

### 5.5 Retinsäure und CytochromP26 (CYP26)

Aufgrund der Bedeutung von Vitamin A für lokale Regulationsmechanismen bei der embryonalen Entwicklung wurde versucht, CYP26, ein Enzym, das am Retinsäure-Abbau beteiligt ist, in den superfundierten Uteri nachzuweisen.

Die all-*trans*-Retinsäure ist ein entscheidender Regulator der Genexpression während der embryonalen Entwicklung. Die Umwandlung des Retinols in all-*trans*-Retinsäure wird durch zwei Enzyme, die Retinol-Dehydrogenase (ALDH-1) und die Retinal-Dehydrogenase (RALDH-2) gesteuert. Die Wirkung der all-*trans*-Retinsäure erfolgt durch die Bildung von Heterodimeren der nuklearen Rezeptoren für Retinsäure (RAR) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Durch die Proteinsynthese wird die Bildung von CYP26 (auch P450RAI) induziert. Dieses Enzym ist am Abbau der Retinsäure beteiligt. Dabei entstehen die polaren Metaboliten 4-OH-Retinsäure, 4-oxo-Retinsäure und 18-OH-Retinsäure (White et al., 2000).

Die kodierende Region des Enzyms CYP26 besteht aus 1491 Nukleotiden. Die ersten 35 Aminosäuren verschlüsseln eine hoch lipophile Region, die aus einem membrankoppelnden Bereich besteht. Weiterhin gibt es eine prolinreiche Region, eine sauerstoffbindende Region, eine charakteristische Häm-Bindungsdomäne und eine steroidbindende Region. Aufgrund dieser Merkmale wird CYP26 in die Cytochrom P450-Familie eingeordnet (Ray et al., 1997; White et al., 2000). Die Enzymbildung kann durch eine steigende Konzentration an Retinsäure induziert werden (Sakai et al., 2001; Yamamoto et al., 2000). Bis heute ist CYP26 *in vitro* bzw. *in vivo* bei der Maus in bestimmten Geweben, wie z.B. dem Gehirn, dem weiblichen Reproduktionssystem, der Leber und dem Hoden nachgewiesen (Fujii et al., 1997; Ray et al., 1997; Lampen et al., 2000; Vermot et al., 2000; Yamamoto et al., 2000).

Bisher liegt nur eine Arbeit über die Induktion von CYP26 durch Hormone im Uterus der Maus vor. Vermot et al. (2000) untersuchten die Bildung von CYP26 unter dem Einfluß von PMSG und hcG. Das Enzym ist in unbehandelten, nicht graviden Uteri nicht nachweisbar. Gleiche Beobachtungen waren bei den eigenen Untersuchungen aufgetreten.

Nach der PMSG-Behandlung kann CYP26 nicht bestimmt werden. Es ist jedoch 24 Stunden nach einer weiteren Gabe von hcG im Epithel des Endometriums nachweisbar. Drei und fünf Tage nach der hcG-Gabe ist die Konzentration wieder abgesunken und sehr niedrig, ähnlich dem Uterus im normalen Zyklus (Vermot et al., 2000).

Die mikroskopische Untersuchung der *in situ* hybridisierten Präparate zeigte bei keiner Hormonbehandlung eine CYP26-Expression. D.h. durch eine exogene Verabreichung der Hormone war die Induktion der Expression unter diesen Bedingungen der Superfusion nicht

---

möglich. Eine Ursache könnte die zu kurze Wirkzeit des jeweiligen Hormons sein, da die Enzyminduktion nach ca. zwei Stunden einsetzt (Sonneveld und van der Saag, 1998). Zum anderen kann die Konzentration der Retinsäure in den Zellen durch die Superfusion gesenkt worden sein, wodurch eine Enzyminduktion nicht möglich war. Es ist ebenfalls möglich, daß RNasen, die sich im Uterusgewebe befanden, die RNA des Enzyms CYP26 zerstörten.

### **5.6 Das Modell der Superfusion**

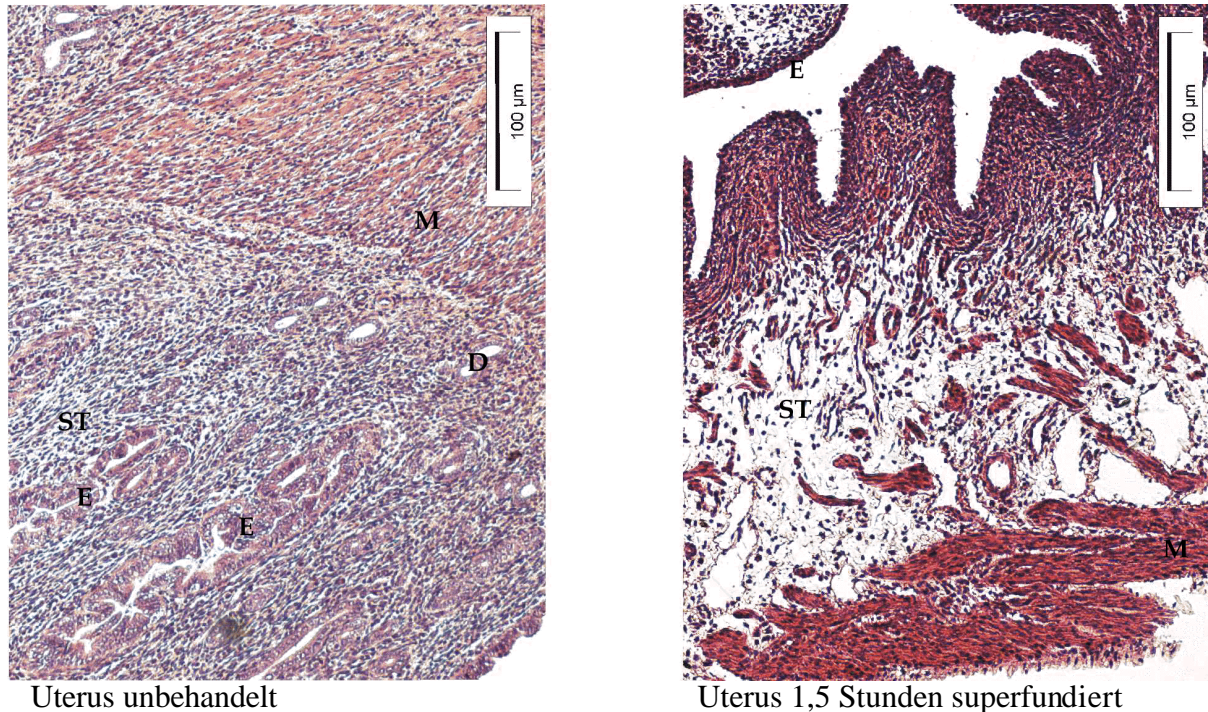
Anhand der durchgeführten Untersuchungen war ersichtlich, daß die Superfusion unter den beschriebenen Bedingungen (3.2.2) ein gutes *ex vitro*-Modell darstellte, um lokale steroidale Effekte zu veranschaulichen.

Eine gelöste Substanz wird durch ein Hohlorgan geleitet. Abhängig vom Organ und der Durchflußgeschwindigkeit, kann die Superfusion über mehrere Stunden erfolgen, wobei mit steigender Zeitdauer die Schäden im Gewebe zunehmen (Peek et al., 1985). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen bei der Superfusion und Perfusion nach einem achtstündigen Experiment große Schäden im uterinen Gewebe. Die Schäden durch die Superfusion sind stärker. Wird der Versuch verkürzt, stellt sich im Uterus eine *in vivo*-ähnliche Situation dar und auftretende Defekte sind geringer. Bei einer einstündigen Behandlung erscheinen Zellkern und Zellorganellen identisch mit einem nicht behandelten Organ (Peek et al., 1985). Die Schädigungen zeigen sich als epitheliale Durchsaftung, endometriale Zerstörung und stromale Ödeme des Uterus, die sich bei unbehandelten Mäusen oder bei Mäusen mit Östradiolgabe minimal darstellen. Die Schäden nehmen nach einer Progesteronbehandlung zu (Martin et al., 1970b).

Abb. 5.6 zeigt den Vergleich eines unbehandelten und eines 1,5 Stunden superfundierten Uterus. Besonders das Stroma verlor in der Nähe des Myometriums seinen physiologischen Zustand. Es kann sich um das oben beschriebene stromale Ödem handeln, welches durch Östradiol hervorgerufen wird. Dieses Ödem wäre sehr stark ausgeprägt, so daß wahrscheinlich zusätzlich Superfusionsmedium in das Stroma gepresst wurde. Das luminal gelegene Stroma endometrii ist kompakt. Das Epithel des Endometriums wies keine lichtmikroskopisch sichtbaren Schäden auf. Das Uteruslumen nahm stark an Größe zu.

Frühere elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen ein großes uterines Lumen, in dem sich Zellfragmente befinden. Das Epithel des Endometriums ist zerstört. Vakuolige Auftreibungen der Mitochondrien und des Zytoplasmas sind im Stroma sichtbar. Die Blutgefäße im Stroma sind zerrissen. Ursache dieser Schäden ist der Druck, mit dem die Flüssigkeit durch das Lumen fließt. Trotz hohem Druck rupturiert der Uterus nicht. Die initiale

Passage der Flüssigkeit durch das Lumen führt zu den meisten Schäden. Deshalb sollen die Lösungen sehr langsam durch den Uterus geleitet werden (Martin, 1984).



**Abbildung 5.6** Uterus der Maus, unbehandelt und 1,5 Stunden superfundiert

HE-Färbung

E – Epithel des Endometriums, ST – Stroma endometrii,

D – Drüsenepithel, M – Myometrium

Der Vorteil der Superfusion, im Gegensatz zur Perfusion, Mikrodialyse oder Injektion besteht darin, daß die Testsubstanz in direkten Kontakt mit dem Uterusepithel tritt. Das Hormon kann unmittelbar und ohne vorher im Organismus verändert zu werden, auf die Zielzellen einwirken. Deshalb traten verschiedene Wirkungen vermutlich schneller ein. Bei den hoch dosierten Hormonkonzentrationen bestand weiterhin die Möglichkeit, daß das Hormon in das Gewebe des Uterus diffundierte und eine schnellere Wirkung hervorrufen konnte als bei den niedrig dosierten Konzentrationen.

Um die Superfusion zu verbessern sollte Sauerstoff nicht nur in das den Uterus umgebende Medium, sondern zusätzlich in die Testsubstanz eingeleitet werden. Dadurch steigt der Sau-

---

erstoffpartialdruck im Gewebe und hypoxische Veränderungen werden vermieden. Weiterhin sollte die Durchflußgeschwindigkeit gesenkt werden. Schäden am Endometrium und im Stroma werden vermieden.