
2 Schrifttum

2.1 Uterus und Vagina bei der Maus

2.1.1 Anatomie

Uterus

Der Corpus uteri der Laboratoriumstiere Maus, Ratte, Hamster, Meerschwein und Kaninchen steht über die Cornua uteri mit den paarigen Eileitern strukturell und funktionell in Verbindung. Er wird durch die Cervix uteri von der Vagina getrennt, durch das Ligamentum latum uteri (Mesometrium) in seiner Lage fixiert und liegt fast vollständig in der Bauchhöhle. Die paarigen Cornua uteri vereinigen sich bei der Maus dorsal der Harnblase in Form eines Ypsilon um den Corpus uteri und die sich nach kaudal anschließende Cervix uteri zu bilden (Leppi, 1964; Cook, 1965). Im Inneren des Uteruskörpers befinden sich zwei, durch ein medianes Septum getrennte Kompartimente. Das Septum endet bei der Maus kranial der Zervix. Die Uterushörner haben eine Länge von ca. 10 – 12 mm, Uteruskörper und Zervix sind ca. 3 – 5 mm lang.

Vagina

Die Vagina stellt ein häutig-muskulöses, schlauchförmiges Organ dar, dessen Lumen, außer während des Deckaktes und der Austreibungsphase der Frucht zur Geburt, auf einen kapillaren Spaltraum verjüngt ist. Sie schließt sich bei der Maus direkt an die Vulva an. Eine Homologie zu den Labiae minores anderer Säugetiere gibt es nicht (Allen, 1922).

2.1.2 Histologie

Mikroskopisch-anatomisch gliedert sich die Wand des weiblichen Geschlechtssystems in eine

- Tunica mucosa (bestehend aus der Lamina epithelialis mucosae und der Lamina propria mucosae),
- Tunica muscularis und eine
- Tunica serosa (Liebich, 1993).

Uterus

Die **Tunica mucosa** besteht aus mesenchymalen und epithelialen Anteilen, die sich während des Zyklus verändern. Die Pars functionalis unterliegt den hormonell gesteuerten zyklischen Veränderungen, wohingegen die Pars basalis das Grundgewebe bildet, aus dem sich die Pars functionalis regenerieren kann (Hoffmeister und Schulz, 1961).

Das Endometrium setzt sich aus dem einschichtigen iso- bis hochprismatischen Epithel (Clauberg, 1931) und der Lamina propria mucosae (Stroma endometrialis) zusammen, die der Muskelschicht unmittelbar anliegen (Plapinger, 1982). Beide Schleimhautanteile unterliegen zyklusabhängigen Strukturveränderungen (Liebich, 1993). Die Lamina propria mucosae besteht aus spinozellulärem Bindegewebe und schließt eine große Anzahl tubulär verzweigter Uterindrüsen ein. Die zylindrischen Epithelzellen des Cavum uteri stimmen mit den Epithelzellen der Drüsen weitgehend überein, und können somit gemeinsam behandelt werden (Wetzstein und Wagner, 1960). Die Zellen wandeln sich während des Zyklus von embryonalen Zellen über ausgereifte, stark stoffwechselaktive Zellen, zu degenerierenden Zellen (Hoffmeister und Schulz, 1961).

Die **Tunica muscularis** setzt sich aus glatten Muskelfaserbündeln zusammen, die sich aus der Muskelschicht des Eileiters entwickeln und sich in die Wandschichten der Zervix fortsetzen. Zusätzlich zu den glatten Muskelfasern sind in den äußeren Schichten modifizierte Fibroblasten ausgebildet, die als kontraktile Myofibroblasten die glatten Muskelzellen unterstützen.

Das **Perimetrium** umgibt das Myometrium von außen. Eine Tunica serosa überzieht in Form eines einschichtigen Peritonealepithels außen das Organ. Die Tunica serosa wird von einer Tela subserosa und einer ausgeprägten glatten Muskelschicht unterlagert (Liebich, 1993).

Vagina

Die **Tunica mucosa** der Vagina ist bei der Maus drüsenlos (Allen, 1922) und verläuft in kleinen Längsfalten. Die Grundlage der Lamina propria ist ein kollagenfaserreiches Bindegewebe, in dem sich elastische Fasern befinden. Dieses Gewebe ist, abhängig vom Zyklusstadium, reich an Leukozyten, Lymphozyten und Plasmazellen.

Die **Tunica muscularis** besteht im Inneren aus einer zirkulär verlaufenden glatten Muskelschicht. Außen schließt eine Längsmuskelschicht an. Die Muskelzellen sind durch ein elastisches, kollagenes Fasernetz verbunden.

Im peritonealen Teil ist die Vagina von einer **Tunica serosa**, im retroperitonealen Bereich von einer **Tunica adventitia** überzogen (Liebich, 1993).

Das vaginale Epithel teilt sich in das Stratum germinativum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum (Yuan und Carlson, 1987). Das Stratum germinativum besteht aus dem Stratum basale mit iso- bis hochprismatischen Zellen, die über Halbdesmomen stabil mit dem Bindegewebe verankert sind. Die zweite Zellschicht ist das Stratum spinosum, mit hauptsächlich isoprismatischen, polygonalen Zellen, die über Desmosomen verbunden werden. Im anschließenden Stratum granulosum sind die Epithelzellen abgeflacht und beinhalten Keratohyalin-Granula. Den Abschluß bildet das Stratum corneum, bei dem sich Kerne und Zellorganellen auflösen (Liebich, 1993).

2.1.3 Umbauvorgänge im Verlauf des Zyklus

Die zyklischen Veränderungen der Tunica mucosa bei den geschlechtsreifen Säugetieren unterliegen der direkten hormonellen Steuerung durch das Ovar. Diese Veränderungen schaffen die Voraussetzungen für die Implantation. Findet keine Befruchtung statt, wird ein Teil der Tunica mucosa abgestoßen und während des nächsten Zyklus wieder aufgebaut.

Beim uterinen Zyklus werden drei Phasen unterschieden: die Proliferations-, die Sekretions- bzw. Transformations- und die Involutionsphase. Meist werden die zyklischen Veränderungen der Uterusschleimhaut nach den vier Phasen des vaginalen Zyklus benannt:

Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus (Allen, 1922; Scheunert und Trautmann, 1987).

Diese Einteilung wird im Folgenden verwendet:

Uterus

Die Zellen der Lamina epithelialis mucosae sind im **Proöstrus** von gleich langen Mikrovilli bedeckt (Lamb, 1978). Die Zellkerne liegen basal und zeigen zahlreiche Mitosen (Nitschke und Fabian, 1970). Die Menge der apikal liegenden Sekretgranula steigt während des Proöstrus an (Fuxe und Nilsson, 1963). Das Stroma endometrii ist im muskelnahen Schleimhautbereich ödematös aufgelockert (Nitschke und Fabian, 1970). Während Clauberg (1931) keine Leukozyten fand, beschrieben Nitschke und Fabian (1970) eine gesteigerte Zahl. Die Glandulae uterinae sind eng und enthalten nur geringe Mengen an Sekret.

Im **Östrus** ist das Oberflächenepithel einschichtig hochprismatisch (Nitschke und Fabian, 1970). Apikal weist es dicht nebeneinander stehende, gleichmäßig verteilte Mikrovilli auf, die annähernd die selbe Länge haben (Lamb, 1978). Die Mikrovilli sind von einem mukösen Sekret überzogen. Das Bindegewebe ist in diesem Zyklusstadium ödematös aufgelockert, so daß Drüsen und Kapillaren deutlich hervortreten. Bei den zahlreich vorhandenen Leukozyten handelt es sich meistens um stab- oder segmentkernige neutrophile Granulozyten, die man in allen Schichten der Lamina propria mucosae findet (Nitschke und Fabian, 1970). Das

Drüsenepithel ist iso- bis hochprismatisch und mit vielen Mitosen versehen. Im Drüsenlumen befindet sich fast immer ein homogenes, nur wenig granuliertes Sekret (Nitschke und Fabian, 1970).

Im **Metöstrus** ist das Oberflächenepithel teilweise zerrissen. Es gibt Zonen, die keine Mikrovilli besitzen (Lamb, 1978). Die Zellen sind isoprismatisch (Nitschke und Fabian, 1970). Einige Zellen haben sehr wenig Zytoplasma, während andere ein dichtes Zytoplasma mit wenigen Zellorganellen aufweisen. Während des Metöstrus findet hauptsächlich eine Veränderung im Bereich des Stroma endometrii statt (Clauberg, 1931). Das im Östrus aufgelockerte Stroma verdichtet sich wieder. Dabei sind lumennahe Zellen dichter gelagert als muskelnah. Die Drüsen sind zum Teil mit Sekret gefüllt. Je nach Sekretanhäufung sind die Zellen flach oder isoprismatisch. Mitosen sind kaum auffindbar (Nitschke und Fabian, 1970).

Die Oberfläche der Epithelzellen im **Diöstrus** hat gleichmäßig verteilte, kurze dicke, teils auch längere Mikrovilli (Lamb, 1978). Vereinzelt sind in der Lamina propria mucosae Leukozyten vorhanden. Die Drüsen sind größtenteils eng und enthalten wenig Sekret (Nitschke und Fabian, 1970).

Vagina

Innerhalb des Zyklus vollziehen Epithel und Lamina propria der Vagina charakteristische Veränderungen, die bei den Nagern zur Zyklusdiagnostik herangezogen werden. Während des Zyklus kommt es zum kompletten Ersatz des Epithels.

Im **Proöstrus** erreicht das vaginale Epithel mit 10 – 13 Schichten seine stärkste Dicke. Die äußeren drei bis fünf Zellschichten beginnen zu degenerieren. Kernpyknosen sind sichtbar. Das Stratum granulosum wandelt sich in das Stratum lucidum um, das von drei bis fünf Hornzellschichten bedeckt ist. In der Lamina propria wird die Zahl der neutrophilen Granulozyten weniger, im Epithel sind keine Granulozyten vorhanden. Das mikroskopische Bild des Abstriches im Proöstrus enthält eine mäßige Anzahl an Epithelzellen mit großen Kernen, welche meist als Zellhaufen sichtbar sind.

Beim Übergang des Proöstrus in den **Östrus** kommt es durch Autolyse und kontinuierliche Verhornung zum Verlust des aus acht bis zwölf Zellschichten bestehenden Stratum corneum. Die oberflächennahen Zellschichten lösen sich von den tiefer gelegenen ab und liegen als Klumpen auf der Oberfläche. Das Stratum lucidum bildet daraufhin die oberste Zellschicht. Ab diesem Zeitpunkt ist der Östrus nachweisbar. Die Leukozyten der Lamina propria wandern in das Epithel. Der Abstrich ist durch viele große verhornte Epithelzellen gekennzeichnet.

2.1.4 Der Zyklus der Maus

Die Geschlechtsreife der Maus tritt um den 38. Tag (Gehring, 1956) bzw. zwischen der 6. - 8. Woche ein (Morrow, 1986). Die Ovulation ist spontan und erfolgt etwa 2 – 3 Stunden nach Beginn des Östrus (Morrow, 1986). Die Maus ist polyöstrisch und hat rasse- und altersabhängig (Aitken, 1977; Nelson et al., 1982) eine Zykluslänge von durchschnittlich 4 – 6 Tagen (Allen, 1922; Morrow, 1986) bzw. 9 Tagen (Vianney, 1965). Die Länge der einzelnen Phasen wird von den Autoren wie folgt angegeben:

Proöstrus	12 – 24 Stunden (Vianney, 1965)
Östrus	36 Stunden (Vianney, 1965) 10 – 20 Stunden (Morrow, 1986)
Metöstrus	48 Stunden (Vianney, 1965) 24 – 48 Stunden (Morrow, 1986)
Diöstrus	48 Stunden (Vianney, 1965)

Alle Angaben basieren auf der klassischen Studie über den Sexualzyklus der Maus (Allen, 1922).

Der polyöstrische Zyklus wird in 2 Typen unterschieden:

Typ 1) Bsp.: Frau, Rind, Sau

Die Östrogenkonzentration steigt kontinuierlich und erreicht ihren Gipfel zum Östrus, wodurch die Ovulation ausgelöst wird = folliculäre Phase. Aus der Follikelhöhle bildet sich das Corpus luteum und der Uterus wird auf die Nidation vorbereitet = Lutealphase. Zu diesem Zeitpunkt ist die strukturelle Veränderung des uterinen Epithels am stärksten (Lawn, 1973).

Typ 2) Bsp.: Maus, Ratte

Bei diesem Typ ist der Zyklus verkürzt, da keine richtige Lutealphase stattfindet. Hier erreicht die Differenzierung und Rückbildung des uterinen Epithels den Peak zum Östrus. Für die Bildung des Corpus luteum ist die Paarung erforderlich. Infolge der Stimulation der Zervix wird die Ovulation ausgelöst (Lawn, 1973).

Die Umgestaltung der vaginalen Mukosa erfolgt durch die ovariellen Steroidhormone. Östradiol stimuliert das Epithel zur Proliferation, Reifung und Desquamation. Progesteron

hemmt die Epithelreifung. Die Schleimbildung ist ein Ergebnis beider Hormone (Carlborg, 1966).

2.2 Die Uterusflüssigkeit

Eileiter und Uterus produzieren eine Flüssigkeit, die ein Milieu bildet, das für die Entwicklung der befruchteten Eizelle notwendig ist. Die uterine Flüssigkeit wird vom Endometrium gebildet und ist für die frühe embryonale Entwicklung wichtig (Amaroso, 1952). Sie bildet die biochemische und physiologische Grundlage für den Embryo vor der Implantation. Kleine Moleküle in der uterinen Flüssigkeit sind die Voraussetzung für die Entwicklung, da sie leicht in den Embryo transportiert werden können.

2.2.1 Die Proteine der Uterusflüssigkeit

Die luminale Flüssigkeit des Uterus der Säugetiere enthält viele Proteine (Daniel, 1970). Serumproteine sind vorherrschend. Die Proteine der Uterusflüssigkeit sind speziesspezifisch (Joshi, 1983).

Die Proteine des Endometriums unterliegen zyklischen Veränderungen, wobei diese Veränderungen im Blut nicht auftreten. Es wurden 16 – 24 verschiedene Proteine im endometrialen Gewebe ermittelt, während im Blutserum durchschnittlich 14 Proteine zu finden sind (Umaphathysivam und Jones, 1981a). Es gibt organ- oder trächtigkeitsspezifische Proteine für das Ovidukt und den Uterus, die durch die Sekretionstätigkeit des Endosalpinx oder des endometrialen Epithels gebildet werden (Beier und Beier-Hellwig, 1973). Deshalb ist es möglich, daß einige Proteine in der uterinen Flüssigkeit höher konzentriert sind als im Blut (Wolf und Mastroianni, 1975).

Die zwei wichtigsten Proteingruppen in der uterinen Flüssigkeit sind:

1. Serum-Proteine:

Sie gelangen durch einen selektiven Transport in das Lumen des Genitaltraktes. Der Konzentrationsunterschied zum Serum wird durch uterine und tubale Sekretion oder Transsudation hervorgerufen bzw. verstärkt.

2. Charakteristische Proteine des Uterus und Eileiters:

Sie werden durch das tubale Gewebe (Beier, 1974) bzw. durch die endometrialen Drüsen sekretiert (Santoro et al., 1989).

Durch biochemische Untersuchungen wurden neun Proteinfractionen gefunden, die endometrial sekretiert werden können. Die Hauptgruppe der Proteine wird durch Glykoproteine

dargestellt (Beier und Beier-Hellwig, 1973). Die Glykoproteine befinden sich in den Granula der sezernierenden Zellen, deren Bildung durch Östrogene kontrolliert wird. Die Freisetzung wird durch Progesteron gesteuert. Einige Proteine sind ständig in der Uterusflüssigkeit. Diese stammen aus dem Eileiter oder der Peritonealhöhle. Ferner stammen die Proteine aus der Lymphflüssigkeit (Renfree, 1973), da sich der Uterus, z.B. während der Lutealphase ödematös verändert.

Nachfolgend sind die wichtigsten Proteinfractionen der uterinen Flüssigkeit aufgeführt:

- uterines Präalbumin
- Albumin
- uterines Postalbumin (graviditätsspezifisch, wird bei der Frau nicht gebildet (Beier, 1974))
- Uteroglobulin/Blastokinin
- Transferrin
- Immunglobulin IgG
- α -Makroglobulin
- Laktoferrin
- Uteroferrin (Beier und Beier-Hellwig, 1973; Dixon und Gibbons, 1979)

Etwa 55 – 60 % der uterinen Proteine haben ein Molekulargewicht zwischen 15 – 70 kDa. Nur wenige Proteine liegen zwischen 600 - 1.000 kDa (Beier und Beier-Hellwig, 1973).

Albumin

Das wasserlösliche Albumin ist neben Transferrin die größte Komponente der uterinen Proteine (Zavy et al., 1982). Sein Molekulargewicht beträgt 69 kDa. Es wird in der Leber synthetisiert. Im Blutplasma kommt nur ein kleiner Teil des Gesamtbestandes an Albumin vor. Extrazellulär sind ca. 60 % vorhanden. Die Hauptaufgabe im Blut ist die Erhaltung des osmotischen Druckes, Stoffwechselzwischenprodukte und Stoffwechselendprodukte sowie Hormone, Vitamine und Elektrolyte reversibel zu binden (Scheunert und Trautmann, 1987) und durch den Organismus zu transportieren.

Das Albumin des Uterussekretes hat eine andere elektrophoretische Eigenschaft als im Blut, da andere Fettsäuren gebunden werden. Gebundene Steroidhormone scheiden als mögliche Ursache aus (Cowan und Daniel, 1972).

Uteroglobulin/Blastokinin

Uteroglobulin, ein Glykoprotein, ist ein spezifisches uterines Sekretionsprotein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa (Urzua et al., 1970), das lokal luminal sekretiert wird (Beier

und Beier-Hellwig, 1973). Uteroglobulin befindet sich in der uterinen Flüssigkeit sowie in der Blastozystenflüssigkeit. Es fehlt im Serum und der Flüssigkeit des Oviduktes bei graviden und scheinträchtigen Kaninchen (Daniel und Krishnan, 1969; Urzua et al., 1970). Es dient als Steroid-Carrier und bindet Progesteron stärker als Östradiol. Testosteron kann nicht transportiert werden (Arthur et al., 1972).

Renfree (1973) beschrieb beim Beuteltier ein β -Globulin mit ähnlicher elektrophoretischer Mobilität wie Uteroglobulin/Blastokinin. Es wird vermutet, daß es eine vergleichbare Funktion wie Uteroglobulin hat.

Transferrin

Transferrin ist ein Eisen-Transportprotein und gleichzeitig ein Anti-Akut-Phase-Protein mit einem Molekulargewicht von 76,5 kDa. Zwei Drittel des Transferrins liegen im ungesättigten Zustand vor und stehen als Transportreserve für Eisen zur Verfügung. Der Übergang des Eisens in die Zellen erfolgt über spezifische Transferrinrezeptoren. Transferrin kann pro Molekül zwei Atome Fe^{3+} aufnehmen, transportiert diese wahrscheinlich zu den Mitochondrien und geht nach Abgabe des Eisens ins Plasma zurück (Scheunert und Trautmann, 1987).

Uteroferrin

Uteroferrin ist ein eisenhaltiges Glykoprotein, das nur beim Schwein vorkommt und durch das Epithel des Endometriums und der endometrialen Drüsen sekretiert wird (Vallet und Christenson, 1996). Es wird vermehrt unter dem Einfluß von Progesteron gebildet (Zavy et al., 1982; Vallet et al., 1998). Uteroferrin wird von den plazentaren Epithelialzellen durch Pinozytose aufgenommen. Somit ist die Zustellung des Eisens während der Gravidität von der endometrialen Sekretion abhängig. Uteroferrin wird mit dem Blut zur Leber transportiert, wo das Eisen für die Hämatopoese genutzt wird (Vallet und Christenson, 1996).

Zavy et al. (1982) fanden ein Protein beim Pferd, daß Uteroferrin-ähnlich ist bzw. dem Uteroferrin des Schweines entspricht. Es gewährleistet den Eisen-Transport von der Mutter zum Konzeptus. Beim Pferd ist ein Unterschied in der Aktivität von trächtigen und nicht trächtigen Tieren auffällig. Die Aktivität bei nicht tragenden Tieren ist 50 mal niedriger als bei graviden Stuten. Wahrscheinlich ist auch beim Pferd die Bildung progesteronabhängig, da das Vorkommen im Zyklus auf die Zeit begrenzt ist, in der Progesteron erhöht ist.

Laktoferrin

Laktoferrin gehört zur Familie der Serum-Transferrin-Gene (Metz-Boutigue et al., 1984) und ist in humaner und boviner Milch, aber auch im Endometrium, im Zervikalschleim, im

Urin, der Tränenflüssigkeit sowie dem Darm- und Bronchialsekret vorhanden. Die Synthese von Laktoferrin steht unter Östrogenkontrolle. Während des Proöstrus steigt die Sekretion von Laktoferrin im Uterus und ist zum Östrus am höchsten. Von diesem Niveau sinkt die Menge des Laktoferrins in der uterinen Flüssigkeit und ist im Met- und Diöstrus nicht mehr bestimmbar.

Im Western-Blot zeigen sich zwei große Proteinbanden im Bereich von 65 und 70 kDa. Diese Banden sind spezifisch für Laktoferrin. Die Bande mit 65 kDa ist im Zyklus konstant vorhanden, während die mit 70 kDa an Intensität während des frühen Proöstrus bis zum späten Östrus zunimmt. Immunhistologisch wurde nachgewiesen, daß die positiven Zellen und die Farbintensität in den Zellen zum Proöstrus und Östrus am höchsten waren (Walmer et al., 1992).

Wie Transferrin kann Laktoferrin zwei Metallbindungen eingehen. Jede Bindungsstelle kann ein Ferri-Ion (Fe^{3+}) und ein Bikarbonat-Anion binden. Somit steht den Darmbakterien kein Eisen zur Verfügung, wodurch die bakteriostatische Wirkung des Proteins erklärt wird. Weiterhin schützen Laktoferrin und Transferrin die Mukosa vor Vergiftungen durch Schwermetalle (Wiesner und Ribbeck, 2000). Die Funktion des Laktoferrins bei der Maus im Reproduktionstrakt ist bisher nicht bekannt.

2.2.2 Proteinveränderungen in der Uterusflüssigkeit

2.2.2.1 Veränderungen der Proteine während des Zyklus und der Gravidität

Die luminalen Proteine des Uterus bilden einen Teil des extrazellulären Milieus für die Präimplantation der Blastozyste und beeinflussen den embryonalen Zellmetabolismus. Die endometriale Sekretion des Uterus wird durch die ovariellen Steroidhormone beeinflusst. Durch die Hormone verändern sich Menge und Verhältnis der Proteine in der uterinen Flüssigkeit (Urzua et al., 1970). Verschiedene Proteine des Endometriums sind spezifisch für die einzelnen Phasen des Zyklus. Zum präovulatorischen Zeitpunkt ist die Uterusflüssigkeit in der Proteinzusammensetzung ähnlich der des Blutes und der Follikelflüssigkeit. Albumin und Transferrin sind prädominant. Lipoproteine befinden sich nicht im endometrialen Sekret (Beier und Beier-Hellwig, 1973). In der lutealen Phase steigt die Konzentration der Proteine, die verstärkt durch die endometrialen Drüsen gebildet werden (Sullivan et al., 1984).

Nicht tragende Tiere haben weniger Proteine im uterinen Sekret als gravide (Renfree, 1973). Die Uterusproteine trächtiger Tiere unterscheiden sich qualitativ und quantitativ von den Proteinen im maternalen Serum, der Peritoneal- und der Lymphflüssigkeit (Oliphant et al., 1984). Die höchste Proteinmenge kommt während der Implantation des Embryos vor. Beim

Beuteltier ist zum Zeitpunkt der Präblastozyste die Proteinkonzentration gering, steigt mit wachsender Blastozyste und erreicht die maximale Konzentration während der Implantation des Embryos (Renfree, 1973).

Die Voraussetzung für das Wachstum der Blastozyste ist nicht nur abhängig von der Proteinmenge, sondern auch von den spezifischen Proteinen im Uterus, die für die Synchronisation zwischen Embryo, Uterus und ernährendem Substrat für den Embryo benötigt werden (Beier und Beier-Hellwig, 1973; Renfree, 1973). Weiterhin kontrollieren Glykoproteine das maternale humorale Immunsystem. Die Proteine der Uterusflüssigkeit sind bedeutend für den Transport von wasserunlöslichen Nährstoffe, z.B. Mineralien oder fettlöslichen Vitaminen (Bazer et al., 1991).

Bei der **Frau** ist die Gesamtprotein-Konzentration der uterinen Flüssigkeit während der sekretorischen Phase am höchsten. Sie verringert sich in der proliferativen Phase und ist zur Menstruation am niedrigsten (Sullivan et al., 1984). Unabhängig vom Zyklusstadium sind Albumin und Transferrin immer vorhanden. In der mittleren Lutealphase treten ein spezifisches Protein mit ähnlicher Molekülmasse wie Uteroglobulin und ein β_2 -Glykoprotein oder γ -Globuline zusätzlich auf (Shirai et al., 1972).

Joshi (1983) fand ein Glykoprotein bei der Frau, das unter Progesterin, einem Analog des Progesterons, vermehrt in den Zellen des Endometriums gebildet wird. Er bezeichnete es als „Progestagen-associated-endometrial-protein“ (PEP). Die Bildung erfolgt in den endometrialen Drüsen. Es wird in das glanduläre Lumen sezerniert und kann auch ins periphere Blut bzw. während der Schwangerschaft in den Amnionsack abgegeben werden. Nach einem Anstieg der Konzentration von Progesteron in der mittleren lutealen Phase steigt PEP in der späten Lutealphase des Zyklus an. Die Synthese von PEP erhöht sich während der ersten Schwangerschaftswochen im Endometrium um ca. das 1000-fache. Nach der 14. Woche sinkt die Konzentration in Serum und Amnionsack schnell, da die Drüsen einer Degeneration unterliegen.

Das Uterussektret von **Ponystuten** wurde mit der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgespalten. Die Proteine wurden nach ihrer Lage im Gel alphabetisch benannt. Die endometrialen Sekrete zyklischer Stuten haben folgendes Proteinmuster: saure Proteine mit Molekulargewichten zwischen ca. 22 - 60 kDa, das basische Uteroferrin mit 35 kDa und ein niedermolekulares Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, das

mit U1 bezeichnet wurde und besonders deutlich auftrat. Dieses Protein wird nur im Uterus gebildet (Zavy et al., 1982).

Nicht trächtige Ponystuten erreichen am 14. Tag des Zyklus eine maximale Konzentration der Aktivität der Sauren Phosphatase. Danach sinkt die Konzentration. Im Gegensatz dazu ist bei graviden Ponystuten eine konstante Steigerung der Sauren-Phosphatase-Aktivität bis zum 20. Tag der Gravidität sichtbar. Die Aktivität ist beim graviden Tier wesentlich höher als bei nicht trächtigen Ponystuten (Zavy et al., 1982).

Untersuchungen an **Kaninchen** im Östrus, der Trächtigkeit und der Pseudogravidität ergaben, daß in allen drei Stadien das Proteinmuster annähernd gleich ist. Es kommt jedoch zu quantitativen Veränderung und zeitlichen Verschiebungen im Proteinmuster (Beier und Beier-Hellwig, 1973).

Progesteron ist für die Sekretion spezifischer Proteine im Uterus des Kaninchens verantwortlich. Die Uteroglobulin-Konzentration steigt während der frühen Gravidität und in der Pseudogravidität beim Kaninchen an, erreicht ein Maximum am fünften Tag post ovulationem (p. o.) und sinkt bis zum neunten Tag p. o. stark ab (Urzua et al., 1970).

Bei der **Maus** ist in der Uterusflüssigkeit Serumtransferrin und Albumin vorhanden, unabhängig vom Zyklusstadium, einer Gravidität oder der verzögerten Implantation. Am 2. und 3. Tag der Gravidität dominiert Albumin, am 4. Tag kommen u.a. zwei α -Globuline hinzu. Bei verzögerter Implantation sind Transferrin, Hämoglobin und Albumin dominant. Ovariectomierte, nicht gravide Mäuse haben ein mäßiges Proteinmuster, in dem Transferrin, Hämoglobin und Albumin dominieren, einige uteruspezifische Proteine sind in geringer Konzentration ebenfalls vorhanden (Aitken, 1977).

Die Expression der mRNA von 24p3 und die Synthese des 24p3-Proteins, einem Akut-Phase-Protein, findet bei der Maus verstärkt im Proöstrus und Östrus statt. Protein und mRNA sind im Epithel des Endometriums und den Drüsen vorhanden. Am 1. Graviditätstag ist 24p3 am höchsten und die mRNA im luminalen und glandulären Epithel lokalisiert. Am 2. Tag sinkt die Konzentration, und der Nachweis ist auf das luminale Epithel beschränkt. Am 3. und 4. Graviditätstag ist 24p3 nicht nachweisbar (Huang et al., 1999).

Während der Gravidität werden vermehrt Wachstumsfaktoren (IGF, EGF, HB-EGF) gebildet, die für Wachstum und Differenzierung von Uterus und Föten notwendig sind. Die Expression wird durch Östrogene reguliert (DiAugustine et al., 1988; Murphy und Ghahary, 1990; Wang et al., 1994). Gleichzeitig wächst der Uterus durch die vorhandenen Früchte.

Die Ursache des Wachstums sind mitogen-regulierte Proteine bzw. Proliferine, die von der Plazenta sekretiert werden. Die sekretierte Menge ist proportional zur Anzahl der Föten (Lee et al., 1988).

2.2.2.2 Veränderungen der Proteine unter Östradiol- und Progesteroneinfluß

Die ovariellen Hormone regeln das Proteingleichgewicht von Ovidukt, Uterus und Zervix. Weiterhin beeinflussen sie die Kapazitation, die Befruchtung, die Blastozystenentwicklung und die Implantation. Unter Östradiol erhöhen sich Gesamtstickstoff, Protein und anorganisches Phosphat in der uterinen Flüssigkeit. Unverändert bleiben das Volumen, der Wassergehalt und die Menge an Na^+ . Es vermindert sich die Konzentration von K^+ in der uterinen Flüssigkeit (Ringler, 1961).

Die Sekretorische Komponente (SC) ist ein Glykoprotein, das von den Epithelzellen der Mukosa sekretiert wird und bei der **Frau** beschrieben wurde. Durch die Gabe von $17\text{-}\beta\text{-}$ Östradiol steigt SC im uterinen Lumen, ähnlich der Steigerung der Konzentration während des Proöstrus und Östrus. Die Serum-Konzentration von SC ist 20-mal niedriger als in der Uterusspülflüssigkeit (Sullivan et al., 1984).

Das bereits beschriebene Protein U1 der **Ponystute** unterliegt quantitativen zyklischen Veränderungen, kann aber durch Progesteron oder Östradiol nicht beeinflusst werden. Die Bildung wird vermutlich durch eine Kombination von Gonadotropin und einem Steroid angeregt (Zavy et al., 1982).

Die Sekretion der uterinen Epithelzellen ovariectomierter **Katzen** wird durch $17\text{-}\beta\text{-}$ Östradiol und Progesteron stimuliert (Boomsma et al., 1982).

Die Katze besitzt ein $17\text{-}\beta\text{-}$ Östradiol abhängiges Polypeptid in der uterinen Flüssigkeit, das als „Cat Uterin Protein that is Estrogen Dependent“ (CUPED) bezeichnet wird. Dieses Polypeptid ist im apikalen Teil der Drüsenzellen als Granula vorhanden und wird nach einer Östradiolbehandlung ins uterine Lumen sezerniert. Wahrscheinlich ist es für die Ernährung der Blastozyste oder bei der Vorbereitung des Epithels auf die Implantation wichtig. CUPED kommt während des Östrus vor und ist bis zum 4. Tage p.c. nachweisbar (Murray und Verhage, 1985).

Bei **Kaninchen**, die mit Progesteron oder Progesteron + Östradiol behandelte wurden, steigt die Konzentration von Uteroglobulin in der uterinen Flüssigkeit. Östradiol alleine hat diesen Effekt nicht (Urzua et al., 1970). Sechs und 30 Stunden nach der Paarung wurden Kaninchen mit 17- β -Östradiolbenzoat behandelt. Es folgte eine verzögerte Sekretion der Proteine. Erst zwei bis fünf Tage später entwickelt sich das typische Proteinmuster. Dieses Phänomen wird als verzögerte Sekretion bezeichnet (Beier und Beier-Hellwig, 1973). Die Blastozysten weisen eine Entwicklungs- bzw. Wachstumsverzögerung auf. Eine anschließende Implantation findet nicht statt.

Nach der Gabe von Progesteron und Östradiol an ovariectomierte **Ratten** entwickelt sich ein ähnliches Proteinmuster wie während der Gravidität. Bei zweimaliger Östradiolgabe innerhalb von 48 Stunden ist das Proteinmuster jedoch ähnlich dem des Proöstrus. Hohe Gaben an Östradiol fördern die Bildung und Speicherung von intraluminaler Flüssigkeit im Uterus und erhöhen die intraluminalen Proteine. Große Mengen an Progesteron verhindern die Akkumulation der Flüssigkeit und steigern das Gesamtprotein (Surani, 1977).

Bei **Mäusen** mit verzögerter Implantation steigen vier bis sechs und zwölf Stunden nach der Gabe von 17- β -Östradiol die uteruspezifischen Proteine (Aitken, 1977).

IgA und IgG werden im Uterus ovariectomierter Mäuse durch Östradiol erhöht. Progesteron alleine oder in Kombination mit Östradiol bewirkt nur einen geringen Anstieg beider Immunglobuline (Canning und Billington, 1983).

Bei Östrogen-behandelten Mäusen wurde im Uterus ein 70 kDa Glykoprotein nachgewiesen. Die Bildung des Proteins kann nicht durch Testosteron oder Progesteron induziert werden. Die Funktion des Proteins ist unbekannt (Teng et al., 1986).

2.3 Steroidhormone

Die Steroidhormone bilden eine eigene Hormonklasse, zu der die Gluko- und Mineralokortikoide, die Androgene, Östrogene und Gestagene gehören. Alle leiten sich vom Cholesterin ab und sind chemisch als stabile räumliche Kohlenwasserstoffverbindungen mit drei Sechsringen und einem Fünfring aufgebaut. Die unterschiedliche biologische Wirkungsweise ergibt sich aus der Änderung der Doppelbindungen oder der Liganden. Alle zeichnen sich durch ihren lipophilen Charakter aus, durch den sie in der Lage sind, die Zytoplasmamembran in beide Richtungen zu durchdringen. Wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit sind sie im Blut an Transportproteine gebunden (Tausk und Thijssen, 1986).

Im folgenden wird auf Östradiol und Progesteron näher eingegangen, da beide Hormone Gegenstand dieser Arbeit sind.

2.3.1 Östradiol

Die Struktur des Östradiols wurde im Jahre 1930/31 von Edward Adelbert Doisy und Adolf Friedrich Johann Butenandt beschrieben. Östradiol gehört in die Hormonklasse der Östrogene und ist in dieser Klasse zusammen mit Östrion und Östriol das wichtigste biologisch aktive Hormon. Die Bildung erfolgt zumeist im reifenden Follikel und der Plazenta, aber auch in den Hoden und der Nebennierenrinde. Während des Transportes im Blut sind die Östrogene an Proteine gebunden, werden aber innerhalb kürzester Zeit abgebaut (Halbwertszeit 6 min). In den Zielorganen bleiben sie länger wirksam. Zur Elimination wird Östradiol in der Leber zum Teil glukuronidiert, zum Teil sulfatiert und sowohl über die Nieren als auch die Gallenflüssigkeit ausgeschieden.

Östradiol fördert die Follikel- und Eireifung im Ovar. Bei der adulten Maus bewirkt es an den epithelialen Teilen der Uterusschleimhaut eine Proliferation (Martin et al., 1973), Hyperämie (Kachkache et al., 1991) bzw. verstärkte Kontraktion der Uterusmuskulatur. Es führt zur Verdickung der vaginalen Schleimhaut sowie zur vermehrten Abstoßung glykogenhaltiger Epithelzellen in der Vagina. Während des Befruchtungsvorganges regelt es die Wandergeschwindigkeit des Ovums durch das Ovidukt und bereitet die Spermien auf die Kapazitation vor.

Des Weiteren werden bei den geschlechtsreifen Wirbeltieren alle Organ- und Instinktveränderungen im Zusammenhang mit dem Geschlechtszyklus durch Östradiol beeinflusst (Silbernagel, 2001).

Die Wirkung des Östradiols erfolgt über Östradiolrezeptoren (ERs). Wie der Hormongehalt im Blut, unterliegt die Rezeptorexpression zyklischen Schwankungen.

2.3.2 Progesteron

1943 wurde Progesteron zum ersten Mal als Reinsubstanz isoliert (Tausk und Thijssen, 1986). Neben Progesteron sind 17- α -Hydroxyprogesteron und Progesterol im Körper aktiv. Progesteron wird während der Luteinphase in den Luteinzellen des Corpus luteum, im Chorion, der Plazenta und der Nebennierenrinde gebildet. Es wird schnell im Blut abgebaut (Halbwertszeit 13 min) ohne in den Zielorganen angereichert zu werden. Gesteuert wird die Produktion hauptsächlich von Gonadotropinen, besonders durch LH. Zum Transport wird es

vorwiegend an α -Globuline gebunden, ein geringer Teil kann durch Albumin transportiert werden. Der Abbau erfolgt in der Leber. Danach wird es an Glukuronsäure gekoppelt und mit dem Harn ausgeschieden (Tausk und Thijssen, 1986).

Für fast alle Progesteron-Wirkungen ist ein vorheriger oder gleichzeitiger Einfluß von Östradiol notwendig (Uotinen et al., 1999). Östradiol vermehrt die intrazellulären Rezeptorproteine für Progesteron (Brenner et al., 1990). Progesteron fördert im Uterus das Wachstum des Myometriums, bewirkt im Endometrium den Umbau der Drüsen und verändert die Gefäßversorgung, d.h. es entsteht ein sekretorisches Endometrium. Progesteron wirkt bei der Ovulation, der Befruchtung, der Implantation und der Erhaltung der Gravidität mit. Im Uterus hemmt es die Proliferation des Endometriums während der Lutealphase (Persson, 1996) und bewirkt eine Proliferation und Zelldifferenzierung des Stromas (Finn und Martin, 1970). Die Bildung der lobu-alveolären Strukturen und die Vorbereitung der Milchdrüse auf die Laktation während der Trächtigkeit werden ebenfalls durch Progesteron beeinflusst (Topper und Freeman, 1980).

2.3.3 Der Progesteronrezeptor (PR)

Angesichts der geringen Größe und ihrer Fettlöslichkeit passieren Steroidhormone ohne besondere Transportmechanismen die Zell- und Kernmembran und binden an vorhandene Rezeptormoleküle (Döcke, 1994). Der Progesteronrezeptor gehört zusammen mit den Östrogen-, Androgen-, Glukokortikoid- und Mineralokortikoid- Rezeptoren, den Rezeptoren der Schilddrüsenhormone, den Rezeptoren der Retinsäure (RAR) und der 9-cis-Retinsäure (RXR) sowie den Rezeptoren für Vitamin D₃ zur Steroidhormon-Rezeptor-Superfamilie (Tsai und O'Malley, 1994).

ER und PR sind Nuklearrezeptoren, deren Synthese im Zytosol erfolgt. Sie sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren und regulieren direkt im Zellkern die Genexpression, indem sie den Liganden reversibel und mit hoher Affinität binden. Eine Zelle enthält 10.000 bis 100.000 Rezeptormoleküle (Landers und Spelsberg, 1992).

Struktur

In den letzten Jahren wurde die molekulare Struktur des PR beim Menschen (Misrahi et al., 1987), aber auch bei verschiedenen Tierarten weitestgehend geklärt (Gorski et al., 1968; Savouret et al., 1989). In der folgenden Besprechung der Struktur des PR und seiner Eigenschaften wird als Beispiel der humane Progesteronrezeptor angeführt. Aufgrund der bekannten Gemeinsamkeiten bei den Säugetieren wird davon ausgegangen, daß die Erkenntnisse zu großen Teilen auf die Maus übertragen werden können.

Der humane PR ist eine Polypeptidkette, die sich aus 933 Aminosäuren zusammensetzt. Eine Besonderheit des Rezeptors besteht darin, daß er bei fast allen Wirbeltieren zwei Isoformen (A- und B- Form) besitzt (Kastner et al., 1990; Kraus et al., 1993). Beide Isoformen zeigen in ihrer Struktur hohe Übereinstimmungen, wobei Isoform B eine höhere molare Masse hat. Trotz der Übereinstimmungen gibt es funktionelle Unterschiede. Beide Formen stammen von einem Gen ab, das durch zwei Promotoren kontrolliert wird (Kastner et al., 1990). Dadurch entstehen bei der Transkription zwei unterschiedliche mRNAs.

Im Uterus und der Mamma der Maus tritt der PR-A (83 kDa) dreimal häufiger als der PR-B (115 kDa) auf (Schneider et al., 1991). Zusätzlich besitzt die A-Form des PR die Fähigkeit, an andere Hormonrezeptoren zu binden, z.B. an den Androgen-, Östrogen-, Mineralokortikoid- oder Glukokortikoidrezeptor.

Die Sequenz des PR läßt sich in verschiedene Domänen unterteilen, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können. Die einzelnen Domänen stellen Exons der DNA dar (Döcke, 1994). Die N-terminale Region des Rezeptors ist in die Domäne A/B und die Domäne C unterteilt (Shibata et al., 1997). Die C-terminale Seite teilt sich in eine kurze D-Domäne, und die Region E, die die Hormonbindungsstelle enthält, sowie die Domäne F (Abb. 2.1).

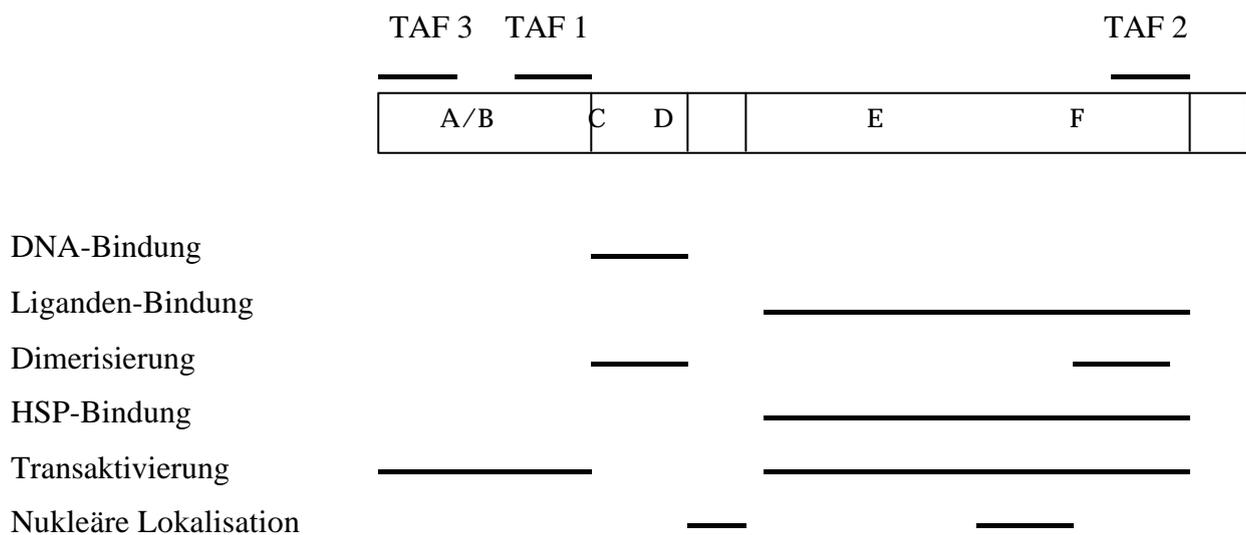


Abbildung 2.1 Funktionelle Domänen des Progesteronrezeptors (Tsai und O`Malley, 1994;

Shibata et al., 1997)

TAF – transkriptionsaktivierender Faktor

Die A/B-Region ist in Sequenz und Länge sehr unterschiedlich. Sie ist für die Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren und die Regulation der Genexpression verantwortlich. Diese Region ist innerhalb der nukleären Hormonrezeptoren relativ inhomogen und am wenigsten konserviert (Tora et al., 1988; Dobson et al., 1989). Durch Phosphorylierung, die der Rezeptor vor und während der Bindung an die DNA erfährt, wird die Transaktivierung weiter reguliert.

Die Region C besteht aus ca. 68 Aminosäuren (Luisi et al., 1991) und enthält die zwei für Steroidrezeptoren typischen „Zinkfinger“, über die die DNA-Bindung erfolgt (Shibata et al., 1997). In jedem Finger wird ein Zn^{2+} von vier Cysteinen komplexiert. Die Schleife der Zinkfinger besteht aus ca. 12 - 13 Aminosäuren. Der Teil zwischen den Zinkfingern enthält, je nach Steroidrezeptor, 15 - 17 Aminosäuren (Carson-Jurica et al., 1990). Aminosäurereste des ersten „Zinkfingers“ sind für die sequenzspezifische Erkennung des Hormon-Responsiven-Elementes (HRE) notwendig, während Reste des zweiten „Zinkfingers“ den Abstand zwischen den Hälften des HRE bestimmen. Des Weiteren befindet sich am C-Terminus des zweiten „Zinkfingers“ eine konservierte basische Sequenz, die im PR als Kernlokalisierungssignal wirkt (Guiochon-Mantel et al., 1989).

In der Domäne D kommt ein weiteres Kernlokalisierungssignal des PR vor (Dobson et al., 1989; Guiochon-Mantel et al., 1989). Die Region D ist wenig konserviert und reich an basischen Aminosäuren, wodurch sie leicht für Proteasen angreifbar ist. Sie ist für die Flexibilität des Rezeptors verantwortlich, die sie für die ligandenabhängige Funktion benötigt. Deshalb wird sie „hinge“-Region genannt (Tsai und O'Malley, 1994).

Die E-Domäne ist stark hydrophob, funktionell sehr komplex und ca. 250 Aminosäuren lang. Durch den hydrophoben Charakter ist sie nur wenig immunogen. Die Hauptfunktion der Region E ist die Ligandenbindung, die Regulation der DNA-Bindung und die Aktivierung der Transkription. Des Weiteren gibt es hier Bereiche, die für die Dimerisierung der Rezeptoren, die Transkriptionsaktivierung und für die Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich sind (Pratt et al., 1988; Guiochon-Mantel et al., 1989). Hier befindet sich auch die Region, an der das heat-shock-protein (HSP) bindet. Wird die E-Region verändert, z.B. durch Punktmutation, Abspaltung oder Hinzufügen einer Aminosäure, kommt es zum Verlust der Hormonbindungsfähigkeit (Carson-Jurica et al., 1990).

Am C-terminalen Ende befindet sich die variable F-Region, die keine spezifische Funktion besitzt.

Am PR wurden drei Regulationssequenzen (TAF 1, TAF 2, TAF 3) gefunden, die die Transkription fördern. Andere, weniger untersuchte transaktivierende Faktoren befinden sich frei im Zellkern. So sind z.B. SRC-1 (steroid-receptor-co activator 1) und RAP 46 (receptor-associated protein 46) gesicherte Aktivatoren der Transkription beim PR (Shibata et al., 1997).

Bei den meisten nukleären Hormonrezeptoren wirkt die Region E als ligandenabhängige transkriptionsaktivierende Region 2 (TAF 2), die synergistisch mit TAF 1 in Region B zusammenwirkt. Durch TAF 1, TAF 2 und TAF 3 wird die Transkription gefördert. Dabei wird die Synthese der mRNA im Zellkern verstärkt, die anschließend im Zytosol durch die Ribosomen zur Proteinsynthese genutzt wird.

Wirkungsweise (Abb. 2.2)

Intrazelluläre Hormonrezeptoren haben eine neutrale oder ruhende Aktivität, wenn kein Ligand vorhanden ist. Während dieser Zeit liegen ER und PR als 8 – 10S (Svedberg-Unit) Komplex (Gorski et al., 1968), verbunden mit dem HSP 90, im Zellkern. In dieser Form kann der Rezeptor nicht an die DNA binden.

Nach der spezifischen Bindung eines Hormones an der E-Domäne wird der Rezeptor aktiviert, was als Transformation bezeichnet wird. Dabei wandelt sich der Rezeptorkomplex unter der Abspaltung des HSP 90 in die DNA-bindende und transkriptionsaktivierende Form um. Eine alleinige Abspaltung des HSP 90 hat keine Wirkung auf die Aktivierung des Rezeptors.

Anschließend folgt ligandenabhängig die Konformationsänderung des Rezeptors, wobei sich ein 5S-Rezeptorkomplex beim ER (Gorski et al., 1968; Landers und Spelsberg, 1992) und ein 4S-Komplex beim PR (Saffran et al., 1976) bildet. Ein weiterer Aspekt der Transformation ist die Bildung eines Homodimers, wofür die Hormonbindungsdomäne verantwortlich gemacht wird. Aufgrund der Symmetrieachse der HRE-Sequenzen wurde schon früh angenommen, daß die Rezeptoren in Dimer-Form mit dem HRE interagieren (Carson-Jurica et al., 1990). Die „Zinkfinger“ der Domäne C binden an das HRE der DNA, das sich in direkter Nachbarschaft zum Promotor befindet und anschließend durch diesen die Transkription auslöst (Tsai und O'Malley, 1994). Während der N-terminale Zinkfinger der Region C wahrscheinlich für die Spezifität der DNA-Bindung verantwortlich ist, stabilisiert der C-lokalisierte Zinkfinger die DNA-Bindung des Rezeptors. Die Phosphorylierung des Rezeptors ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Transkription (O'Malley et al., 1995).

Bis heute ist noch nicht genau geklärt, was mit den entstandenen Hormon-Rezeptor-Komplexen geschieht. Dazu gibt es zwei Theorien:

- 1) Der Abbau des Rezeptors im Zellkern durch Proteasen und somit der Verlust des Rezeptors für die Zelle.
- 2) Die Trennung von Hormon und Rezeptor, Rückdiffusion des Rezeptors ins Zytosol und Umbau in den Aporezeptor (Kassis und Gorski, 1981).

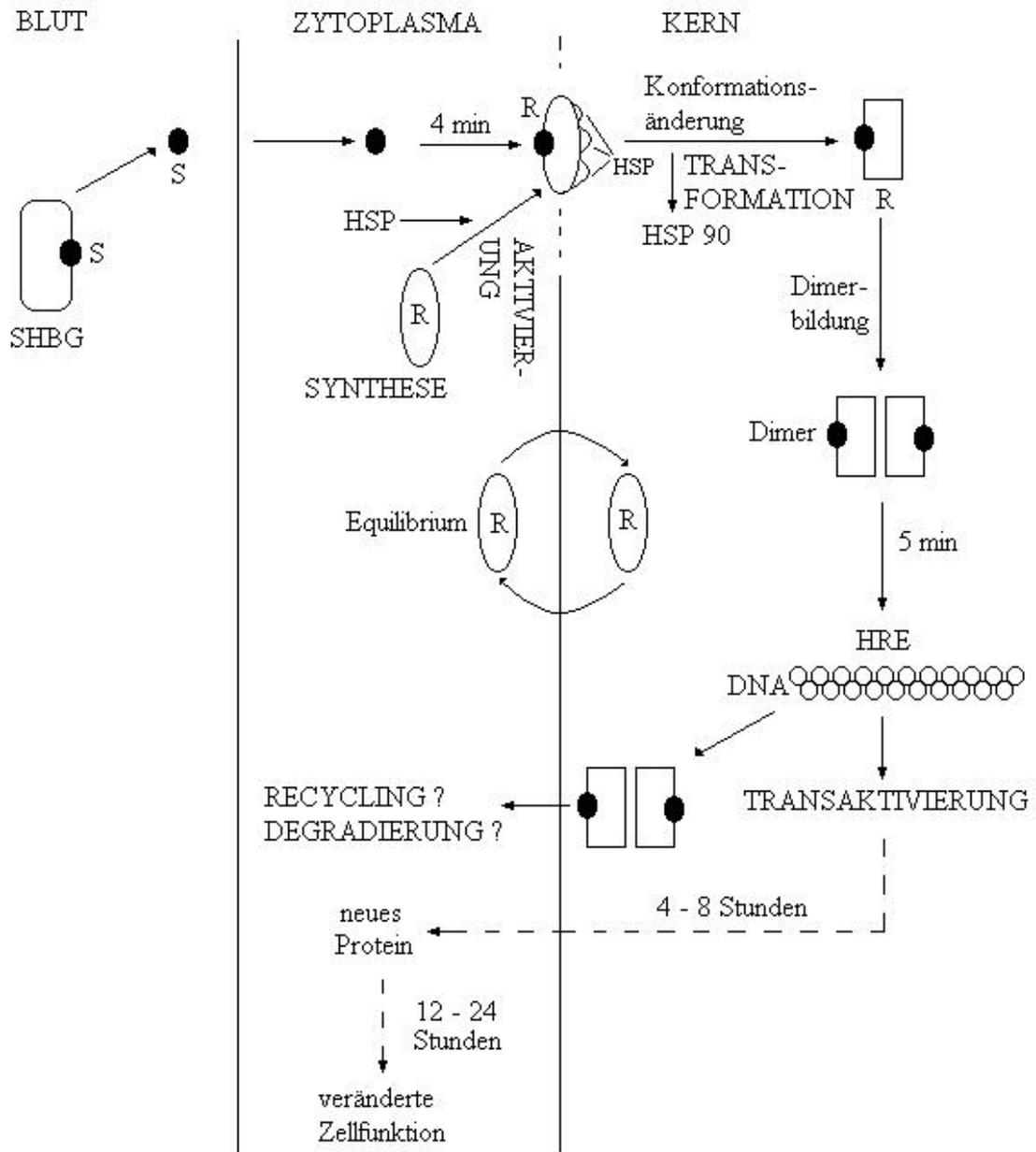


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Funktion und Wirkungsweise des Steroidrezeptors (Landers und Spelsberg, 1992)

HSP – Hitze-Schock-Protein, S – Steroidhormon, R – Rezeptor,
 SHBG – Sexualhormon-Bindendes Globulin,
 HRE – Hormon-Response-Element

2.4 Verschiedene Techniken der Organdurchspülung

2.4.1 Allgemeine Betrachtung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Organe oder Organteile mit einer Lösung zu durchspülen. Das Organ kann sich hierbei im Tier befinden oder isoliert von diesem, *in vitro*, behandelt werden.

Im folgenden werden mehrere Möglichkeiten beschrieben, bei denen das Organ isoliert vom Organismus behandelt wurde. Unabhängig von der Technik müssen grundsätzliche Bedingungen eingehalten werden, um das Überleben des Organs zu sichern.

Das Organ muß vollständig von einem flüssigen Medium umgeben sein, das weitestgehend den physiologischen Grundlagen des Organismus entsprechen soll, d.h. der pH-Wert, die Elektrolyte- und Glukose-Konzentration des Mediums sind der Blutkonzentration anzupassen. Das Medium und die Testsubstanz müssen der inneren Körpertemperatur des Versuchstieres entsprechen. Um dem Organ genügend Sauerstoff bereitzustellen wird Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) in das umgebende Medium, eventuell auch in die Testsubstanz, eingeleitet. Die Testsubstanz muß kontinuierlich fließen, was mit Hilfe einer Pumpe erreicht wird. Die Durchflußrate wird so gewählt, daß ein Druckanstieg im Organ vermieden wird. Aufgrund der geringen Dichte des Organmaterials kann das Organ auf der Flüssigkeitsoberfläche schwimmen. Das wird verhindert, wenn Gewichte mit unterschiedlicher Masse am Organ befestigt werden.

Damit sich das Organ an die *in vitro*-Bedingungen anpaßt und stabilisieren kann, sollte es über eine initiale Zeit, z.B. 30 – 60 min, ohne Behandlung im Medium verbleiben (Tait et al., 1967; Campos et al., 1980; Poyser und Brydon, 1983; Nordenvall et al., 1989; Gaddum, 1997; Richter et al., 2000).

2.4.2 Das Modell der Superfusion

Die Superfusion charakterisiert eine Technik, bei der eine Flüssigkeit über ein Gewebe geleitet wird (Gaddum, 1997). Hierbei ist es möglich, den Effekt von Arzneimitteln zu prüfen, wenn diese mit dem Flüssigkeitsstrom verabreicht werden. Eine größere Sensibilität erreicht man, wenn der Durchfluß für einen bestimmten Zeitintervall gestoppt oder die zu prüfende Substanz unverdünnt auf die Organoberfläche verabreicht wird.

Die Enden des Uterushorns einer Ratte werden an einem Schlauch mittels Ligatur befestigt. Das Superfusionsmedium wird kontinuierlich (0,2 ml/min) durch das Lumen und mittels

eines dritten Schlauches über das Perimetrium geleitet. Der abgehende Schlauch ist mit einem Fraktionssammler versehen. Zusätzlich kann die Flüssigkeit, die über das Perimetrium fließt, aufgefangen werden (Abb. 2.3). Mit diesem System wurde die Wirkung der Katecholamine, von Oxytocin und Kalzium-Ionophoren auf das Myometrium untersucht (Campos et al., 1980).

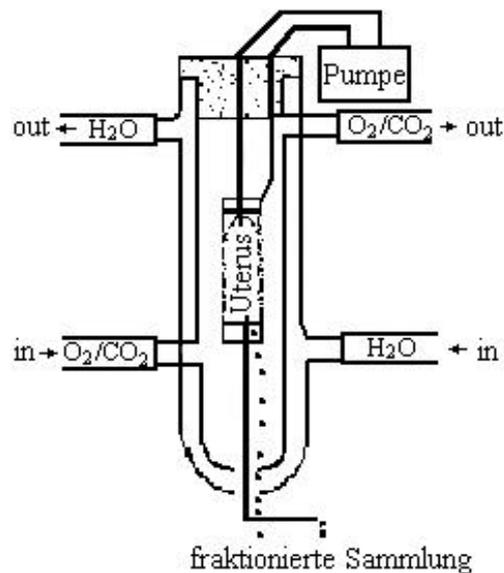


Abbildung 2.3 Aufbau des Superfusionssystems (Campos et al., 1980)

In einem weiteren Experiment von Campos et al., (1980) wurde ein Horn invertiert, bevor die Superfusion durchgeführt wurde, so daß das Endometrium außen war, Myo- und Perimetrium die innere Oberfläche bildeten.

Ein weiteres Beispiel der Superfusion eines graviden Ratten- bzw. im Zyklus befindlichen Schweineuterus besteht darin, die präparierten Cornua uteri longitudinal zu öffnen und sie mit Gewichten zu beschweren. Es wurde die Wirkung von A23187 (Kalzium-Ionophor), Trifluoperazin (Kalmodulin-Antagonist), Oxytocin, Progesteron und Östradiol auf die Freisetzung der Prostaglandine untersucht. Die Uterushörner werden nach einer initialen Periode

kontinuierlich mit verschiedenen Lösungen superfundiert und das Superfusat wird aufgefangen (Poyser und Brydon, 1983; Poyser, 1985).

Tait et al. (1967) beschrieben die Superfusion der Nebennieren der Ratte. Das System umfaßt ein Inkubationsgefäß, an dem eine Pumpe, ein Carbogen-Zufluß und ein abgehender zentraler Arm für die fraktionierte Sammlung des Superfusates vorhanden ist. Durch die Pumpe wird das Superfusionsmedium kontinuierlich in das Gefäß eingebracht (0,8 ml/min) und mit Carbogen angereichert. Durch Bewegen des Inkubationsgefäßes wird eine gleichmäßige Verteilung des Gases im Superfusionsmedium gewährleistet. Innerhalb des Gefäßes befindet sich ein Glaszylinder, dessen Boden perforiert ist. 3 – 4 mm über dem Boden enthält der Zylinder eine Platin-Gaze. Ein kurzer Polyethylenschlauch endet 2 – 3 mm über der Platin-Gaze und ist mit dem Fraktionssammler des Gefäßes verbunden. Das zu superfundierende Material liegt auf dem Gefäßboden. Die Perforation des Glaszylinders gestattet die freie Passage des Superfusionsmediums und verhindert zusammen mit der Platin-Gaze den Austritt des Gewebes. Durch den Zufluß des Superfusionsmediums steigt die Höhe des Flüssigkeitsspiegels und erreicht die Spitze des Polyethylenschlauches. Über das zugeführte Gas steigt der Druck im Gefäß und treibt die Flüssigkeit durch den zentralen Arm in den Fraktionssammler, bis die Flüssigkeitshöhe wieder unter die Spitze des Polyethylenschlauches fällt (Abb. 2.4).

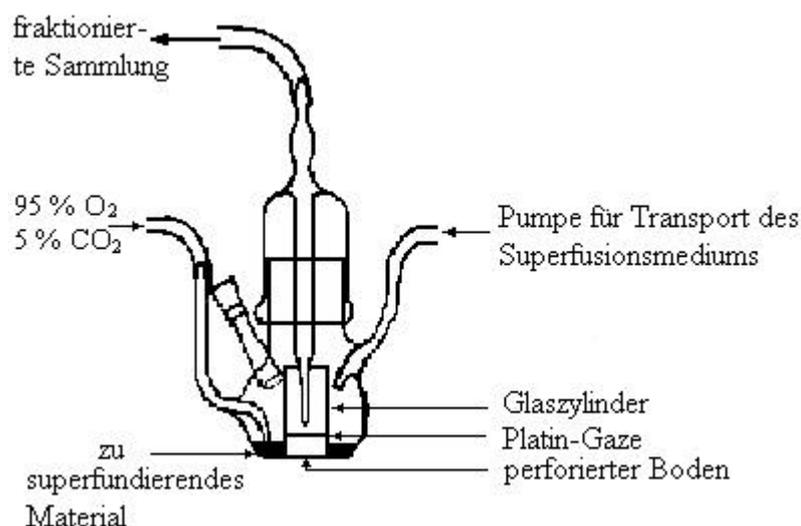


Abbildung 2.4 Schematischer Aufbau des Gefäßes für die Superfusion (Tait et al., 1967)

2.4.3 Das Modell der Perfusion

Bei der Perfusion durchströmen Lösungen ein Gewebe (Gaddum, 1997) oder Organ (Wiesner und Ribbeck, 2000).

Uterus und Ovidukt werden durch zwei wichtige Gefäße, die A. uterina und die A. ovarica bzw. deren Anastomosen versorgt. Über eine Inzision wird eine Glaskanüle in die A. ovarica eingeführt und an eine Pumpe angeschlossen (Abb. 2.5). Das uterine Ende des Eileiters wird mit einer Ligatur verschlossen, das Fimbrienende wird an einer weiteren Kanüle befestigt, um die gebildete Flüssigkeit aufzufangen (Dickens et al., 1995). Dickens et al. (1995) analysierten mit dieser Methode am humanen Eileiter verschiedene Nährstoffe, die für den Metabolismus des Embryos wichtig sind. Mikroskopisch wurde festgestellt, daß bei der Perfusion die Zellhöhe des Epithels abnimmt und die Mikrovilli der Zellen zum Teil verloren gehen.

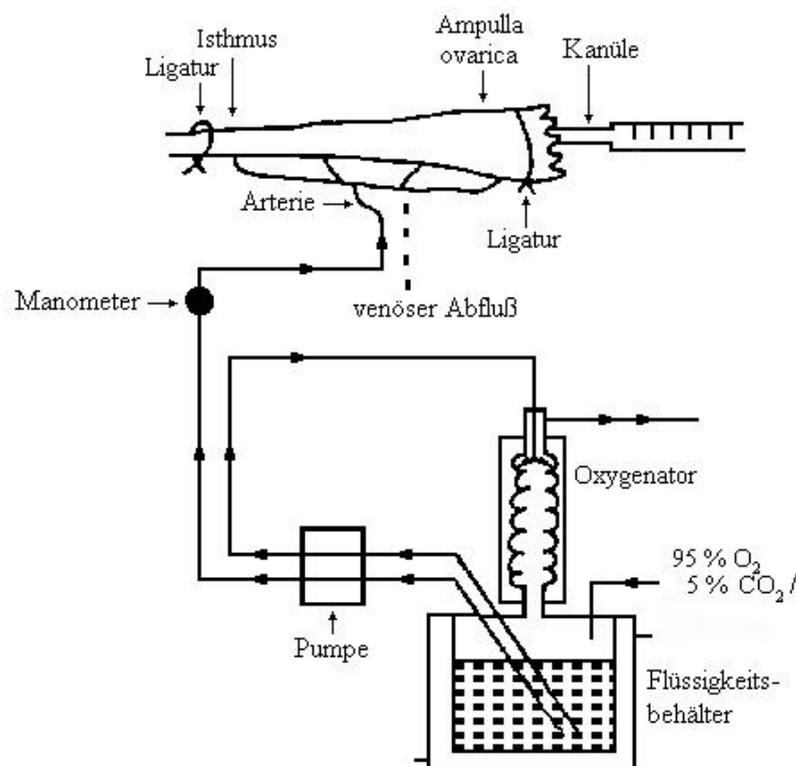


Abbildung 2.5 System der Gefäßperfusion (Dickens et al., 1995)

Richter et al. (2000) benutzten ein ähnliches Modell für die extrakorporale Perfusion des humanen Uterus. Die Aa. ovaricae wird mit einer Knopfkanüle katheterisiert. Vor der ei-

gentlichen Perfusion wird der Uterus mit heparinisiertem Krebs-Henseleit-Puffer durchspült, um Blut und Zelldetritus aus dem Innern des Organs zu beseitigen.

2.4.4 Das Modell der Mikrodialyse

Bei der Mikrodialyse diffundieren kleine Moleküle durch eine semipermeable Membran. Fließt die Flüssigkeit mit langsamer Geschwindigkeit, diffundieren die Substanzen entlang des Konzentrationsgradienten (Nordenvall et al., 1989).

In ein Stück eines bovinen Corpus luteum wird eine Membran vollständig im Lutealgewebe plaziert. Mittels Pumpe kann eine konstante Durchflußrate für das Medium eingestellt werden. Über den gesamten Versuchszeitraum wird das Corpus luteum in ein mit Puffer gefülltes Röhrchen gehängt und im Wasserbad aufbewahrt. So kann Somatotropin verabreicht werden und dessen Wirkung auf die Progesteron- und Oxytocinfreisetzung im Corpus luteum gemessen werden (Liebermann und Schams, 1994).

Häufig wird eine *in vivo*-Mikrodialyse am Gehirn der Ratte beschrieben. Dazu wird eine Mikrodialysesonde, die mit einer Dialysemembran verbunden ist, einige Millimeter in den Schädel einer Ratte eingepflanzt. Mit einer Durchflußrate zwischen 0,5 – 1 µl/min können nach einer initialen Zeit von mehreren Stunden, verschiedene Substanzen direkt in das Rattenhirn verabreicht werden. Über eine abgehende Sonde werden die Proben fraktioniert gesammelt (Gur et al., 2001; Radke et al., 2001).

Nordenvall et al. (1989) zeigten den Aufbau einer Sonde für die Mikrodialyse, an der der Einfluß von Progesteron auf die Konzentration von Na⁺ und K⁺ in der uterinen Flüssigkeit untersucht wird. Am unteren Ende einer feinen Glaskanüle ist eine Membran rohrförmig befestigt. Die Spitze der Sonde ist fest verschlossen (Abb. 2.6). Die Flüssigkeit wird durch eine feine Kanüle in Richtung Membran transportiert und fließt in entgegengesetzter Richtung zwischen Membran und innerer Kanüle zurück. Das gewonnene Material wird außerhalb der Sonde aufgefangen. Die Diffusion durch die Membran ist abhängig von der Länge der Membran und der Geschwindigkeit der Perfusion. Die Wiederfindungsrate dieser Methode liegt, in Abhängigkeit von der untersuchten Substanz, zwischen 75 % und 96 %.

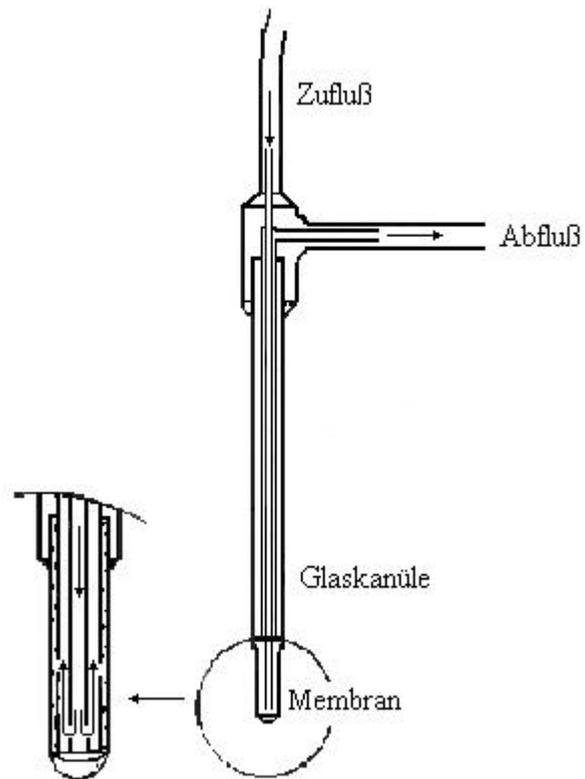


Abbildung 2.6 Sonde für die Mikrodiälyse (Nordenvall et al., 1989)