

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob drei verschiedene Nachweismethoden für Östrogenrezeptoren - Radioligandenbindungsassay, Enzymimmunoassay und immunhistochemischer Assay - zu vergleichbaren Ergebnissen im Verlauf des Zyklus der Stute führen und ob Veränderungen an den Rezeptoren erfolgen, welche die Aussagen dieser Methoden beeinflussen können. Außerdem sollte geprüft werden, ob unterschiedliche Funktionsstadien der Rezeptoren zu unterschiedlicher Nachweisbarkeit führen.

Zu diesem Zweck wurden 19 Stuten jeweils zu zwei Zeitpunkten im Zyklusverlauf in die Untersuchung einbezogen. Zu jedem Zeitpunkt wurden eine klinische und ultrasonographische Untersuchung durchgeführt, sowie eine Blutprobe für die Analyse der Hormone 17β -Östradiol und Progesteron und zwei Uterusbiopsien entnommen. Die Uterusbiopsien wurden für eine histopathologische Untersuchung und die Untersuchung auf Östrogenrezeptoren verwendet. In jeder Gewebeprobe wurden die Östrogenrezeptoren mit drei verschiedenen Nachweismethoden bestimmt: semiquantitativ mittels eines immunhistochemischen Tests (Abbott ER-ICA Monoklonal) und quantitativ im Gewebehomogenat mittels eines Radioligandenbindungsassays und eines Enzymimmunoassays (Abbott ER-EIA Monoklonal). Es erfolgte jeweils die Rezeptorbestimmung in der Zytosolfraktion mit Bezug auf die Protein- und DNA-Konzentration sowie in der Kernfraktion mit Bezug auf die DNA-Konzentration. Die Rezeptorkonzentration wurde einerseits im Verlauf der Zyklusphasen und andererseits in Abhängigkeit von dem Östrogenspiegel betrachtet.

Bei der Rezeptorbestimmung mittels immunohistochemischen Assays konnte im Drüsenepithel der Zyklusverlauf des Prozentsatzes positiver Zellen und im Stroma der der Färbeintensität, des Prozentsatzes positiver Zellen und des immunreaktiven Scores mit Maxima im Östrus und Minima im Interöstrus statistisch abgesichert werden. Bei Bezug auf die Östrogenkonzentration konnte keine statistisch absicherbare Beziehung zwischen Östrogen- und Rezeptorkonzentration festgestellt werden. Allerdings wurde eine statistisch signifikante Differenz zwischen Proben mit einer Progesteronkonzentration größer und kleiner 1 ng/ml gefunden.

Die Bestimmung mittels Radioligandenbindungsassay und Enzymimmunoassay ergab in der Zytosol- und Kernfraktion vergleichbare Rezeptorkonzentrationen im Verlauf des Zyklus, wobei diese im Falle des Radioligandenbindungsassays keine statistisch abzusichernden Schwankungen aufwiesen. Bei Bezug auf die DNA-Konzentration im Zytosol konnte mittels Enzymimmunoassay eine statistisch signifikante Differenz zwischen dem

Rezeptormaximum im frühen Interöstrus und dem Minimum im späten Interöstrus nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Rezeptorkonzentration in Abhängigkeit von dem Östrogenspiegel ergab sich mittels Enzymimmunoassay (bei Bezug auf die Eiweißkonzentration) ein statistisch signifikantes Absinken der Rezeptorkonzentration mit steigenden Östrogenwerten. Dieses dürfte durch den mit steigender Östrogenwerten signifikant steigenden Eiweißgehalt bedingt sein. Die restlichen Rezeptorbestimmungen zeigten keine signifikanten Abhängigkeiten von den Östrogenwerten.

Bei Prüfung auf Abhängigkeit zwischen den Ergebnissen des immunhistochemischen Assays und denen des Enzymimmunoassays korrelierte der Prozentsatz positiver Zellen im Drüsenepithel mit der Rezeptorkonzentration im Zytosol und der Summe der Rezeptoren signifikant positiv, wie auch der immunreaktive Score des Stromas mit der Summe der Rezeptoren signifikant korrelierte. Im Gegensatz dazu war keine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen des immunhistochemischen Assays und denen des Radioligandenbindungsassays festzustellen. Die Rezeptorkonzentration im Zytosol (bei Bezug auf die DNA-Konzentration) und die Summe der Rezeptoren wiesen bei Bestimmung durch den Enzymimmuno- und Radioligandenbindungsassay eine signifikant beziehungsweise stark signifikant positive Korrelation auf.

Die höchste Dissoziationskonstante K_D (= niedrigste Affinität) war statistisch absicherbar zum Zeitpunkt maximaler Rezeptorkonzentrationen im frühen Interöstrus nachweisbar.

In Bezug auf den Zyklus führen alle drei Nachweismethoden zu vergleichbarem Verlauf der Maxima und Minima der Rezeptorkonzentrationen, die allerdings nicht in allen Fällen statistisch absicherbar waren. Die Östrogenrezeptorbestimmung ist für die klinische Diagnostik hormoneller Dysregulationen beim Pferd nur bei sehr deutlichen Rezeptorkonzentrationsunterschieden und nur im Kontext histologischer Parameter aussagefähig. Ihre Anwendung in der Routinediagnostik ist außerdem durch die aufwendige und teure Bestimmung bisher nicht praktikabel.

Trotz der in dieser Arbeit zwischen Enzymimmunoassay und Radioligandenbindungsassay festgestellten quantitativen Unterschiede der Rezeptorkonzentrationen ist keine statistisch abzusichernde Aussage bezüglich Rezeptorformen, die zu unterschiedlicher Nachweisbarkeit durch die beiden Nachweismethoden führen könnten, möglich. Allerdings kann vermutet werden, daß mit dem Enzymimmunoassay alle Rezeptorformen erfaßt werden. Die Bestimmung der Rezeptoren in der Kernfraktion führte zu keiner Verbesserung der Aussage.

6 Summary

Eva Maria Krüdwagen:

Studies on oestrogen receptor detection in the mare endometrium - comparison of various methods -

This thesis aims at finding out whether three different methods (radioligand binding assay, enzyme immunoassay and immunohistochemical assay) of detecting oestrogen receptors in the course of the mare's cycle lead to comparable results. Apart from that, it is tried to detect whether structural changes on the receptors take place which could influence the results of the methods named above. Furthermore, it was tested if different stages of the receptors' function influenced their detectability.

For this purpose, 19 mares were tested at two points of time during their cycle. At each point of time, a clinical examination including an ultrasonography was carried out, blood samples for a following oestrogen and progesterone analysis were taken as well as two uterus biopsies. The uterus biopsies underwent a histopathological examination and a detection of oestrogen receptors. In each biopsy oestrogen receptors were detected by three different methods: semiquantitative by using an immunohistochemical test (Abbott ER-ICA monoclonal) and quantitative by using a radioligand binding assay and an enzyme immunoassay (Abbott ER-EIA monoclonal) on homogenised tissue. In the following, a receptor detection in the cytosolic fraction (with reference to the protein and DNA content) and in the nuclear fraction (with reference to the DNA content) were carried out. The entire receptor content was on the one hand measured during the course of the different cycle stages and on the other hand evaluated in subordination to the oestrogen level.

The receptor detection by an immunohistochemical assay showed the following results. During the cycle the percentage of cells showing positive staining in the glandular epithelium showed maxima in the oestrus and minima in the interoestrus. In the stroma the percentage of cells showing positive staining, the staining intensity and the immunoreactive score also showed maxima in the oestrus and minima in the interoestrus, so that both proved to be highly significant. With reference to the oestrogen content there was no definite statistical correlation between the oestrogen and the receptor content. There was only a significant difference between samples of a progesterone content $>$ and $<$ 1 ng/ml.

A detection by the means of radioligand binding assay and enzyme immunoassay revealed an comparable receptor content during the cycle in the

cytosolic and the nuclear fraction which in the case of the radioligand binding assay could statistically not be proved. With reference to the DNA content in the cytosol, a significant difference between the receptor maximum in the early oestrous and the maximum in the late oestrous could be stated. Evaluating the receptor content with regard to the oestrogen content in the enzyme immunoassay (in subordination to the protein content) it showed a significant decrease that was evidently correlated to an increasing oestrogen content. This was most probably due to the significantly increasing protein content, which was evoked by the increase of oestrogen. The remaining methods of receptor detection showed no significant correlation to the oestrogen content.

Testing the correlation between the results of the immunohistochemical assay and the enzyme immunoassay it became obvious that there was a significant positive correlation between the percentage of cells showing positive staining in the glandular epithelium and the receptor content in the cytosolic fraction and the sum of receptors. The same significant correlation could be found between the immunoreactive score in the stroma and the sum of receptors. In the contrary there was no significant correlation between the results of the immunohistochemical assay and the radioligand binding assay. Comparing the results of the enzyme immunoassay and the radioligand binding assay, the receptor content in the cytosolic fraction (with reference to DNA content) and the sum of receptors indicated a significant resp. highly significant positive correlation.

The largest equilibrium dissociation constant K_D (= lowest affinity) could be statistically proved at the time of maximal receptor concentration in the early oestrous.

With reference to the cycle all three methods of detection lead to comparable courses of receptor concentrations, although not all of them could be statistically proved. For the clinical diagnosis of hormonal disorder of the reproductive cycle in the mare the detection of oestrogen receptors can only be of significant expressiveness in the case of very distinct differences in the receptor concentration and only in context with a supplementary histological examination. The detection is not yet practised in routine diagnosis due to its time taking and expensive methods.

Despite the quantitative differences in the receptor concentration, that have been detected in this thesis between enzyme immunoassay and radioligand binding assay, it is not possible to definitively state that differences in the receptor structure lead to a varying detectability concerning both methods of detection. Nevertheless it can be assumed that the enzyme immunoassay detects any form of receptors. Detecting the receptors in the nuclear fraction did not lead to an improved expressiveness.