

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Wirkungen von Linezolid, Levofloxacin und Moxifloxacin
auf die Sertoli-Zelllinie SerW₃**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Agnes Föst

aus Lübbecke

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Stahlmann
 2. Prof. Dr. med. B. Drewelow
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Th. Schulz

Datum der Promotion: 18.11.2011

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Testes	1
1.1.1 Sertoli-Zellen	1
1.1.2 Sertoli-Zelllinie SerW ₃	4
1.1.3 Blut-Hoden-Schranke	5
1.2 Charakteristische Proteine	7
1.2.1 Occludin	7
1.2.2 Connexin 43	7
1.2.3 N-Cadherin	9
1.2.4 β_1 -Integrine	9
1.2.5 Vimentin	11
1.3 Arzneistoffe mit antibakterieller Wirkung	11
1.3.1 Chinolone	11
1.3.1.1 Levofloxacin	16
1.3.1.2 Moxifloxacin	17
1.3.2 Oxazolidinone	18
1.3.2.1 Linezolid	18
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Antikörper für Western Blot Analyse und Immunhistologie	27
2.2 Medien	28

Inhaltsverzeichnis	IV
2.2.1 Zellkulturmedium	28
2.2.2 Einfriermedium	28
2.3 Lösungen und Puffer	28
2.3.1 Lösungen und Puffer für Western Blot Analyse	28
2.4 Methoden	32
2.4.1 Zellpassage	32
2.4.2 Einfrieren von SerW ₃ -Zellen	32
2.4.3 Auftauen von SerW ₃ -Zellen	33
2.4.4 Bestimmung der Zellzahl	33
2.4.5 Inkubation mit den Testsubstanzen	34
2.4.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse zur Proteindetektion	35
2.4.7 Vorbereitung für Western Blot Analyse	35
2.4.7.1 Lysieren	35
2.4.7.2 Gesamtproteinbestimmung	36
2.4.7.3 Reduktion	36
2.4.7.4 SDS-Gelelektrophorese	37
2.4.7.5 Western Blot Analyse	37
2.4.8 Densitometrische Auswertung	38
2.4.9 Verfahren der Immunhistochemie	38
2.4.9.1 Cytospin	38
2.4.9.2 Immunhistochemie	39
2.4.9.3 Fotografie und semiquantitative Auswertung	39
2.4.10 Elektronenmikroskopie	40
3 ERGEBNISSE	41
3.1 Lichtmikroskopie	41
3.2 Elektronenmikroskopie	42
3.3 Immunhistologie	43
3.3.1 Linezolid	44
3.3.2 Moxifloxacin	51

Inhaltsverzeichnis	V
3.3.3 Levofloxacin	58
3.4 Western Blot Analyse	65
4 DISKUSSION	78
4.1 Linezolid-induzierte Effekte auf die Reproduktionsorgane	78
4.2 Effekte anderer Oxazolidinone auf den Testis	81
4.3 Chinolon-induzierte Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane	83
4.4 Effekte anderer Antibiotika auf die männlichen Reproduktionsorgane	86
4.5 Effekte anderer Medikamente auf die männlichen Reproduktionsorgane	88
4.6 Ausblick	90
5 ZUSAMMENFASSUNG	91
6 LITERATURVERZEICHNIS	93
7 DANKSAGUNG	101
8 ERKLÄRUNG	102
9 LEBENSLAUF	103
10 VERÖFFENTLICHUNGEN	104

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Androgen-bindendes Protein
AIDA	Advanced Image Data Analyser
AJ	adherens junction
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CYP	Cytochrom P
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	dots per inch (Punkte pro Zoll)
EM	Transmissionselektronenmikroskop
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK 1/2	extrazelluläre Signal-regulierende Kinase
ES	ektoplasmatische Spezialisierung
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fetales Kälberserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
GI	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
ILK	Integrin-linked Kinase
INR	International normalized Ratio
JAM	junctional adhesion molecules
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LH	luteinisierendes Hormon
µm	Mikrometer

µl	Mikroliter
M	Mol
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SCSGF	Sertoli cell secreted growth factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Simian Virus
TBC	tubulobulbarer Komplex
TGF	Transforming Growth Faktor
TNF	Tumornekrose-Faktor
TJ	tight junction
V	Volt
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

1 Einleitung

1.1 Testes

Die Testes sind der Ort der Spermiogenese und Syntheseort verschiedener Hormone. Sie werden durch Bindegewebsstränge, die von der Kapsel in die Tiefe ziehen, in ca. 250 Läppchen, den Lobuli testis, unterteilt. Zwischen diesen Läppchen liegt das interstitielle Bindegewebe, in das die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen eingebettet sind. Jedes Lobuli testis enthält ein bis vier Tubuli seminiferi, die Samenkanälchen, die als funktionelle Einheit des Hodens anzusehen sind (Cheng und Mruk, 2002). In ihnen liegt das Keimepithel, das sich aus zwei Zelltypen zusammensetzt. Zum einen die Sertoli-Zellen, die das Grundgerüst der Samenkanälchen bilden und auf die im nächsten Kapitel ausführlich eingegangen wird und die Spermien, die in unterschiedlichen Reifegraden im Epithel zu finden sind. Dabei liegen die Vorläuferzellen, die Spermatogonien, in der Nähe der Basalmembran und durchwandern während ihres Reifungsprozesses das Epithel. Die reifen Spermien werden am Ende der Entwicklung in das Lumen der Tubuli seminiferi abgegeben und zur Speicherung in den Nebenhoden transportiert. Die Spermatogenese wird in drei Stufen unterteilt: die erste ist die Spermatozytogenese, bei der die primären Spermatozyten durch mitotische Teilung aus den Spermatogonien entstehen. Im zweiten Schritt treten die Spermatozyten in die Meiose ein, die sie zweimal durchlaufen. Aus ihnen gehen die Spermatiden mit haploidem Chromosomensatz hervor. Es findet eine Zelldifferenzierung statt, die Spermiogenese, in der aus den runden Spermatiden die reifen Spermatozoen werden. Zuletzt werden die Spermien aus dem Keimepithel in das Tubuluslumen freigesetzt, was als Spermiation bezeichnet wird (Hermo et al., 2010a).

Zum Schutz der heranreifenden Spermien bilden die Sertoli-Zellen die Blut-Hoden-Schranke, die die Spermien während ihrer Reifung überwinden müssen (Junqueira und Carneiro, 2005). Auf die Bedeutung der Blut-Hoden-Schranke wird weiter unten ausführlich eingegangen.

1.1.1 Sertoli-Zellen

Die Sertoli-Zellen verdanken ihren Namen ihrem Entdecker, dem italienischen Physiologen Enrico Sertoli, der sie 1865 zum ersten Mal beschrieben hat. Sie liegen in den Tubuli seminiferi des Hodens auf der Basalmembran und durchziehen das gesamte Keimepithel bis zum Lumen des Tubulus. Die Sertoli-Zellen sind nur bis zu der Pubertät teilungsfähig, so dass geschädigte und abgestorbene Zellen im Erwachsenenalter nicht wieder ersetzt werden können

(Monsees et al., 2000). Das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) der Hypophyse steigert die Proliferationsrate, während das Schilddrüsenhormon die Phase, in der die Proliferation stattfindet, beeinflusst (Sharpe et al., 2003; Griswold, 1998).

Die Sertoli-Zellen sind ca. 70 μm groß und haben einen großen gelappten Zellkern mit auffälligem Nukleolus. Sie machen 35-40 % des Keimepithelvolumens aus und erfüllen zahlreiche Aufgaben im Hoden, wobei besonders der Schutz und die Ernährung der ausreifenden Keimzellen hervor zu heben sind. Daher werden die Sertoli-Zellen oft auch als Ammenzellen bezeichnet. Die Stützfunktion für die Keimzellen zeigt sich in den zahlreichen Ausläufern und Taschen ihrer Zellkörper, in denen die heranreifenden Samenzellen liegen und in Richtung Tubuluslumen wandern. Ein Sekret der Sertoli-Zellen sorgt dafür, dass die Spermien in das Lumen der Tubuli seminiferi gespült werden (Junqueira und Carneiro, 2005). Aber auch die Keimzellen haben Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Sertoli-Zellen. Durch ihren Einfluß verändern sich das Zytoskelett und der Phosphorylierungszustand und damit die Aktivität verschiedener Proteine in den Sertoli-Zellen (Herms et al., 2010a).

Jede Sertoli-Zelle hat Kontakt zu einer konstanten Zahl an Keimzellen, so dass die Anzahl der heranreifenden Spermien von der Anzahl der Sertoli-Zellen limitiert wird. Diese Zahl ist für jede Spezies spezifisch. Verringert sich die Zahl der Ammenzellen werden weniger reife Spermien an das Tubuluslumen abgegeben und die Unfruchtbarkeit kann die Folge sein (Cheng und Mruk, 2002; Monsees et al., 2000; Hess und Franca, 2005). Als Energielieferant stellen sie für die heranreifenden Keimzellen Pyruvat/Laktat zur Verfügung. Ohne diese Stoffwechselprodukte können die Samenzellen nicht heranwachsen, da sie selbst nicht in der Lage sind, Glucose zu verstoffwechseln (Griswold et al., 1995). Eine andere wichtige Aufgabe der Sertoli-Zellen ist die Regulierung des Stofftransportes in die Hodenkanälchen, indem sie eine Blut-Hoden-Schranke ausbilden. Der gesamte Stofftransport des Keimepithels erfolgt transzellulär durch die Zellkörper der Sertoli-Zellen. Untereinander sind sie durch verschiedene Arten von Zellkontakten miteinander verbunden. Die *tight junctions* (TJ) beschränken den Stofftransport sowohl untereinander als auch zu den Keimzellen. Weiterhin kommt ihnen eine sog. „*fence*“-Funktion zu, bei der eine freie Beweglichkeit und Verschieblichkeit der Membrankomponenten zueinander unterbunden wird.

Durch die Blut-Hoden-Schranke werden die Sertoli-Zellen in ein basales und ein apikales Kompartiment geteilt. Im basalen liegen die frühen Entwicklungsstufen der Spermatogenese, die Spermatogonien und die primären Spermatozyten. Während der weiteren Entwicklung müssen die Zellen die Blut-Hoden-Schranke überwinden, um in das luminale Kompartiment

und zum Tubuluslumen zu gelangen. Im apikalen Kompartiment entsteht durch spezifische Produkte der Sertoli-Zellen eine besondere und lebenswichtige Umgebung für die Keimzellen. Durch ihre phagozytierenden Eigenschaften können die Sertoli-Zellen die bei der Entwicklung der Keimzellen entstehenden Residualkörper, aber auch fehl entwickelte Samenzellen entfernen (Junqueira und Carneiro, 2005).

Die Sertoli-Zellen haben viel glattes Endoplasmatisches Retikulum (ER) und eine große Zahl an Mitochondrien. Beides sind Merkmale für eine große Syntheseleistung (Hess und Franca, 2005). Sie produzieren eine große Zahl an Glykoproteinen: zum einen Transportproteine, die in großer Menge sezerniert werden, wie die Metalltransportproteine Transferrin und Coeruloplasmin. Die zweite Gruppe sind Proteasen und Proteaseinhibitoren, die für den Gewebumbau bei der Durchwanderung der heranreifenden Spermien in das luminale Kompartiment notwendig sind. Die dritte Gruppe der Glykoproteine ist am Aufbau der Basalmembran zwischen den Sertoli-Zellen und den peritubulären Zellen beteiligt. Weiterhin werden parakrine und Wachstumsfaktoren sezerniert, u.a. das Anti-Müller-Hormon und Inhibin, durch das die Sertoli-Zellen in der Lage sind, die Produktion vom Follikel-stimulierenden Hormon (FSH) in der Hypophyse im Sinne einer negativen Rückkopplung zu hemmen (Griswold, 1995; Griswold, 1998). Das Androgen-bindende Protein (ABP) sorgt für eine Anreicherung des männlichen Sexualhormons Testosteron im Tubulus, das für die Entwicklung der Keimzellen unerlässlich ist (Junqueira und Carneiro, 2005).

1.1.2 Sertoli-Zelllinie SerW₃

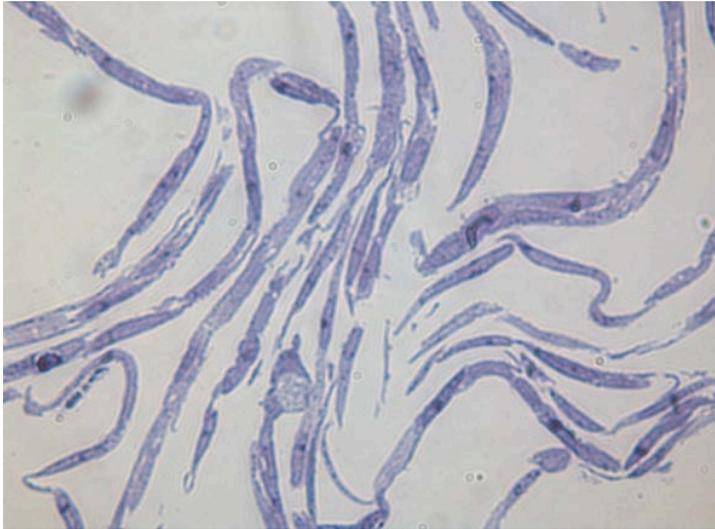


Abbildung 1: SerW₃-Zellen im Lichtmikroskop, Vergrößerung x 100: Die Zellen liegen in dichten Verbänden mit langgestreckten Zellkörpern, die Zellzwischenräume sind eng. Die Zellkerne sind länglich mit gut erkennbaren Nukleoli.

Die Sertoli-Zelllinie SerW₃ wurde aus Zellen von 17 Tage alten Wistar-Ratten gewonnen und mit SV 40 large-T Antigen (Simian Virus) immortalisiert. Sie lassen sich in einem Kulturmedium mit 5 % FCS bei 35°C im Brutschrank unter sterilen Bedingungen kultivieren. Nach 22 Stunden haben sich die Zellen verdoppelt. Die SerW₃-Zellen weisen viele typische morphologische und funktionelle Charakteristika von Sertoli-Zellen auf, wie z.B. Phagozytose, Cisplatin-Sensitivität und Transferrin-Sekretion. Ihre Zellkörper sind länglich und bilden Ausläufer, auch der Nukleus weist strukturelle Charakteristika der Sertoli-Zellen auf. Die ebenfalls starke Stoffwechselaktivität zeigt sich in der Sekretion von ABP (Androgen-bindendes Protein) und SCSGF (*Sertoli cell secreted growth factor*). Ihnen fehlen aber die Rezeptoren für FSH und LH, wodurch sie nicht unter der Kontrolle von Hypophysenhormonen stehen. Als strukturelle Gemeinsamkeit bilden die SerW₃ wie die Sertoli-Zellen im Hoden *tight junctions* aus, die ein wesentlicher Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke sind. Dadurch ergibt sich wie in den Sertoli-Zellen eine basale-apikale Orientierung ihres Zytoplasmas. Alle diese Eigenschaften machen die Zelllinie SerW₃ für toxikologische *in vitro*-Studien und präklinische Versuche in der Medikamententestung geeignet, da eine Schädigung ihrer Proteine ein erster Hinweis auf reproduktionsschädigende Eigenschaften von Stoffen sein kann (Pognan et al., 1997; Hess und Franca, 2005).

1.1.3 Blut-Hoden-Schranke

Die Aufgabe der Blut-Hoden-Schranke ist es, die heranreifenden Spermien vor schädlichen Einflüssen zu schützen. Besonders wichtig ist der Schutz vor körpereigenen immunologischen Zellen, die mit dem Blut in den Hoden transportiert werden und die Keimzellen höherer Entwicklungsstufen angreifen würden. Die Blut-Hoden-Schranke ist ein Zusammenspiel aus mehreren Faktoren. Die Barriere besteht aus der Kapillarwand, den *tight junctions* zwischen den Sertoli-Zellen und einer Schicht aus Myoepithelzellen um den Tubulus (Bart et al., 2002). Die Myoepithelzellen sind kontraktile Zellen, die sich an die Basalmembran anschließen. Ihre Zellkörper sind lang gestreckt, überlappen sich und bilden eine partielle Barriere zum Schutz des Keimepithels (Dym und Fawcett, 1970). Durch die Blut-Hoden-Schranke werden die Sertoli-Zellen in ein basales und ein apikales Kompartiment geteilt. Die Keimzellen in der Frühphase ihrer Entwicklung, die Spermatogonien und die primären Spermatozyten, liegen im basalen Kompartiment und müssen während ihrer weiteren Entwicklung die Blut-Hoden-Schranke überwinden, um zur Ausreifung und Vollendung der Meiose in das apikale Kompartiment und zum Lumen des Tubulus zu gelangen. Dies gelingt ihnen aber nur im Stadium der preleptotenen und leptotenen Spermatozyte. Für diese Zellen besteht eine partielle Durchlässigkeit der Blut-Hoden-Schranke (Wong et al., 2005).

Die Blut-Hoden-Schranke in Säugetieren setzt sich aus vier Komponenten zusammen, den *tight junctions* (TJ) oder auch Zonula occludens, der basalen *ektoplasmic spezialization* (ES), dem basalen tubulobulbaren Komplex (TBC) und der *desmosom-like junction*. Die ES und TBC sind hodenspezifische auf Aktin basierende *adherens junctions* (AJ) (Wong und Cheng, 2005). Die ES bestehen aus Bündeln von parallel angeordneten, hexagonalen Aktinfilamenten, die zwischen der Sertolizellmembran und den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums liegen. Diese Bündel sind auf beiden Seiten der TJ in den gegenüberliegenden Sertoli-Zellen, bzw. zwischen Sertoli- und Keimzelle zu finden (Parreira et al., 2002; Salanova et al., 1998; Vogl et al., 2000). Die ES kann in einen basalen und apikalen Teil gegliedert werden. Die Funktion des apikalen Teils besteht darin, die vorzeitige Abgabe noch unreifer Samenzellen in das Tubuluslumen zu verhindern. Die ES verankert die sich entwickelnden Spermien und mit diesen Ankern ist die Sertoli-Zelle in der Lage, die Spermien aus tiefen Spalten zu mobilisieren und sie Richtung Tubuluslumen und durch die TJ zu bewegen (Hess und Franca, 2005; Wong und Cheng, 2005). Der basale Teil der ES steht zu den frühen Keimzellen in Kontakt und ist am Aufbau der Blut-Hoden-Schranke beteiligt (Mruk et al., 2008).

Der tubulobulbare Komplex (TBC) ist eine besondere Plasmamembranspezialisierung, der eine dünne tubuläre Vertiefung des Zytoplasmas der Sertoli-Zellen und auf Seite der benachbarten Keimzellen einen Vorsprung bildet. Der Komplex hilft, die Samenzellen an die Sertoli-Zellen zu binden, überschüssiges Zytoplasma der Spermatiden zu eliminieren und den ES zu regenerieren. Das ist für den Um- und Wiederaufbau der Sertoli-Zell-Barriere notwendig und Voraussetzung für die Spermiation. Eine Zerstörung des TBC hat eine abnormale Entwicklung der Spermien zur Folge (Hess und Franca, 2005). Die *desmosom-like junctions* vereinigen ultrastrukturelle Bestandteile aus Desmosomen und *gap junctions*. Sie liegen zwischen benachbarten Sertoli-Zellen oder zwischen Sertoli- und Keimzelle und zeigen Verdichtungen des Zytoplasmas an den korrespondierenden Stellen. Ihre Funktion und Regulation in der Blut-Hoden-Schranke ist noch nicht geklärt und zur Zeit Gegenstand vieler Untersuchungen (Russell et al., 1977; Li et al., 2009).

Die *tight junctions* (TJ) oder *Zonula occludens* im Hoden als bekanntester Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke weisen einige Besonderheiten im Gegensatz zu TJ in anderen Geweben auf. Sie werden erst mit der Pubertät ausgebildet, wenn die Entwicklung der Keimzellen einsetzt und diese vor dem körpereigenen Immunsystem geschützt werden müssen. Durch diese immunologische Barriere haben sie keinen Kontakt zum Blutkreislauf. Auch die Lage und Architektur der TJ im Hoden ist einzigartig, da sie in der Nähe der Basalmembran zu finden sind, während sie in anderen Geweben, z.B. im Darm, lumennah liegen. Eine weitere Besonderheit ist die partielle Durchlässigkeit für die heranreifenden Spermatozyten (Cheng und Mruk, 2002; Griswold, 1995).

In den TJ verbinden sich integrale Proteine der gegenüberliegenden Sertoli-Zellen im Extrazellulärraum und dichten diesen ab. An dem Aufbau sind drei Proteine beteiligt, *Zonula occludens*, Claudin und Occludin, auf das später eingegangen werden soll. Die TJ haben zusätzlich Kontakt zu den intrazellulären Aktinfilamenten (Karp et al., 2005).

Die Durchlässigkeit der Blut-Hoden-Schranke wird durch zwei Zytokine, dem *transforming growth factor-β3* (TGF-β3) und dem Tumornekrose-Faktor α (TNF α) über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) reguliert. Diese Zytokine bestimmen die Homöostase der Proteine der TJ und der ES, von Proteasen, Proteaseinhibitoren und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix im Epithel der Tubuli seminiferi, z.B. Kollagen (Wong und Cheng, 2005).

Auf molekularer Ebene besteht die Blut-Hoden-Schranke aus folgenden drei Proteinhauptklassen: integralen Membranproteinen, peripheren Adaptorproteinen und Zytoskelettprotei-

nen. Die extrazellulären Domänen der integralen Membranproteine, die in benachbarten Sertoli-Zellen in der Nähe der basolateralen Region des Epithels zu finden sind, dichten den Interzellularspalt ab, indem sie eine ineinandergreifende Struktur durch Protein-Protein-Interaktionen bilden. Die zytoplasmatische Domäne ist über Adaptorproteine mit dem darunter liegenden Zytoskelett verbunden. Drei Gruppen von TJ-assoziierten Transmembranproteinen sind bekannt: die Gruppen der Claudine, *junctional adhesion molecules* (JAM) und Occludine, auf die weiter unten näher eingegangen wird, und zwei Gruppen von AJ-Transmembranproteinen, Nectin und Cadherine, die ebenfalls später näher erläutert werden (Wong und Cheng, 2005).

1.2 Charakteristische Proteine

In dieser Doktorarbeit sind fünf verschiedene Antikörper zum Einsatz gekommen. Der Nachweis von Veränderungen der entsprechenden Proteine kann einen Hinweis auf die Schädigung der verschiedenen Strukturen in den Zellen und den verschiedenen Zellkontakten geben.

1.2.1 Occludin

Occludin ist ein Bestandteil der TJ mit einem Molekulargewicht von 65 kD, das 1993 entdeckt wurde. Es besitzt vier transmembrane Domänen und zwei extrazelluläre Loops. Die N- und C-terminalen Enden liegen im Zytosol und sind reich an den Aminosäuren Tyrosin und Glycin. Das zytosolische C-terminale Ende korrespondiert mit ZO-1, was ebenfalls ein Bestandteil der TJ ist und Occludin mit den zytosolischen Aktinfilamenten verbindet. Bisher sind fünf verschiedene Occludine bekannt, die in zwei Aktivitätszuständen vorliegen. Dabei scheint die phosphorylierte Form die aktivierte zu sein, die durch die Proteinkinase C phosphoryliert wurde (Balda und Matter, 1998; Fanning et al., 1999; Mitic et al., 1998; Mitic et al., 2000).

1.2.2 Connexin 43

Connexine sind eine Gruppe von Transportmolekülen, die beim Stoffaustausch zwischen den Zellen eine große Rolle spielen. Sie werden nach ihrer Molekularmasse bezeichnet, das in dieser Doktorarbeit verwendete Connexin 43 hat also ein Molekulargewicht von 43 kD. Con-

Connexin 43 ist das am meisten produzierte *gap junction*-Protein des Hodens. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen, denen dieses Protein fehlt, die Unfruchtbarkeit resultiert (Hess und Franca, 2005). Die Connexine bestehen aus vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen. Sechs Connexine lagern sich zusammen und bilden ein sog. Connexon, das eine Pore in der Mitte frei lässt, sich im Interzellularspalt mit einem Connexon der benachbarten Zelle zusammenlagert und so einen Kanal bildet. Dabei können sich die Halbkanaäle sowohl homotypisch, aus gleichen Connexonen, als auch heterotypisch, aus unterschiedlichen Connexonen zusammenlagern, was aber ihre Durchlässigkeit beeinflusst. Dadurch kommt es zu einem direkten Stoffaustausch zwischen den benachbarten Zellen von bis zu 1000 Dalton schweren geladenen und ungeladenen Molekülen. Sowohl Wasser, Glukose, Aminosäuren, als auch Transmitter und Nukleotide, wie cAMP, können mittels Diffusion frei passieren und ggf. mehrere Zellen stimulieren. Durch die Connexone werden die Zellen nicht nur metabolisch sondern auch elektrisch gekoppelt und Aktionspotentiale in Nervenzellen können schnell weitergeleitet werden. *Gap junctions* sind außerdem an der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt und spielen in der Embryologie eine große Rolle. Sie können innerhalb von wenigen Sekunden auf- und wieder abgebaut werden. Der Abstand zwischen den Zellmembranen verringert sich im Bereich der *gap junctions* von 20-30 nm auf 2-4 nm. Die Connexone liegen dicht beieinander und bilden sog. Plaques. Die *gap junctions* unterscheiden sich in ihrem Aufbau von anderen Kanalsystemen der Zellen, weil sie von beiden gegenüberliegenden Zellen gebildet werden und das Zellinnere miteinander verbinden. Normalerweise sind sie in Ruhe geöffnet. Ist die Nachbarzelle aber geschädigt, was sich z.B. durch eine hohe Ca^{2+} -Konzentration oder einen niedrigen pH-Wert bemerkbar macht, werden die Connexone schnell geschlossen, damit es nicht zu einer Schädigung weiterer Zellen kommt und sich der Defekt ungehindert ausbreiten kann. Connexin 43 bildet im Hoden *gap junctions* im Bereich der Blut-Hoden-Schranke und ist das einzige Connexin, das von den Leydig-Zellen gebildet wird. Es ist sowohl zwischen Sertoli-Zellen, als auch zwischen Sertoli- und Keimzellen zu finden. Die Bildung der Connexin 43 wird sowohl von FSH als auch von den Schilddrüsenhormonen gefördert (Herms et al., 2010b). Neuere Forschungen lassen vermuten, dass Connexin 43 auch eine große Rolle bei der Hodenentwicklung und bei der Spermatogenese spielt (Lablack et al., 1998; Pointis und Segretain, 2005; Pointis et al., 2010).

1.2.3 N-Cadherin

Die Cadherine gehören in die Gruppe der Adhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*-CAM). Es sind transmembrane Glykoproteine, die Ca^{2+} -abhängig Signale vom Extrazellularraum in das Zytoplasma übermitteln. Sie sind weit verbreitet und beim Menschen sind über 180 verschiedene Cadherine bekannt. Sie finden sich in Desmosomen und *adherens junctions*. Desmosomen oder Macula adhaerens sind scheibenförmige Verbindungen zwischen zwei Zellen, die besonderer mechanischer Belastung ausgesetzt sind. Die Zellmembran weist auf der Innenseite plattenförmige Beläge auf, die aus intrazellulären Filamenten bestehen. Die Cadherine der Desmosomen haben einen etwas anderen Aufbau als die klassischen Cadherine der Adhäsionsmoleküle und werden daher auch als Desmogleine und Desmocolline bezeichnet. Sie durchziehen den interzellulären Spalt, verbinden sich mit entsprechenden Cadherinen der gegenüberliegenden Zelle und dienen der transmembranen Signalübermittlung. Auf der intrazellulären Seite sind sie über spezielle Ankerproteine, den Cateninen, mit den Intermediärfilamenten verbunden. Diese Bindung ist Ca^{2+} -abhängig. Beim Fehlen von Ca^{2+} ist das Cadherin inaktiv und anfällig für Proteolyse. Die *adherens junctions* liegen in Epithelgeweben häufig in unmittelbarer Nachbarschaft von TJ. In ihnen verbinden sich Cadherine über Ankerproteine wie Catenin oder Vinculin mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Durch die Cadherine werden Aktinfilamente vieler Zellen miteinander verbunden und bilden ein Netzwerk. Cadherine haben mehrere extrazelluläre Domänen mit repetitiven Aminosäuresequenzen, auf Grund derer sie in verschiedene Untergruppen geteilt werden. Das in dieser Dissertation untersuchte Neural-(N)-Cadherin wurde 1982 entdeckt und hat ein Molekulargewicht von 130 kD. Es gehört zur Gruppe der klassischen Cadherine, die aus fünf extrazellulären Domänen aufgebaut sind. Zwischen diesen Domänen liegen die Bindungsstellen für Ca^{2+} , ohne das keine Bindung mit dem Cadherin der gegenüberliegenden Zellen möglich wäre. Die Bindung ist homophil, d.h. ein Cadherin kann sich nur mit einem Cadherin der gleichen Gruppe verbinden (Alberts et al., 2002; Cheng und Mruk, 2002; Junqueira und Carneiro, 2005; Hermo et al., 2010b; Hess und Franca, 2005).

1.2.4 β_1 -Integrine

Die Gruppe der Integrine sind Heterodimere mit vielen Isoformen. Sie setzen sich aus einer α - und einer β -Glykoproteinkette zusammen, die beide die Zellmembran durchziehen. In den

hier beschriebenen Experimenten wurden die β_1 -Integrine untersucht, weil sie die am meisten exprimierten im Hoden sind.

Die extrazelluläre Komponente der β_1 -Integrine ist ein transmembraner Rezeptor, der spezifische Aminosäuregruppen von extrazellulären Matrixproteinen bindet. Dabei vermittelt er Signale sowohl nach intra- als auch nach extrazellulär. Durch die Bindung an den Rezeptor wird ein Signal in das Innere der Zelle geschickt, auf der anderen Seite können bestimmte Bedingungen im Zellinneren das Bindungsverhalten der β_1 -Integrine beeinflussen. Deshalb sind sie in der Lage nicht nur mechanische und molekulare Signale zu empfangen, sondern auch ein Signal in ein anderes zu überführen. Die intrazelluläre Komponente bindet unter Vermittlung von verschiedenen Proteinen, z.B. Talin, an die Aktinfilamente des Zytoskeletts.

β_1 -Integrine kommen vor allem in fokalen Adhäsionen und Hemidesmosomen vor. Die fokalen Adhäsionen sind begrenzte Bereiche, in denen die Zellen über das Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbunden sind (Löffler und Petrides, 2007). Es sind verankernde Zellverbindungen, die über Tyrosinkinase der Signaltransduktion dienen. Außerdem fungieren sie als Mechanorezeptoren, die einem dynamischen Auf- und Abbau unterliegen. Hemidesmosomen verbinden die Zelle mit der Basalmembran. Darüber hinaus haben sie Verbindung zu den Intermediärfilamenten. Im Gegensatz zu den Desmosomen mit den Cadherinen dienen hier die Integrine als Adhäsionsproteine. Die Zelle wird über die extrazelluläre Komponente an das Laminin der Basalmembran gebunden und über die intrazelluläre an die Keratinfilamente (Alberts et al., 2005).

β_1 -Integrine sind ein bekannter Bestandteil vom ES. Sie werden außerdem von Keimzellen auf ihrer Oberfläche exprimiert (Salanova et al., 1995). In Experimenten konnte die Bedeutung von β_1 -Integrinen für die Keimzellmigration in Mäusen nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigte, dass bei einem Verlust von β_1 -Integrinen sich die Zahl der Samenzellen verringert (Alberts et al., 2005; Wong et al., 2004). Verschiedene regulatorische Kinasen sind an der Regulation der Bindung von β_1 -Integrinen und der Adhäsion beteiligt. Im Hoden sind das vor allem die *Integrin-linked Kinase* (ILK) und die fokale Adhäsionskinase (FAK). Sie regulieren die Bindung von β_1 -Integrinen zu den heranreifenden Spermien (Bearsley et al., 2006; Siu et al., 2003).

1.2.5 Vimentin

Vimentin ist ein Typ 3 Intermediärfilament, das sich im Zytoplasma aller Zellen mesenchymalen Ursprungs befindet. Es besteht aus einem Monomer mit zentraler α -Helix. Zwei Monomere verdrillen sich zum Dimer und wiederum zwei Dimere zum Tetramer. Vimentin ist Bestandteil des Zytoskeletts und hat ein Molekulargewicht von 57 kD. Es ist mit dem Nukleus, den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum verbunden und verankert die Zellorganellen an ihren Plätzen im Zytoplasma. Über Ankyrin ist das Intermediärfilament mit der Zellmembran verbunden. Vimentin dient als Tumormarker für Gewebe mesenchymalen Ursprungs und wird daher als Verlaufsparemeter für Sarkome genutzt. In den Sertoli-Zellen ist es als ein Band um den Nukleus und im basalen Zytoplasma zu finden. Vimentinbündel ragen aus den Sertoli-Zellen zu den heranreifenden elongierten Spermatozoen (Fuchs und Weber, 1994; Richburg und Boekelheide, 1996; Hess und Franca, 2005).

1.3 Arzneistoffe mit antibakterieller Wirkung

Der Schotte Alexander Fleming entdeckte 1928 durch Zufall das Penicillin aus dem Pilz *Penicillium notatum*, das eine antibakterielle Aktivität zeigte. Als zweite Substanz wurde 1943 das Streptomycin entdeckt. Inzwischen existieren mehrere Tausend verschiedene Antibiotika. Ein zunehmendes Problem ist die Resistenzentwicklung vieler Bakterien und der damit steigende Bedarf an neuen Wirkstoffgruppen.

Die Chinolone und Oxazolidinone sind im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Antibiotika vollsynthetische antibakterielle Wirkstoffe, die im klinischen Alltag praktisch wie Antibiotika angewandt werden.

1.3.1 Chinolone

Die Chinolone sind eine große Gruppe von vollsynthetischen antibakteriellen Substanzen, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zum Einsatz kommen. Die Nalixidinsäure wurde 1962 als Nebenprodukt bei der Suche nach Malariamitteln als Ursprungssubstanz der Chinolone entwickelt. Ihr Einsatz war durch ein enges Erregerspektrum, niedrige Serumspiegel und auf Grund der Nebenwirkungen beschränkt. 1980 gewann die Nalixidinsäure in der Behandlung von Diarrhöen und Harnwegsinfektionen wieder an Bedeutung, weil die verursachenden Shigellen und *Escherichia coli* resistent gegen die sonst eingesetzten Antibiotika

wurden. Das war der Beginn der Weiterentwicklung der Chinolone. Durch Austausch von Substituentengruppen konnte man Einfluß auf Wirkung und Nebenwirkung nehmen. So erhöht ein Halogenatom in Position 8 die Wirkung gegen Anaerobier, wird aber auch für die Phototoxizität der entsprechenden Chinolone verantwortlich gemacht (Petersen, 2001). Es folgte eine verbesserte Resorption und Gewebegängigkeit, womit sich auch das Anwendungsspektrum erweiterte.

Die Weiterentwicklung der Chinolone hält bis heute an, um neue Antibiotika gegen inzwischen resistent gewordene Keime zu finden (Van Bambeke et al., 2005; Stahlmann und Lode, 2005).

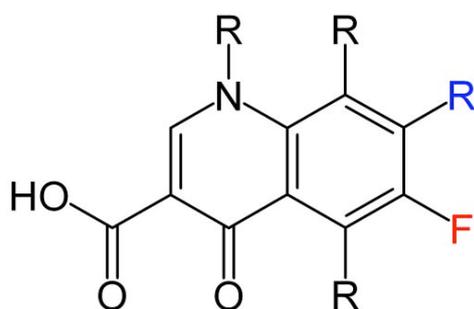


Abbildung 2: Grundgerüst der Chinolone

Das Fluoratom (F) an Position 6 führt zu einem Anstieg der antibakteriellen Wirkung, der Rest (R) in Position 7 beeinflusst die Pharmakokinetik und das antibakterielle Spektrum

Chemisch gesehen sind die Chinolone Chinoloncarbonsäuren oder Aza-Analoga. Sie sind gut gewebe- und liquorgängig. Alle heute üblichen Chinolone sind in Position 6 fluoriert und werden daher auch als Fluorchinolone bezeichnet. Sie können in vier Gruppen unterteilt werden (Tabelle 1). Die Chinolone der 1. Gruppe (Norfloxacin) sind gegen gramnegative Bakterien nur schwach wirksam. Ein weiteres Problem ist die schnelle Resistenzentwicklung und die schlechte Resorption nach oraler Gabe. In der 2. Gruppe (Ciprofloxacin) ist die Aktivität im gramnegativen Bereich verstärkt und auf *Pseudomonas aeruginosa* ausgedehnt. Die Resorption nach oraler Gabe und die Gewebegängigkeit erweitern den Einsatzbereich auch auf systemische Infektionen. Chinolone der Gruppen 3 und 4 sind sowohl gegen grampositive Erreger, einschließlich Makrolid- und β -Lactam-resistente Pneumokokken, als auch gegen gramnegative, Anaerobier und atypische Bakterien wirksam (Domagala, 1994; Stahlmann und Lode, 2005; Van Bambeke et al., 2005).

Einen Überblick über die Einteilung der Chinolone bietet die folgende Tabelle:

Gruppe	Wirkspektrum	Indikation	Vertreter
I	schwach gramnegativ	unkomplizierte Harnwegsinfektionen	Norfloxacin
II	gramnegativ	Harnwegsinfektionen, GI-, nosokomiale und systemische Infektionen	Ciprofloxacin
III	gramnegativ, grampositiv, atypische Erreger	Atemwegs-, Haut-, Weichteilinfektionen, komplizierte Harnwegsinfektionen	Levofloxacin
IV	gramnegativ, grampositiv, Anaerobier, atypische Erreger	Atemwegsinfektionen, akute Sinusitis, Pneumonie	Moxifloxacin

Tabelle 1: Gruppen der Fluorchinolone nach einer Einteilung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (1998)

Wirkmechanismus

Wie die alte Bezeichnung der Chinolone als „Gyrasehemmer“ schon andeutet, wirken die Chinolone über Hemmung der bakteriellen Topoisomerasen II, auch als DNA-Gyrase bezeichnet, und IV. Beide sind für das regelrechte Wachstum der Bakterien von essentieller Bedeutung. Die Topoisomerase II setzt sich aus jeweils zwei A- und B-Untereinheiten zusammen und bildet ein Tetramer. Da die bakterielle DNA ungefähr 1000 mal länger ist als das Bakterium selbst, muß sie räumlich günstig und kompakt gefaltet werden, aber für Ablesevorgänge während der Replikation und Translation wieder zur Verfügung stehen. Die Topoisomerase faltet die DNA zu Schleifen, die dann zusätzlich noch einmal verdrillt werden, „*supercoiling*“ genannt.

Die A-Untereinheit, die ATP-unabhängig arbeitet, teilt die DNA in Fragmente durch Trennung des Doppelstrangs. Die Enden werden verknüpft, nachdem die B-Untereinheit ATP-abhängig die Spannung aus den Fragmenten genommen hat.

Die Topoisomerase IV ist ebenfalls als Tetramer aufgebaut und trennt die beiden DNA-Stränge, die nach der Replikation entstanden sind, ebenfalls durch Doppelstrangbrüche. Die Wirkung der Chinolone besteht in einer Hemmung der Topoisomerasen, indem sie, nachdem sie in das Bakterium gelangt sind, an dem DNA-Topoisomerase-Komplex binden und das erneute Supercoiling nach der Entdrillung der DNA verhindern. Daraus ergibt sich eine bakterizide Wirkung der Chinolone (Aradottir und Yogev, 1999; Stahlmann und Lode, 2005).

Pharmakokinetik

Die Chinolone sind nach oraler Gabe gut resorbierbar und haben ein hohes Verteilungsvolumen. Es ist eine orale und intravenöse Behandlung möglich. Damit sind sie gut gewebeängig und auch für Infektionen in schlecht durchbluteten Geweben wie Knochen geeignet. Auch intrazelluläre Infektionen können mit Chinolonen behandelt werden. Das Verteilungsvolumen liegt bei etwa 2 l/kg für alle Fluorchinolone.

Die Elimination der Chinolone ist sehr unterschiedlich. Die Ausscheidung über die Nieren liegt zwischen 20 % bei Moxifloxacin bis zu > 80 % bei Levofloxacin. Die Löslichkeit der Chinolone ist vom pH-Wert abhängig.

Wechselwirkungen

Die Chinolone gehen als Chelatbildner mit zwei- und dreiwertigen Metallionen, wie Aluminium, Calcium und Magnesium, Komplexe ein. Deshalb kann die gleichzeitige Gabe von Antazida zu einer bis zu 90 % verminderten Bioverfügbarkeit führen (Stahlmann und Lode, 2005). Durch die Chinolone Enoxacin und Ciprofloxacin wird das Enzym CYP1A2 der Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen in der Leber gehemmt, was zu einem verminderten Abbau von in der Leber metabolisierter Stoffe und Medikamente, z.B. Coffein und Theophyllin, führt.

Bei der Kombination mit steroidal und nicht-steroidal Antiphlogistika muß eine verstärkte Krampfneigung vor allem bei Gabe von Enoxacin durch Hemmung der GABA-Rezeptoren beachtet werden.

Eine Überwachung des Digoxinspiegels ist bei gleichzeitiger Einnahme von einigen Chinolonen ratsam, da es zu einer Erhöhung des Plasmaspiegels kommen kann. Auch die Wirkung von Warfarin kann beeinflusst werden. Die gerinnungshemmende Wirkung wird verstärkt und es können Blutungen auftreten. Aus diesem Grund sollten bei den mit Chinolonen behandelten Patienten regelmäßige INR-Kontrollen durchgeführt werden.

Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Bei der Behandlung mit Chinolonen treten bei 4 bis 20 % der Patienten unerwünschte Wirkungen auf. Dabei kommt es am häufigsten zu Magen-Darm-Beschwerden mit Übelkeit, Erbrechen und Durchfällen. Das Ausmaß ist dosisabhängig. Die pseudomembranöse Kolitis tritt bei Einnahme von Chinolonen relativ selten auf (Stahlmann und Lode, 2010).

Eine weitere Gruppe von unerwünschten Reaktionen ist an der Haut zu beobachten. Dabei kann ein Erythem oder Pruritus auftreten. Nach direkter Sonneneinstrahlung sind auch phototoxische Effekte möglich, die in ihrem Ausmaß von der chemischen Struktur des Chinolons abhängen. Befindet sich an Position 8 ein Halogenatom sind die Effekte stärker, als wenn eine Methoxygruppe an dieser Stelle zu finden ist. Entsprechende Derivate sind daher heute nicht mehr im Handel (Van Bambeke et al., 2005).

Durch die gute Gewebegängigkeit sind auch Einflüsse auf das ZNS zu beobachten. Sie reichen von Kopfschmerzen, Müdigkeit und Benommenheit bis zu Krampfanfällen, Halluzinationen und Depressionen. Dieser Effekt kann durch zusätzliche Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika verstärkt werden. Deshalb sind Chinolone für Patienten mit zentraler Krampfneigung kontraindiziert.

Seit langem ist aus Tierversuchen auch der Einfluß der Chinolone auf den juvenilen Gelenkknorpel bekannt. Die Chinolone bilden mit Magnesium Chelatkomplexe und es entsteht ein funktioneller Mangel an Magnesium im Gewebe. Aus diesen Beobachtungen wurde die Empfehlung abgeleitet, schwangere und stillende Frauen, Kinder und Jugendliche nicht mit Chinolonen zu behandeln. Bei der Auswertung von Patientendaten gab es ebenfalls Hinweise auf Achillessehnenrupturen und Tendinitis. Solche Tendopathien wurden vor allem bei Patienten mit folgenden Risikofaktoren beobachtet: Lebensalter über 60 Jahre, gleichzeitige Einnahme von Glukokortikoiden, chronische Nierenerkrankung (Stahlmann und Lode, 2010).

Nach intravenöser Applikation der Chinolone kann eine Tachykardie und ein Blutdruckabfall beobachtet werden. Einige Chinolone können unter ungünstigen Bedingungen dosisabhängig eine QTc-Verlängerung und Torsade de Pointes bewirken. Deshalb ist die parallele Gabe von

Chinolonen und Antiarrhythmika der Klasse IA und III kontraindiziert. Wegen schwerer kardiotoxischer Effekte wurde das Chinolon Grepafloxacin vom Markt genommen.

Weiter sind auch Anstiege der Transaminasen beobachtet worden, beim Anstieg um das Fünffache sollten Chinolone nicht weiter verabreicht werden. Als seltene Nebenwirkung können Blutbildveränderungen, wie Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie, auftreten (Stahlmann und Lode, 2000; Stahlmann und Lode, 2005; Lode, 2010).

Die beiden Chinolone Levo- und Moxifloxacin wurden im Rahmen dieser Dissertation untersucht, weil sie in verschiedenen Studien Effekte auf den Testis gezeigt haben. Das Enantiomer des Levofloxacin, Ofloxacin, zeigte in einigen Studien Wirkungen auf die Testisfunktion bei Ratten (Riecke und Stahlmann, 2000; El-Harouny et al., 2009; Abd-Allah et al., 2000a; Itoh et al., 2005).

1.3.1.1 Levofloxacin



Abbildung 3: Strukturformel von Levofloxacin

Levofloxacin ist das antibakteriell wirksame (-)-Enantiomer von Ofloxacin und damit doppelt so wirksam wie Ofloxacin. Nach oraler Gabe wird es gut resorbiert und ist zu fast 100 % bioverfügbar. Eine gleichzeitige Nahrungsaufnahme hemmt die Resorptionsgeschwindigkeit. Die Halbwertszeit beträgt 4 bis 6 Stunden. Es kann in Dosierungen von 200 bis 500 mg ein- bis zweimal täglich oral oder intravenös verabreicht werden und kann gegen Infektionen der Haut- und Weichteile, Atem- und Harnwege eingesetzt werden.

Die Plasmaeiweißbindung liegt bei 30-40 %. Der maximale Plasmaspiegel wird nach einer Stunde erreicht. Bei Gabe von 500 mg Levofloxacin oral wird eine maximale Plasmakonzentration von ca. 6 mg/l erreicht (Lubasch et al., 2000), nach Gabe von 750 mg intravenös liegen die Spitzenspiegel bei ca. 12 mg/l (Anderson und Perry, 2008).

Die Elimination erfolgt sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Gabe zu mehr als 85 % über die Nieren. Es wird nur in geringem Maß metabolisiert, die Metaboliten machen nur 5 % der Abbauprodukte im Urin aus. Eine Dosisanpassung bei eingeschränkter Nierenfunktion ist erforderlich.

Levofloxacin hatte in präklinischen Tierversuchen an Ratten bei human therapeutisch relevanten Dosierungen keinen Effekt auf Fertilität und Reproduktion. Es konnte auch keine Teratogenität festgestellt werden (Fachinformation Tavanic, Sanofi-Aventis, 2009).

1.3.1.2 Moxifloxacin

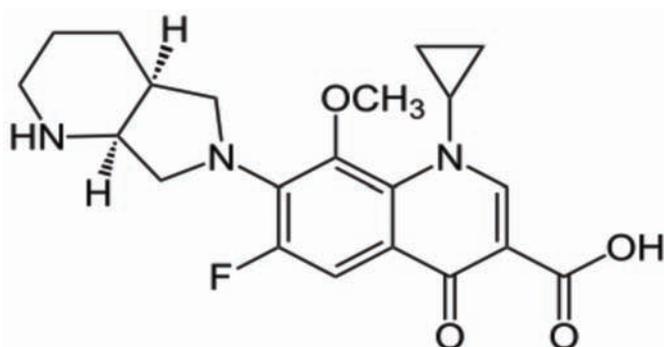


Abbildung 4: Strukturformel von Moxifloxacin

Moxifloxacin gehört nach der Einteilung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft in die 4. Gruppe der Chinolone. Durch Einfügen zyklischer Aminosubstituenten an der Position 7 wurde eine verbesserte Wirkung gegen grampositive Erreger erreicht. Moxifloxacin ist gut gegen grampositive Bakterien, wie Staphylo-, Strepto-, Pneumo- und Enterokokken, gramnegative und atypische Erreger wirksam. Es wird gegen Atemwegsinfektionen, wie ambulant erworbene Pneumonien, exazerbierte COPD und komplizierte Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt (Miravittles und Anzueto, 2008).

Nach oraler Gabe wird es zu über 90 % resorbiert und erreicht nach einer intravenösen Applikation von 400 mg Plasmawerte von ca. 4 mg/l nach 0,5 bis 4 Stunden. Es liegt zu über 40 % an Proteinen gebunden vor, v.a. an Serumalbumin. Mit einer Halbwertszeit von 13 Stunden erfolgt die Elimination zu 40 % renal und zu 60 % hepatisch. Es entstehen zwei Hauptmetabolite, eine Sulfoverbindung und ein Glucuronid, die beide mikrobiologisch inaktiv sind. 96 % des Moxifloxacins werden als Muttersubstanz und seine Hauptmetaboliten über Urin und

Fäzes ausgeschieden (Barman Balfour und Wisemann, 1999; Lubasch et al., 2000; Kruse und Stahlmann, 2006; Fachinformation Avalox, Bayer Schering Pharma, 2010).

Bei Patienten mit leicht eingeschränkter Nierenfunktion oder Dialysepatienten muß keine Dosisanpassung vorgenommen werden. Unter der Behandlung von Moxifloxacin kam es in sehr seltenen Fällen zu einer fulminanten Hepatitis. Obwohl der Kausalzusammenhang mit dem Arzneimittel nicht immer eindeutig war, leitet sich daraus die Empfehlung ab, Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion (Child-Pugh C) und einem Transaminasenanstieg um mehr als das Fünffache nicht mit Moxifloxacin zu behandeln. Auch schwere bullöse Hautreaktionen wie Stevens-Johnson-Syndrom sind aufgetreten und führten zu einem Abbruch der Behandlung (Fachinformation Avalox, Bayer Vital GmbH, 2008; Van Bambeke und Tulkens, 2009).

1.3.2 Oxazolidinone

Die Oxazolidinone sind eine relativ neue Gruppe an vollständig synthetisch hergestellten Antibiotika. Sie sind ursprünglich für den Einsatz gegen bakterielle und Pilzkrankungen von Pflanzen in der Landwirtschaft entwickelt worden. Bereits 1978 wurden die Oxazolidinone in einem US-Patent für Du Pont de Nemours beschrieben. 1987 wurde diese neue Wirkstoffgruppe dann in der Humanmedizin eingeführt. Die Entwicklung der zuerst verwendeten zwei Substanzen wurde auf Grund ihrer schlechten Verträglichkeit nicht weiter verfolgt. Im Jahr 2000 wurde das Linezolid als erstes in der Anwendung für den Menschen zugelassene Oxazolidinon in den USA auf den Markt gebracht. 2001 erhielt Linezolid, unter dem Handelsnamen Zyvoxid die Zulassung in Deutschland und damit war nach 30 Jahren erstmals eine völlig neue Klasse von Arzneistoffen zur antibakteriellen Therapie verfügbar (v. Eiff, 2002).

1.3.2.1 Linezolid

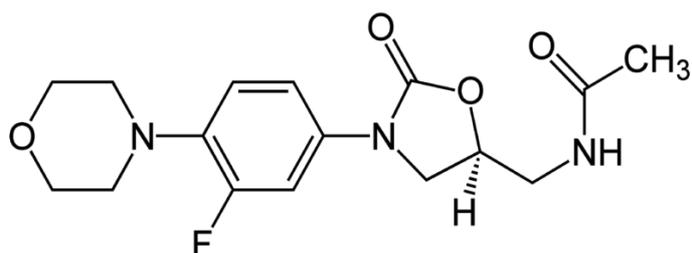


Abbildung 5: Strukturformel von Linezolid

In den letzten Jahren hat die Anzahl an Pneumonien, besonders die der nosokomialen stark zugenommen. Das liegt unter anderem an der großen Zahl älterer und immunsupprimierter Patienten. Ein weiteres großes Problem ist die stetig zunehmende Zahl oft multiresistenter Keime. Linezolid ist ein sehr effektives Antibiotikum, das gegen grampositive Bakterien eingesetzt werden kann. Gramnegative Bakterien sind resistent gegen Linezolid, da sie über Pumpen verfügen, die Linezolid aus der Zelle entfernen. *Bacteroides* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Pasteurella* spp. und *Haemophilus influenzae* werden erst in Konzentrationen ab 4-16 mg/l beeinflusst und können damit als resistent eingestuft werden. Seine wichtigsten Anwendungsgebiete sind die ambulant erworbenen und nosokomialen Pneumonien. Dabei wirkt es überwiegend bakteriostatisch gegen Enterokokken, Staphylokokken und Streptokokken in Konzentrationen von unter 4 mg/l. Auch gegen Haut- und Weichteilinfektionen kann es eingesetzt werden, wenn die Infektion durch grampositive Bakterien verursacht wurde. Die durchschnittliche Behandlungsdauer liegt bei zehn bis 14 Tagen (Diekema und Jones, 2000).

Gegen multiresistente Keime wie Methicillin-resistente Staphylokokken (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und Penicillin- und Erythromycin-resistente Streptokokken ist Linezolid ebenfalls sehr gut wirksam. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Behandlung von Tuberkulose, die durch das oft multiresistente *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird (Diekema und Jones, 2001). Ein weiterer Vorteil des Linezolid ist, dass es sowohl intravenös als auch oral verabreicht werden kann und sich damit die stationäre Behandlungszeit verkürzen lässt. Leider traten bereits die ersten Resistenzen gegen das Oxazolidinon auf (Clemett und Markham, 2000; Norrby, 2001; v. Eiff, 2002).

Wirkmechanismus

Linezolid hemmt wie viele andere Antibiotika die Proteinbiosynthese der Bakterien. Die Proteinbiosynthese gliedert sich in mehrere Stufen. Als erstes entsteht der Initiationskomplex, in dem sich die 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms mit Hilfe der Initiationsfaktoren an die mRNA bindet und die erste Formylmethionin-tRNA mit einschließt. Zur Vervollständigung des Ribosoms lagert sich noch die 50S-Untereinheit an. Linezolid bindet spezifisch an die 23S-rRNA der 50S-Untereinheit und verhindert die Entstehung des 70S-Initiationskomplexes (Chiappini et al., 2010). Damit greift es schon am Anfang der Proteinbiosynthese ein, im Gegensatz zu Chloramphenicol, Makroliden, Lincosaminen und Tetracyclinen, die alle die mRNA-Translation zulassen und erst die Elongation behindern. Dadurch bietet Linezolid zwei Vorteile: zum einen verhindert es die Synthese virulenter Faktoren der

Strepto- und Staphylokokken bereits im Ansatz, zum anderen behindert es nicht die Wirkung anderer Antibiotika, da es an einem anderen Punkt angreift und es damit nicht zu Kreuzresistenzen kommt (Livermore, 2003).

Pharmakokinetik

Da Linezolid zu 100 % bioverfügbar ist, kann das Medikament oral oder intravenös appliziert werden. Das ist ein großer Vorteil, da so die Hospitalisierungszeit verkürzt wird und so die Gefahr von nosokomialen Infektionen reduziert werden kann. Dabei wird nach ein bis zwei Stunden die maximale Plasmakonzentration erreicht, die nach Gabe von 600 mg Linezolid alle zwölf Stunden 21 mg/l beträgt. Die Talkonzentration liegt bei 6 mg/l bei einer Halbwertszeit von fünf bis sieben Stunden. Das Ausmaß der Resorption wird durch eine parallele Nahrungsaufnahme kaum beeinflusst, die Geschwindigkeit wird allerdings verzögert. Im Plasma liegt Linezolid zu 31 % konzentrationsunabhängig an Proteinen gebunden vor. Die Substanz diffundiert frei in gut durchblutete Gewebe, das Verteilungsvolumen beträgt ca. 40 bis 50 l.

Linezolid wird durch Oxidation des Morpholinrings metabolisiert. Die beiden dabei entstehenden Hauptmetaboliten, ein Aminoethoxyessigsäure- und ein Hydroxyethylglycin-Metabolit, sind antibakteriell kaum aktiv. Linezolid wird zu 35 % unverändert über die Nieren eliminiert und zu 50 % in Form der beiden Hauptmetaboliten. 10 % sind in den Fäzes zu finden, ebenfalls in Form der beiden Hauptmetaboliten. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion kommt es nur zu einem leichten Anstieg der Plasmakonzentration von Linezolid, bei dialysepflichtigen Patienten liegt der Anstieg bei 30 %. Sowohl Linezolid als auch die beiden Hauptmetaboliten sind durch eine Dialyse eliminierbar. Bei Patienten mit leichter bis mittlerer Leberinsuffizienz steigt der Plasmaspiegel um 32 %. Eine Dosisanpassung ist nicht nötig, auch bei geriatischen Patienten nicht. Linezolid ist weder Induktor noch Inhibitor von Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen (Moellering, 2003).

Wechselwirkungen

Linezolid ist ein schwacher reversibler nichtselektiver Inhibitor der Monoaminoxidasen (MAO) A und B und kann mit adrenerg oder serotonerg wirksamen Stoffen interagieren. Deshalb kann es in seltenen Fällen bei zusätzlicher Aufnahme von Serotonin-Reuptake-Hemmern zu einem Serotonin-Syndrom kommen, da zwei seiner Metabolite strukturähnlich zu Moclobemid sind, einem reversiblen MAO-A-Hemmer, das ein Serotonin-Syndrom verur-

sacht, wenn es mit einem selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) kombiniert wird (Lawrence et al., 2006). Bei gleichzeitiger Gabe von Linezolid und Sympathomimetika wie Pseudoephedrin oder Phenylpropanolaminhydrochlorid kommt es zu einem Blutdruckanstieg von bis zu 30 mmHg. Bei Aufnahme von 100 mg Tyramin zusätzlich zu Linezolid kommt es ebenfalls zu einem systolischen Blutdruckanstieg von bis zu 30 mmHg, weniger als 100 mg Tyramin zeigen dagegen keinen Effekt. Trotzdem sollten die Patienten während der Behandlung auf große Mengen Rotwein, Sauerkraut, Sojasauce und Käse verzichten (Kruse und Stahlmann, 2006; Fachinformation Zyvoxid, Pfizer 2009; French, 2003).

Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Während der Behandlung mit Linezolid traten in einer Studie mit über 2000 ausgewerteten Patienten bei 22 % Nebenwirkungen auf und damit häufiger als bei anderen Antibiotika. Trotzdem führten diese Nebenwirkungen nicht häufiger zum Behandlungsabbruch (French, 2003). Am meisten können bei Erwachsenen Diarrhöen, Übelkeit und Kopfschmerzen auftreten. Bei Kindern treten Übelkeit und Erbrechen auf. Im Labor kann ein Anstieg der Transaminasen beobachtet werden.

Bei einigen Patienten kann bei einer Behandlungsdauer mit Linezolid von mehr als 21 Tagen eine reversible Myelosuppression mit Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie und Panzytopenie festgestellt werden. Deshalb sollten während langfristiger Behandlungen mit Linezolid regelmäßig einmal wöchentlich Blutbildkontrollen durchgeführt werden (Prasad, 2007). Das Risiko für diese Nebenwirkung hängt von der Behandlungsdauer ab und steigt, wenn die Gabe länger als zwei Wochen andauert. Als Ursache wird die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese durch die Oxazolidinone vermutet. Linezolid ist nur für die maximale Behandlungsdauer von 28 Tagen zugelassen (McKee et al., 2006).

Bei einer Behandlungsdauer über 28 Tage kann auch die Gefahr einer optischen Neuropathie bis hin zur Erblindung ansteigen, weshalb bei den Patienten, bei denen eine längere Behandlung nötig ist, augenärztliche Kontrollen durchgeführt werden sollten. Linezolid sollte bei Patienten mit Phäochromocytom, Karzinoid und unbehandelter Hypertension wegen der Gefahr des Blutdruckanstiegs nicht angewendet werden. Bei schwangeren und stillenden Frauen sollte auf Grund fehlender Daten eine Gabe kritisch abgewogen werden. In Tierversuchen gab es Hinweise, dass Linezolid und seine Metaboliten in die Muttermilch übertreten und dort höhere Konzentrationen erreichen können als im Plasma. Als weitere Nebenwirkung kann wie bei allen Antibiotika eine pseudomembranöse Kolitis durch *Clostridium difficile* auftreten.

Linezolid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, weil sich in den präklinischen Experimenten an Ratten Hinweise für eine Abnahme der Fertilität und Reproduktionsleistung fanden. Die Tiere wurden mit Dosierungen behandelt, die zu Expositionen führen, die denen beim Menschen eingesetzten entsprachen. Bei männlichen geschlechtsreifen Ratten wurden Veränderungen in der Spermienmorphologie und Reifung beobachtet, die reversibel waren. Allerdings waren die Veränderungen bei Jungtieren, die während ihrer Geschlechtsreifung mit Linezolid behandelt wurden, nicht reversibel. Die Anwendung von Linezolid bei Kindern und Jugendlichen wird nicht empfohlen, weil die Daten zur Unbedenklichkeit und Wirksamkeit nicht ausreichen (Stahlmann und Lode, 2005; Zyvoxid Fachinformation, September 2009).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ein zunehmendes Problem ist die ungewollte Kinderlosigkeit bei Paaren mit Kinderwunsch. Dafür gibt es viele Ursachen. Hauptsächlich werden Umweltfaktoren dafür verantwortlich gemacht. Darunter spielen auch bestimmte Gruppen von Antibiotika und andere Arzneistoffe eine Rolle.

Linezolid ist ein Oxazolidinon. Es ist gegen grampositive Erreger wirksam und wird hauptsächlich bei Infektionen durch multiresistente Keime, wie Methicillin-resistente Staphylokokken, Vancomycin-resistente Enterokokken und Penicillin- und Erythromycin-resistente Streptokokken eingesetzt. In Versuchen an Ratten hat sich gezeigt, dass es eine Abnahme der Fertilität und Spermienproduktion verursachen kann. Außerdem konnte bei männlichen geschlechtsreifen Ratten Veränderungen in der Spermienmorphologie und Reifung beobachtet werden. Bei erwachsenen Tieren waren diese Effekte reversibel, bei Jungtieren nicht.

Die Chinolone sind eine häufig eingesetzte Gruppe von Antiinfektiva mit unterschiedlichen Wirkspektren. Neben unerwünschten Wirkungen wie gastrointestinalen Beschwerden, ZNS-Wirkungen und Tendopathien, haben sich in Tierversuchen auch Hinweise für eine verminderte Spermienzahl und -aktivität bei der Gabe von einigen Chinolonen ergeben.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll an Hand einer Sertoli-Zelllinie, den SerW₃-Zellen, die einige Strukturmerkmale von nativen Sertoli-Zellen aufweisen, der Einfluß von Linezolid und zwei Chinolonen getestet werden. Stellvertretend für die Gruppen 3 und 4 der Chinolone wurden Levo- und Moxifloxacin eingesetzt. Die schädigende Wirkung dieser antibiotisch wirksamen Stoffe auf das Reproduktionssystem ist seit langem bekannt, wurde aber kaum in Studien weiter verfolgt. Auch der schädigende Mechanismus auf die heranreifenden Samen-

zellen und die Sertoli-Zellen ist nicht bekannt (Riecke und Stahlmann, 2000). Die Etablierung dieser *in vitro* Methode könnte helfen, neue Arzneimittel vor der Zulassung auf Schädigung von Sertoli-Zellen und damit der Spermienproduktion zu prüfen. Da die Zellen der Zelllinie auch *tight junctions* ausbilden, ließen sich erste Hinweise auf eine mögliche Schädigung der Blut-Hoden-Schranke gewinnen. Dazu wurden die SerW₃-Zellen mit Konzentrationen der Antibiotika, die sich an der Plasmakonzentration von behandelten Patienten orientierten, inkubiert. Untersucht wurden Proteine, die stellvertretend für inter- und intrazelluläre Filamente stehen und damit für verschiedene Arten von Zell-Zell-Kontakten. Die Schädigung der Proteine und die mögliche Abnahme der Strukturproteine wurden durch die Immunhistologie und der Western Blot Analyse sichtbar gemacht. Die morphologischen Veränderungen wurden licht- und elektronenmikroskopisch gezeigt. Als zentrale Fragen dieser Doktorarbeit lassen sich folgende formulieren:

- welchen Einfluß haben die Antibiotika auf die Sertoli-Zelllinie SerW₃
- welche Proteine werden durch Gabe von Linezolid, Levo- und Moxifloxacin geschädigt
- besteht ein Unterschied zwischen den Stoffen und den Konzentrationen
- lassen sich durch Abnahme bestimmter Proteine Rückschlüsse auf die Schädigung bestimmter Zell-Zell-Kontakte ziehen

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden werden die für diese Dissertation benutzten Materialien und Chemikalien aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Analysenwaage Navigator TM	Sartorius Göttingen
Autoklav, Tuttnauer 3870 ELV PV	Biomedis, Gießen
Axiophot Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Bidestanlage	Millipore, Billerica, USA
Blotting-Einheiten	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Calibrated Densitometer GS-800	Bio-Rad, München
Cellspin I (1205-14)	Thermac, Waldsolms
Cryo Freezing Container (Einfrierbox)	Nalgene, Rochster, NY, USA
Dewargefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe
Elektrophorese-Einheiten	Bio-Rad, München
Flow bench NU 425-400	NuAire, Plymouth, MN, USA
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke und Kunkel, Staufen
Magnetrührer MR 2002	Brand, Wertheim
Neubauer-Zählkammer	Schott, Jena
pH-Meter Lab 850	Schott, Jena
Photometer, Ultrospec III	Pharmacia, Wien, Österreich
Pipetboy IBS	Integra, Schweiz
Power PAC 200 (Stromgeber)	Bio-Rad, München
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	MGW Lauda CS20, Königshofen, AUT
Schüttler 3005	Heidolph, Th. Karow, Berlin
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Staufen
Thermostat 3401	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau

Tischzentrifuge Eppendorf centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

30% Acrylamid / Bis Solution 37,5:1 (2,6 % C)	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Avalox® i.v. 400 mg	Bayer AG, Leverkusen
BC Assay Kit	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
BCIP / NBT Solution	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, München
Cellclip	Thermac, Waldsolms
Cellfunnel	Thermac, Waldsolms
Cellspin Filtercards	Thermac, Waldsolms
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
DermaClean	Ansell, Bangkok, Thailand
Dimethylsulfoxid, getrocknet max. 0,05 % H ₂ O	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Eppendorf epT.I.P.S., verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Ethanol (96%) reinst	Merck, Darmstadt
Falcon Serologische Pipetten 5 und 10 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaleidoskope prestained standards (Kaleidoskopstandard)	Bio-Rad, München
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe

Magnesiumchlorid (MgCl ₂) min 99,0 %	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nunc EasyFlask™, 25 und 75 cm ³ (Kulturflaschen)	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturschalen 8,8 cm ²	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co, Wertheim
PBS Dulbecco (1x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, München
Reagenzgläser	Hecht-Assistent, Sondheim
Reaktionsgefäße	Brand GmbH & Co, Wertheim
Salzsäure (HCl, 1M)	Merck, Darmstadt
Skim Milk Powder (Magermilchpulver)	Fluka, Buchs, Schweiz
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad, München
Softa-Man®	Braun, Melsungen
Sterile Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Tavanic® i.v. 500 mg	Aventis, Frankfurt am Main
TEAA (Triethylammonium Acetat)	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Bio-Rad, München
Trispuffer Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, München
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München
Trizma Base®	Sigma-Aldrich, München
Trypsin / EDTA Solution in PBS 0,05% / 0,02% (w/v) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Tween® 20	Bio-Rad, München
Zellschaber, steril	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengläser	Hecht-Assistent, Sondheim
Zyvoxid® i.v. 2000 mg	Pfizer, Berlin

2.1.3 Antikörper für Western Blot Analyse und Immunhistologie

Die folgende Tabelle führt die für die Western Blot Analysen und die Immunhistologie verwendeten primären und sekundären Antikörper auf.

Tabelle 2: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper der Western Blot Analysen und der immunhistologischen Untersuchungen

Methoden	Antikörper	Ausrichtung	Katalognummer	Hersteller
Western Blot	anti- β_1 -Integrin	monoklonal	610467	Transduction, Lexington, Kentucky, USA
Western Blot	anti-Connexin 43	monoklonal	10061	BD Transduction Laboratories TM
Western Blot	anti-N-Cadherin	monoklonal	33-3900	Zymed [®] Laboratories Inc., San Francisco, USA
Western Blot	anti-Occludin	monoklonal	33-1500	Zymed [®] Laboratories Inc., San Francisco, USA
Western Blot	anti-Vimentin	monoklonal	V6630	Sigma [®] , Saint Louis, Missouri, USA
Western Blot	Sheep anti-mouse IgG	gegen monoklonale Primärantikörper	AP326A	Chemicon, Temecula, USA
Immunhistologie	GAM-FITC	gegen monoklonale Primärantikörper	AP 160F	Chemicon, Temecula, USA

2.2 Medien

2.2.1 Zellkulturmedium

Die SerW₃-Zellen wurden in einem Medium aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetalem Kälberserum (FCS) und Glutamin in Tabelle 3 dargestellter Zusammensetzung kultiviert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Nährmediums zur Zellkultivierung

Bestandteile	Anteile in Prozent
DMEM	94 %
FCS	5 %
Glutamin	1 %

2.2.2 Einfriermedium

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff langfristig konserviert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Einfriermediums

Bestandteile	Anteile
DMEM	79 %
FCS	10 %
DMSO	10 %
Glutamin	1 %

2.3 Lösungen und Puffer

2.3.1 Lösungen und Puffer für Western Blot Analyse

Lysepuffer

Um die Proteine der Zellen für die Western Blot Analyse zu gewinnen, wurden die SerW₃-Zellen mit Lysepuffer aufbereitet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Lysepuffers in Aqua bidest.

Bestandteile	Anteile
Triton X 100	1 %
SDS-Lösung (20 %)	0,1 %
NaCl	150 mM
Tris-HCl (1 M, pH 7,2)	50 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin	5 µg/ml

Gele für die Elektrophorese

Um die Proteine in der Elektrophorese nach ihrer jeweiligen Größe aufzutrennen, wurden Gele mit unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentration gegossen. Dabei setzten sich die Gele aus zwei Teilen zusammen, dem Sammelgel, das für eine Konzentrierung der Proben sorgt und dem Trenngel, in dem die Proteine nach ihrer jeweiligen Molekulargröße gespalten werden. Als Polymerisationsbeschleuniger wurden APS und TEMED verwendet und erst kurz vor dem Einfüllen hinzu gegeben. Die Mengen für zwei Gele sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Sammelgels und der Trenngele

Gel	Bestandteile	Anteile
Sammelgel 4 %	Acrylamid 30 %	0,67 ml
	Tris Puffer pH 6,8	1,25 ml
	SDS (20 %)	25 µl
	Aqua dest.	3 ml
	APS (5%)	50 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel 7,5 %	Acrylamid (30 %)	2,5 ml
	Tris Puffer pH 8,8	2,5 ml
	SDS (20%)	50 µl
	Aqua dest.	4,85 ml
	APS (5%)	100 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel 10 %	Acrylamid (30 %)	3,3 ml
	Tris Puffer pH 8,8	2,5 ml
	SDS (20%)	50 µl
	Aqua dest.	4,05 ml
	APS (5%)	100 µl
	TEMED	10 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer

Puffer	Bestandteile	Anteile
Tris Puffer pH 6,8 für Sammelgel	Tris-HCl in Aqua dest.	1 M
Tris Puffer pH 8,8 für Trenngel	Trizma® Base in Aqua dest.	1 M
Laufpuffer 10x für Elektrophorese	Trizma® Base Glycin SDS in Aqua dest.	3 % 14,42 % 1 %
Transferpuffer 2x für Western Blot Analyse	Trizma® Base Glycin Methanol in Aqua dest.	0,25 % 1,13 % 5 %
Blockpuffer für Western Blot Analyse	Magermilchpulver Tween 20 in PBS	5 % 0,1 %
Tris Puffer pH 9,5 für Western Blot Analyse	Trizma® Base MgCl ₂ NaCl in Aqua dest.	0,1 M 0,05 M 0,1 M
Probenpuffer 5x pH 6,8 für Reduktion	SDS Glycerol (87 %) Ethanol (96 %) Bromphenolblau Tris Puffer HCl in Aqua dest.	10 % 35 % 25 % 0,025 % 1,5 M

Um die Proteine in den Proben zur Orientierung für die SDS-Gelelektrophorese und den Transfer farblich zu markieren und zu beschweren, wird ein Probenpuffer hergestellt. Dafür wird SDS in Ethanol und Aqua dest. gelöst, anschließend Natrium-Hydroxid zugegeben und auf einer Heizplatte erwärmt. Die grün-rote Farbe wird durch Zugabe von Glycerol und Bromphenolblau erzeugt, die sich durch Zugabe von NaOH und pH-Einstellung auf 6,8 in dunkelblau ändert.

Karnowsky's Lösung für Elektronenmikroskopie

Zur Vorbereitung für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die SerW₃-Zellen in Karnowsky's Lösung fixiert, die sich aus den in Tabelle 8 zusammengefassten Bestandteilen zusammensetzt und bei 4-8°C gelagert wird.

Tabelle 8: Karnowsky's Lösung für Elektronenmikroskopie

Bestandteile	Anteile
Glutaraldehyd (25 %)	15 ml
Phosphatpuffer (0,2 M)	45 ml
Paraformaldehyd (3 %)	40 ml

Phosphatpuffer für Elektronenmikroskopie

Tabelle 9: Phosphatpuffer für Elektronenmikroskopie

Bestandteile	Anteile
KH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in Aqua dest.	0,1 M

Kontrastierung nach Reynolds für Elektronenmikroskopie

Tabelle 10: Lösungen für die Kontrastierung nach Reynolds für Elektronenmikroskopie

Lösungen	Bestandteile	Anteile
Lösung 1	Uranylacetat in Aqua dest.	1 %
Lösung 2	Bleinitrat Natriumacetat Aqua bidest.	1,33 g 1,76 g 30 ml

Anschließend wurden 8 ml 1 M NaOH zugesetzt und auf 50 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Nachdem die Proben 15-20 min in Lösung 1 vorbereitet wurden, wurden sie mit Aqua bidest. gespült und 3-5 min in Lösung 2 getaucht. Danach folgte ein erneutes Spülen mit Aqua bidest.

2.4 Methoden

2.4.1 Zellpassage

Das Wachstum der SerW₃-Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei Erreichen einer konfluenten Monolayerzellschicht mit 80-90 % Konfluenz auf dem Flaschenboden, wurden die Zellen auf mehrere neue Flaschen verteilt. Dazu wurde in einer keimarmen Umgebung unter dem Laminar Air Flow das alte Kulturmedium abgegossen und die Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gespült. Um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurden 2 ml Trypsin gleichmäßig auf dem Boden verteilt und der Überschuß abgegossen. Zur Inkubation kamen die Flaschen 3 min in den Brutschrank. Die enzymatische Ablösung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und ggf. mechanisch durch Klopfen der Flasche unterstützt. Durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium wurde der Prozeß, der bei längerem Einwirken auch die Zellen schädigen kann, gestoppt, die Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 Umdrehungen 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette wurden die Zellen mechanisch vereinzelt und die Zellzahl mittels Zählung in einer Neubauerkammer ermittelt. Danach wurden die Zellen in 10 ml Nährmedium neu eingesät. Das optimale Aufteilungsverhältnis wurde in Vorversuchen ermittelt, so dass je nach vorheriger Zelldichte eine gewünschte Konfluenz nach einem, drei oder vier Tagen erreicht werden konnte.

2.4.2 Einfrieren von SerW₃-Zellen

Um die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufzubewahren, wurden sie nach Erreichen einer konfluenten Monolayerschicht folgendermaßen vorbereitet:

Nachdem das alte Kulturmedium abgegossen und die Zellen zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gespült wurden, erfolgte die enzymatische Ablösung der adhärenen Zellen vom Flaschenboden mit 2 ml Trypsin. Nach dreiminütiger Inkubation und dem Stoppen dieses Prozesses mit Kulturmedium, wurde die Zellsuspension bei 500 Umdrehungen 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen in neuem Medium zur Zellzählung mit Hilfe einer Neubauerzählkammer resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in Kulturmedium mit DMSO gelöst. Die Zellsuspension wurde zu je 1,5 ml in Cryoröhrchen aufgeteilt und

zuerst in einer Cryobox gefüllt mit Isopropanol zur langsamen Abkühlung für 24 h bei -85°C eingefroren und anschließend in den flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.3 Auftauen von SerW₃-Zellen

Um die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wieder neu in Flaschen zu kultivieren, wurden die entnommenen Cryoröhrchen unter warmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, das zellschädliche DMSO mit 8 ml frischem Kulturmedium verdünnt und bei 500 Umdrehungen 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abpipettiert, die Zellen in 10 ml neuem Nährmedium gelöst und nach lichtmikroskopischer Zellzählung in einer Neubauerkammer in Kulturflaschen überführt. Das Anwachsen der Zellen wurde am folgenden Tag lichtmikroskopisch kontrolliert und bei ausreichender Konfluenz waren die Zellen für erneute Versuche oder Passagen verwendbar.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde durch Zählung in einer Neubauerkammer lichtmikroskopisch ermittelt. Dazu wurden die Zellen wie bei der Zellpassage mit Trypsin enzymatisch vom Flaschenboden abgelöst, 10 min bei 500 Umdrehungen und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Zellen ließen sich in 4 ml Nährmedium lösen und durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen in einer Pipette mechanisch vereinzeln. Anschließend wurden 50 μl der Zellsuspension in ein mit 150 μl Nährmedium vorbereitetes Eppendorf-Hütchen überführt und durch kurzes Schütteln auf dem Vortex gut vermischt. Zur Zählung wurden 10 μl des Gemisches entnommen und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Um den Fehler der ungleichmässigen Verteilung durch Zellhaufenbildung möglichst klein zu halten, wurde ein Dreifachansatz verwendet, d.h. es wurden drei Kulturflaschen mit derselben Konzentration der Prüfsubstanz, bzw. nur mit Kulturmedium als Kontrolle, eingesät und wiederum drei Eppendorf-Hütchen pro Kulturflasche ausgezählt.

Die Neubauerkammer wurde mit einem fusselfreien Papier gereinigt und auf die Trägerstege je ein Tropfen Wasser gegeben und das Deckglas aufgelegt. War der Sitz des Glases korrekt, bildeten sich Newtonsche Ringe und das Deckglas verrutschte nicht mehr. Die 10 μl Zellsuspension sogen sich durch die Kapillarwirkung in den Raum zwischen Deckglas und Neubauerkammer. Als Hilfe zur Zählung sind vier Quadrate mit jeweils 16 Unterquadraten in die

Oberfläche eingätzt. Die Gesamtzellzahl addiert sich aus der Zahl der einzelnen Felder in 10^5 / ml.

2.4.5 Inkubation mit den Testsubstanzen

Die SerW₃-Zellen wurden mit dem Oxazolidinon Linezolid (Zyvoxid® i.v., Pfizer) und den Chinolonen Levofloxacin (Tavanic® i.v., Aventis) und Moxifloxacin (Avalox® i.v., Bayer) als Testsubstanzen inkubiert. Getestet wurden die Konzentrationen 0,1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l und 100 mg/l des jeweiligen Antibiotikums. Dazu wurde das Nährmedium mit der entsprechenden Menge an wässriger Infusionslösung versetzt und zu den Zellen gegeben (Tabelle 11). Eine Kontrolle mit reinem Nährmedium wurde bei allen Versuchen mitgeführt. Der Versuchsaufbau bestand in einem Dreifachansatz, d.h. von jeder Kontrolle und Antibiotikakonzentration wurden drei Flaschen angesetzt und inkubiert. Die Proben für die Western Blot Analyse wurden nach drei und sieben Tagen entnommen, für die Elektronenmikroskopie und Immunhistologie am Endpunkt des Versuches nach sieben Tagen. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Kammer gezählt, um das Zellwachstum zu beurteilen. Die Verdünnung der handelsüblichen Infusionslösungen wurde mittels einer Verdünnungsreihe nach folgenden Schemata vorgenommen:

Tabelle 11: Verdünnungsreihe für Linezolid, Levofloxacin und Moxifloxacin

Stoff	Konzentration in mg/l	Verdünnungsfaktor
Linezolid	2000	Ausgangskonzentration
	100	1:20
	10	1:10
	1	1:10
	0,1	1:10
Levofloxacin	5000	Ausgangskonzentration
	100	1:50
	10	1:10
	1	1:10
	0,1	1:10
Moxifloxacin	1600	Ausgangskonzentration
	100	1:16
	10	1:10
	1	1:10
	0,1	1:10

2.4.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse zur Proteindetektion

Um ein Protein aus einem Gemisch an Proteinen identifizieren und quantifizieren zu können, bedient man sich der Western Blot Analyse. Im ersten Schritt werden die Proteine mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese im elektrischen Feld nach Molekülgröße und –gewicht in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die Proteine schneller wandern. Beim anschließenden Transfer werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dies geschieht durch ein senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegtes elektrisches Feld, die Proteine bleiben auf Grund hydrophober Wechselwirkungen an der Membran haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine bleibt bestehen. Anschließend werden freie Bindungen blockiert und die Membran mit einem spezifischen primären Antikörper, der an der gesuchten Proteinbande bindet, inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper werden in mehreren Waschschrritten mit Pufferlösungen entfernt. Zur Visualisierung erfolgt eine weitere Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der spezifisch gegen Teilstrukturen des primären Antikörpers gerichtet ist. Die enthaltene alkalische Phosphatase findet ein Substrat in dem Entwicklungsgemisch BCIP/NBT-Solution und bildet einen Farbstoff, der die markierten Proteinbanden blauviolett anfärbt.

2.4.7 Vorbereitung für Western Blot Analyse

2.4.7.1 Lysieren

Nach Beendigung der Inkubationszeit mussten die Zellen lysiert werden. Dazu wurde das alte Nährmedium abgegossen und die Zellen zweimal mit PBS (mit Ca^{2+} , Mg^{2+}) gespült. Anschließend wurde in jede Kulturflasche 400 μl Lysepuffer, der erst kurz vor Verwendung mit den Proteaseinhibitoren PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und Pepstatin versehen wurde, gegeben. Nach 15 min Einwirkzeit wurden die Zellen mechanisch vom Flaschenboden durch mehrmaliges Aufsaugen und Ablassen des Lysates mit Hilfe einer Pipette und durch Abschaben mit einem sterilen Zellschaber gelöst. Dabei war Schaumbildung zu vermeiden. Nach weiteren 15 min wurde dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Die Kulturflaschen befanden sich bei der kompletten Behandlung auf Eis, um einer zu schnellen Denaturierung und einem Proteinabbau entgegen zu wirken. Das Lysat wurde in Eppendorf-Cups überführt und 30 min bei 9000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen

wurde vom Pellet mit den Zelltrümmern abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Hütchen gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.4.7.2 Gesamtproteinbestimmung

Damit eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messzeitpunkte und Konzentrationen in den Western Blot Analysen erreicht werden konnte, mussten die Proben auf einen einheitlichen Proteinwert eingestellt werden. Dazu machte man sich die Eigenschaft der Proteine zunutze, dass sie Cu^{2+} zu Cu^{+} im alkalischen Milieu reduzieren. Durch die Bildung eines gefärbten Chelatkomplexes mit dem Reagenz Bicinchoninsäure, der sich in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bildete, gelang die fotometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 562 nm. Folgende Reaktionen bilden die Grundlage für die Biuret-Reaktion:



Als Reagenzien dienten die Substanzen aus dem BC-Assay-Kit-Reagenz der Firma Uptima. In eine 96-Well-Lochplatte wurden neben 10 μl einer Standardverdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) und drei Blank-Feldern, jeweils drei Wells mit 10 μl einer Probe des Lysates befüllt. Dazu kam 1 ml des frisch hergestellten Reagenzgemisches und anschließend wurden die Proben bei 60°C 30 min im Wärmeschrank inkubiert. Nach Abkühlung wurde die sichtbare Farbreaktion fotometrisch gemessen. Anschließend konnten die Lysatproben auf einen einheitlichen Proteinwert von 150 $\mu\text{g/ml}$ durch Verdünnung mit Lysepuffer eingestellt werden.

2.4.7.3 Reduktion

Um ein weiteres Denaturieren der Proteine zu verhindern und die Proben dauerhaft zu lagern, wurden sie pro 1000 μl Probe mit 250 μl Probenpuffer und 62,5 μl Mercaptoethanol versetzt und anschließend im Thermoblock bei 90°C 10 min unter dem Abzug geschüttelt. Danach waren die Proben stabilisiert und konnten bei -20°C eingefroren werden.

2.4.7.4 SDS-Gelelektrophorese

Als Vorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese wurden je nach Molekulargewicht des gesuchten Proteins Polyacrylamidgele in 7,5 % und 10 % Konzentration gegossen. In die erste Tasche wurde ein Marker und in die weiteren je 20 µl der jeweiligen Proben pipettiert. Das für die Elektrophorese genutzte Behältnis wurde mit Laufpuffer, der mit Aqua dest. verdünnt wurde, aufgefüllt. Die Sammelgelphase zur Verdichtung der Proteine dauerte 15 min bei 80 V, die anschließende Auftrennung der Proteine in der Trenngelphase 60 min bei 120 V.

2.4.7.5 Western Blot Analyse

Nach der Auftrennung in der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels eines Transfers auf die Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel zuerst auf ein Filterpapier gelegt, anschließend mit der Nitrozellulose-Membran bedeckt und als Sandwich 60 min bei 120 V in mit Aqua dest. verdünntem Transferpuffer übertragen. Um der dabei entstehenden Wärmeentwicklung entgegen zu wirken, wurde der Vorgang unter Eiskühlung vorgenommen. Nach Übertragung der Proteine auf die Membran wurden unspezifische Bindungsstellen über mindestens 30 min mit Blockpuffer abgedeckt. Der primäre Antikörper ließ sich in Blockpuffer lösen und die Membranen wurden über 48 h bei 4-8°C kontinuierlich rollend inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Spülen mit Blockpuffer über 10 min entfernt. Auch der sekundäre Antikörper ließ sich im Blockpuffer im Verhältnis 1:4000 lösen, um anschließend über 120 min mit den Membranen inkubiert zu werden. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrfache Spülung über einen Zeitraum von ca. 30 min mit Tris-Puffer, der mit Aqua dest. verdünnt wurde, entfernt.

Als letzter Schritt zur Visualisierung wurden die Membranen in lichtempfindlicher BCIP/NCP Lösung, die in Tris-Puffer 1:5 verdünnt wurden, über 120 min im Dunkeln inkubiert. Die im sekundären Antikörper enthaltene alkalische Phosphatase katalysiert eine Farb-reaktion, die die Proteinbanden auf der Membran blauviolett anfärbt. Mehrmaliges Spülen in Aqua dest. beendete die Farb-reaktion und die Membranen wurden im Dunkeln auf Filterpapier getrocknet.

2.4.8 Densitometrische Auswertung

Zur semiquantitativen Auswertung der Banden wurden die Membranen mit Hilfe des Programms Presto Mr. Photo (Version 1.5, New Soft Technology Corporation, Taipei Taiwan) mit 2400 dpi gescannt. Die weitere Auswertung der optometrischen Dichte der Banden erfolgte durch das Programm AIDA (Advanced Image Data Analyser, Version 3.44.035, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Stuttgart), indem einzelne Banden mit einem definierten Rahmen markiert und zu einem ebenfalls markierten Leerwert in Beziehung gesetzt wurden.

2.4.9 Verfahren der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, in dem im Gegensatz zur ebenfalls durchgeführten Western Blot Analyse sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Proteine spezifisch angefärbt werden können, da die Zellen nicht lysiert werden müssen. Der primäre Antikörper bindet an das gesuchte Protein, ein sekundärer Antikörper mit fluoreszierendem Farbstoff bindet an den Antigen-Antikörper-Komplex und macht das Protein im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

2.4.9.1 Cytospin

Nach Ende der Inkubationszeit mit den entsprechenden Testsubstanzen wurden die Zellen enzymatisch mit Trypsin vom Kulturflaschenboden gelöst und 10 min bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert. Dabei verloren die Zellen ihre typische Form und den Zellverband und stellten sich vereinzelt und abgerundet dar. Das Pellet wurde in PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gelöst und mit Hilfe des Cytospin auf Objektträger aufgetragen. Dabei war darauf zu achten, dass es keine Zellüberlappungen oder -haufen gab. Der Vorteil dieser Methode ist eine gleichmäßige und abgegrenzte Verteilung der Zellen auf dem Objektträger. Danach wurden die Zellen bei Raumluft ungefähr 120 min getrocknet und anschließend 10 min in einem Acetonbad fixiert, um sie haltbar zu machen.

2.4.9.2 Immunhistochemie

Die Färbung der verschiedenen Proteine erforderte mehrere Arbeitsschritte. Als erstes war es notwendig, die unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Das geschah mit 0,5 % BSA in PBS über 15 min. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in PBS über 10 min gespült, um das überschüssige BSA wieder zu entfernen. Nach einer Trocknungsphase wurden 10 µl des primären Antikörpers aufgebracht, der in einer Konzentration von 1:10 bis 1:40 benutzt wurde, und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS, das anschließende Aufbringen des sekundären Antikörpers und eine weitere Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur. Es wurde auch eine Kontrolle des sekundären Antikörpers mitgeführt, um eine eigene Fluoreszenz auszuschließen. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären und ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, der das gesuchte Protein sichtbar macht. Nach Abschluß des letzten Inkubationsschrittes wurde der überschüssige sekundäre Antikörper durch zweimaliges Spülen mit PBS über 10 min entfernt und die Proben mit einem Tropfen 0,1% p-Phenylendiamin in Glycerin und PBS vor Austrocknung und Auskristallisierung geschützt. Nach Abdeckung mit einem Deckglas wurden die Proben umgehend fotografiert, da nach einigen Stunden die Leuchtintensität des Farbstoffes nachlässt.

2.4.9.3 Fotografie und semiquantitative Auswertung

Da das Fotografieren und die Auswahl des Bildabschnittes subjektiven Einflüssen unterliegen, wurden die Objektträger durch eine zweite Person angereicht, so dass die Substanz und die Konzentration der Probe nicht bekannt waren und erst nach der Auswertung zugeordnet wurden. Von jedem Objektträger sind fünf Bilder von verschiedenen Stellen angefertigt und als Bilddatei gespeichert worden.

In der Auswertung wurde die Fluoreszenz in einer vorher festgelegten Kreisfläche gemessen, die bei jedem Bild konstant war. Weiter war darauf zu achten, dass sich in dieser Fläche immer möglichst bei jedem Bild die gleiche Anzahl an Zellen befand. Es wurden ungefähr 20 Zellen ausgewertet. Artefakte, starkes Hintergrundleuchten oder Zellhaufen wurden bei der Auswertung ignoriert. Die semiquantitative Auswertung wurde mit dem Programm Scion Image (Scion Image Corporation, Frederick, Maryland, USA) vorgenommen. Es stellt von jedem Objekt ein Graustufen- und ein Farbbild her. Ein Schwarz-Weiß-Bild wurde aus dem monochromen Bild erzeugt, das Farbbild wurde anschließend mit Hilfe des Schwellenwert-

Verfahrens (Threshold) zum Binär-Bild in Beziehung gesetzt. Nach Anpassung entspricht ein fluoreszierender Punkt im originalen Farbbild einem schwarzen Punkt im invertierten Schwarz-Weiß-Bild. Der gemessene Wert wurde zu einem Schwarzwert in Beziehung gesetzt und in Prozent ausgedrückt. Als Grundlage diene folgende Rechnung:

$$\text{Fluoreszenz (\%)} = (\text{Messwert} \times 100) / \text{Gesamtfläche}$$

2.4.10 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. M. Shakibaei vom Institut für Anatomie von der LMU München durchgeführt.

Die SerW₃- Zellen wurden nach fünftägiger Inkubation mit Linezolid für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Dazu wurde das alte Nährmedium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gespült und 30 min in Karnowsky's Lösung fixiert. Anschließend wurden sie mechanisch mittels Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in sterilen Röhrchen zentrifugiert. Das Pellet wurde unter dem Abzug mit 2 % OsO₄ nachfixiert und die Reste durch mehrmaliges Spülen mit Phosphat-Puffer (0,1 M) entfernt. Die Entwässerung der Präparate erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (10 % bis 96 % Ethanol). Danach wurden die Zellen zweimal 15 min in Styrol und anschließend über Nacht in ein Gemisch aus Styrol und Epon (1:1) eingebettet. In Epon erfolgte die endgültige Einbettung in die Flacheinbettungsformen. Von den Präparaten wurden mit Hilfe eines Reichert-Jung Ultracut E Ultradünnschnitte angefertigt und diese mit einer wässrigen Lösung aus 2 % Uranylacetat und Bleicitrat (nach Reynolds) kontrastiert. Die Bilder der Präparate wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10, Zeiss) aufgenommen.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche dargestellt. Dabei dienten die lichtmikroskopischen Untersuchungen dem Nachweis von morphologischen Veränderungen an den SerW₃-Zellen durch die Inkubation mit Linezolid, denen in der weiterführenden elektronenmikroskopischen Analyse nachgegangen wurde. Durch die Immunhistologie und die Western Blot Analysen sollten Veränderungen in den Proteinmengen, die die Blut-Hoden-Schranke ausmachen, nachgewiesen werden. Das eingeschränkte Wachstum wurde über die Zellzählung am Ende der Inkubationsintervalle nach drei und sieben Tagen ermittelt.

3.1 Lichtmikroskopie

Um die morphologischen Veränderungen der Sertoli-Zelllinie SerW₃ durch die Behandlung mit Linezolid optisch darzustellen, wurden die Zellen am Ende der Inkubationszeit von sieben Tagen lichtmikroskopisch analysiert (Abbildung 6). Dabei zeigt sich bei den Kontrollzellen (a) ein geschlossener Zellverband mit engen Zell-Zell-Kontakten. Die Zellen liegen in ihrer typischen langgestreckten Form mit schlanken, ovalen Zellkernen vor. Nach einer siebentägigen Behandlung mit Linezolid (b) ist der Zellverband zerrissen und der Interzellularspalt stark verbreitert. Die Zellen haben ihre typische Gestalt verloren und sind angeschwollen. Sie haben sich abgerundet und die Zellkerne haben eine runde Form angenommen.

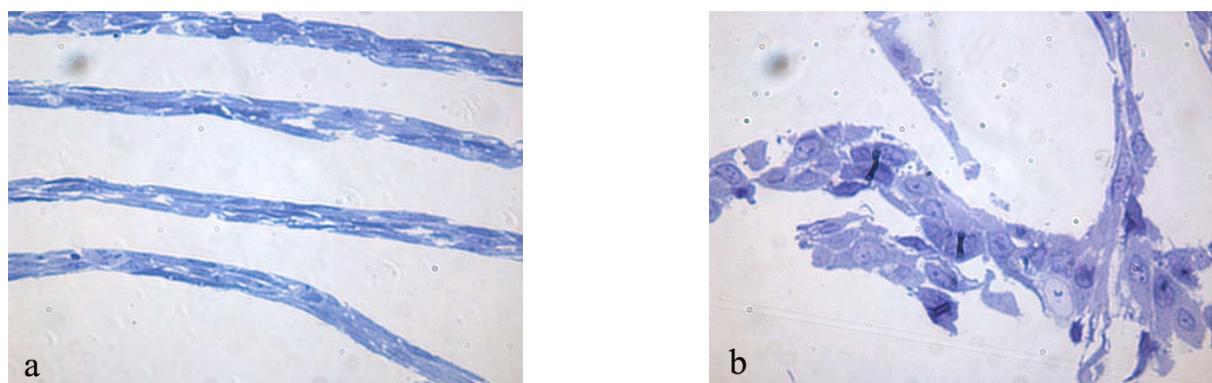


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Bilder der SerW₃-Zellen nach sieben Tagen Inkubation, unbehandelt (a) und mit 100 mg/l Linezolid (b), Vergrößerung x 100

3.2 Elektronenmikroskopie

Um die Veränderungen, die im Lichtmikroskop sichtbar wurden, näher zu untersuchen, wurde eine elektronenmikroskopische Analyse angeschlossen. Dabei zeigte sich wieder in den Bildern der unbehandelten Kontrollzellen ein dichter Zellverband, der durch die gut sichtbaren Zytoplasmaausläufer gebildet wird (Abbildung 7). Die Interzellularspalten der dicht beieinander liegenden, länglichen Zellen, sind schmal (Bild a ➔). In der Untersuchung wurden auch die Desmosomen sichtbar, über die die Zellen miteinander verbunden sind (Bild b ➔). Sie sind ein wichtiger Bestandteil der Zell-Zell-Kontakte, die im Hoden die Blut-Hoden-Schranke ausmachen. Die langgestreckten Zellkerne (★) enthalten gleichmässig verteiltes Chromatin. Die Zellorganellen wie Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat und Mitochondrien sind reichlich vorhanden und gut ausgebildet, was für eine hohe Aktivität, Syntheseleistung und Vitalität der Zellen spricht.

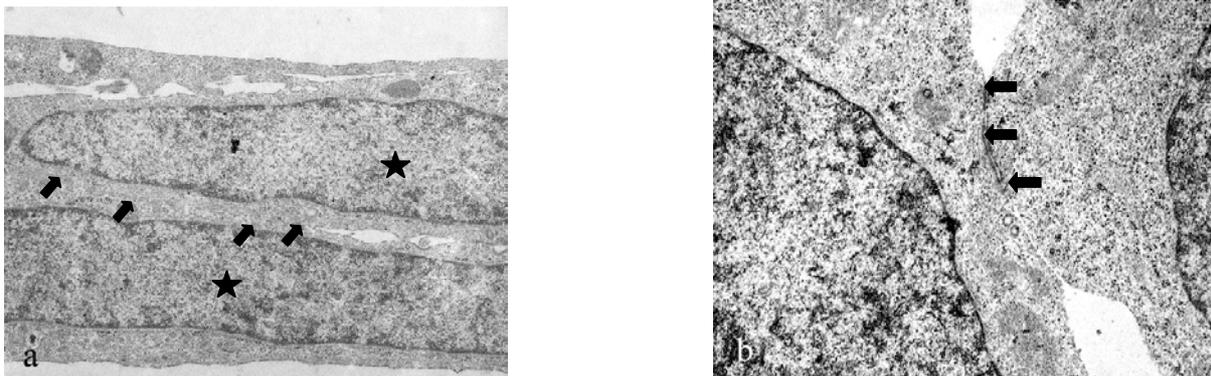


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Bilder der unbehandelten SerW₃-Zellen nach sieben Tagen Inkubation, Bild a: der Interzellularspalt ist schmal (➔), die Zellkerne sind schlank und länglich (★), das Kernchromatin ist gleichmäßig verteilt, Bild b: Desmosom zwischen zwei benachbarten Zellen (➔), Vergrößerung x 10000 (a), x 15000 (b)

Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zeigt sich bereits bei der niedrigsten untersuchten Konzentration von 0,1 mg/l Linezolid (Abbildung 8 a) nach sieben Tagen deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie. Der Zellverband erscheint gelockert und die Interzellularspalten sind verbreitert (➔). In dem Zellkern der unteren Zelle des Bildes ist das Chromatin kondensiert und marginalisiert. Noch stärker sind diese Effekte in dem Bild der Konzentration von 1 mg/l Linezolid (b) ausgeprägt. Die Zellen sind noch weiter auseinander gezogen, die Zellorganellen sind vergrößert. In den Bildern der höchsten Konzentration von 10 mg/l Linezolid (c, d) sind die Auswirkungen auf die Zellen noch deutlicher zu sehen. Es sind einige Zeichen einer beginnenden Apoptose und eines Funktionsverlustes der Zellen zu beobachten.

Das Kernchromatin ist an den Rand gedrängt, der Zellverband ist aufgelöst. Das ER und die Mitochondrien sind stark vergrößert und aufgebläht (★). In den Mitochondrien sind keine Christae mehr zu sehen oder sie sind, wenn noch vorhanden, stark aufgeweitet. Dies spricht für eine verringerte Vitalität und verminderte Syntheseleistung der Zellen. In Bild (d) ist die Kernmembran der oberen Zelle bereits aufgelöst (➡). Vakuolen haben sich im Zellinneren gebildet (●). Die Zellen erscheinen insgesamt geschrumpft. Die Zellausläufer haben sich zurückgezogen und haben ihre gleichmäßige, glatte Form verloren.

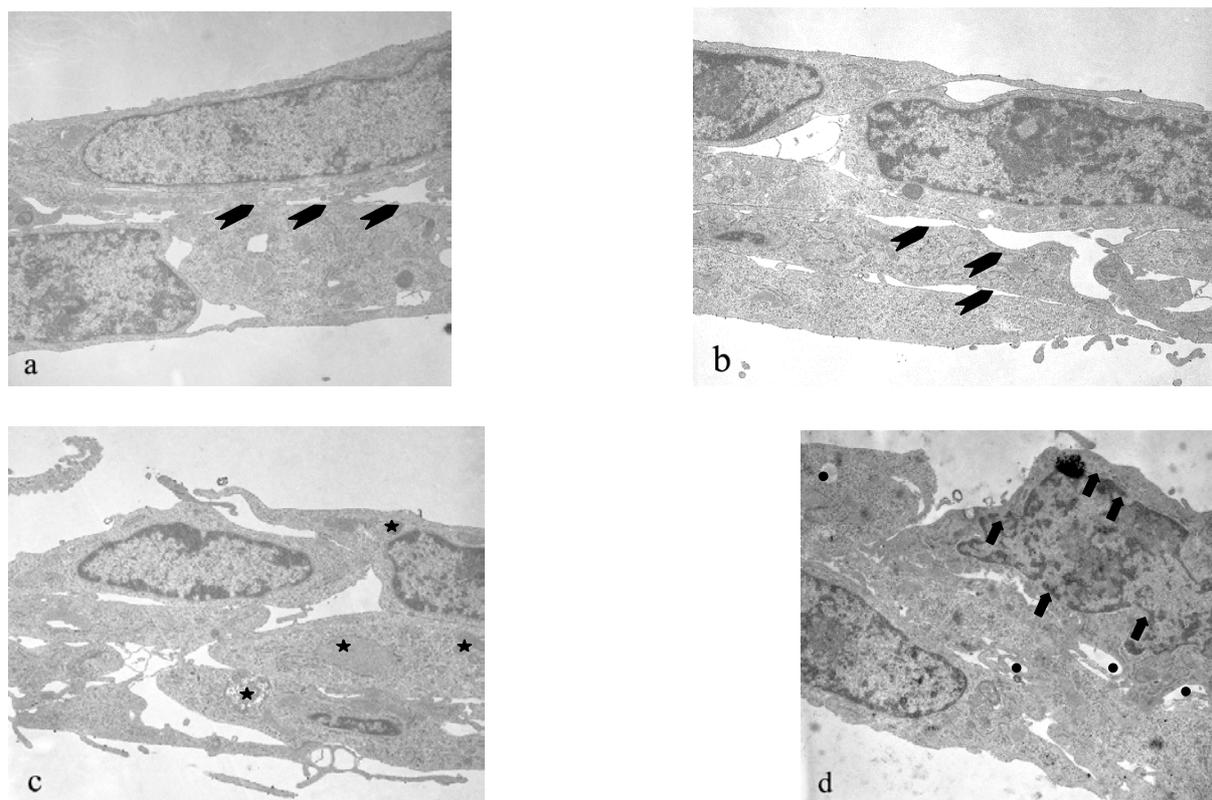


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Bilder der SerW₃-Zellen nach sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1 (a), 1 (b) und 10 mg/l (c, d), Vergrößerung x 5000 (c) und x 10000 (a, b, d), die Zellorganellen sind stark vergrößert und aufgebläht (★), Bild d: Vakuolen haben sich gebildet (●), die Kernmembran hat sich aufgelöst (➡), die Interzellularspalten sind verbreitert (➡)

3.3 Immunhistologie

Mit der immunhistologischen Analyse sollten die Effekte der antibiotisch wirksamen Stoffe semiquantitativ nachgewiesen werden. Dazu wurden die SerW₃-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen über sieben Tage inkubiert. Um die Effekte der drei Stoffe Linezolid, Levofloxacin und Moxifloxacin miteinander vergleichen zu können, wurden bei allen die glei-

chen Konzentrationen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle eingesetzt. Es wurde mit einem Fünffachansatz gearbeitet und eine Kontrolle des sekundären Antikörpers mitgeführt, um eine eigene Fluoreszenz von ihm auszuschließen. Um die Auswirkungen der antibiotisch wirksamen Stoffe auf die SerW₃-Zellen und ihre Zell-Zell-Kontakte zu untersuchen, wurden verschiedene Antikörper eingesetzt: Connexin 43, N-Cadherin, Occludin, β_1 -Integrine und Vimentin. Die für die SerW₃-Zellen untypische runde Form kommt durch die vorbereitenden Arbeitsschritte, bei denen die Zellen vereinzelt auf einen Objektträger geschleudert wurden, zu Stande.

3.3.1 Linezolid

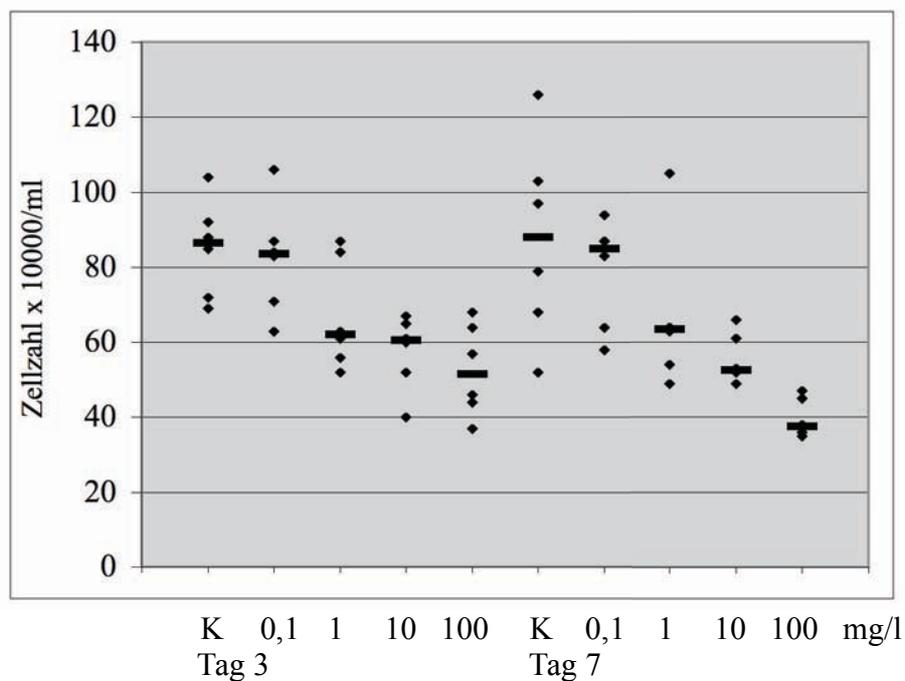


Abbildung 9: Grafische Darstellung der SerW₃-Zellzahl nach drei und sieben Tagen Inkubation mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K), abgebildet wurden je sechs Zählungen pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Die Zahlen aus der Zellzählung am Ende der Inkubationsintervalle nach drei und sieben Tagen machen deutlich, dass es eine starke Abnahme der Zellanzahl bei den höheren Linezolid-Konzentrationen gibt. Die Zahlen der Kontrollen (K) und der geringsten Konzentration 0,1 mg/l bleiben auch nach sieben Tagen Inkubation relativ konstant, wobei der Median der höchsten von 100 mg/l Linezolid nach drei Tagen um etwa ein Drittel und nach sieben auf weniger als die Hälfte zurückgeht.

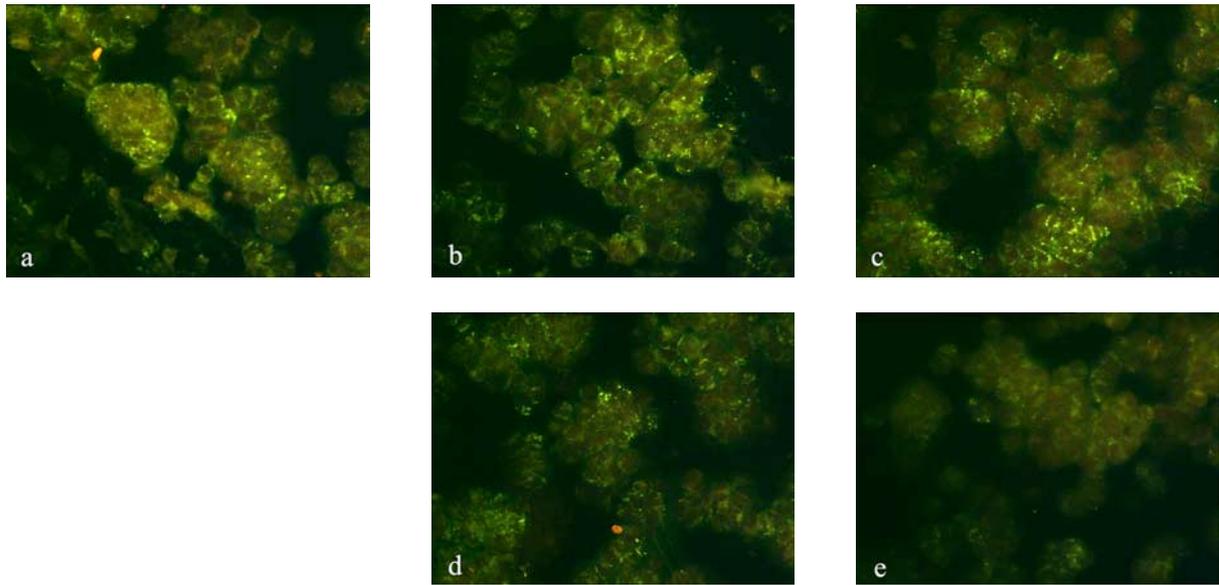
Connexin 43

Abbildung 10: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid, Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

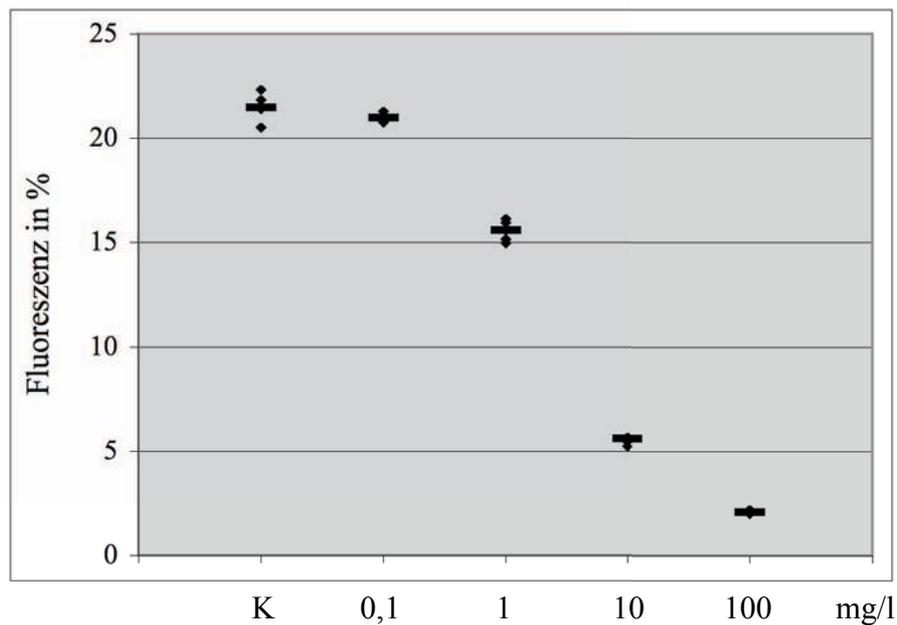


Abbildung 11: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

N-Cadherin

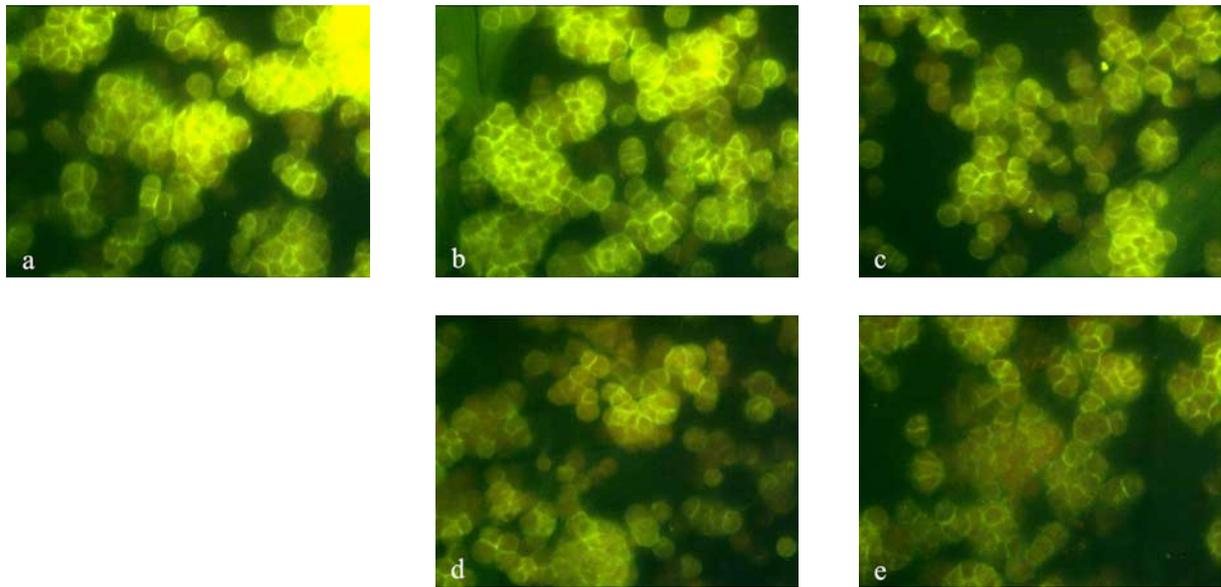


Abbildung 12: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid, Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

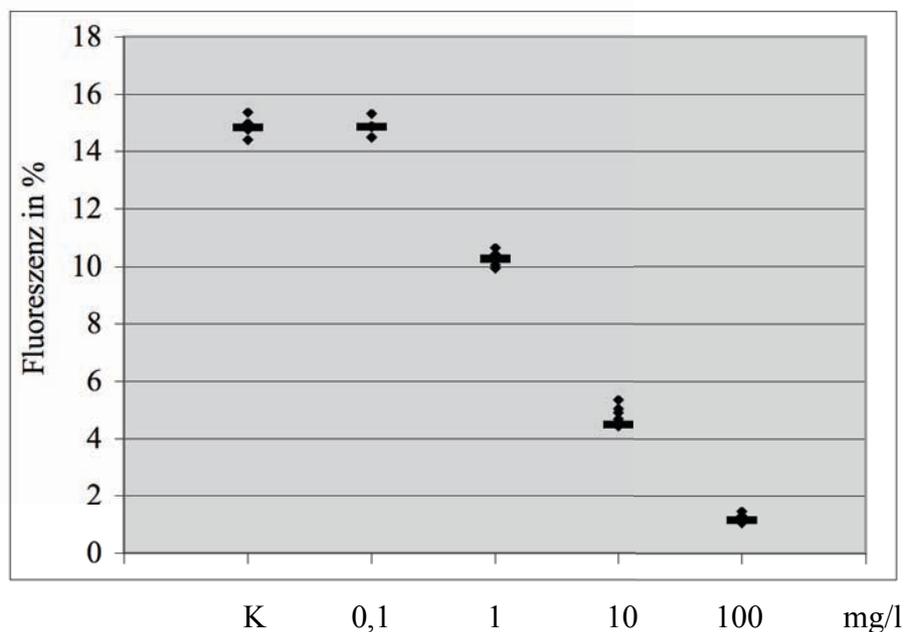


Abbildung 13: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

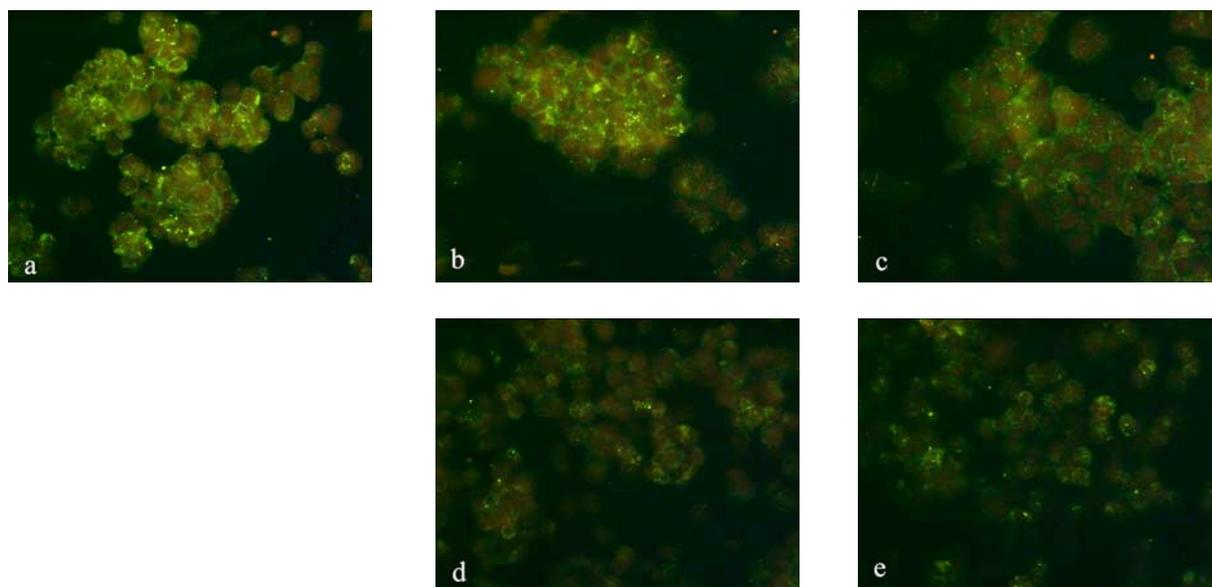
Occludin

Abbildung 14: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid, Färbung mit einem Occludin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

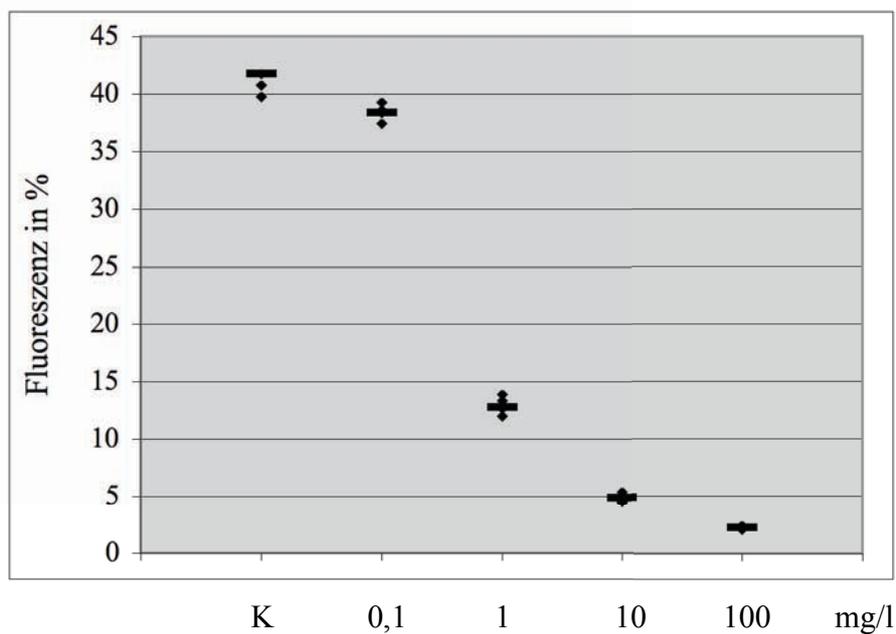


Abbildung 15: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Occludin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

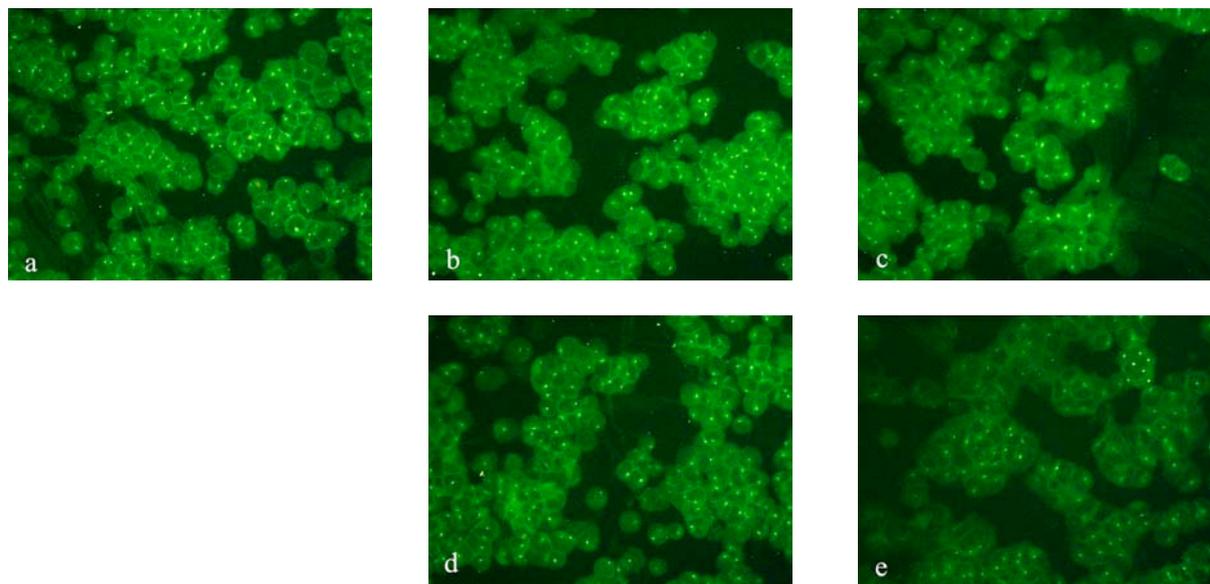
β_1 -Integrine

Abbildung 16: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid, Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

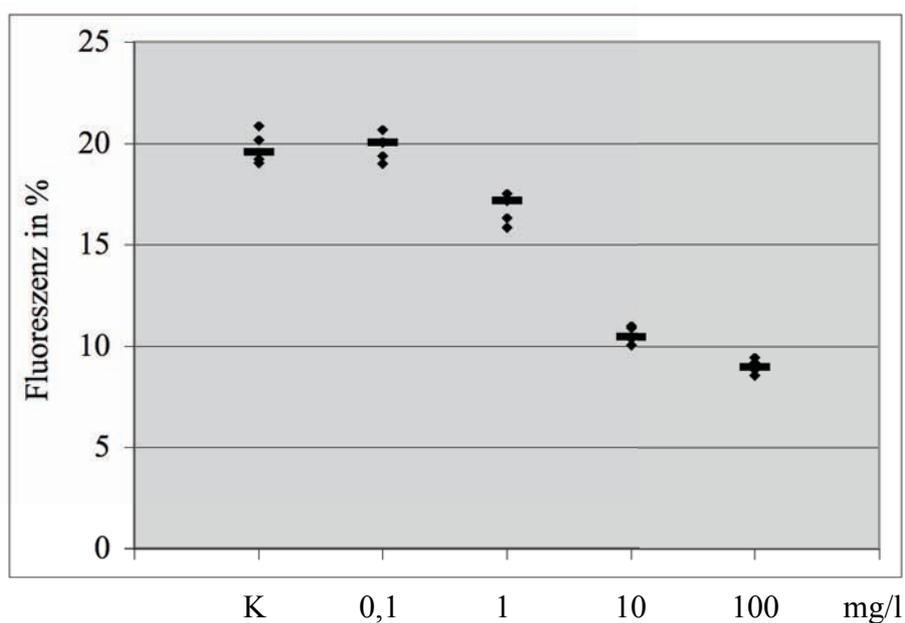


Abbildung 17: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (\blacklozenge) und der Median (\blacksquare)

Vimentin

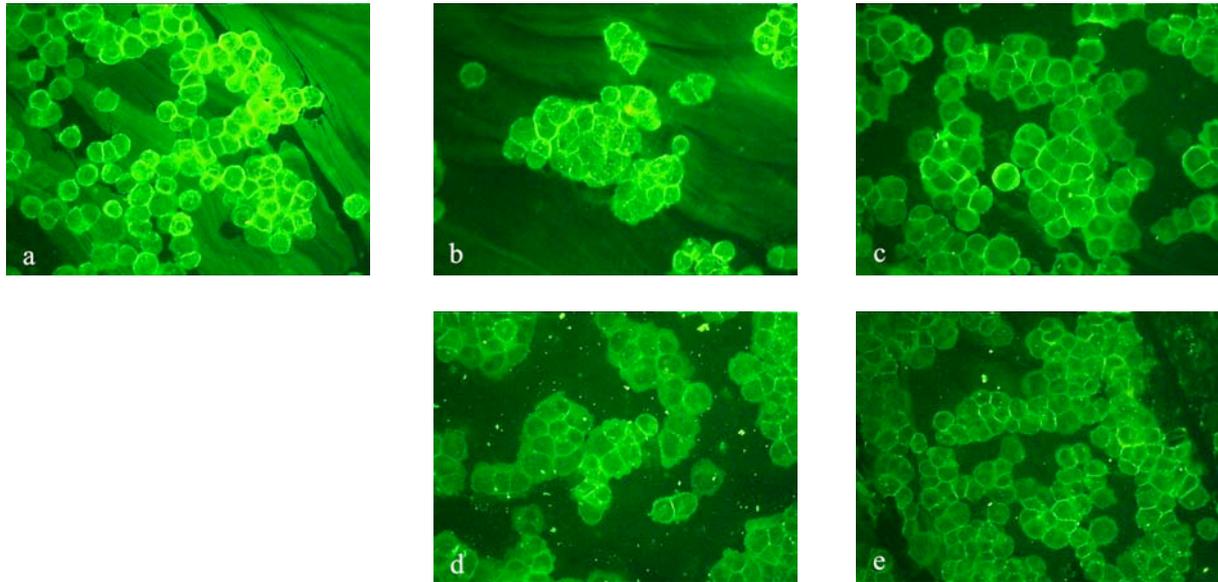


Abbildung 18: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid, Färbung mit einem Vimentin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

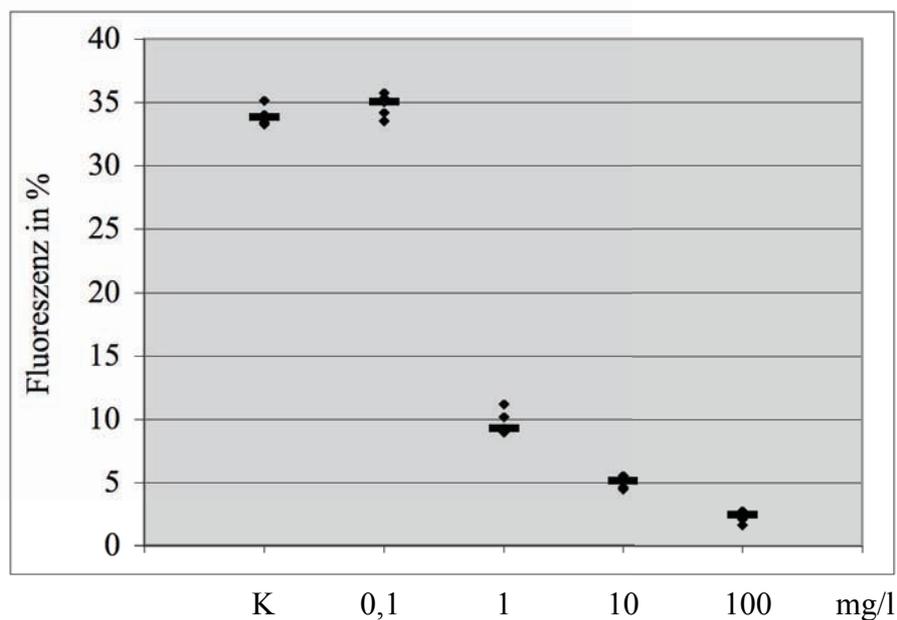


Abbildung 19: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Vimentin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Die abgebildeten Zellen der unbehandelten Kontrollen (a) zeigen eine starke Fluoreszenz. Auch bei der geringsten Linezolid-Konzentration von 0,1 mg/l (b) ist nach sieben Tagen Inkubation keine Fluoreszenzabnahme festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutliche Abnahme des Medians in den höheren Konzentrationen. In den Proben mit der höchsten Linezolid-Konzentration von 100 mg/l (e) ist bei den nachzuweisenden Proteinen Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und Vimentin fast keine Fluoreszenz mehr zu sehen. In den Proben mit einem Antikörper gegen die β_1 -Integrine ist diese Abnahme nicht so stark ausgeprägt, eine 50 % Fluoreszenz verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ist noch vorhanden. Der größte Sprung des Medians ist in den Bildern mit der Färbung gegen Vimentin zwischen den Konzentrationen 0,1 mg/l und 1 mg/l Linezolid zu sehen.

Zur Verdeutlichung sind alle immunhistologischen Ergebnisse der fünf Antikörper mit Linezolid in einer Grafik dargestellt:

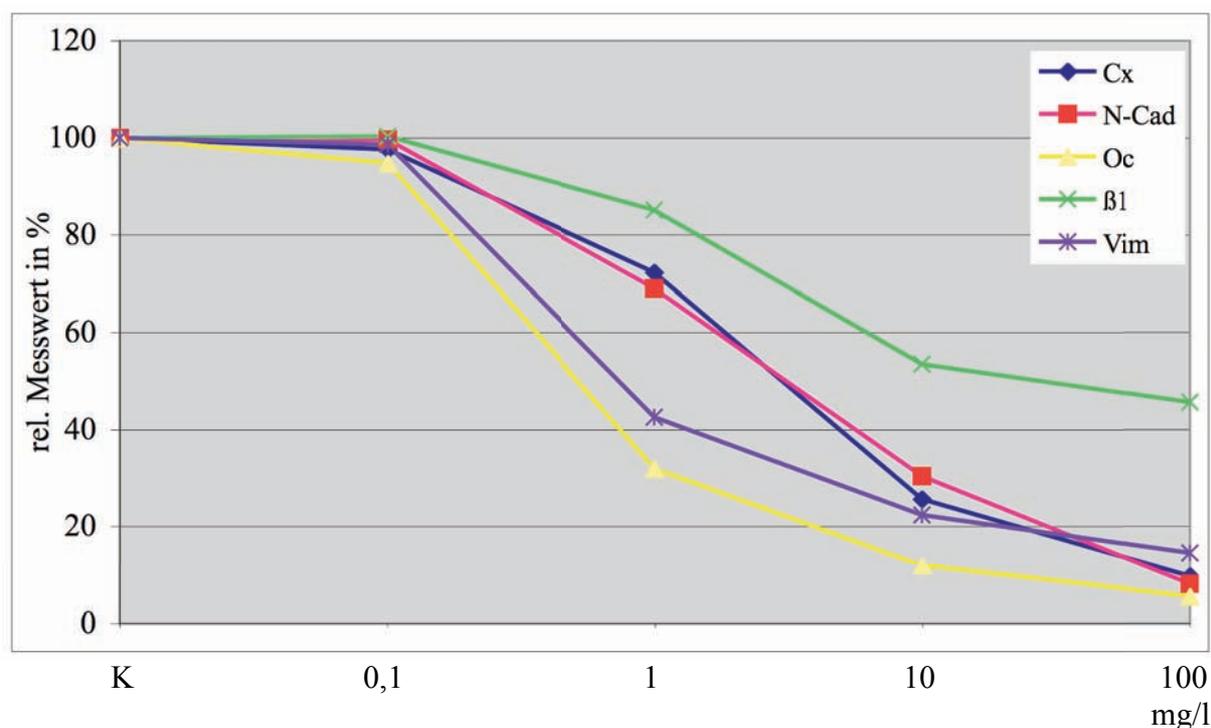


Abbildung 20: Grafische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse von Linezolid, abgebildet wurde die relative prozentuale Fluoreszenzabnahme der Antikörper Connexin 43 (Cx \blacklozenge), N-Cadherin (N-Cad \blacksquare), Occludin (Oc \blacktriangle), β_1 -Integrine (β_1 \times) und Vimentin (Vim \ast) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 mg/l

Wie in der Grafik zu sehen, hat Occludin nach sieben Tagen Inkubation mit Linezolid den stärksten Effekt und die β_1 -Integrine den geringsten.

3.3.2 Moxifloxacin

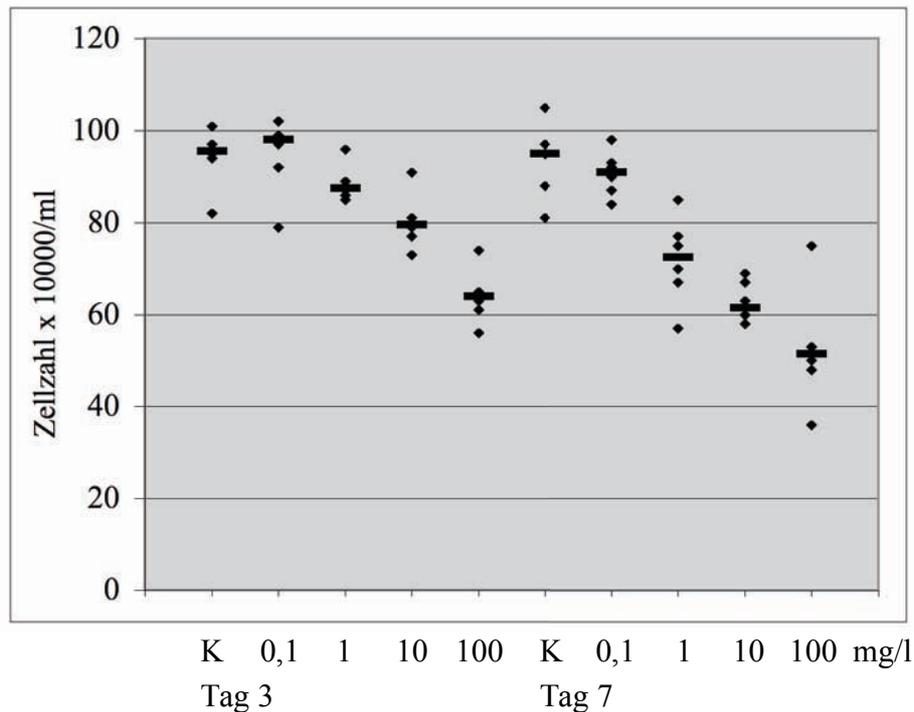


Abbildung 21: Grafische Darstellung der SerW₃-Zellzahl nach drei und sieben Tagen Inkubation mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K), abgebildet wurden sechs Zählungen pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Die Darstellung der Zellzahlen nach den Inkubationsintervallen von drei und sieben Tagen mit Moxifloxacin machen deutlich, dass es auch zu einer Abnahme der Zellzahlen in der höchsten Konzentration kommt, die aber nicht so ausgeprägt ist, wie bei den anderen antibiologisch wirksamen Stoffen Linezolid und Levofloxacin. Der Median der höchsten Konzentration von 100 mg/l Moxifloxacin sinkt um weniger als 50 % im Vergleich zum Median der Kontrolle. Die unbehandelte Kontrolle (K) und die niedrigste Konzentration von 0,1 mg/l verhielten sich untereinander über die Inkubationsintervalle in etwa gleich.

Connexin 43

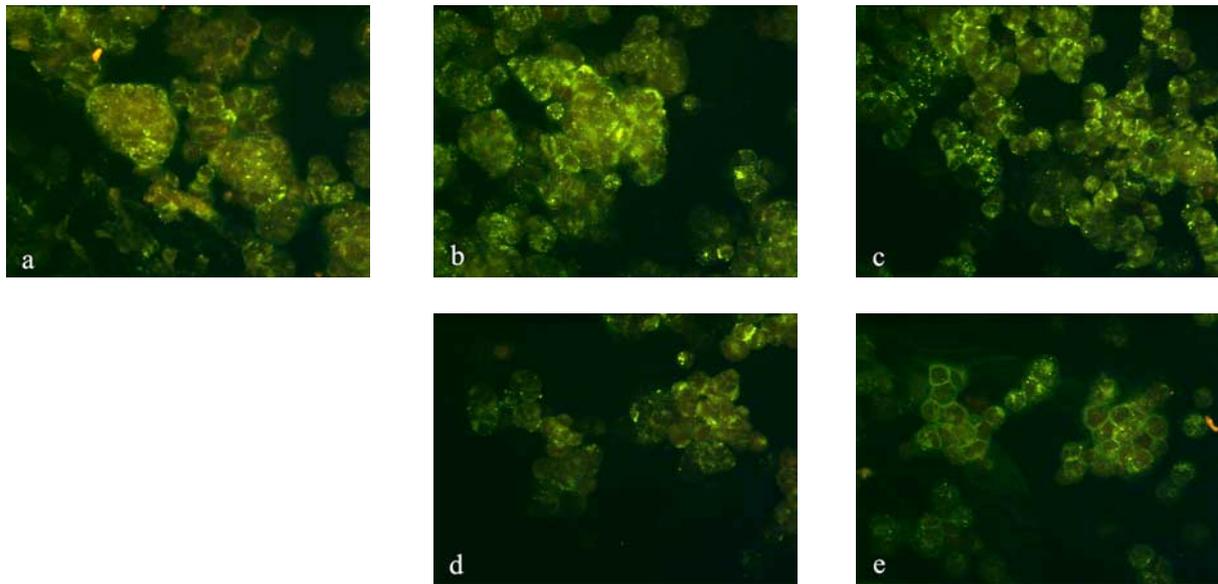


Abbildung 22: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin, Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

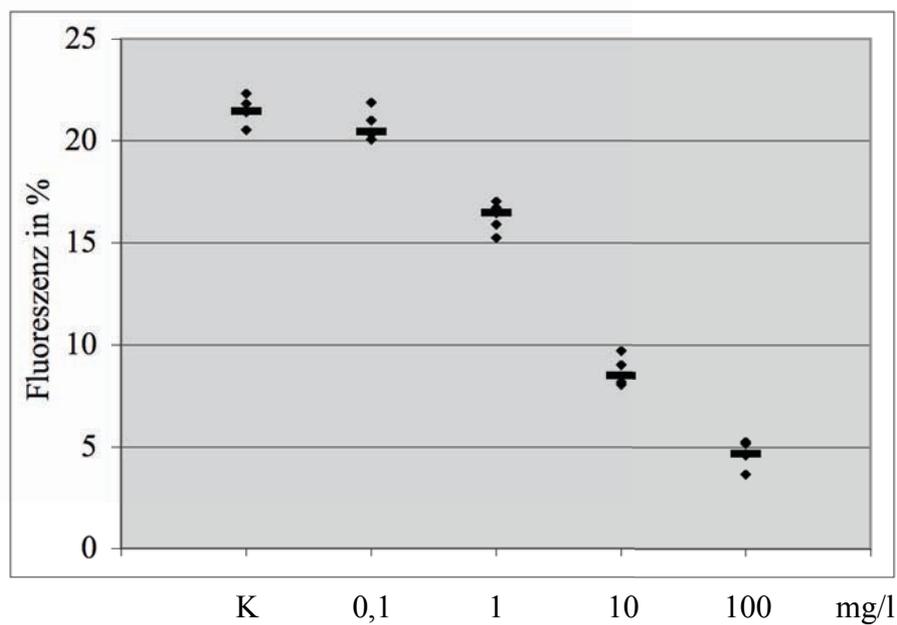


Abbildung 23: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

N-Cadherin

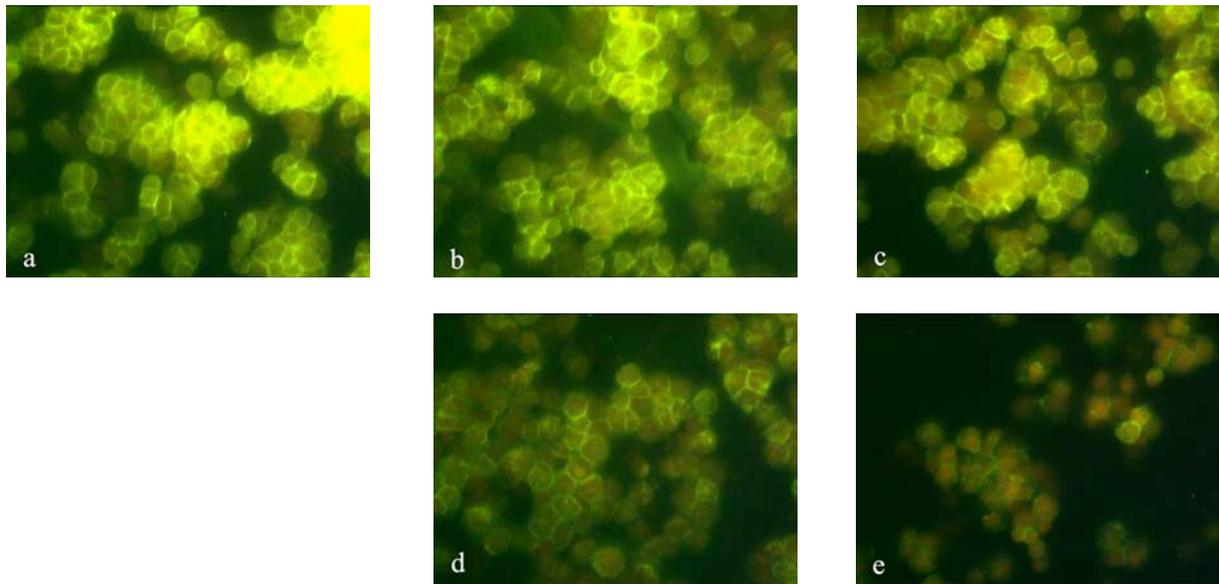


Abbildung 24: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin, Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

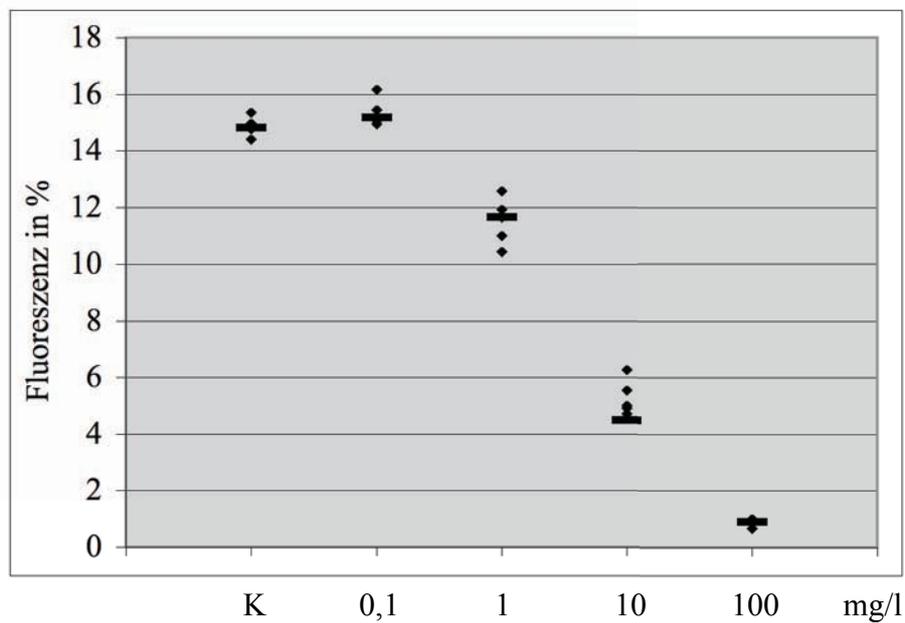


Abbildung 25: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

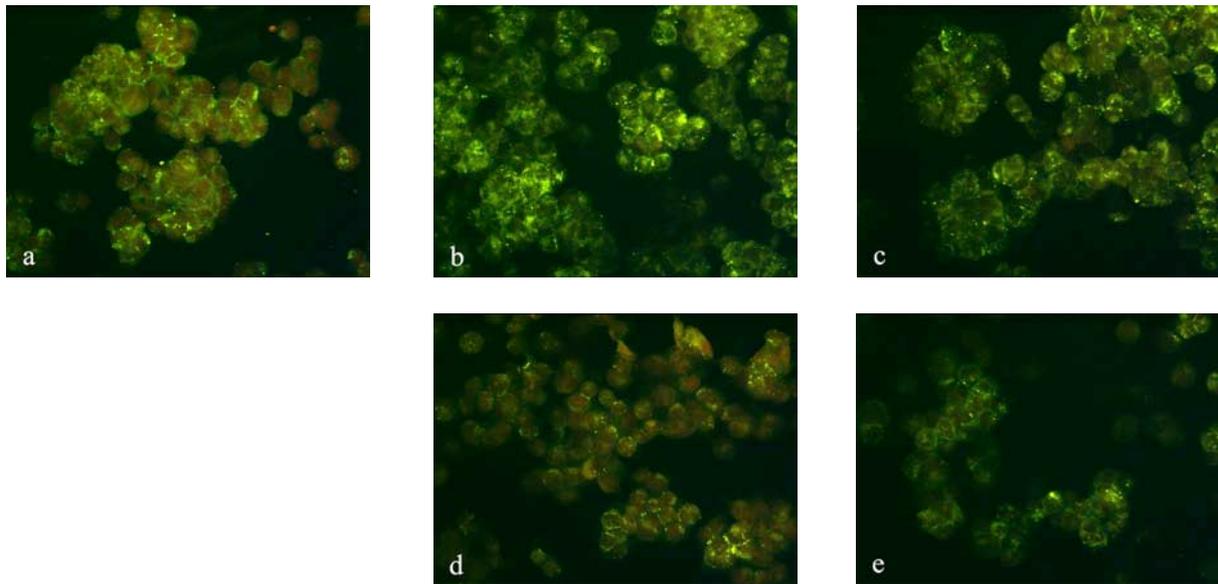
Occludin

Abbildung 26: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin, Färbung mit einem Occludin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

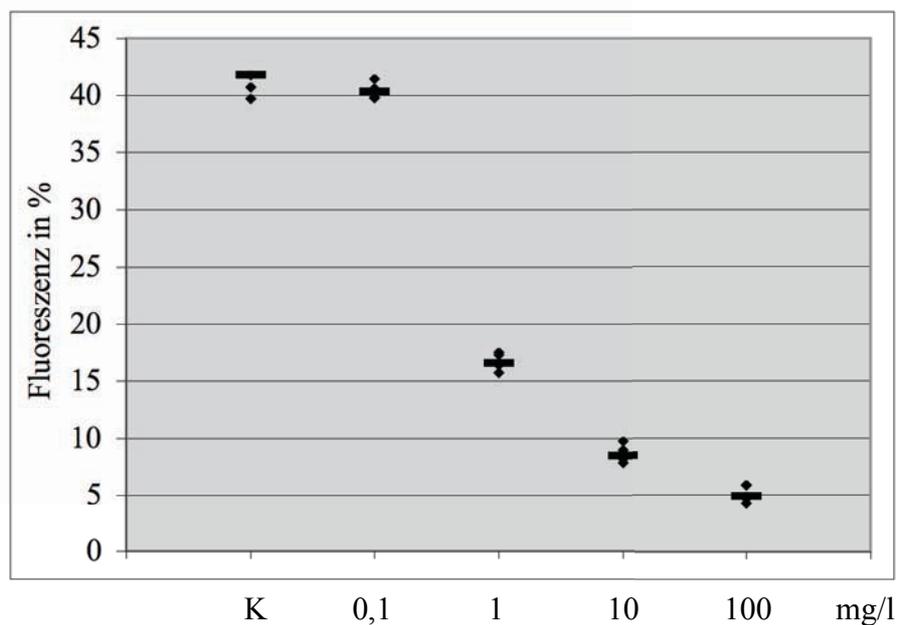


Abbildung 27: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Occludin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

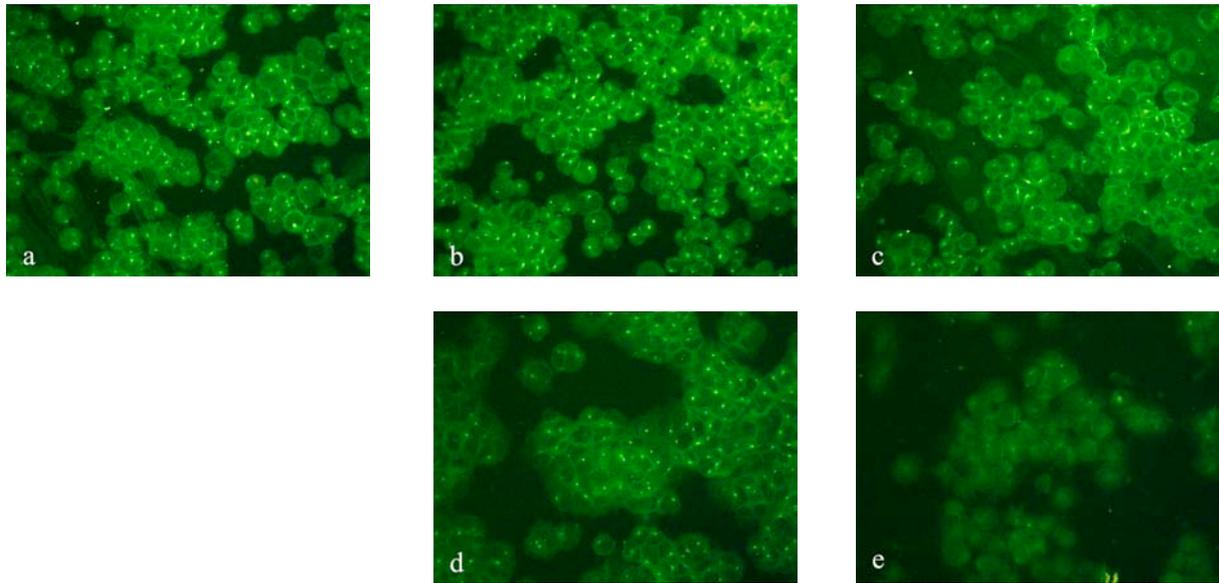
β_1 -Integrine

Abbildung 28: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin, Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

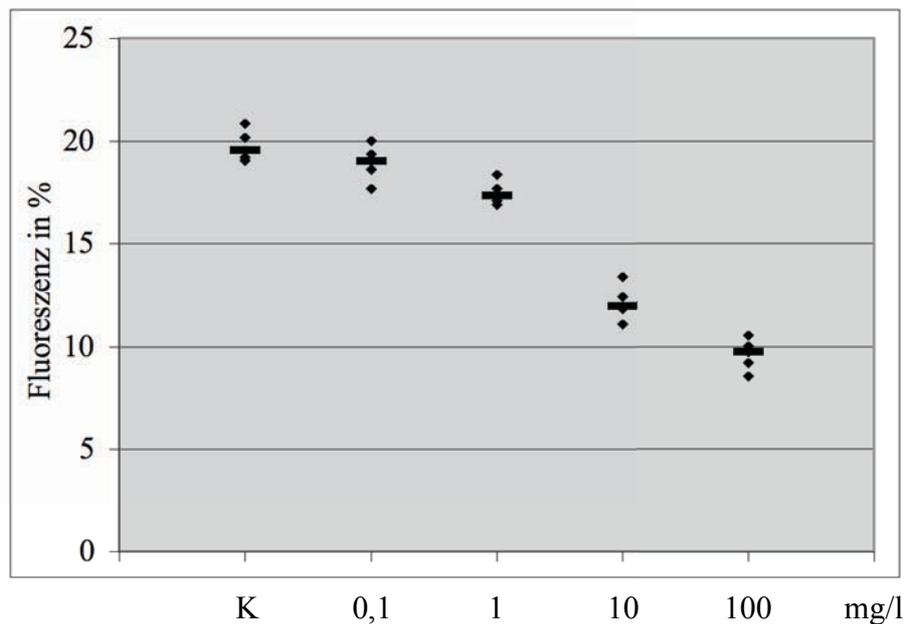


Abbildung 29: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

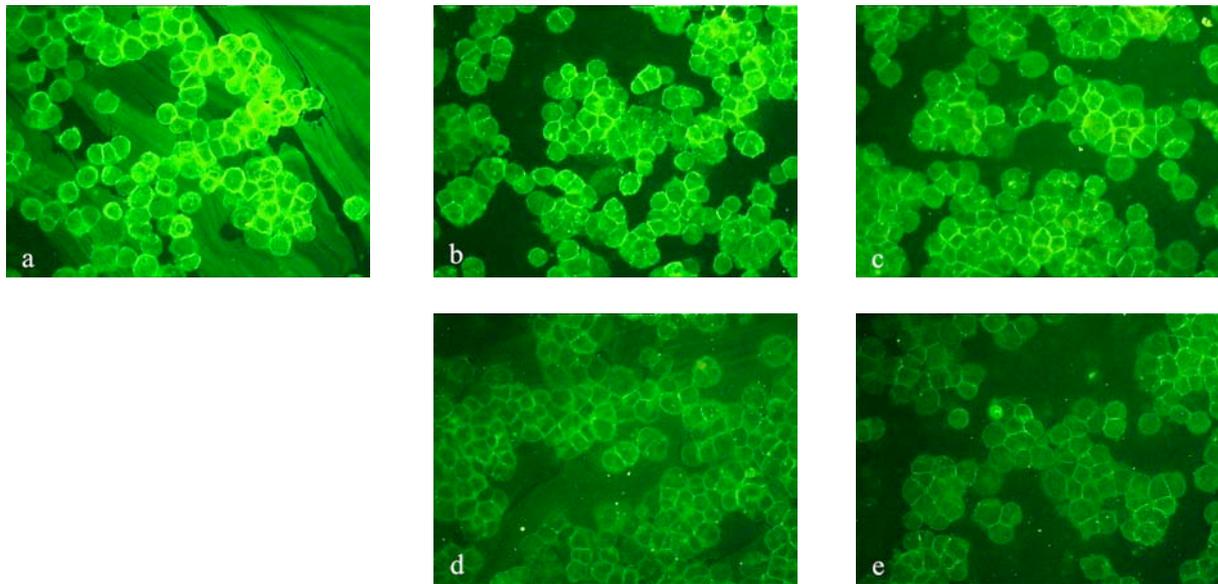
Vimentin

Abbildung 30: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin, Färbung mit einem Vimentin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

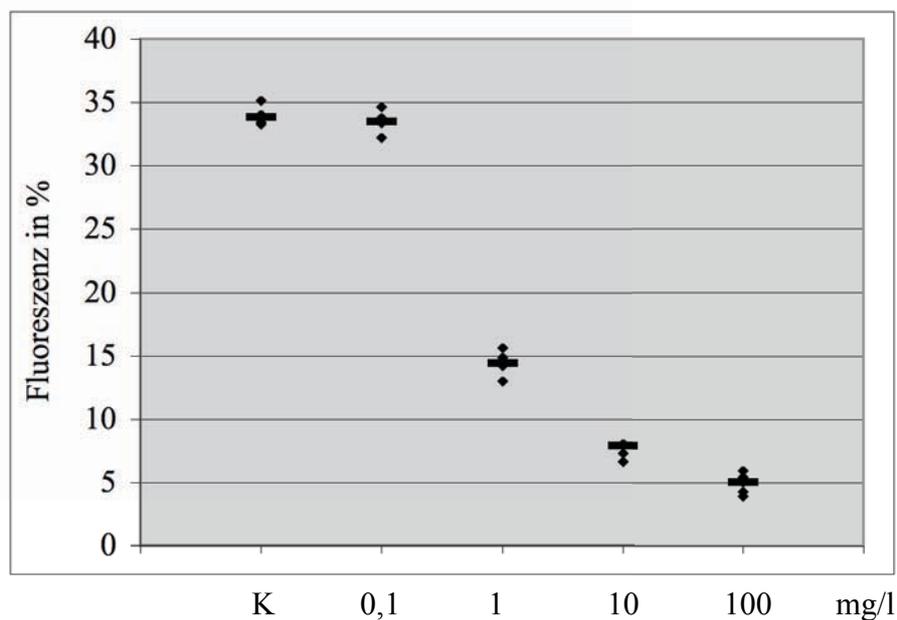


Abbildung 31: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Vimentin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Die gemessene Intensität der Immunfluoreszenz nach der Inkubation über sieben Tage mit Moxifloxacin zeigt ein deutliches Verblässen der Bilder in den hohen Konzentrationen. Zwischen der unbehandelten Kontrolle und der niedrigsten Konzentration mit 0,1 mg/l gibt es kaum Unterschiede im Median. Die Zellen, die mit einem Antikörper gegen Vimentin gefärbt wurden, zeigen einen deutlichen Abfall zwischen den Konzentrationen 0,1 mg/l und 1 mg/l, wie er auch schon bei der Inkubation mit Linezolid zu beobachten war. Trotzdem ist der Fluoreszenzrückgang bei den mit Moxifloxacin behandelten Zellen nicht so ausgeprägt. Der stärkste prozentuale Rückgang ist bei N-Cadherin zu beobachten, wie die unten dargestellte Grafik zeigt, in der die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz aller Antikörper gegenüber der Kontrolle dargestellt ist. Auch hier zeigt sich, dass die β_1 -Integrine die geringste Abnahme aufweisen.

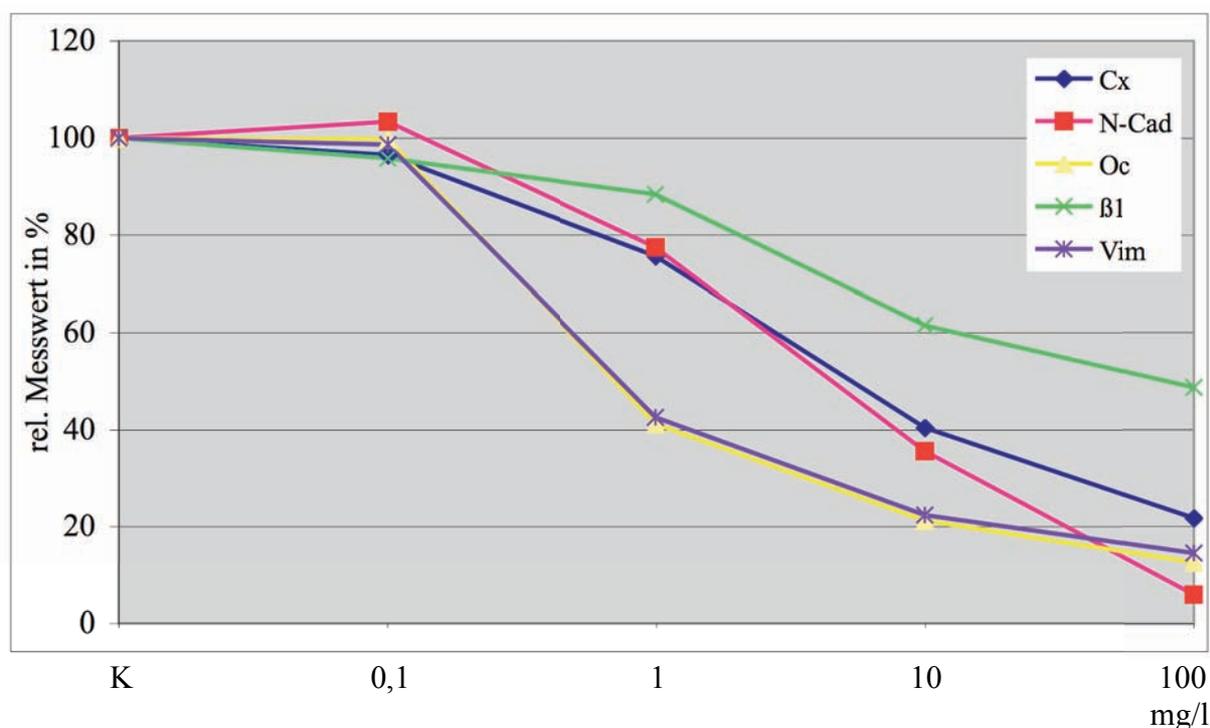


Abbildung 32: Grafische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse von Moxifloxacin, abgebildet wurde die relative prozentuale Fluoreszenzabnahme der Antikörper Connexin 43 (Cx ◆), N-Cadherin (N-Cad ■), Occludin (Oc ▲), β_1 -Integrine (β_1 ×) und Vimentin (Vim ✱) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 mg/l

3.3.3 Levofloxacin

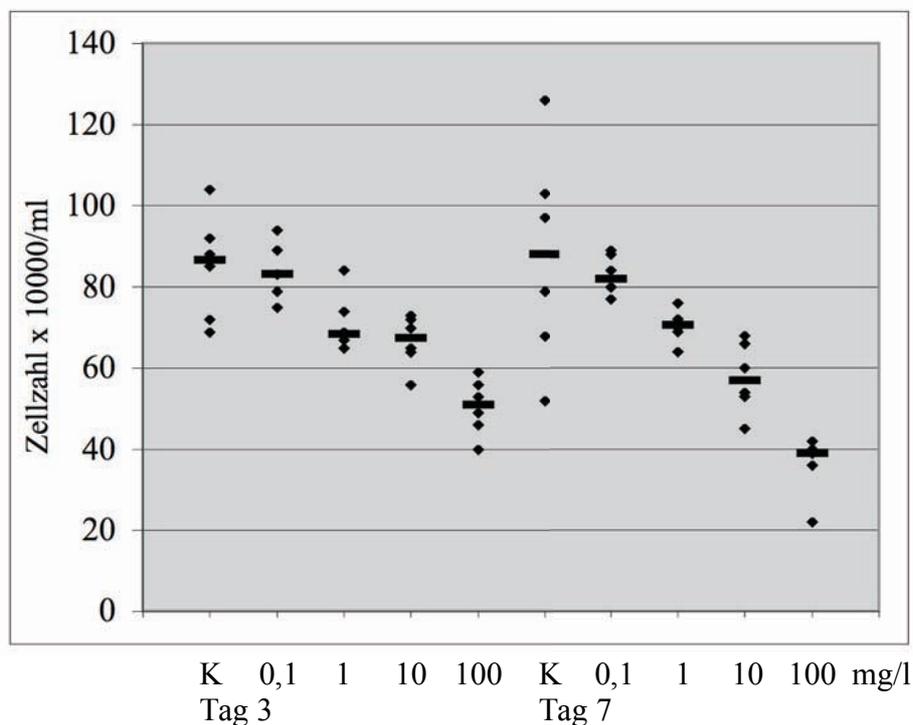


Abbildung 33: Grafische Darstellung der SerW₃-Zellzahl nach drei und sieben Tagen Inkubation mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K), abgebildet wurden sechs Zählungen pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Auch bei den mit Levofloxacin inkubierten Zellen ist die Abnahme der gezählten Zellen nach drei und sieben Tagen Inkubation deutlich an der Grafik abzulesen. Wieder verhalten sich die Mediane der unbehandelten Kontrolle (K) und der niedrigsten Konzentration von 0,1 mg/l Levofloxacin in etwa gleich, während der Median der Zellzahl von 100 mg/l um mehr als die Hälfte zurückgeht.

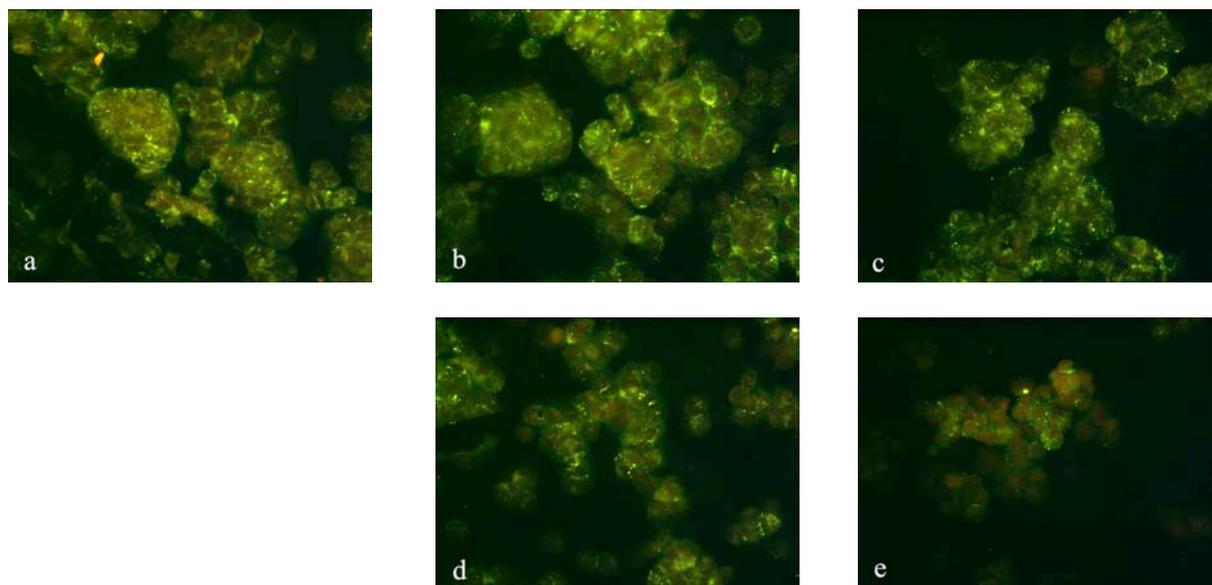
Connexin 43

Abbildung 34: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin, Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

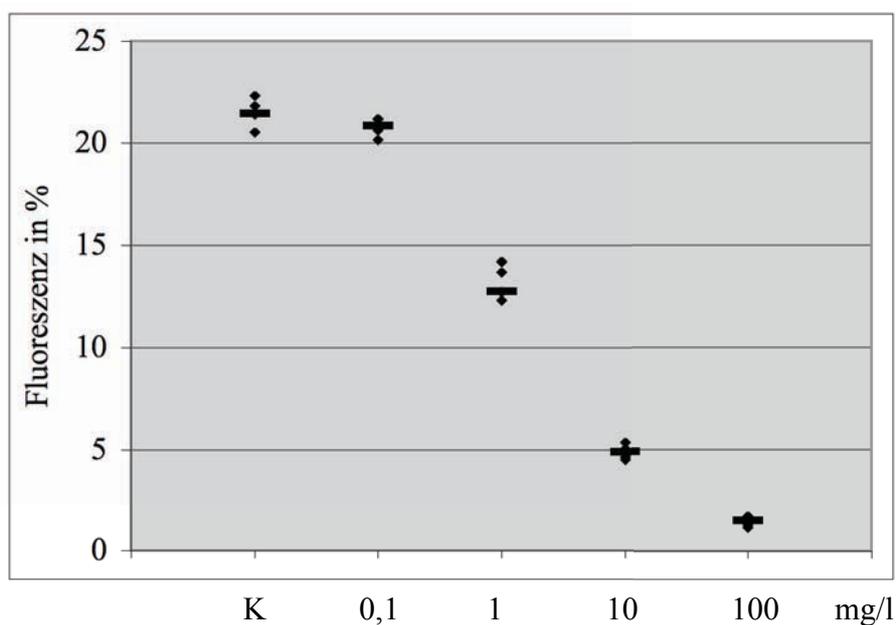


Abbildung 35: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

N-Cadherin

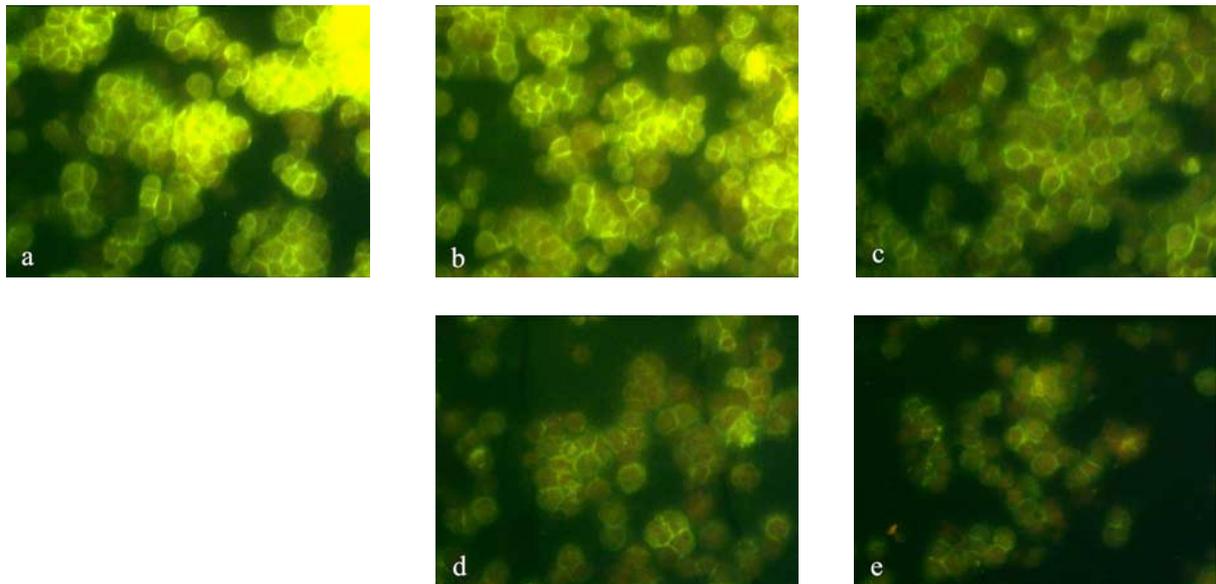


Abbildung 36: Immunhistologische Bilder nach siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin, Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

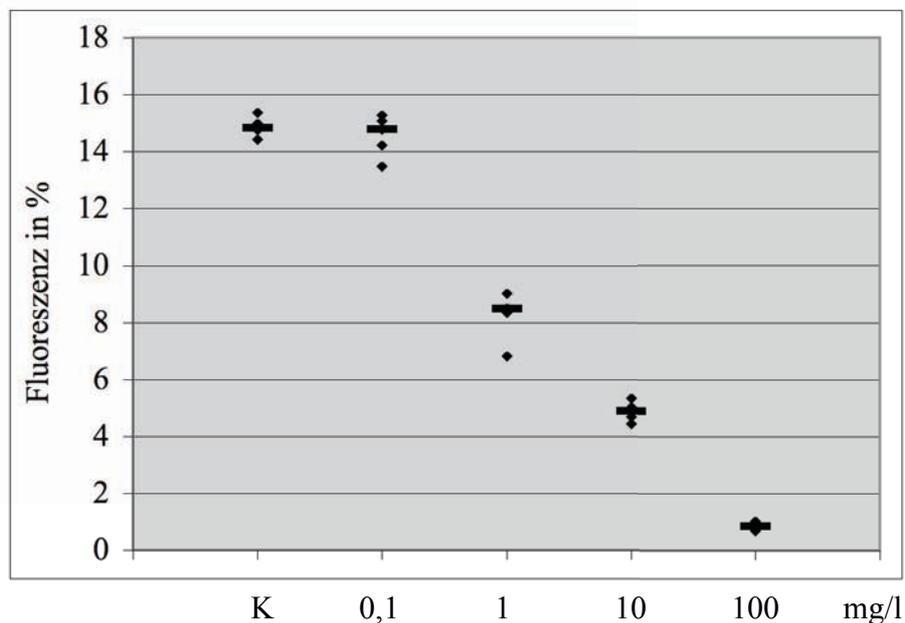


Abbildung 37: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

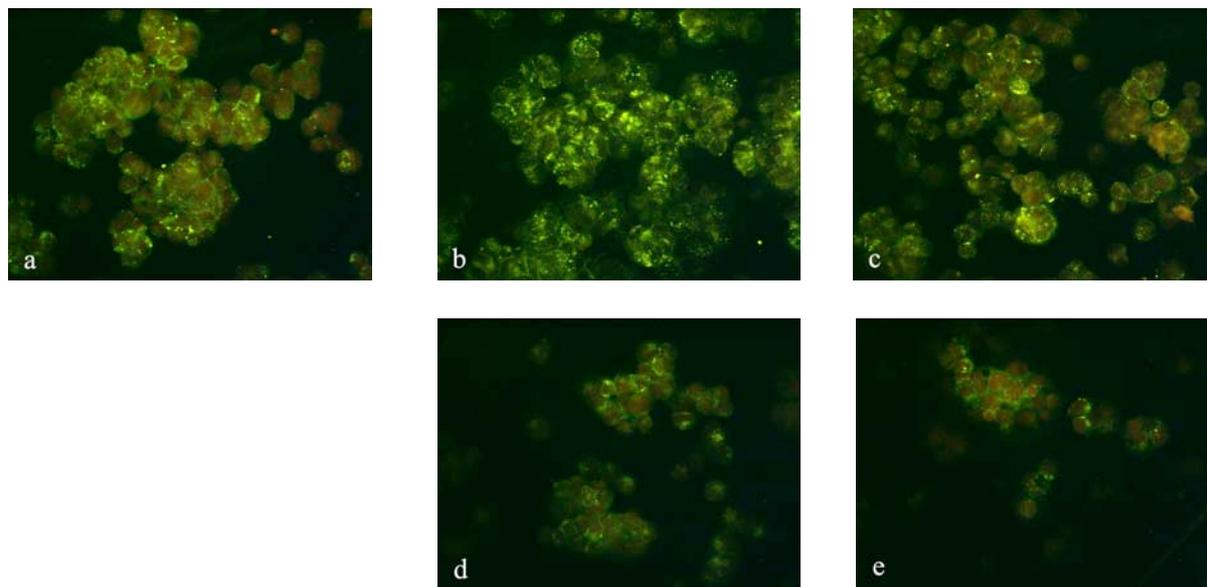
Occludin

Abbildung 38: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin, Färbung mit einem Occludin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

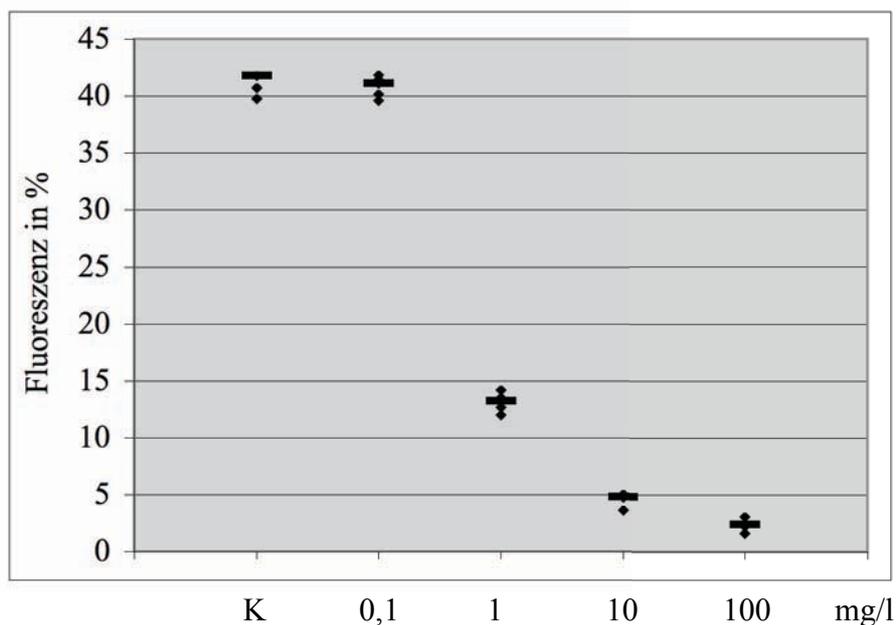


Abbildung 39: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Occludin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

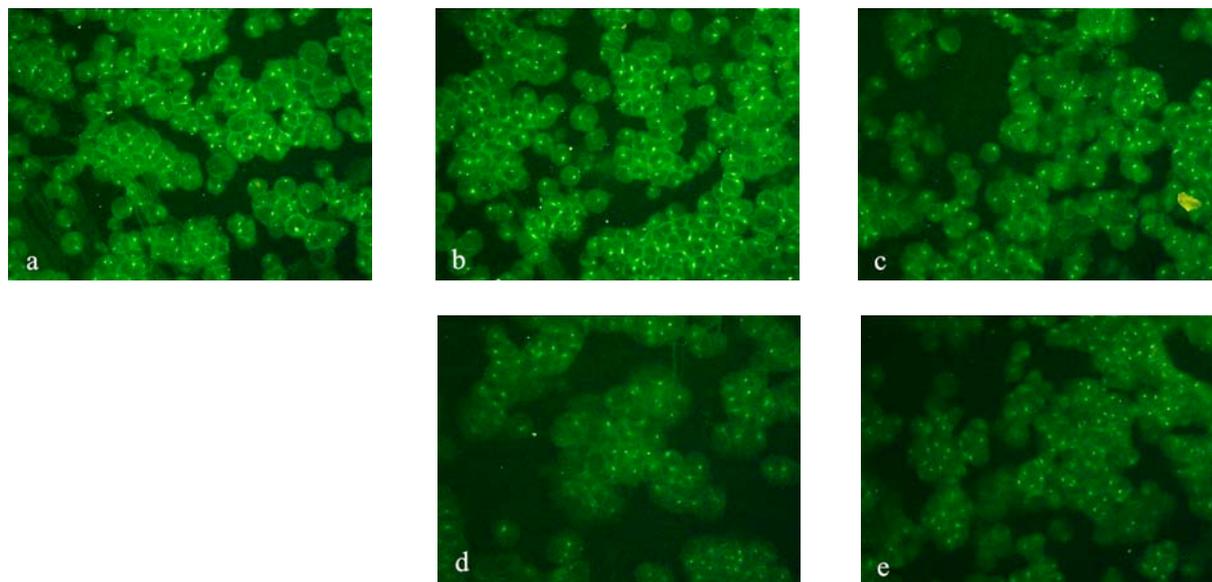
β_1 -Integrine

Abbildung 40: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin, Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

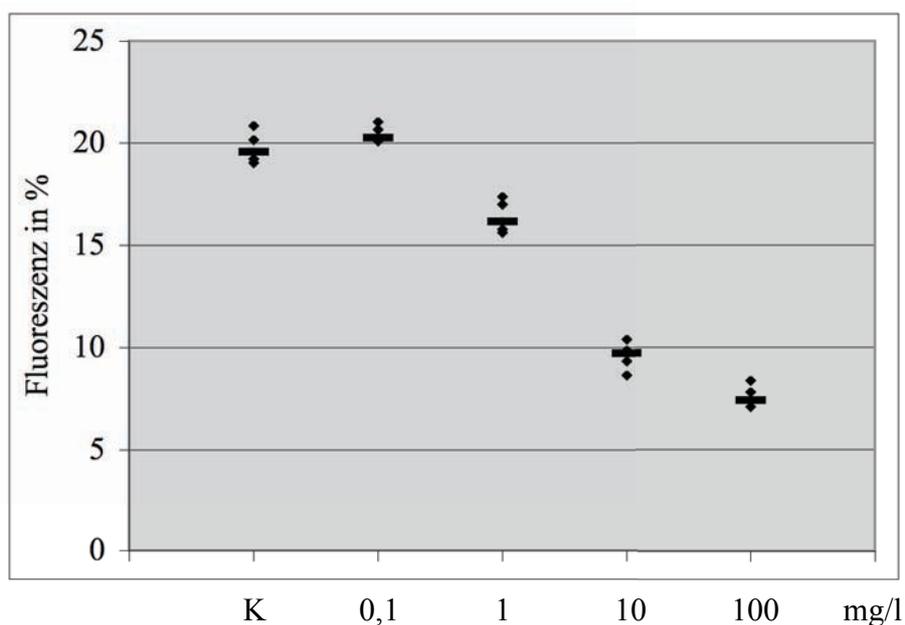


Abbildung 41: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Vimentin

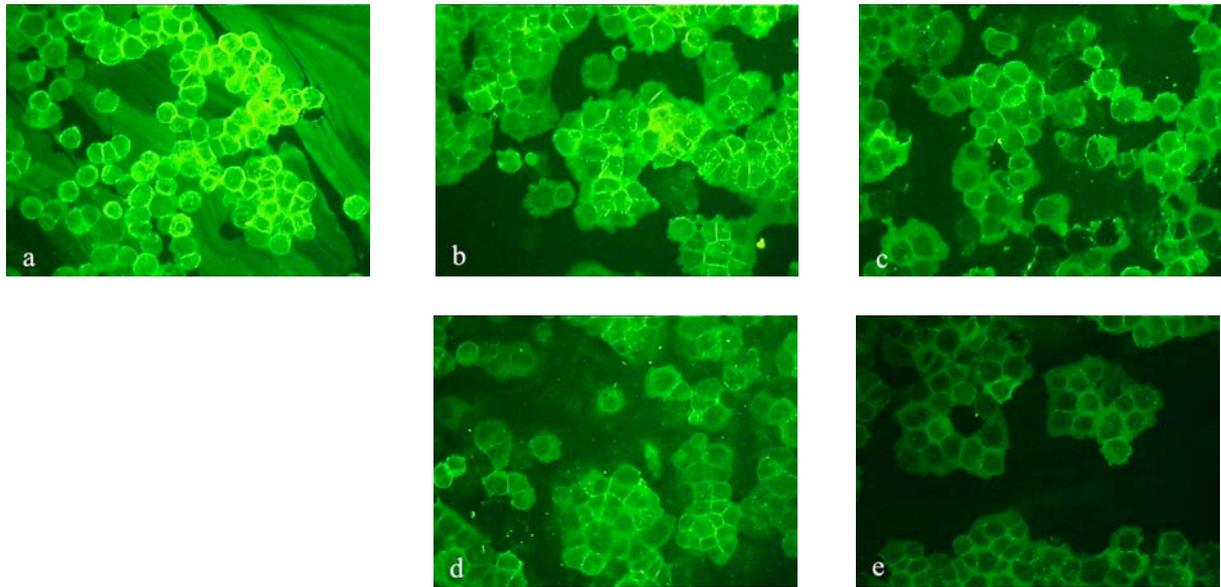


Abbildung 42: Immunhistologische Bilder nach sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin, Färbung mit einem Vimentin-Antikörper: (a) Kontrolle unbehandelt, (b) 0,1 mg/l, (c) 1 mg/l, (d) 10 mg/l, (e) 100 mg/l

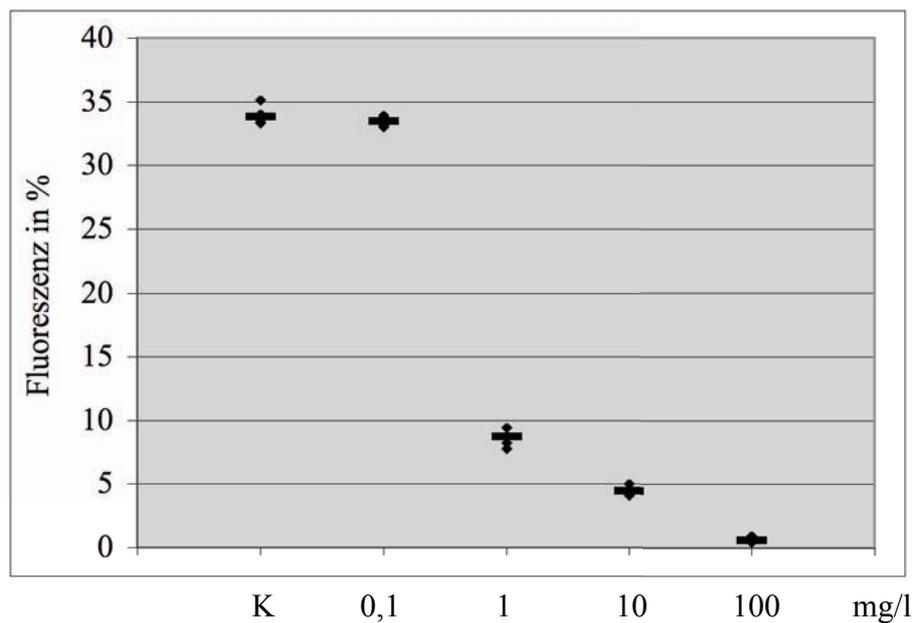


Abbildung 43: Grafische Darstellung der immunhistologischen Messwerte nach sieben Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l und Färbung mit einem Vimentin-Antikörper gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K), dargestellt sind fünf Messwerte pro Konzentration (◆) und der Median (—)

Auf den grafischen Darstellungen der Fluoreszenz der Immunhistologie nach sieben Tagen Inkubation mit Levofloxacin zeigt sich eine deutliche Abnahme des Medians ab der Konzentration von 1 mg/l (c). Wie bei Linezolid geht die Fluoreszenz bei fast allen Antikörpern bis zur höchsten Konzentration von 100 mg/l (e) fast vollständig zurück. Nur bei der Färbung mit einem Antikörper gegen die β_1 -Integrine geht die Fluoreszenz nur um ca. zwei Drittel zurück, wie es auch bei den anderen getesteten Stoffen schon beobachtet wurde. Der größte Abfall des Medians ist bei der Färbung mit Vimentin zwischen den Konzentrationen 0,1 mg/l (b) und 1 mg/l (c) Levofloxacin festzustellen. Auch bei Levofloxacin ist kein wesentlicher Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle (a) und der geringsten Konzentration von 0,1 mg/l (b) zu verzeichnen. Diese Beobachtungen gehen auch aus der Abbildung 44 hervor, in der die relative Abnahme aller getesteten Antikörper in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt wurde. Es ist deutlich zu sehen, dass der Effekt bei den β_1 -Integrinen nicht so stark ist wie bei den anderen Proteinen. Die Kontrolle und die niedrigste Konzentration verhalten sich in etwa gleich. Der größte Sprung ist zwischen den Konzentrationen 0,1 und 1 mg/l Levofloxacin zu beobachten.

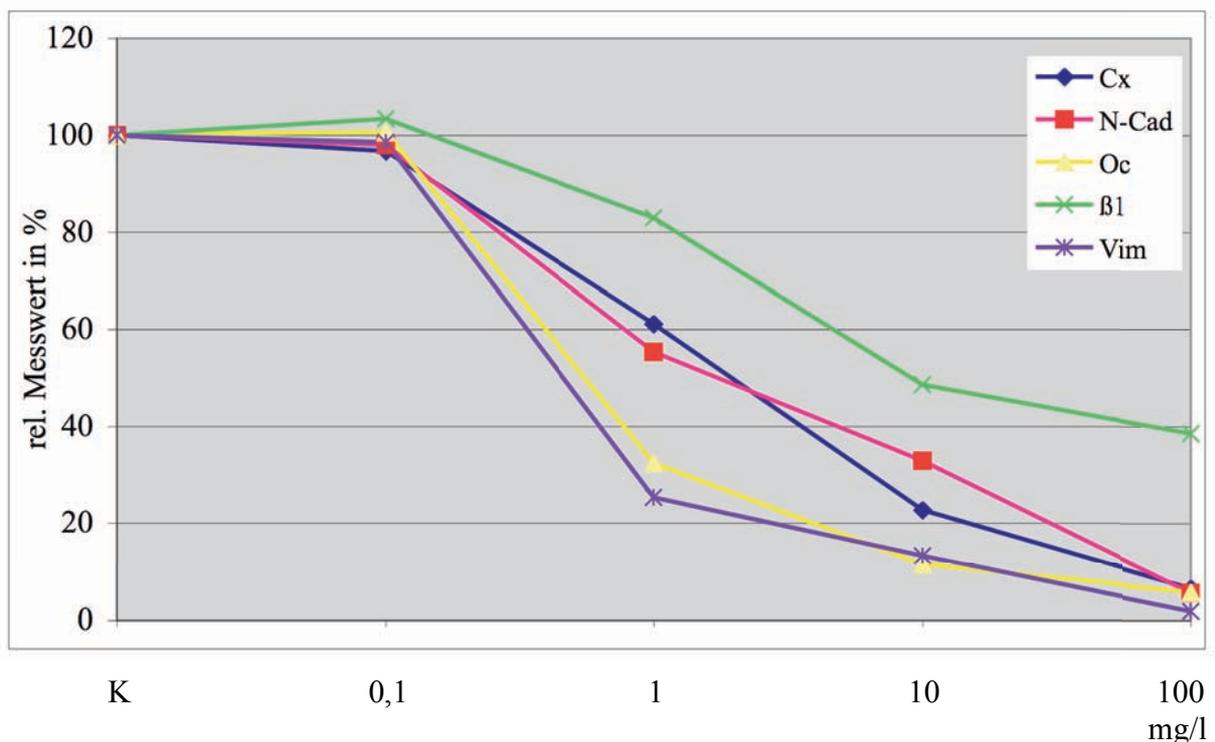


Abbildung 44: Grafische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse von Levofloxacin, abgebildet wurde die relative prozentuale Fluoreszenzabnahme der Antikörper Connexin 43 (Cx ◆), N-Cadherin (N-Cad ■), Occludin (Oc ▲), β_1 -Integrine (β_1 ×) und Vimentin (Vim ✱) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 mg/l

3.4 Western Blot Analyse

Die Effekte, die in der Immunhistologie durch Linezolid, Levofloxacin und Moxifloxacin auf die SerW₃-Zellen gesehen wurden, sollten mit Hilfe der Western Blot Analyse bestätigt werden. Die Versuchsdurchführung wurde beibehalten, es wurden dieselben vier Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 mg/l im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle eingesetzt. Zusätzlich zum Endzeitpunkt nach sieben Tagen wurden noch Proben nach drei Tagen gewonnen, um eine mögliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit nachzuweisen. Zur Markierung wurden vier Antikörper gegen Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und β_1 -Integrine eingesetzt. Jede Western Blot Analyse wurde dreimal wiederholt. Es sind jeweils die Einzelwerte (◆) und der Median (—) dargestellt. Nachfolgend ist eine Membran exemplarisch für die drei Wiederholungen abgebildet.

Connexin 43

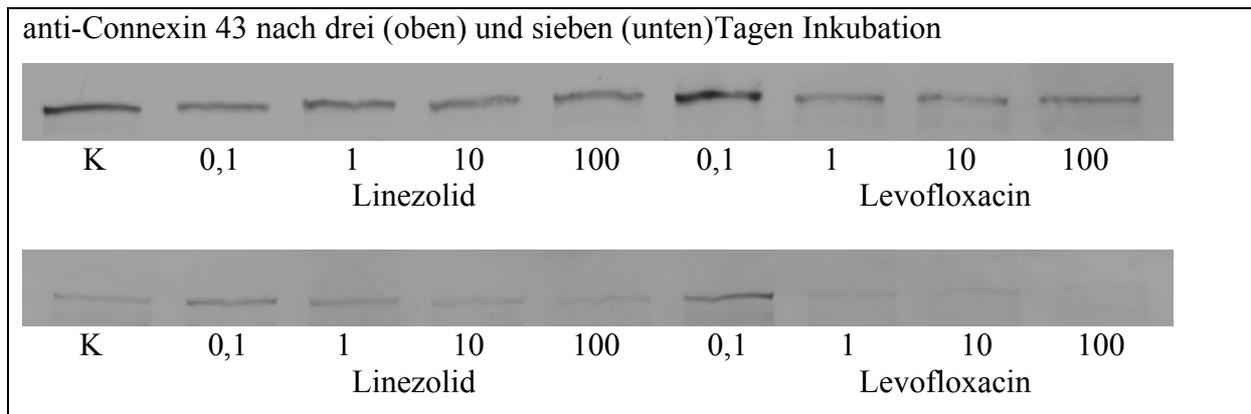


Abbildung 45: Western Blot Analyse, Linezolid und Levofloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen Connexine 43 (43 kD)

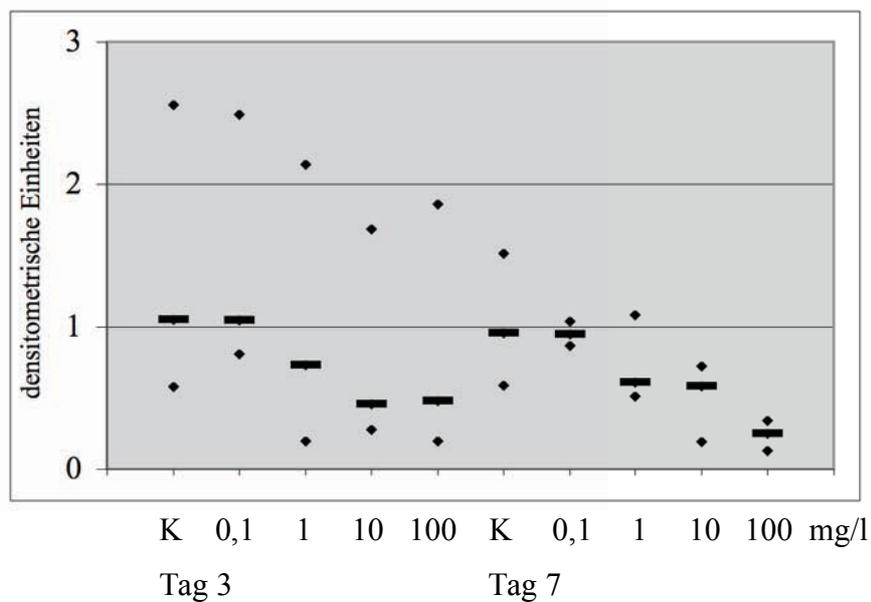


Abbildung 46: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

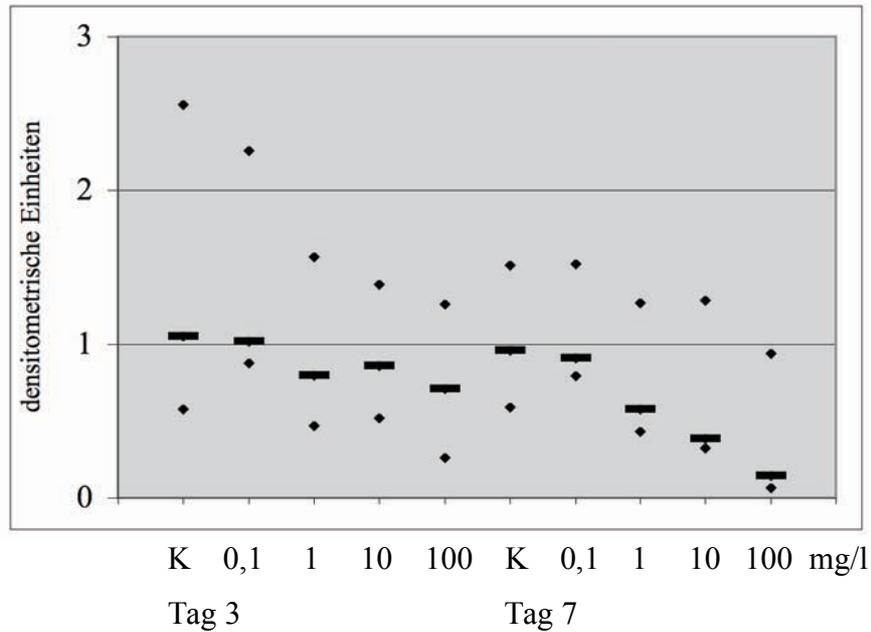


Abbildung 47: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und sieben-tägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

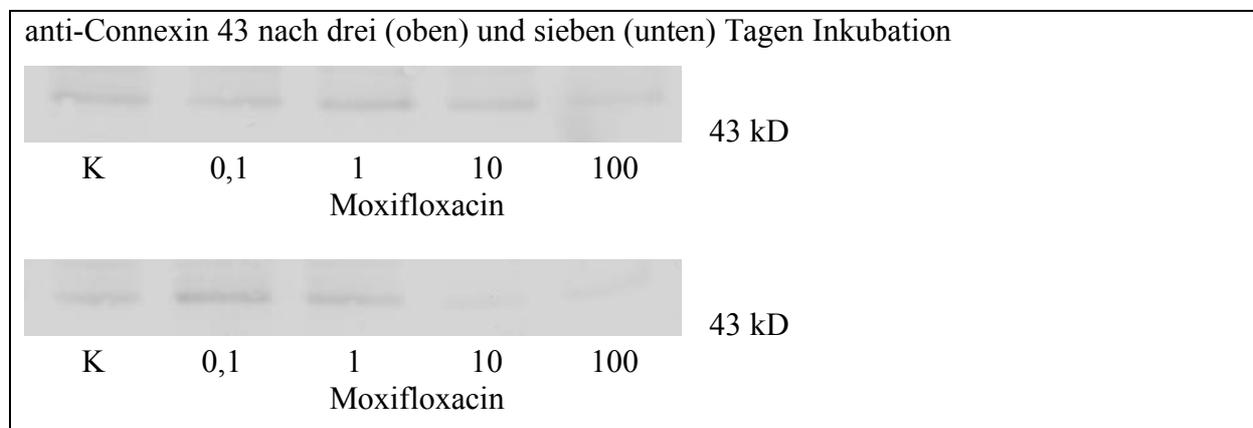


Abbildung 48: Western Blot Analyse, Moxifloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43 (43 kD)

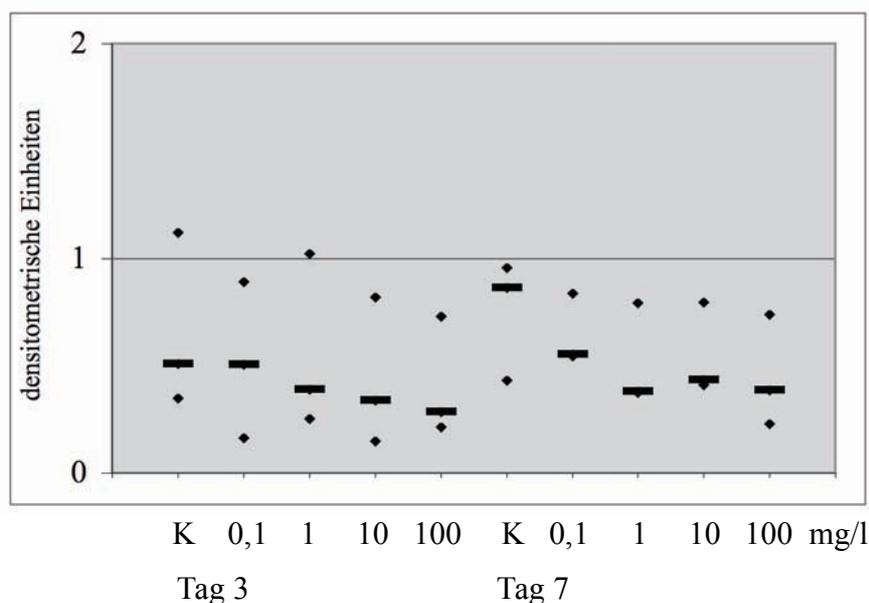


Abbildung 49: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Connexin 43-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

Untersucht wurde die Wirkung der drei antibiotisch wirksamen Stoffe Linezolid, Moxifloxacin und Levofloxacin auf die SerW₃-Zellen nach drei- und siebentägiger Inkubation in Bezug auf das Protein Connexin 43. Nach drei Tagen ist bei den Chinolonen nur eine geringe Abnahme des Medians zu beobachten, bei Linezolid geht der Median des Proteins schon nach drei Tagen um ca. 50 % bei der hohen Konzentration von 100 mg/l zurück. Zwischen der unbehandelten Kontrolle und der geringsten Konzentration von 0,1 mg/l ist fast kein Unterschied der Mediane feststellbar. Nach sieben Tagen ist bei Linezolid und Levofloxacin in der höchsten Konzentration von 100 mg/l fast kein Protein mehr nachweisbar. Bei Moxifloxacin reduziert sich der Median von Connexin 43 in der höchsten Konzentration um ca. 50 %.

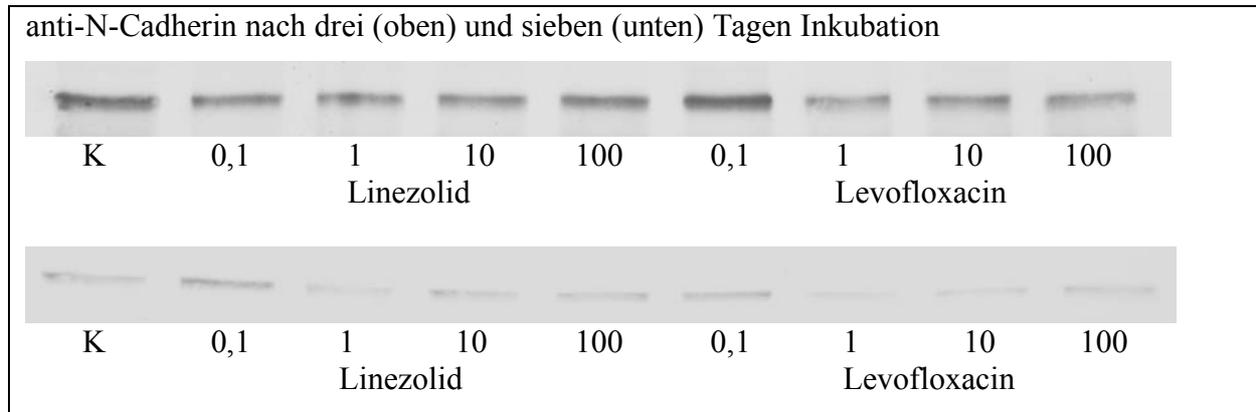
N-Cadherin

Abbildung 50: Western Blot Analyse, Linezolid und Levofloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin (130 kD)

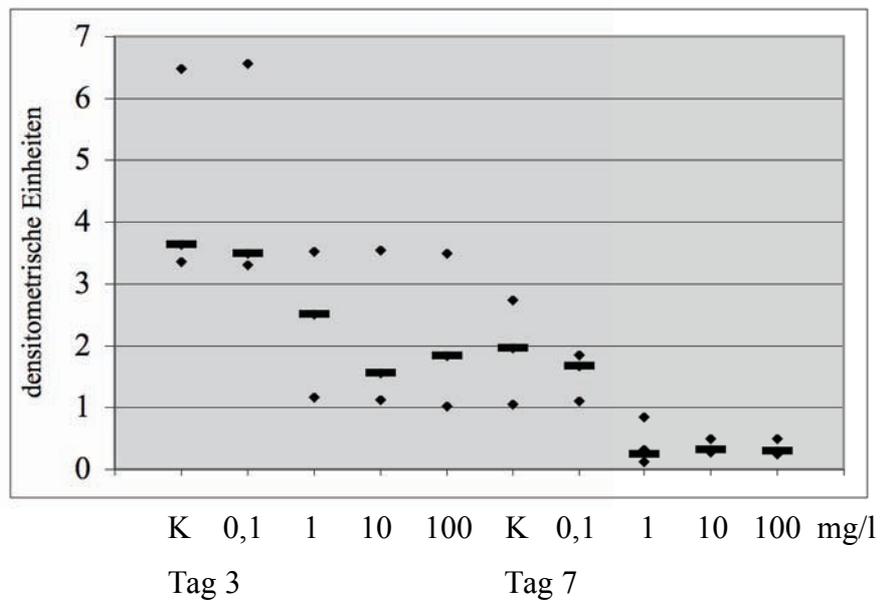


Abbildung 51: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

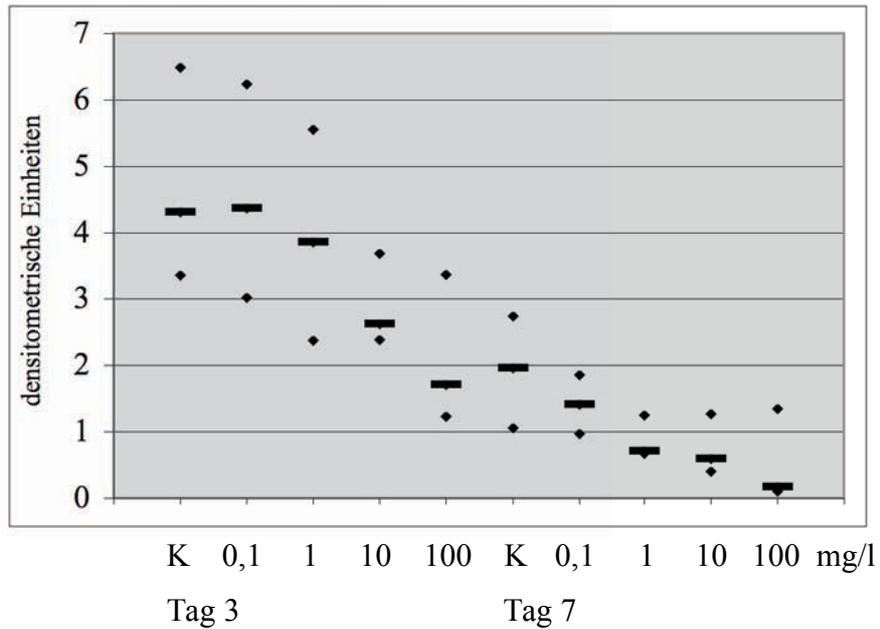


Abbildung 52: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

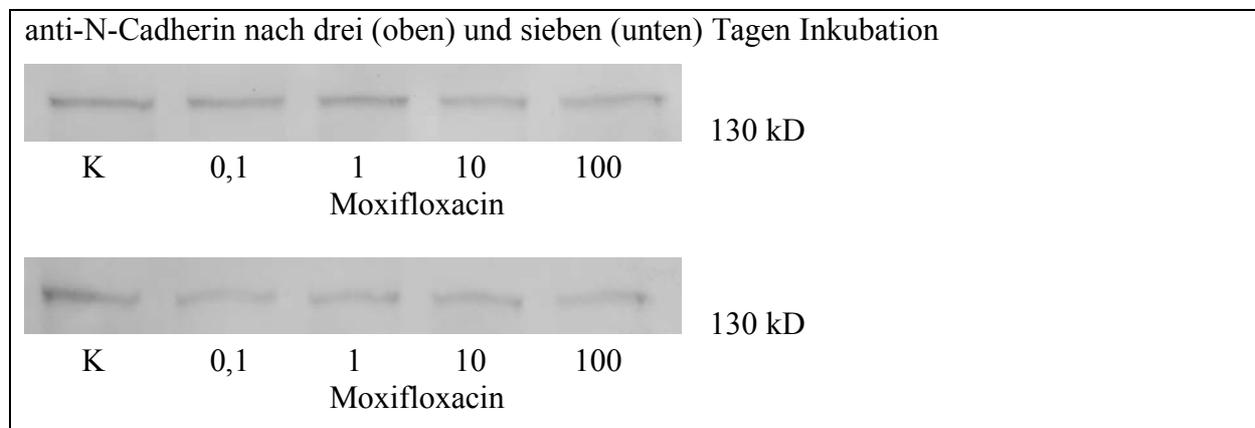


Abbildung 53: Western Blot Analyse, Moxifloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin (130 kD)

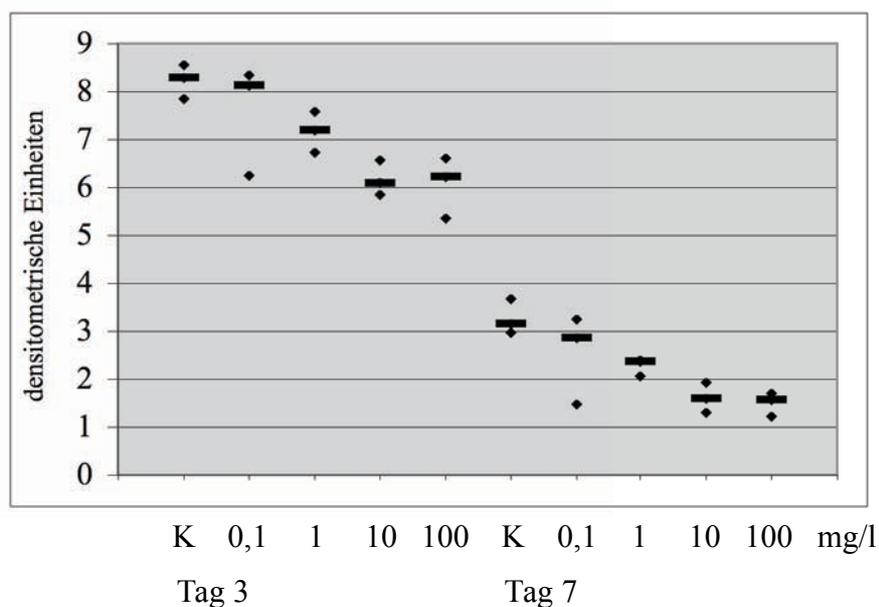


Abbildung 54: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem N-Cadherin-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

Die Effekte der antibiotisch wirksamen Stoffe auf das Protein N-Cadherin sind ähnlich wie bei Connexin 43. Zwischen den Banden der Kontrolle und der niedrigsten Konzentration besteht im Median wieder kaum ein Unterschied, weder nach drei noch nach sieben Tagen. Wieder entsteht ein deutlicher Sprung zur Konzentration von 1 mg/l, bei Linezolid geht die Intensität der Bande fast vollständig zurück. Bei Moxifloxacin sind wie in der Immunhistologie die Effekte nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen beiden antibiotisch wirksamen Stoffen. Im Vergleich zur Kontrolle nimmt der Median um die Hälfte bei der höchsten Konzentration von 100 mg/l Moxifloxacin ab.

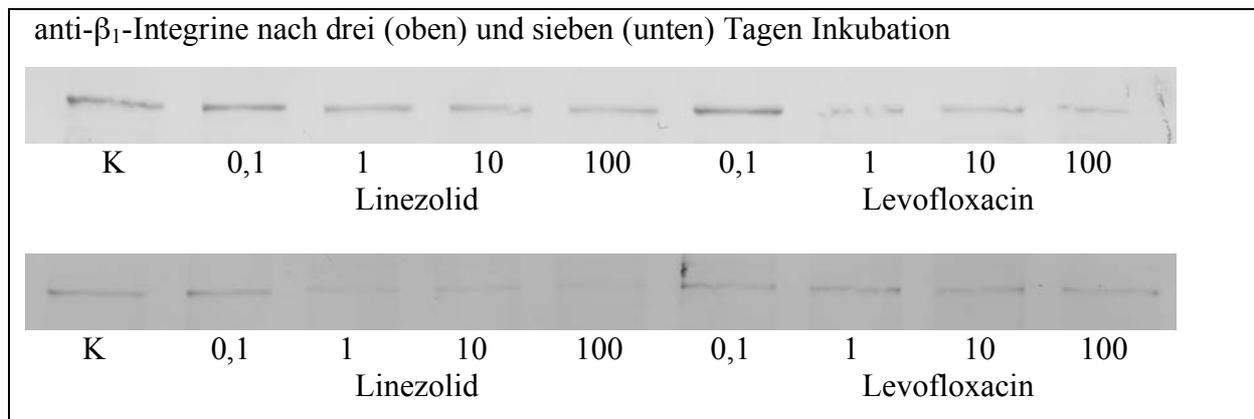
β_1 -Integrine

Abbildung 55: Western Blot Analyse, Linezolid und Levofloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine (130 kD)

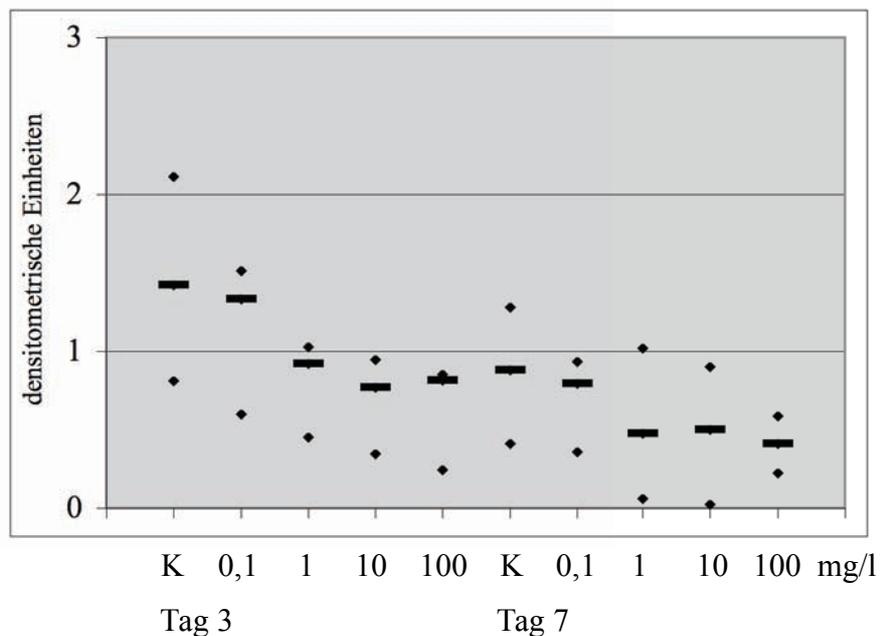


Abbildung 56: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

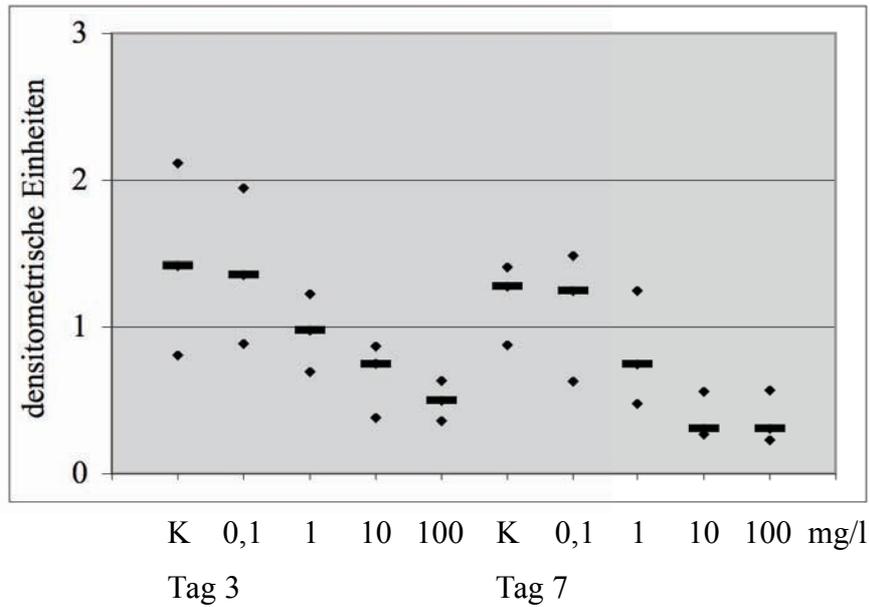


Abbildung 57: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (\blacklozenge), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

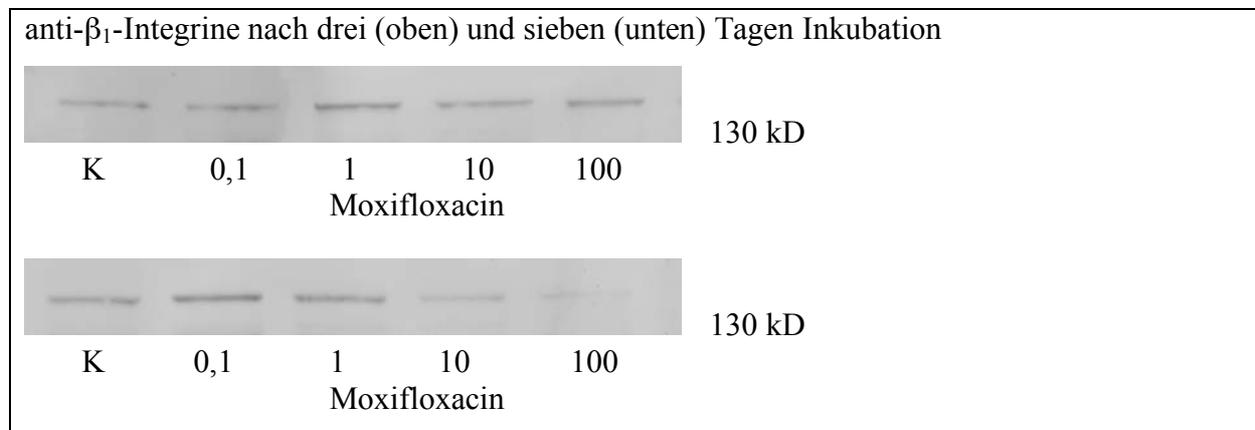


Abbildung 58: Western Blot Analyse, Moxifloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine (130 kD)

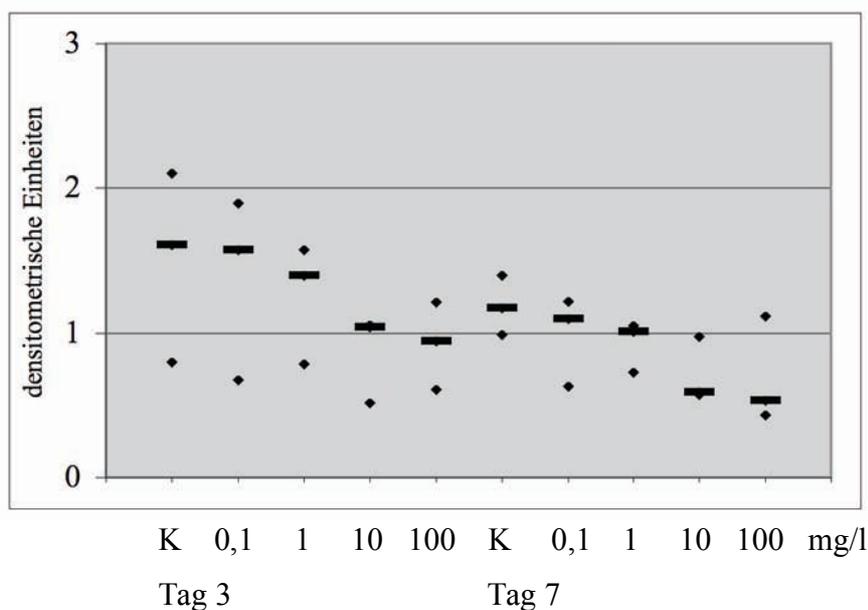


Abbildung 59: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem β_1 -Integrine-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

Wie schon in der Immunhistologie beobachtet, sind die Effekte der drei Stoffe auf die β_1 -Integrine nicht so ausgeprägt, wie auf die anderen Proteinen. Zwar ist auch ein deutlicher Rückgang des Medians besonders nach sieben Tagen zu sehen, aber die Intensität der Banden bleibt auch bei der höchsten Konzentration von 100 mg/l sichtbar über Null. Der Sprung im Median zwischen den Konzentrationen 0,1 mg/l und 1 mg/l ist nicht so ausgeprägt, wie bei den anderen Proteinen. Die Kontrolle und die niedrigste eingesetzte Konzentration verhalten sich wieder etwa gleich, auch am Ende der Inkubationszeit nach sieben Tagen.

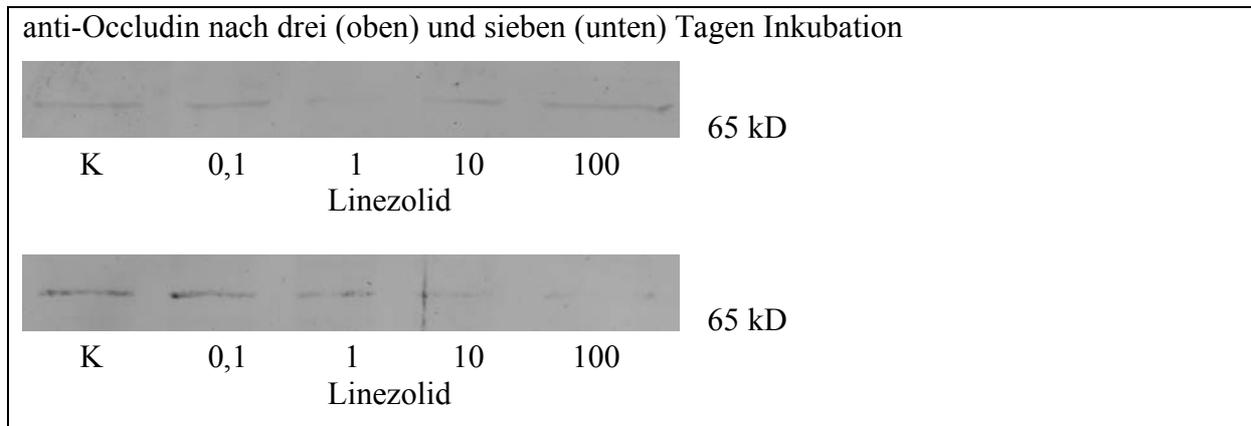
Occludin

Abbildung 60: Western Blot Analyse, Linezolid nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin (65 kD)

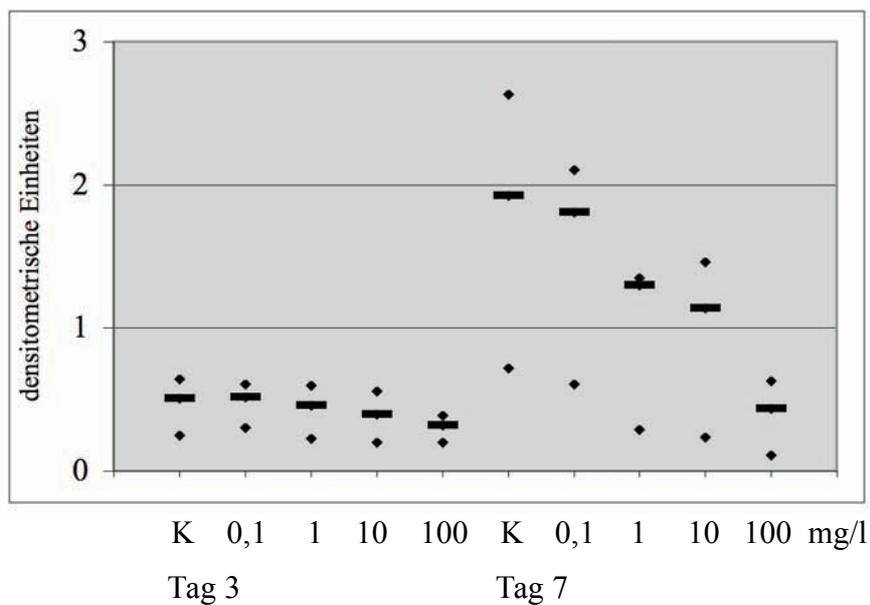


Abbildung 61: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Linezolid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Occludin-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

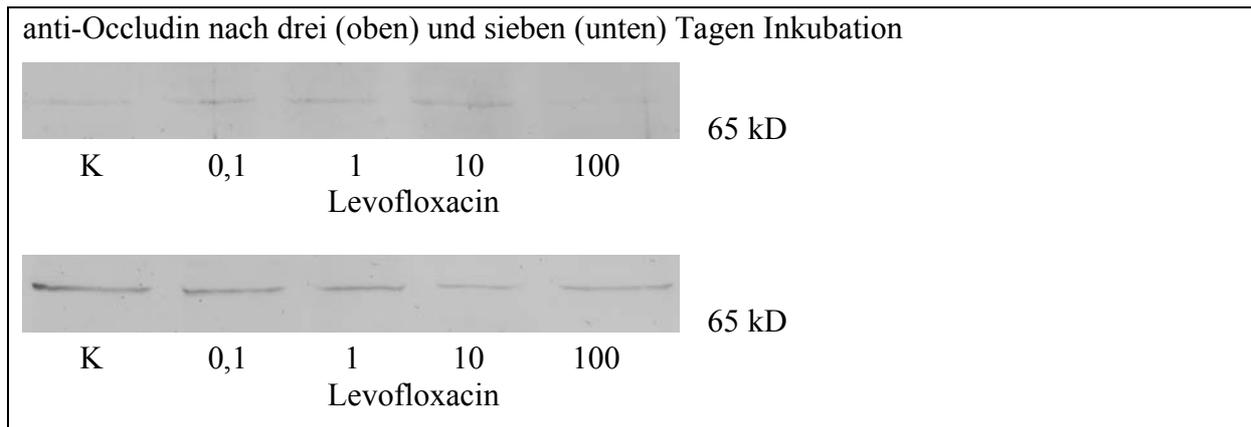


Abbildung 62: Western Blot Analyse, Levofloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin (65 kD)

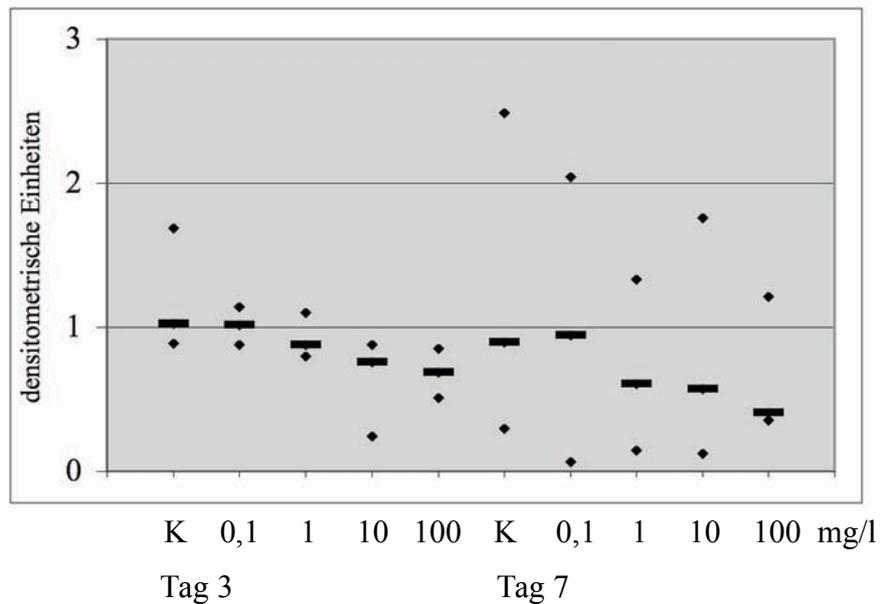


Abbildung 63: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Levofloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Occludin-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

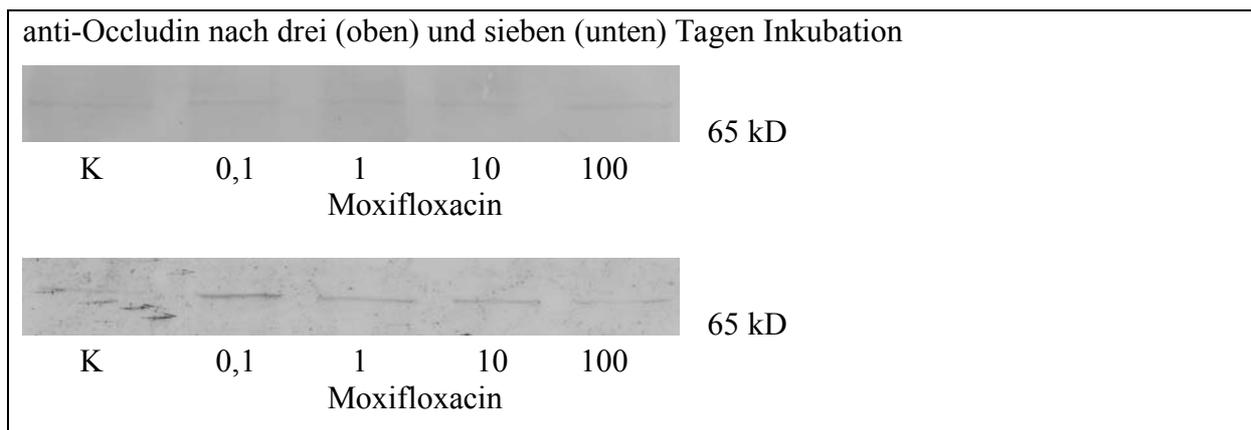


Abbildung 64: Western Blot Analyse, Moxifloxacin nach drei und sieben Tagen Inkubation in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin (65 kD)

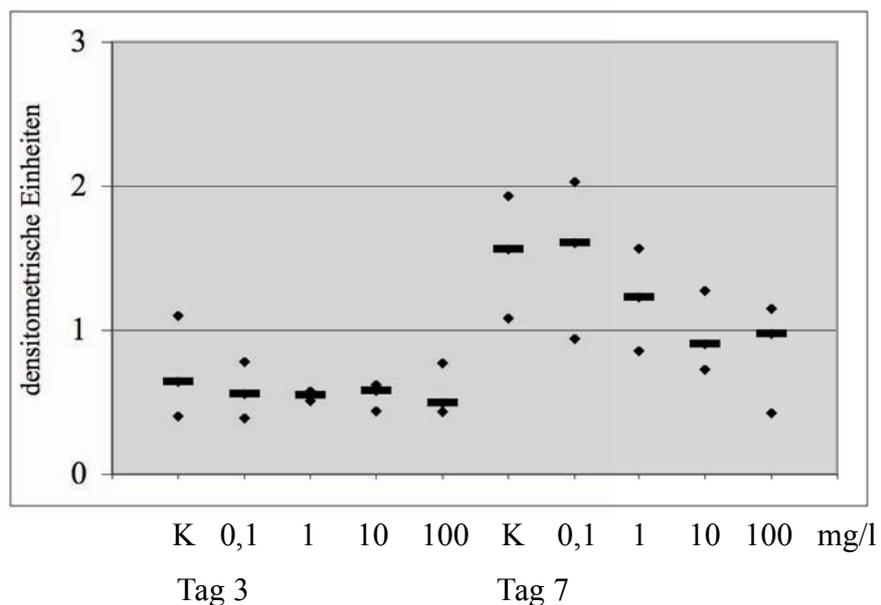


Abbildung 65: graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse, nach drei- und siebentägiger Inkubation der SerW₃-Zellen mit Moxifloxacin in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 mg/l gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (K) und Färbung mit einem Occludin-Antikörper, Darstellung von drei Messwerten pro Konzentration (◆), der Median ist folgendermaßen gekennzeichnet: (—)

Einen starken Einfluss auf das *tight junction*-Protein Occludin scheint Linezolid zu haben. Die Intensität des Medians der höchsten Konzentration von 100 mg/l geht nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen auf ein Viertel zurück. Bei allen drei getesteten Stoffen ist nach drei Tagen auch in den höheren Konzentrationen ein fast gleich bleibender Median zu sehen. Auch der bei den anderen Proteinen beobachtete Abfall des Medians zwischen den Konzentrationen 0,1 mg/l und 1 mg/l fällt bei den Chinolonen hier deutlich kleiner aus.

4 Diskussion

4.1 Linezolid-induzierte Effekte auf die Reproduktionsorgane

Linezolid ist ein Antibiotikum, das zu der neu entwickelten Gruppe der Oxazolidinone gehört und vor allem gegen grampositive Keime wirkt. Es wird auch gegen einige multiresistente Bakterien wie MRSA (Methicillin-resistente Staphylokokken) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) eingesetzt. Auf Grund dieses Wirkspektrums wird es als Reserveantibiotikum bei Therapieversagen oder Mangel anderer Optionen eingesetzt. Durch seinen bisher einzigartigen Angriffspunkt in der Proteinbiosynthese der Bakterien, sind Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika selten. Es ist im Allgemeinen gut verträglich. Zu den klinisch bedeutsamen toxischen Wirkungen gehören Veränderungen des Blutbildes. Tierexperimentell wurden auch reproduktionstoxische Wirkungen beobachtet, die Anlaß für die hier beschriebenen Experimente waren.

In präklinischen Versuchen an männlichen Ratten nahm die Fertilität und Reproduktionsfähigkeit nach der Gabe von Dosierungen, die denen beim Menschen entsprechen, ab. Bei ausgewachsenen Tieren war der Effekt reversibel, bei Jungtieren, die während ihres Heranreifens mit Linezolid behandelt wurden, dagegen nicht. Es zeigte sich bei den erwachsenen Tieren auch eine Veränderung der Spermienmorphologie, eine Hypertrophie des Nebenhodens und eine Hyperplasie des Epithels. Ein teratogener Effekt ließ sich nach Gabe von vierfachen Dosierungen als denen beim Menschen üblichen sowohl bei Mäusen, als auch bei Ratten nicht nachweisen. Dagegen zeigten die Muttertiere der Mäuse bei gleicher Exposition eine Toxizität mit Anstieg der embryonalen Todesrate und vermindertem Geburtsgewicht, bei Ratten wurden schon bei niedrigeren Dosen ein abnehmendes Gewicht der Feten, höhere Todesraten und eine verzögerte Reifung der Jungtiere beobachtet (Fachinformation Zyvoxid, Pfizer, 2009).

Die im Rahmen dieser Dissertation getesteten Linezolid-Konzentrationen von 0,1, 1, 10 und 100 mg/l orientieren sich an den therapeutischen Plasmakonzentrationen. Thallinger und Mitarbeiter bestimmten an gesunden Probanden und septischen Patienten die Plasmakonzentrationen nach einer intravenösen Einmaldosis von 600 mg Linezolid. Dabei ergab sich eine mittlere Plasmakonzentration von 12,8 mg/l bei den gesunden Probanden und 14,2 mg/l bei den septischen Patienten (Thallinger et al., 2007). Diese Werte ließen sich auch bei 16 an Pneumonie erkrankten Patienten finden, die zweimal täglich mit 600 mg/l Linezolid intravenös behandelt wurden. Die durchschnittliche Plasmakonzentration betrug 17,7 mg/l (Boselli et

al., 2005). Mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 100 mg/l liegen also alle in dieser Dissertation untersuchten Konzentrationen unter den mittleren maximalen Konzentrationen, die während einer Linezolid-Behandlung erzielt werden.

Linezolid wird in der Fachinformation Zyvoxid vom September 2009 nicht für die Anwendung bei Kindern und Jugendlichen auf Grund fehlender Daten empfohlen. Besonders bei Neugeborenen ist die systemische Exposition durch die noch eingeschränkte Clearance hoch. Bei Kindern im Alter zwischen einer Woche und zwölf Jahren entspricht die Gabe von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Linezolid alle acht Stunden der Exposition von 600 mg zweimal täglich bei Erwachsenen. Jugendliche von zwölf bis 17 Jahren reagieren ähnlich wie Erwachsene nach der Einnahme von 600 mg Linezolid (Fachinformation Zyvoxid, Pfizer, 2009).

Als Grenzkonzentration für empfindliche Erreger wurde 4 mg/l und als Wert für eine Resistenz 16 mg/l festgelegt. Die empfohlene Dosis für die meisten Indikationen beträgt 10 mg/kg KG alle acht Stunden bei Kindern im Alter von null bis elf Jahren. Ab zwölf Jahren kann eine Dosis von 600 mg alle zwölf Stunden verabreicht werden. Bei Neugeborenen variiert die Halbwertszeit von eineinhalb und sechs Stunden, abhängig vom postnatalen und Gestationsalter. Die interindividuelle Variabilität der Linezolid-Clearance ist bei Neugeborenen größer als bei Erwachsenen und steigt bei Frühgeburten und Neugeborenen schnell innerhalb der ersten Lebenswoche an (Cuzzolin und Fanos, 2006).

In einer vergleichenden Studie mit hospitalisierten Kindern von der Geburt bis zum zwölften Lebensjahr wurde Linezolid mit dem Glykopeptid Vancomycin bei Infektionen mit multiresistenten grampositiven Bakterien verglichen. Die Behandlungsdauer lag zwischen zehn und 28 Tagen. Dabei zeigten sich in der Behandlung mit Linezolid und Vancomycin ähnliche Effekte gegenüber den problematischen Keimen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Linezolid ein sicheres und effektives Antibiotikum sei (Tan, 2004).

In den USA ist Linezolid für die Behandlung von komplizierten und unkomplizierten Haut- und Weichteilinfektionen, ambulant erworbenen und nosokomialen Pneumonien und Infektionen, die durch Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) verursacht werden, bei Kindern und Erwachsenen zugelassen (Saiman et al., 2003).

Aus den Versuchen in dieser Dissertation vorgestellten Daten lässt sich ableiten, dass Linezolid bereits in subtherapeutischen Konzentrationen Auswirkungen auf die Sertoli-Zelllinie SerW₃ hat. Die morphologische Schädigung der Zellen auch schon in geringen Linezolid-Konzentrationen zeigte sich eindrucksvoll in den Bildern der elektronenmikroskopischen Analyse. Die Vakuolisierung ist das erste morphologische Zeichen einer Hodenschädigung

und die Hauptantwort, die bei vielen Sertoli-Zell-Schadstoffen zu beobachten ist. Im Lichtmikroskop sind zwei Formen der Vakuolisierung zu sehen. Entweder bilden sich basal mehrere kleine Vakuolen oder eine große. Im Elektronenmikroskop sind beide Arten zu erkennen. Sie resultieren aus einer Anschwellung und Verschmelzung von intrazytoplasmatischen membrangebundenen Organellen, wie Vesikeln und das Endoplasmatische Retikulum (ER) (Boekelheide et al., 2005). Eine Vakuolenbildung ist auf den im Ergebnisteil dieser Dissertation präsentierten elektronenmikroskopischen Bildern gut zu erkennen. Der Zellkern ist pyknotisch, das Kernchromatin verdichtet und die Kernmembran teilweise schon aufgelöst. Auch die vergrößerten, geschwollenen Mitochondrien und das aufgeweitete ER sind typische Zeichen für eine Schädigung der Sertoli-Zellen, wie sie auch in anderen Studien mit für Sertoli-Zellen schädlichen Substanzen wie Carbamazepin oder MEHP (Mono-2-ethylhexylphthalat) gezeigt werden konnten (Alcantara Saraiva et al., 2006; Moffit et al., 2007).

In der japanischen Arbeitsgruppe um Andriana wurde das Phthalat MEHP (Mono-2-ethylhexylphthalat) an einer Primärkultur von Ziegen-Sertoli-Zellen getestet. Dabei wurden die Zellen über drei, sechs und neun Stunden mit MEHP inkubiert. In der anschließenden elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigten sich die Unterschiede zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen, die durch geschwollene Mitochondrien, Vakuolenbildung, kondensiertes Chromatin und aufgelöste Zell- und Kernmembranen charakterisiert waren (Andriana et al., 2004).

Der in den vorliegenden Untersuchungen beobachtete gelockerte Zellverband lässt auf einen Verlust der Barrierefunktion und eine größere Durchlässigkeit der Blut-Hoden-Schranke schließen. Die untersuchten Proteine zeigten einen deutlichen Rückgang sowohl in der Immunhistologie, als auch in der Western Blot Analyse nach einer Inkubation mit Linezolid. Daraus könnte man im weiteren Sinne auf eine Schädigung der Blut-Hoden-Schranke schließen, da die untersuchten Proteine unter anderem am Aufbau der Barriere beteiligt sind. Dabei zeigt sich eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit. Die größte Abnahme besteht bei der höchsten Konzentration von 100 mg/l Linezolid nach sieben Tagen Inkubation. Die niedrigste Konzentration von 0,1 mg/l verhält sich überwiegend wie die unbehandelte Kontrolle. Am wenigsten scheinen die β_1 -Integrine von Linezolid beeinflusst zu werden, die größten Veränderungen zeigen sich bei N-Cadherin und Connexin 43. Die Arbeitsgruppe um Fiorini, die verschiedene potenziell schädliche Substanzen über 24 h an der SerW₃-Zelllinie testete, darunter Schwermetalle, Chemotherapeutika und Phosphodiesterase-Hemmer, konnte durch die

Western Blot Analyse und die Immunhistologie Einflüsse auf die Zellkontaktproteine Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und Zonula occludens nachweisen (Fiorini et al., 2004). Eine weitere Studie mit DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) konnte den Einfluß auf das Kontaktprotein Connexin 43 und die Vakuolisierung als frühes Zeichen einer Sertoli-Zell-Schädigung bestätigen (Fiorini et al., 2008).

Weiterführende Untersuchungen in dieser Dissertation in der Immunhistologie zeigen einen starken Rückgang der Fluoreszenz des Intermediärfilaments Vimentin ab einer Konzentration von 1 mg/l Linezolid. Dies entspricht den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Tay, die bei der Behandlung von Sertoli-Zellen über drei, sechs, zwölf und 24 Stunden mit MEHP einen Rückgang von Vimentin mittels der Immunhistologie und der Western Blot Analyse nachgewiesen haben (Tay et al., 2010).

Die Auswirkungen von Linezolid auf den Testis, insbesondere bei Kindern, ist ein wenig untersuchtes Gebiet. Bei der Literaturrecherche in der Datenbank „Pub Med“ fanden sich keine Treffer zu den Stichworten „Linezolid“ oder „Oxazolidinone“ in Kombination mit „testis“, „reproductive“, „Sertoli cell“, „spermatogenesis“, „infertility“, „fertility“, „sperm“ oder „semen“. Auch die Kombination von „Linezolid“ mit den getesteten Antikörpern der untersuchten Proteine wie Connexin 43, N-Cadherin, Vimentin, Occludin oder β_1 -Integrine brachte bis zum 03. Oktober 2010 keinen Eintrag in der Datenbank.

4.2 Effekte anderer Oxazolidinone auf den Testis

Vinclozolin ist ein Oxazolidinon, das von 1984 bis 2001 als Fungizid im Obst- und Gemüseanbau eingesetzt wurde. Auf Grund seiner Toxizität wurde die Zulassung zurückgezogen. Das Vinclozolin wirkt mit seinen beiden Metaboliten M1 und M2 als Antiandrogen. In Versuchen der Arbeitsgruppe Elzeinova wurden trächtige Mäuse über sieben Tage und männliche Mäuse während der Geschlechtsreife der F1-Generation über 21 Tage mit 1 mg/kg KG Vinclozolin täglich oral behandelt. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme des Testisgewichts der männlichen Mäuse mit einer Abnahme der Spermienanzahl und einer vierfachen Zunahme der abnormalen Spermien. Die *in utero* exponierten männlichen Nachkommen hatten eine noch deutlichere Abnahme der Spermienanzahl und eine Zunahme der fehlentwickelten Spermien um das Fünffache. Auch das Testisgewicht war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die Autoren konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Vinclozolin in niedriger Dosierung die Spermienproduktion signifikant herabsetzt (Elzeinova et al., 2008).

Auch in den Versuchen von Veeramachaneni an Kaninchen konnte ein Effekt von Vinclozolin auf die Spermatogenese gezeigt werden. Sie gaben trächtigen Kaninchen vom 15. Gestationstag bis zur Geburt der Jungtiere und diesen anschließend vier Wochen entweder 7,2 mg/kg oder 72 mg/kg KG Vinclozolin. Ein Teil der Tiere wurde nach zwölf Wochen, der andere nach 24 Wochen getötet. Bei den anschließenden Untersuchungen war kein Unterschied im Körper- und Testisgewicht zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe festzustellen. Auch die tägliche Spermienproduktion und die totale Spermienanzahl unterschieden sich nicht von der Kontrolle. Dafür gab es bei der Spermienmorphologie signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Zahl der fehlgebildeten Spermien nahm in beiden Gruppen um das Fünffache zu. Im Lichtmikroskop waren mit Flüssigkeit gefüllte Hohlräume neben den Sertoli-Zellen im Keimepithel zu sehen (Veeramachaneni et al., 2006). Diese Resultate zeigen, dass auch andere Substanzen aus der Stoffgruppe der Oxazolidinone eine Vakuolisierung bewirken.

Die Auswirkungen von Vinclozolin auf die nachfolgenden Generationen testete die Arbeitsgruppe um Anway 2006 in einer Studie an Ratten. Es wurden trächtige Ratten vom achten bis zum 14. Tag der Tragzeit mit 100 mg/kg KG Vinclozolin behandelt. Anschließend wurden über vier Generationen, die nicht weiter mit Vinclozolin behandelt wurden, verschiedene Parameter der Fertilität erhoben. Dabei zeigte sich, dass das Fungizid keine Auswirkung auf die Anzahl der Nachkommen oder auf die Sterblichkeit nach der Geburt hatte. Auch das Geburts- und Testisgewicht der Nachkommen zeigte keinen statistischen Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe. In den folgenden Generationen F1 bis F4 sank aber die Spermienmotilität um bis zu 43 % und die Spermienproduktion um bis zu 22 %. Vinclozolin hatte über alle Generationen keinen Einfluss auf die Testosteronproduktion (Anway et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob bestimmte Proteine geschädigt werden, behandelte die Arbeitsgruppe um Auger trächtige Ratten täglich mit 30 mg/kg Vinclozolin. Nach der Geburt der Jungtiere wurden diese über 80 Tage mit der gleichen Dosis über eine Magensonde belastet. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Androgen-abhängigen mitochondrialen Enzyme Malat-Dehydrogenase 2 und Aldehyd-Dehydrogenase, die beide im Zitratzyklus wichtige Funktionen haben. Auch hier scheinen die Mitochondrien, die nach der Inkubation mit Linezolid über sieben Tagen vergrößert und geschwollen waren, durch Vinclozolin geschädigt zu werden. Andererseits wurden höhere Level von AKAP4 (*A-kinase anchor protein 4*) und Aktin gefunden, die auf die eingeschränkte Beweglichkeit der Spermien zurückgeführt wurde (Auger et al., 2010).

4.3 Chinolon-induzierte Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane

Die Chinolone sind eine Gruppe häufig eingesetzter Antibiotika. Auf Grund ihrer relativ guten Verträglichkeit und ihres breiten Wirkspektrums haben sie zunehmend an Bedeutung gewonnen, besonders durch die Wirkung von Ciprofloxacin und Levofloxacin gegen Problemkeime wie *Pseudomonas aeruginosa*. Sie besitzen eine gute Gewebegängigkeit und wenige Keime sind bis jetzt resistent gegen die Chinolone. Eine besondere Nebenwirkung spielt bei einigen Chinolonen eine Rolle. Sie können die Fertilität beeinflussen. Es kann zu einer Abnahme der Spermienzahl und Veränderung der Spermienmorphologie kommen.

Nach einer Einmalgabe von 400 mg Moxifloxacin bzw. 500 mg Levofloxacin wurden Serumspiegel um 3,2 mg/l bzw. 4,1 mg/l festgestellt. Im Bronchialsekret ließen sich Spiegel von etwa 20,7 mg/l für Moxifloxacin und 10,9 mg/l für Levofloxacin nach einer Bronchiallavage messen. In den Alveolarmakrophagen ließen sich die höchsten Konzentrationen mit 56,7 mg/l für Moxifloxacin, bzw. 27,7 mg/l für Levofloxacin nachweisen (Lode und Allewelt, 2002). Dies bestätigt die Relevanz der getesteten Dosierungen.

Die ägyptische Arbeitsgruppe um Abd-Allah hat 2000 die drei Chinolone Ofloxacin, Ciprofloxacin und Pefloxacin an Ratten getestet. Sie verabreichten den Tieren oral über 15 Tage 72 mg/kg Ofloxacin und Pefloxacin und 135 mg/kg Ciprofloxacin. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Spermienzahl, definiert als Spermien pro Ratte, von 67,5 % bei Ofloxacin, 59,2 % bei Ciprofloxacin und 59,8 % bei Pefloxacin. Die Spermienmotilität sank um 93,4 %, 92,8 % und 74,2 %. Die tägliche Spermienproduktion, definiert als Spermienzahl pro Gramm Hodengewebe, ergab eine Abnahme von 73,9 %, 77 % und 61,8 %. Weiterhin testete die Arbeitsgruppe die Dosisabhängigkeit der Effekte bei Ofloxacin. Sie verabreichten Ofloxacin in den Dosierungen von 36 mg/kg, 72 mg/kg und 360 mg/kg KG einmal täglich über 15 Tage. Dabei zeigte sich im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe eine Abnahme der totalen Spermienzahl um 10,6 % bei 36 mg/kg, 67,5 % bei 72 mg/kg und 97,7 % bei 360 mg/kg. Die Spermienmotilität ging um 18,9 %, 39,4 % und 99,3 % zurück. Die tägliche Spermienproduktion blieb bei der niedrigsten Konzentration etwa gleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, nahm aber bei der mittleren Konzentration um 26,1 % und bei der höchsten um 40 % ab (Abd-Allah et al., 2000a; Abd-Allah et al., 2000b).

Ofloxacin wurde von der Arbeitsgruppe um El-Harouny über 14 und 28 Tage an Ratten getestet, jeweils in den Dosierungen von 72 und 216 mg/kg KG. Dabei fanden sie eine Abnahme des Gesamtkörper- und des Testisgewichts. Sie begründeten dies mit einer Toxizität des

Ofloxacin auf Leydig-Zellen, die vermindert Testosteron synthetisieren. Das Chinolon bindet Zink in Chelatkomplexen, das für eine normale Testosteronsynthese essentiell ist und durch die Komplexbildung nicht mehr zur Verfügung steht (Stahlmann und Lode, 2005). Durch den verminderten Testosteronspiegel nahm die Spermienzahl ebenfalls ab (El-Harouny et al., 2009).

Die Arbeitsgruppe Erhart, die 1998 Ofloxacin an Ratten verabreichte, konnte in keiner der untersuchten Dosierungen eine Veränderung der Überlebensfähigkeit der Spermien oder Zunahme der Apoptose feststellen (Erhart et al., 1998).

Da wenige Arbeiten über Levofloxacin in Bezug auf die Toxizität auf den Testis veröffentlicht wurden, wurden die Daten zu seinem Enantiomer Ofloxacin herangezogen. Die oben aufgeführten Daten der verschiedenen Studien zeigen einen deutlichen Einfluß des Chinolons auf die normale Testisfunktion. Dies steht in Übereinstimmung mit den gewonnenen Ergebnissen der vorliegenden Versuche. Dabei gehen die Kontaktproteine der Sertoli-Zellen SerW₃ sowohl in den immunhistologischen als auch in den Western Blot Untersuchungen deutlich zurück. Wie schon bei Linezolid festgestellt, haben die β_1 -Integrine in ihrer Konzentration nicht so stark abgenommen, wie die anderen getesteten Proteine. Die niedrigste getestete Konzentration von 0,1 mg/l Levofloxacin verhielt sich ähnlich wie die unbehandelte Kontrolle. Das Zellwachstum reduzierte sich nach sieben Tagen in der höchsten Dosis von 100 mg/l um mehr als die Hälfte.

Maura und Pino fanden bei der Verabreichung von Norfloxacin an Mäuse eine Erhöhung des Testisgewichts gegenüber der Kontrollgruppe. Sie gaben zwei Dosierungen, 2 und 4 mmol/kg, einmal oder fünfmal täglich über sieben oder 28 Tage. Bei der täglichen Einmalgabe über eine Woche sank das Testisgewicht, während es in allen anderen Gruppen signifikant anstieg. Auch war der prozentuale Anteil der abnormalen Spermien in den niedrigen Dosen höher, als bei den höheren (Maura und Pino, 1991).

Die iranische Arbeitsgruppe um Khaki testete 2008 die Aminoglykoside Gentamycin, Neomycin und Streptomycin und das Fluorchinolon Ofloxacin an Ratten. Dabei wurden die Ratten über 14 Tage mit entweder 5 mg/kg Gentamycin, 50 mg/kg Neomycin, 40 mg/kg Streptomycin oder 72 mg/kg Ofloxacin behandelt. Am Ende der zwei Wochen hatte das Gewicht des Testis in den Gruppen mit Gentamycin und Ofloxacin signifikant abgenommen. Die Spermienanalyse ergab eine signifikante Reduktion in allen Testgruppen, die Spermienmotilität nahm bei Gentamycin und Neomycin ab, die Lebensfähigkeit der Spermien war in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. In der histopathologischen Un-

tersuchung des Testis zeigte sich ein Abbau und Nekrosen der Keimzellen, Zelltrümmer im Lumen und vermehrtes Auftreten von Lymphozyten und Plasmazellen. Das interstitielle Gewebe und die Vakuolisierung im intertubulären Gewebe nahmen zu und der Durchmesser des Tubulus sank in allen Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Besonders Ofloxacin schien direkt in die Spermatogenese einzugreifen und die Apoptose zu induzieren (Khaki, 2008).

Der Effekt von Moxifloxacin auf das Reproduktionssystem wurde von Keutz und Schlüter an Ratten untersucht. Dazu verabreichten sie oral 20, 100 und 500 mg/kg KG Moxifloxacin. Anschließend ließen sich in der höchsten getesteten Dosis Veränderungen in der Spermienmorphologie feststellen. Moxifloxacin hatte aber keine Effekte auf die Fertilität (Keutz und Schlüter, 1999).

Obwohl in den Tierversuchen mit Moxifloxacin kaum Effekte zu sehen waren, zeigten sich bei den Versuchen für diese Dissertation an den SerW₃-Zellen *in vitro* teilweise deutliche Auswirkungen. Das Wachstum der Zellen reduzierte sich nach sieben Tagen in der höchsten Konzentration um 50 %. Auch in der Immunhistologie haben sich Abnahmen in der Fluoreszenz gezeigt, besonders stark bei Färbungen mit den Antikörpern gegen die Proteine Connexin 43 und N-Cadherin. Die Färbung gegen die β_1 -Integrine verhielt sich wie bei den anderen Stoffen. In der Western Blot Analyse waren diese Auswirkungen nicht so deutlich ausgeprägt. Es gab Abnahmen in der Intensität, die aber erst nach sieben Tagen deutlich zu Tage traten. Aber auch bei dieser Methode konnte ein Rückgang der Mediane der Proteinmengen um durchschnittlich ca. ein Drittel, besonders bei Connexin 43, N-Cadherin und Occludin, beobachtet werden. Trotzdem sind die Auswirkungen von Moxifloxacin auf die SerW₃-Zellen deutlich geringer, als bei den anderen beiden getesteten antibiotisch wirksamen Stoffen.

Die Arbeitsgruppe um Crotty testete verschiedene Antibiotika über 56 Tage an Ratten. Um die Spermatogenese zu untersuchen, führten sie an Tag elf und 56 eine Aspiration von Hodengewebe und anschließend eine Durchflußzytometrie durch. Die gewonnenen Zellen wurden in haploide, stellvertretend für Spermatozoen und Spermatozyten, diploide, für Sertoli- und Leydig-Zellen und sekundäre Spermatozoen und tetraploide Zellen, für primäre Spermatozoen, unterteilt. Dabei zeigte sich bei den Antibiotika Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Nitrofurantoin, Doxzyklin und Ofloxacin eine signifikante Abnahme der Spermatogenese. Ciprofloxacin, Norfloxacin und Lomefloxacin zeigten keine Effekte (Crotty et al., 1995).

4.4 Effekte anderer Antibiotika auf die männlichen Reproduktionsorgane

Wie die folgenden Ergebnisse von weiteren Studien mit anderen Antibiotika und antibiotisch wirksamen Stoffen zeigen, sind die Einflüsse auf die Reproduktionsorgane und die darin enthaltenen Zellen auch bei anderen Substanzen beobachtet worden.

Ein weiteres Antibiotikum, das Auswirkungen auf die männlichen Reproduktionsorgane zu haben scheint, ist das Gentamycin. Es ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside und wird hauptsächlich gegen gramnegative Bakterien eingesetzt. Neben Oto- und Nephrotoxizität, die oft für den Behandlungsabbruch verantwortlich sind, steht Gentamycin auch im Verdacht, negative Effekte auf die Reproduktionsorgane zu haben. Eine Studie von Timmermans hat 1989 gezeigt, dass Gentamycin nach acht, 15 und 30 Tagen die Meiose und Mitose der Keimzellen verhindert. Die Proteinsynthese und der Glukosestoffwechsel werden ebenfalls gehemmt und der Zelltod durch Karyolyse induziert (Timmermans, 1989).

2008 wurde in der Studie von Narayana der Schwerpunkt auf die Reduktion der Spermien und die veränderte Morphologie der Tubuli seminiferi und der Spermien gelegt. Die Ratten wurden einmalig oder über 35 Tage entweder mit 3 oder 5 mg/kg Gentamycin behandelt. Die Anzahl der Spermien ging nach 35 Tagen bei 3 mg/kg auf die Hälfte, bzw. bei 5 mg/kg auf ein Viertel zurück. Die Spermienmotilität reduzierte sich in der höheren Dosis schon nach einem Tag signifikant, während es nach 35 Tagen bei beiden Konzentrationen zu einem deutlichen Rückgang kam. Die Anzahl der abnormalen Spermien stieg nach einem Tag mit 5 mg/kg auf das Doppelte im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe, nach 35 Tagen hatte sich der Anteil verfünffacht bzw. versiebenfacht. Am Ende der 35 Tage wurde der Testis auch auf morphologische Veränderungen untersucht. Dabei zeigten sich in einigen Tubuli Zeichen einer Atrophie, mit Unterbrechung des Zellverbandes, Vakuolisierung und Degeneration der Zellen. Im Keimepithel waren noch Sertoli-Zellen und Spermatogonien festzustellen, aber keine Spermatozyten oder Spermatiden mehr (Narayana, 2008).

Eine andere Tierart, um die Auswirkungen auf die Spermien zu testen, sind die Nilbuntbarsche. Die Arbeitsgruppe um Segovia inkubierte gewonnene Spermien der Buntbarsche über sieben Tage mit Gentamycin und Ampicillin in den Konzentrationen 750, 500 und 250 µg/ml und einem Gemisch aus Penicillin, Streptomycin und Amphotericin. Als Ergebnis zeigte sich am Ende der Inkubationszeit eine deutliche Abnahme der Lebensfähigkeit der Spermien bei Gentamycin und dem Gemisch jeweils in der höchsten Konzentration, bei Ampicillin war in allen Konzentrationen ein deutlicher Effekt zu sehen (Segovia et al., 1999). Da es sich bei

diesen Versuchen nicht um Säugetiere handelt und außerdem sehr hohe Konzentrationen untersucht wurden, sind die hier gewonnenen Erkenntnisse für die Einordnung der gewonnenen Daten dieser Dissertation ohne Relevanz.

In einer *in vitro*-Studie von King wurden verschiedene Antibiotika an humanen Spermien getestet, u. a. Amoxicillin, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Doxycyclin und Cefuroxim. Getestet wurden zwei Konzentrationen, die zweite hundertfach höher dosiert, als die erste. Zu drei Zeitpunkten, nach vier, 24 und 48 Stunden, wurden Parameter erhoben, an denen die Vitalität der Spermien beurteilt werden konnte. Als Ergebnis zeigte sich bei Ciprofloxacin eine Abnahme der Beweglichkeit der Spermien nach 48 Stunden in der Konzentration von 5,4 µg/ml, bei 540 µg/ml zu allen Zeitpunkten. Doxycyclin beeinflusste die Spermien in allen Konzentrationen und zu allen Zeitpunkten, während es mit Cefuroxim nur in der pharmakologischen Konzentration von 700 µg/ml nach 48 Stunden zu einem kompletten Stopp der Spermienbeweglichkeit kam. Ampicillin und Ofloxacin hatten in dieser Studie keinen Einfluss auf die Spermienmotilität, bei Ofloxacin kam es aber zu einer Abnahme der Befruchtungsfähigkeit, so dass man trotzdem davon ausgehen kann, dass Ofloxacin auf die Spermienfunktion wirkt (King et al., 1997).

Wodurch der Einfluß auf die Spermienfunktion durch das Enantiomer des Levofloxacin kommt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren. Damit aber die Substanzen zu den heranreifenden Keimzellen gelangen, müssen sie die Blut-Hoden-Schranke überwinden. Eine Schädigung der Proteine, die an dieser Barriere beteiligt sind, konnte in den vorliegenden Versuchen für diese Dissertation gezeigt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe um Hargreaves, die ebenfalls an humanen Spermien die Antibiotika Amoxycillin, Co-trimoxazol, Erythromycin und Tetrazyclin und das Antimalariamittel Chloroquin testete. Bei Amoxycillin zeigte sich keine signifikante Abnahme der Spermienbeweglichkeit und Viabilität, bei den übrigen Medikamenten waren diese Effekte signifikant. Auch nach einer Spülung der zuvor über vier Stunden mit den Medikamenten inkubierten Samenzellen und eine 20-stündige Inkubation nur mit Medium, war keine Erholung der Zellen zu beobachten, die Schädigung war irreversibel (Hargreaves et al., 1998).

4.5 Effekte anderer Medikamente auf die männlichen Reproduktionsorgane

Die thailändische Arbeitsgruppe um Huynh testete Triptolid, ein Inhaltsstoff der chinesischen Kletterpflanze Wilfords Dreiflügelfrucht. Die immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung des Triptolids ist schon seit längerem bekannt. Die Arbeitsgruppe testete über 82 Tage die Wirkung von Triptolid auf die Fertilität von Ratten. Sie verabreichten den Ratten oral 100 µg/kg KG Triptolid. In dieser Dosierung wirkt es nicht immunsuppressiv. Am Ende der Untersuchung hatte sich die Spermienmotilität auf Null reduziert. Dabei blieb der Hormonspiegel von Testosteron und Gonadotropin unverändert. Die Zahl der Spermien blieb je nach Tier normal oder reduzierte sich bis auf Null. Auch die Dicke des Epithels der Tubuli seminiferi war im Lichtmikroskop je nach Tier sehr unterschiedlich. Bei einigen Ratten war es normal, bei anderen hatte es sich auf eine dünne Schicht Sertoli-Zellen mit wenigen Spermato gonien reduziert. Im Elektronenmikroskop zeigte sich im Zytoplasma der Sertoli-Zellen eine Vakuolisierung (Huynh et al., 2000). Dieses frühe Zeichen einer Schädigung der Sertoli-Zellen konnte in den elektronenmikroskopischen Bildern nach einer Inkubation mit Linezolid ebenfalls gezeigt werden.

Nicht immer ist die Schädigung der Spermatogenese und der Sertoli-Zellen ungewollt. Um ein nichtsteroidales orales Verhütungsmittel für den Mann zu entwickeln, wurde das Indenopyridine CDB-4022 von der Arbeitsgruppe um Hild 2001 an Ratten getestet. Schon seit den 70er Jahren ist der hemmende Effekt verschiedener Indenopyridine auf die Hodenfunktion bekannt, der Mechanismus konnte bis heute noch nicht endgültig entschlüsselt werden. Die Funktion der Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen wurde nicht beeinflusst, evaluiert an einem unveränderten Testosteronspiegel. Verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe war nach zehn Wochen Testintervall mit einer täglichen oralen Dosis von 2,5 mg/kg CDB-4022, was der minimalen Effektdosis beim Mann entspricht, die eine Infertilität verursacht, kein signifikanter Unterschied festzustellen. Im Gegensatz dazu war eine deutliche Reduktion des Testisgewichtes, der Anzahl der Spermien und der Anzahl der Tubuli seminiferi, in denen Spermien heranreifen, zu beobachten. Die Produktion von Inhibin B und ABP (Androgenbindendes Protein) ging ebenso wie die Produktion der Tubulusflüssigkeit zum Transport der reifen Spermien signifikant zurück. Im Elektronenmikroskop war eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen in den Tubuli seminiferi, vor allem der frühen Spermatozyten und Spermato gonien, zu sehen. Daraus leiteten die Autoren die Annahme ab, dass CDB-4022 die

Sertoli-Zellen als Hauptangriffsort hat und damit die Schädigung irreversibel ist (Hild et al., 2001).

Sechs Jahre später veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe Daten zu CDB-4022, das sie weiterführend an Makaken getestet hatten. Sie verabreichten den Affen täglich über sieben Tage über eine Magensonde 12,5 mg/kg CDB-4022. Nach drei Tagen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Spermienanzahl und -konzentration, danach fiel sie bis zum 17. Tag, bis sich eine Oligospermie einstellte. Eine Spermienbeweglichkeit war am 17. Tag nicht mehr zu beobachten. Das Testisvolumen hatte signifikant abgenommen. Nach 24 Tagen wurde die Morphologie der Testis durch Hemikastration beurteilt, wobei sich ein reduzierter Durchmesser der Tubuli seminiferi darstellte. Die Anzahl an Spermatozyten und runden Spermatiden war vermindert, es waren nur sehr wenige elongierte Spermien zu sehen. Nach 17 Wochen wurde auch der zweite Hoden entnommen und mikroskopisch untersucht. Dabei waren alle gesehenen Effekte nach 24 Tagen vollständig reversibel und morphologisch glichen die Tubuli der unbehandelten Kontrollgruppe. Die kontinuierlich erhobenen Serumwerte für Testosteron, LH und FSH zeigten während und nach der Behandlung mit CDB-4022 keine Abnahme. Der Spiegel für Inhibin B sank mit der ersten Verabreichung leicht, um danach signifikant während der übrigen Dosistage anzusteigen (Hild et al., 2007).

Um den Angriffspunkt und -mechanismus des CDB-4022 im Testis zu bestimmen, wurden 2008 erneut Versuche mit Ratten vorgenommen. Die Ratten bekamen eine Einmaldosis von 2,5 mg/kg KG. Nach vier, acht, 24, 48, 96 Stunden und nach 14 Tagen wurden Blut- und Gewebeproben der Hoden gewonnen. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass die Apoptose der Samenzellen durch Induktion des Proapoptoseproteins FasL ausgelöst wird. In der Western Blot Analyse zeigte sich eine deutliche Zunahme des Proteins schon vier Stunden nach Exposition. Im Gegenzug nahm das Testisgewicht signifikant durch den Untergang der Samenzellen ab. Die MAP-Kinase Signalkaskade wurde ebenfalls aktiviert, die Proteine ERK 1/2, die zu der Gruppe der MAP-Kinase Proteine gehören, wurden nach vier Stunden vermehrt exprimiert. Diese Aktivierung der ERK 1/2 wurde mit dem Kontaktverlust der apikalen ektoplasmatischen Spezialisierung (ES) zwischen Keim- und Sertoli-Zellen, dem Untergang der Samenzellen und der Rückentwicklung der Sertoli-Zellen begründet. Auch die Wirkung auf die Proteine der *adherens junctions* zwischen Sertoli- und Samenzellen wurde untersucht. In der Western Blot Analyse zeigte sich ein Verlust von E-Cadherin, Nectin-3 und Afadin und eine signifikante Zunahme von N-Cadherin, α - und β -Catenin, γ -Laminin und β_1 -Integrinen. Dies wurde mit dem Verlust der Bindung zwischen den Sertoli-Zellen und den heranreifenden

Spermien begründet. In den vorliegenden Versuchen für diese Promotion konnte eine Abnahme der Proteine Connexin 43, N-Cadherin, Occludin, Vimentin und β_1 -Integrine, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, bei Zellen der SerW₃-Zelllinie nach Behandlung mit Linezolid oder Chinolonen gezeigt werden. Diese Beobachtungen können mit dem Verlust der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Sertoli-Zellen begründet werden, die die Blut-Hoden-Schranke bilden (Koduri et al., 2008).

4.6 Ausblick

Durch die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Schädigung verschiedener Proteine durch antibiotisch wirksame Stoffe, lässt sich feststellen, dass die Zelllinie SerW₃ gut geeignet ist, um die möglichen Effekte verschiedener Medikamente auf die Blut-Hoden-Schranke zu simulieren. Bei der Neuzulassung von Medikamenten spielt die mögliche schädigende Wirkung auf die Reproduktionsorgane eine große Rolle, besonders beachtet werden Effekte bei Kindern, deren Organe sich noch in der Entwicklung befinden. Da die SerW₃-Zellen relevante Strukturmerkmale natürlicher Sertoli-Zellen aufweisen, könnte auch die Schädigung anderer Proteine, die in der Blut-Hoden-Schranke vorkommen, nachgewiesen werden. Die Anzahl der Tierexperimente vor Zulassung eines Medikamentes könnte durch die Testung an der Zelllinie reduziert werden. Durch Verwendung anderer Antikörper könnten weitere Proteine der Blut-Hoden-Schranke durch die Western Blot Analyse nachgewiesen und zur Beurteilung herangezogen werden. Mit Hilfe anderer Methoden, z.B. des PCR-Verfahrens ließen sich die Aktivierung und die Signalkaskade des Apoptoseweges untersuchen. Gerade hinsichtlich der unerwünschten Wirkungen des noch relativ neuen antibiotisch wirksamen Medikaments Linezolid und seines Schädigungsmechanismus besteht noch ein großer Forschungsbedarf, besonders unter dem Aspekt einer möglichen Verabreichung an Kinder. Bisher sind nur sehr wenige Erkenntnisse auf diesem Gebiet bekannt und publiziert. In Tierexperimenten konnte die schädigende Wirkung des Linezolid auf die Reproduktion gezeigt werden, diese Effekte stehen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung.

5 Zusammenfassung

Linezolid ist ein antibiotisch wirksames Medikament aus der relativ neuen Gruppe der Oxazolidinone. Es wirkt hauptsächlich im grampositiven Bereich und wird zum Beispiel bei Pneumonien eingesetzt. Durch seine hohe Bioverfügbarkeit und gute Gewebegängigkeit ist es auch bei Erkrankungen durch multiresistente Keime (z.B. MRSA) anwendbar. Da es an einem anderen Schritt in der Proteinbiosynthese der Bakterien als andere Antibiotika angreift, sind Kreuzreaktionen selten.

In Tierversuchen wurde eine verminderte Fertilität und Reproduktionsleistung nach der Behandlung mit Linezolid bei Ratten beobachtet. Da diese Ergebnisse kaum weiter verfolgt und auch nicht im Detail publiziert wurden, wurden in dieser Dissertation ergänzende Versuche durchgeführt.

Im Gegensatz dazu ist die Gruppe der Chinolone eine häufig eingesetzte Substanzklasse. Auf Grund ihres weiten Wirkspektrums sind sie sowohl im grampositiven als auch im gramnegativen Bereich einsetzbar, besonders bei Atem- und Harnwegsinfektionen, aber auch bei komplizierten Infektionen mit multiresistenten Keimen, soweit diese noch keine Resistenzen gegen Chinolone entwickelt haben. Auch bei einigen Chinolonen hat sich Wirkung in Tierversuchen eine negative Wirkung auf die Reproduktionsfähigkeit und die Fertilität gezeigt. Deshalb wurden die Chinolone Levofloxacin und Moxifloxacin als Vergleichssubstanzen zum Linezolid ausgewählt.

Die Substanzen wurden über drei und sieben Tage in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 mg/l mit einer unbehandelten Kontrolle inkubiert. Um die Wirkung der Medikamente auf den Hoden und die mögliche Schädigung der Blut-Hoden-Schranke zu untersuchen, wurde die Sertoli-Zelllinie SerW₃ ausgewählt, die alle wesentlichen Strukturmerkmale von natürlich vorkommenden Sertoli-Zellen aufweist. Die Veränderungen der verschiedenen Proteine sollte mit Hilfe der Western Blot Analyse und der Immunhistologie nachgewiesen werden. Als charakteristische Proteine für die Blut-Hoden-Schranke und die Sertoli-Zellen wurden Connexin 43, N-Cadherin, Occludin, Vimentin und β_1 -Integrine ausgewählt, die stellvertretend für die verschiedenen Zell-Zell-Kontakte stehen. Morphologische Schädigungen der Zellen sollten durch die Licht- und Elektronenmikroskopie detektiert werden.

Nach Auswertung der gewonnenen Daten konnte festgestellt werden, dass sich die Stoffe Linezolid und Levofloxacin im Ausmaß der Schädigung der untersuchten Proteine kaum unterscheiden. Bei Moxifloxacin war die Abnahme der Proteine nicht so ausgeprägt. Betrachtet

man die eingesetzten Konzentrationen gab es den größten Sprung zwischen den Konzentrationen 0,1 mg/l und 1 mg/l, also bei Konzentrationen, die im Blut des Patienten bei einer Therapie mit den Medikamenten deutlich überschritten werden. Zwischen der unbehandelten Kontrolle und der niedrigsten Konzentration von 0,1 mg/l gab es kaum einen Unterschied. Die am wenigsten beeinträchtigten Proteine waren die β_1 -Integrine, am stärksten wurden das Adhäsionsprotein N-Cadherin und das *gap junction* Protein Connexin 43, sowie das nur in der Immunhistologie untersuchte Vimentin, beeinflusst. Auch das *tight junction* Protein Occludin nahm in seiner Konzentration durch die Behandlung mit den antibiotisch wirksamen Stoffen ab. Insgesamt konnte mit Hilfe der in dieser Dissertation gewonnenen Daten eine Schädigung der Sertoli-Zelllinie SerW₃ durch Linezolid, Levofloxacin und Moxafloxacin gezeigt werden, doch es besteht noch weiterer Forschungsbedarf auf diesem Gebiet.

6 Literaturverzeichnis

- Abd-Allah, A. R., Aly, H. A., Moustafa, M. A., Abdel-Aziz, A. A., Hamada, F. M. (2000a). Adverse testicular effects of some quinolone members in rats. *Pharmacol Res*, 41: 211-219
- Abd-Allah, A. R., Gannam, B. B., Hamada, F. M. (2000b). The impact of ofloxacin on rat testicular DNA: application of image analysis. *Pharmacol Res*, 42: 145-150
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: *Molecular Biology of The Cell*; 5th edition; Garland Science, 1130-1204
- Alcantara Saraiva, K. L., Silva Junior, V. A., Santos Ferreira Dias, E., Alves Peixoto, C. (2006). Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod Toxicol*, 22: 754-759
- Anderson, V. R., Perry, C. M. (2008). Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. *Drugs*, 68: 535-565
- Andriana, B. B., Tay, T. W., Maki, I., Abdul Awal, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2004). An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goat *in vitro*. *J. Vet. Sci*. 5: 235-240
- Anway, M. D., Memon, M. A., Uzumcu, M., Skinner, M. K. (2006). Transgenerational Effect of the Endocrine Disruptor Vinclozolin on Male Spermatogenesis. *J Androl*, 27: 868-879
- Aradottir, E., Yogev, R. (1999). The Use of Fluoroquinolones in Pediatrics-A Reassessment. *Sem Ped Infect Dis*, 10: 31-37
- Auger, J., Eustache, F., Maceiras, P., Broussard, C., Chafey, P., Lesaffre, C., Vaiman, D., Camoin, L., Auer, J. (2010). Modified Expression of Several Sperm Proteins after Chronic Exposure to the Anti-Androgenic Compound Vinclozolin. Oxford University Press, *Society of Toxicology*, 1-32
- Balda, M. S. & Matter, K. (1998). Tight junctions. *J Cell Sci*, 111: 541-547
- Barman Balfour, J. A., Wiseman, L. R. (1999). Moxifloxacin. *Drugs*, 57: 363-373
- Bart, J., Groen, H., Van der Graaf, W., et al. (2002). An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol*, 3: 357-363
- Bayer Schering Pharma (02/2010). Fachinformation Avalox® 400 mg/250 ml Infusionslösung
- Bayer Vital GmbH (02/2008). Wichtige Information zur Arzneimittelsicherheit, Moxifloxacin.

Beardsley, A., Robertson, D., O'Donnell, L. (2006). A complex containing alpha6beta1-integrin and phosphorylated focal adhesion kinase between Sertoli cells and elongated spermatids during spermatid release from the seminiferous epithelium. *J Endocrinol*, 190: 7 59-70

Boekelheide, K., Johnson, K. J., Richburg, J. H. (2005). Sertoli Cell Toxicants. In: *Sertoli Cell Biology*, Elsevier Science, 20: 345-382

Boselli, E., Breilh, D., Rimmelé, T., Djabarouti, S., Toutain, J., Chassard, D., Saux, M-C., Allaouchiche, B. (2005). Pharmacokinetics and intrapulmonary concentrations of linezolid administered to critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*, 33: 1529-1533

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev*, 82: 825-874

Chiappini, E., Conti, C., Galli, L., de Martino, M. (2010). Clinical efficacy and tolerability of linezolid in pediatric patients: a systematic review. *Clin Ther*, 32: 66-88

Clemett, D., Markham, A. (2000). Linezolid. *Drugs*, 59: 815-827

Crotty, K. L., May, R., Kulvicki, A., Kumar, D., Neal, D. E. (1995). The Effect of antimicrobial Therapy on testicular Aspirate Flow Cytometry. *J Urology*, 153: 835-838

Cuzzolin, L., Fanos, V. (2006). Linezolid: A New Antibiotic for Newborns and Children? *J Chemotherapy*, 6: 573-581

Diekema, D.J., Jones R.N. (2000). Oxazolidinones. *Drugs*, 5: 7-16

Diekema, D.J., Jones R.N. (2001). Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*, 358: 1975-1982

Domagala, J. (1994). Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother*, 33: 685-706

Dym, M. and Fawcett, D. W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 3: 308-326

Eiff, v. C. (2002). Oxazolidinone, 5. Auflage Socio-medico Verlag

El-Harouny, M. A., Zalata, A. A., Naser, M. E., Abo El-Atta, H. M., El-Shawaf, I. M., Mostafa, T. (2009). Long-term ofloxacin testicular toxicity: an experimental study. *Andrologia*, 42: 92-96

Elzeinova, F., Novakova, V., Buckiova, D., Kubatova, A., Peknicova, J. (2008). Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reprod Toxicol*, 26: 231-238

Erhart, B., Chan, P. J., Patton, W. C., King, A. (1998). Ofloxacin: the next generation of antibiotic in sperm and embryo cultures for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*, 69: 246-251

- Fanning, A. S., Mitic, L. L. & Anderson, J. M (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1337-1345
- Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C. & Pointis, G. (2004). Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*, 18: 413-421
- Fiorini, C., Gilleron, J., Carette, D., Valette, Ad., Tilloy, A., Chevalier, S., Segretain, D. & Pointis, G. (2008). Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: an early event of DDT carcinogenicity. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 56-67
- French, G. (2003). Safety and tolerability of linezolid. *J Antimicrob Chemother*, 2: 45-53
- Fuchs, E. & Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63: 345-382
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9: 411-416
- Griswold, M. D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*, 5: 211-216
- Hargreaves, C. A., Rogers, S., Hills, F., Rahman, F., Howell, R. J. S., Homa, S. T. (1998). Effects of co-trimoxazole, erythromycin, amoxycillin, tetracycline and chloroquine on sperm function in vitro. *Hum Reprod*, 13: 1878-1886
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., Smith, C. E. (2010a). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to Spermatogenesis, Spermatogonia, and Spermatoocytes. *Microsc Res Tech*, 73: 243-278
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., Smith, C. E. (2010b). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 5: intercellular junctions and contacts between germs cells and Sertoli cells and their regulatory interactions, testicular cholesterol, and genes/proteins associated with more than one germ cell generation. *Microsc Res Tech*, 73: 409-494
- Hess, R., Franca, L. (2005). Structure of the Sertoli Cell. In: *Sertoli Cell Biology*, Elsevier, 19-40
- Hild, S. A., Marshall, G. R., Attardi, B. J., Hess, R. A., Schlatt, S., Simorangkir, D. R., Ramaswamy, S., Koduri, S., Reel, J. R., Plant, T. M. (2007). Development of *l*-CDB-4022 as a Nonsteroidal Male Oral Contraceptive: Induction and Recovery from Severe Oligospermia in the Adult Male Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). *J Endocrinol*, 148:1784-1796
- Hild, S. A., Reel, J. R., Lerner, J. M., Blye, R. P. (2001). Disruption of Spermatogenesis and Sertoli Cell Structure and Function by the Indenopyridine CDB-4022 in Rats. *Biol Reprod*, 65: 1771-1779

Huynh, P. N., Hikim, A. P., Wang, C., Stefanovic, K., Lue, Y. H., Leung, A., Atienza, V., Baravarian, S., Reutrakul, V., Swerdloff, R. S. (2000). Long-term effects of triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function, and fertility in male rats. *J Androl*, 21: 689-699

Itoh, T., Mitsumori, K., Kawaguchi, S., Sasaki, Y. F. (2005). Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test. *Mutation Research*, 603: 135-144

Junqueira L, Carneiro J (2005). The male reproductive System. In: *Basic Histology*; eleventh edition; Mc Graw-Hill, 418-434

Karp G. (2005). Interactions between cells and their environment. In: *Cell and Molecular Biology*; 4th edition; Wiley, 243-278

Keutz, von, E., Schlüter, G. (1999). Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother*, 43: 91-100

Khaki, A., Novin, M. G., Khaki, A. A., Nouri, M., Snati, E., Nikmanesh, M. (2008). Comparative Study of the Effects of Gentamicin, Neomycin, Streptomycin and Ofloxacin Antibiotics on Sperm Parameters and Testis Apoptosis in Rats. *J Biol Sci Pak*, 11: 1683-1689

King, K., Chan, P. J., Patton, W., King, A. (1997). Antibiotics: effect on cryopreserved-thawed human sperm motility in vitro. *Fertil Steril*, 67: 1146-1151

Koduri, S., Hild, S. A., Pessaint, L., Reel, J. R., Attardi, B. J. (2008). Mechanism of Action of *l*-CDB-4022, a Potential Nonhormonal Male Contraceptive, in the Seminiferous Epithelium of the Rat Testis. *J Endocrinol*, 149: 1850-1860

Kruse, M., Stahlmann, R. (2006). Neue Antibiotika zur Therapie von Atemwegsinfektionen. *Pneumologie*, 60: 417-427

Lablack, A., Bourdon, V., Defamie, N., Batias, C., Mesnil, M., Fenichel, P., Pointis, G. & Segretain, D. (1998). Ultrastructural and biochemical evidence for gap junction and connexin 43 expression in a clonal Sertoli cell line: a potential model in the study of junctional complex formation. *Cell Tissue Res*, 294: 279-287

Lawrence, K. R., Adra, M., Gillman, P. K. (2006). Serotonin Toxicity Associated with the Use of Linezolid: A Review of Postmarketing Data. *CID*, 42: 1578-1583

Li, M. W., Mruk, D. D., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. (2009). Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 10213-10218

Livermore, D.M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J Antimicrob Chemother*, 51: 9-16

Lode, H. (2010). Safety and tolerability of commonly prescribed oral antibiotics for the treatment of respiratory tract infections. *Am J Med*, 123: 26-38

Lode, H., Allewelt, M. (2002). Role of newer fluoroquinolones in lower respiratory tract in-

fections. *J Antimicrob Chemother*, 49: 709-712

Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P.C. (2007). Zelluläre Organellen, Strukturen und Transportvorgänge. In: *Biochemie und Pathobiochemie 8. Auflage*; Springer Medizin, 173-215

Lubasch, A., Keller, I., Borner, K., Koepe, P., Lode, H. (2000). Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2600-2603

Maura, A., Pino, A. (1991). Induction of sperm abnormalities in mice by norfloxacin. *Mutat Res*, 264: 197-200

McKee, E. E., Ferguson, M., Bentley, A. T., Marks, T. A. (2006). Inhibition of Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis by Oxazolodinones. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2042-2049

Miravittles, M., Anzueto, A. (2008). Moxifloxacin: a respiratory fluoroquinolone. *Expert Opin Pharmacother*, 9: 1755-1772

Mitic, L. L. & Anderson, J. M (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol*, 60: 121-142

Mitic, L. L., Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M.. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279: 250-254

Moellering, R. C. (2003). Linezolid: The First Oxazolidinone Antimicrobial. *Ann Intern Med*, 138: 135-142

Moffit, J. S., Bryant, B. H., Hall, S. J., Boekelheide, K. (2007). Dose-Dependent Effects of Sertoli Cell Toxicants 2,5-Hexanedione, Carbendazim, and Mono-(2-ethylhexyl) phthalate in Adult Rat Testis. *Toxicol Pathol*, 35: 719-727

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

Mruk, D. D., Silvestrini, B. & Cheng, C. Y. (2008). Anchoring junctions as drug targets: role in contraceptive development. *Pharmacol Rev*, 60: 146-180

Narayana, K. (2008). An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *J Toxicol Sci*, 33: 85-96

Norrby, R. (2001) Linezolid--a review of the first oxazolidinone. *Expert Opin Pharmacother*, 2: 293-302

Parreira, G. G., Melo, R. C., & Russel, L. D. (2002). Relationship of sertoli-sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views. *Biol Reprod*, 67: 1232-1241

Petersen, U. (2001). Die Evolution der Chinolone: Von der Nalixidinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation. In: *Pharmazie in unserer Zeit*, 376-381

Pfizer (09/2009) Fachinformation Zyvoxid

Pognan, F., Masson, M. T., Lagelle, F., & Charuel, C. (1997). Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell Biol Toxicol*, 13: 453-463

Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D., Segretain, D. (2010). Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 365: 1607-1620

Pointis, G., Segretain, D. (2005). Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol Metab*, 16: 300-306

Prasad, V. (2007). New oxazolidinones. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 454-460

Richburg, J. H. & Boekelheide, K. (1996). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 137: 42-50

Riecke, K., Stahlmann, R. (2000). Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia*, 32: 209-218

Russel, L. D. (1977). Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J Anat*, 148: 301-312

Saiman, L., Goldfarb, J., A Kaplan, S., Wible, K., Edge-Padbury, B., Naberhuis-Stehouwer, S., Bruss, J. B. (2003). Safety and tolerability of linezolid in children. *Pediatr Infect Dis J*, 22: 193-200

Salanova, M., Ricci, G., Boitani, C., Stefanini, M., De Grossi, S. & Palombi, F. (1998). Junctional contacts between Sertoli cells in normal and aspermatogenic rat seminiferous epithelium contain alpha6beta1 integrins, and their formation is controlled by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, 58: 371-378

Salanova, M., Stefanini, M., De Curtis, I., Palombi, F. (1995). Integrin receptor alpha 6 beta 1 is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 52: 79-87

Sanovi Aventis (09/2007). Fachinformation Tavanic® 5 mg/ml Infusionslösung

Segovia, M., Jenkins, J. A., Paniagua-Chavez, C., Tiersch, T. R. (1999). Flow Cytometric Evaluation of Antibiotic Effects on Viability and mitochondrial Function of refrigerated Spermatozoa of Nile Tilapia. *Theriogenology*, 53: 1489-1499

Sharpe, R., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125: 769-784

Siu, M., Mruk, D., Lee, W., Cheng, C. (2003). Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of beta 1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins. *Endocrinology*, 144: 2141-2163

Stahlmann, R., Lode, H. (2000). Safety Overview: Toxicity, Adverse Effects, and Drug Interaction. In: Andiole V (ed). *The Quinolones*; London GB Academic Press, 3rd edition; 398-453

Stahlmann, R., Lode, H. (2005). Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Aktories et al (Hrsg) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 10. Auflage; Urban & Fischer, 789-928

Stahlmann, R., Lode, H. (2010). Safety considerations of fluoroquinolones in the elderly: an update. *Drugs Aging*, 27: 193-209

Tan, T. Q. (2004). Update on the Use of Linezolid: A Pediatric Perspective. *Pediatric Infect Dis J*, 23: 955-956

Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Kurohmaru, M. (2007). Disappearance of Vimentin in Sertoli Cells: A Mono(2-ethylhexyl) Phthalate Effect. *Int J Toxicol*, 26: 289-295

Thallinger, C., Buerger, C., Plock, N., Kljucar, S., Wuenscher, S., Sauermann, R., Kloft, C., Joukhadar, C. (2007). Effect of severity of sepsis on tissue concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother*, 61: 173-176

Timmermans, L. M. (1989). Modifications in spermatogenesis following antibiotics therapy. *Acta Urol Belg*, 57: 35-46

Van Bambeke, F., Michot, J.-M., Van Eldere, J., Tulkens, P. M. (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect*, 11: 256-280

Van Bambeke, F., Tulkens, P. M. (2009). Safety profile of the respiratory fluoroquinolone moxifloxacin: comparison with other fluoroquinolones and other antibacterial classes. *Drug Saf*, 32: 359-378

Veeramachaneni, D. N. R., Palmer, J. S., Amann, R. P., Kane, C. M., Higuchi, T. T., Pau, K.-Y. (2006). Disruption of sexual function, FSH secretion, and spermiogenesis in rabbits following developmental exposure to vinclozolin, a fungicide. *Reproduction*, 131: 805-816

Vogl, A.W., Pfeiffer, D. C., Mulholland, D., Kimel, G. & Guttman, J. (2000). Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol*, 63: 1-15

Wong, C. H., Xia, W., Lee, N. P. Y., Mruk, D. D., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. (2005). Regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the seminiferous epithelium by focal adhesion-associated proteins in testosterone-suppressed rat testes. *Endocrinology*, 146: 1192-1204

Wong, C. H. & C. Y. Cheng (2005). The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 71: 263-296

7 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann für die Vergabe dieses interessanten Themas und die intensive Betreuung bedanken. Er war stets zu Diskussionen und Anregungen bereit.

Desweiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Stahlmann für das gute Arbeitsklima und die nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken, auch für die tolle Zusammenarbeit mit den anderen Arbeitsgruppen, insbesondere den Arbeitsgruppen Vetter und Fimmel.

Herrn Prof. Mehdi Shakibaei danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der licht- und elektronenmikroskopischen Bilder.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mich während meines ganzen Studiums unterstützt und an mich geglaubt haben.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem Lebensgefährten Martin Zurek für die gemeinsame Arbeit, die viele gemeinsame Zeit, das gegenseitige Bestärken zum Weitermachen und Diskutieren.

8 Erklärung

„Ich, Agnes Föst, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wirkungen von Linezolid, Levofloxacin und Moxifloxacin auf die Sertoli-Zelllinie SerW₃ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10 Veröffentlichungen

Foest, A., Zurek, M., Baumann-Wilschke, I., Stahlmann, R. (2009). Sertoli cells (SerW₃) are Affected on Linezolid at Therapeutically Relevant Concentrations. In: Toxicology Letters, 189S:S57-S273 (Abstract-No. I11)

Mehdi Shakibaei, Agnes Föst, Martin Zurek, Valentyna Zolotukhina, Ralf Stahlmann (2008) Linezolid verursacht ultrastrukturelle Veränderungen bei SerW3-Zellen *in vitro*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (1):1–98 (Abstract No: 370)