

Kliniken/Institute:

Kinderheilkunde

Claudia Walz

Dr. med.

Gonadotropinsekretion bei Urämie: Zellkulturmodelle aus immortalisierten Hypophysenvorderlappen

Geboren am 23.03.1966 in Konstanz

Reifeprüfung am 20.06.1986 in Konstanz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis SS 1999

Physikum am 15.03.1994 an der Universität Gießen

Klinisches Studium in Gießen und Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 19.5.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: nephrologische Pädiatrie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Franz Schäfer

Verschiedene vorangegangene Versuche haben gezeigt, daß der urämisch bedingte Hypogonadismus durch eine neuroendokrine Störung des hypothalamo-hypophysär-gonadotropen Systems verursacht wird.

In dieser Arbeit haben wir uns auf den Einfluss der urämischen Metabolite auf die hypophysäre Ebene beschränkt. Es wurden in vitro Versuche mit zwei verschiedenen Zellkulturmodellen durchgeführt. Ziel war es, mit Hilfe der Zellkulturmodelle, den Einfluss urämischer Metabolite auf die LH-Freisetzung in vivo zu evaluieren.

Es wurden Versuche sowohl mit α T3-1 Zellen als auch mit L β T-2 Zellen durchgeführt. Zur semiquantitativen Bestimmung der α LH-Sekretionsleistung bei den α T3-1 Zellen wurde speziell dafür ein Revers Hämolytic Plaque Assay (RHPA) etabliert, da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung für die α -Untereinheit des Lutenisierenden Hormons (LH) kein passender Radioimmunassay (RIA) verfügbar war.

Sowohl die Validierungsversuche mit verschiedenen α LH-Antikörperkonzentrationen, als auch die mit verschiedenen α LH-Antigenkonzentrationen zeigten, daß das Ausmaß der Hä-

molyse direkt mit der Anzahl der ausgebildeten Immunkomplexe korreliert. Letztere wiederum sind abhängig von der α LH-Konzentration und der α LH-Antikörpermenge. Das α LH fungiert dabei als Antigen. Damit war es gelungen, einen RHPA zu etablieren, mit dem es möglich gewesen wäre, semiquantitative Unterschiede in der Hormonsekretionsleistung von Zellen unter verschiedenen Bedingungen nachzuweisen.

Leider zeigte sich, daß die α T3-1 Zellen trotz der GnRH-Stimulation nicht in der Lage waren die α -Untereinheit des Lutenisierenden Hormons (α LH) zu sezernieren, so daß die α T3-1-Zellen für diese Versuche ungeeignet waren. Wie parallel durchgeführte Versuche zeigten, waren die α T3-1 Zellen nicht ausreichend entwickelt, um das Lutenisierende Hormon zu bilden bzw. freizusetzen.

Die weiteren Versuche wurden daher mit L β T-2 Zellen durchgeführt, die während der Experimente entwickelt wurden, und für die auch ein geeigneter RIA zur Bestimmung der LH-Sekretion verfügbar war. Die L β T-2 Zellen sind in der Lage, nach GnRH-Stimulation, beide LH Untereinheiten (α und β) zu sezernieren. Somit war ein geeignetes Zellkulturmodell gefunden, um physiologische und pathophysiologische Einflüsse auf das hypothalamo-hypophysäre-gonadale System zu untersuchen. Ziel war es, die mögliche Einflussnahme der urämisch-toxischen Metaboliten auf die Freisetzung von LH zu evaluieren. Mit Hilfe des RIA wurde unter nicht urämischen und urämischen Bedingungen die LH-Sekretion der L β T-2 Zellen gemessen. Zunächst wurde die basale LH-Sekretionsrate über 24 Stunden unter urämischen und nicht-urämischen Bedingungen bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, die in nicht urämischem Medium im Vergleich zu den Zellen, die in urämischem Medium gewachsen waren, festgestellt werden (Kontrolle 86.1 ± 14.3 versus Urämie 84.1 ± 6.3 g/ml/24h). Ebenfalls war die intrazellulär gemessene LH-Konzentration, nach Lyse der Zellen, unter urämischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle 235 ± 26 ng/ml Zelllysate versus Urämie 243 ± 27 ng/ml/24h) nicht signifikant verändert. Anschließend wurden die L β T-2 Zellen mit verschiedenen GnRH Konzentrationen (10^{-12} bis 10^{-6}) stimuliert und nach entsprechenden Zeitintervallen die LH Konzentration gemessen (GnRH-Dosis-Wirkungskurve). In beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß die urämisch-toxischen Metaboliten keinen Einfluss auf die Freisetzung des Lutenisierenden Hormons aus den L β T-2 Zellen haben.

In parallel durchgeführten Sekretionsversuchen mit den GT1-7-Zellen wurde gezeigt, daß unter urämischen Bedingungen die extrazelluläre GnRH-Konzentration vermindert war ($19,3 \pm 4,5\%$ und $31 \pm 6,9\%$ im Vergleich zur Kontrolle nach 1 und 24 Stunden, Mittel-

wert \pm Standardabweichung, $p < 0,01$). Während die intrazelluläre GnRH-Menge innerhalb 24 Stunden um 12% anstieg ($p = 0,02$). Damit war gezeigt, daß die urämischen Metaboliten keinen generell unspezifischen zytotoxischen Effekt haben, sondern vielmehr einen spezifischen Effekt auf die GT1-7 Zellen.

Apoptose- und Vitalitätsversuche zeigten, daß die urämisch-toxischen Metaboliten keinen signifikanten Einfluss auf die oder Viabilität der L β T-2 und der GT1-7 Zellen haben.

Dies bedeutet, daß die Hypoaktivität des hypothalamo-hypophysären Systems nicht auf einer Hemmung der hypophysären Ebene (L β T-2 Zellen), sondern eher auf der spezifischen Inhibition der hypothalamischen Ebene (GT1-7 Zellen) beruht.