
7 Zusammenfassung

Die Zielstellung der Arbeit war die Entwicklung eines *ex vitro*-Modells, mit dem die Wirkung von verschiedenen Östradiol- und Progesteronkonzentrationen auf den isolierten Uterus der Maus untersucht werden sollte. Es wurden 45 Uteri von Mäusen im Zyklusstadium des Östrus mit beiden Hormonen in verschiedenen Konzentrationen superfundiert. Die Ermittlung des Zyklusstadiums erfolgte über einen vaginalen Abstrich.

Die fraktionierte Sammlung der Superfusate verlief in den ersten 60 Minuten in fünf Minuten-Abständen, in den letzten 30 min in Fraktionen zu jeweils zehn Minuten. Anschließend wurde in den Superfusaten die Proteinkonzentration bestimmt und mittels SDS-PAGE das Proteinmuster ermittelt. Zwei auffällige Proteinbanden konnten über MALDI-TOF als Maus-Serumalbumin und Laktoferrin analysiert werden. In den behandelten Uteri mit hoch und niedrig dosierten sowie physiologischen Hormonkonzentrationen wurde das Verteilungsmuster der Progesteronrezeptoren (PRs) in den einzelnen Geweben immunhistologisch ermittelt. Weiterhin wurde das Enzym CytochromP26 (CYP26) durch *in situ*-Hybridisierung bestimmt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Die Proteinkonzentration ändert sich in Abhängigkeit vom Hormon und dessen Konzentration. Östradiol stimuliert die Freisetzung der Proteine bei allen Konzentrationen. Die physiologische Konzentration hat den geringsten Einfluß. Alle anderen Östradiolkonzentrationen steigern die Proteinmenge signifikant. Die Zunahme der Proteinmenge erfolgt ab der 70. Minute vermehrt.

Bei Progesteron führen nur hoch dosierte Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinkonzentration. Physiologische und niedrig dosierte Progesteronlösungen haben keinen anregenden Effekt auf die Proteinfreisetzung. Die Proteine werden unter Progesteron annähernd gleichmäßig freigesetzt.

Die unbehandelte Uteruspülung hat das qualitativ vielfältigste Proteinmuster.

Bei Östradiol wird in den 90 Behandlungsminuten Maus-Serumalbumin und teilweise Laktoferrin verschieden stark freigesetzt. Progesteron steigert nur die Maus-Serumalbumin-Konzentration.

Maus-Serumalbumin ist wahrscheinlich für den biphasischen Verlauf der Proteinkonzentration verantwortlich, da es in den elektrophoretischen Fraktionen

unterschiedlich stark auftritt. Vermutlich steigt die Menge des Albumins im Superfusat durch eine erhöhte Permeabilität der Gefäße.

Laktoferrin ist ein uteruspezifisches Protein und kommt in den unbehandelten Uterusspülungen vor. Nur bei der 100-fach über der physiologischen dosierten Östradiolkonzentration ist es zusätzlich elektrophoretisch in der 10-Minuten-Fraktion nachweisbar.

Die Expression der PRs ist gewebe-, hormon und konzentrationsabhängig. Im Epithel des Endometriums sind bei keiner Hormongabe PRs nachweisbar. Bei den Drüsen bewirken steigende Östradiolkonzentrationen eine Zunahme der PR-Menge. Mit Progesteron führen sehr niedrige und sehr hoch dosierte Konzentrationen zu einer geringen Steigerung der PRs in den Drüsen. Die physiologische Konzentration bewirkt die stärkste Zunahme. Steigende Östradiolkonzentrationen haben eine steigende PR-Expression im Stroma endometrii zur Folge. Mit Progesteron kommt es im Stroma zu einer Steigerung der PRs unabhängig von der Konzentration. Im Myometrium sind die stärksten Effekte sichtbar. Die hoch dosierte und physiologische Östradiolkonzentration hat einen stark positiven Einfluß auf die PR-Expression. Bei sinkender Progesteronkonzentration sinkt auch die Expression des PR.

Innerhalb von 90 Minuten ist unter exogener Zugabe von Östradiol oder Progesteron kein CYP26 durch *in situ*-Hybridisierung nachweisbar.

Anhand der ermittelten Ergebnisse ist festzustellen, daß die Superfusion ein gutes *ex vitro*-Modell darstellt, um die Wirkungen löslicher Substanzen zu untersuchen. Durch den direkten Kontakt des Wirkstoffes mit dem Gewebe treten verschiedene Effekte schneller ein. Außerdem wird die Umwandlung bzw. der Abbau der Wirksubstanz vermindert oder vollständig verhindert.

7.1 Summary

Uterus Superfusion – A Model for the Assessment of Local Steroidal Effects

115 p., 27 fig., 7 tab., 165 ref.

The aim of this study was the development of an *ex - vitro* model for the investigation of the effects of various estradiol and progesterone concentrations on the isolated uterus of the mouse. 45 uteri of estrous mice were superfused with or without the hormones after the stage of estrous cycle had been determined by vaginal smear. The eluate was collected in 5-minute fractions for 60 minutes and in 10-minute fractions for another 30 minutes, respectively. The protein concentration of the fractions was determined, and the protein pattern was characterised by SDS-PAGE. Two striking protein bands appearing upon superfusion with the hormones could be analysed by MALDI-TOF. The pattern of progesterone- receptor (PR) distribution in the tissue was shown immunohistochemically after treatment of the uteri with physiological, overdosed and underdosed hormone concentrations, respectively. CytochromeP26 (CYP26) was determined by *in-situ* hybridisation.

The following results were obtained:

The protein concentration changes dependent on the hormone and its concentration. Estradiol stimulates the release of proteins in all concentrations tested. The physiological concentration has the smallest influence. All other estradiol concentrations significantly increase the amount of protein in the superfusate compared to the control. The augmentation is more distinct from the 70th minute on. Progesterone leads to enhanced protein concentration only with overdosed concentrations. Physiological and underdosed concentrations, respectively, have no stimulating effect on the protein release by the superfused uteri

The first flushing shows the most varied protein pattern. Treatment with estradiol strongly increases the concentrations of mice serum albumin and lactoferrin partly within 90 minutes. Progesterone enhances mouse serum albumin only.

Mouse serum albumin seems to be responsible for the biphasic manifestation of the protein concentration. Very likely the amount of mouse serum albumin elevates due to an increased permeability of blood vessels.

Lactoferrin is a uterus specific protein and is present in the first flushing. It can be electrophoretically detected only in the 10- minute fraction of the treatment with the highest estradiol concentration.

The expression of PRs depends on tissue, hormone and hormone concentration. No PR can be detected with any treatment in epithelium of the endometrium. In glands, PR content increases with rising estradiol concentrations in the medium. Slight progesterone effects can be seen with highest dosed and lowest dosed concentrations. The physiologic concentration leads to the highest PR content in the tissue. In stroma, all estradiol concentrations cause an increase in PR amount, regardless of the concentration. The most striking effect can be observed in the myometrium. Physiological and high dosed estradiol concentrations have the strongest positive influence on PR expression.

No CYP26 could be found by *in - situ* hybridization within 90 minutes of exogenous addition of estradiol and progesterone, respectively

Taking all these results into consideration, we can conclude that the superfusion is a good *ex - vitro* model to investigate the effects of soluble substances on the organ. Because of the direct contact of the active substance with the surface of the tissue, the various effects are reached sooner. Furthermore, the transformation and disassembly of the active substance may be decreased or wholly prevented.