (1999) 30-36
22. Ensslen S Ch, Riedel H H, Blüthgen H, Heeschen W, Grillo M: Chlorkohlenwasserstoffe in Follikelflüssigkeit und Sperma. *Fertil.* 6 (1990) 119-122
23. Ferenczy A, Bertrand G, Gelfand M M: Proliferation kinetics of endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 133 (1979) 859-867
24. Fleming H, Namit C, Gurdipe E: Estrogen receptors in epithelial and stromal cells of human endometrium in culture. *J Steroid Biochem* 12 (1980) 169-174
25. Fry D M: Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect* 103(suppl 7) (1995) 165-171
26. Gellert R J: Uterotrophic activity of polychlorinated biphenyls (PCB) and induction of precocious reproductive aging in neonatally treated female rats. *Environ. Res.* 16 (1978) 123-130
27. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31 (1983) 13-20
28. Göretzlehner G, Lauritzen C: *Praktische Hormontherapie in der Geburtshilfe.* de Gruyter, Berlin, New York, 1991

29. Guan X, Bonney W J, Ruch R J: Changes in gap junction permeability, gap junction number, and connexin43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 130 (1995) 79-86
30. Guilette L J Jr: Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human Ecol. Risk Assess* 1(2) (1995) 25-36
31. Haining R E B, Cameron I T, Papendorp van C, Davenport A P, Prentice A, Thomas E J, Smith S K: Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immunocytochemical localization in normal and endometriotic tissues. *Hum. Reprod.* 6 (9) (1991) 1200-1205
32. Hankinson O: The role of the Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon receptor action. *Trends Endocrinol Metab* 5 (1995) 240-244
33. Helle E, Olsson M, Jensen S: DDT and PCB levels and reproduction in ringed seal from the bothnian bay. *Ambio* 5 (1976) 188-189
34. Holinka Ch F, Hata H, Gravanis A, Kuramoto H, Gurspide E: Effects of estradiol on proliferation of endometrial adenocarcinoma cells (ishikawa line). *J Steroid Biochem* 25 (5B) (1986) 781-786
35. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker M G, Sumpter J P: A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspec.* 103 (1995) 582-587
36. Keck Ch, Neulen J, Breckwoltd M: *Praxis der Frauenheilkunde: Bd.1 Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie.* Thieme, Stuttgart, New York, 1997
37. Kelce W R, Stone C R, Laws S C, Gray L E, Kemppalnen J A, Wilson E M: Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 375 (1995) 581-585
38. Keller P J: *Hormon- und Fertilitätsstörungen in der Gynäkologie.* 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1995
39. Kirk D, King R J B, Heyes J, Peachey L, Hirsch P J, Taylor R: Normal human endometrium in cell culture. *In Vitro cellular and developmental biology* 14 (8) (1978) 651-662
40. Kirk D, Alvarez R B: Morphologically stable epithelial vesicles cultured from normal human endometrium in defined media. *In vitro cellular and developmental biology* 22 (1)0 (1986) 604-614
41. Klaunig J E, Ruch R J, Weghorst Ch M: Comparative effects of phenobarbital, DDT, and lindane on mouse hepatocyte gap junctional intercellular communication. *Toxicol Appl Pharmacol* 102 (1990) 553-563
42. Kleinman D, Sharon Y, Sarov I, Insler V: Human endometrium in cell culture: A new method for culturing human endometrium as separate epithelial and stromal components. *Arch. Gynecol.* 234 (2) (1983) 103-112

43. Kloth Ch: Vergleichende Bestimmung von polychlorierten Kohlenwasserstoffen im Serum, Fettgewebe, Myometrium und Endometrium. Halle, Univ. Diss. 1998
44. Kocan A, Petrik J, Drobna B, Chovancova J: Levels of PCBs and some organochlorine pesticides in the human population of selected areas of the Slovak Republic. *Chemosphere* 29(9-11) (1994) 2315-2325
45. Koopman-Esseboom C, Huisman M, Weisglas-Kuperus N, Boersma E R, Ridder de M A J, Paauw van der C G, Tuinstra L G M Th: Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in the netherlands. *Chemosphere* 29 (9-11) (1994) 2327-2338
46. Küchenhoff A, Seliger G, Klonisch Th, Tscheudschilsuren G, Kaltwaßer P, Seliger E, Buchmann J, Fischer B: Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium. *Fertil Steril* 71 (2) (1999) 354-360
47. Kuiper G G, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Höggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-A : Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138 (3) (1997) 863-870
48. Kuntzsch A: Untersuchungen zum Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau. Halle, Univ. Diss. 2000
49. Laird S M, Tuckerman E M, Saravelos H, Li T C: The production of tumor necrosis factor α (TNF- α) by human endometrial cells in culture. *Hum. Reprod.* 11 (6) (1996) 1318-1323
50. Lehnert G, Angerer J, Göen Th, Schaller K-H: Referenzwerte für persistente Gefahrstoffe am Beispiel der Konzentrationen an Polychlorierten Biphenylen im Humanserum. *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* 29 (1994) 454-458
51. Lehotay S J, Harman-Fetcho J A, McConnell L L: Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake Bay Tributaries. *Marine-Pollution-Bulletin.* 37(1-2) (1998) 32-44
52. Leoni V, Fabiani L, Marinelli G, Puccetti G, Tarsitani G F, De Carolis A, Vescia N, Morini A, Aleandri V, Pozzi V, Cappa F, Barbati D: PCB and other organochlorine compounds in blood of women with or without miscarriage: A hypothesis of Correlation. *Ecotoxicology and enviromental safety* 17 (1989) 1-11
53. Leyendecker G: Sterilität-Informationen zu IVF, ICSI, MESA und TESE. Demeter Verlag im Spitta Verlag GmbH, Balingen 1997
54. Lindenau A: Umweltpersistente Chlorkohlenwasserstoffe und Fertilität: Rückstandsanalytische und endokrinologische Untersuchungen an weiblichen Kaninchen. Bonn Univ. Diss. 1992
55. Lindenau A, Fischer B, Seiler P, Beier H M: Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on reproductive tissues in female rabbits. *Human Reproduction* vol.9 no.5pp.(1994) 772-780
56. Lindenau A, Fischer B: Embryotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) for preimplantation embryos. *Reprod Toxicol* 10 (3) (1996) 227-230

-
57. Linder R E, Gaines T B, Kimbrough: The effect of polychlorinated biphenyls on rat reproduction. *Fd Cosmet. Toxicol.* 12 (1974) 63-77
 58. Lindl T, Bauer J: *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.* 3. Aufl. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York, 1994
 59. Loeber J G, Velsen van F L: Uterotropic effect of β -HCH, a food chain contaminant. *Food Addit. Contam.* 1 (1984) 63-66
 60. Lundholm C E: The effects 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) (1988) 361-368
 61. Marshburn P B, Head J R, MacDonald P C, Casey M L: Culture characteristics of human endometrial glandular epithelium throughout the menstrual cycle: Modulation of deoxyribonucleic acid synthesis by 17β -estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Am J Obstet Gynecol* 167 (6) (1992) 1888-1898
 62. Matthews C J, Redfern Ch P F, Hirst B H, Thomas E J: Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril* 57 (1992) 990-997
 63. Mervil Ph, Degeorges A, Salat-Baroux J, Calvo F: Normal human endometrial cells in culture: Characterization and immortalization of epithelial and stromal cells by SV 40 large T antigen. *Biol Cell* 80 (1994) 187-193
 64. Moessner S, Ballschmiter K: Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines. *Chemosphere.* 34(5-7) (1997) 1285-1296
 65. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1989) 55-63
 66. Murdoch F E, Gorski J: The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 78 (1991) C103-C108
 67. Nakagawa R, Hirakawa H, Iida T, Matsueda T, Nagayama J: Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J. AOAC. Int.* 82(3) (1999) 716-724
 68. Nasir K, Bilto Y Y, Al-Shuraiki Y: Residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in human milk of Jordanian women. *Environmental-Pollution.* 99(2) (1998) 141-148
 69. Nelson J A: effects of dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT) analogs and polychlorinated biphenyl (PCB) mixtures on 17β -[H-3] estradiol binding to rat uterine receptor. *Biochem. Pharmacol.* 23 (1974) 447-451
 70. Neulen J, Wagner B, Flecken U, Breckwoldt M: Effects of progesterone and oestradiol- 17β on 17β -ol-dehydrogenase activity in stromal cells of human endometrium under in-vitro conditions. *Hum. Reprod.* 4 (3) (1989) 243-246

71. Olafsdottir K, Skirnisson K, Gyldfadottir G, Johannesson T: Seasonal fluctuation of organochlorine levels in the common eider (*Somateria mollissima*) in Iceland. *Environmental-Pollution*. 103(2-3) (1998) 153-158
72. Okada H, Nawa M, Kimura J: In vitro effect of estrogens on the peroxidase activity of human endometrium. *J. Clin. Endocrinol: Metab*: 61 (3) (1985) 404-407
73. Pham T, Lum K, Lemieux C: Seasonal variation of DDT and its metabolites in the St. Lawrence River (Canada) and four of its tributaries. *Science of the Total Environment* 179(0) (1996) 17-26
74. Plattner H, Hentschel J: Taschenlehrbuch Zellbiologie. Thieme, Stuttgart, 1997
75. Polder A, Becher G, Savinova T N, Skaare J: Dioxins, PCBs and some chlorinated pesticides in human milk from the Kola Peninsula, Russia. *Chemosphere*. 37(9-12) (1998) 1795-1806
76. Popp W, Vahrenholz C, Kraus R, Norpoth K: Polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Reproduktionsstörungen. *Zbl. Hyg.* 193 (1993) 528-556
77. Ricci M St, Toscano D G, Mattingly C J, Toscano W A: Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured endometrial cells. *J. Biol. Chem.* 274 (6) (1999) 3430-3438
78. Ringer R K, Aulerich R J, Zabik M: effects of dietary polychlorinated biphenyls on growth and reproduction in mink. *Proceedings of the 164th National Meetings of the American chemical Society*. 12 (1972) 149-154
79. Rivas A, Olea N, Olea-Serrano F: Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *Trends in analytical chemistry* 16 (10) (1997)
80. Rodgers J A Jr: Pesticide and heavy metal levels of waterbirds in the everglades Agricultural Area of south Florida. *Florida Field Naturalist* 25(2) (1997) 33-41
81. Römpp Chemie Lexikon. Thieme, Stuttgart, New York, 1995
82. Ross M H, Reith E J: Atlas der Histologie-Ein Farbatlas der Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Schwert, Stuttgart, 1987
83. Ruch R J, Bonney W J, Sigler K, Guan X, Matesic D, Schafer L D, Dupont E, Trosko J E: Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* 15 (1994) 301-306
84. Ruus A, Uglund K, Espeland O, Skaare J: Organochlorine contaminants in a local marine food chain from Jarfjord, Northern Norway. *Marine-Environmental-Research*. 48(2)(1999) 131-146
85. Safe S H: Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 24(2)(1994) 87-149
86. Safe S H: Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmac. Ther.* 67 (2) (1995) 247-281

87. Saxena M C, Siddiqui M K J, Seth T D, Krishna Murti C R, Bhargava A K, Kutty D: Organochlorine pesticides in specimens from women undergoing spontaneous abortion, premature or full-term delivery: *J. Anal. Toxicol.* 5 (1981) 6-9
88. Schatz F, Gurpide E: Effects of estradiol on prostaglandin F_{2α} levels in primary monolayer cultures of epithelial cells from human proliferative endometrium. *Endocrinology* 113 (4) (1983) 1274-1279
89. Schatz F, Markiewicz L, Barg P, Gurpide E: In vitro inhibition with antiestrogens of estradiol effects on prostaglandin F_{2α} production by human endometrium and endometrial epithelial cells. *Endocrinology* 118 (1) (1986) 408-412
90. Schatz F, Hausknecht V, Gordon R E, Heller D, Markiewicz L, Deligdisch L, Gurpide E: studies on human endometrial cells in primary culture. *Annals New York Academy of Sciences* 622 (1991) 80-88
91. Schäfer W R, Zharadnik H P, Frijus-Plessen N, Schneider K: Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung: Auswahl von expositionsrelevanten Xenoestrogenen. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, Forschungsbericht* (1995)
92. Schiebler Th: *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Junqueira L C, Carneiro J, übers., überarb. und erg. von Th. H. Schiebler, 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1996
93. Schlebusch H, Wagner U, Seeber B, Köpernik H, Krebs D: Belastung der Muttermilch mit chlorierten Kohlenwasserstoffen in Bitterfeld/Wolfen – Analyse und Bewertung. *Forschungsbericht* (1991) 287-294
94. Seidel H J: *Praxis der Umweltmedizin*. Thieme, Stuttgart, New York, 1998
95. Seliger E, Kaltwaßer P, Buchmann J, Blüthgen A, Röpke F: Akkumulation polychlorierter Kohlenwasserstoffe im humanen Endometrium. *J. Fertil. Reprod.* 3 (1995) 16
96. Silbernagl S, Despopoulos A: *Taschenatlas der Physiologie*. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1988
97. Sinkkonen S, Kamarainen N, Paasivirta J, Lammi R: PCDDs, PCDFs, PCDTs, PCBs and some other organochlorine compounds in pine needles exposed to pulp and paper mill emissions and effects of waste combustion on the concentrations. *Chemosphere* 35(10) (1997) 2193-2202
98. Sonnenschein C, Soto A M: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 65 (1-6) (1998) 143-150
99. Soto A M, Lin T M, Justicia H, Silvia R M, Sonnenschein C: An “in culture” bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN). In: Colborn T, Clement C (Ed): *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection*. *Advances in modern environmental toxicology*. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, 1992, 295-309

100. Steinmetz R, Young P C M, Caparell-Grant A, Gize E A, Madhukar B V, Ben-Jonathan N, Bigsby R M: Novel estrogenic action of the pesticide residue β -hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Can. Res.* 56 (1996) 5403-5409
101. Strowitzki T, Korell M, Thaler C J, Wolff H: Ungewollte Kinderlosigkeit-Diagnostik und Therapie von Fertilitätsstörungen. Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, 1996
102. Taubert H D: Geschlechtsspezifische Entwicklung der Frau und ihre Störungen. In: Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (Hrsg): Gynäkologie und Geburtshilfe. Schattauer, Stuttgart, New York, 1998, S. 34-38
103. Tavares T M, Beretta M, Costa M C: Ratio of DDT/DDE in the All Saints bay, Brazil and its use in environmental management. *Chemosphere.* 38(6) (1999) 1445-1452
104. Taylor A H, Al-Azzawi F: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 24(1) (2000) 145-155
105. Tiemann U, Schneider F, Tuchscherer A: Effects of organochlorine pesticides on DNA synthesis of cultured oviductal and uterine cells and on estrogen receptor of uterine tissue from heifers. *Arch. Toxicol.* 70 (1996) 490-496
106. van der Veen H, van der Veen K, Wagner U, Schlebusch H, AlHasani S, Diedrich K, Krebs D: Chlorinated hydrocarbon content in serum and genital trakt fluids of infertility patients and pregnant women. Abstracts of the 7th Annual Meeting of the ESHRE and the 7th World Congress on IVF and Assisted Procreation (1991) 107
107. Wagner U, Schlebusch H, van der Veen H, van der Veen K, Diedrich K, Krebs D: Accumulation of pollutants in the genital tract of sterility patients. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28 (1990) 683-688
108. Watson H, Franks S, Bonney R C: Regulation of epidermal growth factor receptor synthesis by ovarian steroids in human endometrial cells in culture. *J. Reprod. Fertil.* 107(2) (1996) 199-205
109. Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen E V, Warner M: Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(11) (2000) 5936-5941
110. Wetzels S, Reichmuth J, Heeschen H: Belastung Erwachsener mit persistenten Organochlorverbindungen. *Ernährungs-Umschau* 40 (1) (1993) 11-15
111. Wobus A: Zellkulturtechniken und Zellmodelle. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg): Handbuch der molekularen Medizin, Band 1 Molekular- und Zellbiologische Grundlagen. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, S.305-337
112. Yang J-H: Expression of dioxin-responsive genes in human endometrial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257(2) (1999) 259-263
113. Zahradnik H P, Schäfer W R, Herrmann T, Deppert W, Meinhold I: Interaktion von Xenoöstrogenen, Phytoöstrogenen und Mykotoxinen mit den Fortpflanzungsfunktionen der Frau. Forschungsbericht <http://bwplus.fzk.de>. (1998)

8. Thesen

1. Gegenstand der Arbeit war es, die Wirkung der im humanen Endometrium nachgewiesenen Umweltchemikalien PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE auf Zellen der Gebärmutter Schleimhaut in relevanten Konzentrationsbereichen zu untersuchen.
2. Als geeignetes Modellsystem wurde die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums etabliert. Die Kultivierung erfolgte auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten in einem Medium ohne fetales Kälberserum.
3. Immunhistochemisch konnte die Zellkultur mit dem Cytokeratin-, Vimentin- und Desmin-Antikörper als eine Epithelzellkultur mit einem geringen Anteil an Stromazellen charakterisiert werden. Dies entspricht den in vivo Bedingungen.
4. Die für das Endometrium typischen Steroidrezeptoren, Estrogen- und Progesteronrezeptor, wurden in der Primärzellkultur nach 24stündiger Inkubation mit den Steroidrezeptorantikörpern immunhistochemisch nachgewiesen.
5. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor, an welchem halogenierte Kohlenwasserstoffe binden, konnte erstmals immunhistochemisch in kultivierten Zellen des humanen Endometriums dargestellt werden. Es konnte nachgewiesen werden, daß er nur in den Epithelzellen, nicht in den Stromazellen lokalisiert ist.
6. Um die Wirkung von PCB 153, β -HCH und p,p'-DDE im Gewebe zu untersuchen, wurden die Primärzellkulturen und die MCF-7 Zellkultur, als hormonsensitive Langzeitkultur des Mammakarzinoms, mit den Substanzen für 24, 48 und 72 Stunden exponiert.
7. Die Exposition erfolgte in fünf verschiedenen Konzentrationen, wobei die niedrigste Konzentration der in Belastungsanalysen ermittelten physiologisch relevanten Konzentration entsprach.
8. Nach der Expositionszeit wurde mit der Neutralrotmethode die Menge der lebenden Zellen ermittelt und mit einem Kontrollwert verglichen.
9. Alle drei Substanzen führten in den niedrigen Konzentrationen nicht zum Zelltod sondern zur Zellproliferation in beiden Zellsystemen.
10. Während die Zellproliferation bei den MCF-7 Zellen bereits nach 24 Stunden Exposition nachweisbar war, wurde die Zellproliferation bei den Primärzellen erst nach 72 Stunden beobachtet.
11. PCB 153 löste bei den Primärzellen die stärkste Zellproliferation aus, gefolgt von β -HCH und p,p'-DDE.

12. Bei den MCF-7 Zellen war die Reihenfolge der Wirksamkeit entgegengesetzt, hier löste p,p'-DDE die stärkste Proliferation aus, während PCB 153 den geringsten Effekt zeigte.
13. In der 10000fachen Menge der physiologischen Konzentration der Substanzen war die Zellproliferation deutlich rückläufig und stagnierte. Die Degeneration der Zellen setzte vermutlich durch Inaktivierung der gap junction und Verlust der Zell-Zell-Interaktion ein.
14. In den Untersuchungen konnte dargestellt werden, daß bereits eine normale Exposition zu Konzentrationen von Umweltchemikalien führt, die modifizierend auf kultivierte Endometriumzellen wirken.
15. Erstmals konnte an einer Primärzellkultur des humanen Endometriums gezeigt werden, daß halogenierte Kohlenwasserstoffe in der Lage sind, endokriner Steuerung unterliegende Prozesse im Sinne einer Zunahme biologischer Aktivität zu beeinflussen.
16. Ob die beobachtete Zellproliferation über die Steroidrezeptoren vermittelt wird, bleibt noch unklar.
17. Die Beeinflussung der natürlichen Abläufe des Aufbaus des Endometriums könnten durchaus die Nidation der befruchteten Eizelle beeinträchtigen und somit eine Ursache für Fertilitätsstörungen sein.

Lebenslauf

Name: Solveig Köller
Geburtsdatum: 22.03.1970
Geburtsort: Merseburg
Wohnort: Halle(Saale)
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Nationalität: deutsch

09/1976 - 08/1986 Polytechnische Oberschule „Ernst Thälmann“ Leuna
09/1986 - 08/1988 Erweiterte Oberschule „Ernst Haeckel“ Merseburg
Abschluß Abitur
09/1988 - 08/1989 Praktisches Jahr als pflegerische Hilfskraft
im Kreiskrankenhaus „Carl-von-Basedow“ Merseburg
09/1989 - 12/1996 Studium der Humanmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/1996 3. Teil des Staatsexamens
01/1997 - 06/1998 Ärztin im Praktikum
an der Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/1998 – 09/2000 Promotionsstudentin im DFG-Graduiertenkolleg „Adaptive
physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch
relevante Wirkstoffe“ an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg in der Klinik für Geburtshilfe und
Reproduktionsmedizin
Thema: „Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer
Umweltchemikalien auf die Primärzellkultur der Epithelzellen
des humanen Endometriums“
seit 10/2000 Assistenzärztin in der Klinik für Geburtshilfe und
Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Halle/Saale, den 16.10.2001

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Promotionsarbeit ist an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt worden. Ein früherer Promotionsversuch ist nicht erfolgt.

Halle/Saale, den 16.10.2001

Solveig Köller

Poster und Veröffentlichungen

Posterbeitrag: Köller,S.; Kaltwaßer,P.; Seliger,E.; Röpke,F.: Investigation of the influence of ecological pollutants on the primary cell culture of human endometrium.
ESHRE 2000 in Bologna/Italien

Publikation: S. Köller, A. Kuntzsch, E. Seliger, P. Kaltwaßer, F.Röpke: Zusammenhang zwischen endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt und Fertilitätsstörungen. IVF-News 1 (3) (2000) 11-13

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 1998 bis Oktober 2001 in der Klinik für Geburtshilfe- und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. habil. F. Röpke für die Überlassung dieses interessanten Themas und das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Herrn Dr. rer. nat. E. Seliger danke ich für die Diskussionsbereitschaft sowie die vielseitige Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Antje Kutzsch für ihre Bereitschaft, mich mit der Arbeit in einem Labor vertraut zu machen, mich auf experimentellem Gebiet zu unterstützen, und ich danke ihr dafür, daß sie zuhörte und immer Zeit für ausgiebige Diskussionen hatte.

Ich danke den Oberärztinnen Dr. P. Kaltwaßer und Dr. A. Herrmann, den Assistenzärztinnen und Schwesterinnen der Station G3, sowie den Op-Schwestern Ursel und Silke für die Mitarbeit bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials.

Privatdozent Dr. rer. nat. Brandtsch aus dem Biozentrum danke ich für das Interesse und die Gesprächsbereitschaft bei Fragen der Zellkultivierung.

Herrn H. Jankowski, The Dow Chemical Company, danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Datenanalyse.

Meinem Ehemann Frank Köller möchte ich für die unendliche Geduld, ständige Motivation und hilfreiche Kritik beim Anfertigen der Arbeit danken.