Aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
im Zentrum Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
sowie
aus der ehem. Abteilung Reproduktionsbiologie
(ehem. Leiter Prof. Dr. J. K. Hodges)
des Deutschen Primatenzentrums Göttingen

Qualitative und quantitative Untersuchungen der Ovarien des in Gefangenschaft lebenden Weißbüschelaffen (Callithrix jacchus) in Relation zu kritischen physiologischen und biochemischen Indikatoren im Zusammenhang mit Übergewicht

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Johanna Bernhard
aus Karlsruhe

Göttingen 2010

Dekan: **Prof. Dr. med. C. Frömmel**

I. Berichterstatter: **Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker**

II. Berichterstatter/in: **Prof. Dr. med. W. Wuttke**

Tag der mündlichen Prüfung: **08. November 2010**

1 Inhaltsverzeichnis

1 INHALTSVERZEICHNIS 3

2 EINLEITUNG 6

2.1 Callithrix jacchus - der Weißbüschelaffe 6

2.1.1 In der Wildbahn 6

2.1.2 In Gefangenschaft 6

2.2 Grundlagen der Reproduktion beim Callithrix-jacchus-Weibchen 7

2.3 Physiologie des Ovars des Callithrix jacchus 8

2.4 Der ovarielle Zyklus des Callithrix jacchus 9

2.5 Steroidhormonsynthese im Ovar des Callithrix jacchus 10

2.6 Metabolisches Syndrom 11

2.7 Ziele 11

3 MATERIAL UND METHODEN 13

3.1 Rahmenbedingungen zu den untersuchten Ovarien 13

3.2 Entnahme der Ovarien 13

3.3 Präparation der Ovarien 13

3.4 Präparatanfertigung 14

3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 14

3.6 Aufnahme und Beurteilung der Präparate 14

3.6.1 Aufnahme und Vermessung 15

3.6.2 Beurteilungsdefinitionen 15

3.7 Immunhistologische Färbungen 16

3.7.1 Immunhistologische ZP3-Färbung 16

3.7.2 Immunofluoreszenzdoppelfärbung ZP3/ Ki67 16

3.7.3 Doppelmarkierung im Ventana Nexes (MHC-II/CD3) 17

3.8 Blutkollektion 17

3.9 Hormonmessungen ... 17

3.9.1 Progesteronbestimmung ... 17

3.9.2 Gesamtöstrogenmessung ... 18

3.9.3 Androstendionbestimmung ... 18

3.10 Weitere Serummessungen ... 19

3.10.1 Triglyzeridbestimmung ... 19

3.11 Glukosetoleranztest ... 19

3.12 Trijodthyronin/Tetrajodthyroninbestimmung ... 19

3.13 Statistische Methoden und graphische Darstellung ... 20

4 ERGEBNISSE ... 21

4.1 Einteilungsgrundlage ... 21

4.2 Follikelanzahl und -beschaffenheit im Zusammenhang mit CL-Menge und Aktivität ... 24

4.2.1 Primordialfollikel ... 24

4.2.2 Primärfollikel ... 25

4.2.3 Sekundärfollikel ... 26

4.2.4 Tertiär- und Graafsche Follikel ... 29

4.2.5 Atresie allgemein ... 33

4.3 Weitere Gewebemerkmale und ihre Abhängigkeiten ... 35

4.3.1 Weitere Abhängigkeiten zum CL-Gewebe ... 35

4.3.2 Beziehungen des durchlöcherten Stromas zu CL-Gewebe und anderen nicht-ovariellen Co-Variablen ... 38

4.3.3 Identifikation des Zona-pellucida-Materials ... 41

4.3.4 MHC-II / CD3 ... 43

4.3.5 Zona-pellucida-3-/ Ki67 - Immunofluoreszenzfärbung ... 46

4.4 Zusammenhänge aller Ovarien und deren Charakteristiken in Bezug auf Gewicht und andere gewichtsbezogene Relationen ... 47

4.4.1 Gewicht und Schnittvermessungen 47

4.4.2 Gewicht, Taillenumfang und Triglyzeride 49

4.4.3 Gewicht und Hormonmessungen 50

4.5 Glukosetoleranztests 54

4.6 Freies Trijodthyronin/ freies Tetrajodthyronin 55

5 DISKUSSION 56

5.1 Gruppierung der Ovarien, basiert auf den CL-Gewebetypen, als Grundlage der Analysen 56

5.2 Verhältnis zwischen Typ und Menge des CL-Gewebes, der follikulären Reserve und der Follikelrekrutierung 58

5.3 CL-Gewebe und Atresie 59

5.4 Atresie, Follikelreste und der Verlust des Stromas im Inneren des Ovars 61

5.5 Dynamik der CL-Lebenszeit und Funktion werden durch Gonadotropine kontrolliert 63

5.6 Beziehung zwischen Körpergewicht und ovariellem CL-Gewebe 64

5.7 Diabetes mellitus Typ II und damit verbundene Insulinresistenz, zusammen mit den ovariellen Symptomen, erinnern an das Polyzystische Ovar 65

5.8 Wirkung von Hyperinsulinämie bzw. Insulinresistenz auf das Ovar 67

5.9 Rolle und Ursprung von Androstendion im Balanceverlust der Ovarien 68

5.10 Die Rolle von Androgenen bei der Aufrechterhaltung der CL-Funktion 71

5.11 Die Rolle des Metabolischen Syndroms und die Folgen der Hyperinsulinämie 71

6 ZUSAMMENFASSUNG 75

7 LITERATUR 77

2 Einleitung

2.1 Callithrix jacchus - der Weißbüschelaffe

2.1.1 In der Wildbahn

Callithrix jacchus ist ein Neuweltprimat mit rascher Generationenfolge, der in der Forschung in vielen Bereichen für Untersuchungen herangezogen wird. Callthrix jacchus kommt in der Wildbahn ausschließlich im nördlichen Brasilien, sowie um die großen Städte Brasiliens vor. Die in der Wildbahn lebenden Callithrix-jacchus-Affen bilden Familienverbände mit meist einem, manchmal auch mit mehreren sich fortpflanzenden Weibchen, sowie einem Paarungsmännchen. Die restlichen weiblichen Tiere im Verband sind währenddessen auch vom sexuellen Zyklus her nicht aktiv (Lang 2005). Die Wurfgröße der Callithrix-jacchus-Affen in der Wildbahn ist ein bis zwei Junge, welche durch den Familienverband aufgezogen werden (Lang 2005). Die Ernährung der Tiere besteht zu einem großen Teil aus Gummi und Baumsäften, sowie Früchten, Insekten, Eidechsen, Eiern und kleinen Vögeln. Während des Tages sind die Tiere bis zu 70 Prozent der Zeit mit der Suche und Gewinnung von Baumexsudaten beschäftigt, vor allem in der Zeit, in der Früchte rar sind (Lang 2005). Die Suche nach Insekten beschäftigt sie die restliche Zeit des Tages.

2.1.2 In Gefangenschaft

In Gefangenschaft jedoch werden die Tiere meist als Pärchen in Käfigen gehalten, bei ähnlicher Temperatur und Luftfeuchtigkeit wie in der Wildbahn. Jedoch ist der unermüdliche Bewegungstrieb der Tiere durch das deutlich reduzierte Platzangebot sehr eingeschränkt. Des Weiteren bekommen die Tiere ihr Futter ad libitum in Form von gepresster, kohlenhydratreicher, süßer Kost - ergänzt durch frische Kost, wechselnd jeden Tag. Viele der Tiere fressen somit deutlich zu viel bei viel weniger Bewegung als in der Wildbahn, sowie bei deutlich kohlenhydratreicherer Kost. Dies hat zur Folge, dass im Gegensatz zu den in der freien Wildbahn lebenden weiblichen Tieren, die ein Gewicht von durchschnittlich 256g haben, die in der Gefangenschaft lebenden weiblichen Tiere in unserer Kolonie ein Durchschnittsgewicht von 411g haben (Wedi 2010).

Ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen den in der Wildbahn lebenden Tieren und den in Gefangenschaft lebenden ist die Anzahl der Jungen pro Wurf. Callithrix-jacchus-Affen können bis zu zwei Mal pro Jahr werfen, mit einer mittleren Schwangerschaftszeit von knapp 5 Monaten. Pro Wurf werden in der Wildbahn meist Zwillinge geboren, in Gefangenschaft,

abhängig vom Gewicht des Weibchens, bis zu Fünflinge. Die Fortpflanzungsfrequenz in der Wildbahn kann in den nahrungsarmen Zeiten teilweise zu einem Ausfall eines Wurfes führen, oder aber nur zu Einlingsgeburten. Die Wurfgröße in der Gefangenschaft ist mit dem Gewicht und der Ernährung verbunden (Tardif und Jaquish 1997), jedoch sind die genauen physiologischen Hintergründe bislang noch unklar. Doch die Anzahl an Ovulationen ist mit dem Gewicht des Callithrix jacchus assoziiert (Tardif und Jaquish 1997). So war die Drillingsrate im Jahre 2007 in unserer Kolonie bei etwa 65 % (Wedi 2010). Für Tiere in Gefangenschaft sind jedoch auch andere Pathologien beschrieben, die unseren Ansatz untermauern, wie inflammatorische Veränderungen des Intestinatraktes, sowie Leberveränderungen, Cholezystitiden, Nierenveränderungen und in 20 % der Ovarien eine luteale Hyperplasie (Kaspareit et al. 2006).

2.2 Grundlagen der Reproduktion beim Callithrix-jacchus-Weibchen

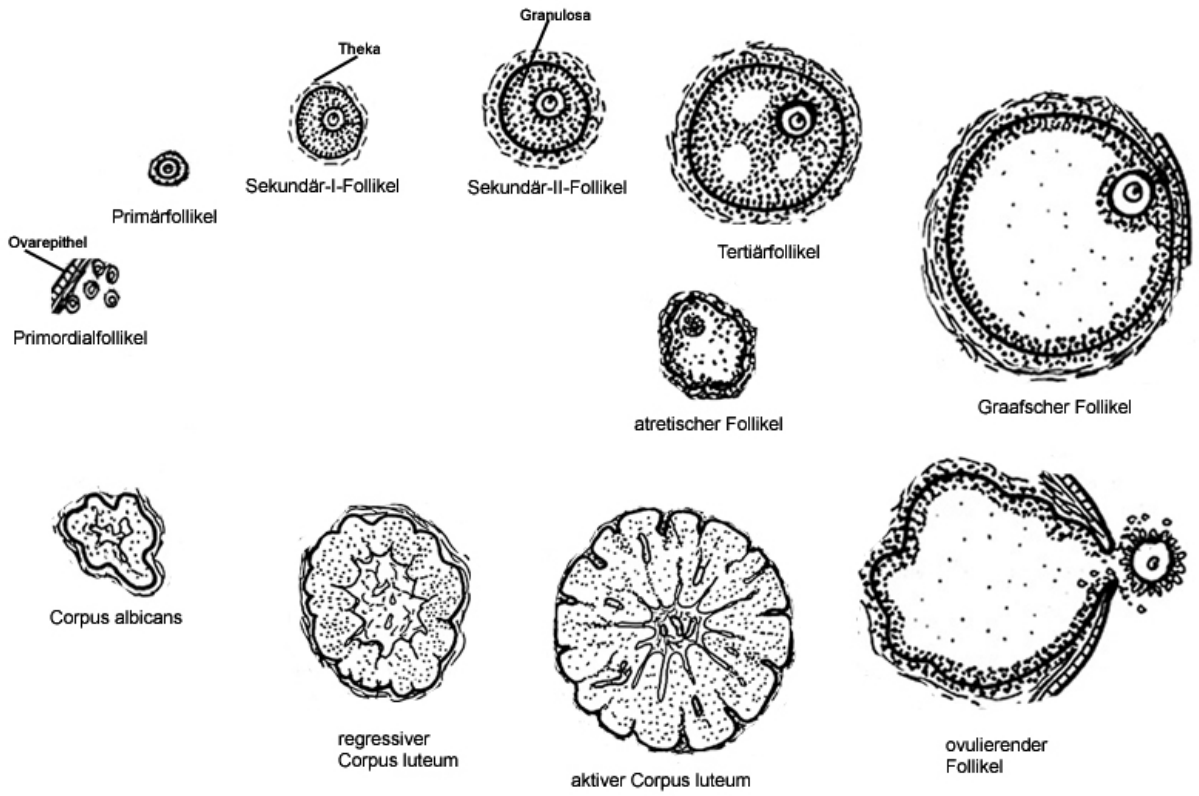
Callithrix-jacchus-Weibchen sind in einem Alter von 1 Jahr und 8 Monaten erwachsen und voll geschlechtsreif und haben in Gefangenschaft eine Lebenszeit von durchschnittlich fünf bis sieben Jahren bei einer maximalen Lebenszeit von 17 Jahren (Tardif et al. 2008), wobei, bedingt durch die Euthanisierung, sowie Einbringung der Tiere in Versuche, die durchschnittliche maximale Lebenszeit nicht genau bestimmt werden kann.

Callithrix-jacchus-Weibchen haben einen durchschnittlich 28-tägigen Zyklus, der nicht durch eine Abbruchblutung gekennzeichnet ist. Somit ist die Bestimmung des Zyklus auf die Hormonbestimmung im Blut angewiesen. Für die follikuläre Phase gilt ein Progesteronlevel von kleiner als 10 ng/ml, sowie größer als 80 ng/ml postovulatorisch (Nievergelt und Pryce 1996). Callithrix-jacchus-Weibchen zeigen des Weiteren Ovulationen bis nahe ihrer maximalen Lebenszeit (Tardif et al. 2008).

Da auch die Ernährungsweisen in Gefangenschaft, sowie ein nahezu analoger Aufbau des Gastrointestinaltraktes denen des Menschen sehr ähneln (Schlumbohm et al. 2005), kann Callithrix jacchus als Modell für Untersuchungen, bezogen auf den Menschen, herangezogen werden. Der Vorteil gegenüber Altweltprimaten, welche ebenfalls in den meisten medizinischen Bereichen wie Krankheiten und Lebensstil, insbesondere auch Übergewicht und Diabetes Mellitus, starke Ähnlichkeiten mit dem Menschen zeigen, ist die rasche Generationenfolge (Tardif et al. 2009).

2.3 Physiologie des Ovars des Callithrix jacchus

Das Ovar ist physiologisch einem 28-tägigen Zyklus unterworfen, welcher durch die hypothalamische-hypophysäre-ovarielle-Achse gesteuert wird. Im Ovar selbst findet eine etwa 12-tägige follikuläre Phase statt, in der die Heranreifung von einem oder zwei Follikeln bis zur Sprungreife stattfindet. Bei Callithrix-jacchus-Weibchen in der Wildbahn reifen in der Regel zwei Oozyten heran, in der Gefangenschaft regelhaft drei. Währenddessen liegen immer mehrere Stadien der Follikelentwicklung parallel im Ovar vor. Die Follikulogenese ist vor allem im Bereich der Follikelrekrutierung aus der Primordialfollikelreserve zu weiten Teilen noch unklar (Adhikari und Liu 2009). Der Verlust der Primordialfollikelreserve ist die natürliche Begrenzung der Reproduktivität: für Tamarinen wird beschrieben, dass die follikuläre Reserve mit dem Alter sinkt, es mit dem Alter weniger Tertiärfollikel gibt und auch weniger der Follikel das Graafsche Follikelstadium erreichen (Tardif et al. 2008). Das gleiche gilt auch für andere Spezies. Nach der Aktivierung einiger der Primordialfollikel entwickeln sich die Follikel über das Stadium der Primärfollikel mit erstmals einer Granulosazellschicht über das Sekundärstadium I, das Sekundärstadium II mit erstmal einer Thekazellschicht, über das Tertiärstadium mit einem erstmals erkennbaren Antrum hin zum Graafschen, sprungreifen Follikel. Auf dem Weg dorthin werden einige der Follikel der fortgeschrittenen Entwicklungsstufen atretisch, da nur ein bis zwei Follikel pro Zyklus das Stadium der Sprungreife erreichen sollten. Nach dem Oozytensprung entwickelt sich aus den Resten der Sprunghülle, also der Theka und Granulosa, das Corpus luteum, das sich bei fehlender positiver Rückkopplung durch hCG apoptotisch zurückbildet.



Grafik 1: Follikelentwicklung modifiziert nach ©Gray's Anatomy (Bannister und Dyson 1995, S. 1864)

Im Laufe der Lebenszeit weiblicher Tiere findet eine langsam fortschreitende, ab einem gewissen Alter expotentiell zunehmende Rekrutierung und Apoptose von Primordialfollikeln statt, welche zusammen zu einer Follikelreservendepletierung führt und damit die Menopause einläutet. Callithrix jacchus jedoch hat vermutlich bis nahe seiner maximalen Lebenszeit Ovulationen (Tardif et al. 2008).

2.4 Der ovarielle Zyklus des Callithrix jacchus

Die verschiedenen Stadien des Zyklus sind durch bestimmte Hormone stark beeinflusst: im Stadium der frühen follikulären Phase (FP) ist das Hypophysenhormon FSH vorherrschend, welches auf die Granulosa der größeren Follikel wirkt (Gore-Langton und Armstrong 1994; Harlow et al. 1984) und dort die Produktion des Östradiols fördert. Des Weiteren stimuliert FSH über einen bis heute unverstandenen Mechanismus, der durch eine Veränderung des Glykolisierungsmusters gekennzeichnet sein könnte (Nayudu und Ulloa-Aguirre 2010), zumal Primordialfollikel keine FSH-Rezeptoren exprimieren, die Primordialfollikelrekrutierung (Adhikari und Liu 2009). Mit steigendem Östrogenspiegel fällt durch negative Rückkopplung zur späten follikulären Phase hin das FSH und die LH-Produktion und die Speicherung in der

Hypophyse beginnt. Mit der Zeit bewirkt das LH die partielle Luteinisierung des präovulatorischen Follikels, so dass es zu einem präovulatorischen Progesteronanstieg kommt, der wiederum zusammen mit den Östrogenen eine positive Rückkopplung auf die Hypophyse ausübt, worauf eine massive LH-Ausschüttung stattfindet. Im Zuge dessen findet eine Luteinisierung der Granulosa statt, die wiederum anfängt Progesteron zu produzieren. Nach dem Sprung der Oozyte am Tag 14 beginnt eine massive Angiogenese mit zeitgleicher weiterer Luteinisierung der Granulosa und der restlichen Theka. Dies bewirkt einen massiven Progesteronanstieg, sowie weiter einen leichten Östrogenanstieg mit einer negativen Rückkopplung auf die Hypophyse und damit einer Suppression von LH und FSH. In der darauf folgenden Zeit produziert das CL vornehmlich Progesteron, um die intrauterine Schleimhaut zur Sekretion zu bringen und um die Einnistung der potentiell befruchteten Oozyten vorzubereiten. Fällt die Rückkopplung durch das im Falle der Einnistung freigesetzten hCG aus dem direkten Umfeld der Oozyte aus, so wird das CL apoptotisch und beginnt rasch seinen Abbau. Innerhalb von wenigen Tagen fällt damit der Progesteronspiegel im Blut so weit, dass beim Menschen eine Abbruchblutung einsetzt, beim Callithrix jacchus eine Rückbildung der Schleimhaut. Damit kann ein neuer Zyklus beginnen. Mit fortschreitendem Umbau des CLs in Bindegewebe durch Apoptose und Phagozytose (Goyeneche et al. 2002) steigt zum Ende der Lutealphase FSH wieder an.

Die Steroidhormonproduktion wird von allen Geweben des Ovars übernommen. Alle Gewebe sind in der Lage alle drei Klassen Steroidhormone de novo zu synthetisieren (McNatty et al. 1979), jedoch mit unterschiedlicher Kapazität.

2.5 Steroidhormonsynthese im Ovar des Callithrix jacchus

Das CL nutzt vornehmlich LDL als Steroidsubstrat, um Progesteron als sein Hauptprodukt zu produzieren (Usadi und Fritz 2003), doch produzieren die großen Lutealzellen, wie auch vermutlich die Paralutealzellen ebenso auch Androstendion und Östrogene (Hild-Petito et al. 1989; Husen et al. 2003). Durch die eigene Produktion von Androstendion und durch die auf den Lutealzellen vorhandenen Androgenrezeptoren erhält das CL sich selbst am Leben, da die Progesteronproduktion stimuliert (Goyeneche et al. 2002).

Die Granulosa als erste Zellschicht um die Follikel, die damit Primärfollikel sind, produziert vornehmlich Östrogene. Stimuliert durch FSH rekrutieren die Granulosazellen Lipoproteine und Cholesterin, um Steroidsynthese zu betreiben. Auch dieser Mechanismus wird durch Androgene gesteigert (Schreiber et al. 1984). Diese Östrogene produziert die Granulosa

vornehmlich, um ein östrogenreiches Milieu für den heranwachsenden Follikel zu schaffen, da dies die Granulosazellproliferation braucht (McNatty et al. 1979).

In geringem Maße kann die Granulosa auch Androstendion und Progesteron produzieren (Gore-Langton und Armstrong 1994; McNatty et al. 1979), jedoch vornehmlich, sobald die Transformation der Granulosa in luteinisierte Granulosa erfolgt ist und damit die Östrogenproduktion nahezu zum Erliegen gekommen ist (McNatty et al. 1979). Auch die Granulosazellen exprimieren den Androgenrezeptor (Goyeneche et al. 2002), jedoch gibt es hierauf eine Androgenlevel-abhängige Reaktion.

Die Thekazellschicht, welche sich ab dem Sekundärstadium II darstellt, produziert vornehmlich Androgene, welche als Substrat für die Östrogenproduktion mittels der Aromatase in der Granulosa gebraucht wird (Goyeneche et al. 2002). Diese Androgenproduktion wird durch LH stimuliert (Gore-Langton und Armstrong 1994; Magoffin 2004). Jedoch besitzt auch die Theka die Kapazität alle drei Klassen an Steroiden zu synthetisieren (McNatty et al. 1979).

2.6 Metabolisches Syndrom

Das Metabolische Syndrom ist für den Menschen definiert über die Kriterien der European Group for Study of Insulin resistance 1999; diese Kriterien bestehen aus Insulinresistenz und zwei oder mehr der weiteren Kriterien: zentrales Übergewicht und Taillenumfang, Dyslipidämie mit erhöhten Triglyzeriden oder erniedrigtem HDL, erhöhtem Blutdruck und erhöhter Nüchternglukose (Gogia und Agarwal 2006). Für Callithrix-jacchus-Affen gibt es keine eigene Definition des metabolischen Syndroms, jedoch einen Versuch der Schaffung von Grenzwerten von Tardif (Tardif et al. 2009) und Schlumbohm (Schlumbohm 2008). Hierbei werden die gleichen Kriterien angebracht wie beim Menschen.

2.7 Ziele

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Gesundheitsstatus der Ovarien des Callithrix jacchus in unserer Kolonie zu untersuchen und zu versuchen zu verstehen, welche sowohl intraovariellen als auch extraovariellen Faktoren mit dem Gesundheitsstatus der Ovarien in Verbindung stehen. In diesem Zusammenhang untersuchten wir die Relation zwischen der Anwesenheit und der Menge an CL-Gewebe in der mittleren follikulären Phase, der ovariellen Follikelreserve, der Induktion von Follikelatresie, der Steroidhormonbalance sowie der systemischen Zusammenhänge wie Gewicht, Glukosetoleranz und Fettstoffwechsel. Des

Weiteren werden mögliche Zusammenhänge zwischen verfrühter ovarieller Alterung und dem Metabolischen Syndrom beleuchtet.

3 Material und Methoden

Alle tierexperimentellen Versuche wurden im Rahmen des Votums des Tierversuchsantrags mit dem Zeichen 33.42502/08-01.03 durchgeführt.

3.1 Rahmenbedingungen zu den untersuchten Ovarien

Grundlegend für die Untersuchung waren die formalinfixierten Ovarien von insgesamt 48 Callithrix-jacchus-Weibchen im Alter zwischen 1 Jahr und 10 Monaten und 4 Jahren (Median = 2,5 Jahre), die randomisiert in die Untersuchung aufgenommen wurden. Beurteilt wurden je 3 HE-gefärbte Schnitte eines Ovars eines Tieres. Die Tiere wurden für die Entnahme entweder euthanasiert oder nach der Ovarektomie als sterilisierte Partner wieder zurückgeführt. Die jeweils zweiten Ovarien bzw. die anderen Anteile der Tiere wurden anderen Experimenten zugeführt.

3.2 Entnahme der Ovarien

Durch Nievergelt und Pryce (Nievergelt und Pryce 1996) wurden die Progesteronspiegel für Callithrix jacchus auf < 10 ng/ml präovulatorisch und bis zu 80 ng/ml postovulatorisch beschrieben. Bei einem Progesteronspiegel unter 10 ng/ml in der Follikelphase, erfolgte die Entnahme. Zur Entnahme der Ovarien wurden die Tiere 12 Stunden nüchtern gehalten und anschließend mit der Göttinger Mischung II (0,1 ml/100 g Tier) und Valium (0,05 ml/Tier) anästhesiert. 10 ml Göttinger Mischung II bestehen aus 5 ml Ketavet® (Ketamin) + 1 ml Rompun® (Xylzine) + 0,1 ml Atropinum sulfuricum (1 %) und NaCl 3,9 ml. Vor Beginn der Operation wurden die Tiere vermessen und gewogen. Die Ovarien wurden sofort entnommen. Im Falle der Euthanisierung der Tiere wurde ihnen im narkotisierten Zustand Herzblut bis zum Herzstillstand abgenommen und damit die Tiere euthanasiert.

3.3 Präparation der Ovarien

Nach der Entnahme wurden die Ovarien in 3,5 % Formalinlösung fixiert. Diese besteht aus 35 % Formaldehydlösung 1:10 verdünnt mit Phosphatpuffer (NaH_2PO_4 x H_2O 4 g/L und NaH_2PO_4 wasserfrei 6,5 g/L, pH 7,0).

Pro 1 cm³ wurden ca. 15 ml Fixierlösung eingesetzt und für etwa 4 bis 6 Stunden bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Organstücke in Einbettkassetten gelegt und ca. 30 bis 60 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend erfolgte die Einbettung

über Shandon Hypercenter XP: zunächst in H_2O bei RT für 2 h 30 min, dann in aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %) bei 35°C jeweils 45 min zweimal in Chloroform bei RT für 45 min und zwei Mal in Paraffin bei 60°C (1 h und 1 h 30 min). Jeder Schritt war gefolgt von je 30 minütigem Abtropfen. Anschließend wurden die Ovarstücke in einer Metallform ausgerichtet und mit flüssigem, 60°C warmem Paraffin überschichtet.

3.4 Präparatanfertigung

Die in Paraffin eingebetteten Ovarien wurden als 5 µm dünne Schichten geschnitten und nach warmem Wasserbad in der Reihenfolge des Schneidens auf beschichtete Objektträger (Histoslides) übertragen. Daraufhin wurden die Schnitte bei 42°C für 24 h getrocknet. Jeder Schnitt zeigte das Gefäß-Nerven-Bündel dem Verlauf nach angeschnitten, wodurch der Verlauf des Schnittes durch die Mitte des Ovars sichergestellt wurde.

3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden jeweils drei Schnitte ausgewählt, die minimal 50 µm von einander entfernt waren, so dass Primordial- und Primärfollikel nicht zwei Mal angeschnitten waren. Die Schnitte wurden zunächst in Xylol entparaffiniert (5 min, 2 min, 2 min), dann in absteigender Alkoholreihe rehydriert (100 %, 96 % jeweils 2 min, 80 %, 70 % je 1 min). Anschließend erfolgte die Waschung in destilliertem H_2O für 1 min. Darauf folgte die Versetzung mit Hämatoxylin für 3 min, 10 minütiges Waschen unter fließendem Wasser, 5 minütiges Einlegen in wässrige Eosinlösung und erneut Waschen für 5 sec unter fließendem Wasser. Im Anschluss folgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) für jeweils 1 min und nochmals 100 % für 2 min. Nach dreimaliger Versetzung mit Xylol (1 min, 3 min, 3 min) wurden die Schnitte mit DePeX mounting medium (Gurr®) eingedeckt.

3.6 Aufnahme und Beurteilung der Präparate

Die HE-Färbung der Schnitte wurde als Basis für die morphologische Beurteilung herangezogen. Alle Werte sind begründet auf Absolutzahlen der jeweiligen Follikel pro Ovar - die Follikelzahlen pro Ovar sind das arithmetische Mittel aus Zählungen von drei Schnitten eines Ovars, die mindestens 50 µm von einander entfernt waren und durch die Mitte des Ovars gingen.

3.6.1 Aufnahme und Vermessung

Die HE-gefärbten Schnitte wurden mit einem Inversmikroskop von Olympus mit 4-facher optischer Vergrößerung fotografiert und die einzelnen Bilder mit Adope-Photoshop 7.0 manuell zusammengesetzt.

Auf Grund der zum Teil schon in Paraffin fixierten Ovarien zu Beginn der Untersuchungen konnte die Ovargröße nicht mehr ermittelt werden. Daher wurde die Schnittgröße durch die Mitte des Ovars als Parameter herangezogen.

Die Vermessung der Ovarfläche des Schnittes und der luteinisierten Gebiete erfolgte als Näherung mit der Ovaloidformel (л*a*b)/4, wobei a und b jeweils die senkrecht aufeinanderstehenden Durchmesser darstellten. Durchlöcherte Gebiete wurden näherungsweise mit ImageJ 1.39u vermessen.

3.6.2 Beurteilungsdefinitionen

Als Primordialfollikel wurden Follikel ohne erkennbare Granulosazellen ausgezählt. Follikel, die mehr als zwei cuboide Granulosazellen um sich hatten, wurden als Primärfollikel gezählt. Als Sekundärfollikel I wurden Follikel mit mehr als einer Granulosareihe ohne erkennbare Thekazellschicht, als Sekundärfollikel II Follikel mit mehr als einer Granulosareihe und erkennbarer Thekazellschicht ohne Antrum gezählt. Tertiärfollikel und Graafsche Follikel wurden zusammengefasst als Follikel mit erkennbarem Antrum und erkennbarer Thekazellschicht. Die Größe der Tertiär- und Graafschen Follikel wurde nicht vermessen, da auf den drei ausgezählten Schnitten nicht garantiert werden konnte, dass diese in der Mitte getroffen wurden.

Die Thekazellschichten der Sekundärfollikel II, der Tertiär- und Graafschen Follikel wurden auf ihre Form beurteilt und unterteilt in Schichten mit flachen oder runden Thekazellen. Bei der Betrachtung zeigte sich, dass die Ovarien deutliche Unterschiede in den Reservoirs an Primordialfollikeln hatten. Ebenfalls fiel auf, dass bei vielen Ovarien Corpora lutea (CL) und/oder Zellverbänden in Form von Corpora lutea ohne die von Fraser (Young et al. 1997) beschriebenen Lutealzellen (von uns als kleinzelliges Lutealgewebe bezeichnet) vorlagen. Außerdem zeigte sich bei vielen Ovarien durchlöchertes Stroma, sowie atretische Follikel jeden Stadiums. Als atretisch wurden Follikel definiert, deren Granulosazellen keinen Gewebeverband mehr darstellten. Die kleinen Überbleibsel, meist in der Region des durchlöcherten Stromas angesiedelt, wurden durch eine Zona-pellucida-3- Färbung (ZP3) als Oozytenrest verifiziert und daraufhin ausgezählt.

3.7 Immunhistologische Färbungen

3.7.1 Immunhistologische ZP3-Färbung

ZP3, als Bestandteil der Zona pellucida von Eizellen, wurde in einer immunhistologischen Färbung nachgewiesen, um die Eihüllenreste im Stroma nachzuweisen. Dafür wurden die Schnitte zunächst in Xylol entparaffiniert, in absteigender Ethanolreihe (je 2 mal 5 min 100 %, 90 %, 75 %, 50 %) rehydriert und in H_2O destilliert gewaschen. Dann wurden die Schnitte dreimal für 5 min in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt und auf RT abkühlen gelassen. Pro Schnitt wurden 50 µl Serum-Blockierungslösung aus Histostain® Bulk Kit für den primären Antikörper Kaninchen für 10 min aufgebracht. Danach wurde der Schnitt mit dem primären Antikörper ZP3 (Kaninchen-anti Mensch, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 verdünnt in PBS aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten dreimaliges Waschen für 5 min in PBS, Inkubation für 60 min mit dem sekundären Antikörper (aus dem Histostain® Bulk Kit für den primären Antikörper Kaninchen),10 min Inkubation mit Enzym Konjugat (aus dem Histostain® Bulk Kit für den primären Antikörper Kaninchen), wieder dreimaliges Waschen für 5 min in PBS, dann Visualisierung mit AEC-Kit (DAKO) für 20 min und zweimaliges Waschen in H_2O bidestilliert für 5 min. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaunlösung (Mayers) 1:10 in PBS verdünnt für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte je 5 min dehydriert in aufsteigender Ethanolreihe (50 %, 75 %, 90 %, 100 %), für je 5 min zweimal in Xylol gegeben und daraus mit DePeX mounting medium (Gurr®) eingedeckt. ZP3 diente als Nachweis für Reste der Zona pellucida - Teil der Oozytenhülle.

3.7.2 Immunofluoreszenzdoppelfärbung ZP3/ Ki67

Zona pellucida 3 und Ki67, ZP3 als Eizellhüllenbestandteil und Ki67 als Marker für Proliferation, wurden in einer Immunofluoreszenzdoppelfärbung nachgewiesen, um nach proliferierenden Granulosazellen in den verschiedenen Follikelphasen zu sehen. Dazu wurden die Schnitte zunächst in Xylol entparaffiniert, dann in absteigender Ethanolreihe (je zweimal 5 min 100 %, 90 %, 75 %, 50 %) rehydriert und in H_2O destilliert gewaschen. Dann wurden die Schnitte dreimal für 5 min in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt, auf RT abkühlen gelassen und 50 µl/Schnitt Serum-Blockierungssolution aus Histostain® Bulk Kit für den primären Antikörper Kaninchen für 10 min aufgetragen. Es folgte die Versetzung der Schnitte mit dem primären Antikörper ZP3 (Kaninchen-anti Mensch, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 verdünnt in PBS und Ki67 (Maus-anti Mensch, Novocastra™) 1:100 verdünnt in PBS mit Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Schnitte wurden dreimal 5 min in PBS gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (S11 Ziege - anti Kaninchen, Alexa Fluor 488 (grün)

und S35 Ziege - anti-Maus, Alexa Fluor 594 (rot)) je 1:200 in Blockpuffer (10 % BSA, 5 % FCS) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Darauf wurden sie dreimal 5 min in PBS gewaschen (im Dunkeln), eingedeckt mit Fluormount (DAKO) und in lichtdichten Kästen bei 4°C gelagert.

3.7.3 Doppelmarkierung im Ventana Nexes (MHC-II/CD3)

MHC-II als Rezeptor auf den antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und CD3 als Teil des T-Zellrezeptorkomplexes wurden nachgewiesen, um die entzündliche Aktivität im Ovar beurteilen zu können. Die Schnitte wurden entparaffiniert und in H_2O bidestilliert überführt. Die Antigendemaskierung wurde im Dampfkochtopf für 1 min mit 0,01 molarem Citratpuffer (pH = 6,0) durchgeführt und anschließend ca. 20 min im offenen Dampfkochtopf abkühlen gelassen. Die Schnitte wurden in H_2O bidestilliert überführt und anschließend im Ventana Nexes nach folgendem Protokoll behandelt: 1.) für ersten Antikörper (MHC-II Dako Code M0775) 10 min Inkubation mit Ziegenserum zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen; Titration des Primärantikörpers in 1:500 Verdünnung über 32 min; Detektion mit Ventana Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection Kit; 2.) für zweiten Antikörper (CD-3 T-Zell Dako Code N1580) Titration für 32 min mit der Ready-to-use Lösung des Antikörpers; Fixation 2 min mit Glutaraldehyd; Detektion mit Ventana iVIEW DAB Detection Kit; Gegenfärbung für 4 min mit Hämatoxylin; Bläuen für 4 min mit Blueing-Reagent. Anschließend wurden die Schnitte nach aufsteigender Alkohlreihe eingedeckt.

3.8 Blutkollektion

Für die Messungen wurden Blutproben aus der follikulären Phase (Progesteron < 10 ng/ml) und Blutproben aus der Lutealphase (Progesteron > 48 ng/ml) verwendet. Die Kollektion der Blutproben erfolgte routinemäßig zur Zykluskontrolle. Dazu wurden jeweils 200 µl Blut aus der Vena femoralis entnommen, mit Heparin versetzt und ein Teil des Serums der Progesteronmessung zugeführt. Der Rest des Serums wurde bei - 80°C bis zu den weiteren Messungen gelagert. Zu den Messungen wurden Blutproben möglichst des Todestages oder in zeitlicher Nähe zur Ovarektomie verwandt.

3.9 Hormonmessungen

3.9.1 Progesteronbestimmung

Das Serumprogesteron wurde mit Hilfe eines Enzymimmunoassays gemessen. In IgG-beschichtete Plattenvertiefungen wurden nach 4-maligem Spülen mit Waschpuffer (PBS,

pH = 7,2) je 50 µl spezifischer Antikörper (1:25000 in BSA-Puffer verdünnt, pH = 7,5), 50 µl Progesteronenzymlabel (1:250 in BSA-Puffer verdünnt, pH = 7,5) und 50 µl Serum (1:30 verdünnt in BSA-Puffer, pH = 7,5) bzw. den Standardproben (50 µl, 2,5-250 pg pro Vertiefung) gegeben. Die anschließende Inkubation bei 4°C lief über 18 h. Im Anschluss erfolgte wiederum Spülung mit Waschpuffer und Zugabe von 150 µl Streptavidin-Peroxidase (2000 ng/20 µl verdünnt in 16 ml BSA-Puffer). Nach einstündiger Inkubation auf dem Schüttler bei RT im Dunkeln erfolgte Zugabe von Stopppuffer (50 µl 2M H_2SO_4) mit anschließender Absorptionsmessung bei 450 nm auf einem Plattenleser. Parallele Messkurven wurden anhand von Progesteronstandards und -kontrollen durchgeführt. Qualitätskontrollen fanden mit jeder Messung statt.

3.9.2 Gesamtöstrogenmessung

Das immunoreaktive Gesamtöstrogen wurde ermittelt, indem es mit einem Antiserum gegen 1,3,5(10)-Östratrien-3,17β-Diol-17HS-BSA (Meyer et al. 1997) und Östradiol-17β gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (HRP) als Enzymkonjugat.versetzt wurde, das in Kaninchen erzeugt wurde. Die Serumproben wurden 1:5 in Puffer (0,04 M PBS, pH = 7,2) verdünnt und je 50 µl in Doppelbestimmung eingesetzt. Die zu überprüfenden Proben und die Estradiol-17β Standardproben (50 µl, 1.9-250 pg pro Vertiefung) wurden zusammen mit Estradiol-HRP-Enzymkonjugat (50 µl, 1:5000) und Antiserum (50 µl, 1:60000) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation und dem Waschen der Platten wurde jede Vertiefung mit 150 µl HRP-Substratlösung (3125 mg Tetramethylbenzidin in 250 µl Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)) gelöst in 17 ml Substratpuffer (0,05 M Zitronensäure mit 0,055 M Na_2HPO_4 und 0,005 M Hydrogen-Peroxid-Harnsäure) bestückt und anschließend die Platten im Dunklen bei RT für 60-90 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Enzymreaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 50 µl 2 M H_2SO_4 in jede Vertiefung und die Absorption wurde bei 450 nm auf einem Plattenleser gemessen. Die Sensitivität der Probendurchführung bei 90 %iger Bindung lag bei 1,5 pg. Anhand der Östrogen-Standards und Östrogen-Kontrollen wurden parallele Messkurven erstellt. Die Faktoren der Abweichung innerhalb der Probendurchführung, bemessen durch wiederholte Bestimmungen der hohen und tiefen Werte der Qualitätskontrolle, waren 18,97 % (tief - n = 12) und 5,39 % (hoch - n = 12).

3.9.3 Androstendionbestimmung

Androstendion im Serum wurde durch den Enzymimmunassay DSL-10-3800 Active® Kit ermittelt. In mit Ziegen-Anti-Kaninchen-Gammaglobulin-Serum beschichteten Mikrotiterplatten wurden die Seren 1:40 verdünnt in PBS (je 25 µl) und 100 µl

Androstendion-Enzymkonjugat (in Meerrettichperoxidase konjugiertes Androstendion in BSA) und 100 µl Androstendion-Antiserum (in BSA) eingebracht. Anschließend wurden die Platten für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert und dann 5-malig mit Mikrotiterplattenwaschlösung gewaschen. In jede Vertiefung wurden 100 µl TMB-Chromogen-Lösung (Tetramethylbenzidin in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid) gegeben und weitere 15 min auf einem Schüttler inkubiert. 100 µl Stopplösung (0,2 M $H2SO_4$) wurde zugegeben und die Absorption bei 450 nm auf einem Plattenleser gemessen. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und anhand der Androstendion-Standards und Androstendion-Kontrollen wurden parallele Messkurven erstellt. Die Faktoren der Abweichung innerhalb der Probendurchführung, bemessen durch wiederholte Bestimmungen der hohen und tiefen Werte der Qualitätskontrollen, waren 0 % (tief - n = 4) und 4,62 % (hoch - n = 4)

3.10 Weitere Serummessungen

3.10.1 Triglyzeridbestimmung

Triglyzeridwerte zur Blutfettbestimmung als Indikator für den Fettmetabolismus wurden mit dem Roche MODULAR System am Gerät ACN 781 bei Standardbedingungen bestimmt. Die Proben wurden 1:2 verdünnt mit PBS eingesetzt.

3.11 Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest wurde als Indikator für eine Glukosestoffwechselstörung der Tiere eingesetzt. Die Tiere wurden dafür über Nacht nüchtern gelassen; zunächst erfolgte eine Blutzuckermessung nüchtern mit handelsüblichem Blutzuckermessgerät (für alle Messungen das gleiche). Dann wurde den Tieren je 2 g Glukose / kg KG in Lösung verabreicht. Daraufhin erfolgten alle 20 min weitere Blutzuckermessungen aus Kapillarblut bis 120 min nach Glukoseverabreichung.

3.12 Trijodthyronin/Tetrajodthyroninbestimmung

Freies Trijodthyronin und freies Tetrajodthyronin wurden mit dem Modular Analytics E170 System bestimmt. Zunächst wurden 15 µl Probe und ein Ruthenium-Komplex markierter T3/T4-spezifischer Antikörper inkubiert. Nach Zugabe von biotinyliertem T3/T4 und Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln erfolgte die Zugabe von Antikörper-Hapten-Komplex. Es folgte eine weitere Inkubation. Dann wurde das Reaktionsgemisch in die

Messzelle überführt, wo Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert wurden. Danach wurden mit ProCell ungebundene Substanzen entfernt. Mit dem Photomultiplier wurden die Chemilumineszenzemissionen gemessen. Mittels gerätespezifischer Kalibrationskurve wurden die Ergebnisse vermittelt.

3.13 Statistische Methoden und graphische Darstellung

Der Zusammenhang zwischen den einzelnen Messgrößen wurde in Scatterplots dargestellt und weiterhin mit Pearson's Korrelationskoeffizient r quantifiziert. r kann Werte von -1 (negative Korrelation) bis +1 (positive Korrelation) annehmen. Werte nahe bei 0 sprechen für keine Korrelation. Zusätzlich wurde ein entsprechender Signifikanztest durchgeführt, der prüft, ob die Korrelation signifikant von 0 verschieden ist. P-Werte kleiner als 0.05 wurden hierbei als signifikant bewertet.

Zur Darstellung wurden des Weiteren Boxplots und Balkendiagramme verwendet. Als deskriptive Werte wurden Minimum, Maximum, Median, Standardabweichung, sowie erstes (Q1) (25%) und drittes (Q2) (75%) Quartil angegeben.

CL-Gewebe, Quotient Primordial-/Primärfollikel, atretische Follikel, Gewicht, Taillenumfang und Triglyzeride der Studiengruppen 1 und 4 wurden paarweise mit dem Mann-Whitney-U verglichen. Auch hier galten p-Wert < 0.05 als signifikant. Alle statistischen Analysen wurden mit Statistica (Version 8, StatSoft) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Einteilungsgrundlage

Auf den Schnitten der in der follikulären Phase entnommenen Ovarien zeigte sich eine unterschiedlich ausgeprägte Menge an luteinisiertem Gewebe als offensichtlichstes Unterscheidungsmerkmal. Da in der Follikelphase diese Strukturen nicht zu erwarten waren, wurde die Einteilung anhand dieser Strukturen vorgenommen. Des Weiteren erfolgte eine Unterteilung in vier Gruppen. CL-Gewebe mit vorwiegend großen Lutealzellen sind als großzelliges Lutealgewebe beschrieben, CL-Gewebe mit ausschließlich kleinen Zellen als kleinzelliges Lutealgewebe. Die Gruppen waren folgende: Gruppe 1 (G1) enthielt Ovarien mit großzelligem CL- und keinem kleinzelligen Lutealgewebe (n = 15); Gruppe 2 (G2) enthielt Ovarien mit großzelligem CL- und kleinzelligem Lutealgewebe (n = 12); Gruppe 3 (G3) enthielt Ovarien mit keinem CL- aber kleinzelligem Lutealgewebe (n = 15); Gruppe 4 (G4) enthielt Ovarien ohne Lutealstrukturen (n = 6), soweit dies auf den drei mindestens 50µm von einander entfernten Schnitten erkennbar war. Da die Gruppeneinteilung qualitativ erfolgte, gab es innerhalb der Gruppen deutliche Variationen in der Quantität.

Tabelle 1: Verteilung der Gewebetypen innerhalb der jeweiligen Gruppen

Gruppe	Gruppen-definition	Großzelliges CL-Gewebe in mm² (Median/ Q1/ Q2)	Kleinzelliges CL-Gewebe in mm² (Median/ Q1/ Q2)	Gesamtes CL-Gewebe in mm² (Median/ Q1/ Q2)	Prozentualer Anteil am Gesamt-schnitt
G1	Großzelliges und *kein* kleinzelliges CL-Gewebe	5,62/ 2,21/ 11,59	0/ 0/ 0	5,62/ 2,21/ 11,59	32,55
G2	Großzelliges und kleinzelliges CL-Gewebe	1,25/ 0,39/ 4,19	1,21/ 0,48/ 2,17	2,92/ 1.98/ 6,54	20,53
G3	Nur kleinzelliges CL-Gewebe	0/ 0/ 0	2,43/ 0,54/ 2,94	2,43/ 0,54/ 2,94	16,63
G4	Keinerlei CL-Gewebe	0/ 0/ 0	0/ 0/ 0	0/ 0/ 0	00,00

Die Progesteronmesswerte bei Entnahme lagen zwischen 1,5 ng/ml und 9,8 ng/ml mit einem Median von 2,15 ng/ml (Q1 = 1,15; Q2 = 4,3).

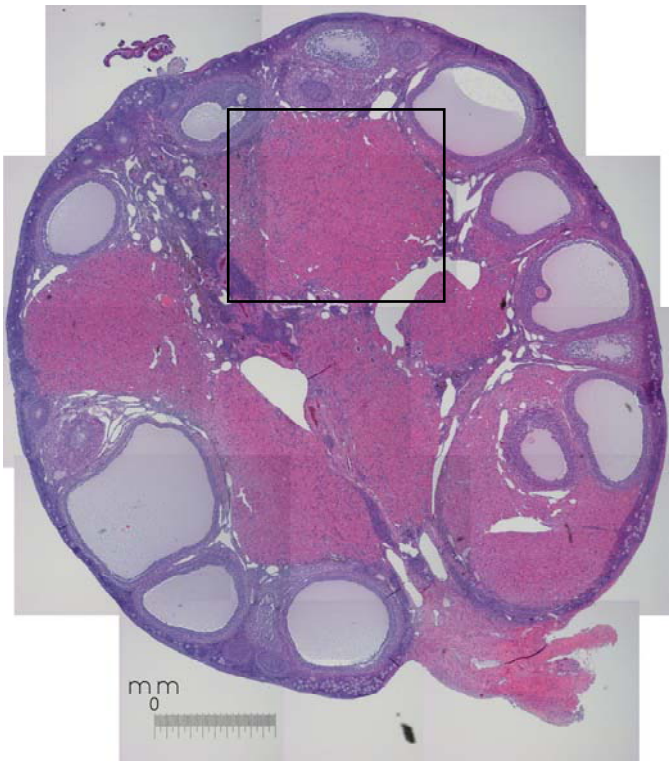


Abbildung 1: Beispiel Gruppe 1 einer HE-Färbung als Basis für grundlegende Beurteilungen -
Ausschnitt auf nächster Seite
Schnittgröße G1 im Median: 17,25 mm² (Q1 = 9,95; Q2 = 26,12)

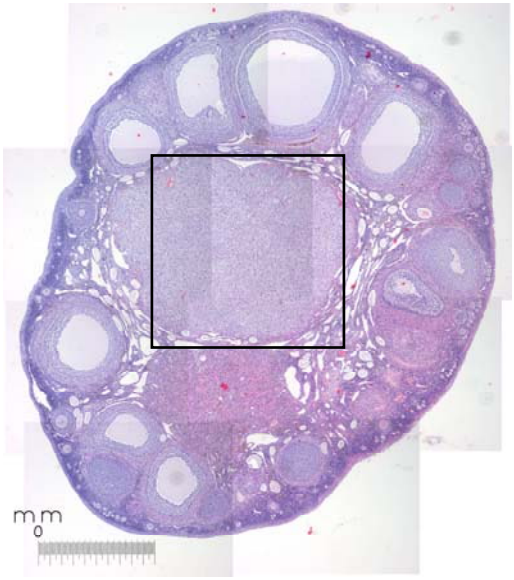


Abbildung 2: Beispiel Gruppe 2 einer HE-Färbung als Basis für grundlegende Beurteilungen -
Ausschnitt auf nächster Seite
Schnittgröße G2 im Median: 14,26 mm² (Q1 = 11,64; Q2 = 17,46)

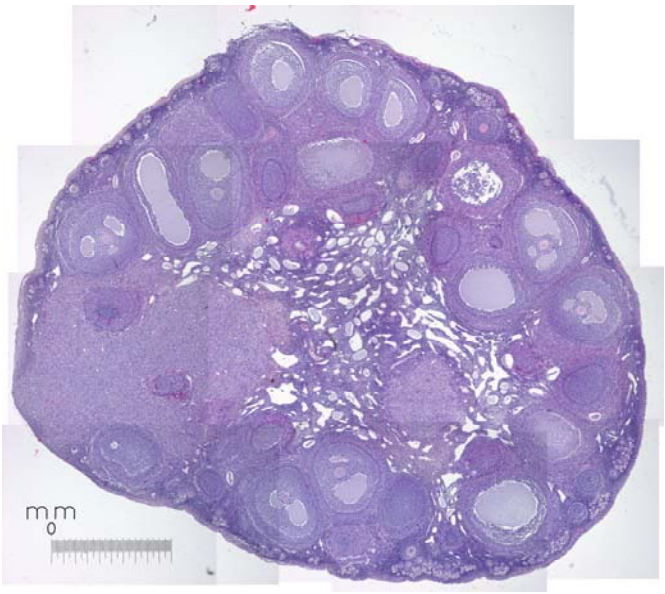


Abbildung 3: Beispiel Gruppe 3 einer HE-Färbung als Basis für grundlegende Beurteilungen
Schnittgröße G3 im Median: 14,64 mm² (Q1 = 10,26; Q2 = 17,63)

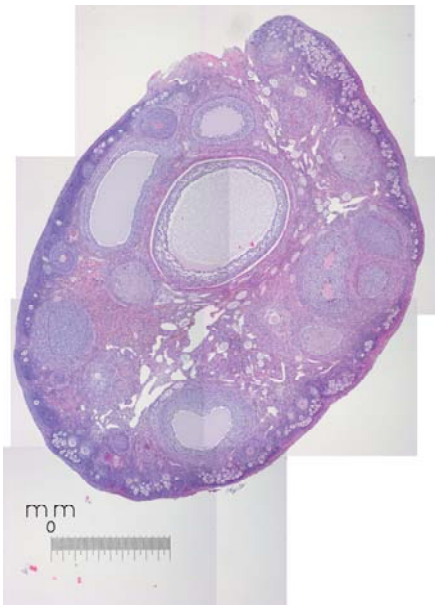


Abbildung 4: Beispiel Gruppe 4 einer HE-Färbung als Basis für grundlegende Beurteilungen
Schnittgröße G4 im Median: 10,32 mm² (Q1 = 6,52; Q2 = 15,74)

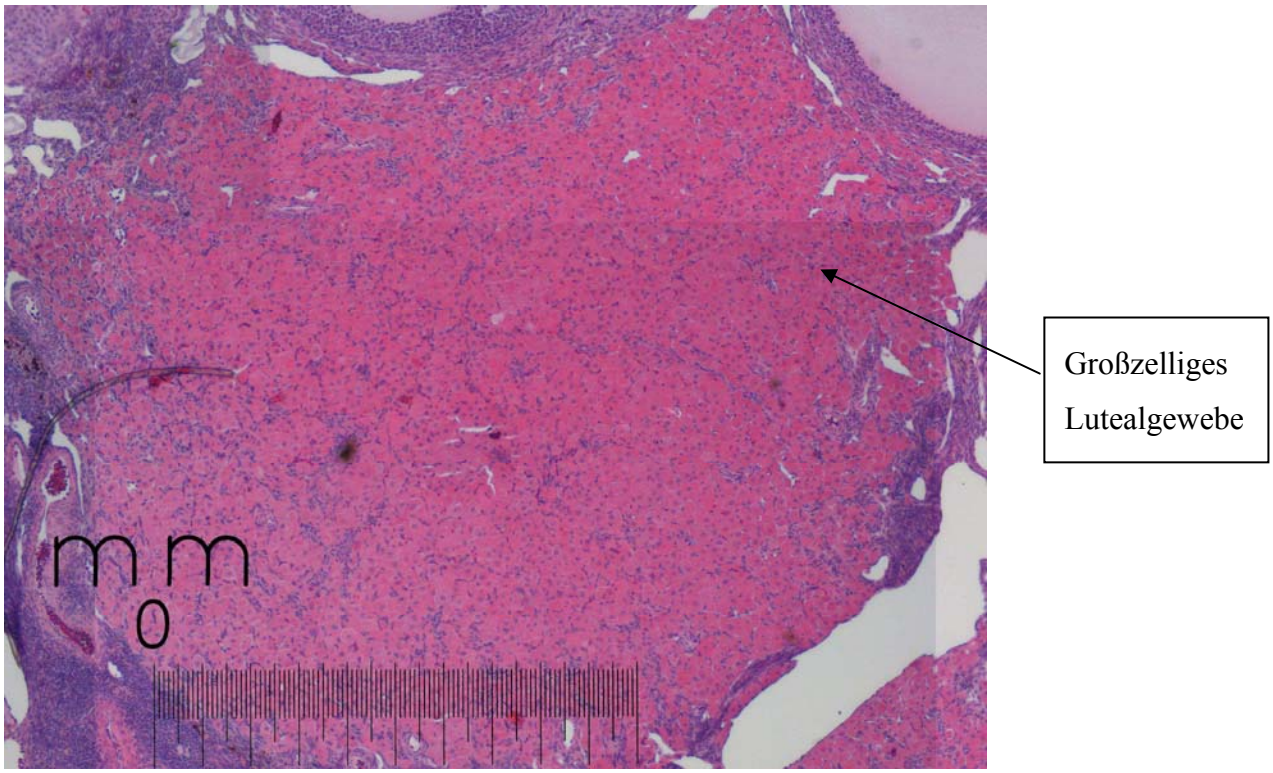


Abbildung 5: Ausschnitt aus Beispiel G1: großzelliges CL-Gewebe

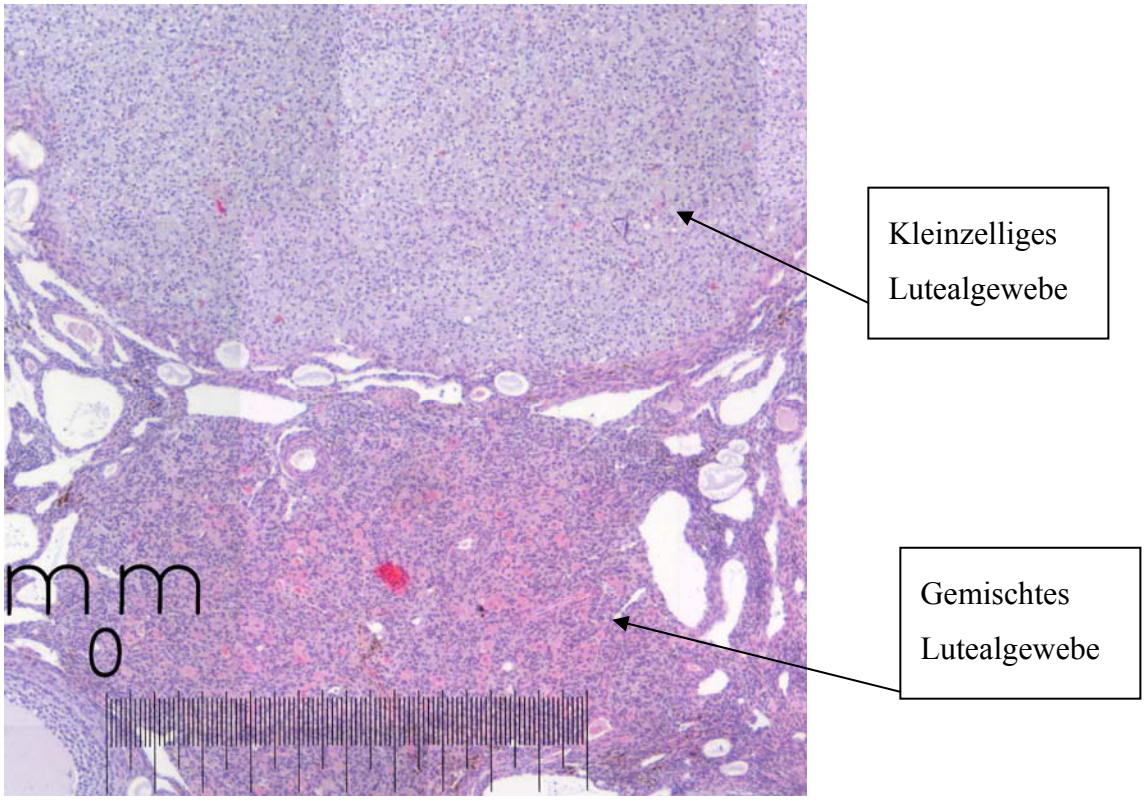


Abbildung 6: Ausschnitt aus Beispiel G2: kleinzelliges CL-Gewbe

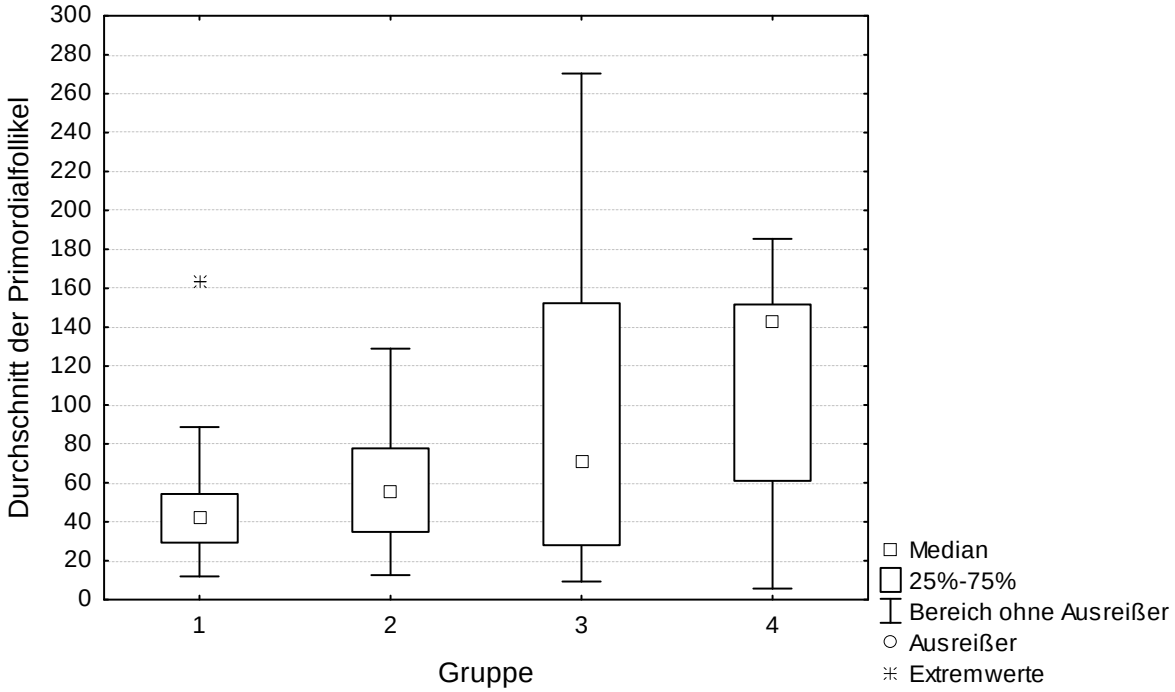
Nicht nur die einzelnen CL-Gewebeanteile veränderten sich über die Gruppen - auch die Menge des Gesamt-CL-Gewebes nahm über die Gruppen von G1 zu G4 signifikant ab (M-W-U-Test G1 zu G4 $p < 0{,}001$). Auch die in G2 summierten Flächen von großzelligem und kleinzelligem CL-Gewebe waren niedriger als in G1.

4.2 Follikelanzahl und -beschaffenheit im Zusammenhang mit CL-Menge und Aktivität

Zunächst werden nun CL-Zusammenhänge auf Ovarbasis beleuchtet - später auch Zusammenhänge bezogen auf die Tiere in der Gesamtheit.

4.2.1 Primordialfollikel

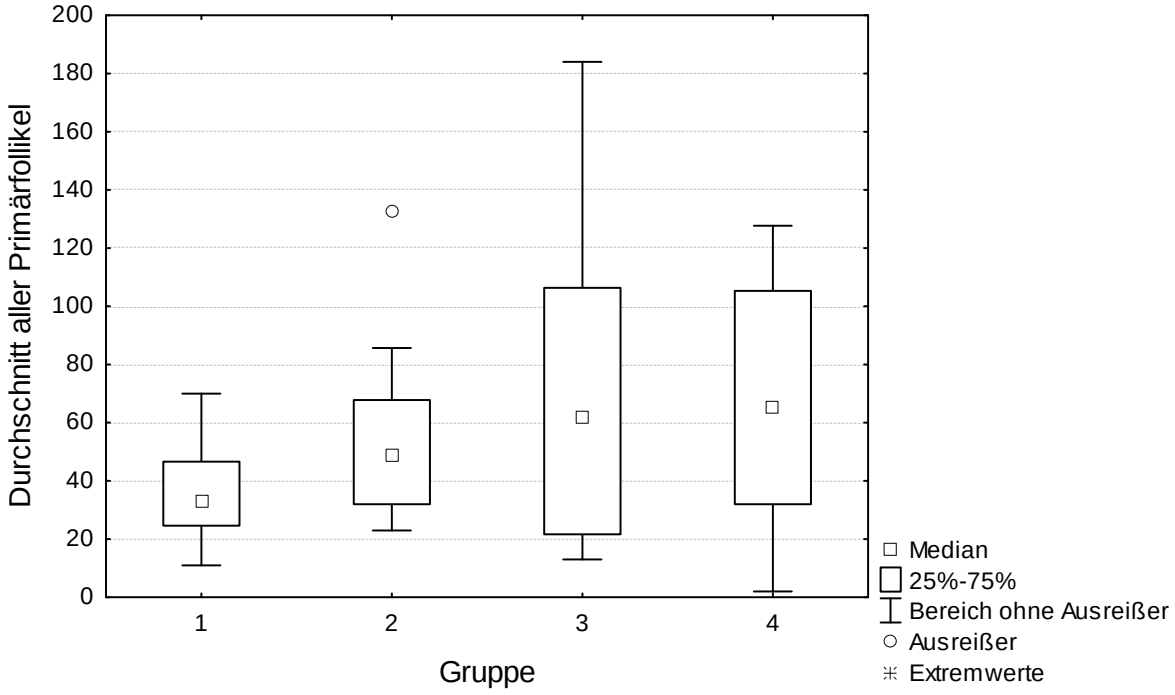
Im Median (Q1/ Q2) (G1 = 42 (29,33/ 54,33); G2 = 55,83 (34,83/ 77,67); G3 = 71,33 (28/ 152,33); G4 = 143,17 (61/ 151,67)) war zu erkennen, dass in Gruppen mit großzelligem CL-Gewebe der Median der Anzahl an Primordialfollikeln niedriger war als in der Gruppe mit nur kleinzelligem CL-Gewebe. Sobald kein CL-Gewebe vorlag, war die Anzahl an Primordialfollikeln noch deutlich größer. Das Minimum lag in allen Gruppen auf nahezu gleich niedrigem Niveau, die Maxima waren ansteigend. In Grafik 1 kann man sehen, dass die größte individuelle Streuung in G3 lag, hervorgerufen durch drei Ovarien mit einer Primordialfollikelanzahl über 200, daher wurde das Maximum mit 270,33 nicht als Ausreißer gewertet (Max G1 = 163 (Extremwert); G2 = 129; G3 = 270,33; G4 = 185,33).



Grafik 2: Primordialfollikel, verteilt auf die jeweiligen Gruppen

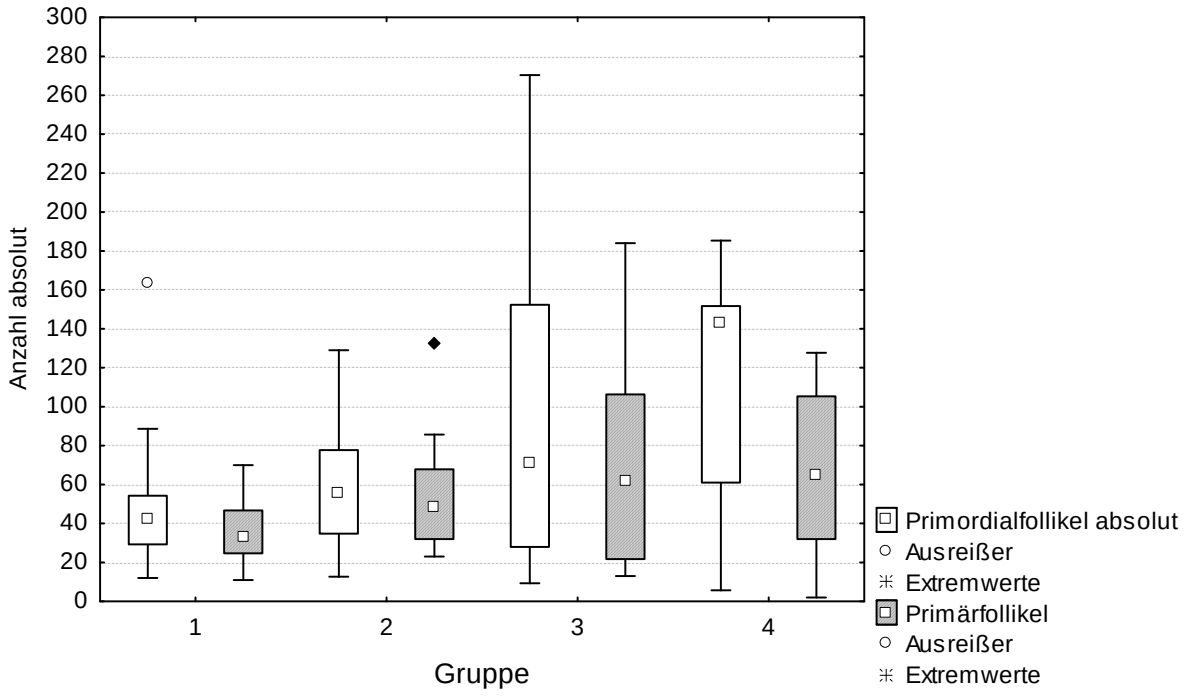
4.2.2 Primärfollikel

Auch nahm die Anzahl an Primärfollikeln mit der Zunahme an CL-Gewebe ab (Mediane (Q1/ Q2) G1 = 32,67 (24,67/ 46,67); G2 = 48,67 (34,83/ 77,67); G3 = 62 (21,67/ 106,33); G4 = 65 (61/ 151,67). Nur eines der drei Ovarien in G3, die auch hohe Primordialfollikelanzahlen hatten, zeigte ebenfalls hier eine deutlich über dem Median liegende Anzahl an Primärfollikeln.



Grafik 3: Primärfollikelanzahlen je Gruppe

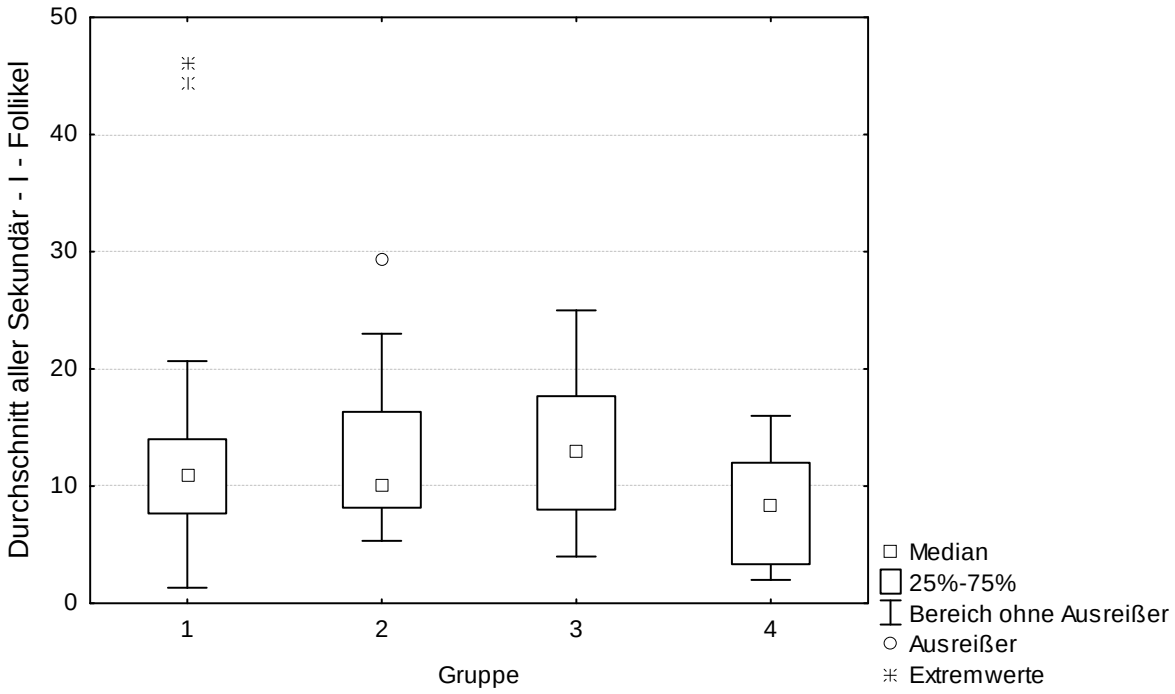
Das Verhältnis zwischen Primordialfollikeln und Primärfollikeln der Mediane lag in den Gruppen 1 bis 3 zwischen 1,05 und 1,12, während G4 mit 1,70 einen deutlich zu den Primordialfollikeln hin verschobenen Quotienten der Mediane hatte (M-W-U-Test G1 zu G4 p = 0,032).



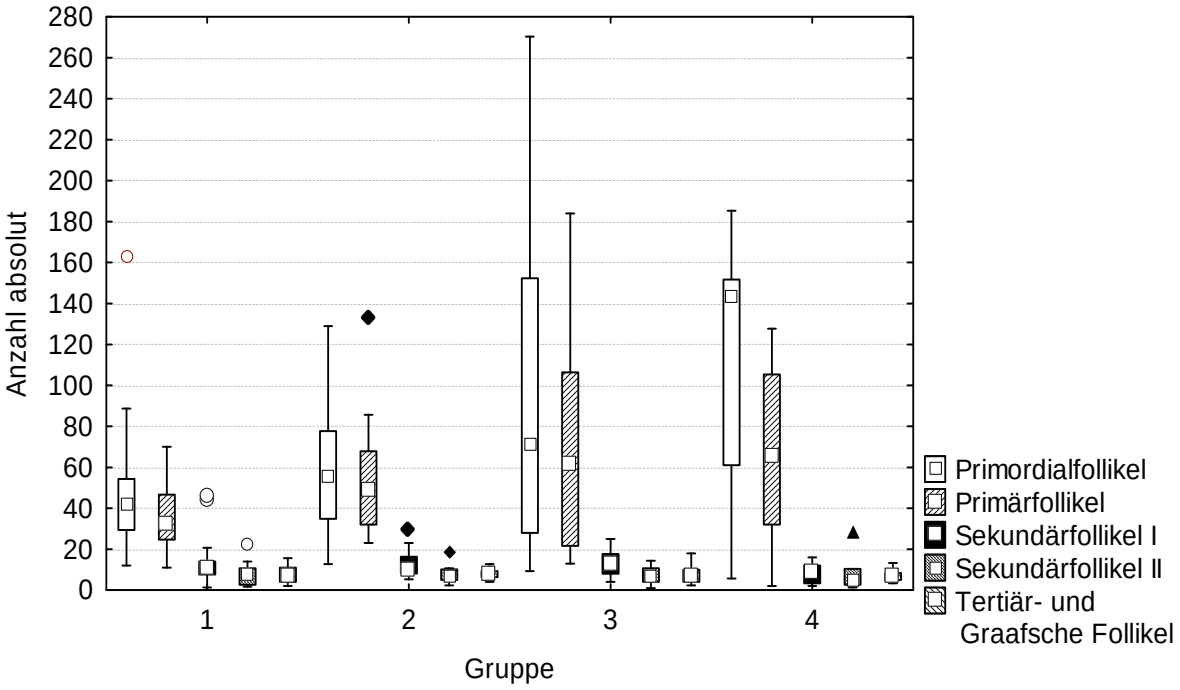
Grafik 4: Primordial- und Primärfollikel im Verhältnisvergleich

4.2.3 Sekundärfollikel

Die Gesamtzahl an Sekundärfollikeln I war in G1-3 (Mediane (Q1/ Q2): G1 = 11 (7,67/ 14); G2 = 10 (8,16/ 16,33); G3 = 13 (8/ 17,67)) ähnlich hoch, in G4 war der Median etwas niedriger (G4 = 8,33 (3,33/ 12)). Im Verhältnis zu den Primärfollikeln waren somit in G1 33,67%, in G2 20,55%, in G3 20,97% und in G4 12,82% Sekundär-I-Follikel vorhanden. Im Verhältnis zu den Primordialfollikeln waren in G1 26,19%, in G2 17,91%, in G3 18,23% und in G4 5,82% Sekundär-I-Follikel vorhanden.

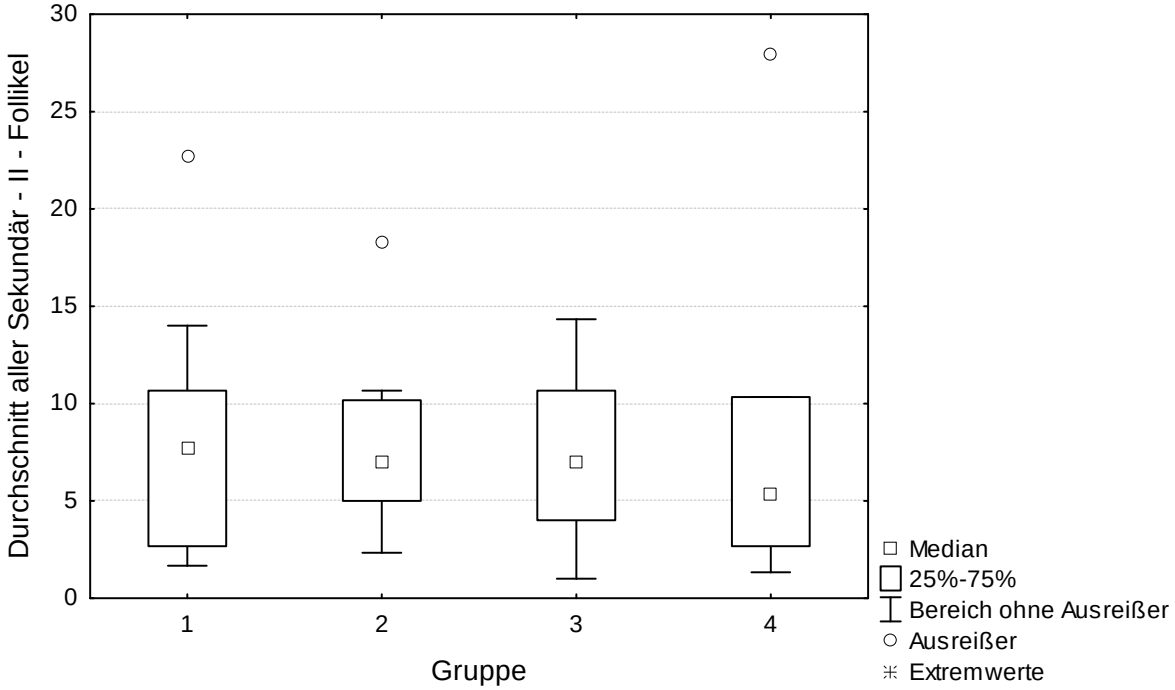


Grafik 5: Sekundärfollikel-I-Anzahl je Gruppe



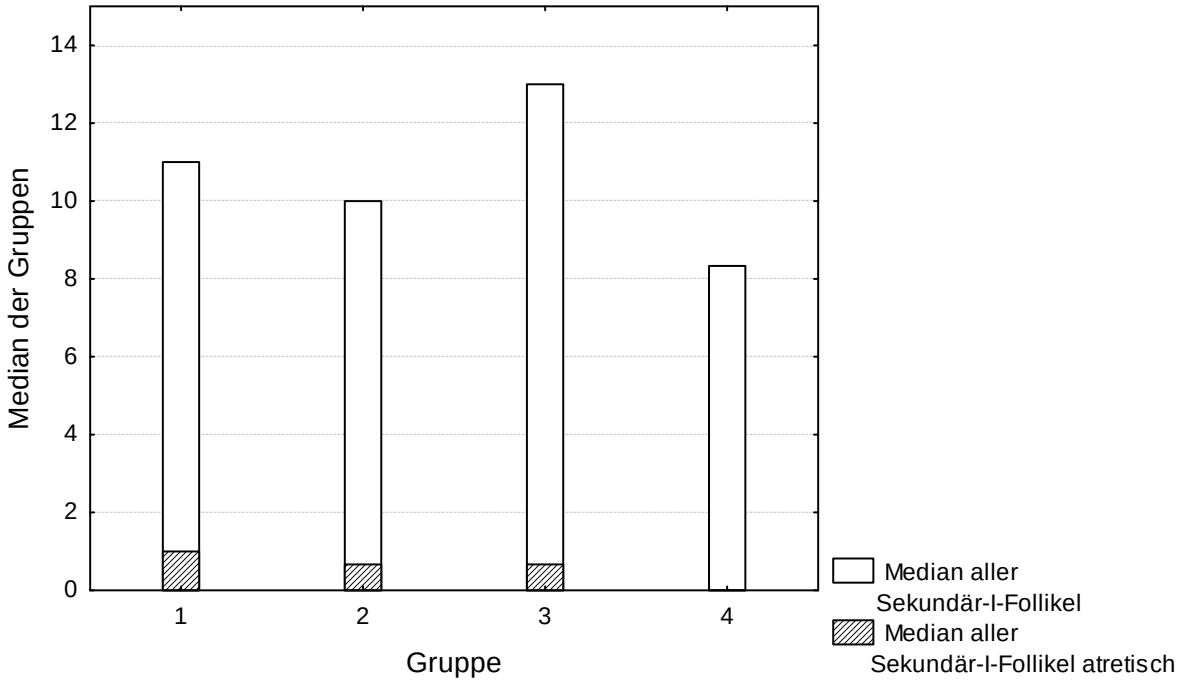
Grafik 6: Vergleich der verschiedenen Follikelstadien der jeweiligen Gruppe

Das gleiche galt für Sekundärfollikel II (G1 = 7,67 (2,67/ 10,67); G2 = 7 (5/ 10,17); G3 = 7 (4/ 10,67); G4 = 5,33 (2,67/ 10,67)). Im Verhältnis zu Primärfollikeln waren in G1 23,48%, in G2 14,38%, in G3 11,29% und in G4 8,20% Sekundärfollikel II vorhanden. Im Verhältnis zu den Primordialfollikeln waren es in G1 18,26%, G2 12,54%, G3 9,81% und G4 3,72%.

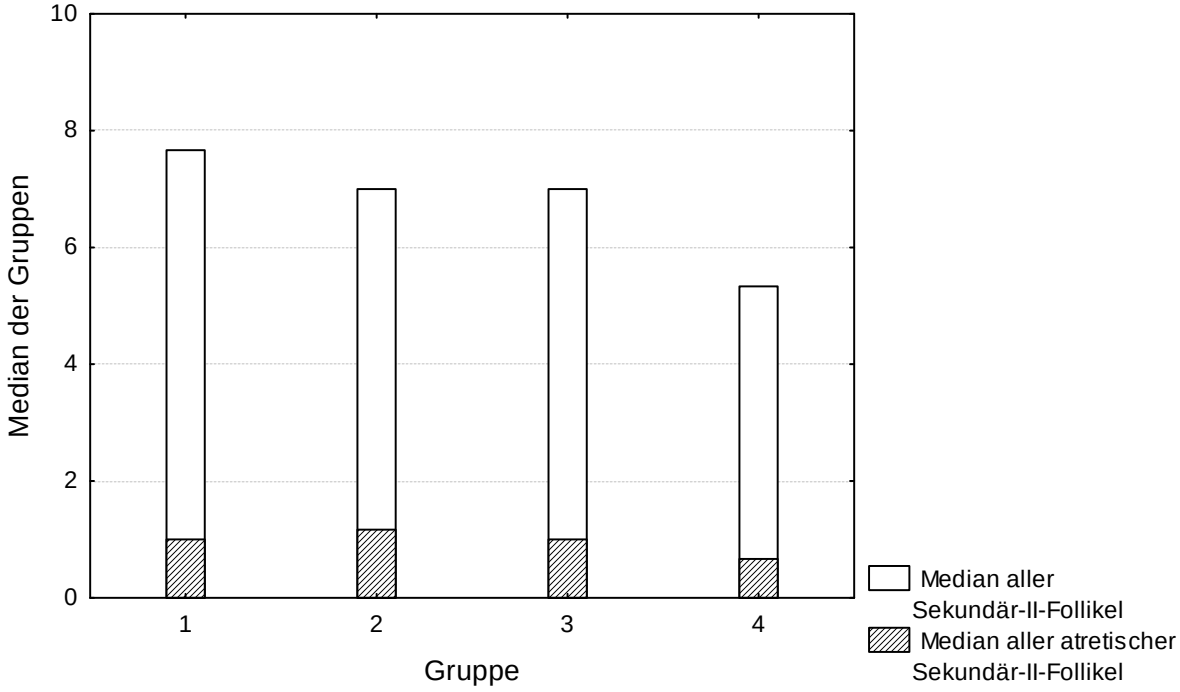


Grafik 7: Sekundärfollikel-II-Anzahl je Gruppe

Bei den Sekundärfollikeln I gab es in G4 keine atretischen Follikel und im Median war von G3 nach G1 ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Sekundärfollikel II, die atretisch waren, waren in allen Gruppen im Median ähnlich, doch lag die Spannweite in G1 deutlich höher als in G2 bis G4 (G1 = 7,67; G2 = 3,00; G3 = 2,33; G4 = 2,67).



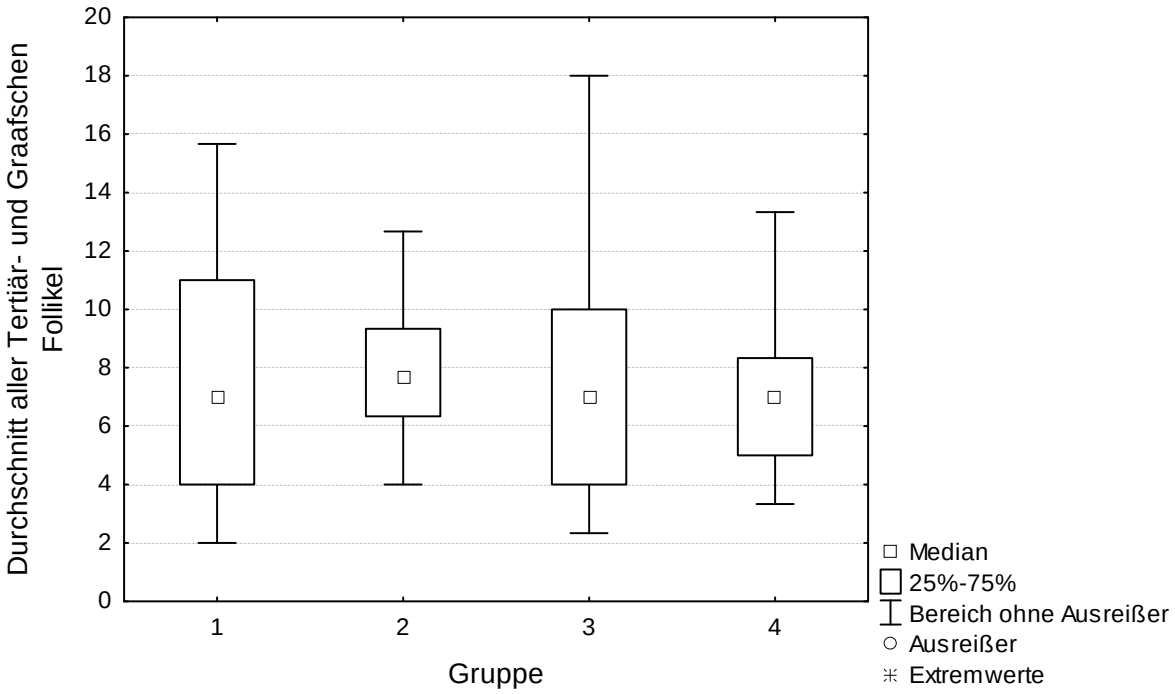
Grafik 8: Anteil an atretischen Sekundärfollikeln I an der Gesamtmenge von Sekundärfollikeln I (bezogen auf die Mediane)



Grafik 9: Anteil an atretischen Sekundärfollikeln II an der Gesamtmenge von Sekundärfollikeln II (bezogen auf die Mediane)

4.2.4 Tertiär- und Graafsche Follikel

Tertiär- und Graafsche Follikel waren in allen Gruppen im Median ohne erkennbare Tendenz auf gleichem Niveau.



Grafik 10: Anzahl der Tertiär- und Graafschen Follikel je Gruppe

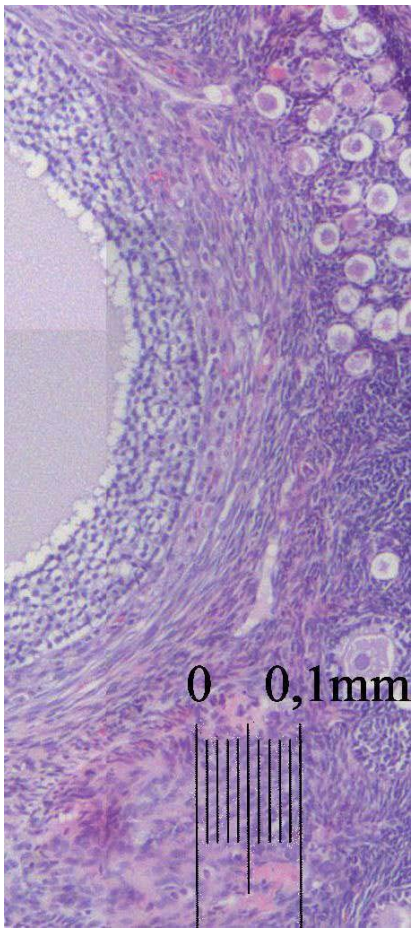


Abbildung 7: HE-Färbung, flache Theka

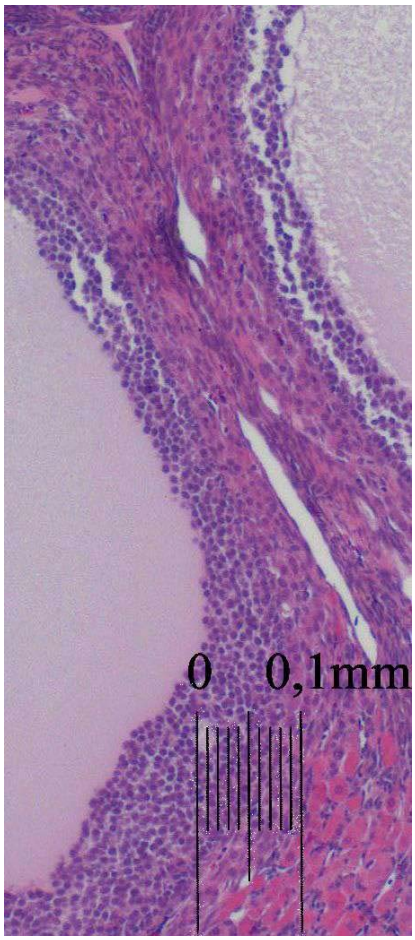
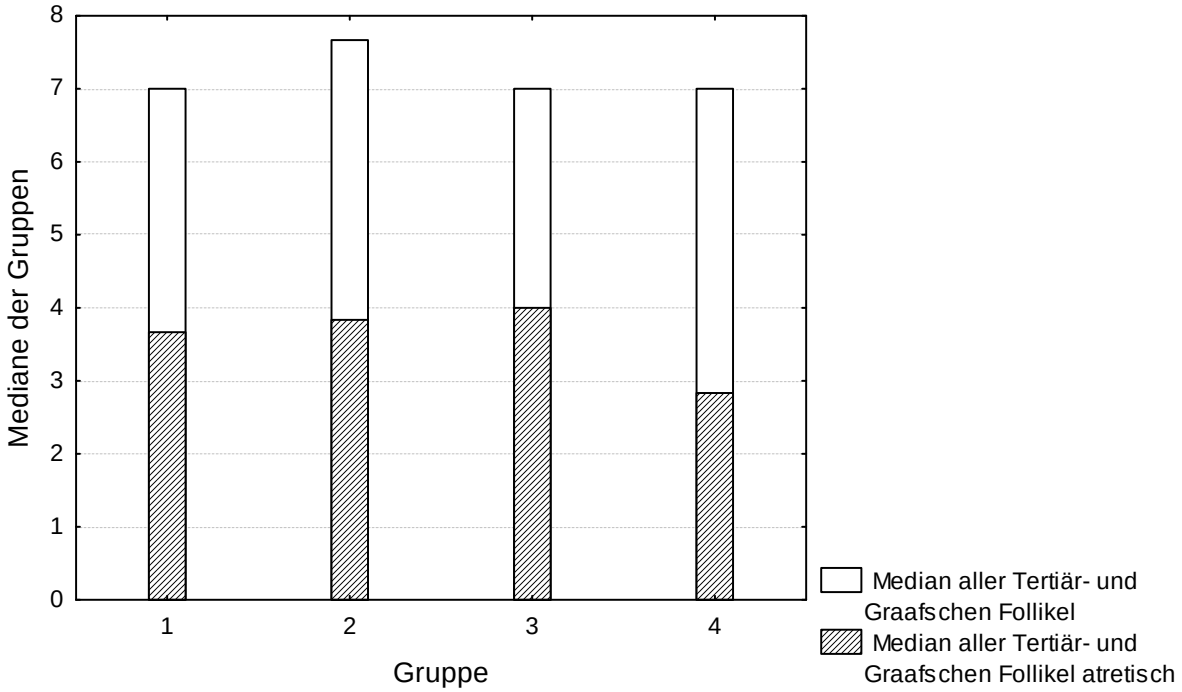


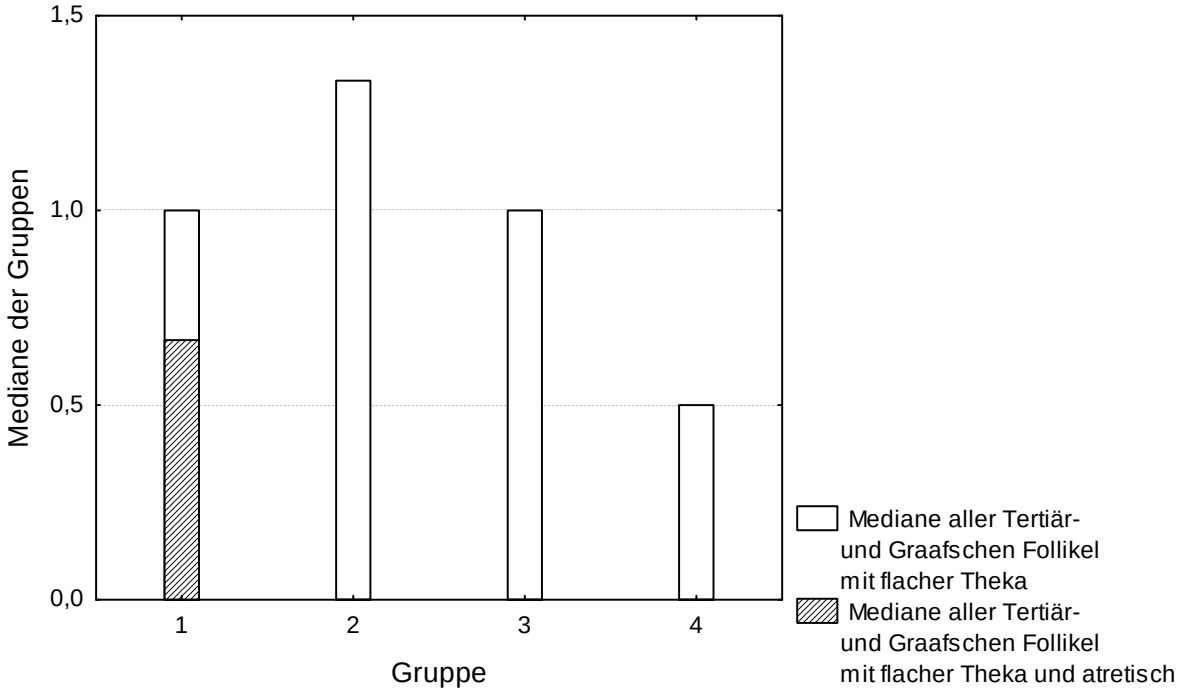
Abbildung 8: HE-Färbung; runde Theka

Die atretischen Tertiär- und Graafschen Follikel alleine genommen zeigten im Gesamten eine signifikante Abhängigkeit von der Menge an CL-Gewebe insgesamt (r = 0,29, p = 0,039).



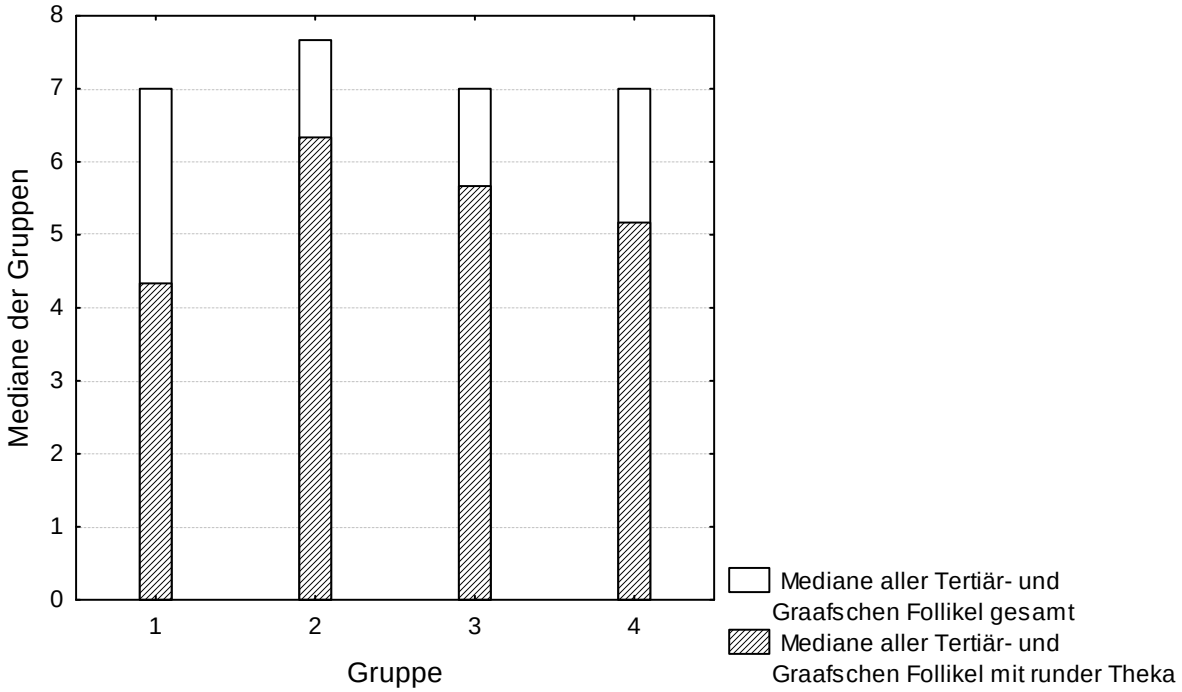
Grafik 11: Anteil atretischer Tertiär- und Graafschen Follikel an der Gesamtzahl (bezogen auf die Mediane)

Tertiär- und Graafsche Follikel, die eine flache Theka hatten und zeitgleich atretisch waren, waren im Median nur in G1 zu finden.

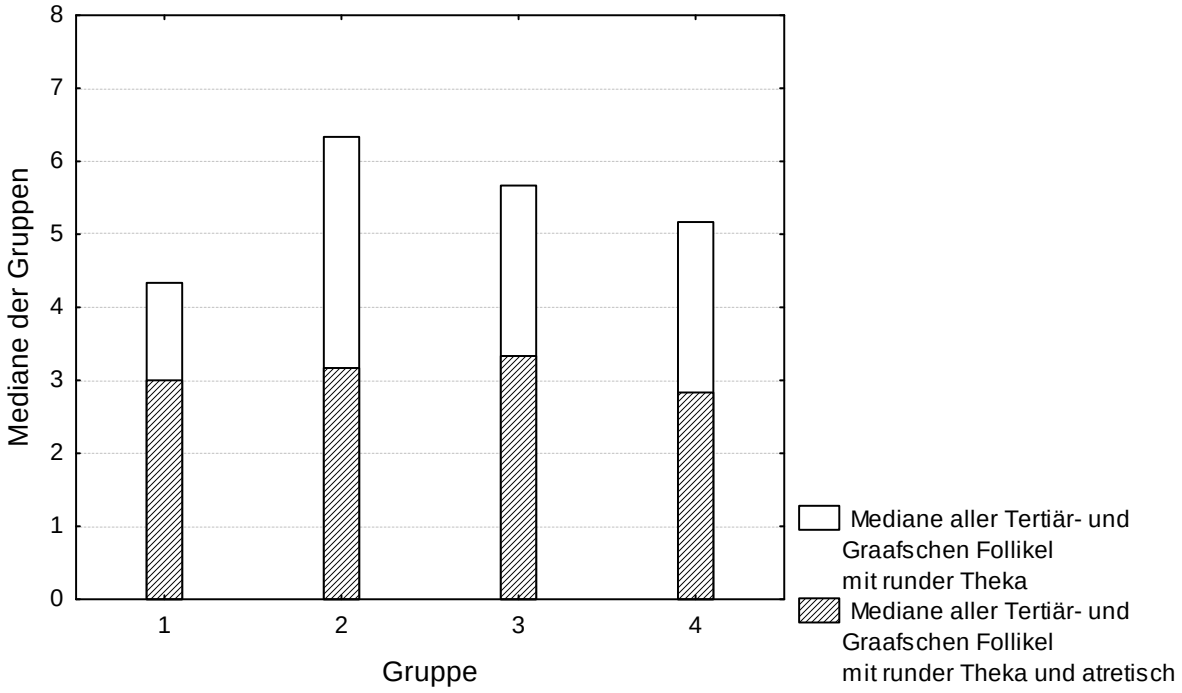


Grafik 12: Anteil an atretischen Tertiär- und Graafschen Follikel mit flacher Theka an der Gesamtzahl der Tertiär- und Graafschen Follikel mit flacher Theka (bezogen auf die Mediane)

Dagegen waren Tertiär- und Graafsche Follikel mit runder Theka, die gleichzeitig atretisch waren, in allen Gruppen zu finden. Im Median waren diese auf ähnlichem Niveau.



Grafik 13: Anteil Tertiär- und Graafscher Follikel mit runder Theka an der Gesamtanzahl (bezogen auf die Mediane)



Grafik 14: Anteil an atretischen Tertiär- und Graafschen Follikel mit runder Theka an der Gesamtzahl der Tertiär- und Graafschen Follikel mit runder Theka (bezogen auf die Mediane)

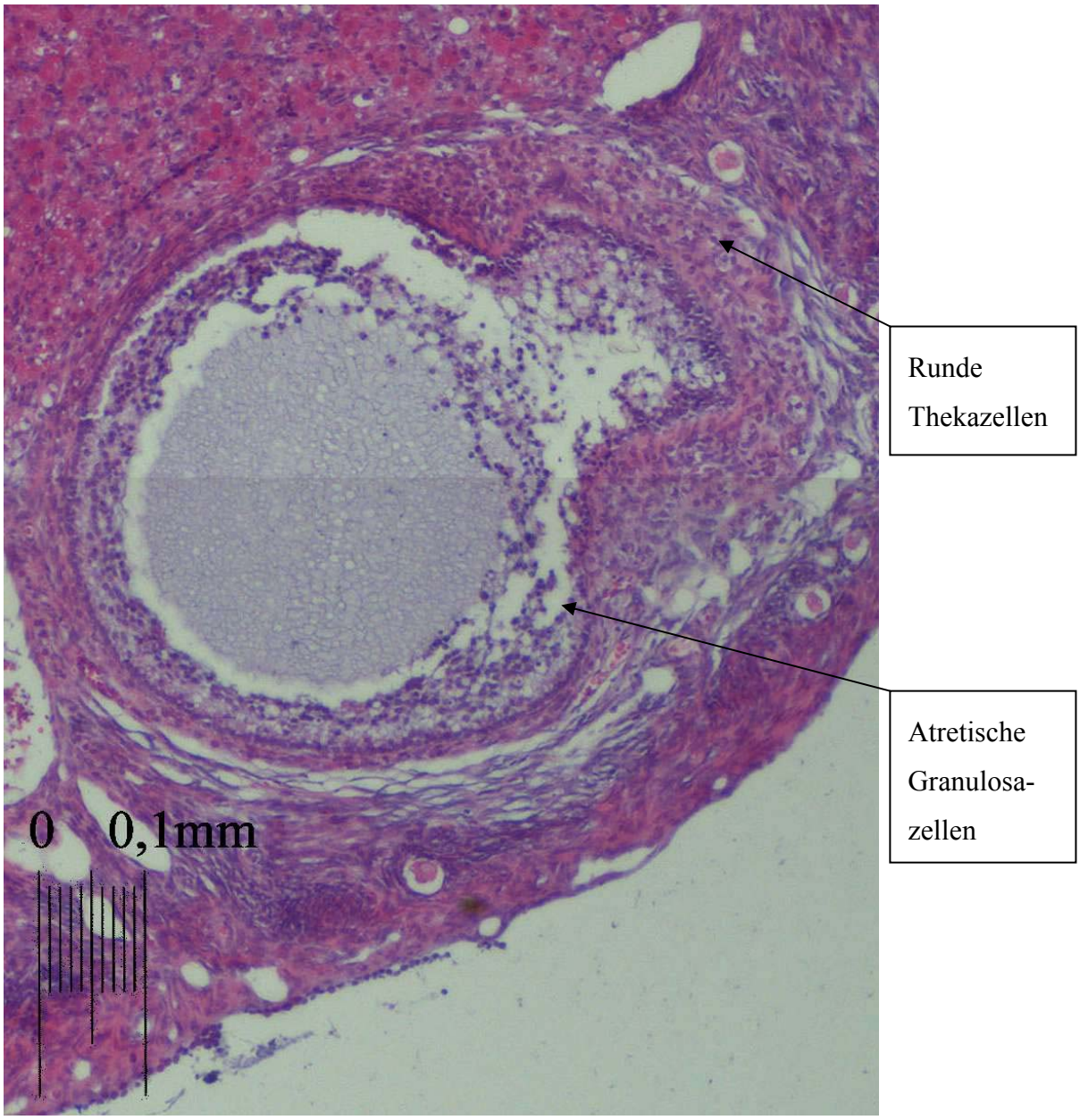
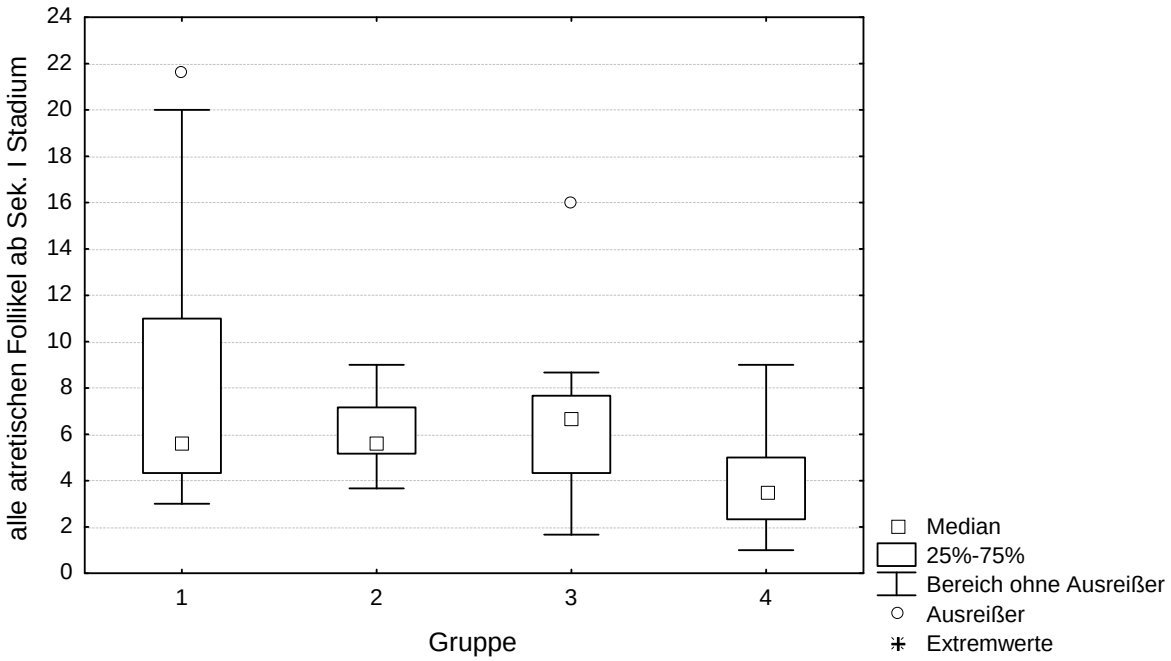


Abbildung 9: Atretischer Tertiärfollikel mit runder Theka

4.2.5 Atresie allgemein

Die Gesamtzahl aller Follikel nahm, vor allem durch die Anzahl an Primordialfollikeln beeinflusst, mit zunehmendem Lutealgewebe ab (Mediane/ Q1/Q2: G1 = 109,67/ 78,67/ 141,67; G2 = 121,33/ 105,17/ 169,17; G3 = 161,00/ 60,67/ 319,67; G4 = 233,17/ 114,33/ 295,00); dabei war auch die Quartil-Spannweite vor allem in G3 und G4 deutlich größer als in G1 und G2 (G1 = 63,00; G2 = 64,00; G3 = 259,00; G4 = 180,67).



Grafik 15: Summe aller atretischen Follikel (ab Sekundärstadium) je Gruppe

Obwohl der prozentuale Anteil an atretischen Follikeln, bezogen auf alle Follikelstadien bis auf G4, auf ähnlichem Niveau war, so zeigte sich doch, dass nur G1 auch atretische Follikel mit flacher Theka aufzeigte und in G4 keinerlei Atresie im Sekundärstadium I aufkam. Auch im Stadium der Tertiär- und Graafschen Follikel waren in G4 deutlich weniger Follikel atretisch als in den anderen Gruppen. Obwohl im Median in G1 kein großer Unterschied zu den anderen Gruppen zu verzeichnen war, zeigte sich in G1 eine große Spannweite (18,67) und in G4 ein niedriger Median. Verglichen mit der Anzahl an heranreifenden Follikeln gehen in G4 ähnlich viele Follikel in die Atresie.

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der atretischen Follikel ab Sekundär-I-Stadium

	G1	G2	G3	G4
Prozentualer Anteil der atretischen Follikel, bezogen auf Follikelstadien ab Sekundär-I (Mediane)	22,98%	23,30%	23,54%	17,07%

Die absolute Gesamtzahl der atretischen Follikel zeigte zwischen G1 und G4 einen signifikanten Unterschied (M-W-U-Test p = 0,043).

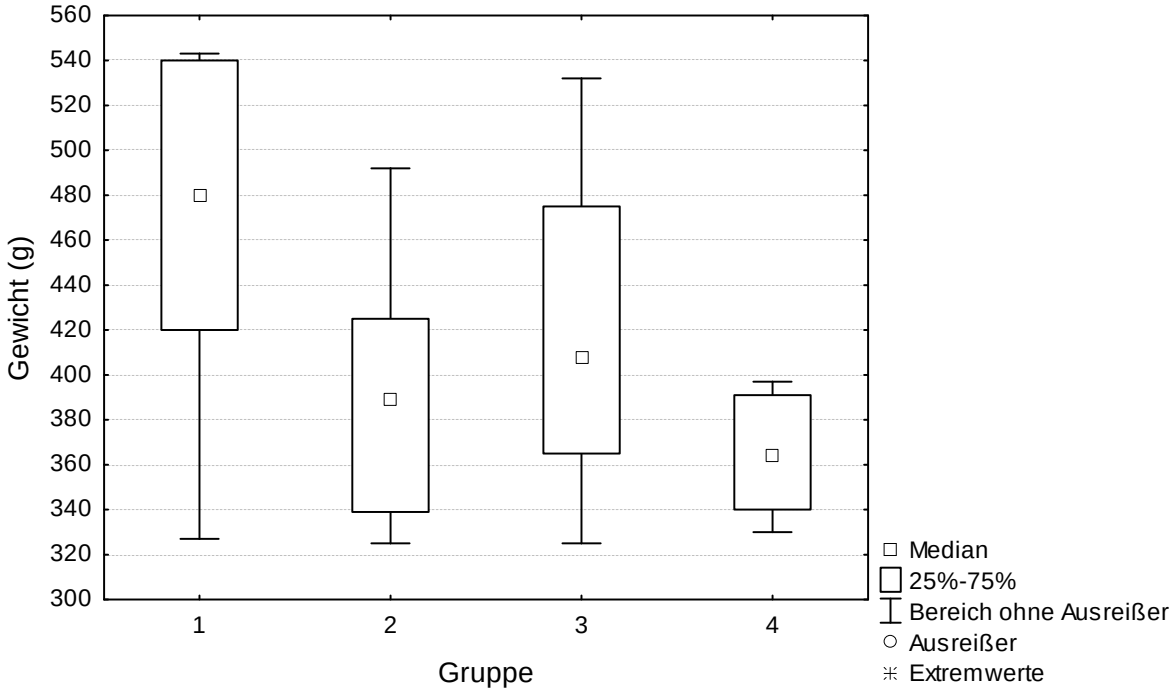
4.3 Weitere Gewebemerkmale und ihre Abhängigkeiten

4.3.1 Weitere Abhängigkeiten zum CL-Gewebe

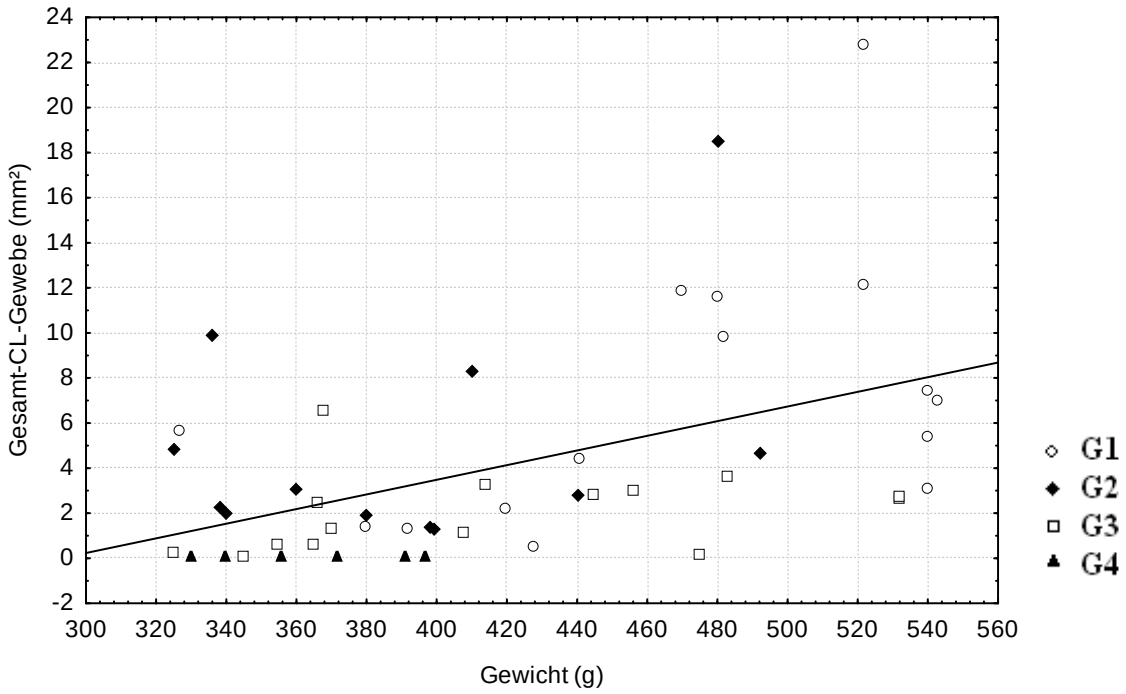
Aufgrund der bereits festgestellten Abhängigkeiten des ovariellen CL-Gewebes mit der Follikelentwicklung suchten wir nach weiteren auch nicht ovariellen Faktoren, die eine Abhängigkeit zum CL-Gewebe haben und damit zur Herleitung weiterer funktioneller und kausaler Zusammenhänge beitragen.

Vor allem das Gewicht, die Blutfettwerte, insbesondere die Triglyzeride und die im Blut messbaren Hormonspiegel waren von Interesse.

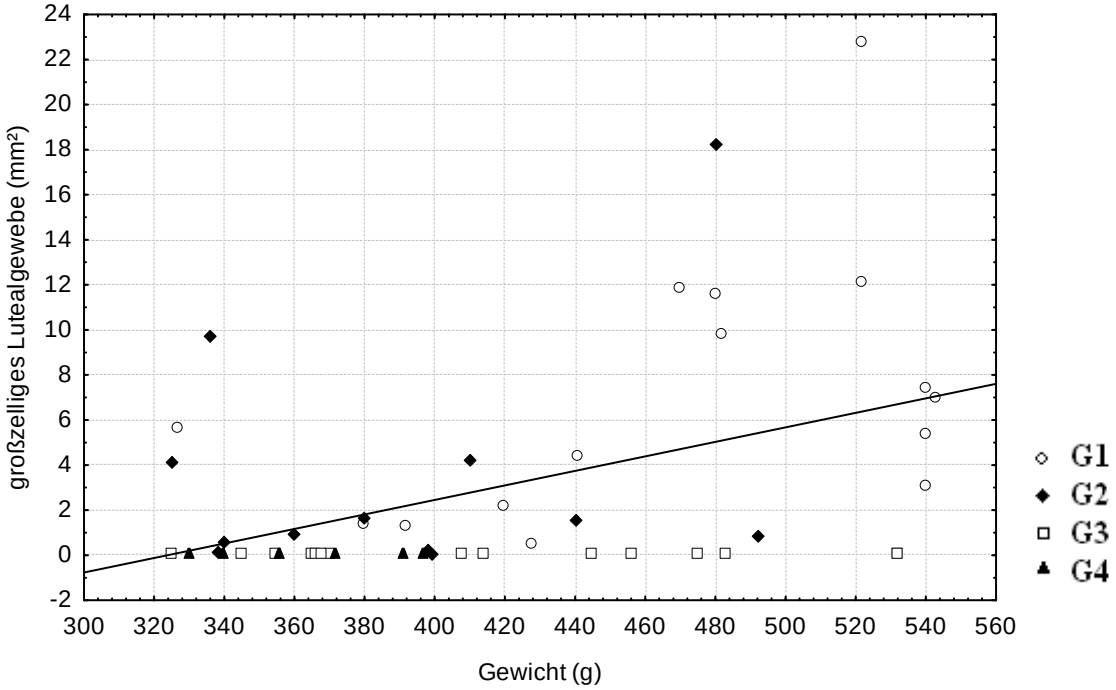
Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die Gesamtmenge an CL-Gewebe signifikant vom Gewicht der Tiere abhing ($r = 0{,}47$, $p = 0{,}001$), als auch die alleinige großzellige CL-Menge (nur im Bezug auf Tiere mit großzelligem CL-Gewebe) ($r = 0{,}47$, $p = 0{,}012$).



Grafik 16: Gewichtsverteilung der Tiere bezogen auf die Gruppen



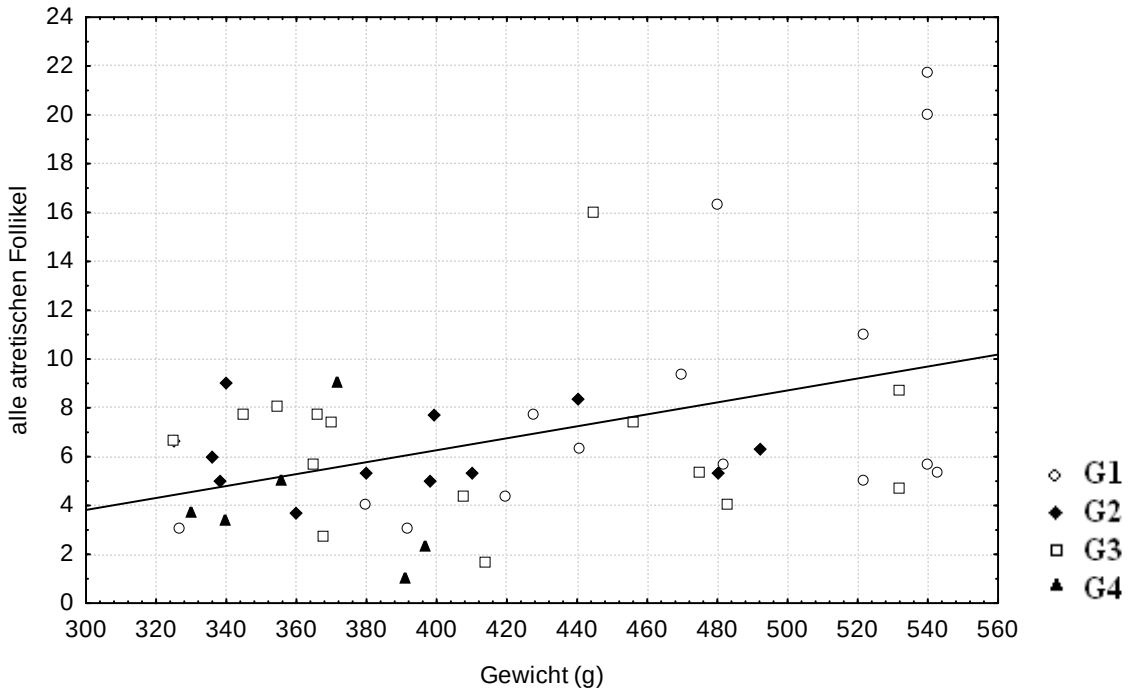
Grafik 17: Gesamt-CL-Gewebe in Abhängigkeit zum Gewicht



Grafik 18: großzelliges CL-Gewebe in Abhängigkeit vom Gewicht

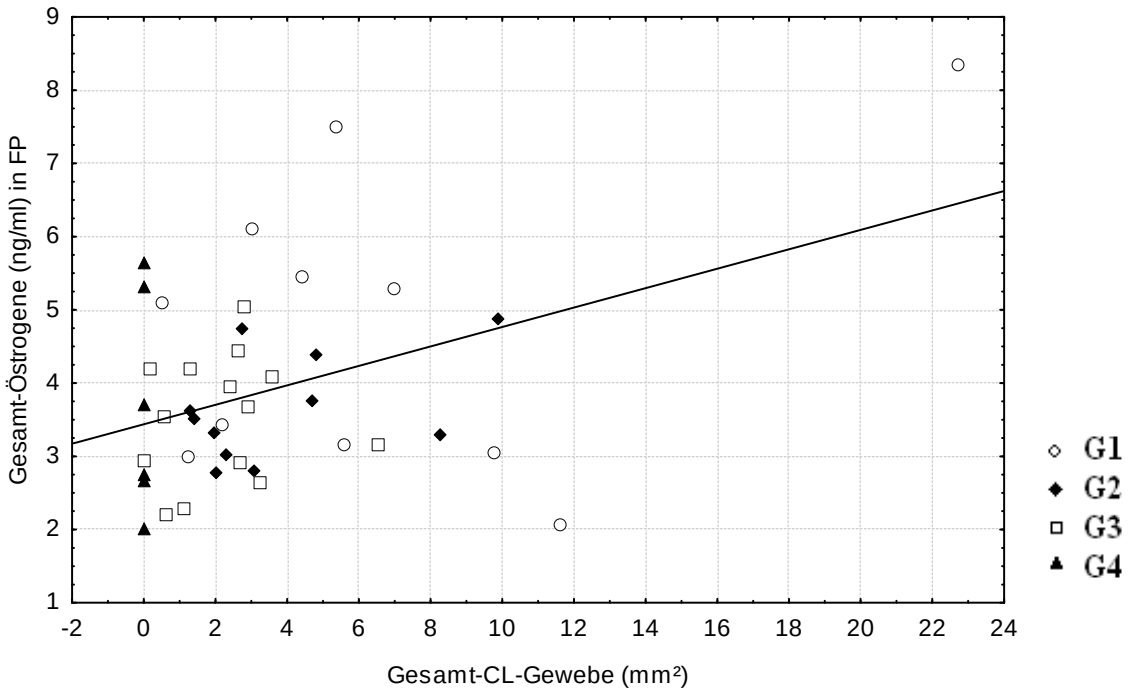
Außerdem stellte sich auch der Zusammenhang zwischen dem gesamten CL-Gewebe und Triglyzeriden dar (r = 0,39, p = 0,010).

Zusätzlich zeigte die Anzahl der atretischen Follikel eine hoch positive Korrelation zum Gewicht der Tiere mit p =0,004 und r = 0,41.

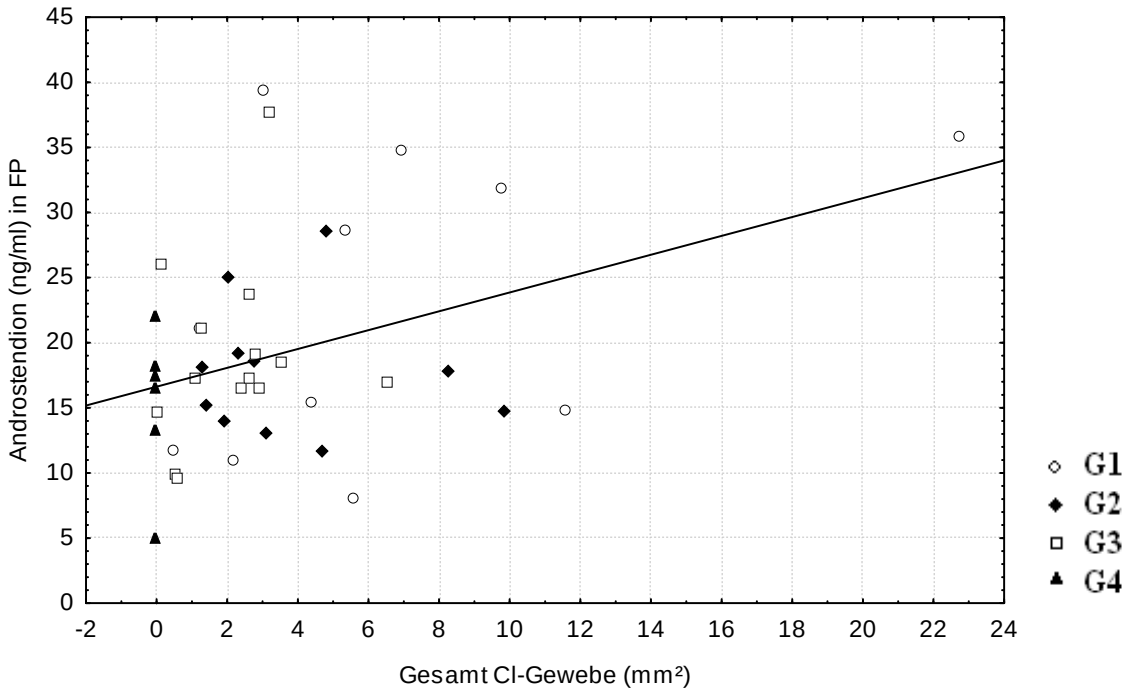


Grafik 19: Atretische Follikel in Abhängigkeit zum Gewicht

Weiterhin standen auch die beiden Blutparameter der Steroidhormone Gesamtöstrogen in der FP: r = 0,41, p = 0,008 und Androstendion in der FP: r = 0,38, p = 0,013 in einem signifikanten Zusammenhang mit der Menge an CL-Gewebe.



Grafik 20: positive Korrelation Östrogenwerte in FP und Gesamt-CL-Gewebe (auch Tiere ohne CL-Gewebe eingeschlossen)



Grafik 21: Zusammenhang Androstendion in FP zu Gesamt-CL-Gewebe (auch Tiere ohne CL-Gewebe eingeschlossen)

4.3.2 Beziehungen des durchlöcherten Stromas zu CL-Gewebe und anderen nicht-ovariellen Co-Variablen

In der Fläche des durchlöcherten Stromas zeigte sich ebenfalls eine Abhängigkeit zu dem Gesamt-CL-Gewebe. So waren in G1-3 die Mediane deutlich höher als in G4 - wobei auch eine Steigerung von G2 und G3 zu G1 zu sehen war. Die Mediane (in mm²) lagen bei G1 = 4,05, G2 = 3,02, G3 = 3,44, G4 = 1,85. Prozentual auf die Schnittgrößen bezogen, waren es (ebenfalls auf die Mediane bezogen) G1 = 23,48%, G2 = 21,16%, G3 = 23,50%, G4 = 17,93%.

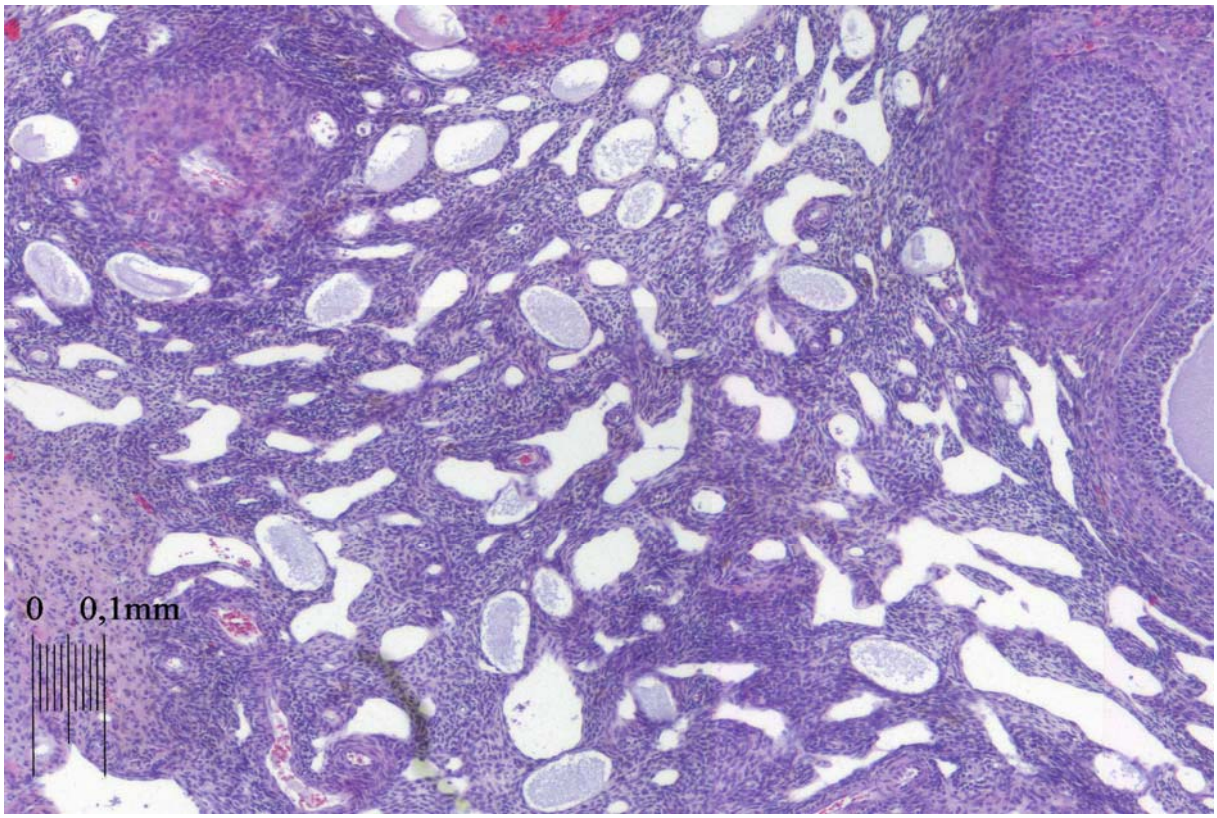
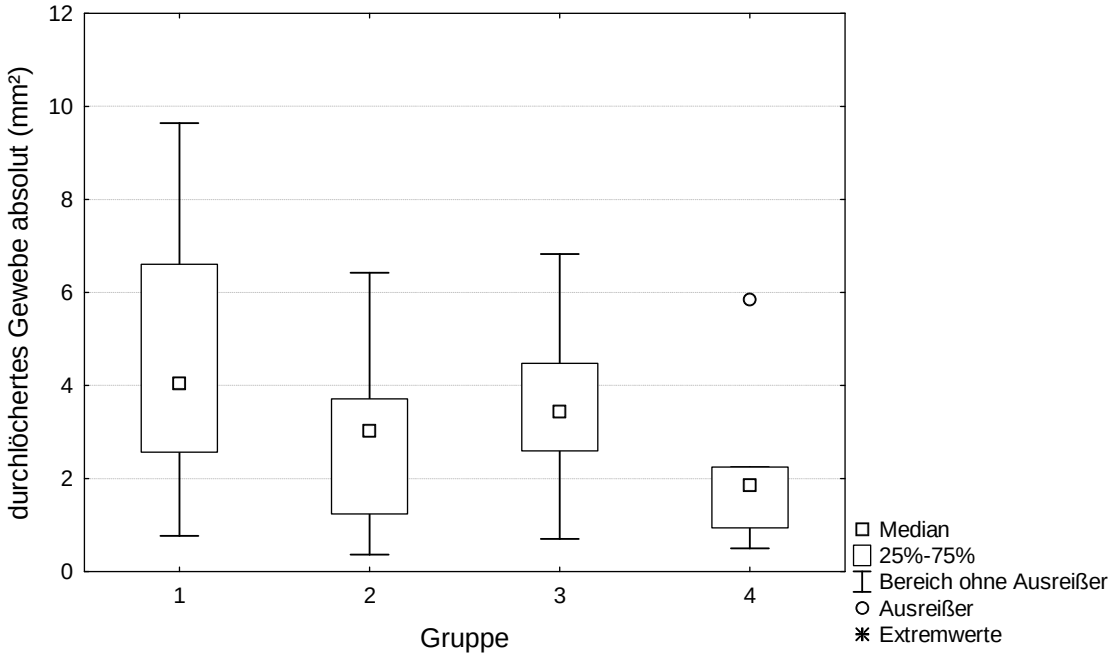
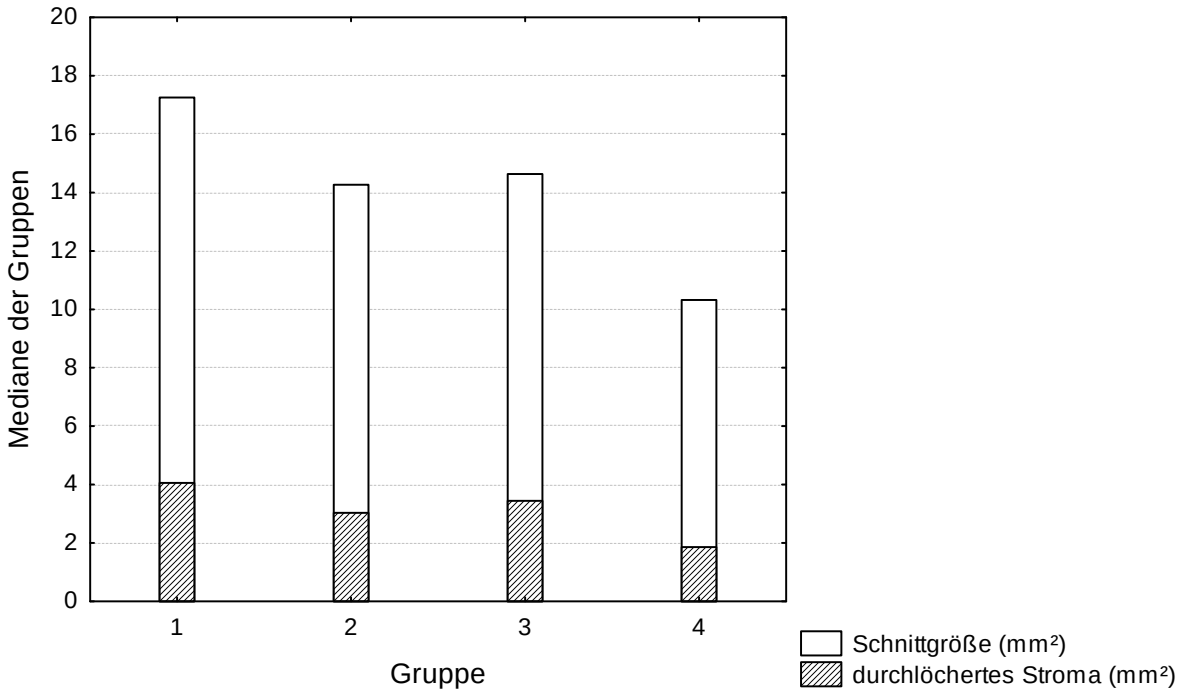


Abbildung 10: Durchlöchertes Gewebe in HE-Färbung dargestellt

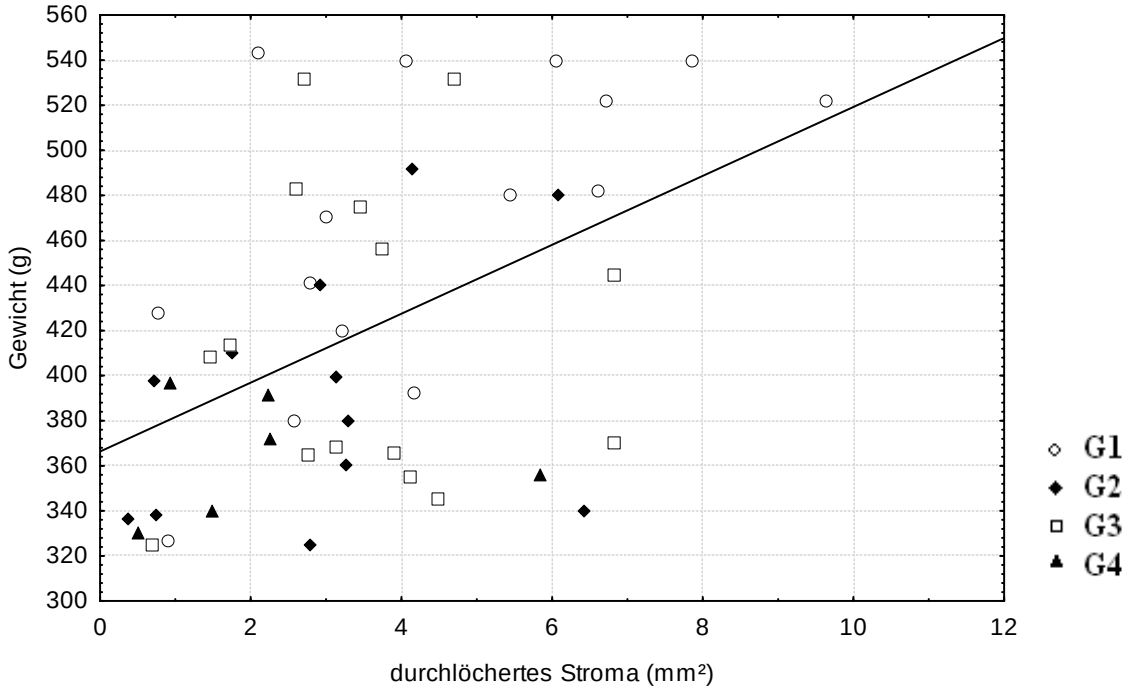


Grafik 22: Verteilung des durchlöcherten Gewebes in mm²

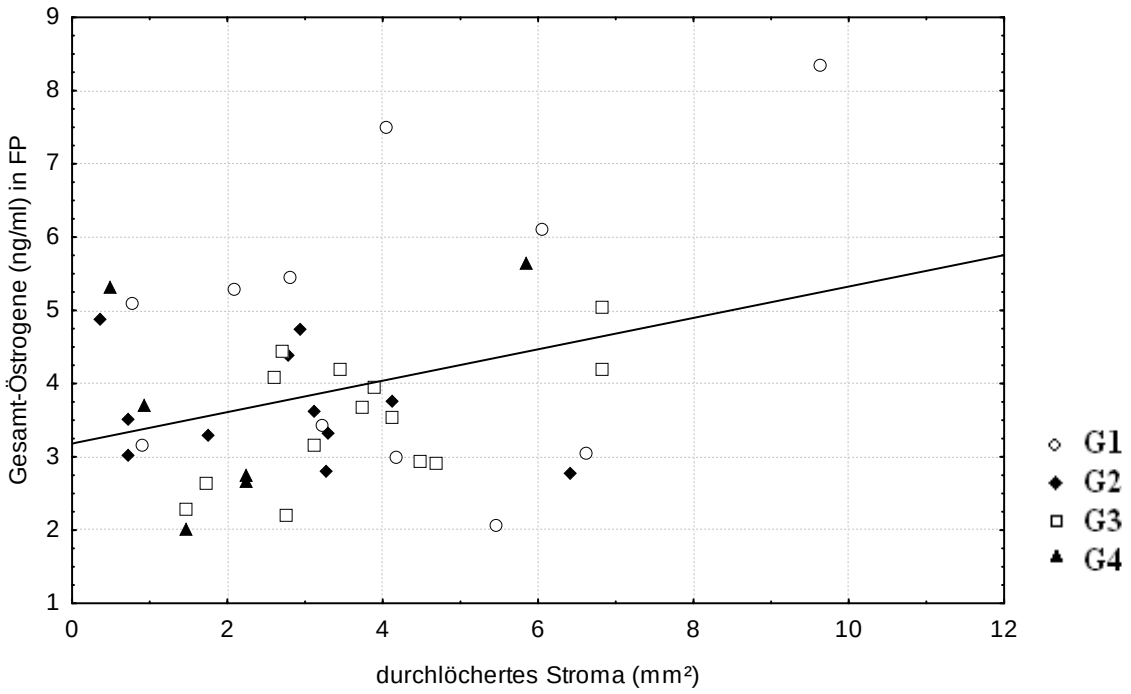


Grafik 23: Anteil des durchlöcherten Gewebes an der gesamten Schnittgröße (Mediane)

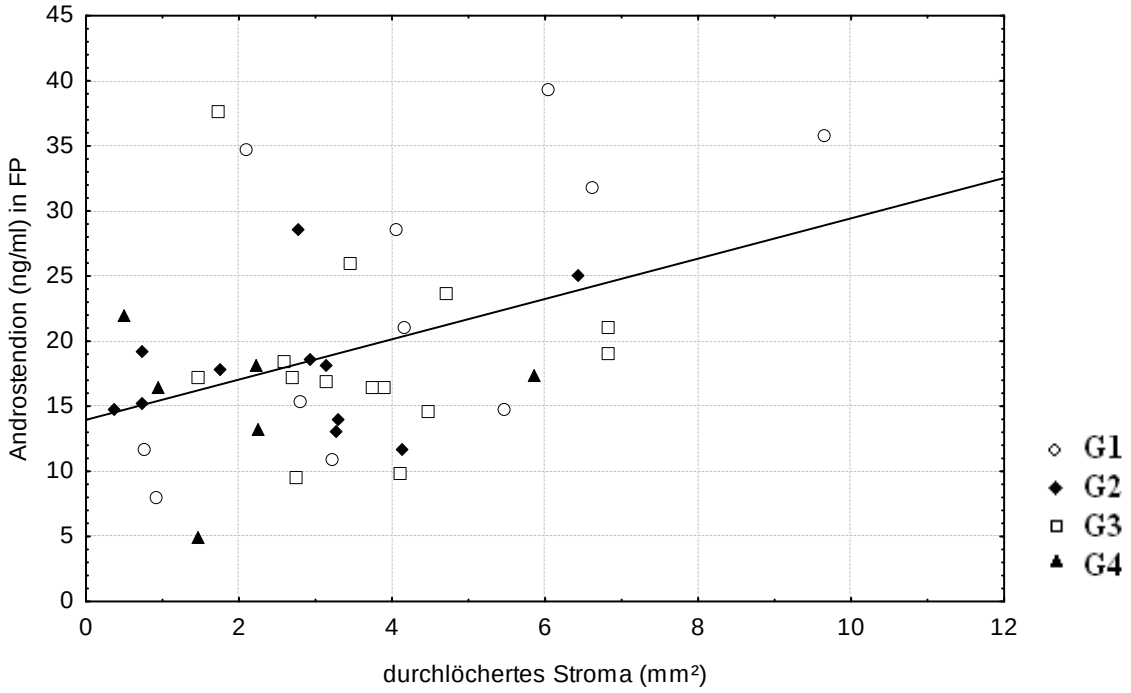
Auch die Faktoren Gewicht mit r = 0,47 und p = 0,001; Östrogene mit r = 0,32 und p = 0,038 und Androgene mit r = 0,40 und p = 0,009 standen in einer signifikanten positiven Korrelation mit dem durchlöcherten Stroma. Triglyzeride hatten mit r = 0,26 und p = 0,09 keine signifikante Korrelation zum durchlöcherten Stroma.



Grafik 24: positive Korrelation Gewicht zu durchlöchertem Stroma



Grafik 25: positive Korrelation Östrogene zu durchlöchertem Stroma



Grafik 26: positive Korrelation Androstendion zu durchlöchertem Stroma

4.3.3 Identifikation des Zona-pellucida-Materials

Um die Entstehung des durchlöcherten Gewebes und der Reste in den Löchern zu verstehen, wurde eine Zona-pellucida-3-AK-Färbung durchgeführt, da ZP3 ein Hauptbestandteil der Zona pellucida ist. Mit Hilfe von ZP3-AK wurden sowohl die Eihautreste im Ovar

nachgewiesen und als solche identifiziert, als auch der Zeitpunkt des ersten Auftretens von ZP3-positiven Strukturen in der Follikelentwicklung aufgezeigt. Außer den Überresten färbten sich auch alle Stadien an Follikeln an, größtenteils auch Primordialfollikel. Auch Primärfollikel zeigten eine ZP3-positive Färbung. Um die ZP3-Reste zeigte sich eine verdichtete Färbung des Stromas, welche im Stroma ohne ZP3-Reste nicht vorkam.

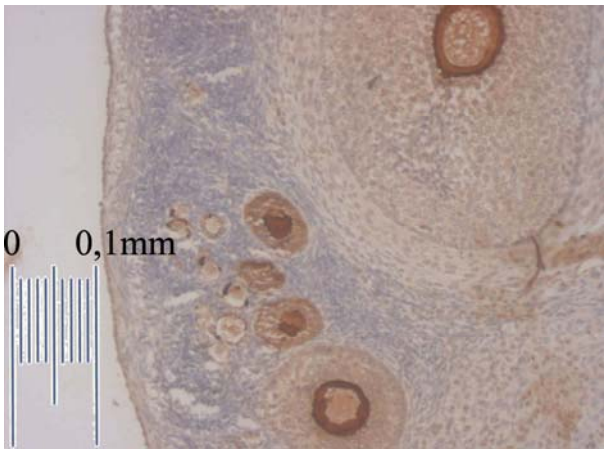


Abbildung 11: ZP3-positive Primordial-, Primär-, Sekundär-I- und Sekundär-II-Follikel

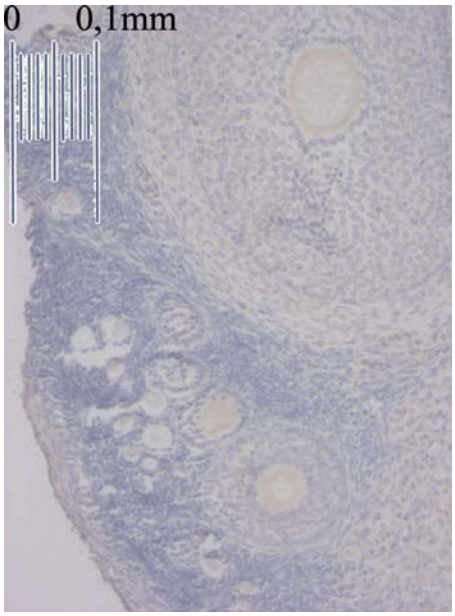


Abbildung 12: Negativkontrolle der ZP3-Färbung

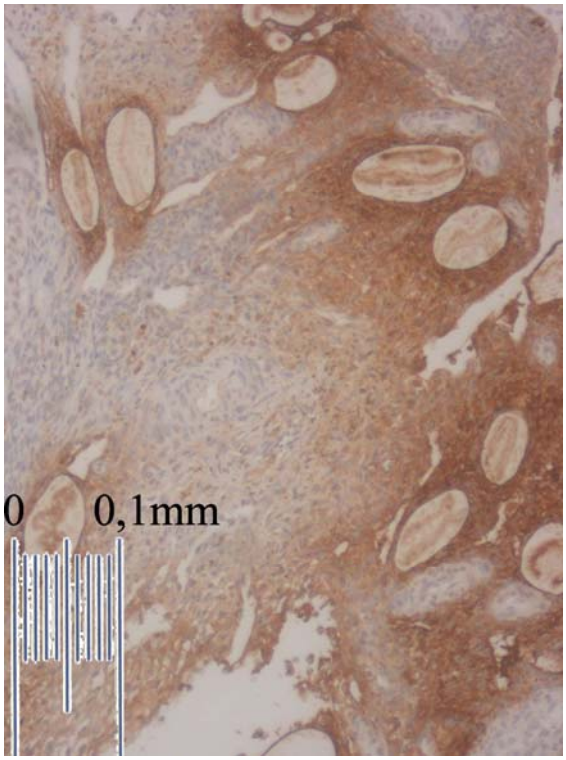


Abbildung 13: ZP3-positive Eihüllreste in Löchern

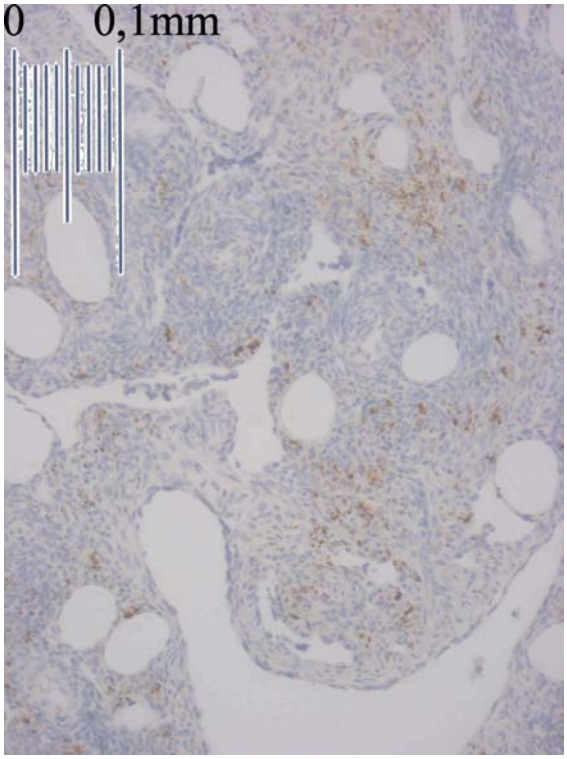
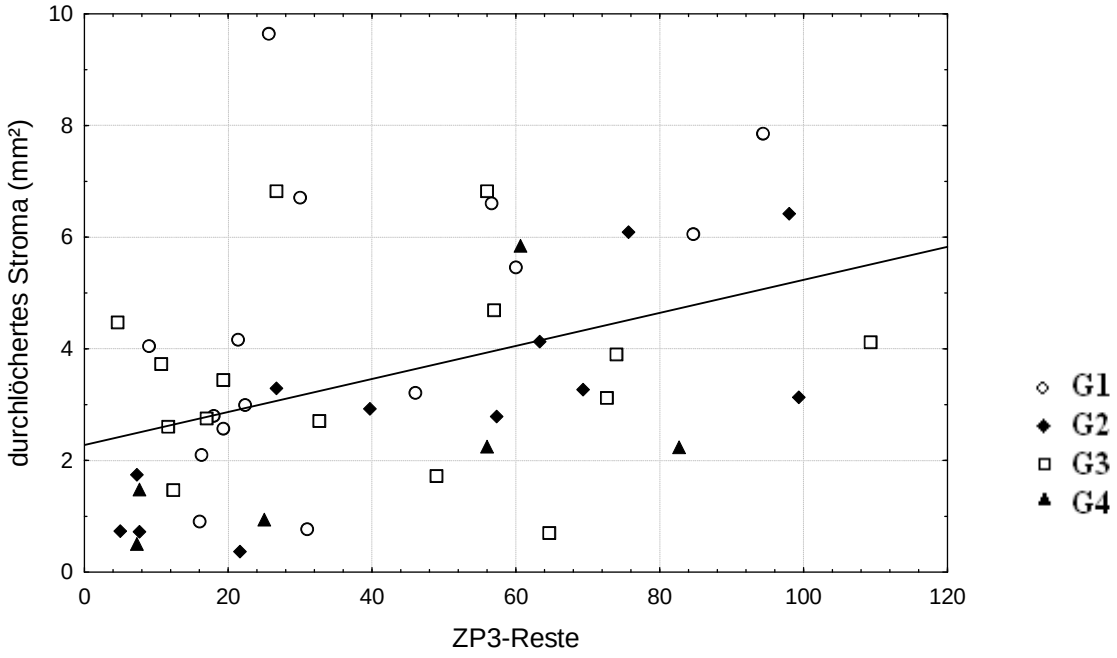


Abbildung 14: Negativkontrolle der ZP3-Färbung

ZP3-positive Oozytenreste lagen in allen Gruppen vor. Es zeigte sich vor allem eine strenge positive Korrelation zum durchlöcherten Stroma (r = 0,47, p = 0,004).



Grafik 27: Relation des durchlöcherten Stromas zur Anzahl an ZP3-positiven Resten

4.3.4 MHC-II / CD3

Um die Entstehung des durchlöcherten Gewebes weiter zu verstehen, wurde auf Entzündung im Bereich der atretischen Follikel und der schon entstandenen ZP3-positiven Follikelreste untersucht. Dazu wurde eine MHC-II/ CD3 - Doppelfärbung angewandt, da MHC-II und CD3 nur im Entzündungsstadium parallel an Zellen anzutreffen sind. MHC-II ist ein antigenpräsentierender Rezeptor, während CD3 als Gegenstück auf T-Helferzellen vorkommt. Als Resultat zeigte sich, dass im Stadium der Zersetzung eines Follikels sich sowohl MHC-II als auch CD3 an und in den Follikeln findet. Im Stadium der reinen ZP3-Reste ist keine Aktivität mehr zu sehen.

Abbildung 15: keine erkennbare Färbung unter MHC-II/ CD3 - Färbung der gesunden Follikel und sich nicht färbendem Stroma

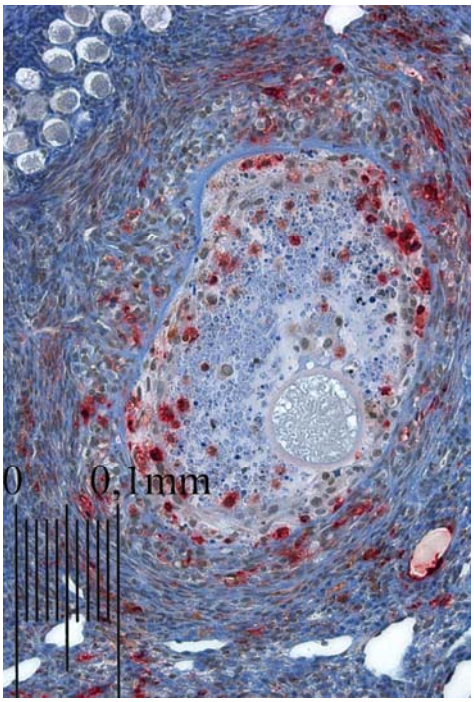


Abbildung 16: Atretischer Follikel mit in der Färbung negativen Primordialfollikeln (MHC-II in ACE-Färbung rot, CD3 in DAB-Färbung braun)

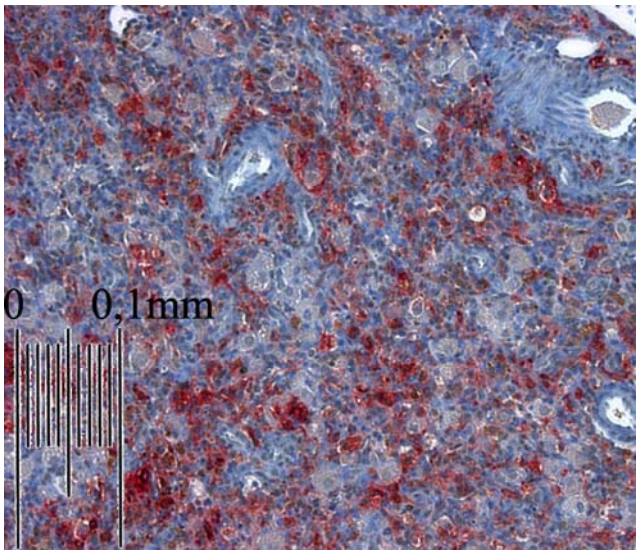


Abbildung 17: gemischtes CL-Gewebe mit deutlicher MHC-II/ CD3-Färbung

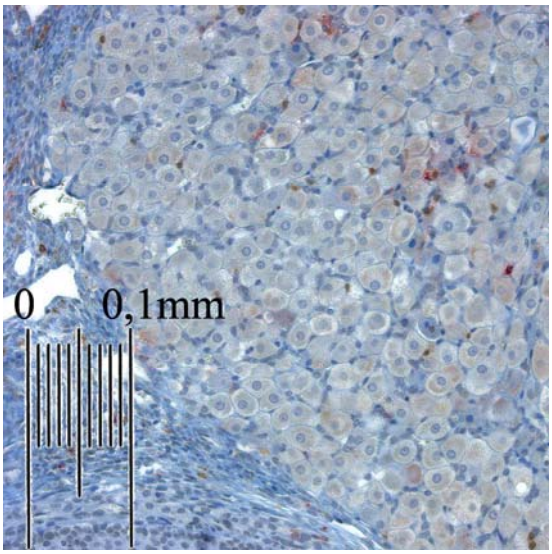


Abbildung 18: großzelliges CL ohne MHC-II/ CD3-Färbung

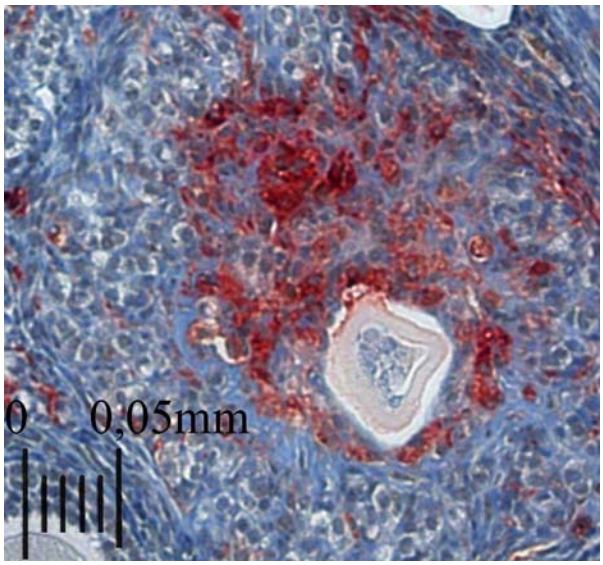


Abbildung 19: Atretischer Follikel MHC-II- und CD3-positiv (MHC-II in ACE-Färbung rot, CD3 in DAB-Färbung braun)

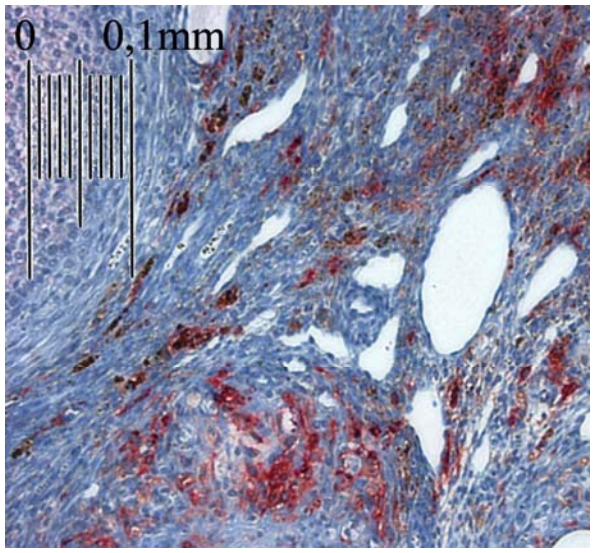


Abbildung 20: durchlöchertes Stroma mit deutlicher MHC-II- und CD3- Färbung des Stromas

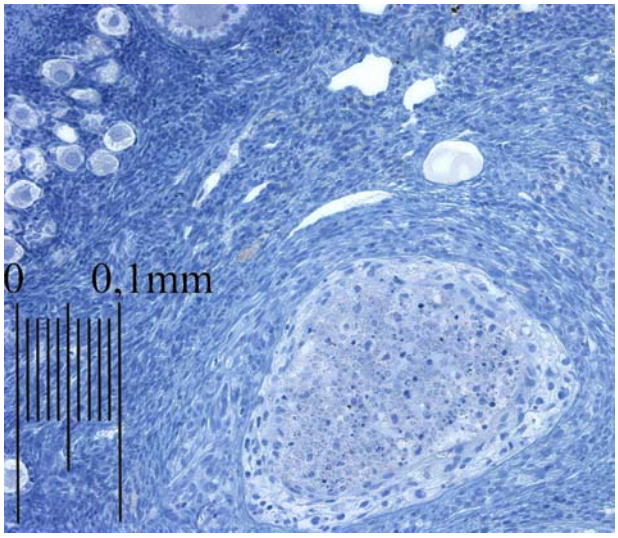


Abbildung 21: Negativkontrolle eines atretischen Follikels

Zwischen den Gruppen war, auf das gesamte Ovar bezogen, rein visuell, kein eindeutiger Trend auszumachen. Quantitativ konnte dies nicht ermittelt werden. Rein optisch war nur in G4 zum großen Teil weniger CD3-positive Färbung aufzufinden. Der Primordialfollikelbereich war in allen Gruppen frei von der Färbung. Gemeinsam lagen MHC-II und CD3 im Bereich des durchlöcherten Stromas, um atretische Follikel und in CL-Geweben vor. Am ausgeprägtesten waren beide Färbungen im Stroma um das durchlöcherte Stroma und um atretische Follikel vorhanden.

4.3.5 Zona-pellucida-3-/ Ki67 - Immunofluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der ZP3-/ Ki67 - Immunofluoreszenzfärbung wurde auf Proliferation im Ovar untersucht um festzustellen, ob in der Umgebung der Primordialfollikel, der Follikelreste und der wachsenden Follikel Proliferation vorhanden ist. Durch die Doppelfärbung konnten die Follikel bzw. die Follikelreste durch ZP3 identifiziert werden. Ki67 als Proliferationsmarker zeigte sich nicht vermehrt in den Bereichen des durchlöcherten Stromas und ebenfalls nicht in direkter Umgebung der Primordialfollikel. Ki67 positive Zellen zeigten sich vor allem in den Granulosazellschichten aller Follikelstadien nach dem Primordialstadium und in Endothelwänden von Blutgefäßen. Um die ZP3-positiven Primordialfollikel waren keine Ki67 positiven Zellen zu sehen. ZP3 war schon, wie in der immunohistologischen Färbung, sowohl bei allen Follikelstadien als auch bei den Überbleibseln bei dem durchlöcherten Stroma positiv.

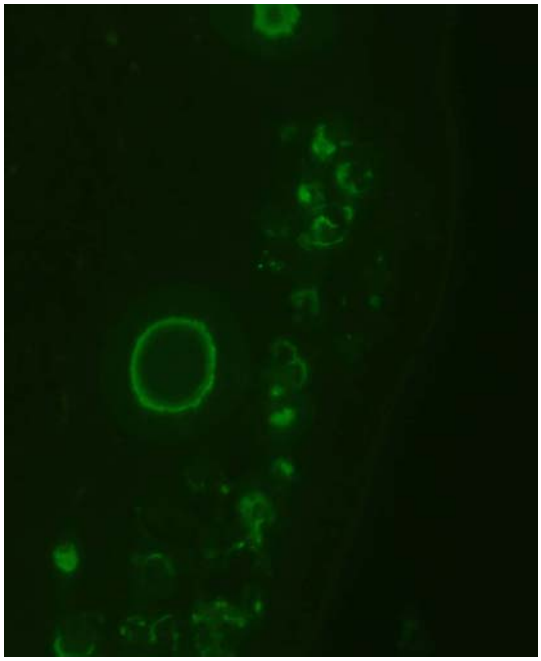


Abbildung 22: ZP3-Immunofluoreszenzfärbung - auch Primordialfollikel färben sich an

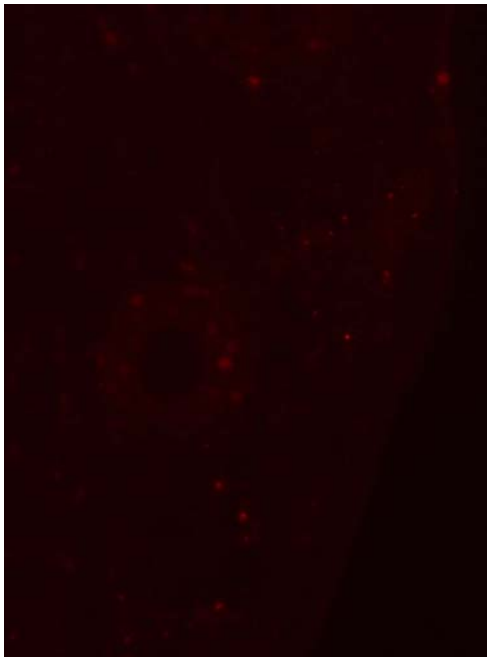


Abbildung 23: Ki67-Immunofluoreszenzfärbung - einzelne positive Zellen um Primär- und fortgeschrittenere Follikelstadien

4.4 Zusammenhänge aller Ovarien und deren Charakteristiken in Bezug auf Gewicht und andere gewichtsbezogene Relationen

Da alle ovariellen Unterschiede mit dem CL-Gewebe assoziiert waren wie auch das CL-Gewebe mit dem Gewicht der Tiere, erfolgten nach der Analyse der Zusammenhänge mit dem CL-Gewebe auch die Analysen der Zusammenhänge, bezogen auf das Gewicht.

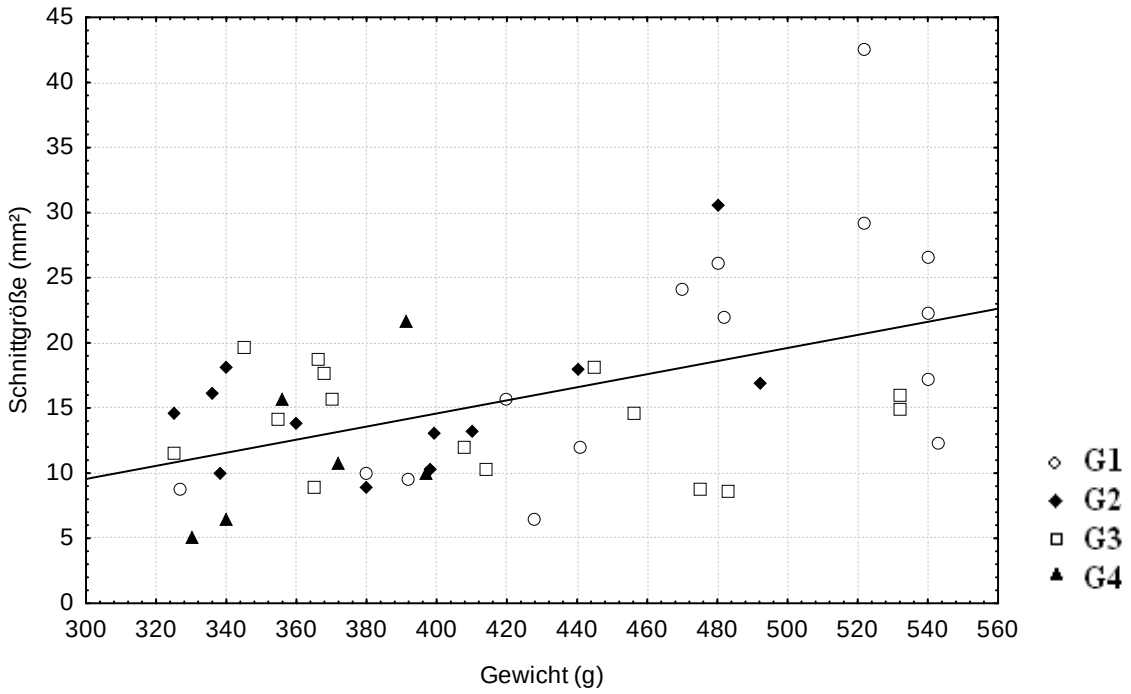
Tabelle 3: Gewichtsverteilung

Gewicht (g)	G1	G2	G3	G4
Median/ Q1/ Q2	480/ 420/ 540	389/ 339/ 425	408/ 365/ 475	364/ 340/ 391

Tabelle 3 fasst die Gewichtscharakteristika der vier Gruppen anhand deren CL-Gewebe zusammen. G1 zu G4 zeigte einen signifikanten Gewichtsunterschied $p = 0{,}006$. Gruppe G1 zeigte im Median das höchste Gewicht (480g) während G4 das niedrigste Gewicht zeigte (364g) und die G2 und G3 mittlere Gewichtswerte zeigten.

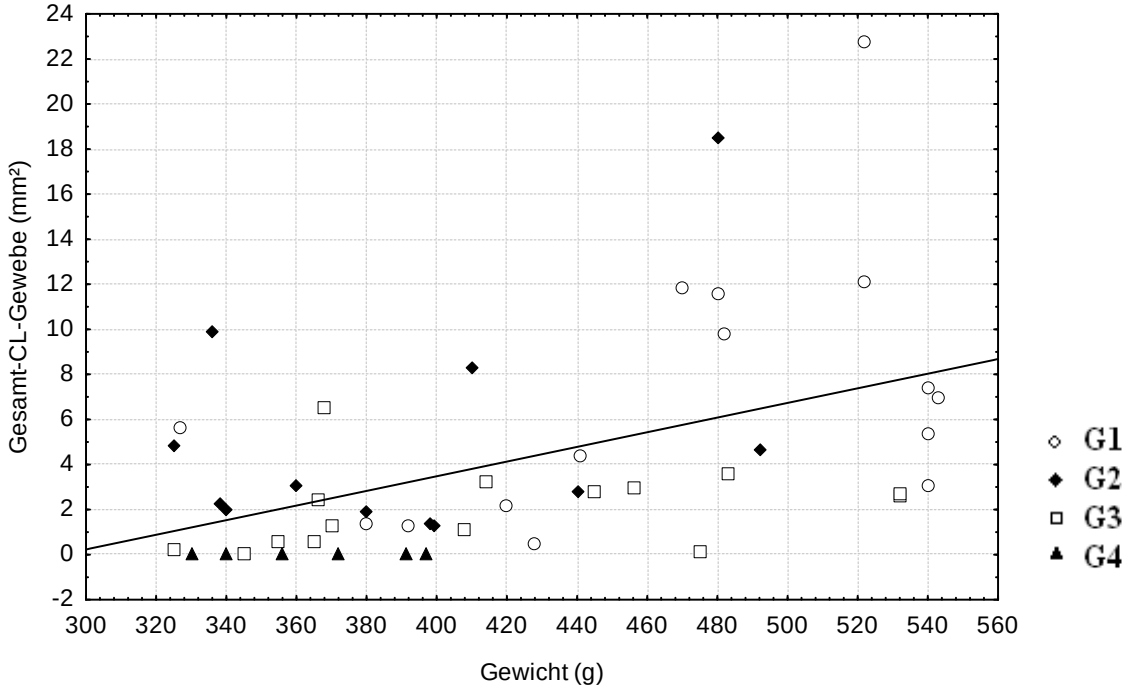
4.4.1 Gewicht und Schnittvermessungen

Auch die Schnittfläche der Ovarien als Indikator der Ovargröße korrelierte streng mit dem Gewicht der Tiere ($r = 0{,}49$, $p < 0{,}001$).



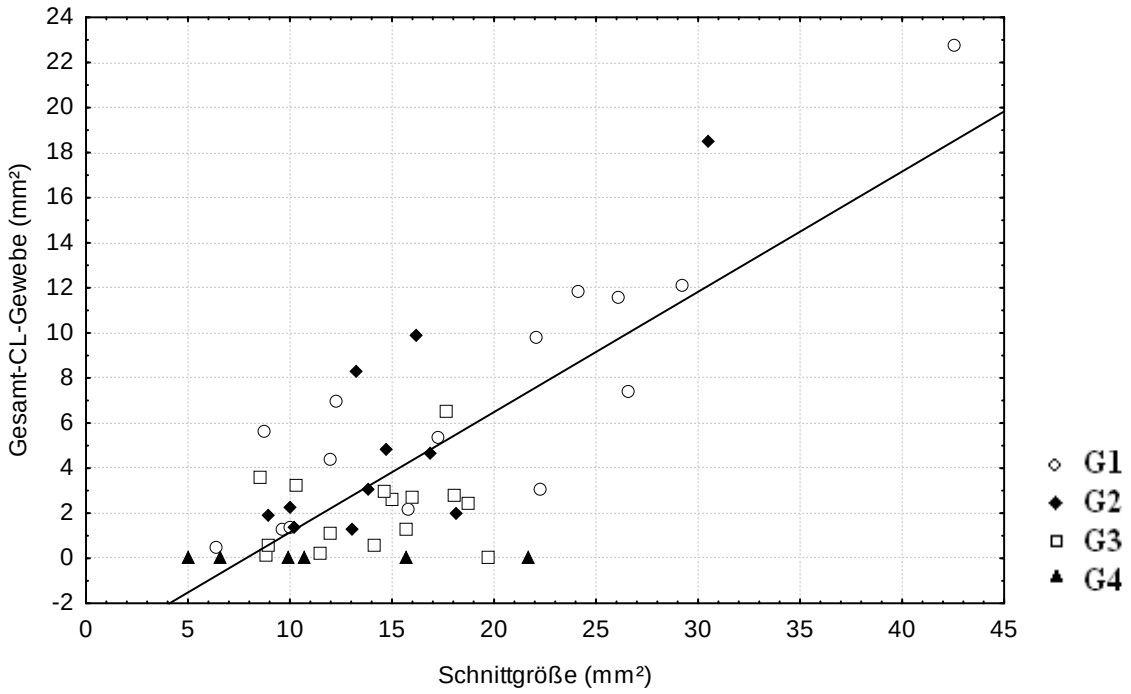
Grafik 28: positive Korrelation Schnittgröße zu Gewicht

Ebenfalls war die Abhängigkeit des gesamten CL-Gewebes zum Gewicht der Tiere nachweisbar (r = 0,44, p = 0,002).



Grafik 29: Gesamtes CL-Gewebe in Abhängigkeit zum Gewicht

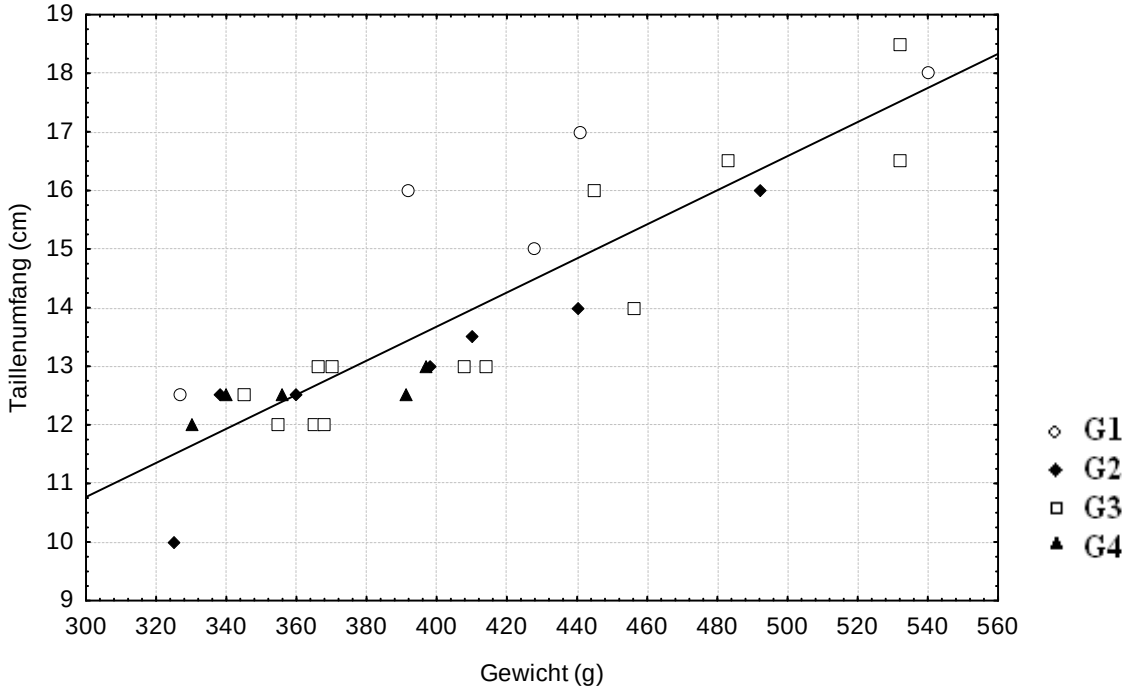
Die Schnittgröße und das Gesamt-CL-Gewebe hingen ebenfalls signifikant voneinander ab (r = 0,79, p < 0,001).



Grafik 30: Schnittgröße in Abhängigkeit zum Gesamt-CL-Gewebe

4.4.2 Gewicht, Taillenumfang und Triglyzeride

Es konnte eine signifikante Abhängigkeit von Gewicht zu Taillenumfang gezeigt werden, was bedeutet, dass das Gewicht der Tiere am Bauch angelagert ist. Bei n = 30 (bei einigen Tieren existierten die Daten des Taillenumfanges nicht) war r = 0,89 und p < 0,001.

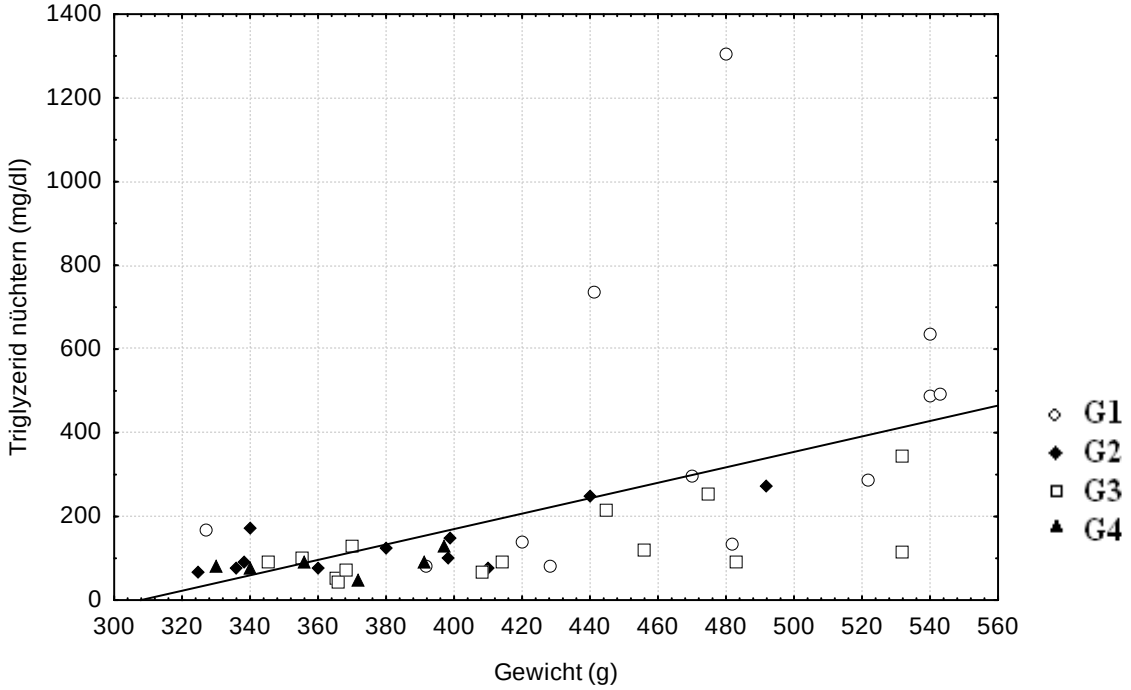


Grafik 31: Taillenumfang zu Gewicht

Die Taillenumfänge der G1 und G4 waren signifikant unterschiedlich (p = 0,047) mit den Medianen (Q1/ Q2) G1 16 (15/ 17), G2 13 (12,5/ 14), G3 13 (12,5/ 16), G4 12,5 (12,5/ 12,5).

Triglyzeride als Blutfettmarker wurden bestimmt, da sie sowohl den Blutfettstatus der Tiere repräsentieren als auch über den Weg des Cholesterins für die Steroidhormonproduktion stehen.

Gewicht und Triglyzeride zeigten ebenfalls eine signifikante positive Korrelation zueinander (r = 0,54, p < 0,001). Jedoch war diese Abhängigkeit in G2 und G3 nicht zu beobachten. Triglyzeride der G1 im Vergleich zu G4 zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied (p = 0,007).



Grafik 32: Triglyzeride in Relation zum Gewicht

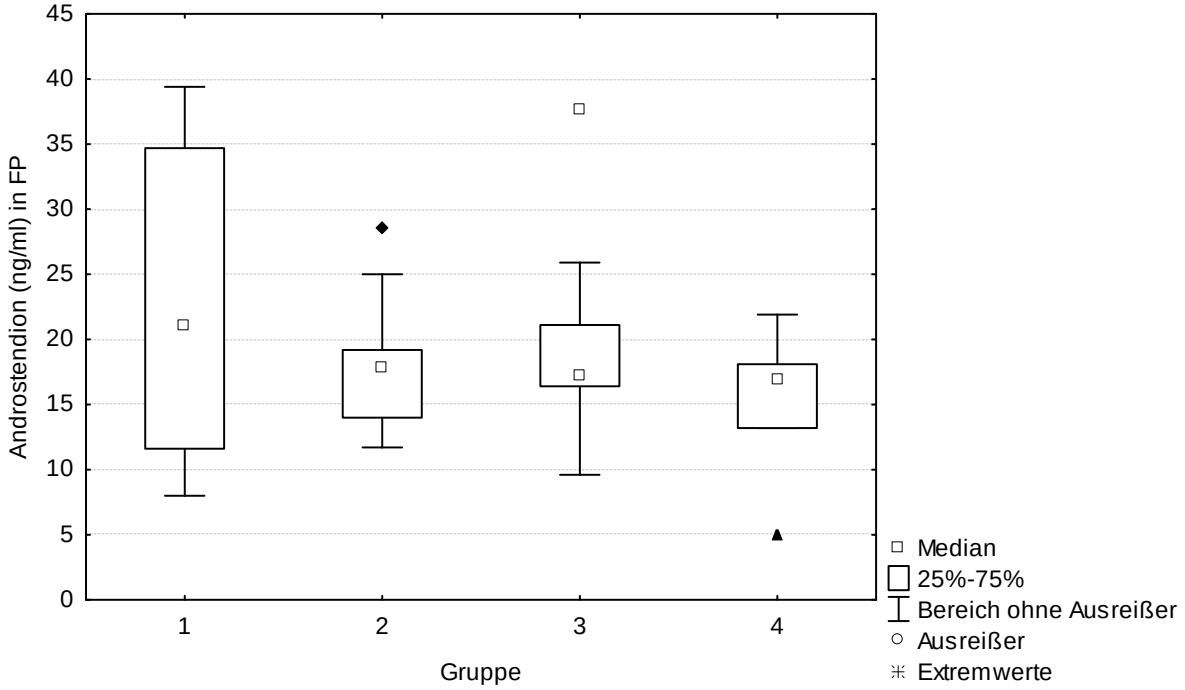
4.4.3 Gewicht und Hormonmessungen

4.4.3.1 Androstendion

Es wurde Androstendion als Vorstufe sowohl des Testosterons als auch des Östradiols zur Untersuchung herangezogen, da es bei normaler Aromataseaktivität zu Östron und weiter zu Östradiol synthetisiert wird. Androstendion lag in der follikulären Phase nur in G1 deutlich höher als in den anderen Gruppen - auch das obere Quartil war in G1 deutlich höher (Werte in Tabelle 4). In der Lutealphase hatte ebenfalls G1 die deutlich höheren Werte, jedoch auch in G4 zeigten sich hohe Werte. Die Signifikanzprüfungen zwischen G1 und G4 ergab keine Signifikanz auf Grund der breiten Streuung der Werte.

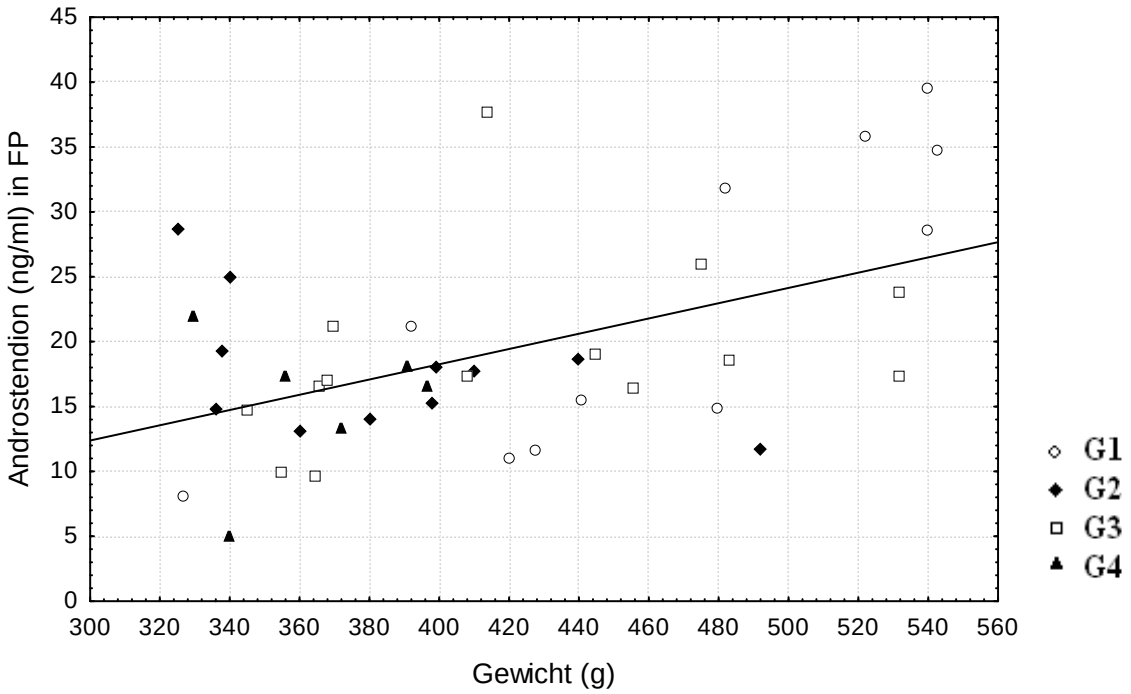
Tabelle 4: Androstendionwerte im Vergleich

Gruppe	Min/Max		Median		Q1		Q2	
	FP	LP	FP	LP	FP	LP	FP	LP
G1	8/39,4	20,5/42	21,1	37,1	11,6	26,6	34,7	39,7
G2	11,7/28,6	9,9/23,8	17,8	20,9	14,0	9,9	19,2	23,8
G3	9,6/37,6	16,3/25,4	17,2	22,3	16,4	16,3	21,1	25,4
G4	4,9/21,9	16,5/35,5	16,9	28,4	13,2	16,5	18,1	35,5



Grafik 33: Androstendion in der Follikelphase je Gruppe

Androstendion zeigte, zusätzlich zur Abhängigkeit zum Gesamt-CL-Gewebe wie beschrieben, sowohl in der FP ($r = 0{,}50$, $p = 0{,}001$, $n = 42$) als auch in der Lutealphase (LP) ($r = 0{,}69$, $p = 0{,}006$, $n = 14$) eine starke positive Korrelation zum Gewicht, sowie eine positive Korrelation zur Fläche an großzelligem CL-Gewebe ($r = 0{,}38$, $p = 0{,}014$) und der Schnittgröße ($r = 0{,}40$, $p = 0{,}009$).

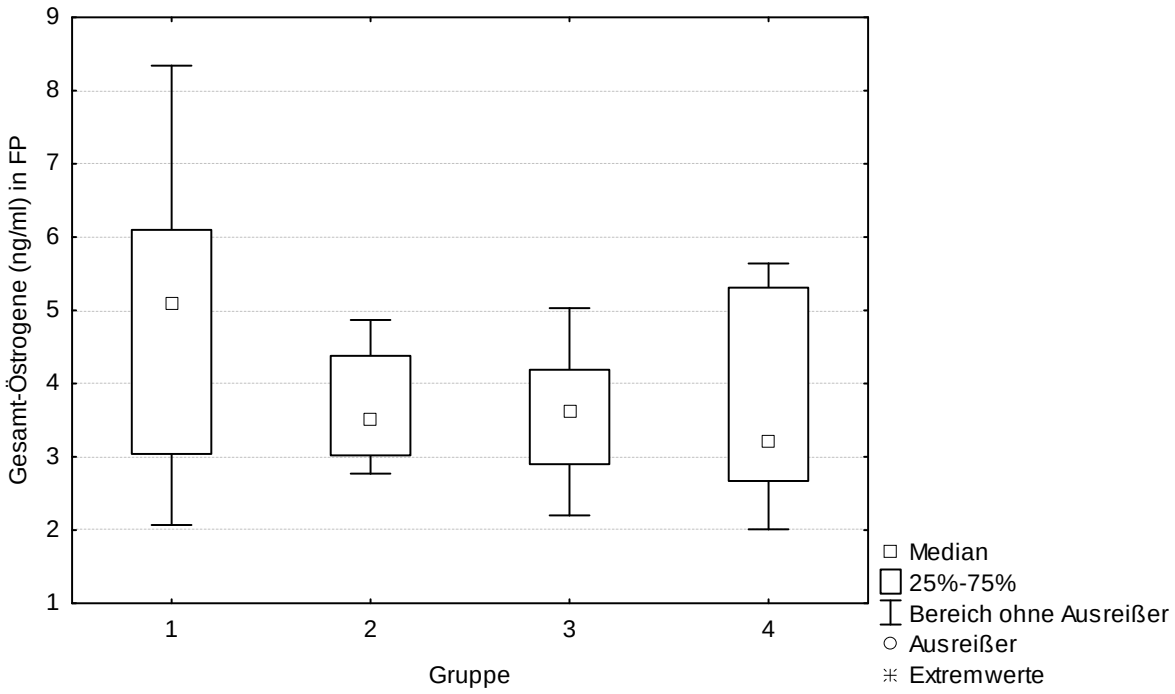


Grafik 34: Androstendion in Abhängigkeit zum Gewicht

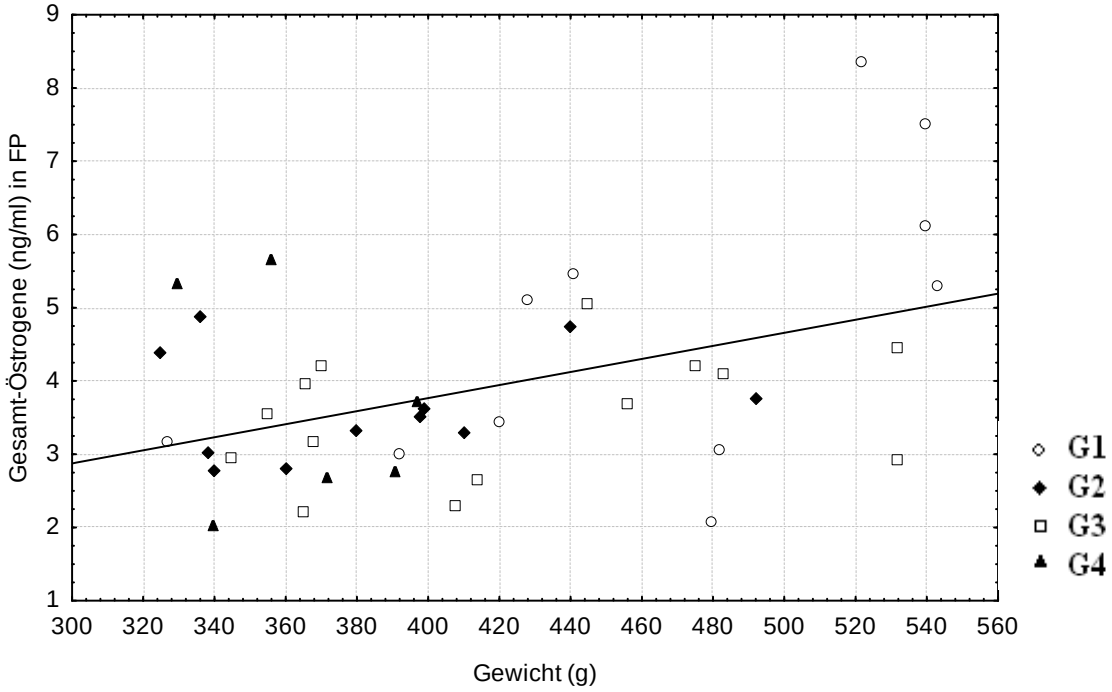
Auch mit der durchlöcherten Stromafläche zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zu Androstendion (r = 0,40, p = 0,009). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante positive Korrelation mit Gesamtöstrogen (r = 0,47, p = 0,002).

4.4.3.2 Gesamtöstrogen

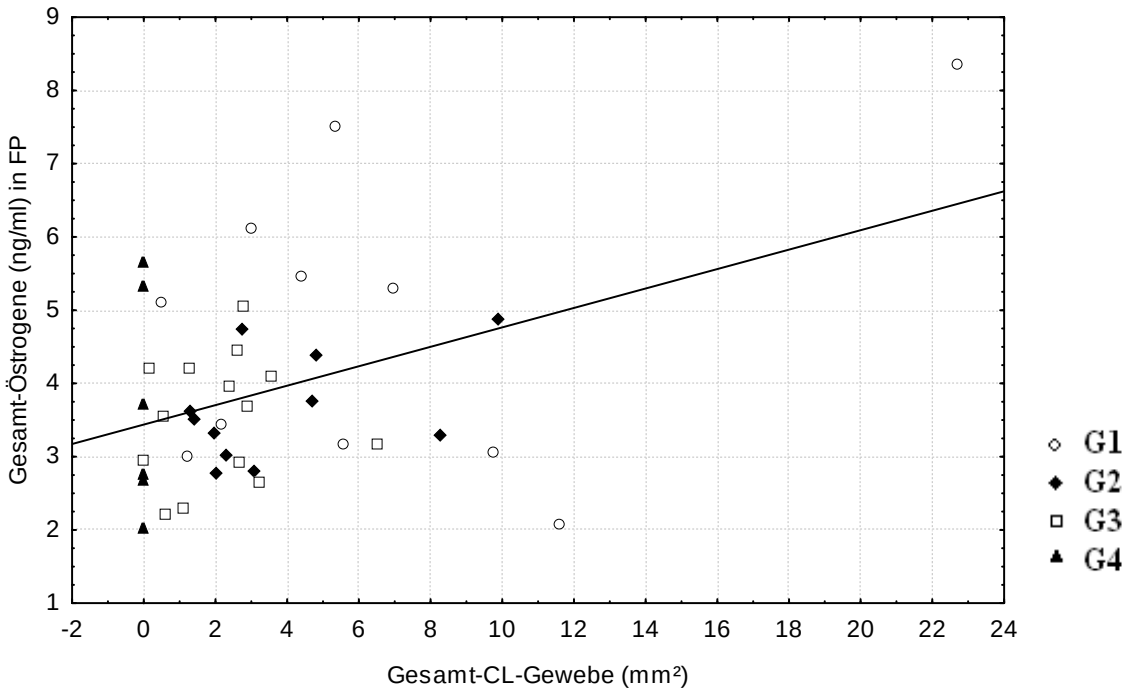
Es wurde Gesamstöstrogen bestimmt, um das stabile Hintergrundlevel der Östrogene zu ermitteln, in dem Wissen, dass nicht alle Metaboliten des Östrogens eine uns bekannte Wirkung haben. Östradiol alleine ist dem Zyklus unterworfen. Gesamtöstrogen in der FP zeigte folgende signifikante positive Korrelationen: zum Taillenumfang (r = 0,44, p = 0,015), zum Gewicht (r = 0,44, p = 0,004), zur Schnittgröße (r = 0,38, p = 0,013), zum großzelligen CL-Gewebe (r = 0,46, p = 0,002), zur durchlöcherten Stromafläche (r = 0,32, p = 0,038) und zum Androstendion in der FP, wie beschrieben.



Grafik 35: Gesamt-Östrogene in der follikulären Phase



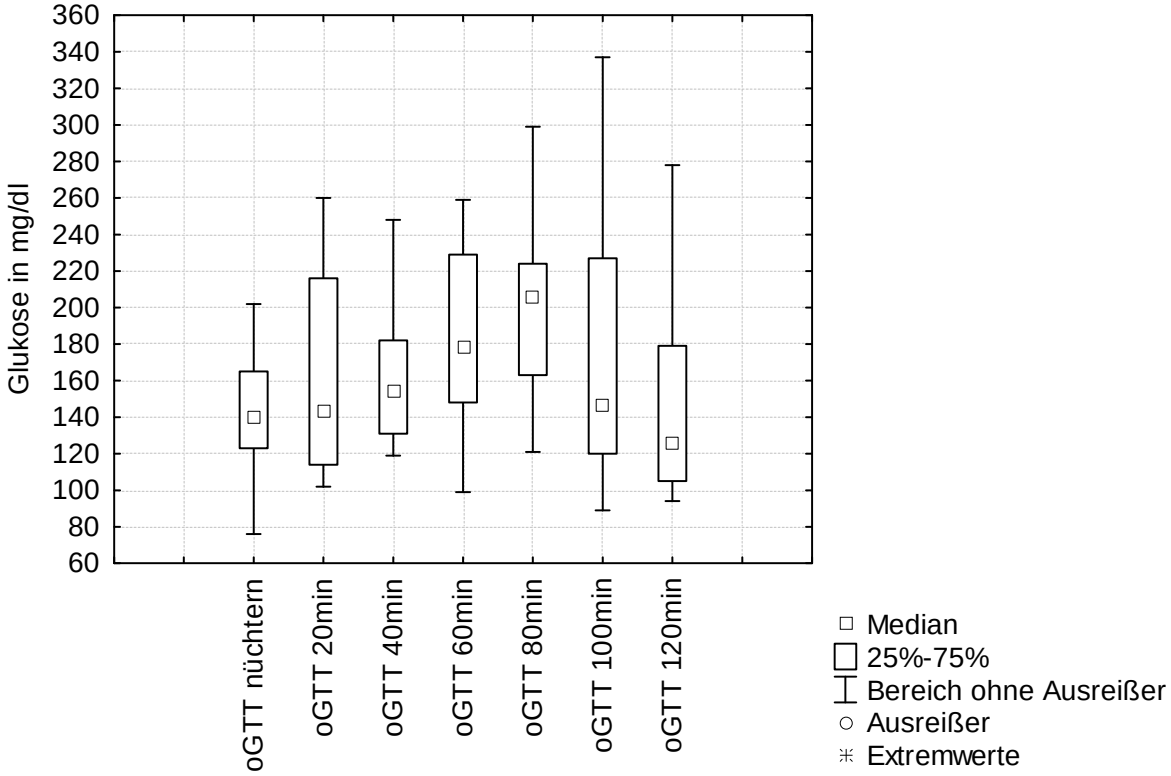
Grafik 36: Östrogene in der FP und Gewicht in Relation



Grafik 37: Östrogene und Gesamt-CL-Gewebe in Relation

4.5 Glukosetoleranztests

Glukosetoleranztests wurden noch vor der Ovarentnahme bei randomisiert ausgewählten Tieren (n = 14) durchgeführt, um die Verwertung und Aufnahme der Glukose in die Zellen zu testen. Bei einer nicht adäquaten Glukosetoleranz ist nach Aufnahme der Glukose der Blutglukosespiegel stark erhöht. Die Werte waren gewichtsassoziiert und damit bei schweren Tieren tendenziell höher als bei leichteren Tieren. Dies hing nicht streng von der Gruppe der Tiere ab.



Grafik 38: Glukosetoleranztest

Stressbedingt sind diese Werte nur bedingt aussagekräftig.

4.6 Freies Trijodthyronin/ freies Tetrajodthyronin

Trijodthyronin und Tetrajodthyronin wurde bestimmt auf Grund des häufig berichteten Zusammenhangs der Schilddrüsenhormone mit dem Ovar. Der Test wurde als ein Vortest von vier Blutproben durchgeführt. Die ermittelten Werte waren folgende:

Tabelle 5: Trijodthyronin- und Tetrajodthyroninwerte

	Freies T3	Freies T4
Tier 1 aus G1	13,55	23,08
Tier 2 aus G1	14,11	23,11
Tier 3 aus G3	11,67	35,98
Tier 4 aus G4	10,02	26,22

Da keine klaren Tendenzen aus den Werten hervorgingen, wurde auf weitere Tests verzichtet.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird erstmalig über die Ovarien der in Gefangenschaft lebenden Callithrix - jacchus - Weibchen im aktiven, reproduktionsfähigen Alter, entnommen in der mittleren FP, berichtet, welche histologisch untersucht und quantitativ auf strukturelle und funktionelle Variabilität evaluiert wurden. Da während der genauen Betrachtung der routinemäßig histologisch aufgearbeiteten Schnitte regelhaft gesehen werden konnte, dass die Ovarien der jungen bis mittelalten erwachsenen Tiere Merkmale der ovariellen Veränderung aufwiesen, wurde es als wichtig angesehen, mehr Informationen über dieses Phänomen im Verhältnis zur Endokrinologie und Physiologie dieser Tiere zu ermitteln und nach Möglichkeit ein normales Ovar für Callithrix jacchus zu definieren.

Die Auffälligkeiten in den untersuchten Ovarien der FP waren große Variationen in der Primordialfollikelreserve, vermehrtes und hochvariables großzelliges CL-Gewebe in einem Großteil der Ovarien, sowie vermehrter Umbau des Stromas, welches alles im scheinbaren Kontrast stand zu den in früheren Untersuchungen festgestellten erhöhten Ovulationsraten dieser Population, sowie deren Geburtenraten.

Die ersten Schritte waren die genaue und quantitative Beschreibung der verschiedenen Merkmale der Ovarien und diese mit der intra- und extraovariellen Physiologie in Zusammenhang zu stellen. Fragen, die sich dabei aufwarfen, waren: Wodurch kommt der Einfluss der CL-Gewebe, wenn die Progesteronlevel in der FP gleich hoch sind, wie bei Tieren ohne CL-Gewebe? - Welche ovariellen Veränderungen bringt das Vorhandensein der CL-Gewebe mit sich? - Was erhält das CL-Gewebe am Leben? - Welche zusätzlichen hormonellen Veränderungen bringt das Vorhandensein der CL-Gewebe mit sich? - Was ist die Rolle des Androstendions? - Welcher Zusammenhang besteht zwischen der CL-Menge und dem Körpergewicht bzw. der Fettverteilung der Tiere? - Ist das Metabolische Syndrom ausschlaggebend für die Veränderungen? - Ist dies ein Grund für verfrühte ovarielle Alterung?

5.1 Gruppierung der Ovarien, basiert auf den CL-Gewebetypen, als Grundlage der Analysen

Es wurden nach histologischer Aufarbeitung Untersuchungen durchgeführt, um eine quantitative Beschreibung der Ovarien zu erlangen. Als Hauptunterscheidungsmerkmal der Ovarien fiel die unterschiedliche Menge an CL-Gewebe auf. Dieses Gewebe sollte in der

follikulären Phase des Zyklus physiologisch schon weitestgehend in Bindegewebe umgebaut sein. Da dieses Gewebe in vielen der Ovarien in großen Mengen vorhanden war, wurde dies zur Einteilungsgrundlage. Alle anderen Aspekte des Ovars und weiterer physiologischer Indikatoren wurden in Referenz zu diesem Aspekt analysiert.

In vielen der Ovarien lagen multiple CLs vor, teilweise mit großen Lutealzellen, teilweise in der Form von CLs mit kleinen Zellen, welche auch eine andere Färbung annahmen als die großen Lutealzellen, teilweise in gemischter Form. Da die FP anhand des Progesteronspiegels im Blut bestimmt wird, ist die Kapazität der noch persistierenden Lutealzellen, Progesteron zu produzieren, zu diesem Zeitpunkt nicht mehr in hohem Maße gegeben. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sich mit der Zeit bei schweren Tieren die Lutealphase, welche durch einen hohen Progesteronspiegel gekennzeichnet ist, deutlich verlängert und die FP sich zusätzlich deutlich verkürzt (unveröffentlichte Daten). Dennoch scheinen andere Steroidprodukte aus den Lutealzellen Einfluss auf das restliche Ovar auszuüben. Die Persistenz des CL-Gewebes hat nach unserer Beobachtung weitreichende Folgen. Es besteht eine enge Abhängigkeit zwischen der Anwesenheit von Lutealgewebe und der vorhandenen Primordialfollikelreserve.

Die Follikelreserve ist bei Ovarien mit CL-Gewebe deutlich reduziert im Vergleich zu Ovarien ohne CL-Gewebe. Mehr noch, CL-Gewebe mit großen Lutealzellen, welche deutlich mehr Steroidprodukte produzieren als die kleineren (Hild-Petito et al. 1989), hat zur Folge, dass die Primordialfollikelreserve deutlicher reduziert ist als in Ovarien, in welchen nur CL-Gewebe mit kleinen Zellen vorliegt. Ob die kleinen Zellen Steroidprodukte produzieren oder nicht, ist in der Literatur nicht eindeutig beschrieben. Entweder sie produzieren vornehmlich Androstendion (Hild-Petito et al. 1989), oder sie sind nicht steroid-produzierend (Young et al. 1997). Nach unseren Ergebnissen macht es jedoch einen deutlichen Unterschied, ob CL-Gewebe mit großen Lutealzellen vorhanden ist, oder nur mit kleinen Zellen, mit gemischtem CL-Gewebe oder mit keinem - unabhängig vom Alter der Tiere.

Dies zeigte sich vor allem in der Auswertung der Follikelzahlen der verschiedenen Stadien, sowie der vermehrten Atresie bei Vorhandensein von CL-Gewebe. In allen ovariellen Faktoren konnte ein Trend verzeichnet werden, dass CL-Gewebe mit großzelligem Lutealgewebe die ovarielle Funktion am deutlichsten negativ beeinflusst und zusätzlich die Barriere zur Weiterentwicklung der Follikel zu senken scheint, während kein CL-Gewebe für die Ovarfunktion eine deutlich längere Funktionalität des Ovars zur Folge zu haben scheint. CL-Gewebe mit kleinen Lutealzellen verschlechtert die ovarielle Funktion, jedoch weniger stark als großzelliges Lutealgewebe.

5.2 Verhältnis zwischen Typ und Menge des CL-Gewebes, der follikulären Reserve und der Follikelrekrutierung

Zwar wurde die Co-Existenz von alten und neuen CLs bei in Gefangenschaft lebenden Callithrix-jacchus-Weibchen bei laparoskopischen Untersuchungen schon zuvor beschrieben (Torii et al. 1996), jedoch wird nach unserem Wissen hiermit zum ersten Mal beschrieben, dass der Anteil an Primordialfollikeln in Ovarien ohne CL-Gewebe deutlich größer ist als in Ovarien mit CL-Gewebe. Der Effekt der reduzierten Primordialfollikelreserve scheint der Follikelrekrutierung und Aufrechterhaltung der Prozessierung zu unterliegen. Betrachtet man die reine Anzahl an Primärfollikeln, welche in den Ovarien vorliegen, so ist eine verminderte Anzahl in Ovarien mit CL-Gewebe vorhanden. Berücksichtigt man zusätzlich die Anzahl an Primordialfollikeln, die pro Ovar vorliegen, so ist der Anteil an heranwachsenden Follikeln im Primärstadium prozentual gesehen in den Gruppen ohne CL-Gewebe deutlich geringer als in Ovarien mit CL-Gewebe. Absolut gesehen entstehen in Ovarien ohne CL-Gewebe mehr Primärfollikel aus einem größeren Pool. Je weniger CL-Gewebe vorlag, desto weiter war das Verhältnis von Primordialfollikeln zu Primärfollikeln zu ersteren verschoben. Die absolute Anzahl an Primärfollikeln ist bei kleinerer Primordialfollikelreserve geringer als bei großer Reserve, jedoch nur in absoluten Zahlen. Die absoluten Zahlen glichen sich aber ab dem Sekundärstadium wieder an, so dass von der geringeren Anzahl an Primärfollikeln der Ovarien mit CL-Gewebe anteilig deutlich mehr Follikel weiterprozessiert werden müssen als in Ovarien ohne CL-Gewebe. Dies hat, so unsere Hypothese, zur Folge, dass auch Primärfollikel in die Weiterentwicklung gehen, welche im Ovar ohne CL-Gewebe auf Grund von Veränderungen des Follikels in die Atresie überführt würden. Da jedoch die Beurteilung der Ovarien eine Momentaufnahme ist, lassen sich die Verläufe der Rekrutierung und Prozessierung nicht genau nachvollziehen. Wenn diese Hypothese zutrifft, dann ist bei Vorhandensein von CL-Gewebe die ovarielle Alterung schon weit fortgeschritten und alle noch möglichen Follikel werden, so weit es geht, prozessiert, wodurch wiederum die Follikelpooldepletion durch spätere Atresie und Nachrekrutierung gefördert wird. Dass die ovarielle Alterung mit viel aktivem CL-Gewebe verbunden ist, ist zumindest für Tamarine schon vorbeschrieben (Tardif und Ziegler 1992).

Der normale erste Atresiezeitpunkt beim Callithrix jacchus, welcher vor der eigentlichen Auswahl des dominanten Follikels stattfindet, ist unserer Beobachtung nach im Übergang zwischen Primär- und Sekundär-I-Follikel im Gegensatz zu beim Menschen beschriebenen ersten Atresiezeitpunkt schon in der Primordialfollikelphase (Adhikari und Liu 2009).

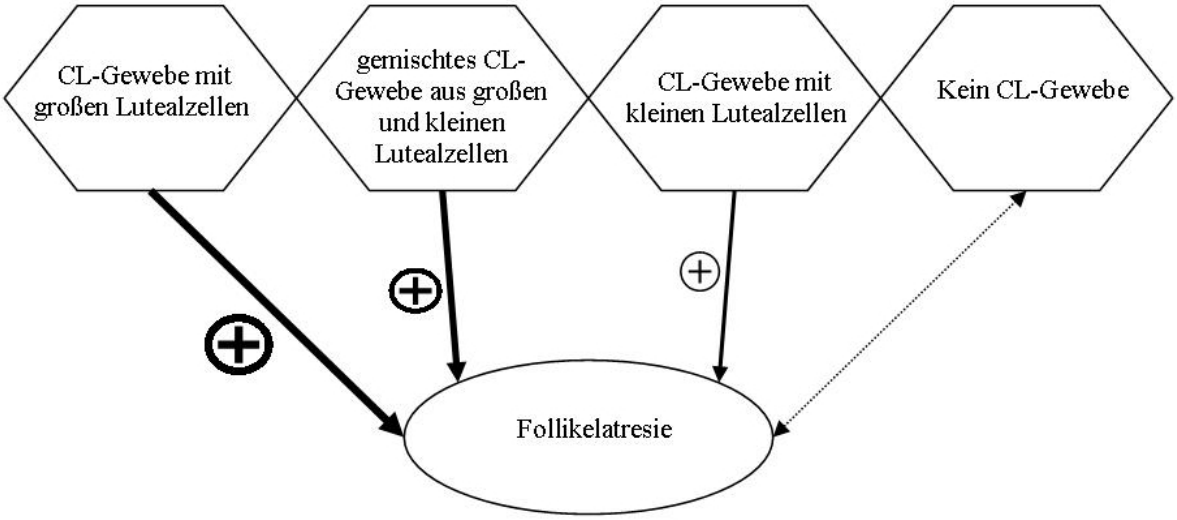
Ab dem Sekundär-I-Stadium gleichen sich die Follikelzahlen über die Gruppen langsam an, wobei in G4 ohne CL-Gewebe weniger Follikel vorhanden sind als in den anderen Gruppen mit CL-Gewebe - was bedeutet, dass in den Gruppen mit CL-Gewebe so viele Follikel weiter prozessiert werden wie möglich, während in G4 noch die scheinbar normale Atresie und damit auch Auswahl der Follikel im Übergang zum Sekundärstadium I stattfindet.

Ab dem Tertiär- und Graafschen Follikelstadium war die absolute Anzahl in allen Gruppen sehr ähnlich. Dies heißt, dass, um die gleiche Anzahl an Tertiär- und Graafschen Follikeln zu bekommen, eine höhere Anzahl an Sekundärfollikeln benötigt werden, da auf dem Weg zu den sprungreifen Follikeln mehr Follikel atresieren. Dieser Mechanismus steht in engem Zusammenhang mit der Anwesenheit der verschiedenen CL-Typen, respektive ihrer Abwesenheit - ein Zusammenspiel, das die schon fortgeschrittene ovarielle Entleerung weiter beschleunigt.

Mögliche Mechanismen, die diese beschleunigte ovarielle Entleerung begünstigen, sind auf hormoneller Ebene zu sehen. So führt ein durch u. a. CL-Gewebe induziertes erhöhtes androgenes Milieu zu einer verfrühten Follikelheranreifung (Greisen et al. 2001), sowie zu einer verfrühten Atresie (Zelinski-Wooten et al. 1993). Dabei erhält das CL-Gewebe sich durch die vermehrte Androgenproduktion selbst am Leben (Goyeneche et al. 2002).

5.3 CL-Gewebe und Atresie

Ein weiterer Aspekt bezüglich der ovariellen Veränderungen in Abhängigkeit zu CL-Gewebe ist die stattfindende Atresie der Follikel. Atresie kommt physiologisch in jedem Ovar zur Selektion der dominanten Follikel vor. Beim Menschen nimmt die Atresie im Alter von 37 bis 38 Jahren deutlich zu (Magoffin 2004). Im normalen Zyklus gehen beim Menschen etwa 1000 Follikel pro Monat zu Grunde - dies ist jedoch beschrieben als direkter Verlust aus der Primordialfollikelreserve (Adhikari und Liu 2009). Ab dem Alter von 37 Jahren gehen beim Menschen noch deutlich mehr Primordialfollikel in die Atresie (Adhikari und Liu 2009); wobei es nicht ganz klar ist, ob diese Primordialfollikel anfangen zu wachsen und das von der Granulosa produzierte östrogenreiche Milieu nicht ausreichend wachstumsfördernd ist, oder ob sie im Primordialfollikelstadium direkt atresieren (Adhikari und Liu 2009). Unserer Beobachtung nach erfolgt diese erste Atresiewelle beim Callithrix jacchus jedoch im Primärstadium - also nachdem das Wachstum begonnen hat.



Grafik 39: Vorkommen von Follikelatresie im Stadium ab Sekundär-I unter Anwesenheit der verschiedenen Lutealzellentypen

Die Atresie ließ sich in den untersuchten Ovarien ab dem Sekundärstadium I eindeutig identifizieren. In diesem frühen Stadium gab es in Ovarien ohne CL (G4) keinerlei Atresie, während ein leichter Anstieg an Atresie in den Gruppen mit CL-Gewebe mit nur kleinen Zellen (G3) über CL-Gewebe mit der Mischform an Lutealzellen (G2) bis hin zu CL-Gewebe mit reinen Lutealzellen (G1) zu verzeichnen war. Atresie, je nach Stadium der Follikel und der zunächst betroffenen Struktur, ist ebenfalls ein Faktor, der durch hormonelle Veränderungen gefördert wird, so z.B. durch erhöhte Androgenexposition (Zelinski-Wooten et al. 1993). Ein Faktor, der zur Hormonverschiebung beiträgt, ist die Atresie selbst, da atretischer Granulosa gleich zu Beginn die Aromatase verloren geht (Greenwald und Roy 1994; Maxson et al. 1985) und damit Östrogene nicht mehr synthetisiert werden können (McNatty et al. 1979). Da die FSH-Rezeptoren der Granulosa verloren gehen, fällt außer der Östrogenproduktion auch die Progesteronproduktion aus (Greenwald und Roy 1994). Somit wird von der atretischen Granulosa nur noch Androstendion produziert (McNatty et al. 1979).

Atresie hat je nach Entwicklungsstadium des Follikels unterschiedliche Stadien, je nachdem, ob schon die Thekazellschicht existiert oder nicht. Für den Menschen wurden drei Stadien der Atresie beschrieben: im ersten Stadium bilden sich Granulosazellen zurück und verlieren den Zellkontakt zu einander, der Zellverband lockert sich. Im zweiten Stadium ist der Granulosazellverlust vorherrschend mit zeitgleicher Hypertrophie und Hyperplasie der Thekazellen und im Stadium drei bildet sich auch die Theka zurück. In allen drei Stadien ist das Hauptsteroidprodukt Androstendion, welches nicht mehr weiter umgewandelt werden kann, da die Aromatase bereits im ersten Stadium verloren geht (Greenwald und Roy 1994).

Die Atresie der Theka, welche den Blutzufluss zum Follikel unterbindet, hat zur Folge, dass, sobald der LH-Spiegel ansteigt, nochmals deutlich mehr Androgene ausgeschüttet werden und in den Thekazellen sich Progesteron akkumuliert, welches im Verlauf ebenfalls freigesetzt wird (Greenwald und Roy 1994; Maxson et al. 1985). Auch die Theka verliert die Fähigkeit Östrogene zu synthetisieren (Maxson et al. 1985).

Atresie war in den weiteren Stadien der Follikulogenese immer und in allen Gruppen vorhanden - jedoch wiederum in G1, der Gruppe mit reinem Lutealgewebe, mit Abstand am häufigsten und mit der größten Variabilität. Der größte Follikelzellverlust nach dem Übergang von Primär- zu Sekundärfollikel war jedoch im Übergang von Sekundär-II-Follikeln hin zu Tertiärfollikeln zu verzeichnen - einem Zeitpunkt, zu dem die Selektion der dominanten Follikel stattfindet.

Die Atresiezeichen der Follikel werden durch die kuboide Form der Theka beschrieben (Greenwald und Roy 1994), jedoch gab es in G1 auch atretische Follikel, bei welchen die Thekazellen noch flach waren und der Granulosazellverband sich bereits aufgelöst hatte. Diese Konstellation zeigte sich aber nur in Ovarien mit großzelligem CL-Gewebe. In allen anderen Gruppen waren die atretischen Follikel des Tertiär-und Graafschen Stadiums ebenfalls mit kuboider Theka gekennzeichnet. Anteilig an der Gesamtzahl der atretischen Follikel im Tertiär- und Graafschen Follikelstadium waren nur in G4, welche keinerlei CL-Gewebe haben, weniger vorhanden.

Über alle Stadien der Follikel ab Stadium Sekundär-II über die Gruppen hinweg war eine Zunahme der Atresie von G4 hin zu G1 zu verzeichnen - je mehr CL-Gewebe vorlag und je mehr großzelliges CL-Gewebe vorlag, desto mehr Atresie war vorhanden. Auch hier liegt die Verbindung zum veränderten hormonellen Milieu durch vor allem das Atresie fördernde Androstendion nahe (Zelinski-Wooten et al. 1993).

Trotzdem scheint das vermehrte Vorkommen von CL-Gewebe die Prozessierung der Primärfollikel zu Sekundärfollikeln zu fördern.

5.4 Atresie, Follikelreste und der Verlust des Stromas im Inneren des Ovars

In den untersuchten Ovarien war jedoch im Zusammenhang mit der Atresie noch eine andere Struktur ins Auge gefallen, welche als Zona pellucida identifiziert werden konnte, eine azelluläre Glykoproteinschicht um die Oozyten (Kerr et al. 1998). Im Stromabereich der Ovarien waren multiple durchlöcherte Gebiete, in welchen ZP3-positive Reste vorlagen.

Diese scheinen z. T. mit der Zeit abgebaut zu werden und ein durchlöchertes Stroma zurückzulassen, in welchem keine Zellproliferation mehr stattfindet. In manchen Ovarien konnte gesehen werden, dass die einzelnen Löcher sich scheinbar verbanden zu einem großen leeren Raum in der Mitte des Ovars und damit auch zu einer Verdrängung der Medulla führten. Zona pellucida, so konnte nach unserem Wissen erstmals gezeigt werden, bildet sich schon bevor die ersten Granulosazellen sich um die Primordialfollikel bilden. Somit kann das Vorhandensein der Zona pellucida als erstes Zeichen der Follikelrekrutierung gewertet werden. Des Weiteren zeigte sich, dass im Übergangstadium zu den Sekundär-II-Follikeln, sowie im Übergang zu den Tertiärfollikeln, diese ZP3-Reste entstehen. Da die Gesamtatresie in den G1 bis 3 höher lag als in G4 und in den Gruppen mit CL-Gewebe das durchlöcherte Stroma mit ZP3-Resten deutlich vermehrt vorlag, bedeutet dies nach unserer Ansicht, dass die Atresie im späteren Stadium als im Primärfollikelstadium mit dem Übrigbleiben der Eihülle im Stroma verbunden ist. Diese Art der Atresie lag dem zu Folge in Ovarien mit CL-Gewebe schon über längere Zeit vor, da die ZP3-Reste mit der Menge an CL-Gewebe positiv korrelierten, aber für die Menge an ZP3-Resten auch eine große Anzahl an Follikeln schon atresiert sein müssen.

Durch MHC-II und CD3-Färbungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die entzündliche Aktivität durch das Zusammenspiel von MHC-II der intraovariellen Zellen, sowie CD3 der immer im Ovar vorhandenen T-Zellen, die Atresie der Follikel gekennzeichnet ist. Diese entzündliche Aktivität herrschte ausschließlich um und an atretischen Follikeln vor, sowie zusätzlich an Rändern des durchlöcherten Stromas. Um die verbliebenen ZP3-Reste lag keine Aktivität vor, genauso wenig wie um die Primordial- und Primärfollikel, was die These stützt, dass die Atresie der Follikel, welche zum zusätzlichen Follikelverlust führt, erst in späteren Follikelstadien stattfindet und gefördert wird durch Verschiebung des hormonellen Milieus. Und erst durch diesen späten Follikelzellverlust wird die Nachrekrutierung und damit Entleerung der Primordialfollikelreserve beschleunigt.

Des Weiteren zeigt es, dass das Ausräumen der zurückbleibenden Löcher im Stroma nicht durch T-Lymphozyten erfolgt. Es scheint durch die Durchlöcherung des Stromas das eigentliche Stroma verloren zu gehen und weitgehend durch Stützgewebe ersetzt zu werden, da der Kern der Ovarien mit diesen Veränderungen deutlich verhärtet ist (Tkachenko 2009).

Da die Menge des durchlöcherten Stromas mit der Anzahl der vorhandenen Zona pellucida-Reste korrelierte und dies beides auch abhängig war von der Menge und Art des CL-Gewebes, liegt auch hier die Verbindung zu hormonellen Verschiebungen durch persistierendes CL-Gewebe nahe.

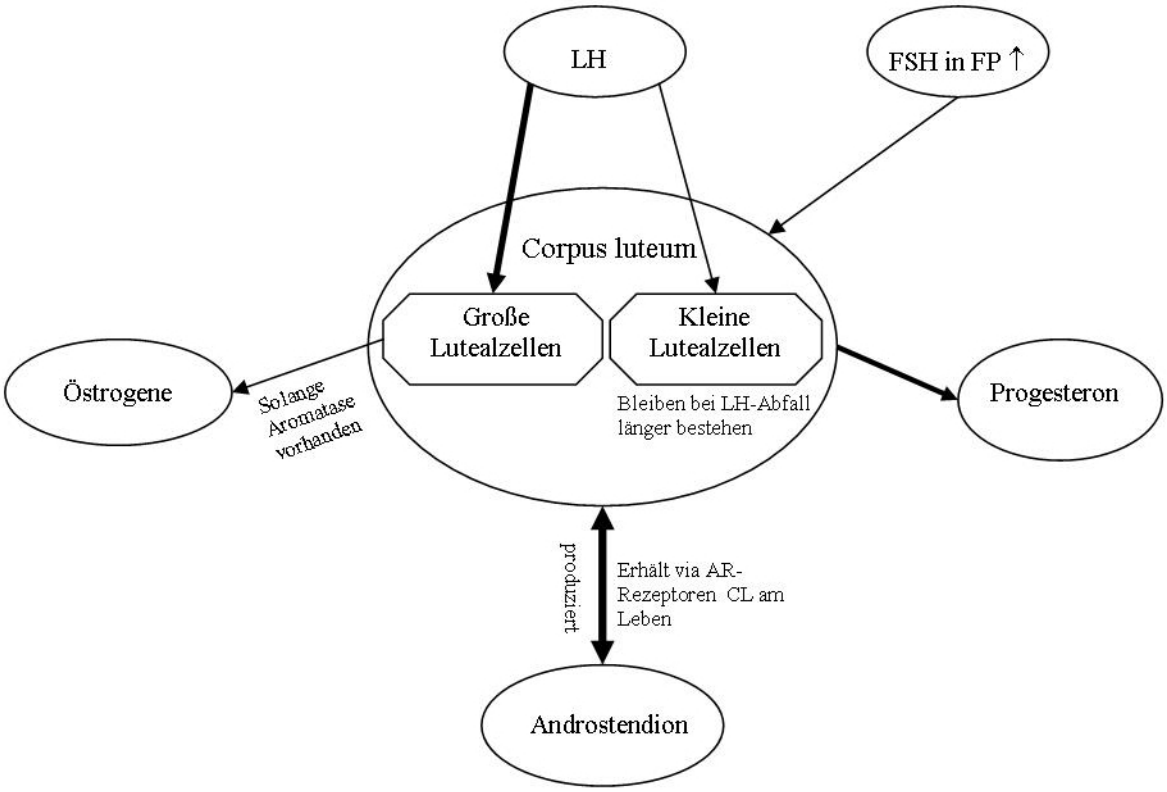
5.5 Dynamik der CL-Lebenszeit und Funktion werden durch Gonadotropine kontrolliert

Das Corpus luteum produziert in der Lutealphase physiologisch vorherrschend Progesteron. Durch die luteale Regression, die durch nicht Eintreten einer Schwangerschaft physiologischer Weise induziert wird, sinkt die Steroidproduktion proportional mit der Menge des CL-Gewebes (Young et al. 1997). Am Leben erhalten wird das CL unter anderem durch die Hypophyse mittels LH. Wenn dieses rückläufig ist, tritt die physiologische Regression ein (Usadi und Fritz 2003). Für Callithrix jacchus wurde einmalig beschrieben, dass die Hypophyse kein LH produziert, sondern ausschließlich CG (Korrelat zu ß-HCG) - was jedoch nicht überprüft oder verfolgt wurde (Müller et al. 2004). Ob jedoch LH/ CG bei Tieren mit persistierenden CLs chronisch erhöht ist und ob dies der ausschlaggebende Unterschied zu Tieren ohne persistierendes CL-Gewebe ist, muss noch weiter überprüft werden. Es gibt jedoch in der Literatur Hinweise darauf, dass chronisch erhöhtes LH entweder die Follikelrekrutierung beschleunigt oder die Apoptose der Primordialfollikel - es habe einen direkten oder indirekten Effekt auf die Follikeldepletion (Flaws et al. 1997).

Schon geringe Änderungen der Sekretion der Hypophyse auch während der FP, durch zu geringe FSH-Ausschüttung, führt zu Abnormalitäten sowohl in Qualität als auch in der Dauer der CL-Funktion, welche dadurch verkürzt wird (Usadi und Fritz 2003). Umgekehrt liegt es nahe, dass eine erhöhte FSH-Ausschüttung in der FP mit vermehrter Follikelrekrutierung und vermehrtem Follikelwachstum einhergeht. Dies wird auch durch die Hypothese von Gilchrist gestützt, der für Callithrix-jacchus-Weibchen eine ähnliche Verlaufsform der Spiegel des FSH wie beim Menschen, jedoch mit einem deutlich höheren Maximallevel präovulatorisch zeigen konnte und damit den Schluss zog, dass dieses deutlich erhöhte Maximallevel eine Erhöhung der Follikelrekrutierung zur Folge haben könnte (Gilchrist et al. 2002). Zusätzlich wird dann durch die vermehrte FSH-Ausschüttung die CL-Funktion länger aufrecht erhalten, was damit auch eine verlängerte Lutealphase zur Folge hat. Jedoch scheint bei Callithrix jacchus, falls die vermehrte Follikelrekrutierung durch FSH induziert sein sollte, das CL zwar länger vorhanden zu sein, jedoch die Funktion der Progesteronproduktion weitgehend einzubüßen.

Ein anderer Aspekt ist der potentielle Unterschied der Reagibilität der großen und kleinen Lutealzellen. Die großen Lutealzellen sind deutlich LH-reagibler als kleine Lutealzellen (Hild-Petito et al. 1989), so dass die kleinen Lutealzellen durch den LH-Abfall in der Lutealphase nicht so stark betroffen sind und daher nicht so schnell in Apoptose bzw. im Umbau münden. Da die kleinen Lutealzellen eine Hauptquelle des Androstendions sind (Hild-

Petito et al. 1989), ist Androstendion, wie auch bei unseren Tieren beobachtet, bei Tieren mit CL-Gewebe deutlich höher als bei Tieren ohne CL-Gewebe, jedoch auch hier am deutlichsten erhöht bei Tieren mit zusätzlich großen Lutealzellen. Dies ist begründet darauf, dass zumindest bei Rhesusaffen ebenfalls die großen Lutealzellen Androstendion und Östrogen produzieren - ebenso wie die Paralutealzellen, welche vermutlich aus der Theka interna entstehen (Hild-Petito et al. 1989).



Grafik 40: Corpus luteum, seine Produkte und was es am Leben erhält

5.6 Beziehung zwischen Körpergewicht und ovariellem CL-Gewebe

Ein interessanter Aspekt bei all diesen Beobachtungen ist die strenge Abhängigkeit aller bisher genannten Faktoren nicht nur von der Gesamtmenge des CLs, sondern ebenso vom Gewicht der Tiere. Auch die CL-Menge an sich zeigt eine strenge positive Korrelation mit dem Gewicht. Das Gewicht der Tiere wurde routinemässig vor der Euthanasie ermittelt. Im Rahmen der CL-abhängigen Gruppeneinteilung konnte gesehen werden, dass Tiere in G1 (großzelliges Lutealgewebe) das bei weitem höchste mediale Gewicht hatten, während in G2 (gemischtes Lutealgewebe) und G3 (reines Lutealgewebe mit kleinen Zellen) das Gewicht auf mittlerem Niveau lag und in G4 (kein CL-Gewebe) das mediale Gewicht deutlich am

geringsten war. Nicht nur das gesamte CL-Gewebe zeigte diese positive Korrelation - auch alleine das großzellige CL-Gewebe. Verglichen mit den Gewichten der in freier Wildbahn lebenden Callithrix-jacchus-Weibchen ist dies schon alleine bei G4 mit über 100g mehr ein deutliches Übergewicht, welches natürlicherweise auf den Körper einen Einfluss hat. Die Fettverteilung, welche bekanntermaßen je nach Verteilungsmuster die gesundheitliche Gefährlichkeit widerspiegelt, war bei allen Tieren hauptsächlich abdominell, welches die gesundheitlich bedenklichere Form ist. So konnten wir zeigen, dass erhöhtes Gewicht bei Callithrix-jacchus-Affen streng korreliert mit dem Taillenumfang der Tiere. Bei höherem Gewicht wurden für Callithrix-jacchus-Weibchen bereits Stoffwechselstörungen beschrieben wie erhöhte Glukose, erhöhte Triglyzeride, niedriges HDL und LDL sowie niedriges Cholesterol (del Rio do Valle 2008; Schlumbohm et al. 2005). Die Stoffwechselstörungen des Callithrix jacchus erinnern deutlich an Diabetes Mellitus Typ II des Menschen (Schlumbohm et al. 2005), so dass auch der Ansatz Callithrix-jacchus-Affen als Modell für Übergewicht und Diabetes anstelle der Altweltprimaten mit dem Vorteil der schnelleren Generationenfolge (Tardif et al. 2009) gerechtfertigt scheint und damit auch als Modell für sog. Lebensstil induzierte Krankheiten. Nach unserem Wissen ist dies damit die erste Studie, die eine direkte Verbindung zwischen ovarieller Dysfunktion und metabolischem Syndrom bei Callithrix-jacchus-Affen aufzeigt.

5.7 Diabetes mellitus Typ II und damit verbundene Insulinresistenz, zusammen mit den ovariellen Symptomen, erinnern an das Polyzystische Ovar

Ein weiterer Aspekt, der damit in den Mittelpunkt rückt, ist der Hintergrund des Diabetes Mellitus Typ II - die Insulinresistenz. Vorbeschrieben ist, dass die Insulinresistenz bzw. die Hyperinsulinämie assoziiert ist mit viel abdominellem Fettgewebe, einer Glukosetoleranzstörung, Hypertonus und einer Dyslipidämie (Vignesh und Mohan 2007). Je ausgeprägter das Übergewicht, desto ausgeprägter stellt sich auch die Insulinresistenz, aber auch ein Hyperandrogenismus dar (Vignesh und Mohan 2007), zumindest bei Menschen, welche unter Polyzystischen Ovarien leiden. Die Polyzystischen Ovarien zeigen zu weiten Teilen ähnliche Veränderungen im Ovar wie die bei uns festgestellten. Das Polyzystische Ovar Syndrom ist meist ein Teil des Metabolischen Syndroms (Vignesh und Mohan 2007).

Diese Aspekte weiter betrachtet und die Ergebnisse der Triglyzeridbestimmungen, sowie der Glukosetoleranztests, lassen den Schluss zu, dass ein Komplex an Stoffwechselstörungen bei übergewichtigen Callithrix-jacchus-Affen vorliegt, welcher der Definition des Metabolischen

Syndroms unterworfen werden kann. Für Callithrix-jacchus-Affen gibt es bisher keine einheitliche Definition des Metabolischen Syndroms, jedoch wurde eine Definition bislang veröffentlicht von Tardif (Tardif et al. 2009), in der sie alle Tiere jenseits der 90sten Perzentile der in die Untersuchung eingeschlossenen Tiere in den jeweiligen Bereichen wie z.B. Fett als krank definiert. So definierte sie Tiere als übergewichtig jenseits des Gewichtes von 432g. Im Bezug auf das Ursprungsgewicht der wild lebenden Tiere ist dies mit über 170g mehr unserer Ansicht nach deutlich zu hoch gegriffen. Da diesem Beispiel der 90sten Perzentile auch die anderen Kriterien untergeordnet sind, sind die damit festgelegten Grenzwerte als sehr frei anzusehen. Schlumbohm machte einen anderen Versuch der Definition und setzte die Grenze bei der 75sten Perzentile der Werte (Schlumbohm et al. 2008). Die weiteren Grenzwerte, die im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom für Callithrix-jacchus-Weibchen in dieser Untersuchung von Tardif gesetzt wurden, sind folgende: HDL kleiner 42 mg/dl, Nüchternglukose > 219 mg/dl bzw. HbA1c > 5,5% und Nüchtern-Triglyzeride > 400 mg/dl (Tardif et al. 2009).

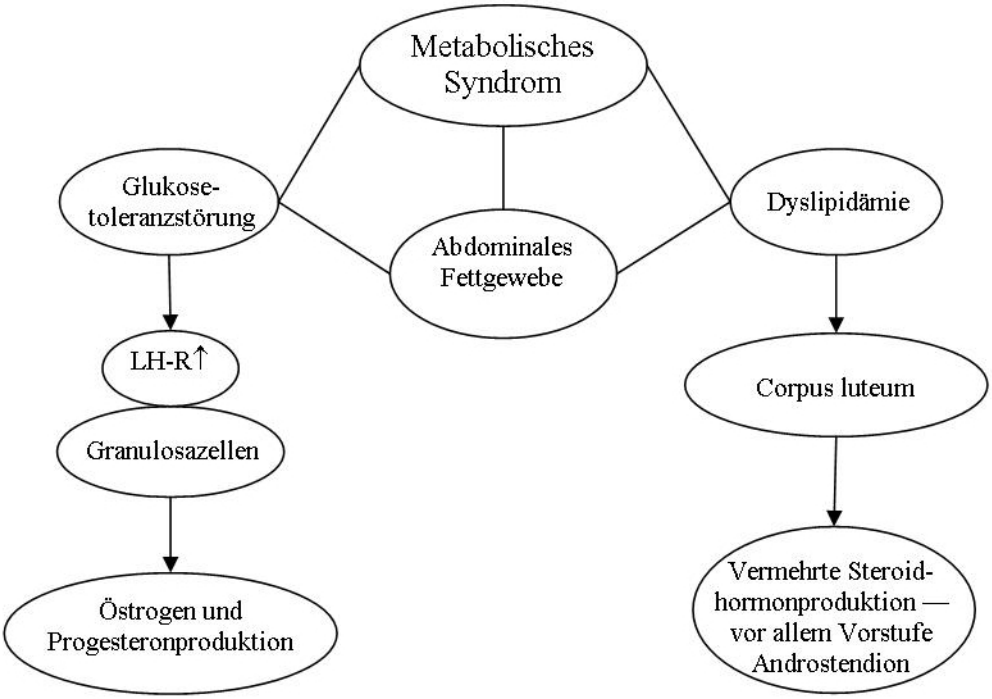
Wir konnten nicht alle Punkte beleuchten und es müssen weitere Untersuchungen folgen, um unsere These zu untermauern, jedoch konnten wir zeigen, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Glukosetoleranzstörung und dem Gewicht der Tiere, sowie zwischen den Triglyzeriden und dem Gewicht der Tiere bestand. Selbst wenn wir für das Gewicht und die Triglyzeride die vorgeschlagenen Grenzen heranziehen, fallen nur Tiere aus G1 (großzelliges Lutealgewebe) in den Bereich des von Tardif definierten Metabolischen Syndroms (Tardif et al. 2009). Jedoch relativ betrachtet, unabhängig von den vorgeschlagenen Grenzen, korreliert die Verteilung der Tiere bezogen auf Gewicht, sowie Taillenumfang und Triglyzeride, streng mit der Gruppeneinteilung, welche unabhängig dieser Faktoren getroffen wurde. Zusätzlich wurde festgestellt, dass, sobald die Triglyzeride bei Callithrix-jacchus-Weibchen erhöht sind, auch immer ein anderer Faktor des Metabolischen Syndroms erhöht ist (Tardif et al. 2009). Eine weitere positive Korrelation, die auffällig war, zeigte eine enge Verbindung zwischen Triglyzeriden und der Menge an CL-Gewebe, so dass auch hier eine Verbindung zwischen Gewicht, Triglyzeriden und der Anwesenheit von CL-Gewebe besteht.

Eine mögliche These, warum CL-Gewebe bei erhöhten Triglyzeriden länger persistiert, ist die Nutzung durch das CL-Gewebe von Steroiden zur Bildung von sämtlichen Steroidhormonprodukten - vermehrt aber von Androstendion. Da für die Steroidproduktion zunächst einmal Fette in Form von Cholesterin und LDL herangezogen werden und diese bei Tieren mit erhöhten Triglyzeriden vermehrt gebildet werden können, liegt somit auch eine höhere Quelle für die Steroidproduktion vor. Da sich das CL-Gewebe durch eine vermehrte

Androgenproduktion und zeitgleich dem Vorhandensein von Androgenrezeptoren damit selbst am Leben erhält, könnte die Dyslipidämie ein weiterer Baustein der CL-Persistenz sein.

5.8 Wirkung von Hyperinsulinämie bzw. Insulinresistenz auf das Ovar

Ein zentraler Gesichtspunkt des Metabolischen Syndroms ist die Insulinresistenz. Bei Tieren der gleichen Kolonie konnte in vorangegangen Untersuchungen festgestellt werden, dass die Glukosetoleranz und auch der Langzeitglukosewert HbA1c in engem Zusammenhang mit dem Gewicht der Tiere stehen (del Rio do Valle 2008). Sobald eine Hyperinsulinämie als Folge der peripheren Insulinresistenz vorhanden ist, können die Wirkungen des Insulins, welche physiologischer Weise auf viele Organsysteme vorhanden sind, deutlich zunehmen. Insulin ist zum Beispiel bekannt dafür die basale Sekretion von Steroidhormonen sowie die Verstärkung der LH-stimulierten Östrogenproduktion und Progesteronakkumulation der Granulosazellen zu fördern (Greisen et al. 2001). Zusammen mit FSH erhöht es durch eine Erhöhung der Anzahl an LH-Rezeptoren auf Granulosazellen die Produktion von Östrogenen und Progesteron noch weiter (Adashi et al. 1991). Bei erhöhtem Insulin ist dieser Effekt, wie auch viele andere Effekte, deutlich verstärkt. Insulin zusammen mit dem im Ovar produzierten IGF induziert auch eine Überproliferation der Theka und des Stromas (Duleba et al. 1997), so dass nicht nur die produzierten Steroidhormone eine Änderung im Ovar bewirken.



Grafik 41: Wahrscheinlicher Zusammenhang zwischen den Komponenten des Metabolischen Syndroms und der hormonellen Dysbalance

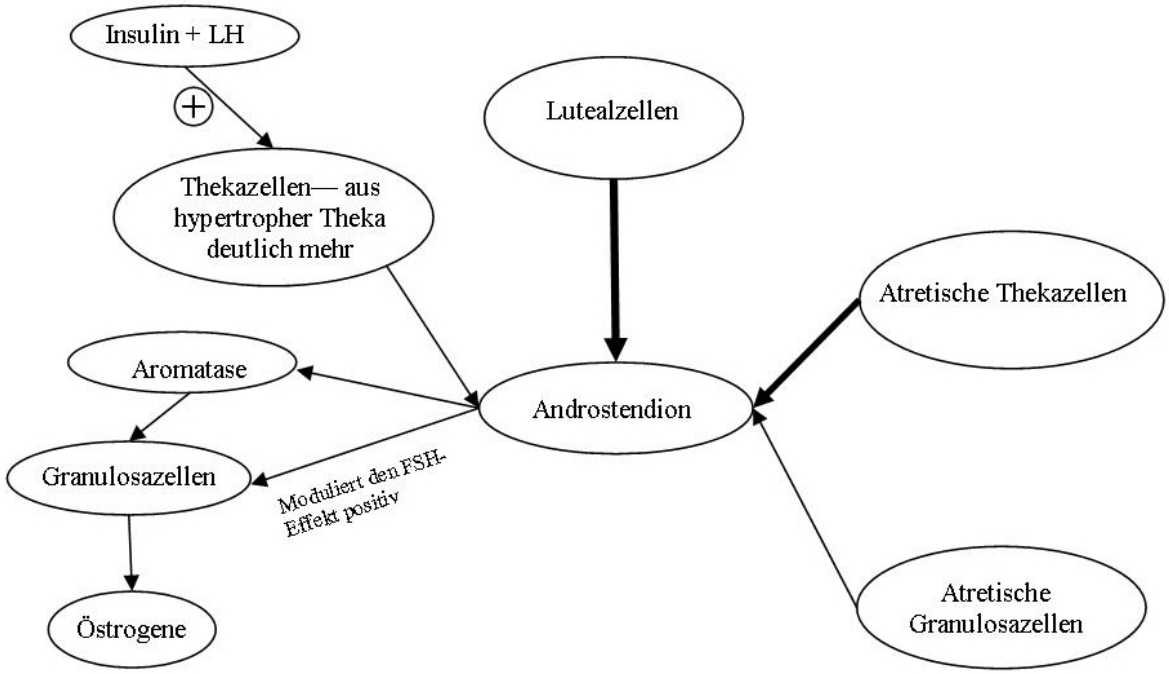
Die verschiedenen Wirkungen sowohl der Hormone als auch im Zusammenspiel mit erhöhtem Insulin auf das Ovar ist ein weiterer Punkt, welcher eine Erklärung für die ovariellen Veränderungen ermöglicht.

5.9 Rolle und Ursprung von Androstendion im Balanceverlust der Ovarien

Androstendion scheint das ausschlaggebende Hormon für den Balanceverlust der Ovarien zu sein. Gebildet wird es im Ovar sowohl von den Lutealzellen, als auch Thekazellen, sowie vermehrt auch von deren atretischer Form durch hohes LH (Greenwald und Roy 1994). Weitere Androstendionquellen sind atretische Granulosa (Maxson et al. 1985; McNatty et al. 1979), sowie in geringem Maße das Stroma, jedoch 500-fach weniger als die Theka (McNatty et al. 1979). Die andere signifikante Quelle des Androstendion sind die Nebennieren, jedoch kommt bei Hyperandrogenismus die vermehrte Androstendionproduktion aus dem Ovar (Magoffin 2004). Außerdem ist Androstendion beim Menschen das Hauptsteroidprodukt des Ovars der Menopause (Burger 2002), welches dann vorwiegend im Interstitium gebildet wird (Mayer et al. 2004). Da es für Callithrix-jacchus-Affen keine Referenzwerte für Androstendion gibt, können wir nicht von Hyperandrogenismus sprechen, jedoch von vermehrtem Vorliegen von Androstendion.

Androstendion wird in den Thekazellen als Vorstufe zur mittels Aromatase stattfindenden Umwandlung in Östrogene in den Granulosazellen (Hild-Petito et al. 1989) produziert - stimuliert durch LH und Insulin (Magoffin 2004). Androstendion moduliert zusätzlich auch den FSH-Einfluss auf die Östrogenproduktion der Granulosazellen. Somit steigert es zusammen mit FSH den Steroidweg der Granulosazellen, welche daraufhin vermehrt Cholesterin und LDL rekrutieren (Schreiber et al. 1984). Da aber in Folge der Atresie den Granulosazellen die Aromatase verloren geht, wird die negative Rückkopplung durch die damit deutlich weniger entstehenden Östrogene die Hemmung der Androstendionproduktion stark vermindert (Gore-Langton und Armstrong 1994).

Die Überproduktion des Androstendion stammt aus hypertropher Theka, welche in hyperandrogenen Frauen regelhaft vorliegt und ein Zeichen von wachsenden Follikeln in Ovarien mit CL-Gewebe sind, welche jeweils deutlich mehr Androstendion produzieren als normale Thekazellen (Magoffin 2004). Vor allem ist aber das CL maßgeblich für die Androstendionüberproduktion mit in Verbindung zu bringen.



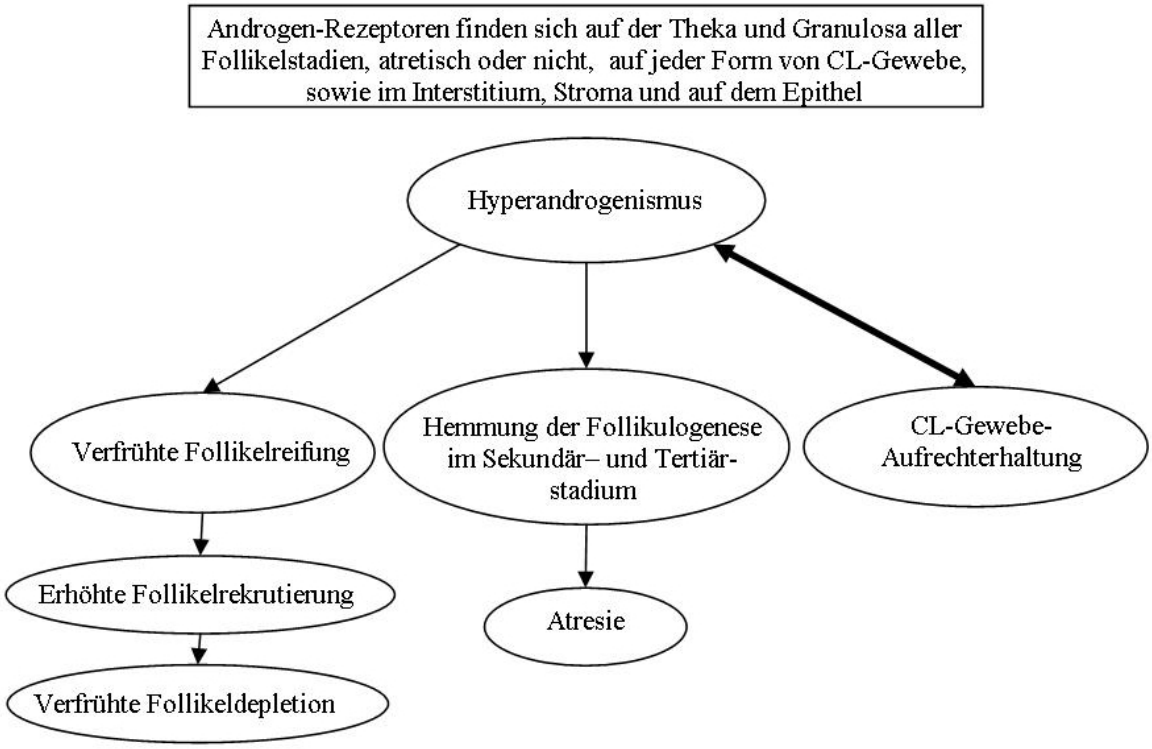
Grafik 42: Herkunft und Weiterprozessierung von Androstendion

Die Androstendionwerte unserer Messung entspringen einem anderen Verfahren als die Werte von 1979, ebenfalls bei Callithrix-jacchus-Affen in Gefangenschaft gemessen von Chambers und Hearn, jedoch kurz nach der Ausfuhr der Tiere aus Brasilien und somit vom Metabolismus aus gesehen nahe deren natürlicher Form. Diese lagen in der Schwangerschaft unter 15 ng/ml, zu Anfang der Schwangerschaft bei 5 ng/ml und am Ende 7 ng/ml (Chambers

und Hearn 1979). Die Werte unserer Tiere lagen in den Medianen zwischen 16,9 ng/ml bei Tieren ohne CL-Gewebe bis hin zu 21,1 ng/ml bei Tieren mit CL-Gewebe und somit insgesamt deutlich höher. Die Werte in LP waren erwartungsgemäß noch weitaus höher.

Der Einfluss von erhöhtem Androstendion ist multipel, da, wie in Rhesusaffen und Zynomolgusaffen festgestellt wurde, die Androgenrezeptoren sowohl im Stroma, als auch ubiquitär am Epithel, an der Granulosa, an der Theka, im Interstitium und sowohl an nicht-atretischen wie auch an atretischen Follikeln, entstehenden, reifen und regressiven CLs vorhanden sind (Hild-Petito et al. 1991). Zunächst einmal bewirkt Hyperandrogenismus eine verfrühte Follikelreifung bei längerfristiger Erhöhung (Greisen et al. 2001). Genau dies, eine längerfristige Androgenspiegelerhöhung, ist der Fall bei unseren Tieren. Anscheinend ist die Überproduktion der kuboiden Theka zusammen mit der Androgenproduktion der persistierenden CLs für die Hyperandrogenämie verantwortlich und damit auch für die vermehrte und verfrühte Follikelrekrutierung, resultierend aus der vermehrten Atresie, zumal die CL-Menge positiv mit dem Androgenspiegel korrelierte. Es reifen zeitgleich bei hyperandrogenen Tieren, welche gleichzeitig auch die vom Gewicht her schwereren sind, mehr Follikel heran, die aber auch vermehrt atretisch werden. Passend hierzu stellte Zelinski-Wooten fest, dass eine kontinuierliche Androstendionerhöhung die Follikulogenese im Sekundär- und Tertiärstadium hemmt - genau der Zeitpunkt, an dem die meiste Atresie stattfindet (Zelinski-Wooten et al. 1993). Generell scheinen viele Follikel durch hohe Androgenexposition atretisch zu werden, vor allem durch Granulosaatresie (Goyeneche et al. 2002; Zelinski-Wooten et al. 1993). So stellte auch Billig in *in-vitro*-Versuchen fest, dass unter Androgenbehandlung eine DNA-Fragmentierung, also Apoptose der Granulosazellen in Tertiär- und Graafschen Follikeln zu beobachten war (Billig et al. 1993). Und auch all diese atretischen Follikel produzieren in allen Stadien der Atresie weiterhin Androstendion (Greenwald und Roy 1994). Interessanter Weise wird die Androgenproduktion wiederum auch durch Insulin mit getriggert, so dass bei hyperinsulämen Zuständen die Theka interna in Kombination mit LH zu mehr Androstendionproduktion stimuliert wird. Die erwartungsgemäß deutlich höheren Androstendionwerte in der LP, gemessen allerdings nur bei wenigen Tieren, mit einer Verteilung ebenfalls in gleicher Form, konfiguriert über die Gruppen wie in FP, könnten dadurch ebenfalls gestützt werden, da LH kurz vor der LP und zu Beginn der LP deutlich erhöht ist. Aber auch atretische Theka spricht weiterhin auf diese LH-Stimulation an (Greenwald und Roy 1994; Maxson et al. 1985). Anscheinend geht an noch unbekanntem Punkt die Gegenregulation und damit Inhibierung der überschüssigen Androstendionproduktion verloren.

5.10 Die Rolle von Androgenen bei der Aufrechterhaltung der CL-Funktion



Grafik 43: Einflüsse des Hyperandrogenismus

Ein weiterer Punkt ist, dass Androgene im Zusammenspiel mit LH die CL-Funktion aufrechterhalten (Gore-Langton und Armstrong 1994; Goyeneche et al. 2002). Ist damit die Persistenz der CL ebenfalls auf das erhöhte Androstendion zurückzuführen, welches aber auch ebenfalls von CLs gebildet wird? Oder ist das LH-Level kontinuierlich leicht erhöht? Warum aber gibt es weiterhin einen Zyklus mit deutlich fallenden Progesteronspiegeln, obwohl erhöhtes Androstendion bei intaktem CL auch eine erhöhte Progesteronausschüttung zur Folge hat (Goyeneche et al. 2002)? Diese Fragen bleiben für weitere Studien zu erörtern.

5.11 Die Rolle des Metabolischen Syndroms und die Folgen der Hyperinsulinämie

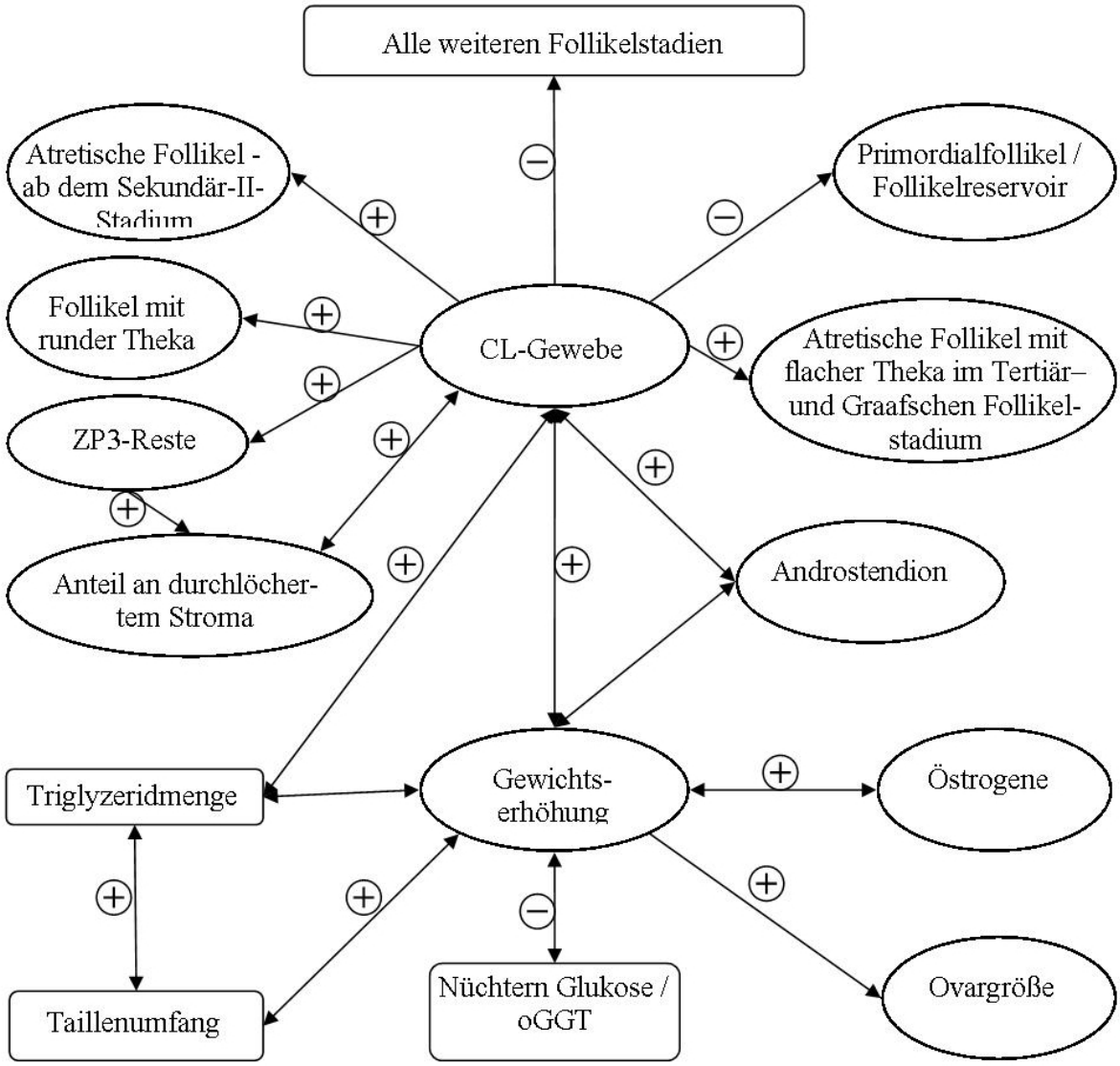
Die plausibelste Theorie, welche auch auf Grund unserer Ergebnisse naheliegend ist, beginnt mit dem durch Nahrung und Bewegungsarmut verursachten Übergewicht der Tiere. Durch das Übergewicht entsteht mit der Zeit sowohl eine periphere Insulinresistenz als auch eine

Dyslipidämie. Dies zusammengefasst ist bereits die Definition des Metabolischen Syndroms. Durch die Hyperinsulinämie, welche wir auf Grund der nicht vorhandenen Messmethoden für Insulin bei Callithrix-jacchus-Affen nur mittels Glukosetoleranzkurven messen konnten, die reflektorisch auf die periphere Insulinresistenz entsteht, beginnen die Einflüsse des Insulins auf das Ovar, das sonst durch die hypothalamische-hypophysäre-ovarielle Achse ausreichend gesteuerte Hormongleichgewicht aus der Balance zu bringen. Insulin bewirkt die zunächst vermehrte Produktion von Östrogenen im Zusammenspiel mit LH. Östrogene stimulieren das Follikelwachstum, inhibieren die Granulosazellapoptose und erhöhen das Ovargewicht, indem sie die Zellhypertrophie der CLs fördern (Goyeneche et al. 2002) und somit auch das CL am Leben erhalten. Sobald jedoch Östrogene im Übermaß produziert werden, können diese, so zeigten *in-vitro* Versuche, zu einem negativen Effekt auf die Oozytenqualität umschlagen (Tkachenko et al. 2010).

Zeitgleich bewirkt die Hyperinsulinämie die Hypertrophie der Theka, welche unter dem LH- und Insulineinfluss vermehrt Androstendion synthetisiert. Durch die erhöhte Androstendionsynthese und durch die Hyperinsulinämie inhibierte Synthese von Sexhormon bindendem Globulin (SHBG) in der Leber und damit erhöhtem Sexhormonlevel im Blut und erhöhter IGF-Aktivität im Ovar (Vignesh und Mohan 2007) schlägt der eigentlich positive Effekt des Insulins durch die Zusammenwirkung mit Androstendion auf die Granulosa der Follikel um, so dass die Granulosa atresiert. Im Atresiezustand produziert die Granulosa ebenfalls nur noch Androstendion durch den Aromataseverlust, so dass bereits zwei Androstendionquellen vorhanden sind. Durch das nach dem Eisprung sich bildende CL wird die Androstendionsynthese weiter vorangetrieben. Die anderen CLs, entstehend aus atretischen Follikeln der späten Entwicklungsphase, tragen ebenfalls dazu bei. Auch zu dem Zeitpunkt, wenn die LH-Stimulation zum Erliegen kommt, scheint das noch vorhandene Androstendion auszureichen das CL am Leben zu erhalten, wobei auch im CL die Aromatase zu Grunde zu gehen scheint und die Östrogenproduktion dadurch reduziert wird und die Fähigkeit Progesteron zu produzieren dem CL verloren geht. Damit wird anscheinend der natürliche Kreislauf unterbrochen. Es beginnt eine Art circulus vitiosus, welcher bei vielen der Tiere dazu führt, dass sie zu einem Zeitpunkt, zu welchem sie noch voll reproduktionsfähig sein sollten, zunächst unter massivem Follikelreserveverlust leiden und infolgedessen viel zu jung in die Anovulation und damit in die Menopause gelangen. Die scheinbar letzten Anstrengungen des Ovars, noch Follikel zur Sprungreife zu bekommen, endet zum Einen, wenn man die Geburtenprotokolle betrachtet, in Mehrlingsgeburten mit bis zu fünf Jungen, als auch zum Zweiten dann in der verfrühten Menopause. Diese These wird

gestützt durch eine zusätzliche, strenge, positive Korrelation zwischen Ovulationsanzahlen und dem Gewicht der Tiere, sowie der Wurfgröße und dem Gewicht der Tiere (Wedi 2010). Die Tiere in Gefangenschaft werden jedoch, sobald sie bei ihren Würfen eine Totgeburt haben, aus dem Zuchtprogramm genommen, so dass der letztliche Eintritt in die Menopause nur mittels Hormonlevelbestimmung nachvollzogen werden könnte. Dies ist jedoch bislang nicht erfolgt.

Der Übergang zwischen reinem Übergewicht und zusätzlich einer Dyslipidämie und Insulinresistenz scheint fließend zu sein. Tiere mit gemischtem Lutealgewebe konnten schwerer sein als Tiere mit rein kleinzelligem Lutealgewebe und trotzdem verhältnismäßig wenige Triglyzeride im Blut haben. Aber genau diese Tiere hatten auch noch keine persistierenden CLs mit großen Lutealzellen, so dass die Hyperandrogenämie wie erwartet nicht so stark ausgeprägt, sowie die Ovarveränderungen noch nicht so weit fortgeschritten waren.



Grafik 44: Zusammenhänge im Überblick

Würde wohl darauf geachtet, dass die Tiere nicht über ihre Verhältnisse hinaus hyperkalorische Nahrung zu sich nehmen und ihnen ein ausreichender Bewegungsraum zur Verfügung stände, so könnte vielleicht bei einigen Tieren das Metabolische Syndrom verhindert und damit auch die Fertilität bis ins hohe Alter aufrechterhalten werden. Überträgt man diesen Gedankengang auf die Menschen, so ist das immer häufiger werdende Metabolische Syndrom eine Gefahr für die Reproduktionsfähigkeit der übergewichtigen Frauen. Obwohl es bislang so scheint, als gäbe es beim Menschen im Gegensatz zum Callithrix-jacchus-Weibchen keine erhöhte Ovulationsrate.

Diese These weiter zu beleuchten und weiter zu fundieren bleibt Aufgabe weiterer Investigationen.

6 Zusammenfassung

Die Ovarien des Callithrix jacchus, in der fertilsten Phase seines Lebens entnommen, wurden von uns histologisch untersucht. Sobald in der FP CL-Gewebe vorliegt, welches zusätzlich unterteilt war in reines Lutealgewebe, gemischtes Lutealgewebe mit ebenso kleinen Lutealzellen, sowie ausschließlich kleinen Lutealzellen, sowie in eine Gruppe ohne dessen Vorkommen, hat einige weitreichende Effekte auf die Ovarfunktion, sowie die reproduktive Lebensdauer der Tiere.

Das CL-Gewebe kam nur in strenger Abhängigkeit zum Gewicht der Tiere vor, so dass die Aussage naheliegt, dass das Gewicht der Tiere einen entsprechenden Einfluss auf das Ovar hat. Callithrix jacchus, in der Wissenschaft schon als Modell für das Metabolische Syndrom etabliert, ist damit nicht nur ein Modell für das Metabolische Syndrom, sondern auch für die damit verbundene verfrühte ovarielle Alterung.

Bei Vorliegen von CL-Gewebe in seiner aktivsten Form war die follikuläre Reserve der Ovarien schon deutlich reduziert im Vergleich zu Ovarien ohne CL-Gewebe. Des Weiteren konnte eine Abstufung der CL-Gewebetypen und der Primordialfollikelreserve gesehen werden. Die Follikelprozessierung ist ebenfalls durch das CL-Gewebe beeinflusst. Durch die verminderte Atresie im Übergang zum Sekundärstadium und die vermehrten Atresie erst im späteren Stadium bei Ovarien mit CL-Gewebe, bei Ovarien mit großzelligem CL-Gewebe wiederum am deutlichsten zu sehen, müssen mehr Follikel rekrutiert und weitergeführt werden, um die gleiche Anzahl an Follikeln zur Sprungreife gelangen zu lassen. Durch diese vermehrte Atresie entstehen auf der einen Seite vermutlich mehr luteinisierte Strukturen, da die Atresie der späteren Follikelstadien über die Luteinisierung der Theka und Granulosa verläuft. Vor allem aber entstehen multiple Oozytenhüllenreste (ZP3), welche eine Zerstörung des Stromas mit sich bringen, was zu einer bindegewebigen Transformation des Stromas und der Medulla führt.

Verantwortlich für die Persistenz der CL-Gewebe sind sowohl die Begebenheiten des Metabolischen Syndroms wie einer Dyslipidämie und einer Hyperinsulinämie durch die Glukosetoleranzstörung, sowie das durch die CLs und die atretischen Theka- und Granulosazellen produzierte Androstendion.

Das CL-Gewebe, sowie die Theka und Granulosa brauchen als Ausgangsstoff für die Bildung von Androstendion, sowie zur Bildung der weiteren Steroidhormone wie Östrogene und Progesteron Lipoproteine, sowie Cholesterin (Schreiber et al. 1984). Diese können deutlich

mehr rekrutiert und gebildet werden bei Dyslipidämie und erhöhten Triglyzeriden - Symptome des Metabolischen Syndroms. Des Weiteren wirkt die Hyperinsulinämie im Zusammenspiel mit LH ebenfalls produktionsfördernd auf die Thekazellen - vor allem auf die luteinisierten Thekazellen. In luteinisierter Form liegen Thekazellen bei atretischen Follikeln vor.

Das vermehrt gebildete Androstendion hat zur Folge, dass das CL-Gewebe sich damit selbst am Leben erhält, vor allem das großzellige CL-Gewebe, dessen Lutealzellen deutlich mehr Androstendion produzieren als die kleinen Lutealzellen (Hild-Petito et al. 1989). Damit scheinen Ovarien mit CL-Gewebe, vor allem diese mit großzelligem Lutealgewebe, in hormoneller Sicht aus der Balance zu geraten und in einer Art *circulus vitiosus* zu enden. Androstendion hat durch seine im Ovar an allen Follikeln vorkommenden Rezeptoren, die wiederum auch auf allen Stadien der CL-Gewebe, sowie im Stroma der Ovarien vorliegen, multiple Einflussmöglichkeiten und bei chronischer Erhöhung einige negative Effekte. So wurde schon durch Greisen beschrieben, dass Androstendion eine verfrühte Follikelreifung bewirkt (Greisen et al. 2001). Da aber Androstendion auch eine vermehrte Atresie fördert durch die Förderung der Apoptose der Granulosazellen (Goyeneche et al. 2002), gleichzeitig aber auch die ständige Androstendionerhöhung in der Follikulogenese den Übergang von Sekundär-I-Follikel zum Tertiärfollikel hemmt (Zelinski-Wooten et al. 1993) und damit auch die Granulosa länger dem Androstendionmilieu ausgesetzt ist, müssen mehr Follikel rekrutiert werden, um die gleiche Anzahl an sprungreifen Follikeln zu produzieren. Diese Verteilung der Follikelstadien, inklusive der Atresie in späteren Stadien der Follikelentwicklung, konnte von uns beobachtet und nachgewiesen werden.

Somit ist das Metabolische Syndrom mit seinen Komponenten zweifelsohne gekoppelt an die verfrühte ovarielle Alterung und hat, zumindest beim Callithrix jacchus, den Effekt, dass dies scheinbar auf Grund der schneller sich neigenden Follikelreserve oder der vermehrten Atresie mit dem entsprechenden androstendionreichen Milieu zu einer Phase der multiplen Ovulationen führt, wodurch Mehrlingsschwangerschaften jenseits der üblichen Zwillinge entstehen.

7 Literatur

Adashi E., Resnick C., Hurwitz A., Ricciarelli E., Hernandez E., Roberts C., Leroith D., Rosenfeld R. (1991): Insulin-like growth factors: the ovarian connection. *Hum Reprod* 6, 1213-1219

Adhikari D., Liu K. (2009): Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 30, 438-464

Bannister L., Dyson M.: Reproductive system; in: Gray's Anatomy; Band 38; hrsg. v. Williams P, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, Ferguson M; Churchill Livingstone, New York 1995, 1864 Fig.: 14.16b

Billig H., Furuta I., Hsueh A. J. (1993): Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133, 2204-2212

Burger H. (2002): Androgen production in women. *Fertil Steril* 77 Suppl 4, S3-5

Chambers P., Hearn J. (1979): Peripheral plasma levels of progesterone, oestradiol-17 beta, oestrone, testosterone, androstenedione and chorionic gonadotrophin during pregnancy in the marmoset monkey, Callithrix jacchus. *J Reprod Fertil* 56, 23-32

del Rio do Valle C. M.: Estudo morfofuncional de rins de primatatas Callithrix jacchus em cativeiro. PhD. Diss. University of Sao Paulo 2008

Duleba A., Spaczynski R., Olive D., Behrman H. (1997): Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 56, 891-897

Flaws J. A., Abbud R., Mann R. J., Nilson J. H., Hirshfield A. N. (1997): Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod* 57, 1233-1237

Gilchrist R., Pritchard L., Amato F., Ritter L., Armstrong D., Norman R. (2002): Characterisation of the Role of FSH in the Marmoset Monkey : Comparison of FSH Levels in Natural Cycles, Prostaglandin-F2α-Regulated Cycles and Socially Subordinate Animals. *Biol Reprod* 66, 449

Gogia A., Agarwal P. (2006): Metabolic syndrom. *Indian J Med Sci* 60, 72-81

Gore-Langton R., Armstrong D.: Follicular Stroidogenesis and Its Control; in: The Physiology of Reproduction; Band 2; hrsg. v. Knobil E, Neill JD; Raven Press, New York 1994, 572-628

Goyeneche A. A., Calvo V., Gibori G., Telleria C. M. (2002): Androstenedione interferes in luteal regression by inhibiting apoptosis and stimulating progesterone production. *Biol Reprod* 66, 1540-1547

Greenwald G., Roy S.: Follicular Selection and its Control; in: The Physiology of Reproduction; Band 2; hrsg. v. Knobil E, Neill J; Raven Press, New York 1994, 629-698

Greisen S., Ledet T., Ovesen P. (2001): Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Hum Reprod* 16, 2061-2065

Harlow C. R., Hearn J. P., Hodges J. K. (1984): Ovulation in the marmoset monkey: endocrinology, prediction and detection. *J Endocrinol* 103, 17-24

Hild-Petito S., Shiigi S., Stouffer R. (1989): Isolation and characterization of cell subpopulations from the monkey corpus luteum of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 40, 1075-1085

Hild-Petito S., West N. B., Brenner R. M., Stouffer R. L. (1991): Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 44, 561-568

Husen B., Adamski J., Bruns A., Deluca D., Fuhrmann K., Moller G., Schwabe I., Einspanier A. (2003): Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 in reproductive tissues of the marmoset monkey. *Biol Reprod* 68, 2092-2099

Kaspareit J., Friderichs-Gromoll S., Buse E., Habermann G. (2006): Background pathology of the common marmoset (Callithrix jacchus) in toxicological studies. *Exp Toxicol Pathol* 57, 405-410

Kerr L., Paterson M., Aitken R. (1998): Molecular basis of sperm-egg interaction and the prospects for immunocontraception. *J Reprod Immunol* 40, 103-118

Lang K.: Common Marmoset - Callithrix Jacchus, aus Primate Info Net - Factsheets, Library WPRC, http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/common_marmoset; Madison, U.S.A. 2005

Magoffin D.: The Role of the Ovary in the Genesis of Hyperandrogenism; in: The ovary; Band 1; hrsg. v. Leung P, Adashi E; Elsevier, Vancouver, Kanada 2004, 664, 1

Maxson W. S., Haney A. F., Schomberg D. W. (1985): Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol Reprod* 33, 495-501

Mayer L., Devine P., Dyer C., Hoyer P. (2004): The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biol Reprod* 71, 130-138

McNatty K. P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan K. J. (1979): The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 49, 687-699

Meyer H. H., Rohleder M., Streich W. J., Goltenboth R., Ochs A. (1997): Sex steroid profiles and ovarian activities of the female panda Yan Yan in the Berlin Zoo. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 110, 143-147

Müller T., Simoni M., Pekel E., Luetjens C., Chandolia R., Amato F., Norman R., Gromoll J. (2004): Chorionic gonadotrophin beta subunit mRNA but not luteinising hormone beta subunit mRNA is expressed in the pituitary of the common marmoset (Callithrix jacchus). *J Mol Endocrinol*, 115-128

Nayudu P. L., Ulloa-Aguirre A.,Göttingen: Follikelrekrutierung. bezugnehmend auf Telefongespräch vom 25.02.2010, persönliche Mitteilung

Nievergelt C., Pryce C. R. (1996): Monitoring and controlling reproduction in captive common marmosets on the basis of urinary oestrogen metabolites. *Lab Anim* 30, 162-170

Schlumbohm C.,Göttingen: metabolisches Syndrom. bezugnehmend auf persönliches Gespräch vom 20.03.2008, persönliche Mitteilung

Schlumbohm C., Armstrong V., Becker T., Nayudu P.: Weißbüschelaffen mit eingeschränkter Glucosetolleranz - ein neues Modell für den Typ II Diabetes des Menschen. zitiert nach Abstract Review in: 40. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Berlin, 4. - 7. Mai 2005, Abstract Review, o. Verl., o. O. 2005

Schlumbohm C., Bramlage C., Strutz F., Armstrong V., Oellrich M., Fuchs E.: Early life programming: Perinatal origins of adult hypertension and obesity - results from a marmoset monkey model. aus dem Conference book in: 18th European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals - Congress, Ghent, Belgium, September 2008, Early life programming: Perinatal origins of adult hypertension and

obesity - results from a marmoset monkey model.; hrsg. v. German A, Mandigers P, o. Verl., o. O. 2008, 113 - 115

Schreiber J., Nakamura K., Schmit V., Weinstein D. (1984): Androgen and FSH synergistically stimulate lipoprotein degradation and utilization by ovary granulosa cells. *Steroids* 43, 25-42

Tardif S., Ziegler T. (1992): Features of female reproductive senescence in tamarins (Saguinus spp.), a New World primate. *J Reprod Fertil* 94, 411-421

Tardif S., Jaquish C. (1997): Number of ovulations in the marmoset monkey (Callithrix jacchus): relation to body weight, age and repeatability. *Am J Primatol* 42, 323-329

Tardif S., Araujo A., Arruda M., French J., Sousa M., Yamamoto M. (2008): Reproduction and aging in marmosets and tamarins. *Interdiscip Top Gerontol* 36, 29-48

Tardif S. D., Power M. L., Ross C. N., Rutherford J. N., Layne-Colon D. G., Paulik M. A. (2009): Characterization of obese phenotypes in a small nonhuman primate, the common marmoset (Callithrix jacchus). *Obesity (Silver Spring)* 17, 1499-1505

Tkachenko O. Y.,Göttingen: ovarielles Stroma. bezugnehmend auf Telefongespräch vom 28.11.2009, persönliche Mitteilung

Tkachenko O. Y., Delimitreva S., Nayudu P. L. (2010): Effect of estradiol dose on marmoset monkey oocyte IVM, IVF and embryo development. In preparation. *Hum Reprod, (eingereicht)*

Torii R., Abbott D., Nigi H. (1996): Morphological Changes of the Ovary and Hormonal Changes Through the Ovarian Cycle of the Common Marmoset (Callithrix jacchus). *Primates* 37, 49-56

Usadi R., Fritz M.: Luteal Dysfunction; in: The ovary; Band 1; hrsg. v. Leung P, Adashi E; Elsevier, Vancouver, Kanada 2003, 664

Vignesh J., Mohan V. (2007): Polycystic ovary syndrome: a component of metabolic syndrome? *J Postgrad Med* 53, 128-134

Wedi E.: Untersuchungen des CFL-Phänotyps ("congenital fused labia") in dem Neuweltaffen Common Marmoset (Callithrix jacchus) unter demographischen, physiologischen und zytogenetischen Gesichtspunkten. Med. Diss., Göttingen 2010

Young F., Illingworth P., Lunn S., Harrison D., Fraser H. (1997): Cell death during luteal regression in the marmoset monkey (Callithrix jacchus). *J Reprod Fertil* 111, 109-119

Zelinski-Wooten M., Hess D., Baughman W., Molskness T., Wolf D., Stouffer R. (1993): Administration of an aromatase inhibitor during the late follicular phase of gonadotropin-treated cycles in rhesus monkeys: effects on follicle development, oocyte maturation, and subsequent luteal function. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 988-995

Abkürzungsverzeichnis

ACE	3-Amino-9-EthylCarbazol
BSA	Bovines Serumalbumin
CL(s)	Corpus luteum (Plural)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
FP	Follikelphase
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGF	Insulin-like Growth-Factor
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LP	Lutealphase
oGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Q1	Unteres Quartil
Q2	Oberes Quartil
RT	Raumtemperatur
SHBG	Sexhormon bindendes Globulin
ZP3	Zona pellucida 3

Danksagungen:

Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker, meinem Doktorvater, danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, sowie die gute Betreuung und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in Kooperation mit dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. P. Nayudu, PhD, für ihre engagierte und lehrreiche Betreuung, die oftmals über den Inhalt der Arbeit hinausging. Ich danke ihr für die Stellung des interessanten und herausfordernden Themas. Sie trug entscheidend dazu bei, Motivation und Spaß bis zur Fertigstellung dieser Arbeit zu erhalten, sowie sie zügig zu einem guten Ende zu bringen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. M. Heistermann, der mir bei der Beleuchtung der endokrinologischen Aspekte eine große Hilfe war.

Ein herzliches Dankeschön für die freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung gilt all meinen Kollegen im Labor für Molekulare Gynäkologie an der Universitätsklinik Göttingen, insbesondere Renate Ditsche für ihre große Hilfe beim Anfertigen der Färbungen, sowie meinen Kollegen im Labor für Reproduktionsbiologie am Deutschen Primatenzentrum Göttingen, insbesondere Kerstin Fuhrmann, Nicole Umland und Angelina Berenson, die mir durch die Arbeit mit den Tieren und ihren Ovarien und Blutproben die Probenzusammenstellung erst ermöglichten, sowie Andrea Heistermann, die mir den ELISA-Test nähergebracht hat. Vielen Dank auch Ellen Wiese, die gute Seele in der Reproduktionsbiologie. Ich danke ihnen allen für ihr stetiges Beistehen und die vielen netten Stunden im Labor und in der Abteilung.

Ein besonders großer Dank gilt dabei Olena Tkachenko und Edris Wedi, mit denen ich nicht nur lange Arbeitstage verbracht habe, sondern auch viele wichtige Fragen des Lebens diskutieren konnte.

Danken möchte ich auch Dr. med. Ivo Chao, der mir immer wieder mit Rat und Tat in technischen, sowie Computerdingen zur Seite stand, sowie auch Dr. K. Jung, der mir bei der Interpretation die Sicherheit der statistischen Richtigkeit gab.