

¹⁾ Lehrstuhl für Hygiene und Ökologie No 2, Charkower Nationale Medizinische Universität

²⁾ Lehrstuhl für Innere- und Berufskrankheiten, Charkower Nationale Medizinische Universität

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

Toxische Wirkung von Methyltertiärbutylether (MTBE) auf das männliche Reproduktionssystem unter Kältebedingungen

Igor Zavgorodnij¹⁾, Walerij Kapustnik²⁾, Ruslan Batschinskij¹⁾, Beatrice Thielmann³⁾, Irina Böckelmann³⁾

I. Zavgorodnij, W. Kapustnik, R. Batschinskij, B. Thielmann, I. Böckelmann: Toxische Wirkung von Methyltertiärbutylether (MTBE) auf das männliche Reproduktionssystem unter Kältebedingungen. *Zbl Arbeitsmed* 63 (2013) 80–90

Schlüsselwörter: Kombinationswirkung, MTBE, Kälte, Reproduktionssystem, Tierexperiment

Kurzfassung:

Das Problem der gemeinsamen Wirkung von Schadstoffen und niedrigen Temperaturen auf den Organismus bleibt aktuell. Ziel unseres Tierexperimentes war die Untersuchung der toxischen Wirkung von Methyltertiärbutylether (MTBE) auf das Reproduktionssystem der Versuchstiere, die MTBE direkt ausgesetzt waren. Hierfür wurde das Experiment unter zwei thermischen Bedingungen durchgeführt: thermische Behaglichkeit bei $25 \pm 2^\circ\text{C}$ oder Kälte (cold stress) bei $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Diese subakuten toxikologischen Experimente erfolgten an 24 geschlechtsreifen männlichen WAG-Ratten. Jeder Testgruppe (2 x 6 Tiere) wurde 30 mal MTBE in einer Dosis von 500 mg/kg des Tiergewichts in den Magen eingeleitet. Diese Applikation erfolgte nüchtern durch eine spezielle Metallsonde als Wasserlösung. Den Tieren der beiden Kontrollgruppen (2 x 6 Tiere) wurde bei gleichen Untersuchungsbedingungen eine äquivalente Menge destillierten Wassers eingeflüßt. Danach wurde für 4 Stunden jeweils eine Gruppe der thermischen Behaglichkeit und eine Gruppe der Kälte ausgesetzt.

Nach einer 30-tägigen Rekonvaleszenzzeit – gemessen ab der letzten Instillation von MTBE bzw. Aquadest – wurden die Experimente wiederholt, um der Frage der Reversibilität nachzugehen.

Die MTBE-Wirkung unter Kälte führt nicht zur Modifikation der Gesamtzahl der in den Hoden befindlichen Spermatozoen. Die Einzelwirkung von MTBE bewirkt dagegen eine Reduzierung der Spermatozoengesamtzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe: $28,8 \pm 4,66$ vs. $76,83 \pm 6,09$. Außerdem wurde in beiden Testgruppen eine statistisch gesicherte Reduzierung der Spermatozoen-Beweglichkeitszeit im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen festgestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die gonadentoxische Wirkung von MTBE sowohl unter den Bedingungen der thermischen Behaglichkeit als auch unter dem Stressor Kälte bestätigt wurde. Männliche Gonaden kann man somit als Zielorgan für die toxische Wirkung von MTBE betrachten. Dabei fiel auf, dass unter Kältebedingungen MTBE größere Störungen der Spermatozoenfunktion verursacht. Außerdem waren hier die Reversibilitätseffekte sehr gering. Die kombinierende Wirkung von MTBE und Kälte verursacht folglich deutlich größere Effekte und Verschiebungen außerhalb des physiologischen Bereiches wie z.B. Beweglichkeitszeit der Spermatozoen sowie die Zahl ihrer toten und pathologischen Formen.

Zusammenfassend zeigt die MTBE-Exposition unter Kältebedingungen eine Ausschöpfung der kompensatorischen Reserven und den Beginn der Dekompensationsphase.

Anschrift der Autoren:

Prof. Dr. med. Igor Zavgorodnij ■ Kharkiv National Medicals University ■ 4, Lenin Av., Kharkiv, 61022 ■ Ukraine

Dr. med. Ruslan Batschinskij ■ Kharkiv National Medicals University ■ 4, Lenin Av., Kharkiv, 61022 ■ Ukraine

Prof. Dr. med. Walerij Kapustnik ■ Kharkiv National Medicals University ■ 4, Lenin Av., Kharkiv, 61022 ■ Ukraine

Dr. med. Beatrice Thielmann ■ Bereich Arbeitsmedizin ■ Medizinische Fakultät ■ Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg ■ Leipziger Str. 44 ■ 39120 Magdeburg ■ Germany

Prof. Dr. med. Irina Böckelmann ■ Bereich Arbeitsmedizin ■ Medizinische Fakultät ■ Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg ■ Leipziger Str. 44 ■ 39120 Magdeburg ■ Germany

Toxicity of Methyl tert-butyl ether (MTBE) on the male reproductive system under cold conditions

I. Zavgorodnij, W. Kapustnik, R. Batschinskij, B. Thielmann, I. Böckelmann: Toxicity of Methyl tert-butyl ether (MTBE) on the male reproductive system under cold conditions. *Zbl Arbeitsmed* 63 (2013) 80–90

Key words: combination effect, MTBE, cold, reproductive system, animal experiment

Abstract: The problem of the common effects of pollutants and low temperatures on the organism remains current. The purpose of our vivisection was to compare the toxic effect of methyl tert-butyl ether (MTBE) on the reproductive system of the laboratory animals exposed directly to MTBE. Therefore this experiment was arranged under two thermal conditions: thermal comfort ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) or cold (cold stress) ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

This subacute toxicity experiments were performed on 24 sexually mature male WAG rats. To each test group (2 x 6 rats) MTBE was administered 30 times in the stomach at a dose of 500 mg / kg of animal weight. This application to the fasting animals was carried out by a special metal tube as a water solution. Under the same test conditions the 12 animals in the two control groups were instilled with an equivalent amount of distilled water. Thereafter, for 4 hours in each case one group was exposed to thermal comfort and the other to cold stress. After the thirty-day recovery period – measured from the last instillation of MTBE or aqua-dest – the experiments were repeated in order to answer the question of reversibility.

The MTBE-effect under cold does not result in a modification of the total number of spermatozoa contained in the testis. In contrast the individual effect of MTBE causes a reduction of the total compared to the control group: $28,8 \pm 4,66$ vs. $76,83 \pm 6,09$. Furthermore, both test groups showed a statistically safe spermatozoa motility time reduction compared to the two control groups.

The results show that the gonad-toxic effect of the MTBE was confirmed both under the conditions of thermal comfort and the stressor cold. Male gonads can be considered the target for toxic effects of MTBE. Besides, under cold conditions the MTBE causes more considerable impairment of the spermatozoa function. Furthermore, the effects of reversibility were very low. Thus, combining the effects of MTBE and cold causes significant effects and shifts outside the physiological area, such as sperm motility time, number of their dead and pathological forms.

In summary, under cold conditions the MTBE exposure shows an exhaustion of compensation capabilities and the beginning of decompensation period.

Einführung

Das Problem der gleichzeitig auftretenden Wirkung von Schadstoffen und Kälte auf den Organismus ist bis heute nur wenig erforscht, obwohl solche Bedingungen am Arbeitsplatz häufiger vorkommen. Die Intensität der Schadstoffwirkung übertrifft viele andere kombinierte Faktoren (Tschatschschin & Dedenko 1990). Der Frage nach der Schadstoffwirkung auf den Organismus bei niedrigen Temperaturen widmen sich verhältnismäßig wenige wissenschaftliche Arbeiten, obwohl das Interesse für dieses Problem, besonders im Rahmen der medizinischen Prävention, seit langem besteht (Kustow et al. 1975).

Die Kombinationswirkung chemischer Faktoren und niedriger Temperaturen auf den Organismus trifft überwiegend auf Produktionsstätten zu, die die Anwesenheit von Menschen unter diesen ungünstigen Bedingungen verlangen, wie z.B. in der Chemieindustrie, Bauindustrie, Gas- und Erdölgewinnung oder Verarbeitungsindustrie. Auch unter ökologischen Gesichtspunkten gewinnt die Kombinationswirkung von chemischen Stoffen und Kälte immer mehr an

Bedeutung. Verschiedene Xenobiotika kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Damit ist die potentielle Gefahr ihrer Aufnahme in den menschlichen Organismus, u.a. in der kalten Jahreszeit, stetig vorhanden (Zavgorodnij et al. 2006).

Zur Einhaltung der vieldiskutierten Abgasgrenzwerte für Autos versucht die Mineralölindustrie, durch Zusatz bestimmter Additive zu einer sauberen Verbrennung ihrer Ottokraftstoffe beizutragen (Aut et al. 2003). Die ökologischen Anforderungen an die Verbrennungsprodukte der Motoren haben zur Entwicklung bzw. Herstellung von reformuliertem (ökologisch sauberem) Benzin mit sauerstoffhaltigen Mischkomponenten – Oxygenten (Spiritus, einfache Äther) – geführt. In Deutschland und Europa wird besonders häufig Methyltertiärbuthylether (MTBE) als Zusatz in Ottokraftstoffen verwendet, um die damit verbundene Erhöhung der Klopfestigkeit zu erreichen (Danilow 2009). Antiklopfmittel werden eingesetzt, um die Gebrauchstauglichkeit von Ottokraftstoffen zu steigern. MTBE wird dem Kraftstoff als Ersatz für Blei bzw. blei-

organische Verbindungen sowie Benzol und andere aromatische Kohlenwasserstoffe, die als umwelt- und gesundheits-schädigend eingestuft sind, zugesetzt. Dieses Additiv für Vergaserkraftstoffe wird in Deutschland überwiegend als Ersatz für Bleitetraethyl eingesetzt und gewinnt seit Anfang der 80er Jahre in Europa eine stetig wachsende Bedeutung als Mischkomponente in Ottokraftstoffen (Oktanbooster). In den USA begann die Produktion von MTBE schon in den 70er Jahren und entwickelte sich seitdem rasant. Dort wurden im Jahr 2000 13 Mio. Tonnen MTBE verbraucht. Im Gegensatz dazu werden europaweit nur 2,3 Mio. Tonnen MTBE verwendet. Der jährliche MTBE-Verbrauch im Jahr 1999 wurde in Deutschland auf ca. 0,5 Mio. Tonnen geschätzt (Pahlke et al. 2000). In 2000 lag die weltweite Nutzung von MTBE insgesamt bei 22 Mio. Tonnen (Danilow 2009). Allerdings wurde kurze Zeit später die Verwendung von MTBE als Benzinadditiv in einigen Staaten der USA untersagt.

Das Verbot von Bleitetraethyl und die gestiegene Nachfrage nach Hochoktan-

benzin verursachen ein großes Defizit an Hochoktankomponenten in Russland. Zurzeit werden dort Zusatzstoffe wie MTBE oder aromatische Amine (N-Methylanilin) breit verwendet. Diese chemischen Verbindungen ermöglichen es, eine wirksame Mischkomponente herzustellen. Hierunter zählt „Oktanum“, welches in der Ukraine erzeugt und verwendet wird.

MTBE – ein Ether – ist eine farblose Flüssigkeit mit auffälligem, für den Menschen sehr intensiven Geruch und Geschmack. Dieser Ether gehört zur Stoffgruppe der leichtflüchtigen Kohlenwasserstoffe und weist mit etwa 42 g/l bei 20°C eine sehr gute Wasserlöslichkeit auf. Mit einem Siedepunkt von 55,3°C bei 1013 hPa ist MTBE ein Leichtsieder (UMEG 2002) und der Dampfdruck liegt mit 270 hPa bei 20°C dreimal so hoch wie der von Benzol. Die Daten zur Mischbarkeit von MTBE mit Wasser sind im Hinblick auf das Verhältnis zwischen Löslichkeit und Temperatur widersprüchlich.

MTBE wird auch in vielen Industriezweigen genutzt, insbesondere für die Medikamentenherstellung. Des Weiteren wird es als Monomer für die Polyethylen-, Polypropylen- sowie Polyvinylchlorid-Synthese eingesetzt (Yavorskii & Paustowskij 2008; Biradar et al. 2009). In Europa kommt ein geringer Anteil an MTBE in Lösungsmitteln vor und wird für die Produktion von Isobutylenen verwendet (MEF 2001).

Es ist bekannt, dass MTBE nicht nur eine Luftverschmutzung des Arbeitsplatzes verursachen, sondern auch eine Verunreinigung der atmosphärischen Luft, des Grundwassers und des Bodens bewirken können. Als betroffene Berufsgruppen gelten u.a. Arbeiter der Erdölverarbeitenden Betriebe und Tankstellen, Spediteure oder Frachtführer der Brennstoffe, Kraftfahrer und Automechaniker. Weitere Untersuchungen ergaben eine belastende Wirkung von MTBE auf die restliche Bevölkerung (Yavorskii & Paustowskij 2008; Mohr et al. 1994; Chang & Chen 2009; Kolb & Puttmann 2006a, b; Phillips et al. 2008; Vandecasteele 2008). Trotzdem wird im Rahmen der europäischen Risikobewertung die MTBE-Einstufung nicht als „umwelt-

gefährlich“ angesehen (<http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/grundwasser/mtbe.htm>).

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen zur toxikologischen Relevanz von MTBE. Dabei zeigte dieser Schadstoff im Großen und Ganzen keine besonders auffälligen toxischen und ökolog/toxischen Wirkungen. Dennoch ergaben einige Tierexperimente potenzielle kanzerogene Wirkungen von MTBE bei deren extrem hohen Expositionen, jedoch wird dieser Stoff nach europäischem Gefahrstoffrecht nur als „leichtentzündlich“ und als „reizt die Haut“ bezeichnet (<http://www.umweltbundesamt.de/wasser/themen/grundwasser/mtbe.htm>). MTBE ist damit von der EU-Kommission als nicht gentoxisches Kanzerogen eingestuft (Richtlinie 2004/73/EG der Kommission vom 29. April 2004; Empfehlung der Europäischen Kommission vom 07.11.2001).

MTBE wurde allerdings von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft in der MAK- und BAT-Werte-Liste der Kategorie 3 B den krebserzeugenden Arbeitsstoffen zugeordnet (MAK- und BAT-Werte-Liste DFG, 2000). Somit besteht für diesen Arbeitsstoff in Deutschland eine Grenzkonzentration in der Arbeitsluft von 180 mg/m³; 50 ppm. Bei Einhaltung dieser Grenzwerte sind keine Schädigungen zu erwarten. Die LD₅₀ bei oraler Aufnahme liegt in Tierexperimenten bei Ratten bei 4000 mg/kg. Der NOAEL für Säugertiere für die orale Exposition ist auf 300 mg/kg/d festgelegt, allerdings dauerten die Tierexperimente nur 90 Tage. Eine kanzerogene Wirkung bei Ratten wurde schon bei oraler Exposition > 250 mg/kg beobachtet.

Dem Bericht der WHO (1998) zu MTBE zufolge sind für die allgemeine Bevölkerung unter den bestehenden Belastungsbedingungen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine akuten Gesundheitsrisiken zu erwarten. Daher wird MTBE für den Menschen bisher als nicht kanzerogen, mutagen oder reproduktionstoxisch eingestuft.

Bei Betrachtung der MTBE-Toxizität bei Ratten stellt man jedoch fest, dass

das Reproduktionssystem der Versuchstiere eines der wichtigsten Zielorgane für dessen schädigende Wirkungen darstellt und MTBE insbesondere auf die Spermatogenese Einfluss nehmen kann. Die Untersuchungen der Reproduktionsfunktion bei Ratten zeigten, dass es bei der Einleitung von MTBE in den Magen zu Störungen der Sekretion des Testosterons und der luteinisierenden (LH-) und follikelstimulierenden (FSH-) Hormone kommen kann. In hohen Konzentrationen trägt MTBE zur deutlichen Senkung der Lebensfähigkeit der Zellen der Spermatogenese bei (Li et al. 2006, 2008, 2009; de Peyster et al. 2008).

Auch Kälte ist ein Umweltfaktor, der auf den Organismus negativ einwirken kann. Optimale raumklimatische Bedingungen am Arbeitsplatz stehen im engen Zusammenhang zu Gesundheit und Zufriedenheit der Beschäftigten (Bux 2006). Kälte kann sowohl den funktionalen als auch den pathologischen Bereich betreffen. Es ist bekannt, dass Kälte die Arbeitsfähigkeit des Menschen mindern sowie eine Unterkühlung hervorrufen kann, die zur Entwicklung von Krankheiten beiträgt und sogar tödliche Folgen haben könnte (Bux 2006; Afanasjeva & Burmistrova 2001; Mitschuk 2006; Soldak et al. 2006). Kälte ist ein Risikofaktor für eine mögliche Gesundheitsgefährdung, die zu einer Verschlechterung der Gesundheit von Personen mit kardiovaskulären Erkrankungen und/oder chronischen Lungenkrankheiten führt. Ebenso kann Kälte auch Sterorkardien auslösen (Collins 1998).

Seit den ersten Beobachtungen von Hans Selye (1973) wird in der Stressforschung oft Kälte („cold stress“) als typischer Stressor benutzt. Dabei löst dieser Stressfaktor eine Reaktion in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) aus – z.B. eine gesteigerte Ausschüttung der Hormone des Hypothalamus und der Hypophyse sowie eine gesteigerte Kortisolausschüttung der Nebennierenrinde. Dies ruft einen typischen Symptomenkomplex „der Anstrengungsreaktion“ im Organismus hervor (Afanasjeva & Burmistrova 2001; Soldak et al. 2006; Afanasjeva et al. 2006; Maistrakh 1975; Azhaev 1979; Hassi & Holmer 1994; Gavhed et al. 2000). Zu

den im Labor häufig angewandten Stressoren gehört der sogenannte cold-pressor-Test.

Die Antwortreaktion auf den Stressor „Kälte“ stützt sich auf komplizierte biochemische Reaktionen, die für die Aufrechterhaltung der thermischen Homöostase des Organismus verantwortlich sind (Kulikow et al. 1988). In wissenschaftlichen Arbeiten wird beschrieben, dass die Abkühlung der homoiothermen (gleichwarmen) Tiere auf Temperaturen von 2 °C bis 6 °C ein adäquates Stressmodell darstellt. Dieses Stressmodell wird in Experimenten breit eingesetzt (Piven & Pewsner 1972; Bondarenko et al. 1990; Isaakjan et al. 1973; Perepetschaeva et al. 2006; Solodkova et al. 2008; Lomteva 2008; Kurenkow et al. 2009; Vavilova et al. 2009; Kucharenko & Nowoselowa 2009; Nasu et al. 2010).

In Anbetracht der Tatsache, dass die Nachfrage und die weltweite Produktion von MTBE ständig wachsen, ist die Fragestellung von der gonadentoxischen Wirkung des MTBE in Kombination mit kühlen bis kalten Temperaturbedingungen, die an einigen Arbeitsplätzen bestehen, zeitgemäß und aktuell.

Das Ziel unseres Tierexperimentes war die vergleichende Untersuchung der toxischen Wirkung von MTBE auf das Reproduktionssystem der Versuchstiere. Dabei wurden zwei thermische Bedingungen – thermische Behaglichkeit bei 25 ± 2 °C und Kälte (cold stress) bei 4 ± 2 °C – betrachtet. Es wurden die Regeln zum Tierschutz bei Tierexperimenten eingehalten. Die Tierversuche wurden von der Bioethikkommission der Charkower Universität und der Bioethikkommission des Kiever Instituts für Arbeitsmedizin (NAMN Kiev, Ukraine) genehmigt. Die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojektes im Rahmen der Dissertation von Herrn R. Batschinskij erfolgte durch das Ministerium für Gesundheit (Ukraine).

Material und Methoden der Forschung

Bei dem subakuten toxikologischen Experiment an geschlechtsreifen männlichen WAG-Ratten handelt es sich um die 30-malige Instillation von MTBE (Dosis 500 mg/kg des Tiergewichts) in den Magen und die anschließende Exposition der Tiere unter den zwei o.g. thermischen Bedingungen. Diese Experimente wurden früh morgens ab 7:00 Uhr 4 Stunden lang 5mal pro Woche durchgeführt. Insgesamt dauerte das Experiment 30 Tage (Standard für ein Modellexperiment für die Untersuchung der Toxikodynamik). MTBE wurde den 12 Ratten (nüchtern) als Wasserlösung durch eine spezielle Metallsonde in den Magen eingeführt. Den 12 Tieren der Kontrollgruppe wurde bei gleichen Untersuchungsbedingungen eine äquivalente Menge destillierten Wassers (Aquadest) verabreicht. Danach wurden alle Tiere für 4 Stunden einer der beiden genannten Temperaturbedingungen ausgesetzt. Die Versuchstiere wurden somit auf 4 Gruppen zu je 6 Tieren verteilt. Die Versuchstiere der Gruppe 1 wurden MTBE bei einer reduzierten Temperatur von 4 ± 2 °C ausgesetzt. Die Versuchstiere der Gruppe 2 (Kontrollgruppe) wurden nur der Kälte ausgesetzt. Die Versuchstiere der Gruppe 3 wurden mit MTBE bei einer Temperatur von 25 ± 2 °C (Normaltemperatur der Außenwelt) exponiert. Die Versuchstiere der Gruppe 4 waren eine Kontrollgruppe bei einer Temperatur von 25 ± 2 °C.



IHR KOMPETENTER PARTNER FÜR
KONGRESSE • TAGUNGEN • EVENTS • PR

ARBEITSMEDIZIN ARBEITSSICHERHEIT 2013

9. NORDBADISCHES FORUM „GESUNDHEIT UND
SICHERHEIT BEI DER ARBEIT“ IN MANNHEIM
18.-19. APRIL 2013

Programm online

11. NORDBAYERISCHES FORUM „GESUNDHEIT UND
SICHERHEIT BEI DER ARBEIT“ IN ERLANGEN
25.-26. APRIL 2013

Programm online

12. TAG DER ARBEITSMEDIZIN IN HAMBURG
15. JUNI 2013

14. FORUM ARBEITSMEDIZIN IN DEGGENDORF
26.-28. JUNI 2013

BETRIEBLICHES GESUNDHEITSMANAGEMENT IN MÜNCHEN
10. JULI 2013

12. TAG DER ARBEITSMEDIZIN IN BERLIN
07. SEPTEMBER 2013

5. SYMPOSIUM ARBEITS-, REISE- UND
IMPFMEDIZIN IN MÜNCHEN
27. NOVEMBER 2013

ÄNDERUNGEN VORBEHALTEN

ANMELDEUNTERLAGEN BITTE ANFORDERN BEI

RG GESELLSCHAFT FÜR INFORMATION UND
ORGANISATION MBH
WÜRMSTR. 55
82166 GRÄFELFING
TEL: 089/89 89 948-0
FAX: 089/89 80 99 34
INFO@RG-WEB.DE

WWW.RG-WEB.DE



Informationen und
Registrierung:
www.forum-impfen.de

Eine der größten umfangreichsten und kostenlosen
deutschen Serviceplattformen für Mediziner und
Apotheker rund um das Thema Impfen.

Der Kälte-Stress wurde folgendermaßen modelliert: die Tieren befanden sich in der Expositionskammer mit zusätzlich ausgestatteten Zellen für eine isolierte freie Unterbringung. Diese Kammer wurde mit dem thermoelektrischen Kühler eines Luft-Luft-Typs (Modell 180–24-AA, Fa. „Kriotherm“, Sankt Petersburg, Russland) ausgestattet, der eine Abkühlung der Luftumgebung auf $4 \pm 2^\circ\text{C}$ gewährleistete (Zavgorodnij et al. 2009).

Bei der Untersuchung der Kombinationswirkungen verschiedener Faktoren auf den Organismus ist es grundsätzlich wichtig, folgende Bewertungen durchzuführen: a) ganzer Komplex, b) von jedem einzelnen geltenden Faktor und c) ihrer Kombinationen (Kundiev et al. 1993). Insofern wurden in unserem Experiment 4 Versuchstiergruppen gebildet, um den gonadentoxischen Einfluss von MTBE in Kombination mit

verschiedenen Temperaturbedingungen zu untersuchen.

In diesem Modellversuch wurde die Wirkung des MTBE in Kombination mit reduzierter Temperatur auf die Reproduktionsfunktion durch den Spermatozonenfunktionszustand (Spermatozoiden) kontrolliert. Folgende Parameter wurden erfasst: relative Hodenmasse, Gesamtzahl der Spermatozoen im Hoden (Spermienkonzentration), Beweglichkeitszeit der Spermatozoen (Spermienmotilität), tote und pathologische Formen der Spermatozoen (Spermienmorphologie) sowie deren osmotische Resistenz und der pH-Wert nach der 30-maligen MTBE-Exposition. Außerdem wurde der Frage einer Reversibilität nach einer 30-tägigen Karenzzeit (gemessen ab der letzten MTBE-Exposition) nachgegangen (Sanotskii et al. 1978).

Die morphologische Bewertung des Funktionszustandes der Hoden erfolgte anhand einer histologischen Untersuchung des Hodengewebes. Außerdem wurden morphometrische Parameter erfasst wie z.B. die Zahl der Samenkanälchen von samenproduzierenden Epithelien in der Desquamationsphase, der Spermatogeneseindex (Summe Spermatogenesestadien in jedem Samenkanälchen geteilt durch Anzahl der gezählten Samenkanälchen), die Gesamtzahl der normalen Spermatogonien in der ersten Reihe der Zellen auf der Basalmembran der Samenkanälchen (die Spermatogonienzahl) und schließlich die Fläche des Kerns der Leydig-Zwischenzellen (Leydig-Zellen) nach der letzten von 30 MTBE-Expositionen sowie am Ende der Reversibilitätsphase von 30 Tagen (Sanotskii et al. 1978).

Ergebnisse

Die Ergebnisse des Funktionszustandes der Spermatozoen unter der chemisch-toxischen Wirkung von MTBE bei zwei verschiedenen Temperaturbedingungen sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Das Körpergewicht der Tiere in diesen vier Gruppen war unterschiedlich, obwohl es sich um geschlechtsreife Tiere handelte, die alle die gleiche Nahrung bekamen und ähnliche biochemische Parameter aufwiesen.

Tabelle 1: Funktionszustand der Spermatozoen unter der subakuten Wirkung von MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)

Parameter	n	Test Gruppe 4 Kontrolle ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)	Test Gruppe 3 MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)
		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Tiermasse [g]	6	255,83 $\pm$ 7,12	263,0 $\pm$ 12,0
Relative Hodenmasse [g]	6	0,97 $\pm$ 0,08	0,60 $\pm$ 0,15
Konzentration der Spermatozoen im Hoden/Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	76,83 $\pm$ 6,09	28,8 $\pm$ 4,66*
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	156,67 $\pm$ 11,14	29,4 $\pm$ 4,93*
Tote Formen (tote Spermien) [%]	6	10,33 $\pm$ 2,36	29,8 $\pm$ 6,24*
Pathologische Formen [%]	6	12,67 $\pm$ 1,45	13,0 $\pm$ 3,70
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	4,49 $\pm$ 0,32	3,62 $\pm$ 0,23
pH-Wert	6	2,82 $\pm$ 0,17	4,33 $\pm$ 0,67
Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).			

Tabelle 2: Funktionszustand der Spermatozoen unter der subakuten Wirkung von MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)

Parameter	n	Test Gruppe 2 Kontrolle ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)	Test Gruppe 1 MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)
		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Tiermasse [g]	6	330,0 $\pm$ 12,86	315,83 $\pm$ 22,15
Relative Hodenmasse [g]	6	1,12 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,06
Konzentration der Spermatozoen im Hoden/Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	75,88 $\pm$ 5,22	76,18 $\pm$ 5,46
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	17,5 $\pm$ 1,45	11,17 $\pm$ 2,91*
Tote Formen (tote Spermien) [%]	6	10,53 $\pm$ 2,68	38,4 $\pm$ 6,96*
Pathologische Formen [%]	6	5,5 $\pm$ 1,12	13,0 $\pm$ 2,39*
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	3,44 $\pm$ 0,21	5,13 $\pm$ 0,2*
pH-Wert	6	62,71 $\pm$ 0,19	3,06 $\pm$ 0,24
Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).			

Die makroskopische Untersuchung der Rattenhoden aus den Kontrollgruppen zeigte, dass diese von normaler Größe und Farbe waren, eine kleine Gefäßinjektion auf der Oberfläche bestand und ihre vaskuläre Zeichnung mäßig deutlich ausgeprägt war. Bei der Prüfung des Funktionszustandes der Spermatozoen wurden keine Abweichungen von der Norm festgestellt. Die Gesamtzahl der Spermatozoen im Hoden sowie die toten und pathologischen Formen bewegten sich im Rahmen der physiologischen Schwankungen. Die Größe der osmotischen Resistenz und der pH-Wert lagen ebenfalls im Normbereich.

Bei den Tieren der Kälte-Kontrollgruppe wurde mikroskopisch eine Kontraktion der Spermiengeißel beobachtet, was möglicherweise auf eine negative Wirkung der Kälte zurückzuführen sein könnte.

Die makroskopische Untersuchung der Rattenhoden nach MTBE-Exposition unter beiden thermischen Bedingungen zeigte normalgroße gräuliche Gonaden mit einer ausgeprägten vaskulären Zeichnung und Zyanose.

Die Prüfung des Funktionszustandes der Spermatozoen zeigte, dass die MTBE-Wirkung unter Kälte nicht zur Modifikation der Gesamtzahl der Spermatozoen in den Hoden führte. Die Einzelwirkung von MTBE hat dagegen eine statistisch sichere Reduzierung der Spermatozoengesamtzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe: $28,8 \pm 4,66$ vs. $76,83 \pm 6,09$ zur Folge. Die Anzahl an toten Spermatozoen bei den Tieren der Gruppe 1 (Kombinationswirkung MTBE und Kälte) war höher im Vergleich zu den Kontrolltieren der Gruppe 2 und lag bei $38,4\%$ vs. $10,5\%$. Unter MTBE-Wirkung bei thermischer Behaglichkeit macht diese Kennziffer nur $29,8\%$ aus. Die Anzahl von pathologischen Formen der Spermatozoen in beiden MTBE-Versuchsgruppen (in Kombination mit Kälte bzw. mit thermischer Behaglichkeit) betrug $13,0\%$. Außerdem wurde in diesen beiden Versuchsgruppen eine statistisch gesicherte Reduzierung der Spermatozoen-Beweglichkeitszeit im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen festgestellt: $29,40 \pm 4,93$ s bzw. $11,17 \pm 2,91$ s vs. $156,67 \pm 11,14$ s bzw. $17,5 \pm 1,45$ s.

Tabelle 3: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten unter der subakuten Wirkung von MTBE und $t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$ (30-tägige Rekonvaleszenzzeit)

Parameter	n	Retest Gruppe 4 Kontrolle ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)	Retest Gruppe 3 MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)
		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Tiermasse [g]	6	$261,67 \pm 13,64$	$275,0 \pm 8,37$
Relative Hodenmasse [g]	6	$0,52 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,09$
Konzentration der Spermatozoen im Hoden/Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	$40,17 \pm 3,78$	$36,67 \pm 3,01$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	$94,67 \pm 6,40$	$32,20 \pm 6,61^*$
Tote Formen (tote Spermien) [%]	6	$13,17 \pm 1,01$	$21,60 \pm 5,73$
Pathologische Formen [%]	6	$6,0 \pm 1,24$	$20,40 \pm 5,56^*$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	$3,38 \pm 0,11$	$3,53 \pm 0,18$
pH-Wert	6	$3,17 \pm 0,34$	$4,72 \pm 0,57$

Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Tabelle 4: Funktionszustand der Spermatozoen von WAG-Ratten unter der subakuten Wirkung von MTBE, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$ (30-tägige Rekonvaleszenzzeit)

Parameter	n	Retest Gruppe 2 Kontrolle ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)	Retest Gruppe 1 MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)
		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Tiermasse [g]	6	$331,67 \pm 22,46$	$312,0 \pm 23,05$
Relative Hodenmasse [g]	6	$0,75 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,12$
Konzentration der Spermatozoen im Hoden/Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	$79,17 \pm 5,48$	$49,33 \pm 3,70^*$
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen, min.	6	$81,67 \pm 6,74$	$36,83 \pm 4,71^*$
Tote Formen (tote Spermien) [%]	6	$9,0 \pm 1,90$	$48,0 \pm 3,47^*$
Pathologische Formen [%]	6	$4,67 \pm 0,84$	$39,50 \pm 4,30^*$
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	$3,25 \pm 0,17$	$3,63 \pm 0,1$
pH-Wert	6	$2,49 \pm 0,16$	$2,51 \pm 0,02$

Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Nach der 30-tägigen Rekonvaleszenzzeit nach der letzten MTBE- bzw. Aquadest-Applikation wurden die Experimente wiederholt, um die Frage der Reversibilität zu beantworten. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 bzw. 5 bis 8 dargestellt.

Die Angaben in den Tabellen 3 und 4 zeigen, dass sich während der Rekonvaleszenzzeit von 30 Tagen keine volle Wiederherstellung der Hodenfunktion bei beiden Versuchsgruppen ergab.

Doch differieren diese Wirkungen bei der Gegenüberstellung der MTBE-Gruppen unter verschiedenen Temperaturbedingungen (Tabelle 6 und 8).

In beiden Kontrollgruppen (Gruppe 2 und Gruppe 4) lagen im Retest alle untersuchten Parameter im Bereich der physiologischen Normen.

Die Prüfung des Funktionszustandes der Spermatozoen der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) nach der Rekonvaleszenz zeigte, dass sich die Gesamtzahl der

Spermatozoen im Hoden um ein 1,6-faches im Vergleich zum Test verringert und die Beweglichkeitszeit der Spermatozoen sich dagegen um ein 2,2-faches verlängert hatte. Die Beweglichkeitszeit der Spermatozoen war in der Gruppe 3 (MTBE unter Normaltemperatur) in der Test-Retest-Gegenüberstellung vergleichbar, wobei im Retest die Beweglichkeitszeit der Spermatozoen wesentlich kleiner (um das 2,9-fache) als bei der Kontrollgruppe 4 war.

Die Zahl der toten und pathologischen Formen der Spermatozoen in der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) lag bei 48,0 % bzw. 39,5 %. In der Gruppe 3 (MTBE unter Normaltemperatur) wies die Anzahl der pathologischen Formen der Spermatozoen gegenüber der Kontrolle eine Verschiebung von 13,0 % auf 20,4 % auf; die Anzahl der toten Formen der Spermatozoen veränderte sich dabei kaum. Diese Unterschiede im Test-Retest-Vergleich sind jedoch statistisch nicht signifikant.

Die morphologische Untersuchung der Hoden zeigte, dass die Versuchstiere, die der toxischen Wirkung des MTBE bei thermischer Behaglichkeit (Gruppe 3) ausgesetzt waren, im Hoden ein weites samenproduzierendes Epithel hatten. Dieses bestand aus Stammzellen, ausreifenden und sich formierenden Geschlechtszellen sowie Spermatozoen. Die Spermatozoen in den Samenkanälchen mit strukturellem Schaden waren geißellos und wiesen hyperchrome, pyknotische und deformierte Zellkerne auf. In der Abbildung 1 sind die Spermatozyten im Zustand der Dystrophie dargestellt.

Die morphologische Untersuchung der Hoden von Tieren der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) belegte, dass die Spermatozyten und Spermatozoen in den Kanälchen ebenfalls dystrophisch-degenerativ waren oder sogar fehlten. Die Degeneration der sich formierenden Zellen und Spermatozoen belegt die hohe Sensitivität dieser Zellen gegenüber dem pathogenen Faktor (MTBE).

Der Vergleich des morphofunktionellen Zustandes der Tierhoden beider Kontrollgruppen (Gruppe 2 und Gruppe 4) weist darauf hin, dass der Stressor Kälte eine Proliferation der testoste-

ronproduzierenden Leydig-Zellen mit geringer Verlangsamung der morphofunktionalen Aktivität einzelner Zellen verursachen kann. Das bestätigt auch die Verminderung der Kernfläche der Leydig-Zellen. Andere morphometrische Parameter unterscheiden sich nicht bei der Gegenüberstellung der Gruppe 3 (MTBE unter Normaltemperatur) und 4 (Kontrollen unter Normaltemperatur).

Anhand der Ergebnisse der Versuchsgruppe 3 (MTBE unter Normaltemperatur) wurde festgestellt, dass hauptsächlich die runden und ovalen Formen der Samenkanälchen locker angeordnet waren. Unter den Zellen des samenproduzierenden Epithels konnten hauptsächlich die 2. – 3. Entwicklungsstadien der Spermatogenese gefunden werden. Das 4. Stadium fehlte ebenso wie die

Tabelle 5: Funktionszustand der Spermatozoen der Kontrollgruppe im Test-Retest-Vergleich ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)

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

Tabelle 6: Funktionszustand der Spermatozoen unter der subakuten Wirkung von MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$) im Test-Retest-Vergleich

Parameter	n	Test Gruppe 3 MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)	Retest Gruppe 3 MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)
		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Tiermasse [g]	6	263,0 $\pm$ 12,0	275,0 $\pm$ 8,37
Relative Hodenmasse [g]	6	0,60 $\pm$ 0,15	0,75 $\pm$ 0,09
Konzentration der Spermatozoen im Hoden/Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	28,8 $\pm$ 4,66	36,67 $\pm$ 3,01*
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	29,4 $\pm$ 4,93	32,20 $\pm$ 6,61
Tote Formen (tote Spermien) [%]	6	29,8 $\pm$ 6,24	21,60 $\pm$ 5,73
Pathologische Formen [%]	6	13,0 $\pm$ 3,70	20,40 $\pm$ 5,56
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	3,62 $\pm$ 0,23	3,53 $\pm$ 0,18
pH-Wert	6	4,33 $\pm$ 0,67	4,72 $\pm$ 0,57
Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).			

reifen Spermatozoen in den Samenkanälchen. Das samenproduzierende Epithel war teilweise beschädigt, die Basalmembran glatt und dünn. Die Zellen auf der Basalmembran zeigten sich spärlicher ausgeprägt als die Zellen auf der Basalmembran der Kontrollgruppe. Die Sertoli-Zellen konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden und hatten eine polygonale Sternform. Die Leydig-Zel-

len im Interstitium bildeten einzelne Inselgruppen von je 5–7 Zellen, wobei die Zellen rundlich, mit eosinophilem Zytoplasma und dunklen Kernen mit großen Ansammlungen von Chromatin waren. Die Stromasklerosierung erwies sich als gering ausgeprägt.

Morphologische Untersuchungen der Rattenhoden der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) zeigten, dass deren Hoden deutli-

cher geschädigt waren. Die Samenkanälchen wiesen hauptsächlich eine rundliche Form auf. Ein Teil von ihnen lag eng beieinander, ein anderer Teil jedoch vereinzelt im Gewebe. Die Mehrzahl der Samenkanälchen stellte sich leer, ohne spermatogenes Epithel, dar. Des Weiteren zeigten sich die Zwischenräume breit und ohne Spermatogonien oder Spermatozoen sowie die Basalmembran verdickt und uneben. Die restlichen Kanälchen hatten ein intaktes oder partial intaktes samenproduzierendes Epithel. Leydig-Zellen konnten nur unterzählig und, wenn vorhanden, mit vielen absterbenden Zellen mit kleinen pyknotischen Kernen und dichtem Zytoplasma gefunden werden. Die Margination von Chromatin in den Kernen der Leydig-Zellen als Zeichen der Apoptose war zu beobachten. Lebende Zellen hatten dabei einen dunklen hyperchromatischen Kern, d.h., sie sind morphofunktional weniger aktiv.

Die morphometrischen Untersuchungen bestätigten, dass die Wirkung des MTBE auf das Reproduktionssystem unter Kältebedingungen besonders auffällig war. Beim Vergleich der morphometrischen Parameter der Tiere aus der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) und der Kontrollgruppe 2 wurde nachgewiesen, dass die Zahl der Samenkanälchen mit desquamiertem Epithel bei der Gruppe 1 um 90 % höher und der Spermatogeneseindex in dieser Gruppe deutlich kleiner war ($0,12 \pm 0,01$ vs. $3,57 \pm 0,11$; $p < 0,05$). Auf der Basalmembran der Samenkanälchen ließen sich nur wenige Spermatogonien nachweisen. Die Kernfläche der Leydig-Zellen war ebenfalls reduziert (Tabellen 9 und 10).

Der Vergleich der MTBE-Wirkung unter verschiedenen Temperatureinflüssen ergab, dass die Wirkung des MTBE unter Kältebedingungen zur Vermehrung von Samenkanälchen mit desquamiertem Epithel (bis 95 %) führt. Unter den Bedingungen der thermischen Behaglichkeit liegt diese Vermehrung nur bei 36 %. Der Einfluss von MTBE verbunden mit Kälte verursacht demzufolge eine Reduzierung des Spermatogeneseindex ($0,12 \pm 0,01$).

Unter MTBE-Wirkung bei thermischer Behaglichkeit konnte die Steige-

Tabelle 7: Funktionszustand der Spermatozoen der Kontrollgruppe im Test-Retest-Vergleich ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)

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

Tabelle 8: Funktionszustand der Spermatozoen unter der subakuten Wirkung des MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$) im Test-Retest-Vergleich

Parameter	n	Test Gruppe 1 MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)	Retest Gruppe 1 MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)
		MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Tiermasse [g]	6	315,83 $\pm$ 22,15	312,0 $\pm$ 23,05
Relative Hodenmasse [g]	6	0,96 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,12
Konzentration der Spermatozoen im Hoden/Gesamtzahl [$\times 10^6$]	6	76,18 $\pm$ 5,46	49,33 $\pm$ 3,70*
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen [min]	6	11,17 $\pm$ 2,91	36,83 $\pm$ 4,71*
Tote Formen (tote Spermien) [%]	6	38,4 $\pm$ 6,96	48,0 $\pm$ 3,47*
Pathologische Formen [%]	6	13,0 $\pm$ 2,39	39,50 $\pm$ 4,30*
Osmotische Resistenz [% NaCl]	6	5,13 $\pm$ 0,2	3,63 $\pm$ 0,1*
pH-Wert	6	3,06 $\pm$ 0,24	2,51 $\pm$ 0,02*
Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).			

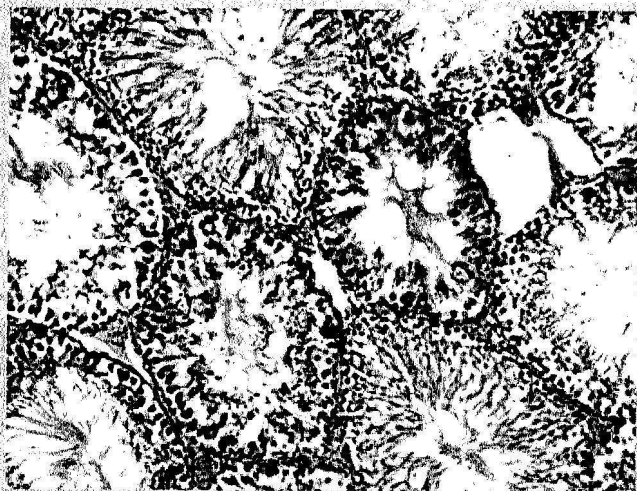


Abbildung 1: Wirkung des MTBE unter Bedingungen der thermischen Behaglichkeit: Geißellose Spermatozoen der Samenkanälchen und Teilung der dystrophisch-degenerativen Spermatozyten. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

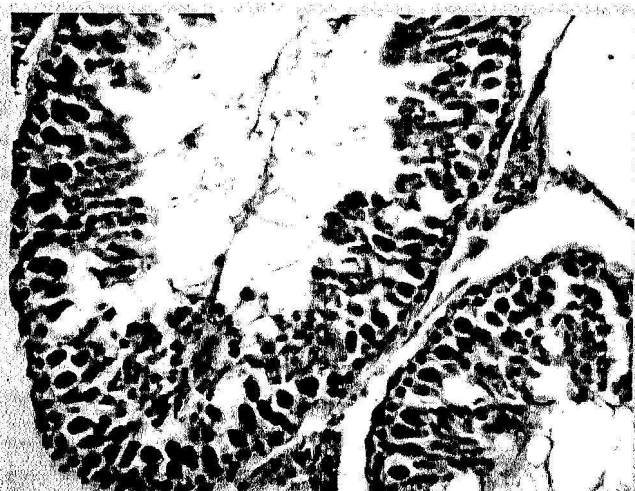


Abbildung 2: Wirkung des MTBE in Kombination mit Kälte: Spermatozoenmangel in Kanälchen und dystrophisch-degenerative Spermatozyten. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

rung des Spermatogeneseindex um drei Stadien der Spermatogonienentwicklung beobachtet werden. Die Wirkung des MTBE in Kombination mit Kälte verursacht somit eine bedeutend höhere Reduzierung der Spermatogonienzahl auf der Basalmembran der Samenkanälchen als eine thermische Behaglichkeit ($30,05 \pm 3,54$ vs. $39,60 \pm 2,76$). Ebenso war unter Kältebedingungen eine Reduzierung der Kernfläche der Leydig-Zellen zu beobachten, was für eine verminderte Testosteronproduktion spricht.

Im Retest konnte nachgewiesen werden, dass alle Effekte (analysierte morphometrische Parameter) bei der Gruppe 3 (MTBE und thermische Behaglichkeit) reversibel waren. Die Untersuchung der Ratten der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) zeigte, dass ihre Samenkanälchen spärlich mit großem Zwischenraum aufgestellt waren und hauptsächlich eine ovale Form boten. Hierbei erwies sich die Basalmembran als nicht eben und vereinzelt dünn. Die Spermatogonien waren selten geordnet und der Spermatogeneseprozess unterdrückt. Es wurde beobachtet, dass die Zahl aller Zellarten des samenproduzierenden Epithels in den Samenkanälchen vermindert war. Die Zellen boten eine lockere Anordnung bei eingengter Wachstumszone und in den Samenkanälchen fand sich oft ein desquamier-

tes Epithel. Die Sertoli-Zellen waren einzeln und hatten hauptsächlich eine rechteckige Form. Weiterhin hatten die Leydig-Zellen in der Gonadenstroma eine polygonale Form und waren intensiv gefärbt. Sie formierten Inselgruppen, aber ihre Gesamtzahl bei der Gruppe 1 (MTBE und Kälte) lag deutlich unter der der Kontrollgruppe 2. Zudem fanden sich hier Zellen mit pyknotischen Kernen. Demzufolge verursachte die 30-malige MTBE-Exposition unter Kältebedingungen ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$) bei Ratten ausgeprägte toxische Effekte auf die Hoden.

Der Retest der Gruppe 3 (MTBE und thermische Behaglichkeit) zeigte eine absolute kompensatorische Wiederherstellung der Hodenstruktur, was unter

Kältebedingungen (Gruppe 1) nur partiell beobachtet wurde.

Zum Schluss der Untersuchung der gonadentoxischen Wirkung des MTBE unter Kältebedingungen wurde eine statistische Bearbeitung durchgeführt, um die gemeinsamen und einzelnen Effekte beider Faktoren (MTBE und Kälte) zu beschreiben. Dem schloss sich eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Tabelle 11) an, um somit auf Kalkulationen des empirischen Determinationskoeffizienten zurückgreifen zu können.

Es wurde gezeigt, dass der Einfluss auf die Beweglichkeitszeit der Spermatozoen bei isolierter Wirkung von MTBE und Kälte mit der Wichtung der Toxizität beider Faktoren zusammenhängt. Dabei liegt der Einwirkungsanteil

Tabelle 9: Zusammenfassung: die Morphometrie der Hoden unter Wirkung von MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)

Parameter	Untersuchung	Gruppe 4 Kontrolle ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)	Gruppe 3 MTBE ($t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$)
Samenkanälchen mit desquamiertem Epithel [%]	Test	$3,88 \pm 0,65$	$35,94 \pm 1,05^*$
	Retest	$3,32 \pm 0,22$	$3,37 \pm 0,5$
Spermatogeneseindex	Test	$3,76 \pm 0,17$	$2,75 \pm 0,20^*$
	Retest	$3,83 \pm 0,23$	$3,52 \pm 0,05$
Spermatogonienzahl in Samenkanälchen [%]	Test	$83,43 \pm 8,81$	$39,60 \pm 2,76^*$
	Retest	$83,00 \pm 4,32$	$75,60 \pm 1,79^*$

Bemerkung: * signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Tabelle 10: Zusammenfassung: die Morphometrie der Hoden unter Wirkung von MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)

Parameter	Untersuchung	Gruppe 2 Kontrolle ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)	Gruppe 1 MTBE ($t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$)
Samenkanälchen mit desquamiertem Epithel [%]	Test	4,54 $\pm$ 0,39	94,67 $\pm$ 1,32*
	Retest	6,53 $\pm$ 0,22	37,27 $\pm$ 10,2*
Spermatogeneseindex	Test	3,57 $\pm$ 0,11	0,12 $\pm$ 0,01*
	Retest	3,75 $\pm$ 0,05	1,64 $\pm$ 0,66*
Spermatogonienzahl in Samenkanälchen [%]	Test	74,26 $\pm$ 0,56	30,05 $\pm$ 3,54*
	Retest	67,58 $\pm$ 2,63	40,23 $\pm$ 11,6*

Bemerkung: * – signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

des Faktors „Temperatur“ bei 89 % und der des chemischen Faktors bei 28 %. Bei der kombinierten Wirkung sinkt der Einwirkungsanteil des Faktors „Temperatur“ auf 42 % und der chemische Faktor bleibt auf dem Niveau von 28 %. Berücksichtigt man den Parameter Faktorenvereinigung bei kombinierter Wirkung, der den Grad der Verstärkung der Toxizität bei gleichzeitiger Wirkung beider Faktoren widerspiegelt und der 25 % beträgt, zeigt sich, dass der additive Effekt von MTBE und Kälte dann bei 95 % liegt.

Der Anteil der Einzelwirkung von MTBE, der Wirkung von MTBE bei der Faktorenvereinigung sowie des additiven Effekts liegt bei dem Parameter der toten Spermienformen bei 28 %. Dieses Ergebnis spricht für eine führende Rolle des Schadstoffes MTBE.

Zusammenfassung

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser experimentellen Untersuchung die gonadentoxische Wirkung von MTBE sowohl unter Bedingungen der thermischen Behaglichkeit als auch unter dem Stressor Kälte nach. Männliche Gonaden kann man als Zielorgan

für eine toxische Wirkung von MTBE betrachten. Außerdem verursacht MTBE in Kombination mit reduzierter Temperatur größere Störungen des Funktionszustands der Spermatozoen. Insbesondere gilt das für den Funktionszustand der Spermatozoen: Die Reversibilitätseffekte waren hier sehr gering. Die Kombinationswirkung von MTBE und Kälte verursacht deutliche Effekte und Verschiebungen außerhalb der physiologischen Norm von Parametern wie z.B. der Beweglichkeitszeit der Spermatozoen sowie der Zahl der toten und pathologischen Formen.

Die Ergebnisse der abschließenden statistischen Analyse zur Beurteilung der gonadentoxischen Wirkung von MTBE bei reduzierter Temperatur einzeln bzw. in Kombination beider Faktoren belegen, dass die gonadentoxische Wirkung von MTBE bei gleichzeitiger Exposition von Kälte verstärkt wird. Diese Wirkung ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Anzahl von toten Formen und die Verminderung der Beweglichkeitszeit der Spermatozoen.

Ob diese Ergebnisse im Zusammenhang mit einer Exposition am Arbeitsplatz eins zu eins auf den menschlichen

Organismus übertragbar sind, ist noch unbekannt. Die Übertragung der Tiermodelle z.B. bei Toxizität bzw. Karzinogenität auf den Menschen wird diskutiert (Borghoff et al. 2010). In der Literatur werden zwar Veränderungen der Hoden bei Ratten beschrieben, jedoch nicht bei Mäusen. MTBE wird im Körper zu Tertiärbutylalkohol (TBA) und Formaldehyd umgewandelt. Belegt ist, dass dieser Metabolismus bei Ratten und Menschen ähnlich ist (Nihlén et al. 1998; Amberg et al. 1999). Trotzdem gibt es einige Unterschiede. Metabolite wie 2-methyl-1,2-propanediol und 2-hydroxyisobuttersäure im Urin und TBA im Blut findet man sowohl bei Ratten als auch bei Menschen, der Urinmetabolit TBA wurde jedoch nur bei Menschen identifiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MTBE-Exposition unter Kältebedingungen eine Ausschöpfung der kompensatorischen Reserven und den Beginn der Dekompensationsphase zeigt, was u.a. durch die Veränderungen des Funktionszustands der Spermatozoen zu erklären wäre.

Literaturverzeichnis

- Afanasjeva RF, Burmistrova OB (2001) Kholodowoi stress i ego profilaktika. Meditsina truda i promyshlennaya ekologija 8: 10–15
- Afanasjeva RF, Burmistrova OB, Bobrov AF (2006) Kholod, kriterii otsenki i prognosirovanie riska okhlazhdeniya tscheloveka. Bjulleten WSNZ SO RAMN 3(49): 13–18
- Amberg A, Rosner E, Dekant W (1999) Bio-transformation and kinetics of excretion of methyl-tert-butyl ether in rats and humans. Toxicol. Sci. 51: 1–8
- Aut B, Bünger J, Krah J, Dutz M, Müller M, Hallier E (2003) Reduktion der Toxizität von Ottomotorenremissionen durch additivierte Kraftstoffe. Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 38(3): 136
- Azhaev AN (1979) Fiziologo-gigienitscheskie aspekty deistwiya vysokikh i nizkikh temperatur. Band 38. Moskwa, Nauka

Tabelle 11: Einwirkungsanteil des MTBE und reduzierter Temperatur auf Funktionszustandsparameter der Spermatozoen von Ratten unter der subakuten Wirkung [%]

Parameter	Einzelwirkung des MTBE	Einzelwirkung $t (4 \pm 2^\circ\text{C})$	Wirkung des MTBE bei der Faktorenvereinigung	Temperaturwirkung bei der Faktorenvereinigung	Faktoren- vereinigung	Σ Effekt
Beweglichkeitszeit der Spermatozoen	28	89	28	42	25	95
Tote Formen (tote Spermien)	58	–	58	–	–	58

- Biradar SA, Bhovi VK, Bodke YD, Bhavanishankar R (2009) A novel method for the synthesis of 6-bromo-2-(3,4-dichlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine using microwave irradiation. *Molbank* 1: 587
- Bondarenko TI, Kritschewskaya AA, Scheikina IW, Kirjukhina EW (1990) Wliyanie peptida delta-sna na sodержanie adrenalina w tkanyakh krysa w norme i pri deistwii kholodowogo stressa. *Ukr. Bikhim. zhurn.* 62(5): 34–38
- Borghoff SJ, Parkinson H, Leavens TL (2010) Physiologically based pharmacokinetic rat model for methyl tertiary-butyl ether; comparison of selected dose metrics following various MTBE exposure scenarios used for toxicity and carcinogenicity evaluation. *Toxicology* 275 (1–3): 79–91
- Bux K (2006) Klima am Arbeitsplatz. Stand arbeitswissenschaftlicher Erkenntnisse – Bedarfsanalyse für weitere Forschungen. Forschung, Projekt F 1987 BAuA, Dortmund, Berlin, Dresden
- Chang KH, Chen CH (2009) MTBE concentration profiles near MTBE manufacturing plant: Modeling approach and modeling uncertainty. *Chemosphere* 75(10): 1322–1328
- Collins KJ (1998) Cold stress and cardiovascular reactions. Problems with cold work. Ed. by I. Holmer, K. Kuklane. *Arbetslivsinstitutet* 18: 166–171
- Danilow AM (2009) Prisdaki k topliwam i maslam w Rossii. *Wisnik NAU* 1: 99–103
- de Peyster A, Rodriguez Y, Shuto R, Goldberg B, Gonzales F, Pu X, Klaunig JE (2008) Effect of oral methyl-*t*-butyl ether (MTBE) on the male mouse reproductive tract and oxidative stress in liver. *Reproductive Toxicology* 26(3–4): 246–253
- Empfehlung der EU-Kommission vom 7. November 2001 über die Ergebnisse der Risikobewertung und über die Risikobegrenzungsstrategien für die Stoffe: Acrylaldehyd; Dimethylsulfat; Nonylphenol; Phenol, 4-Nonyl-, verzweigt; tert-Butylmethylether. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 319/30 vom 4.12.2001
- 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, Maslenikova LS, Olyanskaya RP, Trubitsina GA (1973) O nekotorykh parametrokh kislorodnogo obmena w organosme i tkanjakh u zhiwotnykh pri adaptatsii k kholodu. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR im. I.M. Setshenowa* LIX, 11: 1742–1749
- Kolb A, Puttmann W (2006a) Methyl tert-butyl ether (MTBE) in finished drinking water in Germany. *Environmental Pollution* 140: 294–303
- Kolb A, Puttmann W (2006b) Methyl tert-butyl ether (MTBE) in snow samples in Germany. *Atmos Environ* 40: 76–86
- Kucharenko NC, Nowoselowa AA (2009) Korektsiya khronicheskogo kholodowogo stressa u krysa probioticheskimi preparatami. *Westnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 7: 110–112
- Kulikov WJu, Semenjuk AW, Kolesnikowa LI (1988) Pereksnoe okislenie lipidow i kholodowoi faktor. Nowosibirsk, Nauka, Sib. Otdelenie
- Kundiev JuI, Navakatikyan AO, Kalnisch WW (1993) Sowremennye problemy kombinirowanogo deistwiya na organism proiswostwennykh i sozialno-bytowych faktorow (obsor literatury). *Wratshebnoe delo* 5–6: 35–41
- Kurenkow DW, Budarkow WA, Gontscharenko EN (2009) Effektivnost primeneniya ferrotsina u krysa pri ostrykh stressornykh wosdeistwiyakh. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya* 49(1): 85–89
- Kustow WW, Tiunow WW, Wasiljew GA (1975) Kombinirowannoje Deistwie promyschlennykh yadow. Moskwa, Meditsina
- Li D, Liu Q, Gong Y, Huang Y, Han X (2009) Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with Methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure. *Reproductive Toxicology* 27(2): 170–176
- Li D, Yin D, Han X (2006) Methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat spermatogenic cells. *J Appl Tox* 27(1): 10–17
- Li D, Yuan C, Gong Y, Huang Y, Han X (2008) The effects of methyl tert-butyl ether (MTBE) on the male rat reproductive system. *Food and Chemical Toxicology* 46(7): 2402–2408
- Lomteva NA (2008) Wliyanie stadii estralnogo tsikla na protsessy swobodnoradikalnogo okisleniya samok krysa pri wosdeistwii stressinduksijskikh faktorow. *Problemy reproduksii* 6: 12–15
- Maistrakh EW (1975) Patologicheskaya fiziologiya okhlazhdeniya tscheloveka. Leningrad, Meditsina
- MAK- und BAT-Werte-Liste (2000) Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG, Mitteilung 36, Wiley-VCH, Weinheim
- MEF (2001) Risk Assessment of Tert-butyl methyl ether, EINECS-No.: 216–653–1, carried out in accordance with Council Regulation (EEC) 793/93 on the evaluation and control of the risk of existing substances. Ministry of the Environment Finland, Final Draft 06/2001
- Mitschuk NE (2006) Kholodowaya bolesn (gipotermiya). *Meditsina neotlozhnykh sostoyanii* 4(5): 20–28
- Mohr SN, Fiedler N, Weisel C, Kelly-McNeil K (1994) Health Effects of MTBE Among New Jersey Garage Workers. *Inhalation Toxicology* 6(6): 553–562
- 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
- Nihlén A, Löf A, Johanson G (1998) Experimental exposure to methyl tertiary-butyl ether: II. Acute effects in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148(2): 281–287
- Pahlke G, Leonhardt H, Tappe M (2000) Umweltbelastungen durch die Nutzung von MTBE (Methyl-tertiär buthylether) als Kraftstoffzusatz in Deutschland und Westeuropa. *Erdöl Erdgas Kohle* 116(10): 498–504
- Perepetschaeva ML, Sodorowa Ju A, Grischanova A Ju (2006) Wliyanie kholodowogo stressa na ekspressiju genow AHR-sawisimogo puti regulatsii CYP1 w petscheni krysa. *Bulleten eksperimentalnoi biologii i meditsiny* 141(3): 287–291
- Phillips S, Palmer R, Brody A (2008) Epidemiology, toxicokinetics, and health effects of methyl tert-butyl ether (MTBE). *J Med Toxicol* 4 (2): 115–126
- Piven NW, Pewsner LS (1972) Wliyanie kholodowogo stressa na sodержanie RNK w motoneuronakh spinnogo mosga i ikh glialnykh kletkakh-satellitakh. *Doklady Akademii nauk SSSR*, Band 206(1): 250–253
- Richtlinie 2004/73/EG Der Kommission vom 29. April 2004 zur neunundzwanzigsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt. Unter dem Internet-Link <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:216:0003:0310:DE:PDF>. Letzter Zugriff am 06.08.2012
- Sanotskii IW, Fomenko WN, Salnikowa LS et al. (1978) Metody eksperimentalnogo issledowaniya po ustanowleniju porogow deistwiya promyschlennykh yadow na generatiwnuju funktsiju s tselju gigenicheskogo normirovaniya. *Metodicheskije ukasaniya*. Moskwa, NII GT i PS AMN SSSR
- Selye H (1973) The evolution of the stress concept. *Am Sci* 61(6): 23–24
- Soldak II, Maksimovitsch WA, Brjukhanova ST (2006) Powyschenie fiziologicheskoi ustoiwchivosti promyschlennykh rabotschikh k kholodu. *Westnik gigeny i epidemiologii* 10(1): 144–145
- Solodkova OA, Karedina WS, Senkina WG (2008) Soderzhanie lipidow w kore nadpotschetschnikow pri kholodowom wosdeistwii. *Uspekhi sowremennogo estestwosnaniya* 9: 5
- Tschatschschin WP, Dedenko II (1990) Trud i sdorowje tscheloveka na sewere. Murmansk.
- UMEG 2002: Abschlussbericht zur Messung von MTBE in Mannheim/Heidelberg von Mai 2001 bis Juni 2002. Bericht-Nr.: 31–19/2002
- Vandecasteele J-P (2008) Petroleum Microbiology. Editions Technip, Paris
- Vavilova TP, Mitronin AW, Ostrowskaya IG, Gawerowa JuG (2009) Reaktsiya sosudow pulpy subow krysa na emotsionaln-kholodowoi stress. *Endodontiya Today* 1: 30–33
- WHO (1998) Environmental Health Criteria 206 Methyl Tertiary-Butyl Ether, Genf
- Yavorskii OP, Paustowskij JuO (2008) osobliwosti umow pratsi ta stanu sdorowja robotnikiw, sainyatikh wigotowlennjam ta sastosuwannjam metiltretbutilowogo efiru na NPS. *Dowkillja sdorowja* 3(46): 60–63
- Zavgorodnij IB, Worontsow MP, Batschinskij RO (2006) Do pitannja pro spolutshenu diju khimitschnykh tschinnikiw ta kholodowogo stressu (analititschnii ogyad literatury). *Ukrainskii zhurnal s problem meditsini pratsi* 3(7): 65–70
- Zavgorodnij IW, Myasoedow WW, Batschinskij RO, Iwanenko TO, Wekschin WO (2009) Patent № 39237 UA, MPK B01L 1/00, B01L 5/00. Charkiwsckii natsionalnii meditschnii universitet. – S. № u200812926; Sayawl. 06.11.2008; Opubl. 10.02.2009; Büll. № 3. Satrawotschna kamera.