

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Freien Universität Berlin

eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Einfluß von Spironolacton
auf die männliche Fertilität
nach pränataler Exposition bei der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Silke Wittchen
Tierärztin aus Remscheid

Berlin 1999
Journal-Nr. 2141

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG
DES FACHEREICHES VETERINÄRMEDIZIN
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Frau Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter:	Priv. Doz. Dr. I. Chahoud
Tag der Promotion:	2. Juli 1999

gewidmet der „Zwaardvisch“

1 EINFÜHRUNG	6
1.1 Problemstellung dieser Arbeit	7
1.2 Für die Versuche verwendete Substanz	7
2 STAND DER FORSCHUNG	8
2.1 Morphologie, Entwicklung und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane	8
2.1.1 Anatomie und Histologie	8
2.1.2 Entwicklung	11
2.1.3 Funktion	14
2.2 In dieser Arbeit benutzte Substanz	17
3 MATERIAL, METHODEN UND VERSUCHSPLAN	18
3.1 Material	18
3.1.1 Tiere, ihre Haltung und Verpaarung	18
3.1.2 Spironolacton	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Ausschluß systemischer Wirkungen der Substanzen	21
3.2.2 Entwicklung der Geschlechtsorgane	23
3.2.3 Gewicht und Funktion der Geschlechtsorgane	23
3.2.4 Enzymhistochemische Leydigzellbeurteilung	26
3.2.5 Beurteilung der Wurfdaten der F2-Generation	27
3.2.6 Töten der Tiere	27
3.2.7 Statistische Auswertung	27
3.3 Durchgeführte Versuche	31
3.3.1 Allgemeines	31
3.3.2 Spezielles	31
4 ERGEBNISSE	34
4.1 Ausschluß systemischer Wirkungen der Substanz	34
4.1.1 Verlauf der Trächtigkeit	34
4.1.2 Gewichtsentwicklung	35
4.1.3 Wurfparameter	38

4.1.4 Makroskopische Untersuchung	42
4.1.5 Organgewichtsbestimmung	42
4.2 Entwicklung der Geschlechtsorgane	47
4.3 Gewicht und Funktion der Geschlechtsorgane	48
4.3.1 Gewichtsbestimmung	48
4.3.2 Fertilität	50
4.3.3 Andrologische Untersuchung	51
4.4. Enzymhistochemische Beurteilung der Leydigzellen	54
4.5 Beurteilung der Wurfdaten der F2-Generation	60
5 DISKUSSION	61
6 ZUSAMMENFASSUNG	64
6.1 Summary	65
7 ANHANG	66
7.1 Verzeichnis der Abkürzungen	66
7.2 Ergebnisdatensätze	67
7.3 Verzeichnis der aufgeführten Literaturstellen	82
7.3 Lebenslauf	87

1 Einführung

In den letzten 30-50 Jahren sind mehrfach Befunde vorgelegt worden [Auger et al, 1995; Carlsen et al, 1992], nach denen die Spermienanzahl bei bestimmten Probanden, meist Samenspender in Fertilisationskliniken, abgenommen haben soll. Diese Publikationen sind wegen erheblicher Mängel kritisiert worden [Sherins, 1995], und in anderen Studien sind solche Befunde nicht bestätigt worden [Brake und Krause 1992]. Trotz der Kontroverse über die Relevanz entsprechender Befunde sind bereits Hypothesen zum Kausalzusammenhang aufgestellt worden [Sharpe und Skakkebaek, 1993]. Danach soll eine entsprechende, bisher nicht eindeutig nachgewiesene Wirkung durch Umweltsubstanzen mit östrogenem Potential (sogenannte: Ökoöstrogene) hervorgerufen werden.

Die synthetische nichtsteroidale Substanz Diethylstilböstrol hat eine östrogene Wirkung. Sie wird therapeutisch benutzt und wurde in den Jahren 1945-1971 mehreren Millionen schwangeren Frauen verabreicht. Sie hat, neben dem bekannten transplazentär-karzinogenen Effekt bei weiblichen Nachkommen, bei den Söhnen ein gehäuftes Auftreten von Kryptorchismus und Hypospadie sowie eine verminderte Spermamenge und reduzierte mittlere Spermienanzahl zur Folge gehabt [Stillman, 1982]. Dies wird als ein Indiz für eine Beeinflussung auch der männlichen Entwicklung durch diese sehr wirksame östrogene Substanz angesehen.

Eine erhöhte Östrogenkonzentration während der Embryonalentwicklung kann demzufolge eine negative Wirkung auf die männliche Fruchtbarkeit besitzen. Ähnliche Wirkungen könnten Substanzen haben, die in der Lage sind, die Testosteronproduktion im männlichen Embryo zu senken, da Androgene intrauterin essentiell für die männliche Entwicklung sind [Nieschlag und Scriba, 1993].

Es ist lange bekannt, daß viele natürlich vorkommende und künstlich hergestellte Substanzen östrogene Eigenschaften besitzen können [Verdeal und Ryan, 1979; Field et al, 1990 und andere]. Meist ist die Affinität zu entsprechenden Rezeptoren sehr viel geringer als die von Östradiol. Die meisten dieser Substanzen sind keine Steroide.

Bei einer Reihe von anderen Substanzen wurde beim adulten männlichen Säugetier eine negative Wirkung auf die Androgensynthese bzw. unspezifisch auf die Hodenfunktion nachgewiesen (z.B. Ketokonazol und Spironolacton indirekt durch die Beeinflussung von Cytochrom P 450, aber auch für Blei und anderen Substanzen) [Jockhövel, 1993].

1.1 Problemstellung dieser Arbeit

Basierend auf den genannten, z. T. kontroversen wissenschaftlichen Meinungen und Ergebnissen hinsichtlich der Fertilitätsbeeinflussung, sowie den genannten Überlegungen, soll diese Arbeit am Tiermodell Ratte zur Klärung des Sachverhaltes beitragen, indem folgende Frage geklärt wird:

Kann eine therapeutisch (sowohl human- als auch veterinärmedizinisch) eingesetzte Substanz mit antiandrogenen Nebenwirkungen einen schädigenden Einfluß auf die Entwicklung oder die Funktion des Genitaltraktes haben?

1.2 Für die Versuche verwendete Substanz

Für die Versuche zu dieser Dissertation wurde folgende Substanz ausgewählt:

- Spironolacton, ein als Diuretikum benutzter Aldosteronantagonist, von dem bekannt ist, daß er die zur Testosteronsynthese notwendigen enzymatischen Schritte hemmen kann.

2 Stand der Forschung

2.1 Morphologie, Entwicklung und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane

In diesem Kapitel wird eine Kurzübersicht über den Aufbau der männlichen Geschlechtsorgane, ein kurzer Abriß über ihre embryonale Entwicklung und über ihre Physiologie gegeben.

2.1.1 Anatomie und Histologie

Zu den männlichen Geschlechtsorganen zählt man folgende Strukturen:

1. Keimdrüsen: Bildungsstätte der Keimzellen
2. Ausführungswege für die Keimprodukte (Spermien)
3. akzessorische Geschlechtsdrüsen
4. Begattungsorgane

Die ersten drei Kompartimente faßt man unter dem Begriff innere Geschlechtsorgane zusammen, nur die Begattungsorgane bilden die äußeren Geschlechtsorgane.

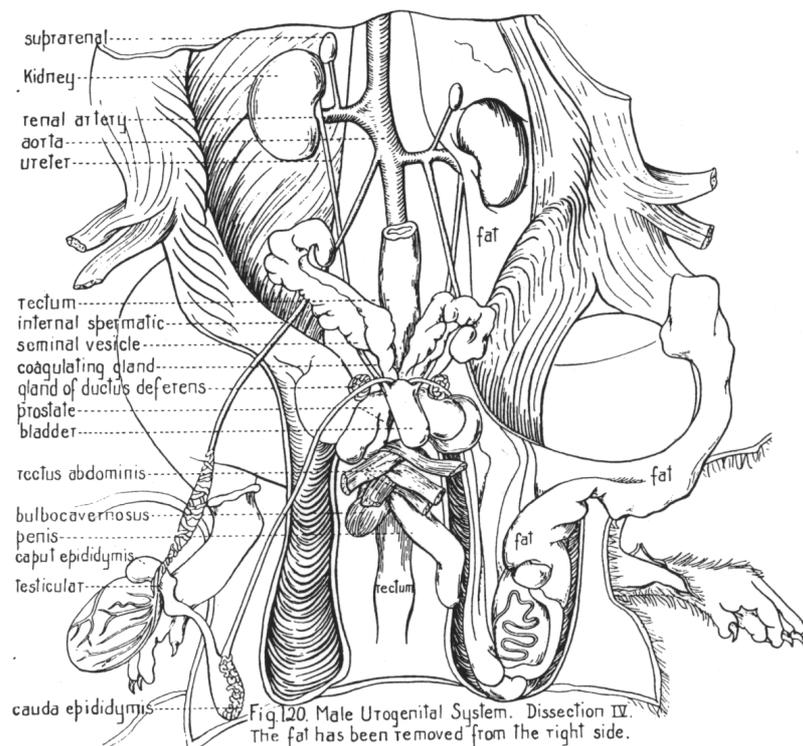


Abb. 1: Männliches Urogenitalsystem der Ratte (Green 1968)

2.1.1.1 Keimdrüsen

Die männlichen Keimdrüsen (Hoden, Testis) liegen im Hodensack (Skrotum) und sind von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. Stränge dieses Bindegewebes teilen beim Menschen den Hoden; im Gegensatz dazu weist der Hoden der Ratte sehr wenig intertubuläres Bindegewebe auf. In den Hoden befinden sich die Samenkanälchen. Sie sind die Bildungsstätte der Samenfäden (Spermien). Ab der Geschlechtsreife findet hier die Samenbildung (Spermatogenese) statt. Die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) sind von einer bindegewebigen Hülle umgeben. Dadurch entsteht zwischen den Samenkanälchen der intertubuläre Raum. Dieser enthält die Blut- und Lymphgefäße. Die am häufigsten gefundene Zellart dieses Bereiches ist die *Leydigzelle*. Zudem finden sich hier auch Makrophagen und wenige andere vom Knochenmark abstammende Zellen. In den Tubuli seminiferi liegen die Fußzellen (Sertolizellen), die die sich hier entwickelnden Samenzellen ernähren.

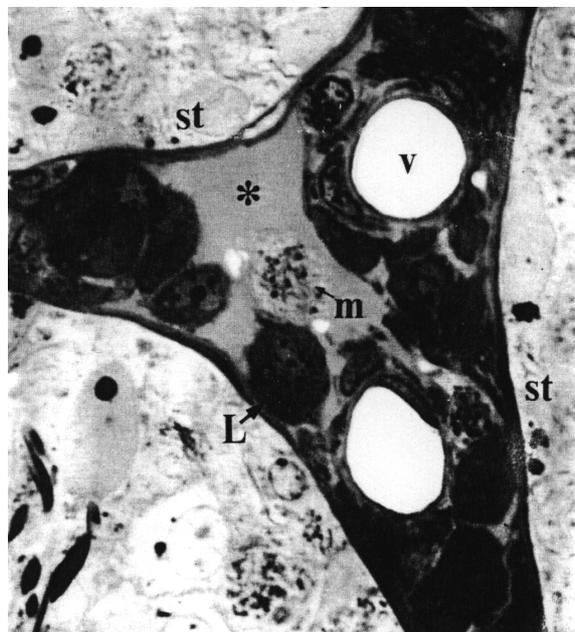


Abb. 2: Intertubuläre Raum mit Tubulusanschnitten der Ratte (Lonnie et al 1990)

L = Leydigzelle, st = Tubulusanschnitt, v = Blutgefäß, m = Mitochondrium, * = Protein

Durch die besondere Art und Weise der Zellverbindungen der Sertolizellen bilden sie die sogenannte Blut-Hoden-Schranke (s.u.). Diese trennt basal von luminal, wodurch die luminal gelegenen haploiden Spermien vor dem Immunsystem und vor mutagenen Einflüssen geschützt werden.

Die Tubuli seminiferi münden an beiden Enden ins Hodennetz (Rete testis). Die Samenkanälchen sind Schläuche, die sehr gewunden im Hoden liegen. Allerdings haben sie eine Längsausrichtung, sodaß das mikroskopische Bild bei einem horizontalen Schnitt durch das Organ vor allem

Querschnitte der Schläuche präsentiert, ein Schnitt längs der Achse zeigt zum größten Teil längsgeschnittene Tubuli seminiferi.

Aus dem Rete testis gelangen die Spermien in den Nebenhoden.

2.1.1.2 Ausführungswege für die Spermien

Die Ausführungswege beginnen im Nebenhoden (Epididymis), der sich wie der Hoden im Skrotum befindet. Der Epididymis entläßt den Samenleiter (Ductus deferens) in das Beckenstück der Harnröhre (am Colliculus seminalis), die danach Harn-Samenröhre (Canalis urogenitalis) genannt wird.

Der Nebenhoden besteht aus einem Kopf (Caput epididymidis), einem Körper (Corpus epididymidis) und einem Schwanz (Cauda epididymidis). Er liegt direkt am Hoden und ist fest mit ihm verbunden.

Im Caput epididymidis liegen enge Kanälchen (Ductuli efferentes), die aus dem Rete testis hervorgehen. Sie fließen zum Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis) zusammen. Dieser liegt eng gewunden in Corpus und Cauda epididymidis und geht beim Austritt aus dem Epididymis in den Samenleiter (Ductus deferens) über.

Im Ductus epididymidis findet unter Einwirkung des Nebenhodensekretes die Ausreifung der Spermien statt. Bis zu diesem Zeitpunkt werden die noch unbeweglichen Spermien mit Hilfe des Flüssigkeitsstroms fortbewegt.

Es kommt im Nebenhodenkanal zur Vorratshaltung der Spermien. Bei einer Ejakulation werden diese durch peristaltische Kontraktionen der die Kanälchen umgebenden glatten Muskelzellen in den Samenleiter (Ductus deferens) weitergeschoben.

2.1.1.3 Akzessorische Geschlechtsdrüsen

Die Ratte besitzt folgende akzessorische Geschlechtsdrüsen: Koagulationsdrüsen, Samenblasendrüsen, Vorsteherdrüse (Prostata), Ampullendrüsen, Harnröhrenzwiebeldrüsen und Präputialdrüsen. Ampullendrüsen, Koagulationsdrüsen, Prostata und Samenblasendrüsen münden in der Umgebung des Colliculus seminalis, der Einmündungsstelle des Ductus deferens in die Harnröhre. Die Harnröhrenzwiebeldrüse mündet weiter kaudal in den Canalis urogenitalis. Die Präputialdrüsen entlassen als letzte ihr Sekret, was sich mit dem der anderen akzessorischen

Geschlechtsdrüsen und den Spermien bei einer Ejakulation mischt und so zur Samenflüssigkeit (Ejakulat) wird.

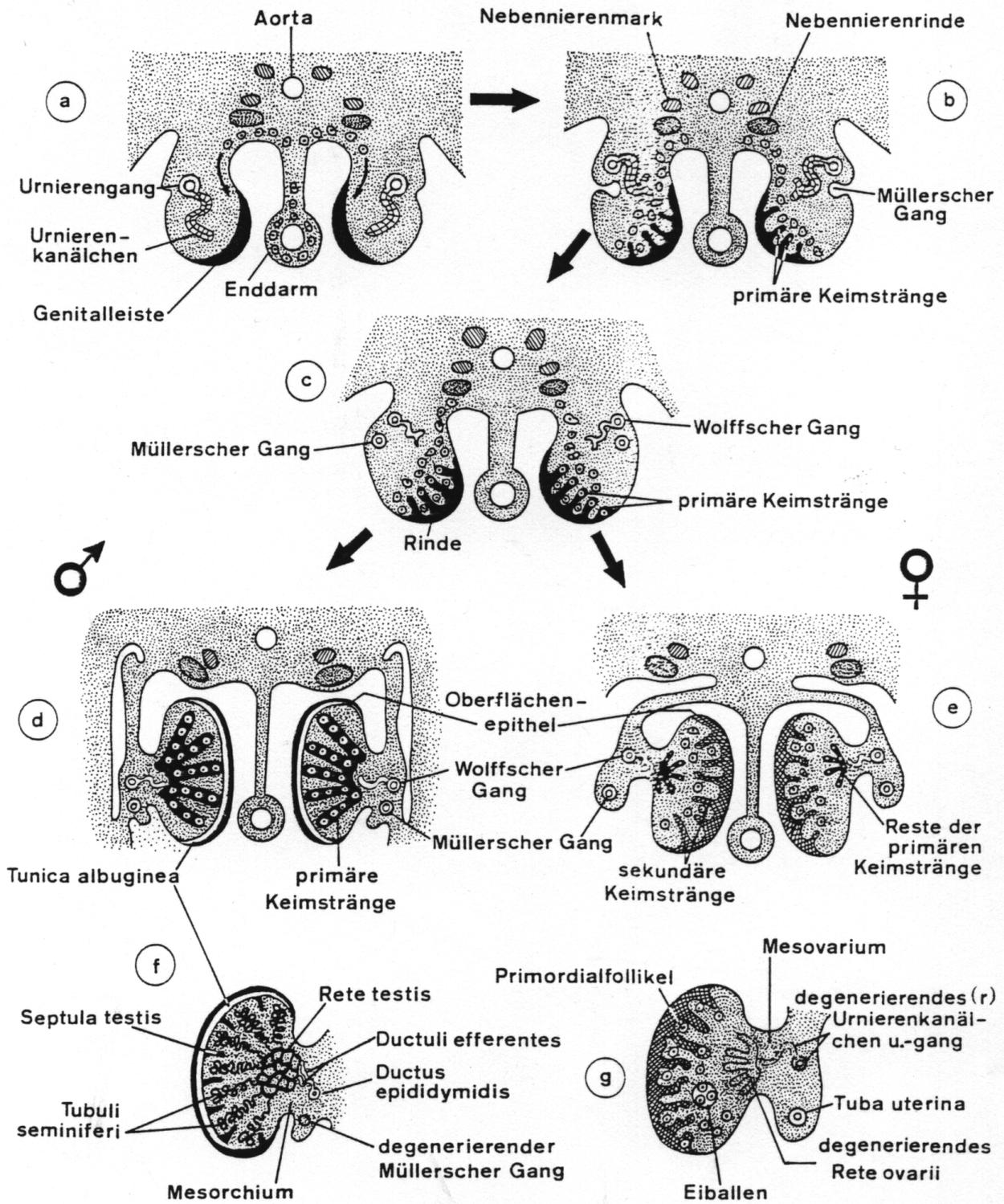
2.1.2 Entwicklung

Die vorgeburtliche Entwicklung des männlichen Geschlechts soll hier nur insoweit beschrieben werden, wie sie für das Verständnis dieser Arbeit relevant ist (nach J.C. Lamb IV und P.M.D. Foster, 1988).

Die Urkeimzellen gelangen durch pseudopodale Bewegung in die Nähe der Urnieren. Es wird angenommen, daß sie durch eine chemotaktische Substanz von dieser Region angelockt werden. Die Gonaden bestehen dann aus drei Zellarten. Die Urkeimzellen (schon auf dem Weg haben sie sich durch mitotische Teilung ständig vermehrt), Coelomepithel und Mesenchymzellen. Bis hierher läßt sich die Entwicklung der männlichen und weiblichen Anlagen nicht unterscheiden. Erst später entwickeln die männlichen Anlagen Samenkanälchen und interstitielle Zellen. Dann ist das Y-Chromosom dieser Zellen sehr aktiv [Wilson, 1978].

Zwar bestimmt das genetische Geschlecht die Entwicklung der Gonaden, deren Hormone sind jedoch für die Entwicklung des Phänotyps verantwortlich. Diese These wurde durch Versuche an Ratten bestätigt, bei denen man Foeten vor der Entwicklung des Phänotyps die Gonaden entfernt hat. Es entstanden nur Weibchen. Daraus wird gefolgert, daß die testikuläre Sekretion der ausschlaggebende Faktor zur Entstehung eines männlichen Phänotyps ist. Es wird angenommen, daß sowohl die Ausschüttung von androgenen Steroiden als auch ein weiterer Faktor (evt. Peptide) für die männliche Entwicklung des Wolffschen Ganges bzw. die Regression des Müllerschen Ganges essentiell sind. Bei Mensch und Kaninchen wurde festgestellt, daß das einzige Androgen, das in nennenswerter Menge im Foetus produziert wird, Testosteron selbst ist [Wilson, 1978]. Bei der Ratte erreicht die Testosteronproduktion am 18.-19. Gestationstag den Höhepunkt und sinkt nach der Geburt innerhalb von zwei Wochen bis zum Nullpunkt ab [Nomura et al., 1966; Warren et al., 1973]. Dieses Hormon ist sowohl für die Entwicklung der Spermatogenese als auch für die extratestikuläre männliche Entwicklung verantwortlich. Das aktive Androgen, das die Virilisation des Urogenitaltraktes bewirkt, ist der 5- α -reduzierte Metabolit - 5- α -Dihydrotestosteron. Testosteron wird von den fetalen Hoden produziert und in diesen Zielorganen in den aktiven Metaboliten verwandelt [Liang et al., 1983; Imperato-McGinley et al., 1986; George und Peterson, 1988].

Lange war unklar, ob der Start der Produktion von Testosteron durch ein übergeordnetes Signal der Hypophyse ausgelöst wird. Es ist inzwischen jedoch bestätigt, daß der Hoden zuerst autonom die Steroide produziert und erst später in der embryonalen Entwicklung unter die Kontrolle der Hypophyse gestellt wird. Aufgrund von Gendefekten wurde festgestellt, daß beim Fehlen bestimmter Enzyme, 20-Desmolase und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, ein männlicher Pseudohermaphroditismus auftritt [Goldstein und Wilson, 1972].



2.1.2.A Entwicklung der Keimdrüsen (beim Menschen; aus Moore, 1980)

2.1.3 Funktion

2.1.3.1 Neuroendokrinologie

Die Aktivität des Hodens wird von zwei hormonellen Systemen beeinflusst. Zum einen ist es die endokrine Kontrolle, zum anderen der parakrine Einfluß.

Endokrin wirken die Hypophysenhormone Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) als Kontrolle der Aktivität und der Entwicklung des Hodens. Beide kommen über den Blutweg zum Hoden und haben unterschiedliche Hauptzielorte. FSH wirkt vor allem auf die *Sertolizellen*. Hier bewirkt es die Größenzunahme, eine Zunahme der Proteinbiosynthese und eventuell auch eine Zunahme der Ausschüttung von androgenbindendem Protein. Die Sertolizelle wiederum ist für die Entwicklung und Funktion der *Leydigzelle* unersetzbar. Allerdings braucht die Leydigzelle zusätzlich die Stimulation durch das LH. Die Leydigzelle produziert und sezerniert das Testosteron. Dieses Hormon ist das eigentliche männliche Geschlechtshormon. Es hat sowohl parakrine als auch endokrine Funktionen. Die endokrinen Funktionen des Testosterons sind die Stimulation der akzessorischen Geschlechtsorgane, der Knochen und der Muskulatur. Allerdings ist eine viel geringere Konzentration (ca. 25-45%; Sharpe 1988) für diese Funktionen notwendig als für die parakrine Steuerung im Hoden.

Eine Anzahl von Hormonen ist an der parakrinen Steuerung der Funktion des Hodens beteiligt. Sie haben Einfluß auf die Durchblutung, auf die Samenkanälchen und auf die Leydigzellen. Hier soll nur die parakrine Wirkung der Hormone erwähnt werden, die von den Leydigzellen produziert werden. Dies sind:

- Testosteron
- Opioid-Peptide
- Oxytocin
- Vasopressin.

Ohne *Testosteron* kann keine Spermatogenese stattfinden. Allerdings weiß man über den Wirkungsmechanismus nur, daß das Testosteron wahrscheinlich seine Wirkung über die Sertolizellen ausübt. *Opioid-Peptide*: β -Endorphin und andere Proopiomelanocortinderivate sollen eine hemmende Wirkung auf die Sertolizellen haben. *Oxytocin* hat eine Wirkung auf die Myoepithelien, die die Tubuli seminiferi umgeben. Es führt zur Kontraktion der Zellen. Zwei Arten von Kontraktionen sind bekannt. Eine bewirkt die Fortbewegung der Spermien zum Hodennetz, die

andere ist eventuell für die Loslösung der ersten Teilungszellen von der Basis verantwortlich. *Vasopressin* kann in vitro die Ausschüttung von Testosteron hemmen [Sharpe, 1988].

2.1.3.2 Spermatogenese

Ab der Geschlechtsreife beginnt in den Samenkanälchen der Hoden die Bildung der Spermien (Spermatogenese). Man unterteilt diesen Prozeß in drei Schritte:

1. Spermatozytogenese

Aus einer Stammspermatogonie entsteht durch mitotische Teilung eine Stammspermatogonie und eine proliferative Spermatogonie. Diese teilt sich wiederum und läßt sowohl proliferative als auch differenzierende Spermatogonien entstehen. Durch diese Teilungsprozesse entsteht schon zu Beginn der Spermatogenese eine sehr große Zellzahl. Bei der Ratte entsteht während der Spermatozytogenese eine um das eintausendfache erhöhte Zellzahl, während die spätere Meiose die Zellzahl nur noch vervierfacht. Der Erhalt der Stammspermatogonien ist wichtig, da sie resistenter als die anderen Spermatogonienformen gegenüber äußeren Einflüssen sind. Solange sie erhalten bleiben, kann die Spermatogenese erneut gestartet werden.

2. Meiose

Es folgen zwei meiotische Teilungen, in denen das genetische Material neu kombiniert und getrennt wird. Bevor die Spermatisden in die leptotäne Phase der Meiose eintreten, erscheinen die Zellen im intermediären Kompartiment (s.u.) des Hodens.

3. Spermiogenese

Bei der Spermiogenese findet die Ausdifferenzierung zur reifen Samenzelle (Spermium) statt. Währenddessen findet die Bildung des Akrosoms, die Umgestaltung des Zellkerns und der Aufbau der Geißel statt. Zu Beginn wird im Golgi-Apparat vermehrt Granula gebildet (*Golgi-Phase*), woraus sich ein akrosomales Vesikel, das sich an die Kernmembran anheftet, bildet. Am Gegenpol induziert ein Zentriol die Geißelbildung. In der *Kappenphase* breitet sich das akrosomale Vesikel zu einer Kopfkappe aus. In der anschließenden *akrosomalen Phase* werden der Zellkern und die Geißel, um die sich Mitochondrien ansammeln, verlängert. In der *Reife-Phase* bildet sich die endgültige Form von Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz des Spermiums.

Die Sertolizellen koordinieren den oben beschriebenen Prozess der Spermiogenese. Sie sind unerlässlich für die Entwicklung der Spermien und haben eine Vielzahl von Aufgaben:

1. *Zusammenhalt des Tubulusepithel.*

Die Sertolizellen sind mit der Basalmembran durch Hemidesmosomen und mit den Keimzellen durch Desmosomen ähnliche Verbindungen, gap-junctions und weitere Verbindungsarten verbunden. Untereinander werden die Verbindungen durch Desmosomen, gap- und tight-junctions gebildet (Blut-Hoden-Schranke). Diese verschiedenen Verbindungen formen eine komplexe Struktur des Epithels und ermöglichen ein interzelluläre Kommunikation.

2. *Unterteilung des Tubulusepithels*

Durch die Bildung neuer und die Auflösung alter tight junctions werden die Keimzellen auf die luminal Seite transportiert. Bis zur Loslösung bleiben sie vom Zytoplasma der Sertolizellen umgeben, wodurch das temporäre Kompartiment entsteht. Des weiteren sorgt die Sertolizelle für die Aufrechterhaltung der zwei permanenten (basal und adluminal) Kompartimente.

3. *Sekretion von Flüssigkeit für das tubuläre Lumen*

4. *Ablösen der fertigen Spermien durch Abbau der o.g. Zellverbindungen*

5. *Phagozytose von degenerierenden Keimzellen*

6. *Lieferung von Nährstoffen an die Keimzellen*

7. *Steroidsynthese und Steroidmetabolismus*

8. *Transport der Keimzellen durchs Tubulusepithel*

9. *Sekretion von Proteinen (z.B. Inhibin)*

10. *Regulation des Spermatogenesezyklusses*

11. *Ziel für Hormone bzw. Mediator der Hormoneffekte*

Die Dauer der Spermatogenese beträgt bei der Ratte ca. 58 Tage (Amman, 1982). Da die einzelnen Phasen der Entwicklung unterschiedlich lang dauern, ergeben sich in einem Tubulusabschnitt unterschiedliche Bilder der Entwicklung. Leblond und Clermont legten 1952 aufgrund dieses Sachverhaltes bei der Ratte 14 Tubulusepithelstadien fest. Ein *Tubulusepithelstadium* ist als Zusammenstellung von Keimzellen in speziellen Phasen der Entwicklung im quergeschnittenen Tubulus definiert.

Abschnitte im Tubulus mit dem gleichen Stadium werden *Segmente* genannt. Unter *Welle* wird der Abschnitt des Tubulus verstanden, in dem einmal alle Stadien von I bis XIV vorkommen. Ein *Zyklus* hingegen ist eine komplette Abfolge der Stadien I bis XIV in einem bestimmten Tubulusabschnitt über die Zeit.

2.2 In dieser Arbeit benutzte Substanz

Spirolacton ist eine Substanz, die dazu eingesetzt wird, den aldosteronabhängigen Natriumtransport im distalen Tubulus der Niere zu blockieren. Als solch ein Aldosteronantagonist schwenkt die Substanz Ödeme aus, und sie unterstützt die Behandlung des primären Hyperaldosteronismus [Mantero et al., 1973; Nicholls et al., 1979]. Sie wird außerdem bei Krankheiten, die mit einem erhöhten Aldosteronspiegel einhergehen, wie Leberzirrhose und kongestives Herzversagen, eingesetzt [Saunders und Alberti 1978]. Dieser Aldosteronantagonist hat eine Anzahl von unerwünschten Wirkungen wie Gynäkomastie [Sussmann, 1963], verringerte Libido und Impotenz bei Männern, sowie unregelmäßige Menstruationen und schmerzhafte Brustvergrößerung bei Frauen [Greenblatt und Koch-Weser, 1973]. Es existieren nur ungenaue Häufigkeitsbeschreibungen dieser Nebenwirkungen.

Basinger und Gittes [1974] fanden bei einer subkutanen Applikation von Spirolacton von zwei mal täglich 12,5 mg über 10 Tage bei adulten Rattenböcken ein reduziertes Gewicht von Prostata und Samenblasen. Männliche Nachkommen von Muttertieren, die von Tag 13 - 21 der Trächtigkeit mit 40 mg Spirolacton/kg KGW behandelt wurden, zeigen Verweiblichung [Hecker et al., 1980].

Vom Wirkungsmechanismus ist folgendes bekannt: Spirolacton ist ein kompetitiver Aldosteronantagonist, der die Bindung von Aldosteron an den zytoplasmatischen Rezeptor verhindert [Koushanpour, 1976; Porter, 1968]. Es ist aber auch in der Lage, die Aktivität von Enzymen zu unterdrücken (durch Hemmung der Synthese oder der Wirkung), die an der Biosynthese von Testosteron beteiligt sind [Sitteri et al., 1974]. Spirolacton wird im Zielgewebe in seinen aktiven Metaboliten 7- α -thiol-Spirolacton umgewandelt. Im Hoden geschieht dies im Zytosol durch eine Esterase [Flowers et al., 1989]. Stripp et al. [1975] und Menard et al. [1974] zeigten, daß die Behandlung mit Spirolacton eine Senkung der testikulären 17- α -Hydroxylase-Aktivität und des Gehaltes von mikrosomalem Cytochrom P 450 bewirkt. Die hat wiederum eine Senkung der Synthese von Testosteron zur Folge. Spirolacton bewirkt auch eine Hemmung von Cytochrom P 450 in der Nebennierenrinde und im Hoden und senkt auf diesem Wege die Aktivität der steroidal Hydroxylase. Auch dieses hat eine Senkung des Testosterongehaltes zur Folge [Menard et al., 1978; Greiner et al., 1976].

3 Material, Methoden und Versuchsplan

3.1 Material

Für die Versuche wurden Ratten verwendet. Ihre Haltung und allgemeine Handhabungen sowie die verwendete Applikation werden im Folgenden beschrieben.

3.1.1 Tiere, ihre Haltung und Verpaarung

Bei den Versuchen wurden Ratten des Stammes Wistar: Bor:spf,TNO (Fa. Winckelmann, Borchen, BRD) verwendet. Die Tiere wurden unter SPF(spezifisch-pathogen-freien)-Bedingungen in Makrolon-Käfigen verschiedener Größe gehalten. In Käfigen des Typs III befanden sich ein adultes männliches Tier oder zwei, seit dem Wurfstag nicht getrennte, männliche Geschwistertiere, bzw. ein Muttertier mit Wurf während der Laktationsperiode, in Käfigen des Typs IV bis zu sechs Rattenweibchen.

Bei einer Raumtemperatur von $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50\% \pm 5$ wurden die Tierräume von 9.00 Uhr bis 21.00 Uhr mit 200 Lux beleuchtet. Während der Dunkelphase von 21.00 bis 9.00 Uhr konnte bei Bedarf eine Notbeleuchtung angeschaltet werden.

Die Tiere wurden bei einem leichten Überdruck gehalten. Atmosphärische Luft wurde dazu durch ein Filtersystem eingeleitet. Eine 20-fache Luftumwälzung pro Stunde wurde bei einer Luftströmungsgeschwindigkeit von weniger als 0,3 m/s im Aufenthaltsbereich der Tiere gewährleistet.

Als Einstreu wurde Weichholzgranulat (Altromin 8-15, Fa. Altromin, Lage, BRD) verwendet.

Autoklaviertes Pelletfutter (Altromin 1324, Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser standen den Tieren zur freien Verfügung. Die Tiere wurden einmal pro Woche in Käfige mit neuer Einstreu und neuen Wasserflaschen gesetzt. Die Wasser- und Futtermittellieferung wurde täglich kontrolliert.

Weibliche, bisher unverpaarte Tiere wurden mit Zuchtböcken im Verhältnis drei zu eins verpaart. Die weiblichen Ratten wurden für einen Zeitraum von drei Stunden am Ende der Dunkelphase zu den männlichen, einzeln gehaltenen Tieren, gesetzt. Nach der Verpaarung wurde ein Scheidenabstrich auf Spermien untersucht. Waren Spermien vorhanden, galt der Verpaarungstag als Trächtigkeitstag 0 der angenommenen Trächtigkeit. Ab diesem Tag wurden die trächtigen Rattenweibchen einzeln gehalten.

Der Tag, an dem um 6.00 Uhr Jungtiere im Käfig des Rattenweibchens gefunden wurden, galt als Wurfstag und gleichzeitig als Postnataltag 1 der Nachkommen.

Die Laktationsperiode reichte vom Wurfstag bis zum Postnataltag 22. Am 23. Tag wurden die Jungtiere vom Muttertier abgesetzt.

Waren am Trächtigkeitstag 25 noch keine Jungtiere im Käfig, wurde das Muttertier gewogen, getötet, die Gebärmutter wurde entnommen und auf Resorptionsstellen hin untersucht.

3.1.2 Spironolacton

Spironolacton ist eine weiße Substanz, die in kristalliner Form vorlag (Fa. Sigma). Sie weist eine dem Aldosteron (Mineralocorticoid der Nebennierenrinde) ähnliche Struktur auf. Sie ist in Erdnußöl löslich und lichtempfindlich. Im Dunklen wurde für die Behandlung 20 mg der Substanz in 10 ml Erdnußöl in einem Ultraschallbad gelöst.

Die Substanz wurde, wie auch in der Literatur, s.c. verabreicht.

Die Substanz ist plazentagängig und wird über die Milch ausgeschieden. Sie wird vorwiegend durch Metabolisierung in der Leber eliminiert.

Tabelle 1: Übersicht der Daten der in den Versuchen verwendeten Substanz

Parameter/Substanz	Spironolacton
Chemische Bezeichnung	3-(7 α -Acetylthio-17 β -hydroxy-3-oxo-4-andosten-17-yl)-propionsäure - γ -lacton
Farbe	weiß
Aggregatzustand	kristallin
Summenformel	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S
Lösungsmittel	Erdnußöl
Konzentration	20 mg/10 ml
Dosierung	20 mg/kg KGW
Zeitpunkt	10. Graviditätstag bzw. 15. Graviditätstag
Häufigkeit	zweimalige Gabe im Abstand von acht Stunden
Applikationsart	s.c.
Bezugsquelle	Fa. Sigma

3.2 Methoden

3.2.1 Ausschluß systemischer Wirkungen der Substanzen

Durch die folgenden Untersuchungen sollten systemische Wirkungen der Substanzen erfaßt bzw. ausgeschlossen werden. Systemische Wirkungen könnten die Versuchsergebnisse verfälschen, da ein systemischer Schaden sich auch (unabhängig vom Einfluß der Substanz) auf die Funktion der Geschlechtsorgane auswirken kann.

3.2.1.1 Verlauf der Trächtigkeit

Während der Trächtigkeit kann es vorkommen, daß ein Muttertier vorzeitig wirft oder verstirbt. Dies wäre ein Anzeichen für eine allgemein toxische Wirkung der Substanz, vor allem, wenn ein zeitlicher Zusammenhang von Applikation und dem Werfen bzw. Versterben zu sehen ist.

Die Muttertiere, die bis Trächtigkeitstag 25 nicht geworfen hatten, wurden an diesem Tag getötet, der Uterus entnommen, für 5 Minuten in eine 10%ige Ammoniumsulfidlösung getaucht und auf Resorptionsstellen untersucht (mit dieser Lösung färben sich die Resorptionsstellen deutlich schwarz). Eine erhöhte Anzahl an Muttertieren, die alle angelegten Feten resorbierten, kann auf eine allgemein-toxische Wirkung der Substanz, aber auch auf einen direkten embryoletalen Effekt der Substanz hinweisen.

3.2.1.2 Gewichtsentwicklung

Alle Gewichtsbestimmungen wurden mit einer elektronischen Waage (Fa. Sartorius) durchgeführt, die aus fünf Meßwerten einen Mittelwert bildet. Die Körpergewichtsentwicklung des Versuchstieres ermöglicht (zusammen mit den unten genannten Meßgrößen) eine Aussage zum Allgemeinbefinden des Versuchstieres.

Muttertiere

Muttertiere wurden während der angenommenen Trächtigkeit am Tag 1, Tag 11 und Tag 21 gewogen. Hatte ein Tier bis Tag 25 nicht geworfen, wurde es vor der Tötung (s.o.) erneut gewogen. Während der Laktationsperiode wurde das Muttertier täglich gewogen.

Jungtiere

Das Gewicht jedes Jungtieres wurde ab dem ersten bis zum 22. Postnataltag täglich bestimmt.

3.2.1.3 Wurfparameter

Wurfgröße

Die Wurfgröße ist von mehreren Variablen abhängig. Als solche gelten: Individuelle Varianz, Nahrungsangebot und Umwelteinflüsse. Die Anzahl der Muttertiere wurde so gewählt, daß die individuelle Varianz beurteilt werden kann. Das Nahrungsangebot war für die Muttertiere unter den beschriebenen Versuchsbedingungen konstant. Unterschiedliche Umwelteinflüsse auf die Versuchsgruppen waren durch die Haltungsart - ausgenommen ist hierbei die Applikation der Substanzen - ausgeschlossen.

Vom Wurfstag bis zum Postnataltag 22 wurde die Anzahl der lebenden Nachkommen als Wurfgröße täglich erfaßt. Außerdem wurde die Anzahl von weiblichen und männlichen Tieren ermittelt.

Mortalität

Mit Hilfe der Mortalität werden Fehler faßbar, die intrauterin nicht zu einem Absterben der Frucht geführt haben, aber mit dem postnatalen Leben unvereinbar sind. Es wurde berücksichtigt, ob es sich um einen Totalverlust des Wurfs handelte, oder nur einzelne Nachkommen aus dem Wurf starben. Speziell bei Totalverlusten wird nach den Ursachen geforscht. Unruhe im Stall kann zum Beispiel das Muttertier veranlassen, den gesamten Wurf aufzufressen. Es könnten aber auch Fehlbildungen vorliegen.

Fellentwicklung

Ab dem siebten Postnataltag wurde der Wurf auf die Entwicklung des Felles untersucht. Das Fell galt als entwickelt, wenn ein erster weißer Flaum bei dem Jungtier sichtbar war.

Schneidezahndurchbruch

Die Beurteilung des Durchbruchs der Schneidezähne erfolgte ab dem siebten Postnataltag, indem mit der Fingerbeere über den Zahnrand des Ober- und Unterkiefers gestrichen wurde.

Öffnen der Augen

Täglich wurde die Anzahl an Tieren bestimmt, bei denen mindestens ein Auge spaltbreit geöffnet war.

3.2.1.4 Makroskopische Untersuchung

Bei der Entnahme der Organe wurde makroskopisch und palpatorisch auf ihre Oberflächenstruktur, Festigkeit, Feuchtigkeit, Farbe und gegebenenfalls Inhalt geachtet.

3.2.1.5 Organgewichtsbestimmung

Die Gewichte von Organen geben einen gewissen Anhaltspunkt über ihren Zustand.

Es wurde ein Gewichtsprofil von den Organen Herz, Thymus, Leber, Niere, Nebenniere, Gehirn und Milz erstellt. Damit läßt sich eine Aussage über den Gesamtzustand des Versuchstierorganismus treffen.

3.2.2 Entwicklung der Geschlechtsorgane

Der Hodenabstieg ist abhängig von der Testosteronkonzentration. Daher wurde bei den männlichen Nachkommen ab dem 16. Postnataltag der Hodenabstieg beurteilt. Hierzu wurden die Tiere im Nacken gegriffen und hochgehalten. War auf mindestens einer Seite im Skrotum eine Vorwölbung zu sehen, galt der Hodenabstieg als vollzogen.

3.2.3 Gewicht und Funktion der Geschlechtsorgane

Die Aktivität der Hoden und akzessorischen Geschlechtsorgane läßt sich anhand folgender Beurteilungskriterien beschreiben:

- Gewichtsbestimmung
- Fertilität
- andrologische Untersuchung

3.2.3.1 Gewichtsbestimmung

Wie schon bei der Gewichtsbestimmung der anderen Organe beschrieben, kann das Gewicht eine Aussage über den Funktionszustand des Organes zulassen. Das Organ Hoden und die

akzessorischen Geschlechtsorgane üben keine überlebenswichtige Funktion für das Einzelindividuum aus. Daher geht bei diesen Organen eine Gewichtsabnahme mit einer Funktionsminderung einher.

Es wurden die Gewichte folgender Organe bestimmt: Hoden, Nebenhoden, Nebenhodenschwanz, Samenblasendrüsen und Prostata. In der Literatur [Basinger und Gittes, 1974] wurde nach der Applikation von Spironolacton bei adulten Rattenböcken eine Gewichtsabnahme der Glandula bulbourethralis und Prostata beschrieben.

3.2.3.2 *Fertilität*

Von der Testosteronkonzentration im Blut ist die Fertilität und Libido der Tiere abhängig. Bei einer Verpaarung mit weiblichen Tieren ist die Fertilität mit Hilfe des folgenden Versuches quantifizierbar:

Ab dem 100. Postnataltag der männlichen Ratten wurde je eine Untergruppe der Expositionsgruppen für 14 Tage verpaart. Bisher unverpaarte und unbehandelte weibliche Tiere wurden im Verpaarungsverhältnis von 1:1 in den letzten Stunden der Dunkelphase für drei Stunden in den Käfig des Rattenbockes verbracht. Täglich kam dasselbe Rattenweibchen für drei Stunden zu einem bestimmten Rattenbock. Dies geschah so lange, bis das Rattenweibchen spermienpositiv war (s.u.), maximal jedoch an den Arbeitstagen von zwei Wochen. Zur Beurteilung einer stattgefundenen Begattung wurde direkt im Anschluß an die Trennung der Tiere mit einem Wattetupfer ein Scheidenabstrich genommen und unter dem Mikroskop (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) auf Spermien untersucht. Die gedeckten Rattenweibchen wurden am 21. Trächtigkeitstag nach 3.2.5 untersucht. Aus den erhobenen Daten wurden folgende Indices errechnet:

- Fertilitätsindex (Anzahl der Tage, die ein männliches Tier benötigt, um das ihm zugeteilte Rattenweibchen zu decken)
- Verpaarungsindex ($\text{Anzahl der spermienpositiven Rattenweibchen} \times 100 / \text{Anzahl der verpaarten Rattenweibchen}$)
- Trächtigkeitsindex ($\text{Anzahl der trächtigen Rattenweibchen} \times 100 / \text{Anzahl der spermienpositiven Rattenweibchen}$)

Fertilitätsindex und Verpaarungsindex erlauben eine Aussage über die Fertilität des Rattenbockes, der Trächtigkeitsindex über das Fertilisationspotential der ejakulierten Spermien.

3.2.3.3 Andrologische Untersuchung

Die andrologische Untersuchung bestand bei diesen Versuchen aus folgenden Einzeluntersuchungen:

- Bestimmung der Spermatozoenanzahl/Hoden,
- Bestimmung der Anzahl der Spermien/Gramm Hoden,
- Bestimmung der Spermienanzahl/Nebenhodenschwanz und
- Untersuchung der Spermienmorphologie.

Bestimmung der Spermatozoenanzahl / Hoden

Um die Anzahl der Spermatozoen pro Hoden zu bestimmen, wurde der entnommene Hoden von der ihn umschließenden Haut (Tunica albuginea = Organkapsel des Hodens) befreit. Das Hauptgefäß (Arteria testicularis), welches sich außen auf dem Hoden von einem zum anderen Pol mäanderförmig schlängelt, wurde entfernt. Der Hoden wurde grob mit der Schere zerteilt. Danach wurde er in 9,5 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung zusammen mit 0,5 ml Triton X 100 in einem Homogenisator (Janke und Kunkelt KG, IKA Werk, Staufen im Breisgau, Deutschland) homogenisiert. Das Hodenhomogenat wurde im Verhältnis 1:10 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt. In einer Bürker-Kammer wurden unter einem Mikroskop (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) die elongierten Spermatozoenkerne der Stufe 17 bis 19, die gegen die Homogenisierung resistent waren, in 80 Elementarquadraten ausgezählt. Die Anzahl der Spermatozoen pro Hoden wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A = S/B \times V$$

wobei

A: Anzahl der Spermien/Hoden

S: Ausgezählte Spermien

B: ausgezähltes Kammervolumen in ml ($0,32 \text{ mm}^3 = 0,32 \times 10^{-3} \text{ ml}$)

V: Verdünnung ($10 (10 + \text{Hodengewicht}^1)$).

¹ das Hodengewicht entspricht annäherungsweise dem Hodenvolumen

Bestimmung der Spermatozoenanzahl / Gramm Hoden

Setzt man die errechnete Gesamtspermatozoenanzahl in Relation zum Hodengewicht, so läßt sich eine Aussage über die Funktionalität des vorhandenen Hodengewebes treffen.

Bestimmung der Spermienanzahl / Nebenhodenschwanz

Um die Funktion des Nebenhodens als Speicherorgan zu beurteilen, wurden die Spermien pro Nebenhodenschwanz ausgezählt. Dazu wurde mit dem Nebenhoden genauso verfahren, wie oben beschrieben.

In diesem Fall betrug

$V=10$ (10 + Nebenhodenschwanzgewicht bzw. -volumen).

Untersuchung der Spermienmorphologie

Zur Betrachtung der Spermien wurde der entnommene Samenstrang mit 1 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung gespült und das Spülwasser aufgefangen. Ein Tropfen dieser Suspension wurde mit einem Tropfen 2 %iger Eosinrotlösung auf einem Objektträger gemischt und ausgestrichen. 100 Spermien pro Ausstrich wurden bei 400-facher Vergrößerung auf ihre morphologische Beschaffenheit hin untersucht und beurteilt. Es wurden folgende Formen unterschieden:

- Spermien mit Kopfveränderungen
- Spermien mit Schwanzveränderungen
- Spermien mit Anzeichen zellulärer Degeneration (wie Zusammenhangstrennungen zwischen Kopf und Schwanz und geknickte Schwänze)

Diese Unterteilung wurde vorgenommen, da Kopfveränderungen auf primäre Schäden wie etwa Mutation oder Schäden in der Bildung des Spermiums zurückzuführen sind, Schwanzveränderungen und Zelldegenerationen hingegen deuten auf sekundäre Schäden, wie Störungen der Reifung oder Veränderung des Milieus hin. Da alle Proben auf dieselbe Weise vorbehandelt werden, deutet eine erhöhte Anzahl an Zusammenhangstrennungen auf eine leichtere Brüchigkeit der Spermien hin.

3.2.4 Enzymhistochemische Leydigzellbeurteilung

Die Hoden wurden sofort nach der Tötung der Tiere entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden in Plastiktüten bei -25°C gelagert, bis sie untersucht wurden. Für die Enzymhistochemie wurden 10 μm dicke Schnitte mit Hilfe eines Kryostaten (2800 Krigocut-E; Fa. Reichert-Jung) hergestellt. Bei jedem Färbevorgang wurden zwei Schnitte eines Kontrolltieres mit Schnitten von behandelten Tieren in einem Arbeitsgang bearbeitet. Nachdem diese in Aceton für 10 Minuten fixiert worden waren, wurde die Inkubationslösung zur Bestimmung der β -

Dihydroxysteroiddehydrogenase nach Rune und Heger [1987] und Haider [1988] aufgeschichtet und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe eines Mikroskops (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die gefärbten Schnitte betrachtet und die Intensität der Färbung verglichen. Um diese besser beurteilen zu können, wurden die Schnitte photographiert. So ist ein direkter Vergleich möglich. Eine geringere Intensität des Farbstoffs bedeutet eine geringere Konzentration der β -Dihydroxysteroiddehydrogenase. Dies ist ein Hinweis, daß auch in vivo weniger Testosteron produziert wurde.

3.2.5 Beurteilung der Wurfdaten der F2-Generation

Je eine Untergruppe der Expositionsgruppen wurde mit unbehandelten weiblichen Tieren zur Erzeugung einer F2-Generation verpaart.

Die Wurfdaten der F2-Generation mußten ebenfalls erfaßt werden, da die F0-Generation zu einem Zeitpunkt behandelt wurde, an dem die F1-Generation die Stammzellen für die F2-Generation bildet.

Die Embryonen wurden am Ende der Trächtigkeit (Tag 21; der wahrscheinlichste Wurfstag ist Trächtigkeitstag 22) untersucht.

In die Beurteilung wurden in diesem Zusammenhang die Wurfgröße, die Zahl der Resorptionen, die Verteilung der Geschlechter, die Einzelgewichte und die Anzahl der toten und lebenden Feten einbezogen.

3.2.6 Töten der Tiere

Die Tiere wurden durch einen Schlag mit dem Rundholz in den Nacken betäubt und durch Dekapitation getötet.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden folgenden statistischen Untersuchungsmethoden unterzogen:

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der SAS Software durchgeführt. Für alle Teste gilt das Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Die *Körpergewichtsentwicklung der Muttertiere* (Tabelle 4) wurden mit dem Students t-Test auf abweichende Werte der Expositionsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe hin untersucht.

Die *Gewichtsentwicklung der Jungtiere* (Tabellen 5 A-C) wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse analysiert. Die Mittelwerte wurden mit der Kleinste-Quadrate (KQ)-Methode geschätzt. Als Einflußfaktoren wurden die Expositionsgruppe, das Geschlecht innerhalb der Expositionsgruppe und als Kovariable die Wurfgröße innerhalb der Expositionsgruppe berücksichtigt.

Wurfgröße und Geschlechterverteilung (Tabelle 6) wurden mit dem Wilcoxon Test auf Unterschiede zwischen den Expositiosgruppen gegenüber der Kontrolle getestet.

Unterschiede in der *Mortalität* an den Postnaltagen 3 - 22 (Tabelle 7) wurden mit einer Probit Analyse auf Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen gegenüber der Kontrolle beurteilt.

Die Merkmale *Fellentwicklung, Zahndurchbruch, Augenöffnung* und *Hodenabstieg* aus den Tabellen 8 und 10 wurden mit einem „proportional Hazard“-Modell von Cox (1972) beschrieben.

Die Hazardrate des i-ten Individuums in Abhängigkeit von der Ereigniszeit $h_i(t)$ ist

$$h_i(t) = h(t, z_i) = h_0(t) \exp(z_i' \beta),$$

wobei $h_0(t)$ eine beliebige, nicht weiter spezifizierte Grundhazardfunktion (baseline hazard function), z_i der Vektor, der für das i-te Individuum gemessenen Kovariablen und β der Vektor, der unbekanntes Regressionsparameter dieser Kovariablen sind.

Die Hazardfunktion beschreibt die momentane "Ausfallrate" zum Zeitpunkt t , also die Wahrscheinlichkeit, daß das Ereignis genau zum Zeitpunkt t eintritt unter der Bedingung, daß dieses Ereignis unmittelbar vor dem Zeitpunkt t noch nicht eingetreten war.

Das Cox-Modell ist ein semiparametrisches Modell, da keine Annahmen über die Form der Grundhazardfunktion nötig sind. Deshalb ist das Cox-Modell robust (es muß keine Verteilung spezifiziert werden), sehr flexibel und für biologische Daten besonders geeignet. Cox (1975) führte ein partielles Likelihood-Verfahren ein, das die nicht näher spezifizierte Grundhazardrate $h_0(t)$ aus der Schätzung der Regressionsparameter eliminiert. Betrachtet man das Verhältnis der Hazardraten zweier Individuen i und j zu einem beliebigen Zeitpunkt t

$$\frac{h_0(t) \exp(z_i' \beta)}{h_0(t) \exp(z_j' \beta)} = \exp\{(z_i - z_j)' \beta\} = konst.,$$

so sieht man, daß die Hazardraten proportional sind über die Ereigniszeit.

Bindungen wurden bei der Analyse berücksichtigt, da in den vorliegenden Daten die Ereignisse bei vielen Individuen zum selben Zeitpunkt auftraten. Die zufälligen Wurfefekte, die zu Abhängigkeiten zwischen den Individuen desselben Wurfes führten, konnten nicht berücksichtigt werden. Dies kann zu einer mangelhaften Anpassung des Modells an die Daten führen.

Folgende Kovariablen (z_i) wurden im Modell berücksichtigt:

-*Behandlung* in drei Stufen:

- Spironolacton Tag 10 behandelt
- Spironolacton Tag 15 behandelt
- Kontrolle (unbehandelt)

-*Wurfgröße* als kontinuierliche Variable

Der Zensierungsanteil lag bei etwa 10%.

Die geschätzten Regressionsparameter (β) wurden mit dem Wald-Test untersucht: Der Parameter für die Wurfgröße auf die Abweichung von 0 ($H_0:\beta(\text{Wurfgröße})=0$, $H_A:\beta(\text{Wurfgröße})\neq 0$), die Parameter für die Behandlungen als Abweichung von der Kontrolle ($H_0:\beta(\text{Behandlung}_i)-\beta(\text{Kontrolle})=0$, $H_A:\beta(\text{Behandlung}_i)-\beta(\text{Kontrolle})\neq 0$).

In den Tabellen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Fettdruck, * und unterstrichen bedeutet, daß dieser Parameter mit dem oben genannten Modell und dem Wald-Test signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ist.

Die *Organgewichte* (Tabellen 9 A-C) wurden mit dem Students-t-Test auf Unterschiede der Werte der Expositionsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe getestet. Die eventuellen Abhängigkeiten der Merkmale durch Wurfefekte wurden hier nicht berücksichtigt. Um die Abhängigkeit vom KGW einzubeziehen, wurden die relativen Organgewichte auch mit Hilfe dieses Testes beurteilt.

Hodengewichte und *Gewichte der akzessorischen Geschlechtsorgane* (Tabellen 11 und 12) sowie die *Spermatiden* und *Spermienzahlen* (Tabellen 14 und 15) wurden mit einer Varianzanalyse beschrieben und die Mittelwerte mit einer KQ-Schätzung beurteilt. Die Expositionsgruppe wurde als Einflußfaktor, das Körpergewicht als Kovariable berücksichtigt.

Die *Kenndaten der Fertilität* (*Verpaarungsindex*, *Fertilitätsindex* und *Trächtigkeitsindex*) (Tabelle 13) wurden auf Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen mit dem Chi-Quadrat-Test beurteilt.

Die Daten der *Spermienmorphologie* (Tabelle 16) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen getestet.

Aus den Tabellen *Wurfdaten der F2-Generation* (Tabelle 17) wurde das Merkmal Trächtigkeit auf Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Die Merkmale Implantationen, Resorptionen und Feten wurden auf Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test beurteilt.

3.3 Durchgeführte Versuche

3.3.1 Allgemeines

Die Rattenweibchen einer jeden Versuchsgruppe wurden während der Trächtigkeit mit der Substanz zweimalig behandelt. Der Behandlungszeitpunkt ergab sich aus folgenden Überlegungen: Testosteron tritt im Blut der Feten erstmalig um den Tag 17 der Gestation auf. Mit dem ersten Auftreten von Leydigzellen muß ab Gestationstag 10 gerechnet werden.

Die Untersuchung der männlichen Nachkommen erfolgte im Alter von 65, 100 oder 130 Tagen postnatal.

- 65 Tage: Beginn der Geschlechtsreife.
- 100 Tage: die Tiere gelten als geschlechts- und zuchtreif.
- 130 Tage: es sollte eine eventuelle Reversibilität einer Wirkung verfolgt werden.

Ab Postnataltag 100 wurden die Rattenböcke der letzten Untergruppe jeweils mit einem Rattenweibchen verpaart. Die trächtigen Rattenweibchen wurden nach dem Schema 3.2.5 untersucht.

3.3.2 Spezielles

Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche ergibt sich aus der Tabelle 2. Die unterschiedlichen Behandlungszeitpunkte wurden gewählt, um den Zeitpunkt der Einwirkung zu beurteilen.

Spironolacton 10

Die Gruppe „Sp 10“ bestand aus 25 verpaarten Rattenweibchen. Diese Tiere wurden am Tag 10 der Trächtigkeit um 6.00 Uhr und um 14.00 Uhr mit je einer Dosis von 20 mg Spironolacton/kg KGW behandelt. Diese Behandlungszeitpunkte wurden gewählt, da die Wirkungsweise von Spironolacton (insbesondere bei pränataler Applikation) noch nicht genau bekannt ist, und es noch nicht geklärt ist, ob es in die Biosynthese von Testosteron eingreift oder die Leydigzellen direkt schädigt. Eine zweimalige Applikation war wegen der schnellen Metabolisierung angebracht.

Am Postnataltag 65/66 (Sp 10-65) sollten 17 Rattenböcke, am Tag 100/101 (Sp 10-100) weitere 17, am Tag 130/131 (Sp 10-130) nochmals weitere 17 Rattenböcke getötet und untersucht werden. Von

zwei Tieren jeder Untergruppe wurde je ein Hoden nach dem unter 3.2.4 angegebenen Schema untersucht.

Spironolacton 15

Die Gruppe „Sp 15“ bestand aus 20 verpaarten Rattenweibchen. Diese Tiere wurden am Tag 15 der Trächtigkeit um 6.00 Uhr und um 14.00 Uhr mit jeweils einer Dosis von 20 mg Spironolacton/kg KGW behandelt.

Am Postnataltag 64/65 (Sp 15-65) wurden 17 Rattenböcke, am Tag 100/101 (Sp 15-100) weitere 17 am Tag 130/131 (Sp 15-130) nochmals 17 Rattenböcke untersucht. Von zwei Tieren jeder Untergruppe wurde je ein Hoden nach dem unter 3.2.4 angegebenen Schema untersucht.

Kontrollgruppe

Die Gruppe „Ko“ bestand aus 25 verpaarten Rattenweibchen. Diese Tiere wurden nicht behandelt. Am Postnataltag 65/66 (Ko-65) wurden 17 Rattenböcke, am Tag 100/101 (Ko-100) weitere 17, am Tag 130/131 (Ko-130) wurden nochmals 17 Rattenböcke getötet und untersucht. Von zwei Tieren jeder Untergruppe wurde je ein Hoden nach dem unter 3.2.4 angegebenen Schema untersucht.

Tabelle 2: Versuchsplan

	Sp 10	Sp 15	Kontrolle
Mutteriere [N]	25	20	25
Gewichte am Trächtigkeitstag 1 (M ± SD)	212,8 ± 4,2	216,8 ± 2,1	217,6 ± 2,1
davon nicht tragend [N]	2	1	2
männliche Nachkommen Tag 21 [N]	102	69	89
Anzahl der Tiere am Untersuchungstag 65	17	17	17
Histologie	2	2	2
Anzahl der Tiere am Untersuchungstag 100	17	17	17
Histologie	2	2	2
Anzahl der Tiere am Untersuchungstag 130	17	17	17
Histologie	2	2	2

Histologie= Anzahl der Hoden, die am entsprechenden Untersuchungstag der histochemischen Untersuchung nach 3.2.4 zugeführt wurden

N = Anzahl der Tiere

4 Ergebnisse

4.1 Ausschluß systemischer Wirkungen der Substanz

4.1.1 Verlauf der Trächtigkeit

In der Kontrollgruppe und bei der Expositionsgruppe Spironolacton 10 waren von je 25 gedeckten (spermienpositiven) Rattenweibchen zwei nicht tragend. Bei der Expositionsgruppe Spironolacton 15 waren alle 20 spermienpositiven Rattenweibchen tragend. Weder in der Kontrollgruppe noch in einer der Expositionsgruppen warf eins der Tiere vorzeitig, noch starb eines während der Trächtigkeit. Die Uteri der nicht tragenden Rattenweibchen zeigten keine Resorptionsstellen (Tabelle 3).

Kontrollgruppe

Am Tag 22/23 der Trächtigkeit warfen 23 der Rattenweibchen insgesamt 120 männliche Jungtiere und 136 weibliche Jungtiere. Am Postnataltag 2 der Nachkommen fraßen vier der Muttertiere den gesamten Wurf auf (s.u.). Am Postnataltag 21 der Nachkommen lebten noch 89 männliche und 101 weibliche Ratten. (Tabelle 13 und 17).

Expositionsgruppe Spironolacton 10

An den Tagen 21 - 23 der Trächtigkeit warfen 23 Rattenweibchen insgesamt 113 männliche und 121 weibliche Jungtiere. Am Postnataltag 21 der Nachkommen waren es noch 102 männliche und 112 weibliche Ratten (Tabelle 13 und 17).

Expositionsgruppe Spironolacton 15

Am Tag 22 - 25 der Trächtigkeit warfen alle 20 Rattenweibchen. Zwei von ihnen fraßen den gesamten Wurf noch am Wurfstag auf, sodaß die Wurfgröße und Geschlechterverteilung nicht festzustellen war. Die restlichen 18 Rattenweibchen warfen insgesamt 77 männliche und 94 weibliche Jungtiere. Am Postnataltag 21 der Nachkommen waren es noch 70 männliche und 80 weibliche Ratten (Tabelle 13 und 17).

Tabelle 3: Daten des Trächtigerungsverlaufs der Muttertiere, die mit Spironolacton am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
gedeckte Tiere [N]	25	25	20
tragend [N]	23	23	20
nicht tragend [N]	2	2	0
vorzeitig geworfen [N]	0	0	0
voll resorbiert [N]	0	0	0
gestorben [N]	0	0	0
Jungtiere am 1. Lebenstag	256	234	171

N = Anzahl der Tiere

4.1.2 Gewichtsentwicklung

Muttertiere

Der mittlere Gewichtszuwachs der Tiere der Expositionsgruppen ist gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe statistisch signifikant geringer (Tabelle 4).

Tabelle 4: Gewichtszuwachs der trächtigen Muttertiere, die mit Spironolacton am 10. bzw. 15. Trächtigkeitstag behandelt wurden, gegenüber der Kontrolle in Gramm [g]

Tag/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
M	23	23	20
Gewichtszuwachs Tag 11-Tag 1 (M ± SD)	34,4 ± 6,8	33,2 ± 21,7*↓	
Gewichtszuwachs Tag 21-Tag 1 (M ± SD)	111 ± 9,9	108,7 ± 26,2*↓	101,3 ± 18,5*↓

Fett u. * = Students t-Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

M = Anzahl der Muttertiere

Jungtiere

Bei der Behandlung mit Spironolacton traten bei der Gewichtsentwicklung der Jungtiere von Tag 1 - 22 keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Die Tiere der Gruppe Sp 10 waren am ersten Postnataltag um 0,2 g schwerer als die Kontrolltiere (Tabelle 5.A).

Auch bei der getrennten Auswertung der Ergebnisse für männliche und weibliche Nachkommen fiel auf, daß die männlichen Nachkommen der Gruppe Sp 10 am ersten Postnataltag signifikant

schwerer waren als die der Kontrollgruppe (um 0,2 g). An allen anderen Tagen unterschieden sich die Gewichte dieser und der Gruppe Sp 15 nicht von denen der Kontrollgruppe (Tabelle 5.B).

Bei den weiblichen Nachkommen der Gruppen Sp 10 und Sp 15 traten in der Gewichtsentwicklung von Tag 1 - 22 keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf (Tabelle 5.C).

Tabelle 5.A: Gewichtsentwicklung aller Jungtiere, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, von Postnataltag 1-22 im Vergleich zur Kontrolle in Gramm [g]

Tag/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
Tag 1			
N	256	234	171
Gewicht [g] (M ± SD)	5,8 ± 0,6	<u>6,0 ± 0,6*</u> ↑	5,8 ± 0,8
Tag 7			
N	204	228	157
Gewicht [g] (M ± SD)	10,7 ± 1,5	10,9 ± 1,4	11,5 ± 2,3
Tag 16			
N	191	214	150
Gewicht [g] (M ± SD)	22,6 ± 3,0	22,6 ± 3,1	23,7 ± 5,5
Tag 22			
N	191	214	150
Gewicht [g] (M ± SD)	31,3 ± 4,3	32,7 ± 4,5	32,7 ± 7,5

Fett u. * = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

N = Anzahl der Tiere

Tabelle 5.B: Gewichtsentwicklung der männlichen Jungtiere, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, von Postnatal Tag 1-22 im Vergleich zur Kontrolle in Gramm [g]

Tag/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
Tag 1			
N	120	113	77
Gewicht [g] (M ± SD)	5,9 ± 0,6	<u>6,2 ± 0,5*</u> ↑	6,0 ± 0,7
Tag 7			
N	98	112	75
Gewicht [g] (M ± SD)	10,8 ± 1,5	11,2 ± 1,4	11,7 ± 2,5
Tag 16			
N	89	102	70
Gewicht [g] (M ± SD)	22,9 ± 2,8	23,0 ± 3,2	23,5 ± 5,4
Tag 22			
N	89	102	70
Gewicht [g] (M ± SD)	31,6 ± 4,2	33,1 ± 4,6	32,9 ± 7,8

Fett u. * = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit p<0,05

N = Anzahl der Tiere

Tabelle 5.C: Gewichtsentwicklung der weiblichen Jungtiere, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, von Postnataltag 1-22 im Vergleich zur Kontrolle in Gramm [g]

Tag/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
Tag 1			
N	136	121	94
Gewicht [g] (M ± SD)	5,5 ± 0,6	5,8 ± 0,6	5,6 ± 0,7
Tag 7			
N	106	116	82
Gewicht [g] (M ± SD)	10,6 ± 1,6	10,6 ± 1,3	11,3 ± 2,2
Tag 16			
N	102	112	80
Gewicht [g] (M ± SD)	22,4 ± 3,2	22,2 ± 2,9	23,8 ± 5,6
Tag 22			
N	101	112	80
Gewicht [g] (M ± SD)	31,0 ± 4,3	32,2 ± 4,4	32,6 ± 7,2

N = Anzahl der Tiere

Test = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

4.1.3 Wurfparameter

Wurfgröße

Weder beim Merkmal Wurfgröße (ca. 10 Tiere pro Wurf) noch beim Merkmal Geschlechterverteilung (48 % männliche, 52 % weibliche Tiere) unterschieden sich die Ergebnisse der Expositionsgruppen signifikant von denen der Kontrollgruppe (Tabelle 6). Bei zwei Tieren der Expositionsgruppe Sp 15 war die Wurfgröße und Geschlechterverteilung schon am Wurfstag nicht mehr zu beurteilen, da die Tiere den Wurf zum größten Teil aufgefressen hatten.

Tabelle 6: Absolute Anzahl, Anzahl/Wurf und Geschlechterverteilung der Jungtiere, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, von Postnataltag 1-22 im Vergleich zur Kontrolle

Tag/Gruppe		Kontrolle		Sp 10		Sp 15	
Tag 1							
W		23		23		18	
männlich [N]	(M ± SD)	120	5,2 ± 2,0	113	4,9 ± 2,0	77	4,3 ± 2,6
weiblich [N]	(M ± SD)	136	5,9 ± 1,7	121	5,3 ± 2,3	94	5,2 ± 2,3
gesamt [N]	(M ± SD)	256	11,2 ± 1,7	234	10,2 ± 2,7	171	9,5 ± 2,8
Tag 7							
W		19		22		17	
männlich [N]	(M ± SD)	98	5,2 ± 1,4	112	5,1 ± 1,8	75	4,4 ± 2,6
weiblich [N]	(M ± SD)	106	5,6 ± 1,5	116	5,3 ± 2,2	82	4,8 ± 2,2
gesamt [N]	(M ± SD)	204	10,7 ± 1,4	228	10,4 ± 2,0	157	9,2 ± 3,0
Tag 16							
W		19		22		17	
männlich [N]	(M ± SD)	89	4,7 ± 1,4	102	4,6 ± 1,7	70	4,1 ± 2,6
weiblich [N]	(M ± SD)	102	5,4 ± 1,6	112	5,1 ± 2,1	80	4,7 ± 2,1
gesamt [N]	(M ± SD)	191	10,1 ± 1,4	214	9,7 ± 2,1	150	8,8 ± 3,0
Tag 22							
W		19		22		17	
männlich [N]	(M ± SD)	89	4,7 ± 1,4	102	4,6 ± 1,7	70	4,1 ± 2,6
weiblich [N]	(M ± SD)	101	5,3 ± 1,6	112	5,1 ± 2,1	80	4,7 ± 2,1
gesamt [N]	(M ± SD)	190	10,0 ± 1,5	214	9,7 ± 2,1	150	8,8 ± 3,0

N = Anzahl der Tiere

W = Anzahl der Würfe

Test = Wilcoxon Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

Mortalität

Am zweiten Postnataltag hatten von der Kontrollgruppe vier der Mütter alle Jungtiere des Wurfes aufgefressen. Dies mußte auf Unruhe im Stall am Wurfstag zurückgeführt werden und wurde daher nicht weiter betrachtet. Es war folglich eine Auswertung der Frühmortalität an Postnataltag zwei nicht sinnvoll; die Daten für Postnataltag eins waren nicht ausreichend, um eine statistisch gesicherte Aussage machen zu können.

Aus der Expositionsgruppe Sp 10 starb von einem Rattenweibchen das einzige Jungtier am dritten Postnataltag. In der Expositionsgruppe Sp 15 fraßen zwei Rattenweibchen die Jungtiere am ersten Postnataltag, obwohl keine Auffälligkeiten in der Umgebung stattgefunden haben. Ein weiteres Rattenweibchen dieser Gruppe fraß zwischen dem zweiten und vierten Postnataltag die Jungtiere des Wurfes auf.

Die Mortalität der männlichen und weiblichen Nachkommen der Mütter der Expositionsgruppen unterschieden sich statistisch nicht signifikant von denen der Kontrolltiere. Für den gesamten Wurf war die Mortalität der Expositionsgruppe Sp 15 jedoch signifikant geringer (Tabelle 7). Dies ist nach den Ausführungen von oben jedoch zu relativieren.

Tabelle 7: Mortalität von Postnataltag 3 - 22 bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle an den Postnataltagen 3-22 in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
W	19	22	18
weiblich [%]	7,3	5,0	3,6
männlich [%]	9,9	10,6	2,8
zusammen [%]	8,6	7,8	<u>3,2*</u> ↓

W = Anzahl der Würfe

Fett u. * = Probit Analyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

Fellentwicklung

Die Entwicklung des Fells geschah bei allen Gruppen um den siebten Postnataltag. Allerdings erfolgte sie in den Expositionsgruppen um 0,3 Tage früher als in der Kontrollgruppe (Tabelle 8). Dies ist statistisch signifikant.

Schneidezahndurchbruch

Bei der Kontrollgruppe sowie bei den Expositionsgruppen tritt der Durchbruch der Schneidezähne um den zehnten Postnataltag auf (Tabelle 8).

Öffnen der Augen

Bei den Expositionsgruppen geschah das Öffnen der Augen einen Tag vor der Kontrollgruppe (Tag 15,5 bzw. 16,5). Für die Expositionsgruppe Sp 15 ist dieses statistisch signifikant (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mittelwerte der Tage [d], an denen bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, der Wurfparameter ausgeprägt war im Vergleich zur Kontrolle

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	256	234	171
Fell [d] (M ± SD)	7,6 ± 0,5	<u>7,3 ± 0,5*</u> ↓	<u>7,2 ± 0,4*</u> ↓
Zahnentwicklung [d] (M ± SD)	10,2 ± 1,2	9,8 ± 0,8	9,7 ± 1,0
Augenöffnung [d] (M ± SD)	16,5 ± 0,8	15,6 ± 0,8	<u>15,5 ± 0,6*</u> ↓

N = Anzahl der Tiere

Fett u. * = proportional Hazard Modell von Cox Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

4.1.4 Makroskopische Untersuchung

Weder bei der Kontrollgruppe noch bei den Expositionsgruppen waren Auffälligkeiten in bezug auf die Oberflächenbeschaffenheit, Farbe, Feuchtigkeit oder Festigkeit der Organe feststellbar. Allerdings fanden sich in der Gruppe Spironolacton 10 und Spironolacton 15 je ein Tier mit Harnsteinen bzw. Harngrieß in der Blase. Ein weiteres Tier der Gruppe Spironolacton 10 war vorzeitig *verstorben*. Bei seiner Autopsie fanden sich massiv Harnsteine bzw. Harngrieß in der Blase, und es lag eine Blasendilatation vor. Desweiteren waren die Nieren dieses Tieres in ihrer Konsistenz weicher als die von Kontrolltieren. Außerdem lagen bei je einem Tier der Untersuchungsgruppen Sp 15-65 und Sp 10-100 die linken Hoden abdominal und waren deutlich kleiner als die rechten bzw. die von Kontrolltieren.

4.1.5 Organgewichtsbestimmung

Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 65

Die Mittelwerte der Körpergewichte von Kontrollgruppe und Expositionsgruppe Sp 10 lagen bei 180 g. Der Mittelwert der Körpergewichte der Expositionsgruppe Spironolacton 15 war signifikant leichter als der der Kontrollgruppe. Er lag bei 146 g. Ein Tier der Expositionsgruppe Sp 10 lag mit 100 g deutlich niedriger als das Durchschnittsgewicht von 183 g. Dieser Mittelwert der Körpergewichte erklärt auch die signifikanten Abweichungen der absoluten Gewichte der Organe Leber, Herz und Thymus, was sich bei der relativen Betrachtung der Organgewichte zum KGW zeigt (siehe Organgewichte relativ zum KGW, Tabelle 9.A). Die Gewichte der Nieren waren in der relativen Betrachtung zum KGW signifikant höher (um 0,02 %) als die der Kontrolltiere. Das relative Gehirngewicht der Expositionsgruppe Sp 15 lag um 0,2 % über dem der Kontrollgruppe. Die Gruppe Spironolacton 10 zeigte ein signifikant erniedrigtes relatives Leber- (um 0,3 %) sowie Thymusgewicht (um 0,03 %) (Tabelle 9.A).

Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 100

An diesem Untersuchungszeitpunkt lag das KGW der Expositionsgruppe Spironolacton 10 mit 298 g signifikant über dem der Kontrollgruppe mit 277 g. Das mittlere Lebergewicht dieser Gruppe war erhöht. In Relation zum KGW war es jedoch unauffällig gegenüber der Kontrollgruppe. Das Gewicht der Milz war auch relativ um 0,02 % signifikant höher als das der Kontrollgruppe. In der Expositionsgruppe Spironolacton 15 war das relative Lebergewicht mit 0,4 % signifikant erhöht, genauso wie die relativen Gewichte von Herz mit 0,03 % und Thymus mit 0,02 %. Die Erhöhung

der relativen Gewichte der linken Nieren sollte mit Vorsicht beurteilt werden, da die relativ große Differenz zwischen rechter und linker Niere in der Kontrollgruppe überrascht (Tabelle 9.B).

Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 130

Am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 130 ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Expositionsgruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe feststellen. Hier war das signifikant höhere absolute Milzgewicht durch das höhere KGW der Tiere der Gruppe Spironolacton 10 und das signifikant geringere absolute Gehirngewicht der Gruppe Spironolacton 15 durch ihr geringeres KGW bedingt und relativ zu diesen nicht signifikant (Tabelle 9.C).

Tabelle 9.A: Mittlere Organgewichte am Untersuchungstag 65 bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle absolut in Gramm [g] und relativ zum KGW in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Ko	Sp 10	Sp 15
N	17	16	17
KGW [g] (M ± SD)	176 ± 26	183 ± 30	<u>146 ± 23*</u> ↓
Organgewichte:			
Leber [g] (M ± SD)	8,06 ± 1,05	7,92 ± 1,69	<u>6,81 ± 1,01*</u> ↓
Milz [g] (M ± SD)	0,34 ± 0,05	<u>0,39 ± 0,08*</u> ↑	0,30 ± 0,06
Herz [g] (M ± SD)	0,64 ± 0,07	0,68 ± 0,11	<u>0,54 ± 0,09*</u> ↓
Thymus [g] (M ± SD)	0,38 ± 0,07	0,34 ± 0,07	<u>0,28 ± 0,04*</u> ↓
Gehirn [g] (M ± SD)	1,66 ± 0,09	1,68 ± 0,07	1,60 ± 0,09
Niere, rechts [g] (M ± SD)	0,68 ± 0,10	0,70 ± 0,12	<u>0,60 ± 0,08*</u> ↓
Niere, links [g] (M ± SD)	0,66 ± 0,08	0,68 ± 0,12	<u>0,57 ± 0,09*</u> ↓
Nebenniere, re [g] (M ± SD)	0,013 ± 0,003	0,014 ± 0,004	0,011 ± 0,003
Nebenniere, li [g] (M ± SD)	0,013 ± 0,003	0,015 ± 0,002	0,011 ± 0,003
Organgewichte relativ zum KGW:			
Leber [%] (M ± SD)	4,58 ± 0,33	<u>4,29 ± 0,38*</u> ↓	4,67 ± 0,27
Milz [%] (M ± SD)	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,21 ± 0,02
Herz [%] (M ± SD)	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,02
Thymus [%] (M ± SD)	0,22 ± 0,04	<u>0,19 ± 0,03*</u> ↓	0,19 ± 0,04
Gehirn [%] (M ± SD)	0,95 ± 0,11	0,94 ± 0,17	<u>1,12 ± 0,2*</u> ↑
Niere, rechts [%] (M ± SD)	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,04	<u>0,41 ± 0,02*</u> ↑
Niere, links [%] (M ± SD)	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,03	<u>0,39 ± 0,02*</u> ↑
Nebenniere, re [%] (M ± SD)	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,002	0,008 ± 0,002
Nebenniere, li [%] (M ± SD)	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,001

Fett u. * = Students t-Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p \leq 0,05$

N = Anzahl der Tiere

Tabelle 9.B: Mittlere Organgewichte am Untersuchungstag 100 bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle absolut in Gramm [g] und relativ zum KGW in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	17	16	17
KGW [g] (M ± SD)	277 ± 20	<u>298 ± 34*</u> ↑	270 ± 35
Organgewichte:			
Leber [g] (M ± SD)	10,69 ± 0,92	<u>11,74 ± 1,5*</u> ↑	11,48 ± 1,67
Milz [g] (M ± SD)	0,52 ± 0,06	<u>0,61 ± 0,10*</u> ↑	0,53 ± 0,06
Herz [g] (M ± SD)	0,90 ± 0,07	1,01 ± 0,25	0,94 ± 0,12
Thymus [g] (M ± SD)	0,40 ± 0,06	<u>0,46 ± 0,09*</u> ↑	0,45 ± 0,10
Gehirn [g] (M ± SD)	1,74 ± 0,08	1,78 ± 0,10	1,76 ± 0,07
Niere, rechts [g] (M ± SD)	0,89 ± 0,07	<u>0,97 ± 0,12*</u> ↑	0,88 ± 0,13
Niere, links [g] (M ± SD)	0,86 ± 0,07	<u>0,97 ± 0,13*</u> ↑	0,88 ± 0,13
Nebenniere, re [g] (M ± SD)	0,018 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,003
Nebenniere, li [g] (M ± SD)	0,017 ± 0,002	0,018 ± 0,003	0,018 ± 0,004
Organgewichte relativ zum KGW:			
Leber [%] (M ± SD)	3,87 ± 0,20	3,94 ± 0,25	<u>4,26 ± 0,34*</u> ↑
Milz [%] (M ± SD)	0,19 ± 0,02	<u>0,21 ± 0,02*</u> ↑	0,20 ± 0,03
Herz [%] (M ± SD)	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,08	<u>0,35 ± 0,02*</u> ↑
Thymus [%] (M ± SD)	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	<u>0,17 ± 0,03*</u> ↑
Gehirn [%] (M ± SD)	0,63 ± 0,05	0,60 ± 0,05	0,66 ± 0,08
Niere, rechts [%] (M ± SD)	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,02
Niere, links [%] (M ± SD)	0,31 ± 0,01	<u>0,32 ± 0,02*</u> ↑	<u>0,33 ± 0,02*</u> ↑
Nebenniere, re [%] (M ± SD)	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,002
Nebenniere, li [%] (M ± SD)	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,01

Fett u. * = Students t-Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p \leq 0,05$

N = Anzahl der Tiere

Tabelle 9.C: Mittlere Organgewichte am Untersuchungstag 130 bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle absolut in Gramm [g] und relativ zum KGW in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	17	17	17
KGW [g] (M ± SD)	332 ± 29	344 ± 29	330 ± 40
Organgewichte:			
Leber [g] (M ± SD)	12,05 ± 1,18	12,75 ± 1,39	12,74 ± 2,04
Milz [g] (M ± SD)	0,54 ± 0,07	<u>0,60 ± 0,07*</u> ↑	0,58 ± 0,05
Herz [g] (M ± SD)	1,04 ± 0,09	1,07 ± 0,10	1,05 ± 0,13
Thymus [g] (M ± SD)	0,37 ± 0,10	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,12
Gehirn [g] (M ± SD)	1,87 ± 0,09	1,88 ± 0,08	<u>1,81 ± 0,09*</u> ↓
Niere, rechts [g] (M ± SD)	1,01 ± 0,09	1,07 ± 0,09	1,06 ± 0,17
Niere, links [g] (M ± SD)	1,01 ± 0,11	1,07 ± 0,08	1,040 ± 0,16
Nebenniere, re [g] (M ± SD)	0,018 ± 0,004	0,020 ± 0,003	0,017 ± 0,003
Nebenniere, li [g] (M ± SD)	0,019 ± 0,004	0,020 ± 0,003	0,018 ± 0,003
Organgewichte relativ zum KGW:			
Leber [%] (M ± SD)	3,64 ± 0,28	3,71 ± 0,25	3,86 ± 0,37
Milz [%] (M ± SD)	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Herz [%] (M ± SD)	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,02
Thymus [%] (M ± SD)	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03
Gehirn [%] (M ± SD)	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,55 ± 0,06
Niere, rechts [%] (M ± SD)	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,02
Niere, links [%] (M ± SD)	0,30 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,02
Nebenniere, re [%] (M ± SD)	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001
Nebenniere, li [%] (M ± SD)	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001

Fett u. * = Students t-Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p \leq 0,05$

N = Anzahl der Tiere

4.2 Entwicklung der Geschlechtsorgane

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe stieg bei den Tieren der Gruppe Spironolacton 10 der Hoden im Durchschnitt mit 0,4 Tagen signifikant eher ab. In der Expositionsgruppe Spironolacton 15 trat der Hodenabstieg wie in der Kontrollgruppe im Durchschnitt ungefähr am 18,5ten Postnataltag ein (Tabelle 10).

Tabelle 10: Mittelwerte der Tage [d], an denen der Hodenabstieg vollendet war bei den männlichen Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	120	113	77
Hodenabstieg [d] (M ± SD)	18,4 ± 1,1	<u>18,0 ± 1,0*</u> ↓	18,6 ± 1,0

Fett u. * = proportional Hazard Modell von Cox Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

N = Anzahl der Tiere

4.3 Gewicht und Funktion der Geschlechtsorgane

4.3.1 Gewichtsbestimmung

Hoden

Die Gewichte der Hoden der Expositionsgruppen waren weder absolut noch relativ an einem der Untersuchungszeitpunkte signifikant von denen der Kontrollgruppe verschieden. Sie stiegen vom Untersuchungstag 65 mit ca. 1,25 g bis zu ca. 1,6 g am Untersuchungstag 130 (Tabelle 11). Das Tier der Gruppe Sp 10-65, welches ein KGW von 100 g zeigte, fiel beim Hodengewicht mit ca. 0,8 g gegenüber dem Mittelwert von 1,34 g im gleichen Verhältnis auf.

Tabelle 11: Mittlere Gewichte der Hoden bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle in Gramm [g] und relativ zum KGW in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Ko	Sp 10	Sp 15
N	17	17*	17
Organgewichte:			
Hoden [g] Tag 65 (M ± SD)	1,27 ± 0,13	1,34 ± 0,17	1,15 ± 0,20
Hoden [g] Tag 100 (M ± SD)	1,52 ± 0,10	1,56 ± 0,19	1,50 ± 0,17
Hoden [g] Tag 130 (M ± SD)	1,64 ± 0,11	1,58 ± 0,12	1,62 ± 0,18
Organgewichte relativ zum KGW:			
Hoden [%] Tag 65 (M ± SD)	0,73 ± 0,07	0,79 ± 0,10	0,74 ± 0,96
Hoden [%] Tag 100 (M ± SD)	0,55 ± 0,05	0,52 ± 0,06	0,56 ± 0,06
Hoden [%] Tag 130 (M ± SD)	0,50 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,49 ± 0,04

* = An Tag 65 besteht diese Untersuchungsgruppe aus 16 Tieren

N = Anzahl der Tiere

Test = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

Akzessorische Geschlechtsorgane

In keiner der Expositionsgruppen waren zu einem der Untersuchungszeitpunkte die relativen Gewichte der akzessorischen Geschlechtsorgane signifikant von denen der Kontrolltiere verschieden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Mittlere Gewichte der akzessorischen Geschlechtsorgane (an den Untersuchungstagen 65,100 und 130) bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle in Gramm [g] und relativ zum KGW in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	17	17*	17
Untersuchungstag 65			
Samenblase re + li [g] (M ± SD)	0,18 ± 0,05	0,22 ± 0,07	0,14 ± 0,05*↓
Prostata re + li [g] (M ± SD)	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,03*↑	0,07 ± 0,03
Organgewichte relativ zum KGW:			
Samenblase re + li [%] (M ± SD)	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,02
Prostata re + li [%] (M ± SD)	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Untersuchungstag 100			
Samenblase re + li [g] (M ± SD)	0,45 ± 0,05	0,47 ± 0,07	0,41 ± 0,06
Prostata re + li [g] (M ± SD)	0,26 ± 0,04	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,05
Organgewichte relativ zum KGW:			
Samenblase re + li [%] (M ± SD)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02
Prostata re + li [%] (M ± SD)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01
Untersuchungstag 130			
Samenblase re + li [g] (M ± SD)	0,52 ± 0,08	0,54 ± 0,07	0,52 ± 0,06
Prostata re + li [g] (M ± SD)	0,33 ± 0,08	0,36 ± 0,07	0,33 ± 0,06
Organgewichte relativ zum KGW:			
Samenblase re + li [%] (M ± SD)	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02
Prostata re + li [%] (M ± SD)	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02

* = An Tag 65 besteht diese Untersuchungsgruppe aus 16 Tieren

Fett u. * = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

N = Anzahl der Tiere

4.3.2 Fertilität

Die Verpaarung der männlichen Nachkommen der Untersuchungsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede für die gemessenen Variablen. In der Expositionsgruppe Spironolacton 10 wurde ein Rattenweibchen nicht als spermienpositiv erkannt. Es hat jedoch später geworfen, muß also gedeckt worden sein. Sie wird in der Tabelle 13 als spermienpositiv und tragend geführt. Für die Tabelle 17 wurde dieses Rattenweibchen nicht berücksichtigt.

Tabelle 13: Kenndaten der Fertilität bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
verpaarte Männchen [N]	17	16	17
verpaart [N]	17	16	17
Spermienpositiv [N]	17	16	17
Verpaarungsindex [%]	100	100	100
Fertilitätsindex [d] (M ± SD)	3,8 ± 2,0	2,7 ± 1,6	3,0 ± 1,5
tragend [N]	14	15	16
Trächtigkeitsindex [%]	82,3	87,5	94,1

N = Anzahl der Tiere

Test = Chi-quadrat Test Behandlung vs. Kontrolle mit $p < 0,05$

d = Tage

4.3.3 Andrologische Untersuchung

Bestimmung der Spermatisidenanzahl

Die mittlere Zahl der Spermatisiden pro Hoden war bei der Expositionsgruppe Sp 10 am Untersuchungstag 65 (um 140×10^6) und am Untersuchungstag 130 (um 85×10^6) signifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe. Bei der Expositionsgruppe Sp 15 am Untersuchungstag 100 um 33×10^6 signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe.

Bestimmung der Spermatisidenanzahl / Hoden

Bei der Betrachtung der mittleren Spermatisidenzahl im Verhältnis zum Hodengewicht waren die Werte von Sp 10 am Untersuchungstag 65 (um 124×10^6) und Sp15 am Untersuchungstag 100 (um 49×10^6) geringer als die der Kontrollgruppe. Alle anderen Werte lagen in der gleichen Größenordnung wie die der Kontrolltiere (Tabelle14).

Tabelle 14: Mittlere Spermatisidenanzahl der Jungtiere, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle absolut und relativ zum Hodengewicht in Millionen [10^6]

Tag/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	17	17*	17
Spermatisiden [10^6] pro Hoden			
Tag 65 (M \pm SD)	425 \pm 55	<u>285 \pm 51*</u> ↓	429 \pm 98
Tag 100 (M \pm SD)	658 \pm 51	682 \pm 106	<u>582 \pm 76*</u> ↓
Tag 130 (M \pm SD)	756 \pm 60	<u>671 \pm 64*</u> ↓	704 \pm 60
Spermatisiden [10^6] pro Gramm [g] Hoden			
Tag 65 (M \pm SD)	332 \pm 26	<u>208 \pm 44*</u> ↓	369 \pm 59
Tag 100 (M \pm SD)	435 \pm 41	445 \pm 122	<u>386 \pm 33*</u> ↓
Tag 130 (M \pm SD)	461 \pm 43	421 \pm 41	436 \pm 40

* = An Tag 65 besteht diese Untersuchungsgruppe aus 16 Tieren

Fett u. * = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

N = Anzahl der Tiere

Spermienanzahl / Nebenhoden

Am Untersuchungstag 130 war die mittlere Zahl der Spermien in Untersuchungsgruppe Sp 15 signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Zu den anderen Untersuchungszeitpunkten lagen die Werte der Expositionsgruppen in der gleichen Größenordnung wie die der Kontrollgruppe (Tabelle 15).

Tabelle 15: Spermienanzahl pro Nebenhoden bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle in Millionen [10⁶] an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten

Tag/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
N	17	17*	17
Spermien [10⁶] pro Nebenhoden			
Tag 65 (M ± SD)	40 ± 6	46 ± 8	47 ± 8
Tag 100 (M ± SD)	248 ± 12	253 ± 12	227 ± 12
Tag 130 (M ± SD)	332 ± 16	300 ± 16	291 ± 16*↓

* = An Tag 65 besteht diese Untersuchungsgruppe aus 16 Tieren

Fett u. * = Varianzanalyse Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit p<0,05

N = Anzahl der Tiere

Spermienmorphologie

Wie in Tabelle 16 dargestellt waren die untersuchten Morphologieparameter der Expositionsgruppe Sp10 am Untersuchungstag 65, bis auf den Parameter *einzelnen Schwänze*, sämtliche (um ca. 100%) signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Auch bei der Expositiosgruppe Sp 15 (2,0%) sind die *Schwanzveränderungen* signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (1,0%) erhöht. In der Expositionsgruppe Sp15 waren die Ausstriche zweier Tiere aufgrund zu geringer Anzahl an Spermien nicht auswertbar.

Für den Untersuchungstag 100 trat beim Parameter *einzelne Köpfe* bei der Auswertung des Kruskal Wallis Tests über alle Untersuchungsgruppen eine Signifikanz auf. Diese Signifikanz läßt sich bei den Tests der Expositionsgruppe Sp 10 gegen die Kontrollgruppe und Sp 15 gegen die Kontrollgruppe aufgrund der geringeren Gruppengröße statistisch nicht darstellen. Die Signifikanz der erhöhten *Kopfveränderungen* in der Expositionsgruppe Sp 10 ist jedoch statistisch gesichert.

Am Untersuchungstag 130 ist der Wert *einzelne Schwänze* in der Expositionsgruppe Sp 15 gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht.

Tabelle 16: Daten der Spermienmorphologie am Untersuchungstag 65, 100 und 130 bei den Jungtieren, die nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 in utero gegenüber Spironolacton exponiert waren, im Vergleich zur Kontrolle in Prozent [%]

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
<i>Untersuchungstag 65</i>			
N	17	16	15
einzelne Köpfe [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	3,0/2,0/1,0	6,0/4,5/3,0	5,0/2,0/1,0
einzelne Schwänze [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	6,0/3,0/2,0	13,5/6,5/3,5	6,0/4,0/4,0
Schwanzveränderungen [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	1,0/1,0/0,0	3,0/2,0/1,0	3,0/2,0/1,0
Kopfveränderungen [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	5,0/4,0/3,0	9,0/7,5/5,0	9,0/5,0/4,0
<i>Untersuchungstag 100</i>			
N	17	17	17
einzelne Köpfe [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	3,0/2,0/1,0	6,0/3,0/2,0	2,0/1,0/1,0
einzelne Schwänze [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	2,0/2,0/2,0	3,0/2,0/1,0	4,0/2,0/1,0
Schwanzveränderungen [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	2,0/1,0/0,5	3,0/2,0/2,0	2,0/2,0/1,0
Kopfveränderungen [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	3,0/2,0/1,0	6,0/4,0/2,0	4,0/3,0/2,0
<i>Untersuchungstag 130</i>			
N	17	17	17
einzelne Köpfe [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	2,5/2,0/1,0	3,5/2,0/1,0	3,0/2,0/1,0
einzelne Schwänze [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	3,0/2,0/1,0	4,0/2,0/0,5	6,0/5,0/3,0
Schwanzveränderungen [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	2,0/0,5/0,0	2,0/2,0/0,5	2,0/2,0/1,0
Kopfveränderungen [%] (Q ₃ /M/Q ₁)	4,0/3,0/1,5	5,0/3,0/2,0	6,0/4,0/3,0

Fett u. * = Kruskal-Wallis-Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit p<0,05

N = Anzahl der Tiere

4.4. Enzymhistochemische Beurteilung der Leydigzellen

Auf den Bildern 1 und 2 sind mehrere Tubuli seminiferi im Querschnitt zu sehen. Zwischen den Tubuli sind dreieckige mehr oder weniger dunkel gefärbte Flächen erkennbar. Dies ist der intertubuläre Raum, in dem vor allem Leydigzellen aber auch Gefäße und wenige andere Zellen zu finden sind. Diese Übersichtsvergrößerung vermittelt ein besseres Bild von dem Gesamteindruck des Schnittes als es die höheren Vergrößerungen vermögen. In den folgenden höheren Vergrößerungen sind Anschnitte von Tubuli seminiferi und im intertubulären Raum deutlicher einzelne Zellen, Gefäße und bindegewebige Strukturen zu finden. Die Zellen sind zum größten Teil Leydigzellen. In ihnen findet die Synthese von Testosteron statt, die ich mit Hilfe der enzymhistochemischen Färbung sichtbar gemacht habe. Der Umsatz von Dehydroepiandrosteron in Testosteron während der Inkubationszeit spiegelt sich in der Intensität der Färbung wieder. Eine geringere Färbung der Leydigzellen bedeutet einen geringeren Umsatz von Dehydroepiandrosteron in Testosteron. Um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu gewährleisten, sind die Bilder des gleichen Untersuchungstags auf einer Seite platziert.

Untersuchungstag 65

Die Bilder der Hoden der Kontrolltiere zeigen, daß die Leydigzellen während der Inkubationszeit in der Lage sind, so viel umzusetzen, daß sie auf diesen Bildern als komplett schwarze Punkte in Erscheinung treten. Diese verdecken die typischen Strukturen der Leydigzellen vollständig. Jedoch treten auch in den Bildern der Kontrolltiere einige wenige Zellen auf, die nur eine leichtere Färbung aufweisen. Diese läßt die typischen Strukturen der Leydigzellen mit großen Zellkernen und vielen Nucleoli durchscheinen.

Bei der Gegenüberstellung der geringeren Vergrößerung des Schnittes der Kontrollgruppe gegenüber der Expositionsgruppe Sp 15 fällt eine schwächere Färbung der Leydigzellnester in der Expositionsgruppe auf (Bild 1 und 2). Es treten in der Expositionsgruppe Leydigzellnester auf, die sehr wenig Dehydroepiandrosteron in Testosteron umgesetzt haben. Dies läßt sich bei der höheren Vergrößerung deutlicher erkennen.

Auf Bild 3 sind zwei Leydigzellnester zu erkennen, in denen alle Leydigzellen deutlich dunkel oder auch schwarz angefärbt sind. Auf Bild 4 hingegen (Expositionsgruppe Sp10) sind vor allem die im rechten Bildabschnitt gelegenen Leydigzellen kaum angefärbt. Auf Bild 5 (Expositionsgruppe Sp 15) sind in dem Leydigzellnest lediglich zwei Zellen deutlich schwarz gefärbt.

Untersuchungstag 100

An diesem Untersuchungszeitpunkt sind die Leydigzellnester der Expositionsgruppe Sp 15 deutlich schwarz gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt sind es die Leydigzellen der Expositionsgruppe Sp10, die zu einem großen Teil nur eine schwache Färbung aufweisen (Bilder 6-8).

Untersuchungstag 130

Am letzten Untersuchungstag sind in den Bildern beider Expositionsgruppen Sp 10 und Sp 15 die Leydigzellen deutlich geringer angefärbt und haben somit weniger Dehydroepiandrosteron in Testosteron umgesetzt als im Hoden des Kontrollschnittes. (Bilder 9-11).

Untersuchungstag 65

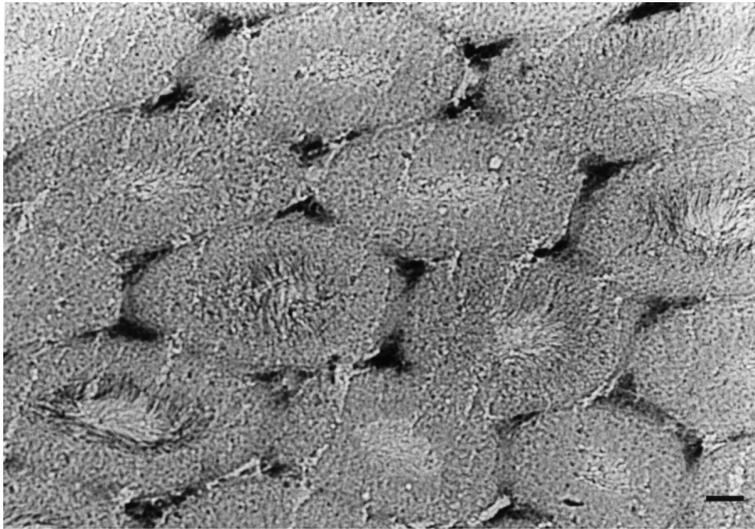


Bild 1: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Kontrolltieres. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 20 μ m.



Bild 2: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 15 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit mäßig schwarz gefärbten Leydigzellen im Interstitium. Untersuchungstag 65. Bar = 20 μ m.

Untersuchungstag 65

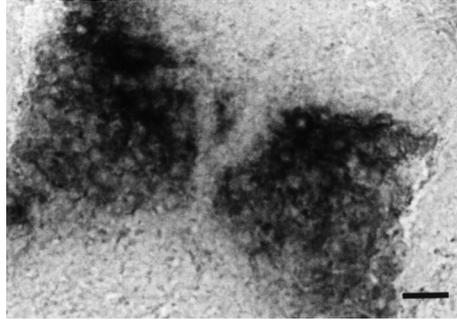


Bild 3: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Kontrolltieres. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 6 μ m.

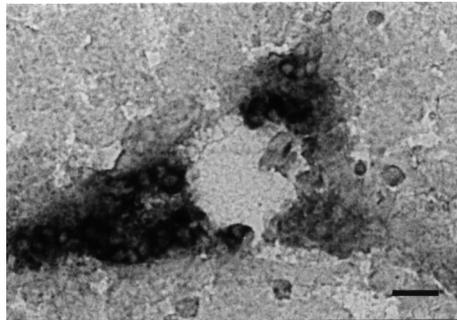


Bild 4: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwärzlich angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 6 μ m.

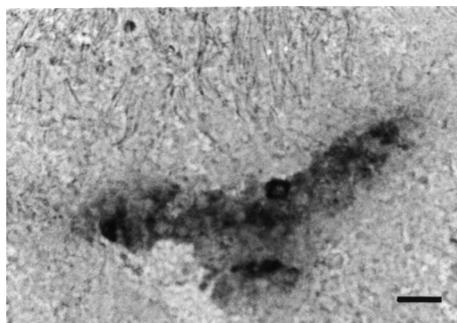


Bild 5: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 15 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwach schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 6 μ m.

Untersuchungstag 100

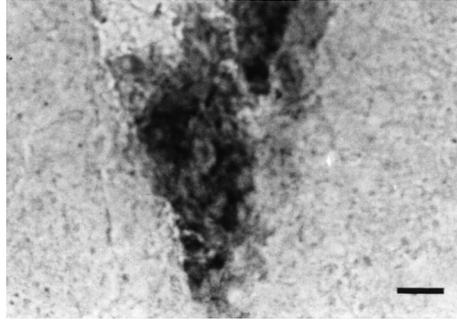


Bild 6: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Kontrolltieres. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Untersuchungstag 100. Bar = 6 μ m.

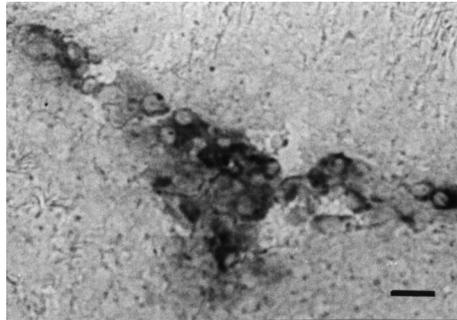


Bild 7: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit unregelmäßig schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Untersuchungstag 100. Bar = 6 μ m.

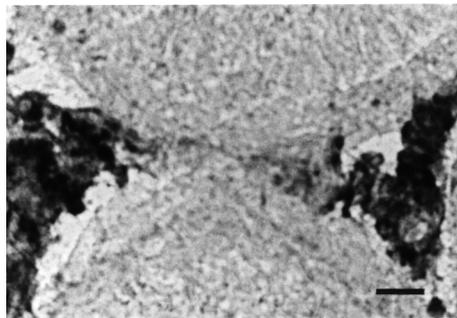


Bild 8: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 15 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Untersuchungstag 100. Bar = 6 μ m.

Untersuchungstag 130

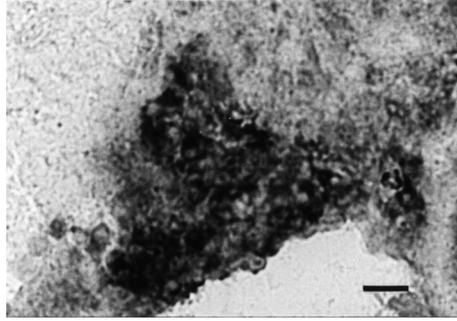


Bild 9: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Kontrolltieres. Quer geschnittene Hodentubuli mit schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 6 μ m.

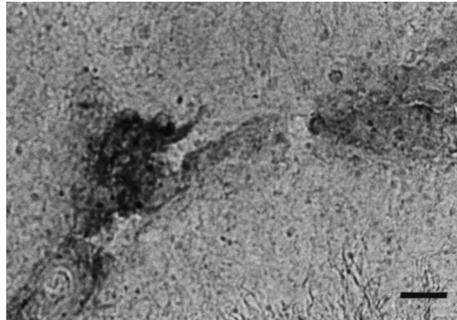


Bild 10: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit geringer schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 6 μ m.

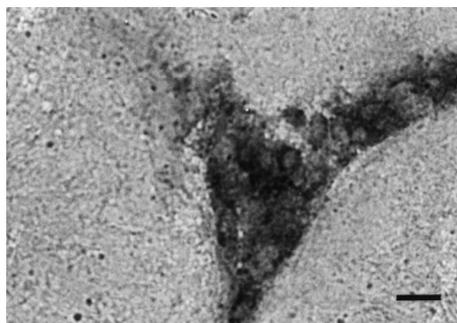


Bild 11: Hodenschnitt mit enzymhistochemisch angefärbten Leydigzellen eines Tieres der Untersuchungsgruppe, deren Muttertiere am Trächtigkeitstag 15 mit Spironolacton behandelt wurden. Quer geschnittene Hodentubuli mit unregelmäßig schwarz angefärbten Leydigzellen im Interstitium. Bar = 6 μ m.

4.5 Beurteilung der Wurfdaten der F2-Generation

Die Ergebnisse der Wurfdaten der F2-Generation waren im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffällig (Tabelle 17).

Tabelle 17: Wurfdaten der F2-Generation der Expositionsgruppe Spironolacton 10 bzw. 15 (Exposition in utero nach Behandlung der Muttertiere am Trächtigkeitstag 10 bzw. 15) und der Kontrolle

Parameter/Gruppe	Kontrolle	Sp 10	Sp 15
tragend [N]	14	14	16
Implantationsanzahl [N]	182	158	197
Implantationen \bar{x} [N] (M \pm SD)	13 \pm 2,4	11,3 \pm 3,1	12,6 \pm 2,0
Feten [N] (davon tot)	178 (1)	156	182
Wurfgröße \bar{x} [N] (M \pm SD)	12,7 \pm 2,5	11,1 \pm 3,1	12,3 \pm 2,0
Resorptionen [N]	4	2	5
Resorptionen [%]	2,2	1,3	2,5

N = Anzahl der Tiere

Test = Chi-Quadrat-Test Behandlung vs. Kontrolle signifikant mit $p < 0,05$

5 Diskussion

Es finden sich in der Literatur zu Spironolacton keine pränatalen Versuche im Hinblick auf die spätere Fertilität der männlichen Nachkommen. Bei anderen Substanzen wird inzwischen die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß sie schon pränatal die spätere Fruchtbarkeit beeinflussen können. Bei Phenobarbital wurde bei einer Behandlung der Muttertiere von Trächtigkeitstag 12-19 mit 140mg/kg/Tag eine Auswirkung auf die männlichen Jungtiere in Form von verkürzter Anogenitalentfernung und verringerter Seminalvesikelgewichte, gesenkten Testosteron- und LH-Werten sowie reduzierter Fertilität gefunden [Gupta et al. 1980].

Des weiteren fanden Gray et al. [1995] bei der pränatalen Applikation von TCDD bei Ratten eine Senkung der Fertilität der F1- und F2-Generation. Außerdem zeigten sich gesenkte Gewichte der akzessorischen Geschlechtsorgane. Bei Applikation dieser Substanz bei Hamstern fielen ein um drei Tage verzögerter Eintritt der präputialen Separation und eine Senkung der Ejakulatspermienzahl um 58% auf.

Beim Menschen fanden Dessens et al. [1994] eine Senkung der Fertilität bei Jugendlichen, deren Mütter aufgrund von Epilepsie Barbiturate und/oder Hydantoine während der Schwangerschaft einnahmen. Diese empirischen Studien wurden anhand von Tierversuchen bestätigt. Coffigny et al. [1994] fanden nach einer Bleivergiftung während der Trächtigkeit von Ratten bei den Nachkommen weder eine Veränderung der Gewichte der Geschlechtsorgane, noch eine Senkung der Fertilität oder eine erhöhte Rate an pränataler Sterblichkeit oder Mißbildungen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnten einige Auffälligkeiten festgestellt werden, die nachfolgend nochmals zusammengefaßt werden.

In der *allgemeinen Entwicklung* der Jungtiere ist der Befund auffällig, daß die männlichen Jungtiere der Expositionsgruppe Sp 10 mit einem signifikant höheren Geburtsgewicht starten. Diese Signifikanz kann durch die sehr hohe Anzahl an Tieren entstehen.

Der mittlere *Gewichtszuwachs der Muttertiere* während der Trächtigkeit ist in den Expositionsgruppen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die sehr hohen Standardabweichungen in den Expositionsgruppen zurückzuführen. Diese ergibt sich in der Expositionsgruppe Sp 10 dadurch, daß ein Tier bis zum Tag 11 51 g abgenommen und bis zum Trächtigkeitstag 21 nur insgesamt 22 g zugenommen hat, am Ende der Trächtigkeit jedoch neun Jungtiere warf. In der Expositionsgruppe Sp 15 wäre die geringere Wurfgröße im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe eine Erklärung.

In bezug auf die *Mortalität* fällt in der Expositionsgruppe Sp 15 auf, daß zwei Muttertiere den gesamten Wurf auffraßen, bevor er registriert werden konnte. Ferner stirbt das einzige Jungtier eines Rattenweibchens dieser Gruppe am dritten Postnataltag. Ein weiteres Rattenweibchen dieser Gruppe fraß seine Jungtiere zwischen dem zweiten und vierten Postnataltag. Es besteht die Möglichkeit, daß die Jungtiere - ohne daß es makroskopisch sichtbar war - mißgebildet waren und die Muttertiere sie deshalb auffraßen bzw. das eine Jungtier verstorben ist. Leider war ein statistischer Vergleich dieser Ereignisse mit der Kontrolle aufgrund äußeren Einflusses (Unruhe im Stall am Wurfstag der Kontrollgruppe) nicht möglich. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte dieser Aspekt berücksichtigt werden.

Die Jungtiere der Expositionsgruppen sind in den *Wurfparametern* wie Zahndurchbruch, Fellentwicklung und Augenöffnung zwar z.T. statistisch signifikant schneller als die Jungtiere der Kontrollgruppen, dies jedoch um einen so geringen Wert (unter einem Tag), daß es biologisch nicht sehr sinnvoll erscheint und auf die hohe Anzahl an Jungtieren zurückgeführt werden kann, die die Standardabweichung sehr gering werden läßt.

Die Autopsie und *Makroskopische Untersuchung* des vorzeitig verstorbenen Tieres der Expositionsgruppe Sp15, sowie die Harnsteine bzw. der Harngrieß je eines Tieres der Expositionsgruppen, läßt eine Beeinflußung der Nieren der exponierten Tiere möglich erscheinen. Weiterhin ist auffällig - in der Häufigkeit jedoch statistisch nicht signifikant -, daß zwei Tiere der Behandlungsgruppen je einen abdominalen Hoden aufwiesen, wohingegen keins der Kontrolltiere eine Lageveränderung eines Hodens aufwies.

Die Tiere der späteren Behandlungsgruppe (Sp 15) zeigten zum ersten Untersuchungstermin verminderte Körpergewichte. Allerdings waren bei diesen Tieren die Gewichte der Nieren relativ zum KGW signifikant erhöht. Auch dies deutet auf eine Veränderung der Nieren hin. Ebenfalls drei weitere Jungtiere der behandelten Muttertiere, die vor dem 65 Lebenstag verstorbenen waren und pathologisch untersucht wurden, zeigten veränderte Nieren und Harngrieß, der die Harnröhre verstopfte und somit zu einer Eigenintoxikation geführt hatte. Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten tauchten diese Auffälligkeiten nicht mehr auf. Entweder hatten sich bis zu diesem Zeitpunkt die Nieren erholt, oder die Tiere, deren Nieren geschädigt waren, waren bis zu diesem Zeitpunkt verstorben bzw. getötet und untersucht. Die signifikanten Veränderungen der relativen *Organgewichte* treten an den Untersuchungstagen 65 bzw. 100 nicht bei denselben Organen auf (an Untersuchungstag 130 ist keines der relativen Gewichte signifikant). Dieses Ergebnis scheint daher eine zufällig aufgetretene Signifikanz darzustellen, was auf eine nicht perfekt angepaßte Testform zurückgeführt werden kann.

Sowohl die relativen *Gewichte der Hoden* als auch der *akzessorischen Geschlechtsdrüsen* der Expositionsgruppen stellten sich als nicht signifikant verschieden von denen der Kontrolle heraus.

Auch die Kenndaten der *Fertilität* sowie die Wurfdaten der F₂-Generation waren unauffällig. Die Behandlung hatte also keinen so weit reichenden Effekt, daß die Rattenböcke der behandelten Gruppen nicht mehr deckfähig oder zeugungsfähig gewesen wären. Bei einer Verringerung der Spermatischenanzahl um bis zu einem Drittel war eine meßbare Auswirkung auf die Zeugungsfähigkeit nicht zu erwarten.

Die Auszählung der *Spermatiden* zeigte - allerdings zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten - signifikante Unterschiede, wonach die Tiere der Expositionsgruppen weniger Spermien produzierten als die Kontrolltiere.

Im Ergebnis der *spermienmorphologischen Untersuchung* konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe bei den Expositionsgruppen eine erhöhte Veränderungshäufigkeit der Spermien zu allen Untersuchungszeitpunkten festgestellt werden. Dies war vor allem für die Anzeichen der zellulären Degeneration der Fall; aber auch ein erhöhter Mittelwert der Kopfveränderungen war signifikant.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten bestätigte die *enzymhistochemische Untersuchung* die uneinheitliche Reaktion der Leydigzellen auf die Substanz. Die Zellen der Expositionsgruppen ließen sich unterschiedliche gut anfärben. Die Zellen, die sich nur sehr schlecht anfärben ließen, besaßen einen gesenkten Umsatz von Dehydroepiandrosteron in Testosteron während der Inkubationszeit.

Die Summe der Ergebnisse zeigt, daß Spironolacton (sowohl bei einem Einsatz am 10. als auch am 15. Trächtigkeitstag) eine schädigende Wirkung auf die spätere Funktion der Hoden besitzt. Eine Herabsetzung der Fertilität oder eine Beeinflußung der F₂-Generation wurde bei der vorliegenden Versuchsanordnung jedoch nicht festgestellt. Eine gesenkte Spermienproduktion sowie eine erhöhte Veränderungshäufigkeit der Spermienmorphologie muß jedoch konstatiert werden. Medikamente, die während der Schwangerschaft eingesetzt werden bzw. werden sollen oder auch Schadstoffe, denen Frauen ausgesetzt sein können, sollten also auf jeden Fall auf diesen möglichen Schädigungsweg hin untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Tragende Rattenweibchen wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Behandlung und zwei Gruppen wurden mit Spironolacton (Trächtigkeitstag 10 bzw. 15 mit je 2 x 20mg/kg KGW in achtstündigem Abstand) behandelt. Bei den Jungtieren wurden folgende Untersuchungen zur Beurteilung der Entwicklung durchgeführt: Einzelgewichte der Postnataltage 1-21, Zeitpunkt der Augenöffnung, des Zahndurchbruchs und der Fellentwicklung sowie bei den männlichen Nachkommen der Zeitpunkt des Hodenabstiegs. Es trat keine Auffälligkeit hinsichtlich der postnatalen Entwicklung auf. Die männlichen Nachkommen wurden in Gruppengrößen von 17 Tieren zu drei Zeitpunkten (Postnataltag 65, 100 und 130) getötet und untersucht. Zur Beurteilung der Funktionalität der Hoden und der Fertilität wurden folgende Untersuchungen vorgenommen: Gewichte der Hoden und Nebenhoden, Anzahl der Spermatiden und Spermien, Spermienmorphologie und Enzymhistochemie. Zusätzlich wurde je eine Untersuchungsgruppe vor dem Untersuchungszeitpunkt mit unbehandelten weiblichen Ratten zur Erzeugung einer F2 Generation verpaart.

Unterschied sich die Spermatidenanzahl signifikant, so war sie stets in der Expositionsgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe, geringer. Auch bei der Spermienmorphologie fanden sich in den Expositionsgruppen mehr abnorme Formen. Die stichprobenartig durchgeführte Beurteilung der Enzymaktivität der Leydigzellen war in den Expositionsgruppen z.T. deutlich geringer als bei der Kontrollgruppe. Die Daten der F2 Generation waren unauffällig.

Die therapeutisch eingesetzte Substanz Spironolacton zeigt eine Störung der Funktion der Hoden.

6.1 Summary

Influence of spironolactone after prenatal exposure on male fertility of the rat

Three groups of pregnant female rats were formed: a control group and two groups treated with spironolactone (twice 20mg/kg BW at an eight-hour interval on the 10th or 15th day of gestation). The stage of development of the offspring was evaluated on the basis of the following criteria: individual body weight from the 1st to 21st day of life, time of eye opening, time of eruption of teeth, time of fur development and - with male offspring - time of decline of the testes. A change in postnatal development caused by this substance was not observed. The male offspring were killed and examined in groups of 17 animals at three different dates (65th, 100th and 130th day of life, respectively). In order to evaluate the function of the testes and the fertility, testes and epididymides were weighed, the number of spermatids and sperms was counted and the morphology of sperms and histological enzyme chemistry were checked. In addition, prior to the examination, some animals of each group were mated with untreated female rats to create a F2 generation.

In those cases where the number of spermatides significantly differed, it was lower in the test groups than in the control group. The sperms morphology data of the test groups were worse in the same manner. The random testing of the enzyme activity of the Leydig cells showed in some cases far worse results in the test groups than in the control group. The data from the F2 generation were unobvious.

Spironolactone adversely affects the function of the testes.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzungen und Zeichen:

Ko	= Kontrollgruppe
Ko-65	= Kontrolle am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 65
Ko-100	= Kontrolle am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 100
Ko-130	= Kontrolle am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 130
Sp 10-5	= Sp 10 am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 65
Sp 10-100	= Sp 10 am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 100
Sp 10-130	= Sp 10 am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 130
Sp 15	= Expositionsgruppe, in der die Muttertiere am 15. Trächtigkeitstag mit Spironolacton behandelt wurden
Sp 15-65	= Sp 15 am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 65
Sp 15-100	= Sp 15 am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 100
Sp 15-130	= Sp 15 am Untersuchungszeitpunkt Postnataltag 130
<u>Fett u. *</u>	= signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05
N	= Anzahl der Nachkommen
W bzw. M	= Anzahl der Würfe bzw. Muttertiere
SPF	= spezifisch pathogenfrei
M ± SD	= Mittelwert ± Standardabweichung

7.2 *Ergebnisdatensätze*

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisdatensätze der wichtigen Ergebnisse zusammengestellt.

In den Tabellen sind in den Spalten unter den Kürzeln die folgende Werte eingetragen:

OBS = Observation Number = fortlaufende Nummer

GR = K = Kontrollgruppe; S = Gruppe Spironolacton 10; T = Gruppe Spironolacton 15

Tabelle der *Gewichte und Geschlechter der Nachkommen*

Tag 1 = Gewicht am Lebenstag 1

Tag 7 = Gewicht am Lebenstag 7

Tag 16 = Gewicht am Lebenstag 16

GE = w = weiblich; m = männlich

In der Tabelle der *Gewichte der Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen*

KG = Körpergewicht der Tiere

Rhoden = Gewicht des rechten Hodens

Lhoden = Gewicht des linken Hodens

Rsamen = Gewicht der rechten Samenblasendrüse

Lsamen = Gewicht der linken Samenblasendrüse

Rprost = Gewicht der rechten Prostata

Lprost = Gewicht der linken Prostata

In der Tabelle der *Spermatidenzahlen*

Tag = Untersuchungstag

Rsperm = Anzahl der Spermatiden im rechten Hoden

Lsperm = Anzahl der Spermatiden im linken Hoden

In der Tabelle der *Spermienmorphologie*

Kopf, Schwanz = Anzahl der einzeln gefundenen Köpfe bzw. Schwänze

Schwanzver, Kopfver = Anzahl der gefundenen Schwanz- bzw. Kopfveränderungen

Ergebnisdatensatz der Gewichte an den Lebenstagen 1,7,16 und 22 und Geschlechter der Nachkommen

OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge	OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge
1	5.47	10.42	23.42	31.51	K	m	58	6.07	11.45	20.43	28.77	K	w
2	5.53	10.89	24.81	33.83	K	w	59	5.94	12.17	26.01	34.67	K	w
3	4.81	9.86	23.62	32.23	K	w	60	6.03	10.85	21.74	30.02	K	m
4	5.02	.	.	.	K	w	61	5.71	10.21	21.21	29.27	K	w
5	5.19	10.13	24.14	31.65	K	m	62	5.56	10.06	21.27	29.32	K	w
6	4.77	9.04	21.67	28.46	K	m	63	6.07	10.62	21.87	29.70	K	m
7	5.41	8.85	.	.	K	m	64	6.06	10.95	21.83	30.46	K	m
8	5.04	10.81	22.77	30.67	K	m	65	6.11	10.91	21.49	30.79	K	m
9	4.94	.	.	.	K	m	66	5.18	9.88	19.90	27.91	K	w
10	5.23	9.43	24.44	33.06	K	w	67	5.40	9.96	20.97	29.41	K	w
11	4.82	10.23	23.82	31.65	K	w	68	5.39	9.91	21.12	28.52	K	w
12	5.07	10.37	.	.	K	w	69	5.49	10.14	20.64	29.23	K	w
13	6.18	12.65	26.34	35.70	K	m	70	5.87	11.11	21.67	28.84	K	w
14	6.33	13.13	26.70	36.24	K	w	71	5.91	12.02	24.01	36.10	K	m
15	5.97	12.08	25.04	34.26	K	w	72	6.60	12.87	25.40	35.88	K	m
16	6.51	13.30	26.98	36.32	K	w	73	7.27	13.55	27.50	40.17	K	m
17	6.08	12.34	25.09	33.53	K	w	74	6.31	12.01	24.98	35.81	K	m
18	5.66	11.50	24.91	33.55	K	w	75	6.14	11.92	26.42	37.82	K	m
19	5.78	12.88	23.92	32.55	K	w	76	6.44	12.82	25.80	37.64	K	w
20	6.19	12.65	25.29	34.27	K	w	77	6.32	12.45	25.55	36.77	K	w
21	5.71	.	.	.	K	w	78	6.21	12.94	26.12	37.76	K	w
22	6.03	12.11	25.14	34.35	K	w	79	5.85	9.45	21.26	31.18	K	w
23	6.37	12.98	25.60	33.55	K	w	80	6.10	10.99	21.30	30.80	K	m
24	6.45	.	.	.	K	m	81	5.47	10.77	20.97	29.56	K	w
25	5.79	.	.	.	K	w	82	5.32	9.97	20.59	28.73	K	w
26	5.59	.	.	.	K	w	83	5.05	9.75	20.42	29.14	K	w
27	5.66	.	.	.	K	w	84	5.92	10.79	21.22	29.70	K	m
28	5.50	.	.	.	K	w	85	5.81	10.55	21.15	28.85	K	m
29	6.20	.	.	.	K	m	86	5.69	10.93	22.30	31.14	K	m
30	5.91	.	.	.	K	m	87	5.44	10.62	21.10	30.04	K	m
31	6.20	.	.	.	K	m	88	5.42	10.02	20.65	28.41	K	m
32	5.77	.	.	.	K	w	89	5.43	9.92	20.60	31.01	K	w
33	6.19	.	.	.	K	w	90	5.55	10.25	20.75	29.38	K	w
34	6.03	.	.	.	K	w	91	5.69	10.40	20.71	28.94	K	w
35	5.76	.	.	.	K	w	92	6.25	.	.	.	K	m
36	6.01	.	.	.	K	w	93	5.45	.	.	.	K	m
37	5.40	10.43	21.69	31.82	K	m	94	7.22	.	.	.	K	m
38	5.23	9.94	21.03	30.81	K	w	95	6.47	.	.	.	K	m
39	5.40	10.40	21.63	31.15	K	w	96	5.98	.	.	.	K	w
40	4.69	9.63	20.86	30.73	K	w	97	5.12	.	.	.	K	w
41	5.59	10.56	22.70	33.57	K	m	98	6.16	.	.	.	K	w
42	5.51	10.19	20.53	27.76	K	m	99	5.95	.	.	.	K	w
43	5.41	10.24	21.53	31.61	K	m	100	6.05	.	.	.	K	w
44	5.48	10.41	22.17	31.64	K	m	101	5.70	11.44	22.20	31.60	K	m
45	5.46	10.81	21.48	31.24	K	m	102	5.70	11.48	21.38	31.89	K	w
46	5.48	10.67	21.74	30.87	K	m	103	6.58	11.48	21.54	29.93	K	m
47	5.71	10.88	20.60	29.91	K	m	104	6.53	12.61	22.37	31.09	K	m
48	5.07	9.90	20.15	29.67	K	w	105	6.41	11.78	21.47	30.93	K	m
49	6.44	12.30	24.76	31.68	K	m	106	6.49	13.06	23.16	32.86	K	m
50	6.07	11.68	25.70	34.90	K	w	107	6.27	11.63	21.53	31.20	K	w
51	5.74	10.88	22.39	30.18	K	w	108	6.26	12.39	22.36	30.99	K	w
52	6.37	12.74	26.93	34.18	K	m	109	6.46	11.65	21.84	31.20	K	w
53	6.47	12.64	24.06	34.67	K	m	110	5.60	10.86	21.48	29.09	K	w
54	6.31	11.93	25.82	33.70	K	m	111	6.14	11.83	24.44	33.60	K	m
55	6.11	11.34	24.23	32.96	K	m	112	6.59	12.27	25.49	36.42	K	m
56	5.82	10.99	24.40	31.90	K	m	113	6.56	11.75	24.68	34.69	K	m
57	5.99	11.74	23.82	31.33	K	w	114	6.37	12.40	24.64	32.85	K	m

OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge	OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge
115	6.83	12.56	24.95	35.29	K	m	172	6.76	13.32	30.84	47.99	K	w
116	6.03	11.44	23.78	33.51	K	w	173	6.43	12.42	29.37	42.00	K	m
117	5.92	11.20	24.20	31.96	K	w	174	6.87	13.34	31.42	45.11	K	m
118	6.06	11.95	25.18	34.43	K	w	175	6.51	9.75	.	.	K	m
119	6.39	12.49	25.14	34.64	K	w	176	6.87	13.27	31.53	45.15	K	m
120	4.93	7.94	.	.	K	m	177	6.72	13.79	33.62	44.56	K	w
121	4.56	8.61	21.74	33.48	K	w	178	5.30	.	.	.	K	w
122	4.40	5.04	15.33	22.84	K	w	179	6.21	13.18	31.62	45.86	K	w
123	4.20	7.66	20.13	30.19	K	w	180	4.52	9.01	11.78	.	K	w
124	4.70	7.75	19.33	27.80	K	w	181	6.39	12.32	22.96	33.88	K	m
125	4.81	7.31	19.63	28.22	K	w	182	5.96	11.76	21.71	32.23	K	w
126	4.84	9.01	20.95	30.07	K	m	183	5.44	11.13	21.62	31.56	K	w
127	4.83	8.88	21.19	30.13	K	m	184	6.74	12.62	22.86	33.19	K	m
128	4.98	9.10	.	.	K	m	185	6.11	12.39	22.63	33.10	K	m
129	4.72	.	.	.	K	m	186	6.10	12.45	22.84	32.20	K	m
130	5.38	9.26	20.68	29.80	K	m	187	6.40	12.76	23.40	33.91	K	m
131	4.77	8.56	20.73	30.58	K	m	188	6.19	11.97	21.92	31.68	K	w
132	4.73	8.96	20.55	30.86	K	w	189	6.00	12.61	23.04	33.23	K	w
133	4.67	8.77	20.96	30.59	K	w	190	4.12	9.84	20.17	30.23	K	w
134	5.87	9.34	20.45	27.57	K	m	191	6.63	12.48	22.30	32.65	K	w
135	5.32	9.97	20.43	28.34	K	w	192	6.28	11.52	24.20	33.95	K	m
136	5.30	10.07	21.59	27.92	K	w	193	6.09	12.02	25.24	35.60	K	w
137	5.13	9.57	19.50	28.31	K	w	194	6.63	12.42	26.29	38.92	K	m
138	5.86	10.63	21.70	25.28	K	m	195	6.24	13.76	27.12	40.22	K	m
139	5.86	10.65	20.66	28.75	K	m	196	6.74	13.98	28.87	40.98	K	m
140	5.38	9.45	21.42	27.80	K	m	197	5.73	11.46	23.93	33.60	K	m
141	5.69	10.15	20.23	27.77	K	m	198	5.74	11.44	24.44	35.95	K	w
142	4.97	8.55	15.49	21.27	K	w	199	5.80	11.82	26.06	34.92	K	w
143	5.26	10.18	21.23	29.39	K	w	200	5.63	11.01	24.52	34.76	K	w
144	5.61	10.78	21.31	26.90	K	w	201	6.26	12.43	26.09	36.27	K	w
145	5.50	10.27	20.17	28.04	K	w	202	6.06	12.21	25.83	28.00	K	m
146	5.05	10.22	21.54	30.88	K	m	203	5.60	11.87	27.87	26.23	K	m
147	5.17	.	.	.	K	w	204	5.90	11.57	26.42	29.05	K	m
148	4.64	8.62	.	.	K	w	205	4.79	9.82	23.74	25.87	K	w
149	4.72	8.30	17.09	25.43	K	w	206	5.39	11.58	24.75	27.60	K	w
150	5.51	9.73	19.60	28.25	K	m	207	5.85	11.70	25.19	28.84	K	w
151	5.81	8.90	18.24	26.37	K	m	208	5.37	11.04	24.53	25.63	K	w
152	5.55	9.34	17.04	24.03	K	m	209	5.24	11.11	25.58	28.18	K	w
153	5.02	9.61	19.69	27.72	K	w	210	5.20	11.10	25.36	28.42	K	w
154	5.48	10.01	20.75	28.50	K	w	211	5.07	8.74	18.23	23.97	K	m
155	5.10	10.76	22.57	31.63	K	w	212	4.69	7.14	.	.	K	w
156	5.04	8.82	18.99	27.26	K	w	213	5.46	8.23	.	.	K	w
157	4.99	10.05	20.76	28.30	K	w	214	4.89	8.29	18.52	24.10	K	w
158	5.56	8.20	.	.	K	m	215	5.00	8.68	17.93	22.52	K	w
159	5.25	8.68	21.05	27.96	K	m	216	4.74	8.45	18.12	23.51	K	m
160	5.50	9.78	21.87	31.33	K	m	217	5.42	8.98	18.73	24.14	K	m
161	5.29	9.13	23.85	32.36	K	w	218	5.80	9.65	19.81	25.42	K	m
162	5.32	8.54	21.25	29.31	K	w	219	5.08	9.37	19.72	26.18	K	m
163	5.35	8.48	.	.	K	m	220	4.94	8.85	18.52	25.14	K	m
164	5.50	10.08	23.39	31.60	K	m	221	5.15	8.98	19.00	24.79	K	w
165	5.53	9.51	24.56	32.58	K	m	222	5.12	8.48	18.56	24.26	K	w
166	5.62	9.47	21.88	30.87	K	m	223	4.68	8.94	18.40	23.66	K	w
167	5.57	10.61	23.09	31.51	K	m	224	5.93	11.41	23.33	33.07	K	m
168	4.78	8.56	19.46	27.27	K	m	225	4.75	9.31	20.17	27.88	K	w
169	5.18	8.58	.	.	K	m	226	5.46	9.96	21.43	29.43	K	w
170	5.63	8.90	.	.	K	m	227	6.21	11.82	22.90	31.52	K	m
171	6.43	8.29	.	.	K	m	228	5.88	10.98	21.06	31.54	K	m

OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge	OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge
229	6.50	11.69	22.52	28.51	K	m	286	5.53	10.15	15.79	24.79	S	w
230	6.14	11.64	24.30	33.51	K	m	287	5.67	10.42	20.19	29.86	S	w
231	5.83	11.15	21.29	29.73	K	w	288	6.19	10.74	21.61	31.03	S	m
232	5.65	11.35	22.08	31.42	K	w	289	6.25	10.78	21.35	30.55	S	m
233	5.56	.	.	.	K	m	290	5.74	10.98	21.08	30.85	S	w
234	4.72	.	.	.	K	w	291	5.19	9.84	21.32	30.63	S	w
235	4.68	.	.	.	K	w	292	5.34	9.81	20.17	29.26	S	w
236	5.24	.	.	.	K	w	293	5.50	10.23	20.18	29.23	S	w
237	5.21	.	.	.	K	w	294	5.76	10.23	21.26	30.13	S	w
238	4.50	.	.	.	K	w	295	5.74	10.18	21.84	31.00	S	w
239	4.72	.	.	.	K	w	296	5.83	8.15	.	.	S	m
240	5.23	.	.	.	K	m	297	5.80	9.63	24.49	34.75	S	w
241	5.49	.	.	.	K	m	298	5.31	8.72	22.99	32.46	S	w
242	6.05	.	.	.	K	m	299	5.77	10.66	26.45	35.62	S	w
243	5.70	.	.	.	K	m	300	6.61	11.34	29.91	39.62	S	m
244	5.27	.	.	.	K	m	301	6.22	10.58	25.85	35.68	S	m
245	5.08	.	.	.	K	w	302	5.68	9.28	.	27.40	S	m
246	4.82	.	.	.	K	w	303	6.04	10.26	21.88	30.88	S	m
247	4.46	.	.	.	K	w	304	5.71	9.33	.	.	S	m
248	6.61	.	.	.	K	m	305	5.88	10.11	25.67	35.50	S	m
249	6.04	.	.	.	K	m	306	6.19	10.22	24.25	33.92	S	m
250	6.61	.	.	.	K	m	307	6.13	10.47	25.11	35.14	S	m
251	5.87	.	.	.	K	m	308	6.21	11.25	22.87	31.67	S	m
252	6.71	.	.	.	K	m	309	5.68	11.11	21.83	32.67	S	w
253	6.10	.	.	.	K	m	310	6.21	11.28	22.09	33.34	S	w
254	5.96	.	.	.	K	w	311	5.80	10.58	21.92	30.52	S	w
255	5.96	.	.	.	K	w	312	6.01	11.26	22.67	30.13	S	m
256	6.12	.	.	.	K	w	313	6.02	11.45	23.12	33.11	S	m
257	5.28	10.88	.	.	S	m	314	6.31	11.94	22.80	32.95	S	m
258	6.08	12.60	20.08	34.71	S	m	315	6.14	11.24	22.32	32.20	S	m
259	5.33	9.62	29.32	43.53	S	m	316	6.03	10.62	22.12	32.33	S	m
260	5.81	12.26	34.78	46.30	S	m	317	6.15	11.31	22.49	31.25	S	w
261	5.38	11.70	33.54	46.27	S	w	318	6.09	11.73	22.93	32.32	S	w
262	5.00	.	.	.	S	w	319	5.68	10.85	22.20	31.62	S	w
263	4.99	.	.	.	S	w	320	6.47	.	.	.	S	m
264	6.21	11.80	23.93	35.63	S	m	321	6.05	12.08	20.82	31.19	S	m
265	6.00	10.10	20.89	30.88	S	w	322	6.27	11.19	20.66	27.76	S	w
266	6.06	11.70	22.47	32.12	S	m	323	6.09	10.97	20.74	29.89	S	w
267	6.49	11.68	23.87	35.92	S	m	324	5.47	9.77	19.31	27.30	S	w
268	6.31	11.10	21.63	31.72	S	m	325	6.82	11.85	20.91	30.65	S	m
269	6.86	10.06	19.43	34.83	S	m	326	6.33	11.18	21.01	30.25	S	m
270	6.48	12.16	23.58	36.05	S	m	327	5.84	11.28	22.02	31.01	S	m
271	6.29	11.57	23.54	33.85	S	w	328	6.21	11.07	21.43	31.01	S	m
272	5.62	7.52	.	.	S	w	329	5.89	10.09	20.24	29.07	S	m
273	5.90	11.05	22.81	34.55	S	w	330	6.26	10.94	20.42	29.57	S	w
274	6.06	9.23	20.87	28.92	S	m	331	5.31	10.39	19.85	27.42	S	w
275	6.28	9.30	21.78	30.92	S	w	332	5.31	10.43	20.57	30.86	S	w
276	5.93	10.34	21.87	32.08	S	w	333	6.76	12.30	24.24	35.08	S	m
277	6.44	11.11	23.81	33.14	S	m	334	7.09	12.31	24.95	37.19	S	m
278	5.63	9.64	20.03	27.77	S	m	335	7.01	12.87	23.66	35.85	S	m
279	6.43	8.83	19.90	26.71	S	m	336	6.00	11.30	22.66	34.24	S	w
280	6.36	9.41	20.59	31.05	S	m	337	6.64	11.80	23.39	34.52	S	w
281	6.79	10.26	22.16	29.92	S	m	338	6.12	11.31	23.12	34.43	S	w
282	6.41	10.03	21.36	29.79	S	m	339	6.61	11.70	23.63	35.18	S	w
283	5.85	10.03	21.68	31.40	S	w	340	6.05	11.09	22.69	34.46	S	w
284	6.39	9.81	21.94	31.08	S	w	341	5.83	11.01	22.64	32.08	S	w
285	6.48	11.52	22.14	32.23	S	m	342	5.64	8.88	18.28	25.57	S	m

OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge	OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge
343	5.09	6.94	.	.	S	w	400	5.75	11.30	21.58	32.59	S	w
344	5.79	9.17	21.05	31.32	S	w	401	6.32	12.43	23.06	37.97	S	m
345	5.78	9.56	18.57	27.21	S	w	402	6.42	12.29	24.42	35.33	S	m
346	4.50	.	.	.	S	w	403	6.80	12.41	23.20	36.33	S	m
347	5.74	8.79	17.79	25.28	S	m	404	6.86	12.95	23.87	36.42	S	m
348	5.74	9.30	19.80	28.47	S	m	405	6.59	12.00	22.99	35.26	S	m
349	4.85	8.48	19.82	28.56	S	m	406	6.47	11.84	22.24	34.52	S	m
350	5.57	8.59	17.37	25.73	S	m	407	6.68	11.09	20.64	33.41	S	w
351	5.57	9.73	19.89	27.47	S	w	408	6.50	11.89	22.73	34.34	S	w
352	6.25	9.35	21.27	29.79	S	w	409	5.86	10.64	21.20	32.32	S	m
353	5.46	9.46	21.69	30.14	S	w	410	5.19	9.83	21.58	30.98	S	w
354	4.68	.	.	.	S	w	411	5.22	10.28	21.61	30.89	S	w
355	6.86	11.85	16.43	24.78	S	m	412	5.46	10.26	21.64	30.55	S	w
356	6.88	11.42	20.97	27.86	S	w	413	5.51	10.82	22.63	31.67	S	m
357	6.38	11.67	20.72	29.72	S	w	414	4.72	8.77	.	.	S	m
358	6.88	12.13	21.50	29.43	S	m	415	5.10	9.92	17.13	26.35	S	m
359	6.81	12.24	20.29	29.97	S	w	416	5.71	11.17	22.74	32.32	S	m
360	6.48	11.80	20.38	29.37	S	w	417	5.67	9.81	22.81	31.11	S	m
361	6.90	10.68	20.55	29.69	S	w	418	5.93	9.92	22.08	31.54	S	m
362	6.58	12.02	20.13	30.45	S	w	419	5.52	9.59	20.30	29.81	S	w
363	6.60	11.47	19.56	27.22	S	w	420	5.37	9.90	21.60	32.48	S	w
364	6.57	11.71	20.82	29.16	S	w	421	6.24	10.64	.	.	S	m
365	6.41	11.13	20.17	28.52	S	w	422	5.71	10.09	20.82	29.51	S	w
366	5.51	11.05	22.59	31.95	S	m	423	5.10	10.85	19.89	27.05	S	w
367	5.60	11.61	22.47	29.62	S	w	424	5.89	9.71	21.00	28.07	S	m
368	6.06	11.63	22.79	31.56	S	w	425	6.18	10.91	21.72	28.63	S	m
369	6.09	11.11	22.99	31.04	S	w	426	6.19	11.12	21.45	30.06	S	m
370	5.42	10.21	21.01	29.88	S	w	427	6.44	10.26	15.95	23.13	S	m
371	6.22	10.74	20.91	29.35	S	m	428	5.91	11.36	23.44	30.92	S	m
372	6.21	12.36	25.51	34.75	S	m	429	5.84	10.43	22.61	28.81	S	m
373	6.14	11.09	22.99	32.26	S	m	430	6.30	10.76	18.28	26.59	S	w
374	5.46	10.36	22.15	30.98	S	w	431	6.15	10.35	21.51	30.50	S	w
375	4.79	10.12	22.38	30.05	S	w	432	6.70	13.00	25.79	38.37	S	m
376	4.88	10.23	22.40	29.98	S	w	433	6.27	12.73	25.72	36.91	S	m
377	5.85	11.01	22.65	32.31	S	w	434	7.12	13.12	25.43	36.70	S	m
378	5.04	10.09	22.30	30.78	S	w	435	6.21	11.12	24.73	35.21	S	w
379	6.36	11.24	21.41	28.99	S	m	436	5.90	11.15	24.04	34.74	S	w
380	6.46	12.35	22.84	32.56	S	m	437	5.98	.	.	.	S	w
381	6.04	10.97	20.97	28.56	S	m	438	5.52	10.58	22.51	32.15	S	w
382	6.32	11.51	22.22	31.06	S	m	439	5.67	11.08	23.06	34.07	S	w
383	6.23	12.11	22.87	32.72	S	w	440	6.27	10.59	25.68	38.73	S	m
384	6.02	11.85	22.34	30.45	S	w	441	5.72	10.07	20.53	32.66	S	w
385	5.27	9.43	19.55	27.15	S	w	442	6.04	11.35	28.77	40.98	S	w
386	6.20	11.66	23.80	31.73	S	w	443	5.71	11.14	27.35	40.73	S	w
387	5.25	10.32	19.94	27.87	S	w	444	5.56	9.47	.	.	S	w
388	6.39	12.85	23.82	32.61	S	m	445	5.76	10.38	.	.	S	m
389	6.11	11.36	22.90	33.65	S	w	446	5.99	11.18	26.09	39.52	S	m
390	6.68	12.68	25.20	34.94	S	m	447	5.92	9.87	.	.	S	m
391	6.70	13.39	25.05	33.89	S	m	448	6.55	11.31	.	.	S	m
392	6.86	13.18	24.46	35.42	S	m	449	5.72	9.99	26.05	40.43	S	m
393	6.69	12.37	22.44	32.57	S	m	450	6.13	11.39	28.21	40.49	S	m
394	6.79	12.68	23.87	34.81	S	m	451	5.57	10.25	27.92	42.79	S	w
395	6.39	12.17	23.32	33.84	S	m	452	4.85	9.28	25.95	39.16	S	w
396	6.19	11.97	23.81	34.09	S	w	453	6.27	11.53	23.54	34.48	S	m
397	5.95	11.17	23.03	31.57	S	w	454	5.69	9.19	20.49	30.76	S	w
398	7.03	12.57	24.05	36.03	S	m	455	5.84	9.65	19.37	29.03	S	m
399	7.00	12.39	24.08	36.61	S	w	456	6.37	11.73	22.89	33.30	S	m

OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge	OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge
457	6.21	11.17	22.36	32.42	S	m	514	4.43	7.95	16.78	21.45	T	w
458	5.99	10.81	21.55	31.63	S	w	515	4.52	7.52	15.59	23.05	T	w
459	5.80	11.20	22.42	31.61	S	w	516	4.59	8.07	16.54	24.00	T	w
460	5.61	10.33	20.23	31.50	S	w	517	3.96	.	.	.	T	w
461	6.30	11.34	22.68	32.00	S	w	518	5.03	8.31	16.51	23.47	T	m
462	5.99	10.60	22.07	33.04	S	w	519	4.73	7.99	16.12	23.20	T	m
463	5.12	8.93	19.78	29.33	S	m	520	4.99	8.61	17.02	24.83	T	m
464	4.87	8.62	18.58	28.31	S	w	521	4.06	7.65	16.60	23.99	T	m
465	4.59	7.84	18.09	26.53	S	w	522	4.08	7.23	14.45	21.37	T	w
466	4.64	8.25	18.33	27.90	S	w	523	4.84	7.81	16.30	23.66	T	w
467	4.92	9.14	18.75	28.41	S	m	524	4.79	7.73	15.68	24.04	T	w
468	5.39	9.51	18.88	28.54	S	m	525	4.77	7.59	15.72	23.02	T	w
469	5.18	9.40	19.19	28.13	S	w	526	6.73	14.32	32.60	46.94	T	m
470	5.24	9.56	19.18	28.91	S	w	527	6.46	12.78	.	.	T	m
471	4.86	8.64	19.48	27.76	S	w	528	6.67	14.16	33.06	46.54	T	w
472	4.89	7.99	.	.	S	w	529	6.75	13.70	32.85	47.62	T	w
473	4.26	8.07	18.33	26.79	S	w	530	7.01	15.01	34.19	47.06	T	w
474	4.56	8.42	18.10	28.11	S	w	531	6.30	14.71	32.92	45.47	T	w
475	7.03	14.73	29.94	41.36	S	m	532	4.50	13.09	32.01	45.57	T	w
476	6.68	14.19	28.61	42.47	S	m	533	5.14	11.18	28.74	41.00	T	w
477	7.15	14.27	29.54	41.21	S	m	534	5.38	11.30	26.92	35.62	T	m
478	6.94	15.27	30.94	43.66	S	m	535	5.58	12.33	25.07	34.14	T	w
479	6.67	14.60	30.51	44.24	S	w	536	6.65	15.38	30.21	40.66	T	w
480	6.08	12.69	28.07	42.10	S	w	537	5.61	.	.	.	T	w
481	6.62	14.36	30.42	41.65	S	w	538	6.98	16.19	29.98	41.71	T	w
482	8.29	14.05	.	.	S	m	539	5.97	12.39	27.59	37.71	T	w
483	6.95	11.64	.	.	S	m	540	5.50	9.68	19.97	28.38	T	m
484	6.75	13.65	30.93	45.19	S	m	541	5.16	9.41	19.49	27.36	T	w
485	6.79	13.28	29.32	42.62	S	m	542	4.77	9.09	19.47	28.66	T	w
486	5.66	12.08	28.43	41.94	S	w	543	5.23	9.39	20.78	28.88	T	w
487	5.79	11.83	26.57	40.13	S	w	544	5.18	9.65	19.59	28.22	T	m
488	6.58	13.10	29.99	46.30	S	w	545	5.64	9.62	20.21	27.80	T	m
489	5.90	13.44	27.44	39.93	S	w	546	5.22	9.31	20.00	27.64	T	m
490	5.91	12.02	29.75	43.68	S	w	547	5.19	9.25	20.27	28.01	T	w
491	5.77	14.48	34.96	50.33	T	m	548	5.13	9.05	18.97	28.71	T	w
492	4.81	.	.	.	T	w	549	5.07	8.94	18.85	27.24	T	w
493	5.52	.	.	.	T	w	550	4.83	8.37	18.47	27.47	T	w
494	5.22	.	.	.	T	w	551	5.32	7.94	19.63	27.07	T	w
495	6.28	.	.	.	T	m	552	6.68	12.69	28.68	40.28	T	m
496	5.71	17.33	37.46	51.41	T	m	553	6.24	10.87	26.56	38.82	T	w
497	6.14	18.60	40.09	57.10	T	m	554	6.53	12.80	28.83	40.22	T	m
498	5.79	.	.	.	T	w	555	6.86	12.58	27.08	39.20	T	m
499	5.86	16.02	36.88	51.70	T	w	556	6.30	12.18	27.87	38.86	T	w
500	5.79	.	.	.	T	w	557	6.29	12.14	27.79	40.50	T	w
501	5.44	.	.	.	T	w	558	6.36	11.91	26.06	38.10	T	w
502	4.70	.	.	.	T	w	559	5.91	11.66	27.56	39.09	T	w
503	6.73	15.75	30.79	42.76	T	m	560	6.07	11.85	27.26	36.87	T	w
504	7.31	15.54	30.42	40.39	T	m	561	6.34	.	.	.	T	w
505	6.77	15.11	30.69	44.31	T	m	562	5.63	9.87	20.89	28.51	T	m
506	6.87	14.79	29.72	43.51	T	m	563	5.21	9.70	20.57	27.66	T	w
507	6.76	15.62	32.26	44.74	T	m	564	5.09	8.58	19.88	29.64	T	w
508	7.06	15.34	29.75	42.26	T	m	565	5.11	9.46	20.99	30.83	T	m
509	6.74	14.38	28.96	40.65	T	w	566	5.44	9.42	20.52	29.45	T	m
510	5.77	13.90	29.51	41.53	T	w	567	5.16	9.55	21.53	31.39	T	m
511	6.46	14.04	28.51	40.79	T	w	568	5.30	9.36	21.89	30.33	T	m
512	4.78	8.19	16.59	23.46	T	m	569	5.64	9.36	20.83	29.18	T	m
513	4.49	8.24	17.44	25.27	T	w	570	5.01	8.50	19.13	27.76	T	w

OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge	OBS	Tag1	Tag7	Tag16	Tag22	Gr	Ge
571	5.42	9.37	.	.	T	w	621	6.65	14.41	28.54	41.17	T	m
572	5.02	8.80	19.38	28.95	T	w	622	6.98	14.42	28.21	39.75	T	w
573	6.08	.	.	.	T	m	623	6.72	14.20	28.35	40.79	T	w
574	4.89	.	.	.	T	m	624	6.71	13.90	29.46	40.65	T	w
575	6.46	.	.	.	T	m	625	6.28	11.46	22.04	31.41	T	m
576	5.49	.	.	.	T	m	626	6.34	11.29	21.50	31.90	T	w
577	4.92	.	.	.	T	w	627	6.04	11.98	23.92	34.55	T	w
578	4.91	.	.	.	T	w	628	5.89	11.36	21.56	31.91	T	w
579	6.51	12.03	21.31	30.24	T	m	629	6.12	11.63	22.83	34.94	T	w
580	5.82	12.92	22.39	31.24	T	m	630	6.33	11.89	21.80	33.22	T	m
581	6.83	13.14	22.00	30.04	T	m	631	6.81	12.29	22.74	33.68	T	m
582	6.26	12.76	22.19	30.33	T	m	632	6.62	12.17	22.30	32.49	T	m
583	6.50	12.85	22.51	30.79	T	w	633	6.65	11.74	21.68	32.61	T	m
584	6.00	12.68	22.84	32.02	T	w	634	5.81	11.73	22.98	33.52	T	m
585	5.77	12.62	22.48	31.76	T	w	635	6.83	11.58	22.06	33.16	T	m
586	5.82	12.12	21.59	30.32	T	w	636	6.05	11.80	22.22	33.91	T	m
587	5.79	12.64	21.91	30.48	T	w	637	6.20	11.07	21.01	29.95	T	w
588	6.38	12.90	22.92	31.58	T	m	638	5.26	9.37	18.39	23.43	T	m
589	6.03	12.29	22.91	27.19	T	m	639	5.66	9.03	19.13	23.87	T	m
590	5.46	11.43	21.20	27.29	T	w	640	4.90	7.90	16.35	21.09	T	w
591	5.87	11.50	21.16	28.38	T	w	641	5.19	8.43	17.49	22.11	T	w
592	6.16	12.15	22.23	29.17	T	w	642	5.10	9.20	18.77	23.44	T	m
593	5.65	11.99	22.51	30.38	T	w	643	5.33	9.26	18.67	22.96	T	m
594	5.74	11.25	21.15	28.97	T	w	644	4.90	8.78	18.36	24.36	T	m
595	6.09	12.34	22.12	29.55	T	w	645	5.21	8.99	18.90	24.10	T	m
596	6.26	11.72	21.91	30.59	T	m	646	5.22	8.83	18.64	22.56	T	m
597	6.00	12.15	23.17	32.58	T	w	647	5.54	8.80	18.83	23.06	T	m
598	6.48	11.90	22.36	31.62	T	m	648	4.97	8.48	17.64	31.49	T	m
599	6.47	12.12	22.79	32.68	T	m	649	5.40	9.70	19.76	24.27	T	m
600	6.47	12.35	23.12	32.84	T	m	650	4.71	9.81	21.00	28.71	T	m
601	6.82	12.43	23.24	31.73	T	m	651	5.42	10.80	20.42	28.96	T	w
602	6.11	11.80	22.14	32.57	T	m	652	4.65	9.40	19.68	27.81	T	w
603	6.32	12.04	22.07	32.40	T	w	653	5.24	10.40	17.82	24.81	T	m
604	5.54	11.04	21.44	32.70	T	w	654	5.64	10.43	20.86	29.53	T	m
605	6.32	12.26	23.63	32.55	T	w	655	5.24	10.40	21.15	28.89	T	m
606	6.80	14.75	34.16	.	T	m	656	5.38	10.95	21.44	30.46	T	w
607	6.80	13.81	.	.	T	m	657	4.86	10.00	20.19	27.22	T	w
608	6.13	12.53	31.21	.	T	w	658	4.95	10.01	18.39	26.44	T	w
609	5.49	12.36	32.54	.	T	w	659	4.81	9.07	15.79	24.05	T	w
610	6.73	14.18	33.55	.	T	w	660	5.14	10.31	19.69	27.31	T	w
611	6.19	12.98	32.72	.	T	w	661	4.94	9.35			T	w
612	6.89	13.89	33.21	.	T	w							
613	5.76	12.27	31.65	.	T	w							
614	7.11	12.45	28.13	40.73	T	m							
615	6.81	12.49	30.73	41.51	T	w							
616	6.93	12.00	26.32	37.46	T	w							
617	6.50	14.37	28.76	41.34	T	m							
618	6.79	14.14	28.67	40.90	T	m							
619	6.77	14.54	27.92	39.96	T	m							
620	6.42	14.48	29.27	42.99	T	m							

Ergebnisdatensatz der Gewichte der Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Untersuchungstag 65

Obs	Gr	KG	Rhoden	Lhoden	Rsamen	Lsamen	Rprost	Lprost
1	S	190.0	1.476	1.490	0.117	0.113	0.065	0.035
2	S	186.0	1.244	1.247	0.130	0.124	0.065	0.049
3	S	177.0	1.355	1.394	0.121	0.113	0.041	0.047
4	S	193.0	1.373	1.400	0.123	0.115	0.067	0.076
5	S	184.0	1.307	1.327	0.071	0.103	0.055	0.053
6	S	188.0	1.372	1.427	0.115	0.106	0.061	0.058
7	S	194.0	1.411	1.397	0.118	0.136	0.046	0.063
8	S	223.0	1.421	1.415	0.146	0.133	0.117	0.078
9	S	182.0	1.308	1.379	0.088	0.089	0.052	0.055
10	S	100.0	0.827	0.747	0.026	0.029	0.010	0.005
11	S	153.0	1.201	1.258	0.075	0.077	0.042	0.036
12	S	144.0	1.638	1.190	0.038	0.051	0.014	0.019
13	S	210.0	1.428	1.441	0.104	0.119	0.077	0.071
14	S	214.0	1.318	1.397	0.136	0.144	0.065	0.034
15	S	182.0	1.418	1.460	0.138	0.138	0.072	0.070
16	S	214.0	1.368	1.427	0.163	0.148	0.098	0.108
17	K	179.0	1.272	1.369	0.098	0.079	0.025	0.037
18	K	166.0	1.277	1.334	0.067	0.069	0.053	0.035
19	K	179.0	1.356	1.300	0.104	0.101	0.052	0.054
20	K	159.0	1.241	1.222	0.077	0.091	0.050	0.049
21	K	183.0	1.304	1.266	0.074	0.075	0.049	0.042
22	K	221.0	1.440	1.412	0.144	0.126	0.080	0.067
23	K	153.0	1.220	1.194	0.071	0.126	0.044	0.047
24	K	175.0	1.282	1.266	0.085	0.085	0.029	0.025
25	K	142.0	0.814	0.892	0.042	0.046	0.031	0.036
26	K	164.0	1.314	1.346	0.094	0.079	0.042	0.027
27	K	219.0	1.317	1.362	0.110	0.104	0.034	0.038
28	K	174.0	1.350	1.377	0.094	0.099	0.069	0.034
29	K	140.0	1.099	1.090	0.057	0.071	0.017	0.017
30	K	202.0	1.297	1.340	0.136	0.113	0.030	0.029
31	K	165.0	1.357	1.371	0.080	0.080	0.068	0.067
32	K	159.0	1.246	1.290	0.057	0.057	0.035	0.027
33	K	220.0	1.387	1.364	0.121	0.146	0.032	0.028
34	T	165.0	1.282	1.313	0.105	0.107	0.053	0.052
35	T	159.0	1.179	1.239	0.065	0.050	0.016	0.030
36	T	146.0	1.095	1.147	0.056	0.069	0.080	0.000
37	T	146.0	1.168	1.217	0.074	0.073	0.035	0.038
38	T	160.0	1.296	0.366	0.062	0.066	0.043	0.038
39	T	156.0	1.257	1.214	0.077	0.075	0.046	0.030
40	T	137.0	1.276	1.244	0.067	0.072	0.037	0.032
41	T	127.0	1.133	1.196	0.058	0.059	0.018	0.028
42	T	98.00	0.868	0.900	0.025	0.027	0.013	0.006
43	T	121.0	0.774	0.787	0.045	0.055	0.032	0.033
44	T	115.0	0.912	0.908	0.038	0.055	0.030	0.022
45	T	180.0	1.449	1.415	0.103	0.092	0.054	0.046
46	T	180.0	1.332	1.340	0.113	0.126	0.056	0.049
47	T	148.0	1.040	1.307	0.079	0.085	0.056	0.053
48	T	165.0	1.300	1.348	0.102	0.109	0.047	0.028
49	T	157.0	1.264	1.258	0.077	0.061	0.027	0.018
50	T	128.0	1.206	1.264	0.056	0.044	0.031	0.026

Untersuchungstag 100

Obs	Gr	KG	Rhoden	Lhoden	Rsamem	Lsamem	Rprost	Lprost
51	S	313.0	1.579	1.528	0.250	0.275	0.215	0.195
52	S	350.0	1.863	1.901	0.268	0.262	0.097	0.098
53	S	232.0	1.350	1.402	0.216	0.161	0.147	0.132
54	S	248.0	1.451	1.458	0.245	0.237	0.122	0.105
55	S	268.0	1.488	1.548	0.251	0.247	0.154	0.148
56	S	301.0	1.673	1.641	0.232	0.170	0.112	0.096
57	S	355.0	1.762	1.803	0.268	0.268	0.123	0.185
58	S	315.0	1.995	2.040	0.276	0.322	0.117	0.155
59	S	286.0	1.550	1.516	0.169	0.153	0.168	0.131
60	S	302.0	1.491	1.540	0.260	0.226	0.119	0.104
61	S	317.0	1.456	1.447	0.243	0.278	0.133	0.138
62	S	287.0	1.555	1.615	0.204	0.207	0.103	0.069
63	S	291.0	1.573	1.628	0.245	0.211	0.148	0.154
64	S	274.0	1.527	0.435	0.220	0.243	0.108	0.084
65	S	273.0	1.495	1.477	0.252	0.204	0.103	0.084
66	S	324.0	1.595	1.644	0.237	0.272	0.141	0.131
67	S	337.0	1.675	1.664	0.259	0.224	0.162	0.136
68	K	288.0	1.421	1.487	0.175	0.202	0.146	0.143
69	K	259.0	1.599	1.554	0.281	0.280	0.137	0.154
70	K	265.0	1.717	1.641	0.186	0.191	0.118	0.101
71	K	266.0	1.444	1.453	0.242	0.228	0.109	0.103
72	K	295.0	1.448	1.488	0.228	0.219	0.084	0.107
73	K	257.0	1.475	1.536	0.250	0.214	0.122	0.106
74	K	261.0	1.384	1.425	0.209	0.230	0.133	0.132
75	K	233.0	1.338	1.345	0.187	0.187	0.090	0.096
76	K	267.0	1.638	1.675	0.221	0.232	0.138	0.111
77	K	283.0	1.561	1.603	0.223	0.209	0.129	0.130
78	K	292.0	1.572	1.541	0.248	0.282	0.148	0.109
79	K	317.0	1.648	1.657	0.231	0.225	0.123	0.136
80	K	264.0	1.463	1.468	0.229	0.216	0.182	0.103
81	K	293.0	1.567	1.561	0.221	0.177	0.147	0.163
82	K	293.0	1.372	1.421	0.221	0.231	0.148	0.146
83	K	278.0	1.596	1.642	0.184	0.258	0.118	0.136
84	K	290.0	1.505	1.400	0.228	0.221	0.158	0.158
85	T	307.0	1.911	1.849	0.190	0.227	0.133	0.156
86	T	243.0	1.470	1.502	0.190	0.172	0.117	0.091
87	T	286.0	1.443	1.475	0.169	0.178	0.139	0.154
88	T	301.0	1.504	1.584	0.194	0.193	0.103	0.150
89	T	301.0	1.411	1.422	0.182	0.209	0.182	0.188
90	T	301.0	1.536	1.573	0.246	0.273	0.193	0.171
91	T	279.0	1.434	1.449	0.256	0.226	0.130	0.106
92	T	236.0	1.320	1.331	0.219	0.204	0.125	0.113
93	T	240.0	1.362	1.369	0.203	0.193	0.117	0.117
94	T	218.0	1.339	1.357	0.180	0.179	0.098	0.096
95	T	270.0	1.354	1.333	0.173	0.133	0.144	0.147
96	T	300.0	1.752	1.797	0.192	0.212	0.129	0.154
97	T	289.0	1.641	1.622	0.270	0.252	0.168	0.122
98	T	280.0	1.729	1.770	0.235	0.216	0.132	0.125
99	T	203.0	1.347	1.386	0.172	0.161	0.118	0.127
100	T	226.0	1.342	1.414	0.213	0.202	0.106	0.112
101	T	308.0	1.571	1.543	0.208	0.197	0.173	0.176

Untersuchungstag 130

Obs	Gr	KG	Rhoden	Lhoden	Rsamen	Lsamen	Rprost	Lprost
102	K	328.0	1.516	1.525	0.220	0.242	0.171	0.156
103	K	347.0	1.591	1.621	0.265	0.272	0.167	0.170
104	K	340.0	1.570	1.562	0.267	0.221	0.195	0.197
105	K	302.0	1.704	1.710	0.261	0.276	0.147	0.165
106	K	268.0	1.549	1.638	0.310	0.290	0.218	0.237
107	K	335.0	1.551	1.597	0.250	0.227	0.197	0.199
108	K	291.0	1.614	1.635	0.240	0.237	0.265	0.200
109	K	371.0	1.680	1.743	0.286	0.243	0.174	0.188
110	K	358.0	1.726	1.705	0.277	0.280	0.185	0.190
111	K	355.0	1.842	1.839	0.228	0.200	0.183	0.189
112	K	365.0	1.788	1.840	0.340	0.348	0.110	0.113
113	K	325.0	1.530	1.561	0.275	0.286	0.131	0.134
114	K	317.0	1.716	1.764	0.280	0.253	0.123	0.135
115	K	331.0	1.562	1.613	0.178	0.176	0.160	0.173
116	K	332.0	1.466	1.496	0.265	0.248	0.114	0.177
117	K	308.0	1.538	1.485	0.230	0.220	0.155	0.151
118	K	371.0	1.737	1.763	0.262	0.269	0.110	0.079
119	S	291.0	1.294	1.341	0.229	0.223	0.186	0.172
120	S	321.0	1.741	1.742	0.277	0.284	0.164	0.141
121	S	350.0	1.625	1.694	0.288	0.273	0.132	0.118
122	S	309.0	1.524	1.480	0.213	0.212	0.129	0.123
123	S	387.0	1.669	1.764	0.295	0.281	0.158	0.291
124	S	343.0	1.559	1.569	0.276	0.293	0.160	0.170
125	S	341.0	1.454	1.538	0.278	0.265	0.206	0.168
126	S	358.0	1.457	1.538	0.264	0.288	0.183	0.177
127	S	329.0	1.759	1.727	0.256	0.270	0.187	0.174
128	S	338.0	1.678	1.816	0.259	0.254	0.207	0.147
129	S	343.0	1.521	1.563	0.241	0.214	0.149	0.129
130	S	414.0	1.707	1.728	0.300	0.306	0.239	0.201
131	S	361.0	1.721	1.676	0.312	0.292	0.191	0.202
132	S	347.0	1.402	1.560	0.336	0.325	0.259	0.227
133	S	363.0	1.662	1.606	0.311	0.323	0.283	0.176
134	S	340.0	1.634	1.566	0.244	0.277	0.189	0.136
135	S	313.0	1.520	1.551	0.237	0.237	0.135	0.154
136	T	419.0	2.063	2.033	0.262	0.271	0.254	0.245
137	T	339.0	1.909	1.916	0.273	0.264	0.157	0.133
138	T	380.0	1.756	1.797	0.289	0.313	0.178	0.212
139	T	266.0	1.290	1.374	0.158	0.231	0.128	0.130
140	T	354.0	1.821	1.720	0.295	0.306	0.197	0.206
141	T	294.0	1.682	1.670	0.264	0.264	0.178	0.173
142	T	316.0	1.467	1.497	0.283	0.297	0.211	0.191
143	T	303.0	1.484	1.460	0.280	0.254	0.142	0.215
144	T	326.0	1.587	1.627	0.247	0.268	0.160	0.120
145	T	296.0	1.472	1.523	0.240	0.239	0.173	0.127
146	T	388.0	1.742	1.677	0.259	0.240	0.147	0.166
147	T	345.0	1.604	1.685	0.300	0.319	0.163	0.113
148	T	312.0	1.484	1.537	0.264	0.274	0.173	0.162
149	T	306.0	1.562	1.553	0.247	0.233	0.135	0.152
150	T	327.0	1.493	1.471	0.249	0.239	0.173	0.121
151	T	355.0	1.547	1.523	0.233	0.210	0.130	0.160
152	T	290.0	1.546	1.571	0.240	0.259	0.134	0.129

Ergebnisdatensatz der Spermatidenzahlen

OBS	GR	TAG	RSPER	LSPER	OBS	GR	TAG	RSPER	LSPER
1	K	65	1385.10	1309.71	52	S	65	954.80	529.46
2	K	65	1082.59	1472.51	53	S	65	762.79	1115.70
3	K	65	1417.23	983.55	54	S	65	683.12	707.34
4	K	65	.	1256.86	55	S	65	589.58	627.46
5	K	65	1512.02	.	56	S	65	947.98	1065.64
6	K	65	1391.10	1628.72	57	S	65	647.75	665.51
7	K	65	1371.53	1289.55	58	S	65	730.30	831.53
8	K	65	1328.57	1362.74	59	S	65	533.59	1161.59
9	K	65	678.25	913.19	60	S	65	1020.43	1106.95
10	K	65	1165.79	1372.41	61	S	65	.	.
11	K	65	1434.09	1512.51	62	S	65	1017.95	1224.87
12	K	65	1489.12	1536.35	63	S	65	804.42	1009.79
13	K	65	1008.68	1455.01	64	S	65	1060.52	1112.98
14	K	65	1265.26	.	65	S	65	840.25	1137.88
15	K	65	.	1411.82	66	S	65	789.21	1041.48
16	K	65	1295.54	1683.56	67	S	65	894.89	1133.56
17	K	65	1319.07	1374.59					
18	K	100	2192.83	1771.75	68	S	100	1496.93	1755.94
19	K	100	1982.04	2233.16	69	S	100	2292.88	2117.43
20	K	100	.	2331.93	70	S	100	1452.80	.
21	K	100	2343.73	2367.56	71	S	100	1854.15	1715.95
22	K	100	2029.50	.	72	S	100	.	1810.73
23	K	100	1938.82	2170.61	73	S	100	2099.27	2086.07
24	K	100	1901.58	1828.00	74	S	100	2273.36	2054.67
25	K	100	2300.25	1495.72	75	S	100	2287.69	2334.80
26	K	100	1884.42	1808.22	76	S	100	2099.33	2196.33
27	K	100	2315.90	2190.65	77	S	100	2331.29	2296.92
28	K	100	1866.33	1831.79	78	S	100	1854.96	2051.30
29	K	100	2005.32	.	79	S	100	2447.81	2802.47
30	K	100	2318.28	1746.81	80	S	100	.	2195.37
31	K	100	2102.42	2093.93	81	S	100	2663.20	.
32	K	100	.	2105.12	82	S	100	2207.04	2105.69
33	K	100	1937.00	1959.58	83	S	100	2211.40	2012.08
34	K	100	2289.96	2152.32	84	S	100	2787.06	2388.79
35	K	130	2373.22	.	85	S	130	2168.45	1996.02
36	K	130	2240.31	2543.60	86	S	130	1856.02	.
37	K	130	2139.99	2323.50	87	S	130	2112.96	2282.67
38	K	130	2539.30	2001.00	88	S	130	.	2182.12
39	K	130	2298.71	2107.87	89	S	130	2471.96	2070.46
40	K	130	2314.03	.	90	S	130	2285.91	1969.51
41	K	130	2519.77	2487.10	91	S	130	2074.55	2156.22
42	K	130	.	2562.79	92	S	130	1246.52	1964.23
43	K	130	2424.00	2367.22	93	S	130	2235.15	2251.58
44	K	130	2501.03	2523.13	94	S	130	2324.39	.
45	K	130	.	2637.00	95	S	130	2175.16	1761.28
46	K	130	2294.93	2175.32	96	S	130	2142.85	2169.21
47	K	130	2252.93	1822.01	97	S	130	.	2510.81
48	K	130	2345.70	2497.26	98	S	130	2050.54	1990.17
49	K	130	2304.21	2508.89	99	S	130	2089.83	2109.51
50	K	130	2481.13	2352.13	100	S	130	2151.82	1828.35
51	K	130	2463.83	2424.12	101	S	130	2042.27	1833.37

OBS	GR	TAG	RSPER	LSPER
102	T	65	1364.67	1571.15
103	T	65	1373.68	.
104	T	65	1129.03	1005.91
105	T	65	1293.70	1486.03
106	T	65	1229.00	.
107	T	65	1577.78	1499.98
108	T	65	1443.33	1475.21
109	T	65	2066.28	1368.60
110	T	65	.	1109.18
111	T	65	675.75	476.35
112	T	65	907.88	.
113	T	65	1509.44	1789.87
114	T	65	1544.78	1495.07
115	T	65	1300.07	1548.61
116	T	65	1641.66	1953.67
117	T	65	1427.37	1405.00
118	T	65	1416.46	1160.64
119	T	100	2142.07	1979.26
120	T	100	.	2061.16
121	T	100	1926.09	1858.03
122	T	100	.	1972.06
123	T	100	1745.43	1761.73
124	T	100	2192.76	2133.14
125	T	100	1683.08	1868.48
126	T	100	1608.35	1609.91
127	T	100	1679.76	1804.49
128	T	100	1531.22	.
129	T	100	1591.38	1515.90
130	T	100	2128.52	2249.92
131	T	100	1735.91	1919.02
132	T	100	2131.86	.
133	T	100	1793.73	1457.41
134	T	100	1647.77	1402.55
135	T	100	1503.30	1558.77
136	T	130	2555.43	2271.83
137	T	130	2332.26	.
138	T	130	2362.49	2181.97
139	T	130	1950.91	1943.59
140	T	130	.	2295.24
141	T	130	2362.57	2636.49
142	T	130	2847.49	2001.40
143	T	130	2057.93	2259.00
144	T	130	2083.81	2061.23
145	T	130	.	2146.04
146	T	130	2216.89	2406.40
147	T	130	2101.72	.
148	T	130	2102.03	1779.47
149	T	130	2182.91	2195.99
150	T	130	1816.81	1754.60
151	T	130	2416.56	2190.29
152	T	130	2135.55	2303.09

Ergebnisdatensatz der Spermienmorphologie

OBS	GR	TAG	KOPF	SCHWANZ	SCHWANZVER	KOPFVER
1	K	60	3	5	0	5
2	K	60	2	6	0	5
3	K	60	1	7	1	5
4	K	60	3	5	0	6
5	K	60	0	2	4	4
6	K	60	2	2	0	2
7	K	60	0	8	1	4
8	K	60	3	2	1	6
9	K	60	0	5	1	3
10	K	60	6	3	1	6
11	K	60	1	2	1	5
12	K	60	0	0	0	3
13	K	60	1	1	2	4
14	K	60	2	0	1	1
15	K	60	2	2	2	3
16	K	60	1	7	0	8
17	K	60	7	9	0	4
18	K	100	1	3	0	1
19	K	100	3	2	1	2
20	K	100	4	1	0	6
21	K	100	4	1	2	5
22	K	100	3	0	3	1
23	K	100	0	0	2	3
24	K	100	1	3	1	2
25	K	100	2	2	0	3
26	K	100	2	2	1	0
27	K	100	2	2	0	1
28	K	100	2	2	1	2
29	K	100	2	1	2	2
30	K	100	2	1	1	2
31	K	100	1	1	3	1
32	K	100	1	2	1	5
33	K	100	4	2	2	2
34	K	100	2	3	1	3
35	K	130	1	2	2	1
36	K	130	3	3	4	1
37	K	130	2	3	0	5
38	K	130	2	1	2	2
39	K	130	1	4	0	3
40	K	130	2	1	2	1
41	K	130	1	2	1	2
42	K	130	2	1	0	1
43	K	130	1	3	1	3
44	K	130	1	1	0	4
45	K	130	3	3	1	2
46	K	130	0	0	0	5
47	K	130	3	1	0	5
48	K	130	2	0	0	4
49	K	130	4	4	3	3
50	K	130	0	2	0	3
51	K	130	2	2	1	3

OBS	GR	TAG	KOPF	SCHWANZ	SCHWANZVER	KOPFVER
52	S	60	3	9	1	5
53	S	60	5	7	2	8
54	S	60	5	13	3	2
55	S	60	7	14	3	16
56	S	60	5	21	3	21
57	S	60	3	3	1	9
58	S	60	4	16	4	9
59	S	60	3	2	2	5
60	S	60	5	5	3	10
61	S	60	7	9	1	8
62	S	60	3	4	1	7
63	S	60	7	4	2	8
64	S	60	2	6	2	4
65	S	60	3	0	1	4
66	S	60	1	2	1	7
67	S	60	7	16	4	6
68	S	100	1	2	2	2
69	S	100	5	0	0	4
70	S	100	7	2	2	7
71	S	100	0	3	2	2
72	S	100	2	4	2	4
73	S	100	3	1	3	6
74	S	100	0	7	3	6
75	S	100	6	5	4	5
76	S	100	4	0	2	5
77	S	100	6	3	4	5
78	S	100	3	2	1	1
79	S	100	2	1	4	2
80	S	100	2	3	3	4
81	S	100	2	0	0	2
82	S	100	7	1	4	6
83	S	100	5	3	2	4
84	S	100	8	0	1	7
85	S	130	2	5	2	4
86	S	130	1	1	0	3
87	S	130	4	2	1	3
88	S	130	4	6	2	2
89	S	130	3	3	2	1
90	S	130	1	0	2	1
91	S	130	3	1	0	3
92	S	130	0	9	1	7
93	S	130	4	6	3	2
94	S	130	2	4	2	4
95	S	130	1	2	1	5
96	S	130	1	4	4	4
97	S	130	2	4	3	5
98	S	130	4	0	0	2
99	S	130	3	0	2	2
100	S	130	0	0	0	5
101	S	130	1	2	2	7

OBS	GR	TAG	KOPF	SCHWANZ	SCHWANZVER:	KOPFVER
102	T	60	6	10	0	12
103	T	60	0	2	3	7
104	T	60
105	T	60
106	T	60	2	8	4	5
107	T	60	1	7	2	4
108	T	60	4	6	1	3
109	T	60	5	4	1	3
110	T	60	6	4	2	9
111	T	60	7	3	0	4
112	T	60	1	4	2	8
113	T	60	4	4	5	9
114	T	60	1	4	2	5
115	T	60	2	6	2	9
116	T	60	2	5	2	4
117	T	60	2	3	2	4
118	T	60	0	6	3	4
119	T	100	1	4	0	2
120	T	100	2	0	1	4
121	T	100	1	0	2	2
122	T	100	1	5	1	2
123	T	100	1	5	1	5
124	T	100	5	3	1	3
125	T	100	2	0	2	2
126	T	100	1	5	5	6
127	T	100	2	7	1	4
128	T	100	1	2	2	3
129	T	100	4	2	2	3
130	T	100	1	1	2	5
131	T	100	2	4	2	1
132	T	100	2	3	3	3
133	T	100	3	2	1	4
134	T	100	1	0	5	3
135	T	100	0	2	0	4
136	T	130	2	7	1	5
137	T	130	2	7	2	5
138	T	130	3	5	3	4
139	T	130	3	6	1	7
140	T	130	4	2	1	4
141	T	130	2	3	2	0
142	T	130	4	6	3	1
143	T	130	1	3	2	4
144	T	130	6	5	1	9
145	T	130	1	6	4	6
146	T	130	3	1	1	3
147	T	130	1	4	2	4
148	T	130	2	1	2	0
149	T	130	4	9	2	9
150	T	130	1	4	2	6
151	T	130	2	5	0	3
152	T	130	1	4	2	2

7.3 Verzeichnis der aufgeführten Literaturstellen

Amann, R.P.: Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam Appl Toxicol* 2 (1982) 13-26.

Auger, J., J.M. Kunstmann, F. Czyglik, P. Jouannet: Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332 (1995) 281-285.

Basinger, G. T., R. F. Gittes: Antiandrogenic effect of spironolactone in rats. *J Urol* 111 (1974) 77-80.

Brake A., W. Krause: Decreasing quality of semen. *BJM* 305 (1992) 1498.

Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keidin, N. E. Skakkebaek: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305 (1992) 609-613.

Coffigny, H., A. Thoreuy-Manlay, G. Pinon-Lataillade, G. Monchaux, R. Masse, J. C. Soufir: Effects of lead poisoning of rats during pregnancy on the reproductive system and fertility of their offspring. *Hum Exp Toxicol* 13 (1994) 241-246.

Cox,D.R.: Partial likelihood. *Biometrika* 62 (1975) 269-276.

Cox,D.R.: Regression models and life-tables. *J. Roy Stat Soc, Series B*, 34 (1972) 187-220.

Dessens, A.B., K. Boer, J. G. Koppe, N. E. von de Poll, P. T. Cohen-Kettenis: Studies on long-lasting consequences of prenatal exposure to anticonvulsant drugs. *Acta Paediatr Suppl* 404 (1994) 54-64.

Field, B., M. Selub, C.L. Hughes: Reproductive effects of environmental agents. *Semin Reprod Endocrinol* 8 (1990) 44-54.

Flowers, N. L., J. P. O'Donnell, H.D. Colby: Spironolactone metabolism in target tissues. Characteristics of deacetylation in kidney, liver, adrenal cortex, and testes. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 17(2) (1989) 186-18.

George, F. W., K. G. Peterson: 5alpha-Dihydrotestosterone formation is necessary for embryogenesis of the rat prostat. *Endocrinology* 122 (1988) 1159-1164.

Goldstein, J. L., J. D. Wilson: Studies on the pathogenesis of the pseudohermaphroditism in the mouse with testicular feminisation. *J Clin Invest* 51 (1972) 1647-1658.

Gray, L.E. Jr; W. R. Kelce, E. Monosson, J. S. Ostby, L. S. Birnbaum: Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 131 (1995) 108-118.

Green, E.C.:Anatomy of the Rat, Hafner Publishing Company. New York and London 1968.

Greenblatt, D.J., J. Koch-Weser: Adverse reactions to spironolactone: A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *J Am Med Assoc* 225 (1973) 40-43.

Greiner, J. W., R. E. Kramer, J. Jarrell, H. D. Colby: Mechanism of action of spironolactone on adrenocortical function in guinea pigs. *J Pharmac Exp Ther* 198 (1976) 709-715.

Gupta, C., B. H. Shapiro, S. J. Yaffe: Reproductive dysfunction in male rats following prenatal exposure to phenobarbital. *Alan R. Liss Inc.* 1980.

Haider, S.: Leydigzellen *Thieme, Stuttgart* 1988.

Hecker, A., S. H. Hasan, F. Neumann: Disturbances in sexual differentiation of rat foetuses following spironolactone treatment. *Acta Endocrinol* 95 (1980): 540-545.

Imperato-McGinley, J., Z. Binienda, J. Gedney, E. D. Vaughan: Nipple differentiation in fetal male rats treated with an inhibitor of the enzyme 5alpha-reductase: definition of a selective role for dihydrotestosterone. *Endocrinology* 118(1986) 132-137.

Jockhövel, F.: Hypogonadismus und Infertilität als Folge von allgemeinen Erkrankungen und Toxinen. *Internist* 34 (1993) 741-755.

Koushanpour, E: Renal Physiology: Principles and Function Philadelphia. *W.B. Saunders Co.* 1976 356.

Lamb, J. C., P. M. D. Foster: Physiology and Toxicology of Male Reproduction, Academic Press Inc. San Diego 1988.

Leblond, C.P.,Y. Clermont: Spermiogeneses of the rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique. *Am J Anat* 90 (1952) 167-215.

Liang, T., C. E. Heiss, J. R. Brooks: Biochemical and biological studies with 4-aza steroidal 5 alpha-reductase inhibitors. *J Steroid Biochem* 19 (1983) 385-390.

- Mantero, F., D. Armanini, S. Urbani: Antihypertensive effect of spironolactone in essential, renal and mineralocorticoid hypertension. *Clin Sci Mol Med* 45 suppl.1 (1973) 219S-224S.
- Menard, R. H., B. Stripp, J. R. Gillette: Spironolactone and testicular cytochrome P-450: decreased testosterone formation in several species and changes in hepatic drug metabolism. *Endocrinology* 94 (1974) 1628-1636.
- Menard, R. H., D. L. Loriaux, F. C. Bartter, J. R. Gillette: The effect of administration of spironolactone on the concentration of plasma testosterone, estradiol, and cortisol in male dogs. *Steroids* 31 (1978) 771-782.
- Moore, H.: Embryologie, Schattauer. Stuttgart New York 1985.
- Nicholls, M. G., L. E. Ramsay, K. Boddy, R. Fraser, J. J. Morton, J. I. S. Robertson: Mineralocorticoid-induced blood-pressure, electrolyte, and hormone changes, and reversal with spironolactone in healthy men. *Metabolism* 28 (1979) 584-593.
- Nieschlag, E., P. C. Scriba: Hypogonadismus und Infertilität des Mannes. *Internist* 34 (1993) 699-702.
- Nomura, T., J. Weisz, C. W. Lloyd: In vitro conversion of 7-3H-progesterone to androgens by the rat testis during the second half of fetal life. *Endocrinologie* 78 (1966) 245-253.
- Porter, G.A.: In vitro inhibition of aldosterone-stimulated sodium transport by steroidal spironolactones. *Mol Pharmacol* 4 (1968) 224.
- Rune, G.M., W. Heger: Histochemical localization of 3 β hydroxysteroid dehydrogenase with special reference to substrate specificity. *Histochemistry* 86 (1987) 621-625.
- Russell, L.D., R.A. Ettlin, A.P. Sinha Hikim, E.D. Clegg: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press. Clearwater 1990.
- Saunders, F. J., R. L. Alberti: Aldactone: Spironolactone: A Comprehensive Review, Searle, Inc., New York (1978).
- Sharpe, R.M., K. Donachie, I. Cooper: Re-evaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. *J Endocrinol* 117 (1988) 19-26.

Sharpe, R. M.: Endocrinology and Paracrinology of the testis. In: Physiology and toxicology of male reproduction, eds. Lamb IV, J.C., P. M. D. Foster, Academic Press 1988

Sharpe, R. M., N. E. Skakkebaek: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 (1993) 1392-1395.

Sherins R.J.: Clinical aspects of treatment of male infertility with gonadotropins: testicular response of some men given hCG with and without pergonal. In Mancini R.E., L Martini eds. Male fertility and sterility. Proceedings of the Sero Symposium. Vol. 5. London: Academic Press, 1974 : 545-565

Sitteri, P. K., P. Brenner, P. C. MacDonald: Mechanism of spironolactone induced gynecomastia. *56th Annual Meeting of the Endocrine Society Abstract No. 187* (1974).

Stillmann, R. J.: In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring. *Am J Obstet Gynecol* 142 (1982) 905-921.

Stripp, B., A. A. Taylor, F. C. Bartter, J. R. Gillette, D. L. Loriaux, R. Easley, R. H. Menard: Effect of spironolactone on sex hormones in man. *J Clin Endocrinol Metab* 41 (1975) 777-781.

Sussman, R. M.: Spironolactone and gynecomastia. *Lancet* 1 (1963) 58.

Verdeal, K., D. S. Ryan: Naturally-occurring oestrogens in plant foodstuffs - a review. *J Food Protect* 7 (1979) 577-583.

Warren, D. W., G. C. Haltmeyer, K. B. Eik-Nes: Testosterone in the fetal rat testis. *Biol Reprod* 8 (1973) 560-565.

Wilson J. D.: Sexual differentiation. *Ann Rev Physiology* 40 (1978) 279-306.

Danksagung

Mein Dank gilt Priv. Doz. Dr. Ibrahim Chahoud für die Überlassung des Themas.

Frau Prof. Dr. Fink danke ich sehr herzlich für die Vertretung am Fachbereich.

Für seine freundlichen Ratschläge danke ich Herrn Prof. Dr. Berg herzlich.

Für die freundliche Unterstützung der Enzymhistochemischen Analyse möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Rune und Mitarbeitern sehr herzlich bedanken.

Frau Dr. Gerstmayer und Frau Gerike möchte ich herzlich für die geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Meine Familie mußte nicht nur sehr viel Geduld aufbringen, hierfür herzlichen Dank.

Abschließend möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, ohne deren Hilfe diese Arbeit jedoch nicht zustande gekommen wäre.

7.3 Lebenslauf

Name: Wittchen geb. Dreyer
Vorname: Silke
Geburtsdatum: 24.09.1966
Geburtsort: Remscheid
Familienstand: verheiratet
Kinder: Lucas * 11.08.1994, Lena * 01.08.1997

Schulischer Werdegang: Tätigkeit/Abschluß:

August 1973 - Juni 1977:	Grundschule Am Stadtpark in Remscheid	
August 1977 - Juni 1983:	Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium, Remscheid	
August 1983 - Juni 1984:	Carsonville - Port Sanilac - High Schools, USA	Diploma
August 1984 - Juni 1986	Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium, Remscheid	Abitur

Beruflicher Werdegang:

Oktober 1986 - Juli 1992	Freie Universität Berlin	Tierärztin
April 1989 - März 1992	Veterinär-Physiologie der FU Berlin	Tutorin
seit 1992	diverse Praxen	Mitarbeit und Vertretungen
ebenfalls 1992	Beginn der Dissertation	