

Toxizität von Nitrobenzol auf männliche Gonaden von Ratten unter Kältebedingungen

Igor Zavgorodnij^{*}, Beatrice Thielmann^{3*}, Walerij Kapustnik², Ruslan Batschinskij¹ und Irina Böckelmann³

¹Lehrstuhl für Innere- und Berufskrankheiten, Charkower Nationale Medizinische Universität

²Lehrstuhl für Hygiene und Ökologie No 2, Charkower Nationale Medizinische Universität

³Bereich Arbeitsmedizin, Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Zusammenfassung

Hintergrund: Eine durch Kälte erhöhte Toxizität von Schadstoffen kann an Arbeitsplätzen vorkommen. Nitrobenzol kann möglicherweise zur Sterilität führen. Ziel dieser Studie war es, die toxische Wirkung von Nitrobenzol auf das Reproduktionssystem von männlichen Ratten zu untersuchen.

Methode: Diese Experimente erfolgten an 24 geschlechtsreifen männlichen WAG-Ratten. Jeder Versuchsgruppe (2 x 6 Tiere) wurden insgesamt 30-mal Nitrobenzol (70 mg/kg des Tiergewichtes) an 5 Tagen pro Woche und 6 Wochen lang in den Magen eingeleitet. Die Tiere der Kontrollgruppe (2 x 6 Tiere) erhielten eine äquivalente Menge Aqua destillata. Dabei wurden die Tiere für 4 Stunden Temperaturen der thermischen Behaglichkeit ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) oder der Kälte ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) ausgesetzt. Nach einer 30-tägigen Rekonvaleszenzzeit wurden die Daten neu erhoben, um der Fragestellung der Reversibilität nachzugehen.

Ergebnisse: Die Nitrobenzolkwirkung führte in beiden Versuchsgruppen zu einer signifikanten Verminderung der Spermatozoenkonzentration und deren Beweglichkeitszeit im Hoden. Außerdem waren dort signifikant vermehrt pathologische und tote Spermatozoen nachweisbar ($p < 0,05$), was unter Kälte ausgeprägter war.

Schlussfolgerungen: Es konnte eine gonadentoxische Wirkung von Nitrobenzol sowohl unter Kältebedingungen als auch unter thermischer Behaglichkeit nachgewiesen werden. Somit können männliche Gonaden als Zielorgan für die toxische Wirkung von Nitrobenzol betrachtet werden.

Schlagwörter: Nitrobenzol, Kombinationswirkung, Kälte, Reproduktionssystem, Tierexperiment

Abstract

Toxicity of nitrobenzene to male gonads of rats under cold conditions

Background: An increased toxicity of different pollutants by cold conditions may occur in the workplace. Nitrobenzene possibly leads to sterility. The aim of this study was to investigate the toxic effects of nitrobenzene on the reproductive system of male rats, exposed to this substance directly.

Method: These experiments were performed on 24 sexually mature male WAG rats divided into four test groups of 6 animals each. Two test groups got 30 times of nitrobenzene (70 mg/kg of animal weight) in the stomach, 5 days a week for 6 weeks. Both control groups received an equivalent amount of distilled water. All animals were exposed to temperatures of thermal comfort ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) or cold conditions ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) for 4 hours. After a 30-day recovery period, the data were re-evaluated to investigate the question of reversibility.

Results: In both test groups the effect of nitrobenzene caused a significant reduction of the concentration of spermatozoon and their motility time in the rat testis ($p < 0,05$). Also a significantly increased amount of pathological and dead spermatozoon were found ($p < 0,05$). These effects were more pronounced under cold conditions.

Conclusions: The results proved a gonad-toxic effect of nitrobenzene both under temperatures of cold conditions as well as thermal comfort. Therefore male gonads can be considered as a target organ for the toxic effects of nitrobenzene.

Keywords: Nitrobenzene, combination effect, cold, reproductive system, animal experiment

1 Einführung

Die Toxikologie befasst sich u.a. mit der Wirkung von Giftstoffen auf den Organismus. Nach wie vor problematisch und aktuell noch wenig erforscht ist der gleichzeitige Einfluss von Schadstoffen und Kälte auf den Organismus. Diese Bedingungen kommen an verschiedenen Arbeitsplät-

Korrespondenzautor:

Prof. Dr. med. Irina Böckelmann
Bereich Arbeitsmedizin
Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Leipziger Straße 44
39120 Magdeburg
e-Mail: irina.boeckelmann@med.ovgu.de

*gleichberechtigter Beitrag zur Erstautorenschaft

zen vor. Gefährlich dabei ist, dass die schädliche Wirkung von Schadstoff und Kälte zusammen auf den Organismus andere Kombinationen wesentlich übertrifft (Tschatschschin und Dedenko 1990).

Das Interesse einer Evaluierung solcher Arbeitsbedingungen steigt seit längerem vor allem bei Arbeitsmedizinern im Rahmen von Präventionsprogrammen (Kustow et al. 1975). Bis dato gab es nur wenige wissenschaftliche Arbeiten zu dieser Thematik, sodass Forschungsarbeiten zu dieser Fragestellung aktuell sind. 2013 veröffentlichte unsere Arbeitsgruppe erste Ergebnisse zur toxischen Wirkung von Methyltertiärbutylether (MTBE) auf das männliche Reproduktionssystem unter Kältebedingungen (Zavgorodnij et al. 2013). Diese Resultate zeigten eine beträchtliche toxische Wirkung von MTBE auf das Zielorgan.

Wie eingangs kurz erwähnt, kommen diese kombinierenden Arbeitsbedingungen an zahlreichen Arbeitsplätzen vor, was die arbeitsmedizinische Relevanz bedingt. Die Notwendigkeit des Aufenthaltes von Menschen unter ungünstigen Arbeitsbedingungen kommt v.a. in der Chemieindustrie, Bauindustrie, Verarbeitungsindustrie sowie bei der Gas- und Erdölgewinnung vor.

Neben dem arbeitsbedingten Kontakt zu Schadstoffen befinden sich weitere toxische Substanzen in der Umwelt und stehen so mit der Allgemeinbevölkerung in Verbindung. Diese *Xenobiotika* in der Umwelt stellen, v.a. in der kalten Jahreszeit, eine potentiellen Gefahr einer Interaktion mit dem Organismus des Menschen dar (Ökotoxizität) (Zavgorodnij et al. 2006).

Der Anwendungsbereich von Chemikalien vergrößert sich ständig. Unter der Vielzahl der chemischen Verbindungen, mit denen der Mensch in Kontakt kommen kann, nehmen verschiedene Nitroverbindungen einen besonderen Platz ein. Vor allem Nitrobenzol findet eine breite Anwendung in Industrie, Landwirtschaft, Bauwesen, Medizin und Alltagsleben (Igonina 2007).

Im Jahr 1994 betrug die Weltproduktion von Nitrobenzol 2.133.800 Tonnen. Ein Drittel wird in den USA produziert – 740.000 Tonnen (EPA 2009). Mehr als 97% der Weltproduktion des Nitrobenzols wird für die Synthese von Anilin verwendet. Im Jahr 2008 lag sein Produktionswachstum der chemischen Weltindustrie bei 5,2%. Anilin wird in der chemischen Industrie in erster Linie als Ausgangsstoff für die Herstellung von Farbstoffen und Kunstfasern, aber auch zur Produktion von Kautschuk und von N-Methylanilin (Zusatzstoff in Ottokraftstoffen) verwendet.

In der Industrie dient Nitrobenzol als Lösungsmittel für Ester und Acetate (ATSDR 1990), als Schmierölbestandteil und chemisches Reagenz in der Analytik sowie als Zusatzstoff bei Sprengstoffen. Ferner ist es als Zündbeschleuniger für Dieselkraftstoffe verwendbar.

Die Syntheseprozesse des Nitrobenzols und Stoffe auf dessen Basis sind mit seiner möglichen Verdunstung in die Luft der Produktionsräume sowie mit der Verschmutzung

der Arbeitsgeräte bzw. -kleidung und der Haut der Beschäftigten verbunden. Demnach ist die ungünstige Wirkung des Nitrobenzols auf den Organismus hauptsächlich mit der beruflichen Exposition verbunden.

Es ist jedoch bekannt, dass bei der Synthese des Nitrobenzols etwa 2% von seiner allgemeinen Herstellung in die Abwässer gelangen. Ein weiterer Teil des Nitrobenzols gerät in die Atmosphäre oder den Grundwasserboden, was eine Gefahr für die Bevölkerung darstellen kann, besonders dann, wenn die Personen nur unweit von der Expositionsquelle der Verschmutzung wohnen (EPA 2009).

In der Literatur sind neben den pathognomonischen Erscheinungsformen der toxischen Wirkung des Nitrobenzols auch Veränderungen des Blutes beschrieben, z.B. Senkung des allgemeinen und oxygenierten Hämoglobins, starke Vermehrung der Erythrozytenzahl, Met- und Sulfhämoglobinämie oder Erscheinung der *Heinz-Blaukörper*. Es kann zu einer Entwicklung einer regenerativen Anämie führen (Wasilenko 1980). Ergebnisse von Tierexperimenten zeigen, dass das Reproduktionssystem eines der wenigen Organsysteme ist, bei dem die toxische Wirkung des Nitrobenzols durch Inkorporation (per os, Inhalation) beschrieben ist. Die Schädigung des Reproduktionssystems von männlichen Ratten ist bekannt. Die Beeinträchtigung der Fortpflanzungsorgane ist gekennzeichnet durch eine Degeneration des germinativen Epithels, den Verlust von Hoden- und Nebenhodenmasse, Reduzierung der Spermatozoenkonzentration bzw. ihrer Beweglichkeit sowie des Fertilitätsindex. Außerdem sind eine Samenkanälchenatrophie und histopathologische Veränderungen der Keimzellen in verschiedenen Spermatogenesestadien bekannt. Die Verringerung der Fertilität ist möglich. 2013 erfolgte eine Neubewertung des BAT-Wertes (biologische Arbeitsplatztoleranzwert, 100 µg aus Hämoglobin-Konjugat freigesetztes Anilin/ Blut) (Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe 2013).

Auch Kälte ist ein schädigender Umweltfaktor, der den Organismus negativ beeinflussen kann. Die Reaktionen auf Kälte können im physiologischen, aber auch im pathologischen Bereich liegen. Kältebedingungen können beim Menschen eine Verminderung der Arbeitsfähigkeit und Unterkühlung bewirken sowie die Entwicklung von Krankheiten begünstigen und sogar tödliche Folgen verursachen (Afanasjeva und Burmistrova 2001, Mitschuk 2006, Soldak et al. 2006). Kälte ist insbesondere ein Risikofaktor für Personen mit chronischen Krankheiten, v.a. bei pulmonalen und kardialen Erkrankungen, und kann Stenokardien auslösen (Collins 1998).

Seit den ersten Beobachtungen von Hans Selye (1973) wird in vielen Studien nachgewiesen, dass Kälte für Menschen ein typischer Stressfaktor ist, der zu einer gesteigerten Ausschüttung von Hormonen des Hypothalamus und der Hypophyse führt. Dies hat eine erhöhte Kortisolausschüttung in der Nebennierenrinde zur Folge, was wiederum den typischen Symptomenkomplex der "Anstrengungsreaktion"

im Organismus hervorruft (Maistrakh 1975, Azhaev 1979, Hassi und Holmer 1994, Gavhed et al. 2000, Afanasjeva et al. 2006). Studien belegen, dass die Abkühlung von homoiothermen Tieren (zwischen $+ 2\text{ °C}$ bis $+ 6\text{ °C}$) ein adäquates Stressmodell ist und breite Anwendung findet (Piven und Pewsner 1972, Isaakjan et al. 1973, Bondarenko et al. 1990, Perepetschaeva et al. 2006, Solodkova et al. 2008, Lomteva 2008, Kurenkow et al. 2009, Vavilova 2009, Kucharenko und Nowoselowa 2009, Nasu 2010).

In Anbetracht der Tatsache, dass die Nachfrage und die weltweite Herstellung von Nitrobenzol stetig zunehmen, ist die Fragestellung der toxischen Wirkung des Nitrobenzols auf das Reproduktionssystem unter Kältebedingungen aktuell.

Das Ziel dieser Studie ist die vergleichende Analyse der toxischen Wirkung von Nitrobenzol auf das Reproduktionssystem von Versuchstieren, die unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt waren. Es wurde die Wirkung von Nitrobenzol unter thermischer Behaglichkeit ($+25 \pm 2\text{ °C}$) und unter Kälte (cold stress bei $+4 \pm 2\text{ °C}$) untersucht. Dabei wurden die Regeln zum Tierschutz bei Tierexperimenten eingehalten. Es lagen positive Voten der Bioethikkommissionen der Charkower Universität und des Kiever Instituts für Arbeitsmedizin (NAMN Kiev, Ukraine) vor.

2 Material und Methoden

Das subakute toxikologische Experiment wurde an 24 geschlechtsreifen männlichen WAG-Ratten durchgeführt. Die Untersuchungspopulation wurde in 4 Gruppen eingeteilt, da die zusätzliche Untersuchung von Einflüssen verschiedener Faktoren auf den Organismus wichtig erschien. Dabei handelte es sich um die 30-malige Instillation von Nitrobenzol in den Magen (Dosis 70 mg/kg des Tiergewichtes, LD_{50} nach oraler Gabe 640 mg/kgKG) bei der Hälfte der Versuchstiere ($n = 12$) und die Aussetzung dieser Tiere unter verschiedenen thermischen Bedingungen (je 6 Tiere, Kälte $4 \pm 2\text{ °C}$, thermische Behaglichkeit $25 \pm 2\text{ °C}$). Diese Experimente wurden zur gleichen Tageszeit 4 Stunden lang und 5-mal pro Woche durchgeführt (6 Wochen lang). Nitrobenzol wird in den Tiermagen der Expositionsgruppe durch eine spezielle Sonde als eine 1%ige Sonnenblumenöllösung eingeführt. Die Tiere der Kontrollgruppen ($n = 12$) erhielten eine äquivalente Menge von Aqua destillata und wurden auch unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt (je 6 Tiere, $4 \pm 2\text{ °C}$ bzw. thermische Behaglichkeit $25 \pm 2\text{ °C}$). Der nachfolgende 4-stündliche Kälte-test wurde bei den Versuchstieren wie folgt durchgeführt: Die Tiere befanden sich in einer Expositions-kammer, wo eine isolierte freie Unterbringung möglich war. Jede Kammer war mit einem thermoelektrischen Kühler des "Luft-Luft"-Typs (Modell 180-24-ÅÅ, Firma Kriotherm, Sankt Petersburg in Russland) versehen, was eine Abkühlung der Luftumgebung auf Temperaturen von $+4 \pm 2\text{ °C}$ gewährleistete (Zavgorodnij et al. 2009).

Durch die Unterteilung in 4 Untersuchungsgruppen war die Bewertung der toxischen Wirkung von Nitrobenzol und Kälte hinsichtlich a) des ganzen Komplexes, b) jedes einzelnen Faktors und c) in der Kombination beider Faktoren auf die Geschlechtsdrüsen möglich (Kundiev et al. 1993). Jede Untersuchungspopulation entsprach 6 Versuchstieren. Folgende Gruppeneinteilung wurde durchgeführt: Gruppe 1 (Nitrobenzol + Kälte bei $4 \pm 2\text{ °C}$), Gruppe 2 (Kälte bei $4 \pm 2\text{ °C}$), Gruppe 3 (Nitrobenzol + thermische Behaglichkeit bei $25 \pm 2\text{ °C}$) und Gruppe 4 (thermische Behaglichkeit bei $25 \pm 2\text{ °C}$). Die gleichen Parameter wurden bei allen Gruppen nach einer 30-tägigen Rekonvaleszenzzeit unter gleichen Bedingungen noch einmal erhoben.

Für die Beurteilung der toxischen Wirkung von Nitrobenzol nach 30-maliger Instillation (Test) sowie nach einer 30-tägigen Rekonvaleszenzzeit (Retest) wurden nachfolgende Parameter analysiert: Tiermasse, relative Hodenmasse, Gesamtzahl der Spermatozoen im Medium, Beweglichkeitszeit der Spermatozoen, tote und pathologische Formen der Spermatozoen, osmotische Resistenz und pH-Wert. Anschließend erfolgte eine histopathologische Begutachtung des Funktionszustandes der einzelnen Hodengewebe. Die Analyse wurde durch die Erfassung der morphometrischen Parameter wie folgt ergänzt: Zahl der Kanälchen mit dem desquamierten samenproduzierenden Epithel, Spermato-geneseindex, die Gesamtzahl der normalen Spermato-gonien in der ersten Reihe der Zellen auf der Basalmembran der Kanälchen (die Spermato-gonienzahl), die Leydig-Zell-kernfläche (Saotskii et al. 1978).

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Statistica 6.0 unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt. Auf Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Vergleiche zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Die Test-Retest-Vergleiche erfolgten anhand des t-Tests für abhängige Stichproben. Die Variablen aus den morphometrischen Auswertungen wurden in die Varianzanalyse nach Pearson einbezogen. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse wurde ergänzt, um die einzelnen und gemeinsamen Effekte der Faktoren zu beschreiben.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Tests

Die Ergebnisse des Funktionszustandes der Spermatozoen unter der chemisch-toxischen Wirkung von Nitrobenzol unter Berücksichtigung zweier verschiedener Temperaturbedingungen sind in den ► Tabellen 1 und 2 dargestellt.

In den makroskopischen Untersuchungen der Rattenhoden der beiden Kontrollgruppen (Gruppe 2 und 4) wurde festgestellt, dass die Gonaden von normaler Größe und Farbe sind. Es bestand eine kleine Gefäßinjektion. Die vaskuline

Tabelle 1: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten unter Einfluss von Nitrobenzol und Kälte ($t = + 4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) während der Testphase

Parameter	n	Gruppe 2	Gruppe 1	Signifikanz t-test
		Kontrolle	Nitrobenzol	
		($t = + 4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	($t = + 4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	
		MW \pm SD	MW \pm SD	
Tiermasse [g]	6	330,0 \pm 12,86	293,2 \pm 14,22	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	1,12 \pm 0,14	0,36 \pm 0,04	$p < 0,05$
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	75,88 \pm 5,22	23,2 \pm 3,69	$p < 0,05$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	17,5 \pm 1,45	9,8 \pm 7,42	$p < 0,05$
Tote Formen [%]	6	10,53 \pm 2,68	85,47 \pm 7,39	$p < 0,05$
Pathologische Formen [%]	6	5,5 \pm 1,12	87,0 \pm 7,44	$p < 0,05$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	3,44 \pm 0,21	4,99 \pm 0,26	n. s.
pH-Wert	6	2,71 \pm 0,19	3,0 \pm 0,28	n. s.

Tabelle 2: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten unter Einfluss von Nitrobenzol und thermischer Behaglichkeit ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) während der Testphase

Parameter	n	Gruppe 4	Gruppe 3	Signifikanz t-test
		Kontrolle	Nitrobenzol	
		($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	
		MW \pm SD	MW \pm SD	
Tiermasse [g]	6	255,83 \pm 7,12	245,4 \pm 16,07	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	0,97 \pm 0,08	0,52 \pm 0,05	$p < 0,05$
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	76,83 \pm 6,09	35,0 \pm 6,19	$p < 0,05$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	156,67 \pm 11,14	51,5 \pm 5,92	$p < 0,05$
Tote Formen [%]	6	10,33 \pm 2,36	64,2 \pm 10,88	$p < 0,05$
Pathologische Formen [%]	6	12,67 \pm 1,45	43,8 \pm 9,41	$p < 0,05$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	4,49 \pm 0,32	2,66 \pm 0,75	n. s.
pH-Wert	6	2,82 \pm 0,17	3,75 \pm 1,41	n. s.

Zeichnung war mäßig deutlich ausgeprägt. Die Prüfung des Funktionszustands der Spermatozoen ergab, dass sich die Gesamtzahl der Spermatozoen im Hoden sowie die Zahl der toten und pathologischen Formen im Rahmen der physiologischen Schwankungen befanden. Die Osmotische Resistenz und der pH-Wert waren normwertig. Die Tiere der Kälte-Kontrollgruppe boten eine reduzierte Beweglichkeitszeit der Spermatozoen (von 14 bis 20 Minuten). Ebenso fand sich eine Geißelkontraktion bei den Spermien. Die makroskopische Untersuchung der Rattenhoden nach Nitrobenzolexposition unter beiden thermischen Bedingungen ergaben verkleinerte Rattenhoden mit gelblichen Verfärbungen unterschiedlicher Intensität. Die Oberfläche dieser Rattenhoden zeigte eine ausgeprägtere vaskuläre Zeichnung und eine stärkere Gefäßinjektion als bei den beiden Kontrollgruppen. Die gonadentoxische Wirkung des Nitrobenzols unter beiden thermischen Bedingungen zeigte

sich identisch, aber der Intensitätsgrad der Veränderungen in Abhängigkeit von den angebotenen Temperaturbedingungen unterschied sich in vielen einzelnen Parametern. Die relative Hodenmasse der Tiere der Gruppe 2 ist, nach Nitrobenzolexposition und unter Kältebedingungen, 3,2-mal kleiner als bei den Kontrolltieren der Gruppe 1. Dagegen führte die Wirkung des Nitrobenzols bei thermischer Behaglichkeit zu einer 1,8-maligen Reduzierung dieses Parameters. Die Prüfung des Funktionszustandes der Spermatozoen der Versuchsgruppe 1 (Nitrobenzol + Kälte) ergab eine Verminderung der Spermatozoengesamtzahl um das 3,3-fache. Die Analyse der Ergebnisse der Versuchsgruppe 3 (Nitrobenzol + thermische Behaglichkeit) ergab eine Reduzierung der Spermatozoengesamtzahl im Rattenhoden um das 2,2-fache. Bei 2 von 6 Versuchstieren der Gruppe 1 ließen sich 100% tote Spermatozoen ermitteln. Bei 4 von 6 Tieren der Gruppe 1 waren 100% pathologi-

Tabelle 3: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten unter Einfluss von Nitrobenzol und Kälte ($t = + 4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) während der Retestphase (nach 30-tägiger Rekonvaleszenz)

Parameter	n	Gruppe 2	Gruppe 1	Signifikanz t-test
		Kontrolle ($t = + 4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	Nitrobenzol ($t = + 4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	
		MW \pm SD	MW \pm SD	
Tiermasse [g]	6	331,67 \pm 22,46	325,83 \pm 23,04	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	0,75 \pm 0,03	0,66 \pm 0,12	$p < 0,05$
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	79,17 \pm 5,48	6,67 \pm 2,55	$p < 0,05$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	81,67 \pm 6,74	4,67 \pm 0,88	$p < 0,05$
Tote Formen [%]	6	9,0 \pm 1,90	95,50 \pm 2,63	$p < 0,05$
Pathologische Formen [%]	6	4,67 \pm 0,84	83,58 \pm 8,57	$p < 0,05$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	3,44 \pm 0,21	-*	-*
pH-Wert	6	2,71 \pm 0,19	-*	-*

* keine statistische Aussage möglich ($n < 5$), da bei mehreren Tieren 100 % tote Spermatozoen nachweisbar

Tabelle 4: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten unter Einfluss von Nitrobenzol und thermischer Behaglichkeit ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) während der Retestphase (nach 30-tägiger Rekonvaleszenz)

Parameter	n	Gruppe 4	Gruppe 3	Signifikanz t-test
		Kontrolle ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	Nitrobenzol ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	
		MW \pm SD	MW \pm SD	
Tiermasse [g]	6	261,67 \pm 13,64	291,0 \pm 13,55	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	0,52 \pm 0,04	0,62 \pm 0,08	n. s.
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	40,17 \pm 3,78	42,0 \pm 12,02	n. s.
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	94,67 \pm 6,40	4,10 \pm 9,30	$p < 0,05$
Tote Formen [%]	6	13,17 \pm 1,01	46,60 \pm 14,09	$p < 0,05$
Pathologische Formen [%]	6	6,0 \pm 1,24	28,40 \pm 6,35	$p < 0,05$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	3,38 \pm 0,11	4,06 \pm 0,48	n. s.
pH-Wert	6	2,71 \pm 0,19	4,56 \pm 0,56	n. s.

sche Formen auszumessen. Die pathologischen Spermatozoköpfchen waren dabei wulstig aufgetrieben, wobei das Zentrum verdünnt war. Stellenweise fanden sich Spermatozoen mit reduziertem Köpfchen oder ohne Geißel.

3.2 Ergebnisse des Retests

Die Ergebnisse der Testreihe nach der Rekonvaleszenzzeit sind in den ► Tabellen 3 und 4 gegenübergestellt. Insgesamt zeigte sich, dass es keine volle Wiederherstellung der Hodenfunktion der WAG-Ratten beider Nitrobenzol-Versuchsgruppen (Gruppen 1 und 3) nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit gab. Es ergaben sich Unterchiede

de der toxischen Nitrobenzolwirkung bei der Gegenüberstellung der Nitrobenzol-Versuchsgruppen unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Anders als bei den Versuchsgruppen konnten die untersuchten Parameter der Kontrollgruppen nach abgeschlossener Rekonvaleszenzzeit wiederhergestellt werden und lagen in den Bereichen der physiologischen Norm.

3.3 Ergebnisse des Test-Retest-Vergleiches

Die Ergebnisse der Test-Retest-Gegenüberstellung sind in den nachfolgenden ► Tabellen 5 bis 8 dargestellt.

Tabelle 5: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten der Versuchsgruppe 1 unter Einfluss von Nitrobenzol und Kälte ($t = +4 \pm 2^\circ\text{C}$) im Test-Retest-Vergleich

Parameter	n	Gruppe 1 Test Nitrobenzol ($t = +4 \pm 2^\circ\text{C}$) MW \pm SD	Gruppe 1 Retest Nitrobenzol ($t = +4 \pm 2^\circ\text{C}$) MW \pm SD	Signifikanz t-test
Tiermasse [g]	6	293,2 \pm 14,22	325,83 \pm 23,04	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	0,36 \pm 0,04	0,66 \pm 0,12	n. s.
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	23,2 \pm 3,69	6,67 \pm 2,55	n. s.
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	9,8 \pm 7,42	4,67 \pm 0,88	n. s.
Tote Formen [%]	6	85,47 \pm 7,39	95,50 \pm 2,63	n. s.
Pathologische Formen [%]	6	87,0 \pm 7,44	83,58 \pm 8,57	n. s.
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	4,99 \pm 0,26	-*	-*
pH-Wert	6	3,0 \pm 0,28	-*	-*

* keine statistische Aussage möglich ($n < 5$), da bei mehreren Tieren 100 % tote Spermatozoen nachweisbar waren

Tabelle 6: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten der Versuchsgruppe 2 unter Kälteeinfluss ($t = +4 \pm 2^\circ\text{C}$) im Test-Retest-Vergleich

Parameter	n	Gruppe 2 Test Kontrolle ($t = +4 \pm 2^\circ\text{C}$) MW \pm SD	Gruppe 2 Retest Kontrolle ($t = +4 \pm 2^\circ\text{C}$) MW \pm SD	Signifikanz t-test
Tiermasse [g]	6	330,0 \pm 12,86	331,67 \pm 22,46	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	1,12 \pm 0,14	0,75 \pm 0,03	n. s.
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	75,88 \pm 5,22	79,17 \pm 5,48	$p < 0,05$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	17,5 \pm 1,45	81,67 \pm 6,74	$p < 0,05$
Tote Formen [%]	6	10,53 \pm 2,68	9,0 \pm 1,90	$p < 0,05$
Pathologische Formen [%]	6	5,5 \pm 1,12	4,67 \pm 0,84	$p < 0,05$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	3,44 \pm 0,21	3,25 \pm 0,17	n. s.
pH-Wert	6	2,71 \pm 0,19	2,49 \pm 0,16	n. s.

Die Versuchsgruppe 1 (Nitrobenzol + Kälte) wies eine bedeutsame Reduzierung der Gesamtzahl der Spermatozoen im Rattenhoden im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dies war im Test höher ausgeprägt als im Retest (12,5-fach vs. 3,5-fach). Gleiches war bei der Beweglichkeitszeit zu beobachten. In der Testphase war diese bei der Gruppe 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe 2,1-fach reduziert und im Retest sogar 17,5-fach. Durch die Zunahme der toten Formen in der Retestphase war die Bestimmung der osmotischen Resistenz und des pH-Wertes in der Gruppe 1 nicht möglich. Insgesamt bot die Kontrollgruppe 2 unter

Kältebedingungen eine Wiederherstellung der Gonadenfunktion, was für die Spermatozoen-Konzentration und -Beweglichkeitszeit sowie für die Anzahl der toten und pathologischen Formen signifikant war. Dagegen ergaben die Ergebnisse der Retestphase der Versuchsgruppe 1 teilweise schlechtere Werte als in der Testphase, was jedoch statistisch nicht signifikant war.

Bei der Versuchstiergruppe, die der Wirkung des Nitrobenzols bei thermischer Behaglichkeit ausgesetzt waren, erlangte die Spermatozoen-Konzentration Werte in Bereich

Tabelle 7: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten der Versuchsgruppe 3 unter Einfluss von Nitrobenzol und thermischer Behaglichkeit ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) im Test-Retest-Vergleich

Parameter	n	Gruppe 3	Gruppe 3	Signifikanz t-test
		Test	Retest	
		Nitrobenzol ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	Nitrobenzol ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	
		MW \pm SD	MW \pm SD	
Tiermasse [g]	6	245,4 \pm 16,07	291,0 \pm 13,55	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	0,52 \pm 0,05	0,62 \pm 0,08	n. s.
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^5$]	6	35,0 \pm 6,19	42,0 \pm 12,02	n. s.
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	51,5 \pm 5,92	41,60 \pm 9,30	n. s.
Tote Formen [%]	6	64,2 \pm 10,88	46,60 \pm 14,09	n. s.
Pathologische Formen [%]	6	43,8 \pm 9,41	28,40 \pm 6,35	n. s.
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	2,66 \pm 0,75	4,06 \pm 0,48	n. s.
pH-Wert	6	3,75 \pm 1,41	4,56 \pm 0,56	n. s.

Tabelle 8: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten der Versuchsgruppe 4 unter thermischer Behaglichkeit ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) im Test-Retest-Vergleich

Parameter	n	Gruppe 4	Gruppe 4	Signifikanz t-test
		Test	Retest	
		Kontrolle ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	Kontrolle ($t = + 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)	
		MW \pm SD	MW \pm SD	
Tiermasse [g]	6	255,83 \pm 7,12	261,67 \pm 13,64	n. s.
Relative Hodenmasse [g]	6	0,97 \pm 0,08	0,52 \pm 0,04	$p < 0,05$
Konzentration der Spermatozoen/ Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	76,83 \pm 6,09	40,17 \pm 3,78	$p < 0,05$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	156,67 \pm 11,14	94,67 \pm 6,40	$p < 0,05$
Tote Formen [%]	6	10,33 \pm 2,36	13,1 \pm 1,01	n. s.
Pathologische Formen [%]	6	12,67 \pm 1,45	6,0 \pm 1,24	$p < 0,05$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	4,49 \pm 0,32	3,38 \pm 0,11	$p < 0,05$
pH-Wert	6	2,82 \pm 0,17	3,17 \pm 0,34	n. s.

der physiologischen Norm und unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe. Auch die Beweglichkeitszeit der Spermatozoen der Gruppe 3 wurde teilweise wieder hergestellt, aber noch 2,2-fach verkürzt im Vergleich der Kontrollgruppe 4. Tote und pathologische Formen nahmen in der Retestphase deutlich ab, blieben aber 3,4-fach erhöht im Vergleich der Kontrollgruppe in der Retestphase.

3.4 Morphometrische Untersuchungen der Rattenhoden im Test-Retest-Vergleich

In den morphometrischen Untersuchungen der Rattenhoden der Versuchsgruppe 1 (Nitrobenzol + Kälte) waren ein-

schichtige spermiogene Zellen und Sertoli-Zellen nachweisbar, die nur ganz vereinzelt zweischichtig waren. Einige Kanälchen waren strukturell so zerstört, dass die PAS-positive Basalmembran frei lag (► Abb. 1). Unter Kältebedingungen bewirkte die Nitrobenzolinoxikation dystrophe Spermatozyten in der Abluminalzone. Spermatozoen waren geißellos und mit hyperchromen pyknotischen und dystrophen Kernen nachweisbar.

Die morphometrischen Untersuchungen der Rattenhoden der Versuchsgruppe 3 (Nitrobenzol + thermische Behaglichkeit) ergaben eine verdünnte spermiogene Ephitelschicht und nur wenige spermiogene Zellen und Sertoli-Zellen (► Abb. 2). In der Abluminalzone zeigte sich die Amitose



Abbildung 1: Wirkung des Nitrobenzols in Kombination mit Kälte: verdünnte spermiogene Epi­thelschicht, nur vereinzelt spermiogene Zellen und Sertoli-Zellen. Einige Kanälchen waren strukturell zerstört und mit freiliegender PAS-positiver Basalmembran nachweisbar (PAS-Reaktion x 400)

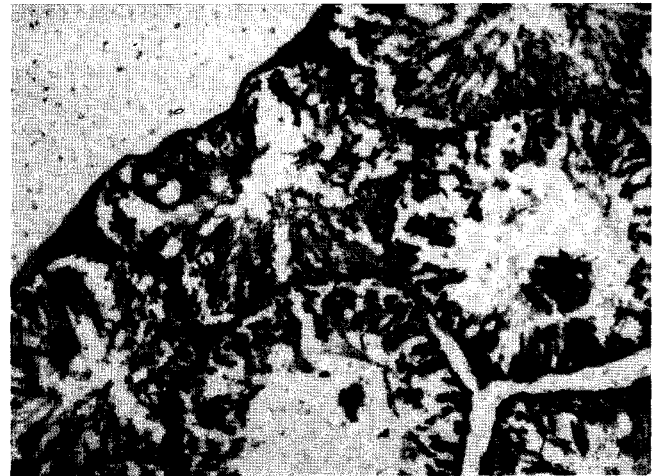


Abbildung 2: Wirkung des Nitrobenzols unter Bedingungen der thermischen Behaglichkeit: verdünnte spermiogene Epi­thelschicht. Ablu-malzone mit einzelnen teilenden Spermatozyten (Van Gieson-Färbung x 100)

von Spermatozyten, Spermatischen und auch von Spermatozoen. In der intertubulären Zone fanden sich ein Ödem und Gefäßhyperämie. Interstitielle Zellen waren nur vereinzelt und dystroph vorhanden.

Bei dem Vergleich des morphofunktionellen Zustandes der Rattenhoden beider Kontrollgruppen 2 und 4 wurde festgestellt, dass der Einfluss von Kälte die Proliferation der testosteronproduzierenden Leydig-Zellen mit Reduzierung der morphofunktionellen Aktivität der Zelle hervorruft, was durch eine verminderte Kernfläche der Leydig-Zellen bedingt ist. Andere morphometrische Parameter ergaben keine Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen.

Betrachtet man die Nitrobenzolwirkung, lassen sich gemeinsame Veränderungen in beiden Gruppen 1 und 3 nachweisen: alle Samenkanälchen haben große Lumen, ein häufig vorhandenes desquamiertes Epithel neben dem Tubuluslumen, eine reduzierte Spermatozoenanzahl aller Entwicklungsstufen in den Samenkanälchen, eine verdünnte Wachstumszone, ein ungeordnetes Vorkommen der Spermato gonien mit teilweise vorhandenen pyknotischen Kernen, eine unebene und vereinzelt verdünnte Basalmembran.

Die Leydig-Zellen weisen Apoptosezeichen auf.

Insgesamt ist die toxische Wirkung von Nitrobenzol unter Kälteeinfluss stärker ausgeprägt als unter thermischer Behaglichkeit, was in ► Tabelle 9 gegenübergestellt ist.

Sowohl unter Kältebedingungen als auch unter thermischer Behaglichkeit bewirkt Nitrobenzol eine deutliche Reduzierung der Spermato gonienanzahl, was unter Kälteeinfluss noch ausgeprägter erfolgt. Ähnliches konnte für die Spermato geneseindices beobachtet werden. Unter Nitrobenzolwirkung beider thermischen Bedingungen konnten fast nur Samenkanälchen mit desquamierten Epithel nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse des Retests nach einer 30-tägigen Rekonvaleszenz ergaben eine Wiederherstellung eines intakten spermato genen Epithels, was unter Kältebedingungen nicht so ausgeprägt war wie unter thermischer Behaglichkeit. Das Interstitium der Samen drüsen ergab in der Versuchsgruppe 1 den Nachweis eines makrophag-lymphozytäres Infiltrats mit einer großen Anzahl von Plasmazelle als Hinweis für entzündliche Prozesse. Auch die anderen mor-

Tabelle 9: Zusammenfassung der morphometrischen Untersuchung der Rattenhoden aller Versuchsgruppen

Parameter	Phase	Gruppe 2	Gruppe 1	Signifikanz Pearson	Gruppe 4	Gruppe 3	Signifikanz Pearson
		Kontrolle	Nitrobenzol		Kontrolle	Nitrobenzol	
		(t = + 4 ± 2 °C)			(t = + 25 ± 2 °C)		
Samenkanälchen mit desquamierten Epithel [%]	Test	4,5 ± 0,4	99,3 ± 0,8	< 0,05	3,9 ± 0,7	94,6 ± 1,3	< 0,05
	Retest	6,2 ± 0,2	21,0 ± 0,4	< 0,05	3,5 ± 0,2	10,0 ± 1,5	< 0,05
Spermato geneseindex	Test	3,8 ± 0,2	0,5 ± 0,06	< 0,05	3,6 ± 0,1	0,2 ± 0,04	< 0,05
	Retest	3,8 ± 0,05	2,3 ± 0,2	< 0,05	3,7 ± 0,3	2,6 ± 0,2	< 0,05
Spermato gonienzahl in Samenkanälchen [%]	Test	74,3 ± 0,6	7,3 ± 0,5	< 0,05	83,4 ± 8,8	28,9 ± 5,4	< 0,05
	Retest	65,8 ± 4,7	59,4 ± 10,8	< 0,05	82,9 ± 2,6	60,7 ± 1,9	< 0,05

Tabelle 10: Einwirkungsanteil des Nitrobenzols und Kälte auf die Funktionszustandsparameter der Spermatozoen Von WAG-Ratten unter der subakuten Wirkung [%]

Parameter	Einzelwirkung Nitrobenzol	Einzelwirkung Kälte (t = + 4 ± 2 °C)	Wirkung Nitrobenzol bei der Faktorenvereinigung	Temperaturwirkung bei der Faktorenvereinigung	Faktorenvereinigung	ΣEffekt
Relative Hodenmasse	73	-	73	-	5	78
Spermatozoen im Hoden/ Gesamtzahl	80	-	80	-	-	80
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen	25	94	25	44	21	90
Pathologische Formen	69	60	69	5	11	85

phometrischen Parameter der Kontrollgruppen regenerierten in dem physiologischen Bereich besser und ausgeprägter als die Werte der Versuchstiere.

Zum Schluss der Untersuchung der gonadentoxischen Wirkung von Nitrobenzol unter Kältebedingungen wurde eine statistische Analyse durchgeführt, die einzelne oder gemeinsame Effekte beider Faktoren (Nitrobenzol, Kälte) bewertete. In einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (► Tab. 10) wurde der Einfluss von Nitrobenzol und/oder Kälte auf die Parameter des Funktionszustandes der Spermatozoen von Rattenhoden unter der subakuten Wirkung untersucht. Insgesamt lässt sich erkennen, dass Nitrobenzol die führende Rolle in der Entwicklung der gonadentoxischen Wirkung ausweist, was unter Kältebedingungen noch stärker ausgeprägt ist als unter alleiniger Nitrobenzolwirkung.

4 Diskussion

Nitrobenzol ist eine toxische, aromatische organische Nitroverbindung, die bei Raumtemperatur flüssig ist. Diese Substanz ist hochgradig verdächtig, krebserregend zu sein. Daher wurde der BAT-Wert 2013 durch eine DFG-geförderte Senatskommission erneut kontrolliert und bewertet; dieser liegt nach wie vor bei 100 µg/l (Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe 2013). Nitrobenzol wirkt akut toxisch bei oraler und inhalativer bzw. dermalen Exposition. Bei Ratten führte dies zu Leber- und Nierenschäden sowie zu neurotoxischen Effekten (MAK 1998).

In der vorgestellten Publikation, die sich mit der toxischen Wirkung von Nitrobenzol – einerseits unter Kältebedingungen und andererseits unter thermischer Behaglichkeit – auf das männliche Reproduktionssystem befasst, lässt sich er-

kennen, dass das männliche Reproduktionssystem als Zielorgan für die toxische Wirkung von Nitrobenzol angesehen werden kann. Es konnte eine hohe Sensibilität auf die Gonaden nachgewiesen werden. Unsere Untersuchungen ergaben die Verminderung der relativen Hodenmasse und der Spermatozoengesamtzahl. Eine enorme Erhöhung pathologischer und toter Spermatozoenformen konnte nachgewiesen werden, was sowohl unter Kälte als auch unter thermischer Behaglichkeit signifikant gegenüber der Kontrollgruppe auszumessen war. Dieser Effekt war unter Kältebedingungen noch ausgeprägter als unter Bedingungen der thermischen Behaglichkeit. Die Ergebnisse der abschließenden Varianzanalyse der gonadentoxischen Wirkung von Nitrobenzol bestätigte den Effekt, dass die kombinierende Wirkung von Nitrobenzol und Kälte stärker toxisch wirkt als die Einzeleffekte, da mehr tote und pathologische Formen nachgewiesen wurden bzw. die Beweglichkeitszeit deutlich herabgesetzt wurde. Ähnliche Ergebnisse konnten eigene Studienergebnisse hinsichtlich der gonadentoxischen Wirkung von Methyltertiärbutylether auf das männliche Reproduktionssystem belegen (Zavgorodnij et al. 2013).

Es ist nicht bekannt, ob die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse auf den Menschen mit einer Exposition am Arbeitsplatz identisch übertragbar sind. Es wird aktuell diskutiert, ob die in Tierexperimenten geprüfte Toxizität bzw. Karzinogenität von Substanzen auf den Menschen übertragbar ist. Nitrobenzol wird u.a. in p-Aminophenol und p-Nitrophenol (vs. Ratten und Mäusen: σ-Aminophenol bzw. m-Nitrophenol) verstoffwechselt. Des Weiteren wurden bei Ratten und Mäusen zwei unbekannte Metabolite gefunden (MAK 1998).

Unsere Studie zeigt, dass die Bedeutung von Nitrobenzol als Gonadentoxin relevant ist. Die Exposition von Nitro-

benzol bedingt v.a. unter Kältebedingungen eine nahezu vollständige Zerstörung der Spermatozyten mit Beginn der Dekompensationsphase. Die Forschung soll aufgefordert sein, weitere Arbeitsschadstoffe auf die kombinierende Wirkung mit Kälte zu untersuchen.

Relevanz für die Praxis:

- Nitrobenzol kommt an verschiedenen Produktionsstätten vor und hat arbeitsmedizinische Relevanz,
- Nitrobenzol wirkt gonadentoxisch,
- Schadstoffwirkung wird unter Kälteeinfluss verstärkt.

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

5 Literatur

- Igonina NA (2007): Osobennosti okazaniya meditsinskoi pomotschi postradawshchim ot wosdeistwiya metgemoglobinoobrasowatelei. Dissert. St. Petersburg 14.00.20 "Toksikologiya"
- Afanasjeva RF, Burmistrowa OB (2001): Kholodowoi stress i ego profilaktika. Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya 8, 10-15
- Afanasjeva RF, Burmistrowa OB, Bobrov AF (2006): Kholod, kriterii otsenki i prognozirowanie riska okhlazhdeniya tscheloveka. Bjulleten WSNZ SO RAMN 3(49), 13-18
- ATSDR (1990): Toxicological profile for Nitrobenzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S. Public Health Service
- Azhaev AN (1979): Fiziologo-gigienitscheskie aspekty deistwiya vysokikh i nizkikh temperatur. Band 38. Moskwa, Nauka
- Bondarenko TI, Kritschewskaya AA, Scheikina IW, Kirjukhina EW (1990): Wliyanie peptida delta-sna na sodержanie adrenalina w tkanyakh krys w norme i pri deistwii kholodowogo stressa. Ukr. Bikhim.zhurn. 62(5), 34-38
- Collins KJ (1998): Cold stress and cardiovascular reactions. Problems with cold work. Ed. by I. Holmer, K. Kuklane. Arbetslivsinstitutet 18, 166-171
- EPA (2009): Toxicological Review of Nitrobenzene (CAS No. 98-95-3). U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Gavhed D, Makinen T, Holmer I (2000): Face temperature and cardiorespiratory responses to wind in thermoneutral and cool subjects exposed to -10 °C. European Journal of Applied Physiology 83, 449-456
- Hassi J, Holmer I (1994): Cold related diseases and cryopathies. Work in cold environments. Invest report 33-40
- Isaakjan LA, Maslenikowa LS, Olynyanskaya RP, Trubitsina GA (1973): O nekotorykh parametrah kislородnogo obmena w organosme i tkanjakh u zhiwotnykh pri adaptatsii k kholodu. Fiziologitscheskii zhurnal SSSR im. I.M. Setschenowa LIX 11, 1742-1749
- Kucharenko NC, Nowoselowa AA (2009): Korrektsiya khronischeskogo kholodowogo stressa u krys probiotitscheskim preparatom. Westnik Krasnoyarskogo gosudarstwenного agrarnogo universiteta 7, 110-111
- Kundiev Jul, Navakatikyan AO, Kalnisch WW (1993): Sowremennye problemy kombinirowannogo deistwiya na organism proiswodstwenных i sozialno-biwtowykh faktorow (obsor literatury). Wratschebnoe delo 5-6, 35-41
- Kurenkow DW, Budarkow WA, Gontscharenko EN (2009): Effektivnost primeneniya ferrotsina u krys pri ostrykh stressornykh wosdeistwiyakh. Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya 49(1), 85-89
- Kustow WW, Tiunow WW, Wasiljew GA (1975): Kombinirowannoje deistwie promyshlennых yadow. Moskwa, Meditsina
- Lomteva NA (2008): Wliyanie stadii estralnogo tsikla na prozessy swobodno-radikalnogo okisleniya samok krys pri wosdeistwii stressindutsirujuschikh faktorow. Problemy reproduktsii 6, 12-15
- Maistrakh EW (1975): Patologitscheskaya fiziologiya okhlazhdeniya tscheloveka. Leningrad, Meditsina
- MAK, 27. Lieferung, 1998. Link: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb9895d0027/pdf> Letzter Zugriff 15.10.2013
- Mitschuk NE (2006): Kholodowaya bolesn (gipotermiya). Meditsina neotlozhnykh sostoyan 4(5), 20-28
- Nasu T, Taguchi T, Mizumura K (2010): Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. European Journal of Pain 14(3), 236-244
- Perepetschaeva ML, Sodorowa Ju A, Grischanova A J (2006): Wliyanie kholodowogo stressa na ekspressiju genow AHR-sawisimogo puti reguljatsii CYP1 w petscheni krys. Bulletin eksperimentalnoi biologii i meditsiny 141(3), 287-291
- Piven NW, Pewsner LS (1972): Wliyanie kholodowogo stressa na sodержanie RNK w motoneironakh spinnoego mosga i ikh glialnykh kletkakh-satellitakh. Doklady Akademii nauk SSSR 206(1), 250-253
- Sanotskii IW, Fomenko WN, Salnikowa LS (1978): Metody eksperimentalnogo issledowaniya po ustanowleniju porogow deistwiya promyshlennых yadow na generatiwnuju funktsiju s tselju gigienitscheskogo normirowaniya. Metoditscheskie ukasaniya. Moskwa, NII GT i PS AMN SSSR
- Selye H (1973): The evolution of the stress concept. Am Sci 61(6), 23-24
- Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (2013): MAK- und BAT-Werte-Liste 2013. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Soldak II, Maksimovitsch WA, Brjukhanova ST (2006): Powyschenie fiziologitscheskoi ustoitschivosti promyshlennых rabotschikh k kholodu. Westnik gigieny i epidemiologii 10(1), 144-145
- Solodkova OA, Karedina WS, Senkina WG (2008): Soderzhanie lipidow w kore nadpotschetschnikow pri kholodowom wosdeistwii. Uspekhi sowremenno-go estestwosnaniya 9: 5
- Tschatschschin WP, Dedenko II (1975): Trud i sdorowje tscheloweka na sewere. Murmansk
- Vavilowa TP, Mitronin AW, Ostrowskaya IG, Gawerowa JuG (2009): Reaktsiya sosudow pulpy subow krys na emotsionaln-kholodowoi stress. Endodontiya Today 1, 30-33
- Wasilenko NM (1980): Toksikologiya aromatitscheskikh aminow i nitrosoedinenii bensolnogo ryada – produktow anilinokrasotschnoi promyshlennosti. Dissert. Kiev. 14.00.07 "Gigiena"
- Zavgorodnij I, Kapustnik W, Batschinskij R, Thielmann B, Böckelmann I (2013): Toxische Wirkung von Methyltertiärbutylether (MTBE) auf das männliche Reproduktionssystem unter Kältebedingungen. Zbl Arbeitsmedizin 63, 80-90
- Zavgorodnij IB, Worontsow MP, Batschinskij RO (2006): Do pitannya pro spolutshenu diju khimitschnых tschinnikiw ta kholodowogo stresu (analititschnii oglyad literaturi). Ukrainkii zhurnal s problem meditsini pratsi 3(7), 65-70
- Zavgorodnij IW, Myasoedow WW, Batschinskij RO, Iwanenko TO, Wekschin WO (2009): Patent № 39237 UA, MPK A01L 1/00, B01L 5/00. Charkiwskii natsionalnii meditschnii universitet. – S. № u200812926; Sayawl. 06.11.2008; Opubl. 10.02.2009; Büll. № 3. Satrawotschna kamera