

Aus dem Institut für Tierschutz und Verhalten  
und  
dem Institut für Tierökologie und Zellbiologie  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Charakterisierung und Optimierung eines Tiermodells der Endometriose in Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin  
der Veterinärmedizin  
(Dr. med. vet.)  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Szilvia Eiterer

aus Budapest

Hannover 2007

Wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. Bettina Husen

1. Gutachter: Prof. Dr. Hansjoachim Hackbarth

2. Gutachterin: Anne-Rose Günzel-Apel

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2007

Achte gut auf diesen Tag,  
Denn er ist das Leben-  
Das Leben allen Lebens.  
In seinem kurzen Ablauf  
Liegt alle Wirklichkeit und Wahrheit des Daseins,  
Die Wonne des Wachens,  
Die Größe der Tat, die Herrlichkeit der Kraft-  
aus dem Sanskrit

meiner Großmutter



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>13</b>
2.1	Definition und Symptome der Endometriose.....	13
2.2	Pathogenese.....	14
2.3	Behandlung der Endometriose .....	16
2.3.1	Standardtherapien.....	16
2.3.1.1	Hormontherapie.....	16
2.3.1.2	Schmerztherapie .....	18
2.3.2	Zukünftige Therapieansätze .....	18
2.3.2.1	Hormontherapie.....	18
2.3.2.2	Nicht hormonale Therapien.....	21
2.4	Tiermodelle für Endometriose .....	24
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
3.1	Versuchstiere.....	30
3.2	Haltung der Versuchstiere.....	31
3.3	Tierexperimentelle Methoden .....	32
3.3.1	Autotransplantation .....	33
3.3.2	Substanzapplikation .....	33
3.3.3	Vaginalzytologie .....	33
3.3.4	Zyklussynchronisation .....	34
3.3.5	Blutentnahme .....	34
3.4	Analytische Methoden.....	35
3.4.1	Progesteron-Enzymimmunoassay .....	35
3.4.2	Estradiol-Enzymimmunoassay.....	35
3.4.3	Immunhistochemie .....	36
3.4.3.1	Proliferationsantigen Ki67 .....	36
3.4.3.2	Estrogen- und Progesteronrezeptor .....	37
3.4.4	Genexpressionsanalyse.....	38
3.4.5	Datenanalyse .....	40
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
4.1	Studie 1A + 1B: Endometriale Autotransplantation in 5 verschiedenen Ratteninzuchtstämmen und Wirkung der chronisch hohen Dosierung von Cetorelixacetat .....	41
4.1.1	Transplantatgrößen und Transplantatgewichte, Wiederfindungsrate der Transplantate .....	43
4.1.2	Organgewichte .....	45
4.1.3	Körpergewicht.....	46
4.1.4	Histologie .....	47
4.1.4.1	Morphologie .....	47
4.1.4.2	Proliferationsrate (Ki67) .....	48
4.1.4.3	Estrogenrezeptor und Progesteronrezeptor .....	50

4.1.5	Vaginalzytologie .....	51
4.1.6	Hormonspiegel .....	52
4.1.6.1	Estradiol .....	52
4.1.6.2	Progesteron.....	52
4.2	Studie 2: Endometriale Autotransplantation in 2 Inzucht- und einem Auszuchtstamm und Wirkung von chronisch niedrig dosiertem Cetrorelixpamoat.....	53
4.2.1	Transplantatgrößen und Transplantatgewichte, Wiederfindungsrate der Transplantate .....	54
4.2.2	Organgewichte .....	55
4.2.3	Körpergewicht.....	55
4.2.4	Vaginalzytologie .....	55
4.2.5	Hormonspiegel .....	56
4.2.5.1	Progesteron.....	56
4.3	Studie 3: Isogene Transplantation .....	57
4.3.1	Transplantatgrößen und Transplantatgewichte, Wiederfindungsrate der Transplantate .....	58
4.3.2	Organgewichte .....	58
4.3.3	Körpergewicht.....	58
4.3.4	mRNA-Expression .....	59
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
5.1	Empfindlichkeit für die Entwicklung von induzierter Endometriose .....	68
5.2	Induktion durch isogene Transplantation versus Autotransplantation.....	69
5.3	Effekte der Cetrorelix-Gabe auf den ovariellen Steroidhormonstoffwechsel.....	69
5.4	Effekte der Autotransplantation und der Cetrorelix-Behandlung an Transplantaten und Zielorganen.....	70
5.5	Effekte der Autotransplantation und der Cetrorelix-Behandlung auf die Expression von potentiellen Markergenen.....	72
5.6	Schlussbetrachtung.....	72
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG: ROHDATEN.....</b>	<b>94</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Stammbaum der als Labortiere eingesetzten Ratteninzuchtstämme ..... 42

Abbildung 2: Transplantatgröße nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET)..... 43

Abbildung 3: Transplantatgewicht nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET)..... 44

Abbildung 4: Wiederfindungsrate nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET)..... 45

Abbildung 5: Relatives Uterusgewicht nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET) ..... 46

Abbildung 6: relative Körpergewichtsveränderung zwischen Beginn und Ende der Behandlung mit Cetrorelixacetat (CET) ..... 47

Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung von Ki67 (A, B), Estrogenrezeptoren (C, D) und Progesteronrezeptoren (E, F) ..... 49

Abbildung 8: individuelle und mittlere Proliferationsraten der endometrialen Drüsenzellen..... 50

Abbildung 9: Zyklusverlauf während der Behandlungsphase mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat; Studie 1A ..... 51

Abbildung 10: Individuelle und mittlere Estradiolkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere ..... 52

Abbildung 11: Individuelle und mittlere Progesteronkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere und der mit Cetroreloxacetat (CET) behandelten Tiere ..... 53

Abbildung 12: Individuelle und mittlere Transplantatgrößen der Kontrolltiere und der mit Cetrorelixpamoat behandelten Tiere..... 54

Abbildung 13: Relatives Ovargewicht nach der Behandlung mit Cetrorelixpamoat (CET) bei Ratten der Inzuchtstämme BN, F344 und SPRD ..... 55

Abbildung 14: Zyklusverlauf der Kontrolltiere und der mit Cetrorelixpamoat behandelten Tiere ..... 56

Abbildung 15: Progesteronkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere und der mit Cetrorelixpamoat behandelten Tiere ..... 57

Abbildung 16: Individuelle Werte der Transplantatgröße bei Ratten der Inzuchtstämme BN und F344 ..... 58

Abbildung 17: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von Steroidrezeptoren ..... 61

Abbildung 18: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von Enzymen des Steroidstoffwechsels ..... 62

Abbildung 19: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von am Fettstoffwechsel beteiligten Proteinen ..... 63

Abbildung 20: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von verschiedenen weiteren potentiellen Markern..... 64

Abbildung 21: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von am Tissue remodelling beteiligten Proteinen ..... 66

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Transplantation am abdominalen Peritoneum.....	27
Tabelle 2:	Transplantation am mesenterialen Peritoneum .....	28
Tabelle 3:	Verschiedene Transplantationsorte .....	29
Tabelle 4:	Liste der Gene und der verwendeten Primer .....	39
Tabelle 5:	Studienplan 1A und 1B .....	41
Tabelle 6:	Verhältnis der normalisierten Genexpressionslevel in Transplantat versus Uterusgewebe vom BN Stamm .....	60
Tabelle 7:	Statistische Auswertung zu den in Abb. 17-21 dargestellten Daten .....	67



### Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BN	Brown Norway (Inzuchtrattenstamm)
BSA	bovines Serumalbumin
BUF	BUffalo (Inzuchtrattenstamm)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CET	Cetrorelix
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
E2	Estradiol
ER	Estrogen Rezeptor
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
F344	Fischer 344 (Inzuchtrattenstamm)
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GOI/HKG	Gene of interest/house keeping gene, Maß für den relativen Genexpressionslevel
HRPO	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxydase)
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
KGW	Körpergewicht
LEW	Lewis (Inzuchtrattenstamm)
LH	luteinisierendes Hormon
Lsg.	Lösung
MHC	Major Histocompatibility Komplex
min	Minuten
MMP	Matrix Metalloproteinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

NIH	National Institutes of Health
NSAID	non steroidal antiinflammatory drugs (nichtsteroidale Entzündungshemmer)
OVEX	Ovarektomie
P4	Progesteron
PBS	Phosphate BUffered Saline (mit Phosphat gepufferte 0.9% Kochsalzlösung)
PR	Progesteron Rezeptor
PVG	Piebald-Viral-Glaxo (Inzuchtrattenstamm)
qRT-PCR	reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s.c.	subkutan
SHBG	Sexhormon bindendes Globulin
SPRD	Sprague-Dawley (Auszuchtrattenstamm)
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 1. EINLEITUNG

Endometriose ist einer der häufigsten pathologischen Befunde in der Gynäkologie. Sie betrifft bis zu 30% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter und bis zu 50% aller unfruchtbaren Frauen. Die Krankheit beeinträchtigt die Lebensqualität der betroffenen Frauen erheblich. Die schwerwiegenden klinischen Symptome wie Schmerzen im kleinen Becken, Dysmenorrhoe, Dyspareunie und Infertilität führen häufig zu zusätzlichen psychischen Belastungen bis hin zur Arbeitsunfähigkeit. Die Endometriose ist eine chronische Erkrankung, bei der endometriales Gewebe ektop, d.h. außerhalb des Uterus wächst. Nicht selten kommt es nach einer Therapie zu Rezidiven oder Neuentwicklungen. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist nicht geklärt. Die derzeitigen therapeutischen Maßnahmen sind rein symptomatisch und führen nicht zu einer vollständigen und dauerhaften Heilung. Ziel der pharmakologischen Behandlung ist zur Zeit die Schmerzbekämpfung und/oder Hemmung des estrogenabhängigen Wachstums der Endometrioseherde. Zum Teil sind die heutigen Therapieansätze mit starken Nebenwirkungen verbunden wie z.B. Osteoporose oder Symptome ähnlich der Menopause. Hieraus ergibt sich, daß effektivere oder nebenwirkungsärmere Pharmaka dringend gebraucht werden. Neue pharmakologische Methoden müssen entwickelt werden, um neue, auch ursachenorientierte Therapieansätze für diese Erkrankung zu finden. Wirksamkeitstests von Substanzen gegen Endometriose setzen einen intakten Gesamtorganismus voraus. Eine spontane Endometriose entwickelt sich nur bei menstruierenden, höheren Primaten, deren Einsatz als Tiermodell natürlich extrem limitiert sein muss. Aus diesem Grund kann auf die Vortestung von zukünftigen klinischen Substanzen in Nagern nicht verzichtet werden. Endometriose kann in Labornagern durch die Transplantation von Uterusgewebe in ektopen Lokalisationen induziert werden. Solche In-vivo-Modelle sind aber in der Literatur wenig beschrieben, ungenügend charakterisiert und schwer zu etablieren. In Rattenmodellen scheint die autologe Transplantation von Uterusfragmenten ans Mesenterium am erfolgversprechendsten zu sein. In allen bisher in der Literatur beschriebenen Ansätzen wurden Auszucht-Rattenstämme, wie Wistar oder SPRD verwendet. Die Möglichkeit, einen Inzuchtstamm für die Etablierung des Krankheitsmodells einzusetzen, wurde bisher nicht genutzt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll ein verbessertes In-vivo Endometriosemodell in der Ratte entwickelt werden. Das Modell soll vor allem eine bessere Übertragbarkeit der gewonnenen

Erkenntnisse auf den Menschen gewährleisten. Um die Qualität des Tiermodells in dieser Hinsicht zu beurteilen, werden folgende Parameter untersucht:

- Transplantatgröße und -gewicht
- relative Gewichte von estrogenresponsiven Organen (Uterus, Ovarien, Nebennieren)
- Reaktion auf Estrogensuppression durch den GnRH-Antagonisten Cetrorelix (Veränderung der Messparameter und Veränderungen im Ovarialzyklus)
- Expressionsmuster einer Auswahl von 24 verschiedenen Genen
- Estrogen- und Progesteronkonzentration im Serum

Da in der Ätiologie der Endometriose eine genetische Prädisposition eine wichtige Rolle spielt, soll geprüft werden, ob ein Inzucht-Rattenstamm gefunden werden kann, der ähnlich den Patientinnen, eine genetische Prädisposition, sprich eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber der induzierten Endometriose besitzt. Die geringe genetische Variabilität in Inzuchtstämmen dürfte zusätzlich zu einer besseren statistischen Absicherung der Ergebnisse beitragen.

Im ersten Ansatz sollen die Effekte einer Behandlung an fünf verschiedenen Inzucht-Rattenstämmen überprüft werden. Die Behandlung erfolgt mit dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix-acetat in hoher Dosis, bei der sicher Effekte zu erwarten sind.

Im zweiten Ansatz soll durch eine Depotformulierung von Cetrorelix die Wirkung einer chronisch niedrigen Dosierung untersucht und die Empfindlichkeit der in der ersten Studie identifizierten Stämme für die Entwicklung von Endometriose bestätigt werden.

Ein weiterer Aspekt zur Verbesserung des Modells ist die Minimierung der Belastung der Versuchstiere durch den operativen Eingriff, der zur Induktion der experimentellen Endometriose erforderlich ist. Da bei der Inzucht die genetische Variabilität minimal ist, muss keine Autotransplantation vorgenommen werden. Von einem Donortier entnommenes Gewebe kann in einen Empfänger desselben Stammes transplantiert werden. Dieser Überlegung entsprechend sollten in einer dritten Studie Uterusfragmente eines Donors transplantiert werden. Hierdurch entfiel für die Empfängertiere die zur Gewinnung der Transplantate dienende Teilhysterektomie.

## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Definition und Symptome der Endometriose**

Tritt funktionelles Endometrium, sowohl Drüsen- als auch Stromazellen, außerhalb des Uterus auf, so wird dies als Endometriose bezeichnet (Mettler 2000). Endometrioseherde können prinzipiell an allen Stellen des Körpers auftreten, am häufigsten befinden sie sich jedoch am Peritoneum, im kleinen Becken, auf den Haltebändern der Gebärmutter, auf den Ovarien, auf den Eileitern, im Douglasraum und/oder auf der äußeren Oberfläche der Gebärmutter. Manchmal findet man Endometrioseherde auch auf Narben von Bauchoperationen, im Darm, an der Blase, in der Scheide, im Gebärmutterhals, an den äußeren Schamlippen. In seltenen Fällen kann die Endometriose außerhalb des Unterbauches z. B. in der Lunge, auf der Haut oder an anderen Stellen liegen. Die Endometrioseherde reagieren fast genauso auf die zyklischen hormonellen Veränderungen im Körper einer Frau wie das normale Endometrium, d.h. die Schleimhaut wird jeden Monat aufgebaut, abgebaut und blutet ab. Im Gegensatz zum normalen Endometrium kann jedoch die abgestoßene Schleimhaut der Endometrioseherde außerhalb der Gebärmutterhöhle den Körper nicht verlassen. Dadurch kommt es zu inneren Blutansammlungen, Zersetzung des Blutes und des Endometriumgewebes sowie möglicherweise zu Entzündungen in dem betroffenen Bereich und Narbenbildungen. Endometriose ist eine gutartige Erkrankung, sie ist nicht lebensbedrohlich und bildet keine Metastasen, kann jedoch je nach Lage der Herde und Ausprägungsgrad tiefe pelvine Dauerschmerzen, Bauchschmerzen, Dysmenorrhoe, Kohabitationsbeschwerden und/oder Infertilität verursachen (Leyendecker et al. 2002). Andere Symptome wie Müdigkeit, Schmerzen beim Stuhlgang, Kreuzschmerzen während der Periode, Durchfall oder Verstopfung und andere Darmstörungen können ebenfalls auftreten. Abhängig vom Ort des Auftretens kann es auch zu Komplikationen wie Ruptur der Endometrioseherde mit nachfolgender Streuung der Herde an andere Stellen, Entstehung von Verwachsungen und Darmbluten kommen.

## 2.2 Pathogenese

Die Ursache der Entstehung einer Endometriose ist bis heute nicht zufriedenstellend erforscht. Es werden verschiedene Theorien diskutiert, jedoch ist keine alleine ausreichend, um alle Vorgänge zu erklären.

### Theorie der Verschleppung durch retrograde Menstruation

Nach der von Sampson entwickelten Theorie der retrograden Menstruation gelangen normale Endometriumzellen oder Fragmente des eutopen Uterus, also desquamierte Funktionalis, in den Peritonealraum, wo sie implantieren und sich zu Endometrioseherden entwickeln (Sampson 1927). Diese Theorie wird u.a. dadurch unterstützt, daß während des Zyklus kultivierbare und vermutlich implantierfähige Endometriumzellen in der Peritonealhöhle nachgewiesen werden können (Kruitwagen et al. 1991a,b). Während jedoch die retrograde Menstruation ein physiologisches Phänomen ist (Blumenkrantz et al. 1981, Halme et al. 1984), tritt die Endometriose bei weitem nicht bei allen Frauen mit retrograder Menstruation auf.

Zur Klärung dieser Diskrepanz zwischen Theorie und Befund wird eine vermehrte retrograde Menstruation bei Frauen mit Endometriose angenommen, weil die Menstruation insgesamt stärker ist oder durch Behinderung des orthograden Abflusses mehr Menstrualblut und mehr Zellen in den Bauchraum gelangen. Ein weiterer Erklärungsversuch besteht darin, bei Frauen mit Endometriose im Peritonealraum besondere Verhältnisse, z.B. eine defekte Immunabwehr, zu postulieren (Leyendecker et al. 1996, 1998, Nisolle et al. 1997, Müller et al. 2000, Lebovic et al. 2001). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Endometrioseherde und das peritoneale Milieu intensiver Forschung unterzogen, die zu vertieften Einsichten in die zelluläre Pathomorphologie und Pathobiochemie führte. Dabei wurde die Bedeutung von immunkompetenten Zellen, Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren wie VEGF für die Transplantations-, Infiltrations-, Wachstums- und lokalen Entzündungsprozesse analysiert (Sillem et al. 1997, 2001, Müller et al. 2000, Lebovic et al. 2001).

### Metaplasietheorie

Nach der Metaplasietheorie soll pluripotentes Zölomepithel aus dem Bereich der Urogenitalfalte unter bestimmten Bedingungen auch beim Erwachsenen die Fähigkeit besitzen, sich in

Müller'sches Gängepithel auszudifferenzieren und Endometrioseherde zu bilden (Gruenwald 1942). Schwere Endometriosen bei Gynatresie und fehlendem Uterus (Mayer-Rokitansky-Müller-Hauser-Syndrom) sowie Endometriose bei mit hohen Dosen Estradiol behandelten Männern mit Prostatakarzinom (Pinkert 1979) könnten mit dieser Theorie erklärt werden.

#### Induktionstheorie

Die Induktionstheorie stellt eine erweiterte Metaplasietheorie dar und postuliert, daß Menstruationsgewebe Substanzen bildet, die in der Peritonealhöhle das Wachstum von Endometrioseherden induzieren (Witz 2002).

#### Theorie der Metastasierung über Lymph- und Blutgefäße

Diese Theorie wird oft als Halban's Theorie bezeichnet (Halban 1924). Er beschreibt, daß Endometriose auch im Retroperitonealraum und auch in Bereichen, die nicht an das Peritoneum grenzen, entstehen kann. Auch Sampson (1925) postuliert, daß Endometriose aus der lymphatischen oder hämatogenen Dissemination von endometrialen Zellen resultieren kann.

Es gibt eine umfangreiche Verbindung der Lymphgefäße zwischen Uterus, Eileitern, Becken- und Vaginallymphknoten, Nieren und Nabel (Schenken 1989). Die Streuung von endometrialen Zellen in o. g. Bereiche über das lymphatische System ist demnach anatomisch möglich.

1952 stellte Javert bei 6,5% von 153 Lymphadenektomiefällen fest, daß in den Lymphknoten endometriales Gewebe vorhanden war. Bei Patientinnen mit Endometriose lag das Auftreten von Lymphknotenendometriose bei 29%. Dies steht im Einklang mit 178 Autopsieberichten, in denen in 6,7% der Fälle Lymphknotenendometriose nachgewiesen wurde (Javert 1952).

Die lymphatische und hämatogene Metastase von Endometrium wird als Erklärung für die seltenen Fälle von Endometriose angeführt, bei denen die Herde fernab der Peritonealhöhle lokalisiert sind, wie z.B. an der Pleura oder im Lungenparenchym, aber auch in Knochen, Muskeln, peripheren Nerven und im Gehirn (Van Schil et al. 1996, Cassina et al. 1997, Jubanyik 1997, Witz 2002).

#### Kombinationstheorie

Javert (1952) schlug zur Erklärung der Histogenese der Endometriose eine Kombination aus verschiedenen Theorien vor. Diese berücksichtigt sowohl die Implantations- und die Meta-

plasie-Theorie als auch die Annahme, daß Endometrium sich über das Myometrium hinweg ausdehnen kann.

In ähnlicher Weise haben Nisolle und Donnez (1997) postuliert, daß die Histogenese der Endometriose von der Lokalisation und vom Typ des Implantats abhängt. Z.B. kann die peritoneale Endometriose durch die Implantations-Theorie erklärt werden. Ovarielle Endometriose könnte das Ergebnis einer Metaplasie von invaginierten Ovariepithelien sein. Rectovaginale Endometriose könnte aus einer Metaplasie der Überreste der Müller'schen Gänge im Rectovaginalseptum resultieren (Witz 2002).

## **2.3 Behandlung der Endometriose**

Da, wie oben beschrieben, die Ursachen der Endometriose noch nicht vollständig erforscht sind, steht bis jetzt keine ursächliche Therapie zur Verfügung.

Wichtigstes Ziel jeder Behandlung ist z.Zt. die Schmerzlinderung und die Unterdrückung der Hormonwirkung von Estrogenen auf die Endometrioseherde, so daß deren Aktivität und Wachstum gehemmt wird (Giudice u. Kao 2004).

### **2.3.1 Standardtherapien**

#### **2.3.1.1 Hormontherapie**

Für die Hormontherapie werden Substanzen aus 2 verschiedenen Substanzklassen eingesetzt.

Verschiedene Steroidhormonderivate und GnRH-analoge Peptide:

Danazol

Danazol erhöht die Konzentration von freiem Testosteron im Plasma, indem es Testosteron vom Sex-hormone-binding-globulin (SHBG) verdrängt. Zusätzlich wird die Steroidproduktion durch Blockade der Sulfatase im Ovar gehemmt, die Estrogen-Synthese nimmt ab. Außerdem interferiert Danazol mit der LH- und FSH-Sekretion. Alle Mechanismen führen zur Inhibition des Endometriumwachstums innerhalb und außerhalb der Gebärmutter. Die Endometrioseherde schrumpfen, wodurch meist auch die Schmerzen gelindert werden.



Der größte Nachteil dieser Therapie besteht in den androgenen Nebenwirkungen des Danazol. Es kommt häufig zu Gewichtszunahme, Brustdrüsenatrophie, Hitzewallungen und Hirsutismus.

#### Orale Kontrazeptiva

Orale Kontrazeptiva, die ein Estrogen und ein Gestagen oder nur Gestagen enthalten, haben den Vorteil, daß sie zeitlich unbegrenzt eingesetzt werden können. Sie eignen sich daher auch für eine Langzeittherapie. Durch orale Kontrazeptiva kommt es zu Dezidualisierung der Endometrioseherde.

Zum Einsatz kommen diese Präparate meist bei unklarer Diagnose mit dem Symptom Dysmenorrhoe (Montgomery Rice 2002).

#### Gestagene

Die meisten Gestagene unterdrücken die Freisetzung von Gonadotropinen und sorgen für einen hypoestrogenen Zustand. Die direkte Wirkung an Endometrioseherden besteht in einer Dezidualisierung der Herde und in einer Drüsenatrophie. Die Nebenwirkungen sind ähnlich denen der GnRH-Agonisten. Es kann zu Zwischen- und Sturzblutungen, Depression, Flüssigkeitsretention und Gewichtszunahme kommen.

#### GnRH-Agonisten

GnRH-Agonisten wurden zum ersten Mal 1981 in klinischen Studien gegen Endometriose eingesetzt. Heute gehören Leuprolide, Buserelin, Goserelin, Nafarelin zum Standard in der Endometriosetherapie.

Nach einer anfänglichen Stimulation der Hypophyse mit vorübergehender, gesteigerter LH- und FSH-Freisetzung und vermehrter ovarieller Estrogenproduktion, dem sog. Flare-up-Effekt, bewirken GnRH-Agonisten eine Adaptation der Hypophysenzellen in Form einer Downregulation der Rezeptordichte für GnRH. Des Weiteren werden GnRH-Agonisten schlechter metabolisiert als das natürliche Hormon und blockieren so die Rezeptoren. Folglich wird weniger GnRH ausgeschüttet, die LH- und FSH-Produktion stagniert, es kommt zu einer Hypoestrogenämie. Infolgedessen schrumpfen die Endometrioseherde, Dyspareunie und Unterleibsschmerzen werden gelindert. Andererseits treten durch den gravierenden Eingriff in

den Hormonhaushalt zahlreiche Nebenwirkungen auf. Zum einen beobachtet man Symptome ähnlich der Menopause wie Hitzewallungen, Schlaflosigkeit, Depression, Schwindel, Kopfschmerzen usw. Zum anderen kommt es durch länger andauernden Estrogen-Entzug zu vermehrtem Abbau von Knochensubstanz. Es kommt zu Osteoporose vorzugsweise in der Wirbelsäule. Da diese Nebenwirkungen unerträglich sein können, wird eine sog. Add-back-Therapie zur Minderung der Nebenwirkungen empfohlen. Hierbei wird Estrogen oder ein Gestagen so niedrig dosiert, daß die Wirkung des GnRH-Agonisten nicht beeinflusst, die Nebenwirkungen jedoch minimiert werden (Mettler 2000).

### **2.3.1.2 Schmerztherapie**

Zur hormonfreien Therapie der chronischen Schmerzen bzw. als Unterstützung der Hormontherapie können auch Schmerzmittel eingesetzt werden. NSAID's werden als Mittel der Wahl bei der Endometriose-assoziierten Schmerztherapie angewandt. In erster Linie wird Acetaminophen oder Aspirin verwendet. NSAID's können durch die Inhibition der Prostaglandinsynthese nicht nur den Schmerz, sondern auch die Entzündungsprozesse minimieren, weil sie die Enzyme COX-1 und COX-2 blocken, wobei im endometriotischen Gewebe erhöhte COX-2 Konzentrationen nachgewiesen wurden (Ota et al. 2001, Chisima et al. 2002) Bei Langzeitanwendung ist jedoch die gastrointestinale Toxizität zu beachten (Montgomery Rice 2002).

## **2.3.2 Zukünftige Therapieansätze**

### **2.3.2.1 Hormontherapie**

#### **Progesteronrezeptor-Antagonisten**

Mifepriston (RU486)

Mifepriston ist ein potenter Progesteron-Antagonist mit einer direkten antiproliferativen Wirkung an humanen Endometriumzellen (Murphy et al. 2000). Außerdem hat es in hohen Dosen einen antiglukokortikoiden Effekt. In einer Dosis von 50-100mg/Tag sorgt Mifepriston für eine Reduktion der Unterleibschmerzen und den Rückgang der Endometrioseherde um 55%. Es treten keine signifikanten Nebenwirkungen auf (Kettel et al.1996, Koide 1998).

### Onapriston

Die Wirkung von Onapriston und eines weiteren Progesteron-Antagonisten (ZK 136 799) wurde an Ratten mit operativ induzierter Endometriose geprüft. Beide Substanzen bewirkten den Rückgang der Läsionen um 40-60% (Stöckemann et al. 1995).

### Andere Progesteronrezeptor-Antagonisten

ZK 230 211 ist ein hochpotenter Progesteron-Antagonist. Es ist sowohl am Progesteron-Rezeptor-A als auch am Progesteron-Rezeptor-B wirksam (Fuhrmann et al. 2000). In Untersuchungen an Primaten wurde gezeigt, daß die Substanz die Ovulation und die Menstruation verhindert. Dagegen blockiert ZK 137 316 dosisabhängig nur die Menstruation. Alle behandelten Tiere weisen für die Follikelphase normale Estradiol-Werte auf. 15-41 Tage nach Beendigung der Behandlung setzt der normale Menstruationszyklus wieder ein (Slayden et al. 2001). Progesteron-Antagonisten haben den Vorteil, daß sie keinen Hypoestrogenismus verursachen. Somit kommt es nicht zu Knochenschwund, einer der bedeutsamsten Nebenwirkungen der antiestrogenen Therapien. (Nothnik et al. 2003)

### Gestrinon

Gestrinon ist ein 19-Nortestosteron-Derivat, wie Danazol, besitzt androgene, antigestagene und antiestrogene Eigenschaften. Es wirkt zentral antigonadotrop. Die androgenen Effekte äußern sich in einer Erhöhung des freien Testosterons und einer Reduktion des SHBG. Die antiestrogene Wirkung führt zu einer Abnahme des Serum-Estradiolspiegels, vergleichbar mit dem in der frühen Follikelphase, und zur Reduktion der mittleren LH-Konzentration. Das Auftreten der LH- und FSH-Peaks wird, als Zeichen der zentralen antigonadotropen Wirksamkeit, unterdrückt. Gestrinon verursacht eine zelluläre Inaktivierung und Degeneration der endometriotischen Läsionen, nicht jedoch deren Verschwinden (Brosens et al. 1987). Die Nebenwirkungen sind ähnlich denen des Danazols, jedoch weniger intensiv (Fedele et al. 1989). Ein Vorteil wird in der langen Halbwertszeit von Gestrinon gesehen.

### Aromataseinhibitoren

Endometriotisches Gewebe zeigt im Vergleich mit eutopem Endometrium eine erhöhte Aromataseaktivität (Noble et al. 1996). Es wird angenommen, daß die lokale Aromataseexpression zur erhöhten, lokalen Estrogenproduktion des endometriotischen Gewebes beiträgt (Bulun et al. 2002). Bisher wurde der Aromataseinhibitor Anastrozol bei einer postmenopausalen Patientin mit einer polypoiden Läsion in der Vagina eingesetzt. Die Behandlung bewirkte einen hypoestrogenen Status mit Schmerzreduktion und teilweisem Rückgang bzw. Umformung der Läsion (Takayama et al. 1998).

In Ratten mit induzierter Endometriose kam es durch den Einsatz von Fadrozol-hydrochlorid (Yano et al. 1996) bzw. YM511 (Kudoh et al. 1997), beide nichtsteroidale Aromatase-Inhibitoren, zur dosisabhängigen Abnahme des Transplantatvolumens.

### **GnRH-Antagonisten**

GnRH-Analoga kontrollieren die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH im Hypophysenvorderlappen. Während Agonisten bereits zum medizinischen Standardrepertoire zur Beeinflussung der Sexualhormonproduktion gehören, sind GnRH-Antagonisten für Indikationen mit chronischer Applikation, wie Endometriose, noch in der klinischen Entwicklung. Cetrorelix, das in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ist seit 1999 als Arzneimittel zugelassen für die Unterdrückung der endogenen Hormonsynthese, um eine kontrollierte Stimulation der Follikelreifung im Rahmen eines in-vitro-Fertilisationszyklus zu ermöglichen.

GnRH-Antagonisten bewirken, im Gegensatz zu den derzeit eingesetzten GnRH-Agonisten, eine sofortige, dosisabhängige Inhibition der GnRH-Ausschüttung. Der Wirkungsmechanismus beruht auf einer kompetitiven Blockade der membranständigen GnRH-Rezeptoren von hypophysären Drüsenzellen (Reissmann et al.2000). Die Wirkung tritt sofort ein und bleibt bei kontinuierlicher Behandlung erhalten ohne einen unerwünschten, initialen, stimulierenden Effekt, wie er bei GnRH-Agonisten beobachtet wird. Die Suppression der LH- und FSH-Produktion führt zu einer dosisabhängigen Unterdrückung der Sexualsteroid Estradiol, Progesteron und Testosteron, bei hohen Dosen bis zum Kastrationslevel. Nach Beendigung der Behandlung klingt die antagonistische Wirkung völlig ab. Dies erlaubt den kurativen Einsatz bei Erkrankungen, bei denen nur eine partielle Ausschaltung der Hormonwirkungen notwendig ist, wie Endometriose, Gebärmuttermyome und Prostatahyperplasie.

Cetrorelix ist ein Dekapeptid, welches ursprünglich an der Tulane University, New Orleans, USA synthetisiert wurde (Bokser et al. 1990). Cetrorelix hat eine stark modifizierte GnRH Sequenz, bestehend aus 10 Aminosäuren, von denen 5 in einer D-Konfiguration vorliegen. Die C- und N- terminalen schützenden Gruppen (acetyl, amid) sorgen für die Stabilität des Moleküls und sind notwendig für die vollständige antagonistische Wirkung (Reissmann et al. 2000).

Cetrorelix wurde als Acetat- oder Pamoatsalz entwickelt. Die Acetatform wird subkutan verabreicht, während die Pamoatform intramuskulär appliziert wird und eine Depotformulierung darstellt.

In intakten weiblichen Ratten kommt es während einer Behandlung mit Cetrorelix (100µg/Tag über 30 Tage) zum Absinken des Estradiol-, des Progesteron- und des Gonadotropinspiegels im Serum. Die vaginalcytologische Überwachung des Ovarialzyklus zeigt, daß die Tiere in ein dauerhaftes diestrisches Stadium übergehen. Uterus und Ovarien verkleinern sich kontinuierlich (Horvath et al. 2002). Bei niedriger Dosierung (23,7µg/kg/Tag) über die Depotformulierung sank die Serumkonzentration o.g. Hormone zunächst ab, ab Tag 4 nach Applikation stiegen die Werte von Estradiol und den Gonadotropinen kontinuierlich an und erreichten am Ende des Experiments die Kontrollwerte, wobei die LH-Konzentration am Tag 20 weit über der der Kontrollwerte lag und dann leicht abnahm. Die Progesteronkonzentration blieb niedrig. Die Ovarien waren verkleinert, am Uterus zeigten sich keine Gewichtsveränderungen (Horvath et al. 2004). Die Wirkung in Endometriosemodellen ist nicht bekannt.

### **2.3.2.2 Nicht hormonale Therapien**

Nicht hormonale Therapien haben den Vorteil, daß der Hormonhaushalt nicht beeinflusst wird. Eine Konzeption und Schwangerschaft während einer Therapie wäre möglich.

#### Matrix Metalloproteinase-Hemmer (MMP-Inhibitoren)

In humanen Endometrioseherden und auch in von derselben Patientin stammendem eutopen Endometrium wurden veränderte Muster der MMP- (Matrix Metalloproteinase) und TIMP- (tissue inhibitor of metalloproteinase) Expression im Vergleich zu gesunden Frauen gefunden. Endometriotische Läsionen weisen aberrante oder erhöhte Level von MMP-1 (Kokorine et al.

1997, Gottschalk et al. 2000), MMP-2 (Wenzl u. Heinzl 1998), MMP-3 (Saito et al. 1995, Osteen et al. 1996), MMP-7 (Rodgers et al. 1994) und MMP-9 (Chung et al. 2001), sowie verminderte Level von TIMP-1 (Saito et al., 1995 Gottschalk et al. 2000) und TIMP-2 (Gottschalk et al. 2000) auf. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf die invasive Natur der Implantate sein, wobei MMP's an der Invasion und Vaskularisation der endometriotischen Implantate maßgeblich beteiligt sind. Eine Blockade dieser MMP's könnte die Manifestation der Läsionen verhindern (Nothnik et al. 2003).

Verschiedene MMP-Inhibitoren werden bei Brust-, Magen-, Eierstock- und Nierenkrebs eingesetzt. Hier verhindern sie die Tumordinvasion und -vaskularisation, wodurch das Tumorstadium gehemmt wird. Außerdem induzieren sie die Apoptose der Tumorzellen (Vihinen u. Kahari 2002). Diese Eigenschaften prädestinieren MMP-Inhibitoren für den Einsatz gegen Endometriose. Eine große Schwäche dieser Substanzen sind die Nebenwirkungen, die sich vor allem in muskuloskeletalen Schmerzen äußern (Nelson et al. 2000).

Antiinflammatorische und immunmodulatorische Substanzen:

#### Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten

Leukotriene sind Produkte der Lipooxygenase und sind im Körper weit verbreitet so auch im Uterus. Als Entzündungsmediatoren sind sie Ziel therapeutischer Eingriffe. Es wird vermutet, daß Leukotriene eine gewisse Rolle in der Pathophysiologie der Endometriose spielen (Abu u. Konje 2000). In der Zukunft könnten Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten bei Patientinnen eingesetzt werden, die auf eine Behandlung mit Prostaglandin-Synthetase-Inhibitoren nicht ansprechen (Yamaguchi u. Mori 1990).

#### Anti-TNF- $\alpha$ -Therapien

TNF- $\alpha$  ist ein potenter Stimulator der MMP Expression im Endometrium und in endometriotischem Gewebe (Sillem et al. 1999). Erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und anderen Cytokinen in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose stimulieren die MMP Expression und ermöglichen die Invasion und den Wachstum der Läsionen. Demnach könnte die Blockade dieser Cytokine die Induktion und somit die Wirkung der MMP's verhindern. (Nothnik et al. 2003)

### Pentoxifyllin

Das Methylxanthinderivat Pentoxifyllin ist ein Phosphodiesterasehemmer und reduziert die Produktion von Cytokinen, die Aktivierung von B- und T-Lymphocyten sowie die Aktivität der natürlichen Killerzellen (Mandell 1995). In einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, daß Pentoxifyllin das Wachstum der Transplantate reduziert (Nothnik et al. 1994). Dieser Rückgang war hormonunabhängig, die Konzentrationen von Estradiol und Progesteron wurden nicht beeinflusst. Aufgrund dieser Daten wird angenommen, daß Pentoxifyllin in der Lage ist, den Rückgang endometriotischen Gewebes zu induzieren, ohne einen hypoestrogenen Status hervorzurufen. Ausserdem hat Pentoxifyllin einen positiven Effekt auf die endometriose-assoziierte Infertilität (Steinleitner et al. 1991a, Balasch et al. 1997).

### Leflunomid, Etanercept und Infliximab

Das Isoxazolderivat Leflunomid ist ein Inhibitor der Pyrimidin-de-novo-Synthese (Fox et al. 1999). Das Protein Etanercept konkurriert mit den Liganden des endogenen TNF Rezeptors (Jarvis u. Faulds 1999) und das chimäre monoklonale Antikörper Infliximab bindet lösliche und membranständige Formen des TNF $\alpha$  (Markham u. Lamb 2000). Alle drei Substanzen reduzieren die Wirkung von TNF- $\alpha$  und vermindern somit die Cytokinproduktion und entzündliche Reaktionen. Sie werden in der Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie rheumatische Arthritis oder Morbus Crohn, eingesetzt. Ihre Wirksamkeit bei Endometriose muss noch überprüft werden (Nothnik et al. 2003).

### Tumor Necrosis Factor-Binding Protein-1

Das TNF-binding Protein-1 (TBP-1) ist die lösliche Form des TNF-Rezeptor Typ-I, welches TNF- $\alpha$  bindet und neutralisiert. In einem Rattenmodell für Endometriose zeigten D'Antonio et al. (2000), daß rekombinantes humanes TBP-1 das Wachstum der Transplantate effektiv reduziert. Rekombinantes humanes TBP-1 unterdrückt die Entwicklung von Endometriose in Pavianen (*Papio spp.*) ohne den Estradiolstoffwechsel zu beeinflussen (D'Hooghe et al. 2001).

## 2.4 Tiermodelle für Endometriose

Es werden verschiedene Säugerspezies in der Erforschung der Endometriose eingesetzt. Höhere Primaten können die Krankheit spontan entwickeln, sie kann aber auch für Forschungszwecke induziert werden, jedoch soll hier nur auf die Nagemodelle eingegangen werden.

Nager sind in der Lage, durch die Transplantation von autologem und isogenem Uterusgewebe oder auch humanen Endometriumfragmenten an ektope Lokalisationen, endometriotische Läsionen zu entwickeln. Die verschiedenen experimentellen Techniken und der offensichtlich große phylogenetische Abstand zwischen Nager und Mensch müssen bei Übertragung von Ergebnissen aus diesen Modellen berücksichtigt werden.

Die bedeutendsten Unterschiede bestehen im fehlenden Menstruationszyklus bei Nagern und darin, daß sie spontan keine Endometriose entwickeln können. Die Ratte ovuliert spontan, aber die Lutealphase ist kürzer als beim Menschen. Kaninchen fehlt die Lutealphase gänzlich. Die endometriotischen Läsionen entwickeln sich in Nager anders als die in Menschen. Bei der Ratte bilden sich Zysten mit einem klaren, serösen Inhalt. Beim Kaninchen findet man feste, hämorrhagische Läsionen, die sich jedoch sehr von denen des Menschen unterscheiden (Story und Kennedy 2004).

Autologe Transplantate wurden bei Kaninchen (Schenken und Ash 1980), Ratten (Vernon und Wilson 1985) und Hamstern (Steinleitner et al. 1991b) eingesetzt. Transplantate syngener Individuen sind histokompatibel und werden nicht abgestoßen. Diese Methode wurde bisher nur bei Mäusen eingesetzt (Somigliana et al. 1999). Die Verwendung von Ratten anstatt Mäuse hätte den Vorteil, daß man größere Tiere operationstechnisch einfacher handhaben könnte und größere Mengen Probenmaterial zur Verfügung stünden.

Humanes Endometrium konnte erfolgreich in thymusaplastische Nacktmäuse implantiert werden. Zamah et al. (1984) applizierten das Gewebe subkutan. Nisolle et al. (2000a) und Grümmer et al. (2001) verbrachten das Gewebe durch eine Laparotomie und Somigliana et al. (1999) durch Inokulation in die Peritonealhöhle. Es muß jedoch bedacht werden, daß Thymusaplasie eine gestörte Immunantwort zur Folge hat. Dies erlaubt zwar den Einsatz der Tiere als Empfänger von humanem Gewebe, entspricht aber nicht den immunologischen Vorgängen beim Menschen.



Sowohl bei der Autotransplantation als auch bei der Xenotransplantation sind Stroma- und Epithelzellen des Endometriums gleichzeitig erforderlich (Zamah et al. 1984, Vernon u. Wilson 1985). Xenotransplantierte humane Endometriumzellen entwickeln eher endometriotische Läsionen, wenn sie vor der Applikation mit Estrogen oder mit einer Kombination aus Estrogen und Progesteron behandelt wurden (Beliard et al. 2002). Die Zyklusphase in der das Endometrium entnommen wurde, scheint die Fähigkeit des Gewebes Läsionen zu entwickeln nicht zu beeinflussen (Nisolle et al. 2000b).

Die Entwicklung von Tiermodellen in gängigen Nagerspezies statt in den sehr viel aufwendiger zu haltenden Primaten, hat die Erforschung der Pathophysiologie der Endometriose erleichtert. Die Darstellung der Morphologie des transplantierten Gewebes zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht die Untersuchung der Anheftungsmechanismen von endometriotischen Zellen. Weiterhin kann die frühe Entwicklung der Läsionen beobachtet werden (Nisolle et al. 2000a). Auch die durch Endometriose entstehenden Entzündungsprozesse wurden im Rattenmodell erforscht (Uchiide et al. 2002). Immunologische Faktoren, die eine große Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielen sollen (Rock u. Markham 1992), konnten in Ratten (Keenan et al. 1999, Ingelmo et al. 1999), in syngenem Mäusen (Steinleitner et al. 1991a, Somigliana et al. 1999), aber auch im Hamster (Steinleitner et al. 1991b) erfolgreich untersucht werden.

Ebenso sind beim Menschen wirksame Pharmaka auch im Nagermodell erfolgreich eingesetzt worden. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Expression verschiedener Gene, die in das Krankheitsgeschehen involviert sind, sich bei Mensch und Ratte in ähnlicher Weise verändert (Rojas-Cartagena et al. 2005, Eiterer et al. 2005).

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über bisherige Studien, bei denen Ratten als *in vivo*-Endometriose-Modell eingesetzt wurden. In den in Tabelle 1 aufgeführten Untersuchungen wurden zur Induktion der Endometriose Autotransplantate von Uterusgewebe am Peritoneum befestigt. Eine häufig gewählte Lokalisation für die Autotransplantate befindet sich im Bereich der Mesenterialarkaden des Gastrointestinaltraktes (Tab. 2). Tabelle 3 beinhaltet Studien mit unterschiedlichen Methoden und Publikationen mit der Angabe, daß eine Autotransplantation stattgefunden hat. Sakata et al. (1990), Katsuki et al. (1998) und Saito et al. (2003)

verbrachten die Transplantate unter die Nierenkapsel, Yano et al. (1996) subkutan auf die Bauchmuskulatur. Golan et al. (1986) befestigten die Transplantate an den Uterusbändern.

**Tabelle 1: Transplantation am abdominalen Peritoneum**

Erläuterung der Abkürzungen am Ende von Tab. 3

<b>Autor</b>	<b>Rattenstamm</b>	<b>untersuchte Parameter</b>	<b>Behandlung</b>
<b>Jones 1984</b>	n.s.	TV	GnRH-Agonist (Wy-40,972), Levonorgestrel, Danazol, OVEX
<b>Vernon &amp; Wilson 1985</b>	n.s.	TG, Morphologie, Anzahl und Entwicklungsfähigkeit der Läsionen, Fertilität	–
<b>Jones 1987</b>	n.s.	TV	GnRH-Antagonist ("Salk LRH analogue")
<b>Okada et al. 1988</b>	n.s.	TW	GnRH-Agonist (Leuprolidactetat)
<b>Tjaden et al. 1993</b>	n.s.	TV und Lebensfähigkeit (H&E) der Transplantate nach Behandlung	RU486
<b>Stoekemann, Hegele-Hartung, Chwalisz 1995</b>	n.s.	VC, TO in situ, TG, intaktes Uterushorn, O, NN, HP Histologie und PCNA-Färbung des Uterus und der Transplantate	Onapriston, ZK136799
<b>Matsubayashi et al. 1995</b>	n.s.	Identifikation der Leukocytenpopulationen in der PF und im peripheren Blut (Durchflußcytometrie), Histologie der Transplantate	Danazol
<b>Quereda et al.1996</b>	n.s.	TG und Histologie	GnRH-Antagonists: Triptorelin (Dekapeptyl 3.75), Gestrinon
<b>Yang et al. 1996</b>	n.s.	Protoporphyrinfluoreszenz, 3h nach Verabreichung von 5-Aminolävulinsäure	unterschiedliche Applikationswege
<b>Schor et al.1999</b>	n.s.	TF,H&E	Equine konjugierte Estrogene, MPA
<b>D´Antonio et al. 2000</b>	n.s.	TG, Serum-E2, NK-Zellaktivität	rhTNF $\alpha$ -receptor1, GnRH-Antagonist (Antide)
<b>Gong et al.2001</b>	n.s.	TV, VC	RU486, Lilopriston
<b>Uchiide et al. 2002</b>	n.s.	morphologische und immunologische Veränderungen	–
<b>Cason et al. 2003</b>	n.s.	E2-abhängige Veränderungen der vaginalen Nociception	–
<b>Yao et al. 2005</b>	n.s.	TG,TV, Beschaffenheit, intaktes Uterushorngewicht, Plasma-E2 (RIA)	E2, Raloxifen, OVEX

**Tabelle 2: Transplantation am mesenterialen Peritoneum**

Erläuterung der Abkürzungen am Ende von Tab. 3

<b>Autor</b>	<b>Rattenstamm</b>	untersuchte Parameter	Behandlung
<b>Sharpe et al.1991a</b>	<b>SPRD</b>	TG, TW, VC, Serum- E2 und -P4	GnRH-Antagonist (Antide) E2, P4
<b>Sharpe et al. 1991b</b>	n.s.	Zusammensetzung der sekretierten Proteine im eu- und ektopen Endometrium	P4, E2
<b>Isaacson et al. 1991</b>	<b>SPRD</b>	Sekretion des Komplementfaktors 3	E2,OVEX 2 Wochen nach Autotransplantation
<b>Wright, Sharpe-Timms 1995</b>	<b>SPRD</b>	VC,Serum-E2 und -P4 (RIA), Ausmaß der Adhäsionen	GnRH-Agonist (Lupron Depot)
<b>Stoekemann, Hegele-Hartung, Chwalisz 1995</b>	n.s.	VC, TO in situ, TG, intaktes Uterushorn, O, NN, HP Histologie und PCNA-Färbung des Uterus und der Transplantate	Onapriston, ZK136799
<b>Cummings &amp; Metcalf 1996</b>	<b>SPRD</b>	TD, OG, VC, Thymusatrophie, Hepatomegalie, KGW, entzündliche Veränderungen	TCDD
<b>Quereda et al.1996</b>	n.s.	TG und Histologie	GnRH-Antagonisten: Triptorelin (Dekapeptyl 3.75), Gestrinon
<b>Keenan et al. 1999</b>	<b>SPRD</b>	H&E, Immunhistochemie: dendritische Zellen, CD8-T-Lymphocyten, Makrophagen, NK-Zellen	Immunmodulatoren: Loxoribin, Levamisol
<b>Cox, Piva, Sharpe-Timms 2001</b>	<b>SPRD</b>	VC, mRNA-Expression von MMP-3, MMP-2, TIMP-1, GAPDH	–
<b>Cotroneo, Larmartiniere, 2001</b>	<b>SPRD</b>	TG, Serum-E2, -P4,- Genistein	Estron, Gestrinon
<b>Berkley et al. 2004</b>	<b>SPRD</b>	VC, Innervation des ektopen Endometriums (Immunhistochemie)	–
<b>Rojas-Cartagena et al. 2005</b>	<b>SPRD</b>	TG,sTNF, sTNFRSF1A u-B in PF u. Plasma, TNF im Kolon u. Intestinum, Genexpression: Tnf,Tnfrsf1 u.1b, Traf,Icam, Sele	–

**Tabelle 3: Verschiedene Transplantationsorte**

<b>Autor</b>	<b>Rattenstamm</b>	<b>untersuchte Parameter</b>	<b>Behandlung</b>
<b>Vernon &amp; Wilson 1985</b>	n.s.	TG, Morphologie, Anzahl und Entwicklungsfähigkeit der Läsionen, Fertilität	–
<b>Golan et al. 1986</b>	n.s.	TG, Ausmaß der Adhäsionen, Fertilität	Danazol, Indomethacin
<b>Sakata et al. 1990</b>	n.s.	TG	Danazol, GnRH-Agonist (Leuprolid), OVEX
<b>Zanagnolo et al. 1991</b>	n.s.	TV	GnRH-Agonist
<b>Barragan et al. 1992</b>	<b>Wistar</b>	TG, Trächtigkeitsrate, Histologie, Serum-E2 und -P4	Trächtigkeit, Laktation
<b>Cummings &amp; Metcalf 1995</b>	n.s.	TD	E1, P4, Methoxichlor (MXC), OVEX
<b>Yano et al. 1996</b>	<b>SPRD</b>	VC, TV in situ, Gewicht des intakten Uterushorns, 1 Ovar und TG	Fadrozol (ARO-Inhibitor)
<b>Katsuki et al. 1998</b>	<b>SPRD</b>	TV, UG, Knochendichte NK-Aktivität in der PF, IL-1 $\beta$ -Produktion der peritonealen Makrophagen	Dienogest, Danazol, Busserelin, OVEX
<b>Giamberardino et al. 2002</b>	<b>SPRD</b>	Schmerzsymptomatik	–
<b>Saito et al. 2003</b>	<b>Wistar</b>	TV	TZE5323 (Antiestrogen), Danazol, Leuprorelinacetat

## Abkürzungen:

HP	Hypophyse	TF	Transplantatfläche
H&E	Hämatoxilin&Eosin	TG	Transplantatgewicht
NN	Nebenniere	TO	Transplantatoberfläche
NK	natürliche Killerzellen	TV	Transplantatvolumen
n.s.	nicht spezifiziert	TW	Transplantatwachstumsrate
O	Ovar	UG	Uterusgewicht
OG	Ovargewicht	VC	Vaginalzytologie
PF	Peritonealflüssigkeit		
TD	Transplantatdurchmesser		

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Versuchstiere**

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden, mit Hilfe der öffentlich zugänglichen Datenbank Ratmap ([www.ratmap.org](http://www.ratmap.org)) und dem Stammbaum der Inzucht-Rattenstämme, weibliche Ratten aus folgenden 5 Inzuchtstämmen und einem Auszuchtstamm, gezüchtet von Harlan UK Limited, England, verwendet:

-BN RijHsd (Brown Norway)

Ein brauner Mutant wurde von D.H. King und P. Aptekman in einer pen-bred-Kolonie erhalten, aus diesen Tieren wurden 1958 von Billingham und Silvers die BN gezüchtet. Die BNRijHsd Ratten sind direkte Nachkommen von einer Kernkolonie der TNO Institute, Niederlande.

Die Tiere sind braun.

Inzuchtgeneration: >F71

-BUF SimRijHsd (Buffalo)

1946 hat Heston mit Tieren aus dem Buffalostamm von H. Morris die Zucht begonnen. 1950 kam der Stamm in der 10. Inzuchtgeneration zu NIH. Die Tiere sind Albinos.

Inzuchtgeneration: F130 (NIH 1989)

-F344 NHsd (Fisher)

Die Zucht fingen Curtiss und Dunning 1920 an der Columbia Universität am Institut für Krebsforschung an. Der Stamm kam 1949 zu Heston, 1951 dann zu National Institutes of Health.

F344 ist einer der meist verwendeten Stämme, die in der Krebsforschung und in der Toxikologie eingesetzt werden. Die Tiere sind Albinos.

Inzuchtgeneration:>F155

#### -LEW HanHsd (LEWis)

Der Stamm wurde von Dr. Margaret LEWis aus Wistar-Ratten gezüchtet, kam 1954 in der 20. Inzuchtgeneration zu Aptekman und Bogden, 1958 in der F31-Generation dann zu Silvers. Häufige Verwendung findet dieser Stamm als Inzucht-Partner für einige kongene Stämme am MHC. Die Tiere sind Albinos.

Inzuchtgeneration:> F?+96

#### -PVG OlaHsd

Den Ursprung des Stammes findet man in Kings College of Household Science, von hier kam der Stamm über das Lister Institute und Virol 1946 zu Glaxo. Hier begann die Inzucht. Die Tiere sind weiß mit schwarzer Haube.

Inzuchtgeneration: F70+?

#### -SPRD HsdSD

Der Stamm entstand bei der Sprague-Dawley Company, Madison, Wisconsin, durch eine Reihe von Kreuzungen zwischen einer männlichen Haubenratte und sechs weiblichen Albinoratten unbekanntem Ursprungs. Die derzeitigen Harlan Kolonien sind direkte Nachkommen aus dieser Ursprungskolonie. Die Tiere sind Albinos.

### **3.2 Haltung der Versuchstiere**

Die Tiere wurden zu zweit in Makrolonkäfigen vom Typ IV (1815 cm<sup>2</sup>) auf Weichholzeinstreu gehalten. Die Einstreu wurde zweimal pro Woche ausgewechselt.

Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einem Alleinfutter (ssniff R/M-H, 10mm; Fa. ssniff: 19 % Rohprotein, 3,3% Rohfett, 4,9% Rohfaser, 6,7% Rohasche, Zusatzstoffe: Vit.A 15000 IE/kg, Vit.D3 1000 IE/kg, Vit.E 100 mg/kg, Cu 5 mg/kg). Unbehandeltes Trinkwasser stand in Makrolonflaschen ad libitum bereit.

Nach Anlieferung und einer einwöchigen Quarantäne wurden die Tiere in den eigentlichen Versuchsraum gebracht, hier blieben sie bis Versuchsende. Dieser Raum wurde von 6:00 bis 18:00 Uhr künstlich beleuchtet, die mittlere Temperatur lag bei 22±2 °C, die relative Luftfeuchtigkeit betrug 30-70%. Die Luft wurde 10mal pro Stunde gewechselt.

Alle Versuchstiere waren laut Züchterangaben frei von den in der Liste von FELASA genannten Erregern und Parasiten.

### 3.3 Tierexperimentelle Methoden

Die Versuche wurden in der Zeit von Mai 2003 bis November 2005 im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben der Solvay Pharmaceuticals GmbH (Genehmigungsbescheid 509c-42502-02/615, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Hannover) durchgeführt.

An dieser Stelle werden die tierexperimentellen Methoden allgemein beschrieben. Einzelheiten der jeweiligen Studien werden zur besseren Übersicht nochmals im Hinblick auf die Zielsetzung im Zusammenhang mit den Ergebnissen dargestellt.

Nach der einwöchigen Quarantäne wurden die Tiere zur Identifizierung mit einem handelsüblichen wasserfesten Stift am Schwanz markiert und operiert. Nach der Laparotomie folgte eine zweiwöchige Rekonvaleszenzphase.

In den darauf folgenden 3 Wochen mit Ausnahme der Wochenenden fanden täglich morgens die Entnahme von Vaginalabstrichen und gegebenenfalls die Substanzapplikation statt. Einmal wöchentlich erfolgte eine Körpergewichtsbestimmung. Aus den gemessenen Werten wurden die relativen Körpergewichtsveränderungen nach der Formel  $X_{\Delta} = [(X_{\text{Ende}} - X_{\text{Anfang}}) / X_{\text{Anfang}}] \times 100$  errechnet. In einer Studie wurde zweimal wöchentlich Blut aus der Vena saphena lateralis entnommen. Vor dem chirurgischen Eingriff und vor der Sektion wurden die Tiere in den Studien 1A, 1B und 2 mittels Urin von männlichen Ratten bzw. in der Studie 3 durch Estradiolapplikation in ihrem Zyklus synchronisiert.

Die Tiere wurden am Ende der Studien durch Kohlendioxid-Exposition getötet und sezirt. Hierbei wurden die Transplantate, Uterus, Ovarien und Nebennieren entnommen. Alle entnommenen Organe wurden gewogen, die Transplantate zusätzlich mit einer Schieblehre vermessen und deren Fläche nach der Formel  $(A = d_1/2 * d_2/2)\pi$  bestimmt.

Transplantate und Uterusfragmente wurden je nach Studie z.T. für die Immunhistologie in Formalin fixiert, z.T. für RT-PCR in RNAlater (Qiagen, Hilden) konserviert und eingefroren oder in Stickstoff eingefroren. Außerdem wurden in drei Studien Blutproben zur Plasmagewinnung aus der Vena cava caudalis entnommen.



### **3.3.1 Autotransplantation**

Die Tiere wurden mit einer Ketamin-Xylazin-Mischung per i.p. Applikation narkotisiert. Bei der letzten Studie wurde eine Inhalationsnarkose mit einem Isofluran/Lachgas/Sauerstoffgemisch durchgeführt. Zur Einleitung erhielten die Tiere 5 Vol. % Isofluran und jeweils 1 Liter Lachgas und Sauerstoff pro Minute. Zur Erhaltung wurde die Isoflurankonzentration auf 1,8 Vol. % reduziert. Nach dem Scheren des Operationsfeldes in der Regio abdominalis folgte eine Desinfektion mit 70 %igem Alkohol. Nach Durchtrennung der Haut wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba eröffnet. Das rechte Uterushorn wurde am Beginn des distalen Drittels gemeinsam mit der Arteria uterina abgebunden und proximal von der Ligatur sowie am Übergang zum Eileiter durchtrennt. Der so entstandene etwa 2 cm lange Uterusschlauch wurde der Länge nach aufgeschnitten und dieses rechteckige Stück nochmals in sechs jeweils ca. 3x3 mm große Stücke geteilt. Diese Transplantate wurden an den Mesenterialgefäßen des Dünndarms mit einem nicht resorbierbaren Faden der Stärke 6-0 fixiert. Nach Reponierung des Darms in die Bauchhöhle erfolgte der Verschluss der Bauchmuskulatur und der Haut mit U-Heften. Bis zum Aufwachen wurden die Ratten in Zellstoff gewickelt auf einer Wärmematte gelagert.

### **3.3.2 Substanzapplikation**

Das Cetorelixacetat 50µg/0,2 ml/Tier, gelöst in 5%igem Mannitol, bzw. 0,2ml 5% Mannitol wurde täglich, außer am Wochenende, subkutan in der Nackenregion appliziert (Cetorelixacetat 9908-001/11, Zentaris GmbH Frankfurt). Die Verabreichung des Cetorelixpamoats 156µg/250g KGW gelöst in Aqua injectabilia (entspr. 0,1ml Lsg.) bzw. nur Aqua inj., erfolgte einmalig in die lange Sitzbeinmuskulatur (Cetorelixpamoat P85P002A Aliquot B Zentaris GmbH Frankfurt).

### **3.3.3 Vaginalzytologie**

Durch die Verfolgung der zyklischen, hormonabhängigen Veränderungen des Vaginalepithels wurde der Ovarialzyklus der Tiere analysiert.

Handelsübliche Wattestäbchen wurden mit PBS befeuchtet und durch Einführen in die Vagina wurden den Tieren Zellen der Vaginalschleimhaut entnommen (Maede et al. 2000). Die

Zellen wurden auf Objektträgern ausgestrichen, nach einer kurzen Trocknungszeit, ohne weitere Fixierung der Zellen, mit Methylenblau für 5 Minuten gefärbt, danach gespült, getrocknet und bei 100x Vergrößerung im Lichtmikroskop untersucht.

Der Ovarialzyklus der Nager gliedert sich in vier Abschnitte, die an bestimmten Zelltypen im Vaginalabstrich zu erkennen sind. Der Proestrus dauert etwa 12 Stunden, im Abstrich dominieren kernhaltige Epithelzellen. Während des ebenfalls ca. 12 stündigen Estrus sind fast ausschließlich verhornte Epithelzellen („Schollen“) zu finden. Der Metestrus hält auch ungefähr 12 Stunden an und ist durch zahlreiche Leukocyten, verhornte und kernhaltige Epithelzellen charakterisiert. Der Diestrus ist eine 2-3 Tage lange Phase und ist im Abstrich an kleinen kernhaltigen Epithelzellen und Leukocyten erkennbar (Weiß et al. 2003).

### **3.3.4 Zyklussynchronisation**

Der zyklische Auf- und Abbau des Endometriums bedingt deutliche Schwankungen des Uterusgewichtes. Größe und Gewicht der Autotransplantate wird ebenfalls vom hormonellen Status der Tiere beeinflusst. Um möglichst identische Bedingungen zu schaffen sollten sich die Tiere im selben Zyklusstadium befinden. Durch die Wirkung männlicher Pheromone bzw. durch Estrogene wird die Paarungsbereitschaft weiblicher Ratten stimuliert, die Tiere werden östrisch. Dies kann experimentell durch Pheromone aus dem Urin männlicher Ratten erreicht werden oder durch die Applikation eines Estrogens. Männliche SPRD-Ratten wurden über Nacht auf Papiertupfer gehalten. Die mit Urin der Böcke getränkten Tupfer wurden zwei Tage hintereinander morgens in die Käfige der weiblichen Tiere gelegt und verblieben dort 24 Stunden. Diese Methode wurde in den Studien 1A, 1B und 2 eingesetzt.

In der letzten Studie (3) wurde den Tieren über 4 Tage Estradiol in einer Dosierung von 1µmol/kg KGW/Tag subkutan verabreicht, um eine vollständige Synchronisation zu erreichen.

### **3.3.5 Blutentnahme**

Die Tiere wurden fixiert, am Hinterbein rasiert und desinfiziert. Mit einer 23G Kanüle wurde dann die Vena saphena punktiert und 200-400µl Blut entnommen, das in unbeschichteten Microvetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) zur Serumgewinnung gesammelt wurde. Nach 15

minütigem Zentrifugieren bei 3000 U/min wurde das Serum abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

### **3.4 Analytische Methoden**

#### **3.4.1 Progesteron-Enzymimmunoassay**

Die Serumprogesteron-Werte wurden mit dem correlate-EIA Progesterone Enzyme Immunoassay Kit der Firma Assay Designs Inc. gemessen. Das Prinzip der Messung beruht auf einer Antigenkompetition. Standards, Proben, Assay-Puffer, Progesteron konjugiert mit alkalischer Phosphatase und Maus-Anti-Progesteron-Antikörper werden in eine 96-Well Platte, die mit Ziege-Anti-Maus-IgG beschichtet ist, pipettiert. Während der Inkubationszeit von 2 Stunden, auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm, binden Progesteron aus der zu untersuchenden Probe und AP-markiertes Progesteron in Konkurrenz an die begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am Progesteron-Antikörper. Überflüssige Reagenzien werden ausgewaschen. P-nitrophenyl-Phosphat wird durch die alkalische Phosphatase (AP) umgesetzt zu einem farbigen Komplex. Nach Beendigung der Reaktion mit einer Stop-Lösung wird die Absorption bei 405nm in einem Spektralphotometer gemessen. Der Intraassayvariationskoeffizient ist 5,4%, der Interassayvariationskoeffizient beträgt 8,3%.

#### **3.4.2 Estradiol-Enzymimmunoassay**

Die Estradiol-Spiegel im Serum bzw. Plasma wurden mit Hilfe des DSL-10-4300 ACTIVE\* Estradiol-Kits der Firma DSL Inc. bestimmt.

Wie beim Progesteron-Enzymimmunoassay liegt auch hier das Prinzip einer Antigenkompetition zugrunde. Jeweils 50µl der Standards, Kontrollen und der Estradiol enthaltenden Proben werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem Kaninchen-anti-Estradiol-Antiserum beschichtet ist. Danach wird von einer Estradiol-Biotinkonjugat-Lösung in jede Vertiefung 100 µl pipettiert. Bei der anschließenden einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur (~25°C) auf einem Plattenschüttler bei 500-700rpm bindet das unmarkierte Estradiol in Konkurrenz mit dem Biotin-markierten Estradiol an eine begrenzte Anzahl von Anti-Estradiol-Bindungsstellen. Ungebundene Reagenzien werden ausgewaschen. Nun werden je 200 µl einer Streptavidin-Horseradish Peroxidase-(HRPO)Lösung dazugegeben. Streptavidin-HRPO

bindet an das Biotin-markierte Estradiol, ungebundenes Streptavidin-HRPO wird nach 30 min Inkubation ausgewaschen. Als Substrat für die Peroxidase fungiert eine Tetramethylbenzidin-Chromogen-Lösung. Hiervon werden je 100µl in die Vertiefungen pipettiert. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wird die Reaktion mit je 100 µl einer sauren Stopp-Lösung beendet. Der Grad der enzymatischen Umsetzung des Substrats wird durch die Absorptionsmessung in einem Spektralphotometer bei 450 nm festgestellt. Der Intraassayvariationskoeffizient ist 8,2%, der Interassayvariationskoeffizient beträgt 12,4%.

### **3.4.3 Immunhistochemie**

Der immunhistochemische Nachweis von Estrogen- und Progesteronrezeptoren sowie vom Ki67-Antigen erfolgte auf Paraffinschnitten von Uterus- und Transplantatgewebe, die im Auftrag von Solvay Pharmaceuticals GmbH durch die Fa. Histoserve auf Chromalaun-gelatine-beschichteten Objektträgern angefertigt wurden.

Zur Vorbereitung für die Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert.

#### **3.4.3.1 Proliferationsantigen Ki67**

Das Proliferationsantigen Ki67 wurde mit Hilfe der sogenannten Labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB, Dako Diagnostika Hamburg) nachgewiesen.

Die Antigendemaskierung, das heißt das Aufbrechen der fixationsbedingten Quervernetzungen und Renaturierung der Antigenstruktur, erfolgte durch ein 20 minütiges Kochen in einer Target Retrieval Lösung (Dako Target Retrieval Solution, Dako Diagnostika Hamburg) bei 90°C im Dampfgarer (MultiGourmet, Braun, Kronberg). Nach Abkühlung wurden die folgenden Inkubationsschritte in einer Feuchtekammer durchgeführt:

- 5 min spülen in PBS + 0,05% Tween 20
- 30 min Inkubation mit dem Primärantikörper (Dako Maus anti-Ratten Ki 67, Klon MIB-5, Dako Diagnostika Hamburg) 1:50 mit PBS + 3% BSA verdünnt bzw. Negativkontrolle (Dako Maus Universal, Dako Diagnostika Hamburg) 1:500 mit PBS + 3% BSA verdünnt.
- 5 min Spülen in PBS + 0,05% Tween 20

- 20 min Inkubation mit dem biotinylierten Sekundäantikörper (ChemMate Detection Kit AP/RED, Rabbit/Mouse, Dako Diagnostika Hamburg)
- 5 min spülen in PBS + 0,05% Tween 20
- 20 min Inkubation mit Streptavidin markierter alkalischer Phosphatase (ChemMate Detection Kit AP/RED, Rabbit/Mouse, Dako Diagnostika Hamburg).
- 5 min Spülen in PBS + 0,05% Tween 20.
- 10 min Fuchsin-Färbung (ChemMate Detection Kit AP/RED, Rabbit/Mouse, Dako Diagnostika Hamburg).
- Spülung in Aqua dest.
- 2 sec. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.
- 5 min Spülen in warmem Leitungswasser.

Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser 10 min gespült und anschließend mit Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

#### **3.4.3.2 Estrogen- und Progesteronrezeptor**

Die Steroidrezeptoren wurden mit dem EnVision™ 2-Schritt-Detektionssystem (Dako Diagnostika Hamburg) dargestellt.

Die Antigendemaskierung, erfolgte in diesem Fall durch 35 minütiges Kochen in Target Retrieval Lösung bei 90°C im Dampfgarer. Nach Abkühlung wurden die folgenden Inkubationsschritte in einer Feuchtekammer durchgeführt:

- 5 min Peroxidase-Block ( 0,03% Wasserstoffperoxid-Lsg.), um die endogene Peroxidase-Aktivität zu hemmen
- 5 min spülen in PBS + 0,05% Tween 20
- 45 min Inkubation mit dem Primäantikörper (für Progesteron-Rezeptor Dianova PR-Ab-10 hPRa4+HPRa5, für Estrogen-Rezeptor Biozol ER Maus-antihuman) 1:50 mit PBS + 3% BSA verdünnt bzw. Negativkontrolle (Dako Maus Universal, Dako Diagnostika Hamburg) 1:500 mit PBS + 3% BSA verdünnt.
- 5 min Spülen in PBS + 0,05% Tween 20
- 45 min Inkubation mit HRP-markiertem Polymer konjugiert mit Ziegen-Antimaus-Ig in Tris-HCl-Puffer

- 5 min Spülen in PBS + 0,05% Tween 20

Die Anfärbung erfolgte mit Diaminobenzidin. Nach Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

### **3.4.4 Genexpressionsanalyse**

Die Genexpressionsanalyse von Uterus- und Transplantatgewebe wurde freundlicherweise in der Target Biology Unit von Solvay Pharmaceuticals (Weesp, NL) durchgeführt. Dies fand in folgenden Schritten statt:

#### **RNA-Isolierung**

Uterus- und Transplantatgewebe wurde in TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) überführt und homogenisiert (TissueLyser MM300, Qiagen, Hilden). Die RNA wurde mittels Zentrifugieren mit TRIzol und Chloroform in die wässrige Phase extrahiert. Anschließend wurde die RNA mit 70%igem Ethylalkohol präzipitiert und über RNeasy-Säulen (Qiagen) mit entsprechenden Wasch- und Reinigungsschritten aufgereinigt, gefolgt von einer DNase-Behandlung. Die eluierten RNA-Proben wurden in RNasecure (Ambion, Huntingdon, UK) konserviert.

#### **cDNA-Synthese**

2 µg der Gesamt-RNA wurden für die cDNA-Synthese benutzt und revers transkribiert mit Superscript II Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe). Die fertigen cDNA-Proben wurden auf ein Endvolumen von 400µl mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

Je 5µl der einzelnen cDNA-Proben wurden mittels qRT-PCR quantitativ analysiert. Die Darstellung und Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen, mit den Detektionssystemen ABIPrism 7000 oder 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die qPCR-Bedingungen waren für alle Gene gleich. Für die Amplifikation wurde ein zweistufiges Programm (40 Zyklen mit 15 sec. bei 95°C und 1 min bei 60°C) mit anschließender Schmelzkurve eingesetzt. Die Polymerase war AmpliTaq Gold bei 3mM Mg<sup>++</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Die absoluten Daten der Expressionslevel wurden über eine Standardkurve quantifiziert und über das Hauskeeping-Gen normalisiert.

**Tabelle 4: Liste der Gene und der verwendeten Primer**

F = forward, R = reverse Primer

Gensymbol	Offizieller Name des Gens (EntrezGene)	Accession Nr.	Primer-positionen
<b>Housekeeping-Gen:</b>			
<u>PPIA</u>	peptidylprolyl isomerase A	NM_017101	52F-117R
<b>Steroidrezeptoren / Steroidmetabolismus:</b>			
<u>CYP19A1</u>	cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1 (Aromatase)	NM_017085	1135F-1225R
<u>ESR1</u>	estrogen receptor 1 (ER alpha)	NM_012689	756F-846R
<u>ESR2</u>	estrogen receptor 2 (ER beta)	NM_012754	681F-771R
<u>HSD17B1</u>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1	NM_012851	498F-588R
<u>HSD17B2</u>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	X91234	899F-989R
<u>PGR</u>	progesterone receptor	NM_022847	2454F-2546R
<u>STS</u>	steroid sulfatase	NM_012661	1781F-1873R
<u>AR</u>	androgen receptor	NM_012502	2002F-2093R
<b>Bei Ratte und Mensch in Läsionen regulierte Gene :</b>			
<u>CD44</u>	CD44 antigen	NM_012924	2402F-2526R
<u>CTHRC1</u>	collagen triple helix repeat containing 1	NM_172333	734F-824R
<u>IDI1</u>	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	NM_053539	178F-269R
<u>LDLR</u>	low density lipoprotein receptor	X13722	2290F-2380R
<u>LGALS3</u>	lectin, galactose binding, soluble 3	NM_031832	792F-891R
<u>PTGDS2</u> *	prostaglandin D2 synthase 2	NM_031644	596F-686R
<u>STAR</u>	steroidogenic acute regulatory protein	NM_031558	3014F-3104R
<u>VCAM1</u>	vascular cell adhesion molecule 1	NM_012889	179F-284R
<b>Weitere potentielle Endometriosemarker im Rattenmodell</b>			
<u>C4BPA</u>	complement component 4 binding protein, alpha	NM_012516	872F-968R

**Tabelle 4 (Fortsetzung):**

Gensymbol	Offizieller Name des Gens (EntrezGene)	Accession Nr.	Primerpositionen
<u>FABP4</u>	fatty acid binding protein 4, adipocyte	NM_053365	322F-412R
<u>GABARAP</u>	gamma-aminobutyric acid receptor associated protein	AF161588	81F-177R
<u>TAC2</u> *	tachykinin 2	NM_019162	503F-600R
<u>GJA1</u>	gap junction membrane channel protein alpha 1 (connexin 43)	NM_012567	1019F-1104R
<u>GJB2</u>	gap junction membrane channel protein beta 2 (connexin 26)	X51615	333F-418R
<u>FST</u>	follistatin	NM_012561	624F-716R
<u>MMP12</u>	matrix metalloproteinase 12	NM_053963	1237F-1315R

\* humanes Homolog für TAC2 der Ratte ist TAC3 und Homolog für PTGDS2 der Ratte ist PGDS

### 3.4.5 Datenanalyse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Bei den Transplantaten geht der Mittelwert der 6 Transplantate pro Tier in die Berechnungen ein.

Die statistische Auswertung der Studien 1A, 1B und 2 beruht auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) mit den Faktoren Stamm und Behandlung. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten wurde mit dem Bonferroni-Test überprüft. Für den Vergleich der Behandlungs- oder Kontrollgruppen zwischen den Stämmen und für die Studie 3 wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse und der Tukey-Posttest verwendet.

Die Anpassung der Enzymimmunoassay-Standardkurven und die Berechnung der Konzentrationen der unbekanntenen Proben erfolgten über die Funktion "sigmoidal dose-response"-Funktion mit GraphPad Prism.



## 4. ERGEBNISSE

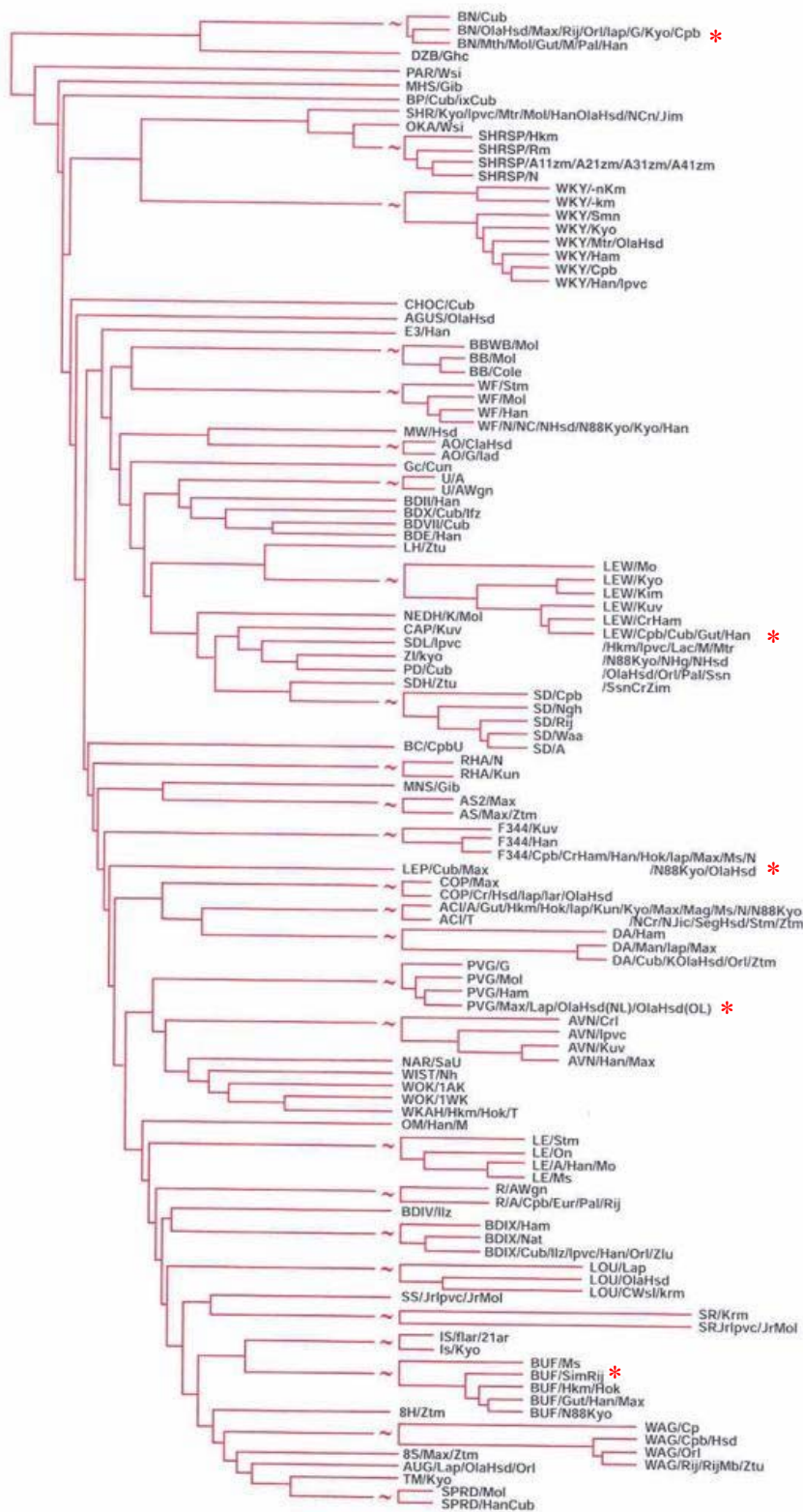
### 4.1 Studie 1A + 1B: Endometriale Autotransplantation in 5 verschiedenen Ratteninzuchtstämmen und Wirkung der chronisch hohen Dosierung von Cetrorelixacetat

In den Studien 1A und 1B sollte überprüft werden, ob es einen Inzuchtrattenstamm gibt, der gegenüber der induzierten Endometriose und in seiner Reaktion auf die Behandlung mit dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix besonders empfindlich ist. Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich die Variabilität durch die Zyklussynchronisation reduzieren lässt.

5 Inzuchtrattenstämme wurden ausgewählt, die eine möglichst geringe Verwandtschaft untereinander aufweisen und deren Hormonstoffwechsel und Reproduktionsorgane durch die Inzucht möglichst wenig beeinträchtigt ist. Das Vorhandensein ausführlicher Daten über die anatomischen, physiologischen und pharmakologisch-toxikologischen Besonderheiten der Tiere war ein ebenso wichtiges Kriterium für die Auswahl. Zum Einsatz kamen die Rattenstämme PVG (PVG OlaHsd), F344 (Fisher344 NHsd), LEW (Lewis HanHsd), BUF (Buffalo SimRijHsd), BN (Brown Norway RijHsd). Die taxonomische Verwandtschaft dieser Stämme ist in Abb. 1 dargestellt. Die Studie wurde aus Kapazitätsgründen in zwei Serien mit jeweils 50 Tieren nach dem gleichen Versuchsplan (Tab.5) durchgeführt

**Tabelle 5: Studienplan 1A und 1B**

Gruppe	Stamm	d0	d14-35 (Montag-Freitag)	d36
A	PVG	Auto-transplantation	Vehikel (5% Mannitol)	Autopsie
B	PVG		50µg Cetrorelix	
C	F344		Vehikel (5% Mannitol)	
D	F344		50µg Cetrorelix	
E	LEW		Vehikel (5% Mannitol)	
F	LEW		50µg Cetrorelix	
G	BUF		Vehikel (5% Mannitol)	
H	BUF		50µg Cetrorelix	
I	BN		Vehikel (5% Mannitol)	
K	BN		50µg Cetrorelix	



**Abbildung 1: Stammbaum der als Labortiere eingesetzten Ratteninzuchtstämme**

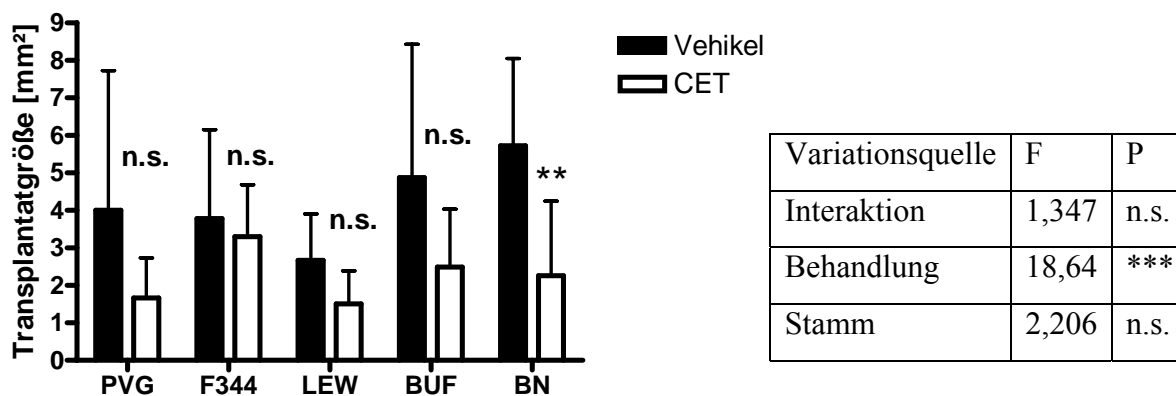
Nach: Krinke (2000): The Laboratory Rat ; \* = für die Studien eingesetzte Stämme

In beiden Serien wurden die Tiere vor der Autotransplantation und vor der Sektion synchronisiert. Nach 2 Wochen Rekonvaleszenz begann die Behandlung. Von den 10 Tieren eines Stammes wurden 5 Tiere täglich mit 50 µg Cetrorelixacetat in 5%igem Mannitol über 3 Wochen, außer am Wochenende, behandelt. Die anderen 5 Tiere erhielten 0,2 ml Vehikel (5% Mannitol) pro Tag.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden zunächst die Gruppenmittelwerte und die dazugehörigen Variationskoeffizienten pro Studie errechnet. Da sich die Variationskoeffizienten nicht signifikant unterschieden, wurden die Daten beider Studien zusammen ausgewertet. Rohdaten, Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt. Im Folgenden sind die Gesamtergebnisse der Studien dargestellt.

#### 4.1.1 Transplantatgrößen und Transplantatgewichte, Wiederfindungsrate der Transplantate

Der Einfluß der Behandlung auf Transplantatgröße und -gewicht war statistisch hochsignifikant. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Inzuchtstämmen waren nicht signifikant.

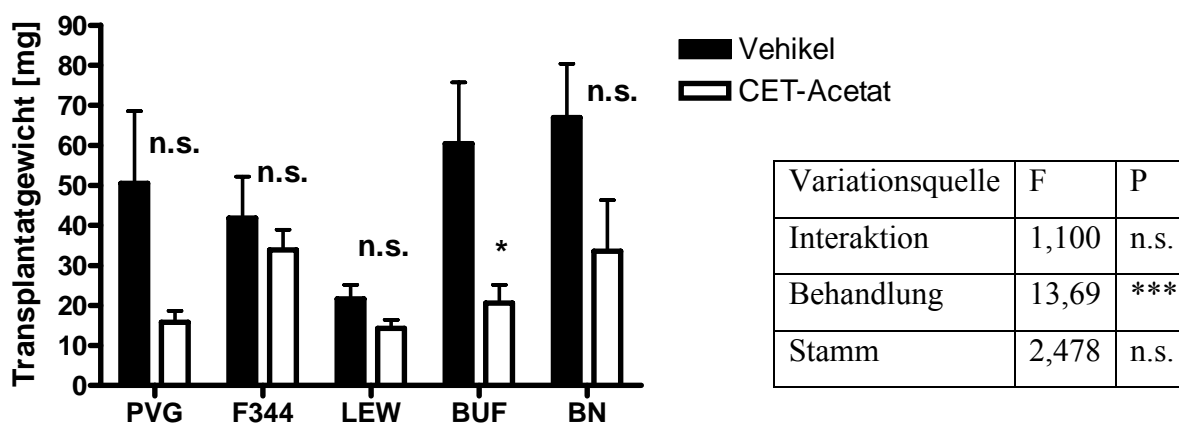


**Abbildung 2: Transplantatgröße nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET)**

n = 8-10; Mittelwert ± SD; Signifikanz der Differenz zur jeweiligen Kontrollgruppe: \*\* = p < 0,01, n.s.= nicht signifikant

Durch die Behandlung mit Cetrorelix verkleinerten sich die Transplantate sowohl in der Größe (Querschnittsfläche) als auch im Gewicht. Die größten Transplantate entwickelten die BN-Ratten, die kleinsten wurden bei den LEW-Ratten gefunden. Die Transplantatgröße war bei den behandelten BN-Ratten über 60% kleiner als in der Kontrollgruppe. Die geringste Reaktion zeigten die F344-Ratten mit einer Verkleinerung der Transplantatflächen um 12,7% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die stärkste Abnahme des Transplantatgewichtes um 68,7% fand sich bei den PVG-Ratten, am schwächsten reagierte der Stamm F344 mit 18,9%. Der Unterschied zur Vehikelgruppe war nur bei den BUF-Ratten statistisch signifikant.



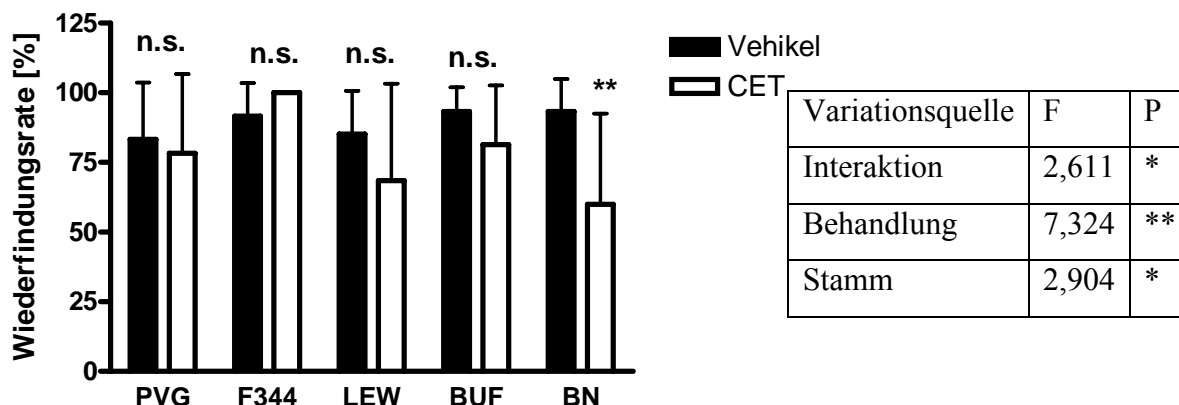
**Abbildung 3: Transplantatgewicht nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET)**

n = 8-10; Mittelwert ± SD; Signifikanz der Differenz zur jeweiligen Kontrollgruppe: \* =  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant

Als Wiederfindungsrate wird der prozentuelle Anteil der persistierenden Transplantate an der Gesamtzahl der ursprünglich transplantierten Uterusfragmente pro Tier angegeben. Die 2-faktorielle Varianzanalyse zeigte, daß der Einfluß der Behandlung auf die Wiederfindungsrate statistisch hochsignifikant war. Auch der Einfluß des Stammes auf die Wiederfindungsrate sowie die Interaktion zwischen Stamm und Behandlung war signifikant.

Bei den Stämmen BUF und BN wurden in den Kontrollgruppen im Durchschnitt 93,3% der Transplantate wieder gefunden. Bei den anderen Stämmen lag der Durchschnitt geringfügig niedriger. Bei den mit Cetrorelix behandelten Tieren der Stämme PVG, LEW, BUF und BN

persistierten weniger Transplantate als in den jeweiligen Kontrollgruppen. Bei den F344-Ratten blieben alle Transplantate bis zum Ende des Experiments erhalten.



**Abbildung 4: Wiederfindungsrate nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat (CET)**

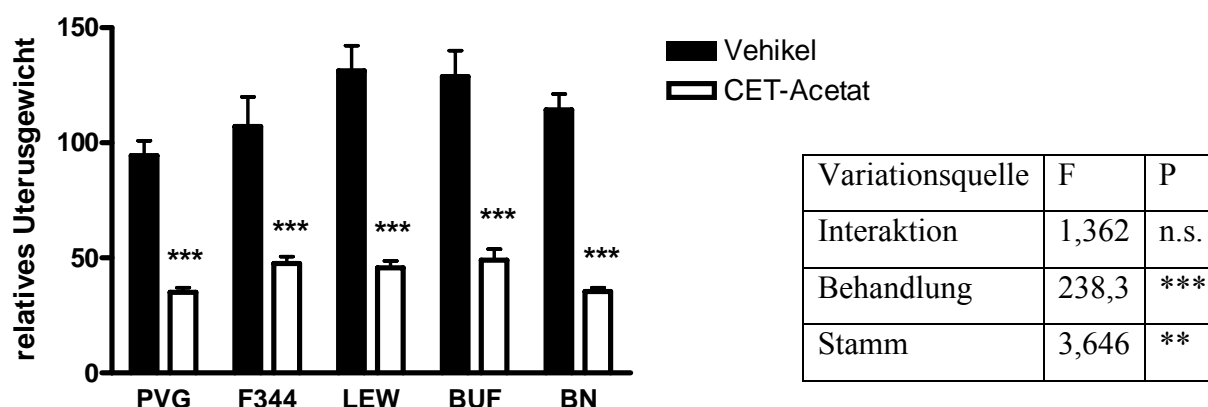
n = 8-10; Mittelwert ± SD; Signifikanz der Differenz zur jeweiligen Kontrollgruppe:  $p < 0,01$ , n.s. = nicht signifikant

#### 4.1.2 Organgewichte

Das relative Uterusgewicht wurde sowohl durch die Behandlung als auch durch die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Stamm statistisch signifikant beeinflusst.

Die Gewichte estrogenresponsiver Organe geben Aufschluss über die systemischen Effekte der Behandlung. Entnommen wurden Uterus, Ovarien und Nebennieren, deren Gewicht sofort nach der Entnahme bestimmt wurde. Die Blockade der GnRH-Wirkung bewirkte eine statistisch hoch signifikante Abnahme des Uterusgewichtes im Vergleich mit den Vehikelgruppen bei allen Stämmen. Die Uteri der Stämme PVG und BN waren im Vergleich zu den F344 und BUF in der Cetrorelixgruppe signifikant leichter. Die Ovarien wogen auch bei allen Stämmen weniger, hoch signifikant waren die Unterschiede zur Vehikelgruppe bei den Stämmen PVG, LEW und BN. Stammesunterschiede zeigten sich in der Cetrorelixgruppe, BUF und BN Tiere hatten signifikant leichtere Ovarien als F344 Tiere. Die Reaktion der Nebennieren war ungleich. Eine Zunahme des Gewichtes konnte bei den Stämmen F344 und BN

beobachtet werden, BUF-Ratten zeigten in der Studie 1A eine Zunahme in der Studie 1B eine Abnahme des Nebennierengewichtes. Bei den PVG- und LEW-Ratten wurde eine Abnahme festgestellt. Sehr auffällige Abweichungen zeigten sich in der Vehikelgruppe zwischen den Stämmen. PVG Ratten hatten hochsignifikant schwerere Nebennieren als alle anderen Stämme, gefolgt vom BN Stamm. F344 und LEW Tiere lagen im mittleren Bereich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die leichtesten Nebennieren hatten die BUF Ratten. Auch hier war die Differenz zu allen anderen Stämmen hochsignifikant.



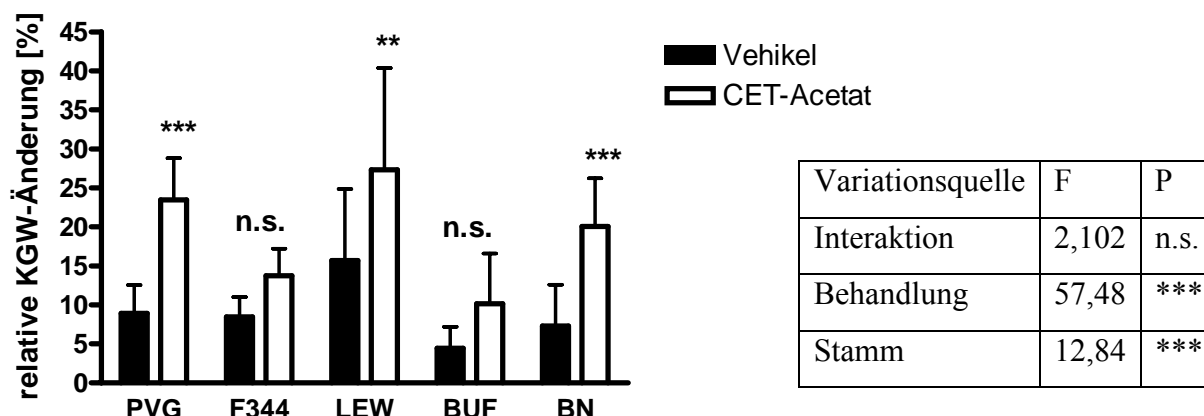
**Abbildung 5: Relatives Uterusgewicht nach Behandlung mit 50µg/Tier/d Cetrorelix-acetat (CET)**

n = 8-10; Mittelwert ± SD; Signifikanz der Differenz zur jeweiligen Kontrollgruppe: \*\*\* = p < 0,001

#### 4.1.3 Körpergewicht

Der Einfluß der Behandlung auf die relative Körpergewichtsänderung und die Unterschiede zwischen den Stämmen waren hoch signifikant.

Bei allen Stämmen wogen die mit Cetrorelix behandelten Tiere am Ende der Studie im Durchschnitt mehr als die Kontroll-Tiere. Die relative Körpergewichtsveränderung zeigte bei den Stämmen PVG und BN mit p<0,001 und bei den LEW-Ratten mit p<0,01 statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungs- und Kontrollgruppen.



**Abbildung 6: relative Körpergewichtsveränderung zwischen Beginn und Ende der Behandlung mit Cetrorelixacetat (CET)**

n = 9-10; Mittelwert  $\pm$  SD; Signifikanz der Differenz zur jeweiligen Kontrollgruppe: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; n.s. = nicht signifikant

#### 4.1.4 Histologie

Zur Auswertung kamen Transplantat- und Uterusquerschnitte von 43 Tieren. Untersucht wurden die Morphologie beider Gewebe, die Verteilung und die Intensität der Estrogen- und Progesteronrezeptorfärbung. Weiterhin war eine Abhängigkeit der Rezeptordichte vom Zyklusstadium, vom Stamm und von der Behandlung von Interesse.

##### 4.1.4.1 Morphologie

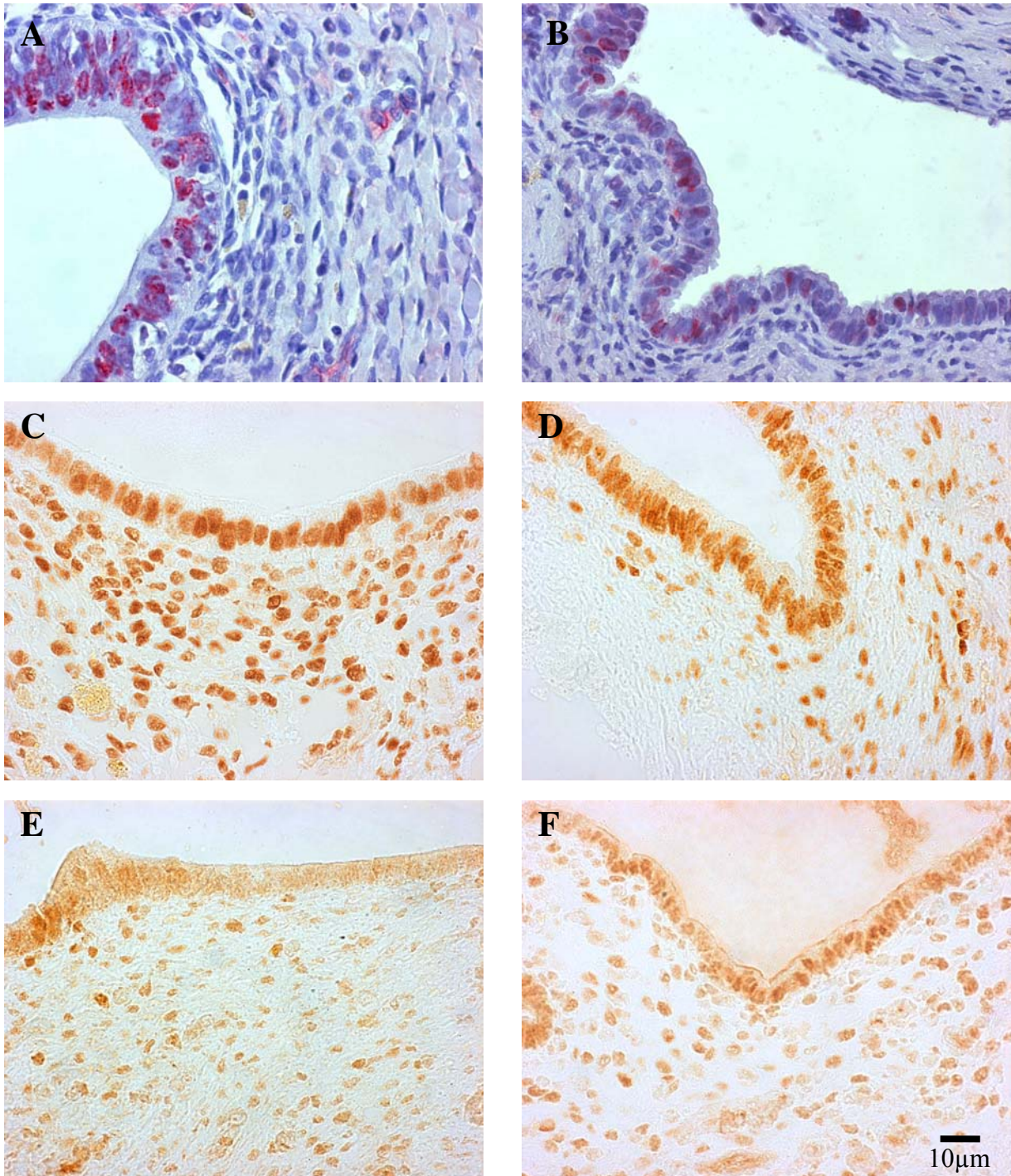
Die Morphologie der einzelnen Transplantate war bezüglich des jeweiligen Anteils an Stroma- und Drüsengewebe sehr unterschiedlich. In 27 der 43 ausgewerteten histologischen Schnitte fanden sich zystenförmige Gebilde, die durch die sekretorische Aktivität der endometrialen Drüsenzellen entstehen. Die Drüsenzellen waren von Stroma und meist auch von Myometrium umgeben. In allen anderen Transplantatquerschnitten war nur endometriales Stroma zu erkennen. Bei den Lewis-Ratten konnten gar keine zystenartigen Gebilde gefunden werden. Bei den anderen Stämmen waren im Durchschnitt 60% der Transplantate zystenartig

ausgebildet. In den Uterusquerschnitten waren, entsprechend dem jeweiligen Zyklusstadium der Tiere, die Drüsenepithelien unterschiedlich stark entwickelt.

#### **4.1.4.2 Proliferationsrate (Ki67)**

Ki67 ist ein nukleäres Antigen, dessen Expression eng an die Zellproliferation gebunden ist. Die immunhistochemische Darstellung dieses Antigens ermöglicht die Zählung sich teilender Zellen (Abb.7). Bei der Auswertung wurde das Verhältnis der Ki67 positiven Drüsenzellen zu allen in einem Schnitt befindlichen Drüsenzellen, sowohl in den Uteri als auch in den Transplantaten, bestimmt. In den Transplantaten konnten vereinzelt Ki67 positive Zellen nachgewiesen werden. In den Uterusgewebeschnitten konnten bei jedem Stamm Ki67 positive Zellen detektiert werden, außer in der mit Cetrorelix behandelten Gruppe des BN-Stammes. Statistisch waren jedoch aufgrund einer sehr heterogenen Verteilung, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen oder den Behandlungsgruppen darstellbar (Abb. 8).

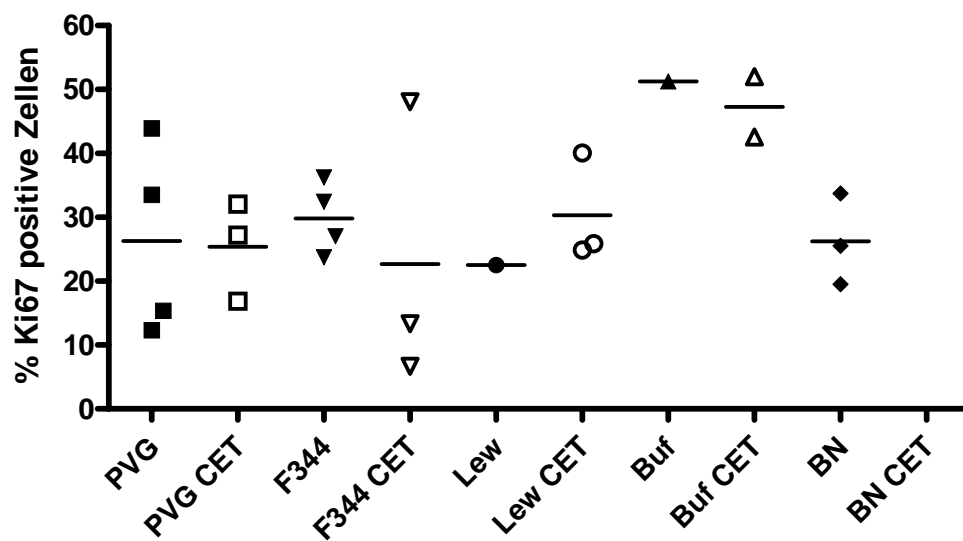




**Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung von Ki67 (A, B), Estrogenrezeptoren (C, D) und Progesteronrezeptoren (E, F)**

repräsentativ ausgewählte 5 µm Paraffinschnitte; links: Uterus; rechts: Transplantat.

Ki67: rote spezifische Kernfärbung, blaue allgemeine Kernfärbung; ER, PR: braune Kernfärbung.



**Abbildung 8: individuelle und mittlere Proliferationsraten der endometrialen Drüsenzellen**

#### 4.1.4.3 Estrogenrezeptor und Progesteronrezeptor

Die Verteilung der Estrogenrezeptor positiven Zellen war im Uterus und im Transplantat in etwa gleich. Grundsätzlich waren Drüsenepithelzellen stärker (intensiver) angefärbt als Stromazellen (Abb. 7). Bei den PVG Ratten waren die Stromazellen ähnlich stark angefärbt, wie die Drüsenzellen. Die Anzahl der ER positiven Stromazellen und die Intensität der Färbung variierten von Tier zu Tier.

Die Verteilung der Progesteronrezeptoren (Abb. 7) zeigte ein behandlungsabhängiges Muster. Sowohl in den Uterus-, als auch in den Transplantatquerschnitten der Kontrollgruppen fand man die Progesteronrezeptor positiven Zellen vor allem im Bereich des Stomas, bei den Cetorelix behandelten Tieren waren die Drüsenepithelzellen sehr viel stärker angefärbt als die Stromazellen. Eine zyklusabhängige Variation kann ausgeschlossen werden, weil fast alle Tiere im Estrus waren. Hinweise auf Stammesunterschiede konnten nicht gefunden werden.

### 4.1.5 Vaginalzytologie

Die Dokumentation der Vaginalzytologie gibt Aufschluss über Regelmäßigkeit und Länge der Ovarialzyklen. Die Vaginalabstriche erfolgten ebenso wie die s.c. Injektionen nur an Werktagen.

Die mit Cetrorelix behandelten Tiere zeigten einen regelmäßigen jedoch verlängerten Zyklus, wobei der Estrus immer am Dienstag auftrat. Montags und freitags befanden sich bis auf Tier 6 am Tag 6 und Tier 4 am Tag 10 alle Tiere im Metestrus oder im Diestrus. Mit Cetrorelix behandelte BN-Ratten hatten insgesamt 49 Met- bzw. Diestrustage, und somit die geringste Estradiolexposition. Dies korreliert mit der geringen Größe der Transplantate.

Vehikel		Tag 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
PVG 1	2	2	2				2	2	2	2	2			2	2	2	2	2			2	2	2
3	-	1/2	2				-/-	2	-	-	1/2			-	1/2	2	2	2	-		2	2	2
5	2	2	2				2	2	2	2	2			2	2	2	2	2			2	2	2
7	2	2	-				1/2	2	1/2	2	2			2	2/-	-	1/2	2			2	2	2
9	-	1	1/2				-	1	2	2	2			2/-	2	2	2	2			2	2	2
F3441	-	-	-				-	-	2	-	-/-			-	-	-	1	-			-	2/-	2/-
13	-	-	1/2				1/2	1/2	2	-	-			2/-	1/2	1/2	2	2			2	2	2
15	-	-	1				-	2	2	-	-			2	-	1/2	2	-			2	2/-	1/2
17	-	-	1				2	1/2	2	-	-			2	1/2	2/-	2	-			2	2	2/-
19	-	-	-				2/-	-	1/2	2	2			2	-	-	-	1/2			-	1/2	2
Lew 21	1	1/2	1/2				1	1	1/2	2	2			-	2	2/-	-	-/-			2	2	2
23	2	1/2	1/2				1	1/2	2	2	2			2	2	2	2	2			2	2	2
27	1/2	1/2	1/2				2	2	2	2	2			1	2	2	2/-	-			2	2	2
29	2	2	2				1	1	2	2	2			2	2	2	2/-	2/-			2	2	2
Buf 31	2	2/-	2/-				2	-	1/2	2	-			-	1/2	2	2/-	2/-			2/-	1/2	2
33	-	1	2				-	2	2	-	-			-	-	-	-	2/-			-	2	2/-
35	-	1	-				-	-	-	-	-			-	2	2	-	-			-	-	1/2
37	2	2	1/2				1	1/2	1/2	-	-			1	1	1/2	-	-			1	1	1/2
39	2/-	2	2				-	2	2	2	2/-			-	-	1/2	-	2			2/-	2	2
BN 41	2	2	2				2	2	2	2	2			1	-	1/2	2	2			2/-	2	2
43	1/2	2	2				2	-	2	2	1/2			2	2	2	2	2			1/2	2	2
45	1/2	1/2	1/2				1	-	1	1	2			2	1/2	1/2	1/2	2/-			2	2	2
47	2	1/2	1/2				2	-	1	-	1			2/-	1/2	1/2	1/2	2			2	2	2
49	1	2/-	2				1	2	2	2	-			1/2	2	2	2	2/-	2		2	2	2/-

1 proestrus, 2 estrus, - metestrus, --diestrus

50µg Cetrorelix		Tag 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
PVG 2	2	2	2/-				--	2	2	-	-			-	1/2	2	2/-	2/-			-	-	-
4	2	2	2				-	2	2	1/2	1/2			-	2	2	2	2/-			-	-	1/2
6	2	2	2/-				1	2	2	2	2			-	2	2	2	-			-	-	1/2
8	-	-	-				-	2	2	-	-			-	2	2	2/-	-			-	-	1/2
10	-	1	1				--	2	2	-	-			-	2	2	-	-			--	1/2	2
F3441	1/2	-	-				-	1/2	2	-	-			-	1	2	2/-	2/-			-	1/2	2
14	-	-	-/-				-	1/2	2	-	-			-	2	2	-	-			-	1	2
16	-	1/2	1/2				-	2	2	-	-			-	2	2	2/-	-			-	-	1/2
18	2/-	-	1				-	2	2	-	-			-	2	2	-	-			-	-	1/2
20	2	2/-	-				-	-/-	1	-	-			-	1/2	2	-	-			-	-	1/2
Lew 22	1	2	-				-	2	2	-	-/-			-	1/2	2	-	-			-	2	2
24	1/2	1/2	-				-	1/2	2	-	-			-	2	2	2/-	-			-/-	--	1/2
26	1/2	2	2				-	2	2	2	2/-			-	2	2	2/-	-			-	1/2	2
28	2	1/2	2/-				-/-	2	2	-	-			-	2	2	2	-			-	1/2	2
30	2	2	-				-/-	2	2/-	--	-			-/-	2	2	2/-	-			-	1/2	2
Buf 34	-	2	2/-				-	1/2	2	-	-			-	1/2	2	-	-			-	--	1/2
36	2/-	-	-				-	-	-	-	-			-	-	1	1/2	-			-	1/2	1/2
38	-	2	2				-	1/2	2	2/-	-			-	-	2	-	-			-	1/2	2/-
40	-	1/2	2				-	1/2	2	2	2/-			-	1	2	-	-			-	1/2	2
BN 42	1/2	2	2/-				-	1	2/-	-	-			-	1	1/2	-	-			-	-	1/2
44	1/2	1/2	1/2				-	1/2	2	-	-			-	1/2	2	2/-	-			-	-	2
46	-	1/2	-				-/-	-/-	1/2	-	-			-	-	1	1/2	-			-	-	1
48	1	2	2/-				-	-	-	-	-			-	-	1/2	-	-			-	-	1/2
50	1/2	1/2	-				-	-	-	-	-			-	-	2	-	-			-	--	1/2

Abbildung 9: Zyklusverlauf während der Behandlungsphase mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat; Studie 1A

1=Proestrus; 2=Estrus; -=Metestrus; --=Diestrus

#### 4.1.6 Hormonspiegel

Die Bestimmung erfolgte nur in Plasmaproben der Studie 1B.

##### 4.1.6.1 Estradiol

Die Estradiolkonzentration im Plasma lag bei allen Cetorelix-behandelten Tieren unter der Nachweisgrenze des Enzymimmunoassays von 7 pg/ml. Die Kontrolltiere wiesen je nach Zyklusstadium unterschiedliche Werte oberhalb der Nachweisgrenze auf. Die Stämme unterschieden sich nicht signifikant.

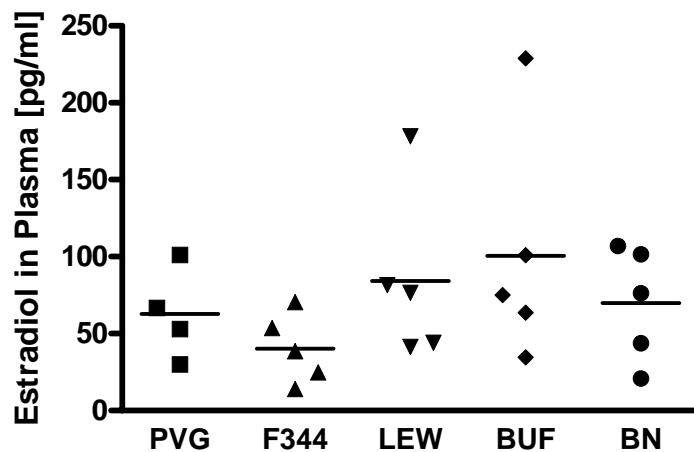
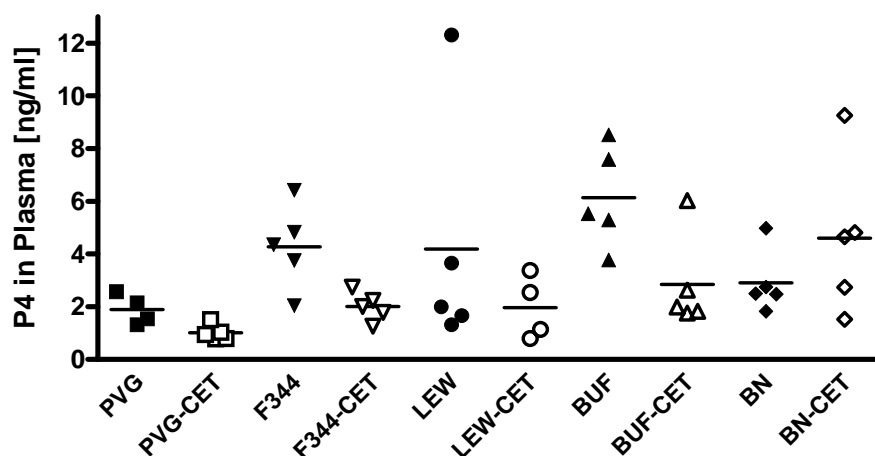


Abbildung 10: Individuelle und mittlere Estradiolkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere

##### 4.1.6.2 Progesteron

Bei den Cetorelix-behandelten Tieren der Stämme PVG, F344, LEW und BUF wurde eine erniedrigte Progesteronkonzentration gegenüber den Kontrollgruppen des jeweiligen Stammes gemessen. Im Gegensatz dazu wiesen die Cetorelix-behandelten BN-Ratten höhere Progesteronwerte auf als die Kontrollgruppe.



**Abbildung 11: Individuelle und mittlere Progesteronkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere und der mit Cetroreloxacetat (CET) behandelten Tiere**

#### 4.2 Studie 2: Endometriale Autotransplantation in 2 Inzucht- und einem Auszuchtstamm und Wirkung von chronisch niedrig dosiertem Cetrorelixpamoat

Auf den Erkenntnissen der vorangegangenen Studien beruhend wurden in dieser Studie nur noch Inzuchtstämme eingesetzt. Ausschlaggebend war die Differenz der Transplantatgrößen und Transplantatgewichte zwischen den behandelten und Kontrollgruppen eines Stammes. Der Stamm BN zeigte die größten Unterschiede, die F344-Ratten die kleinsten. Um zu überprüfen, ob die Variabilität in den Inzuchtstämmen in diesem Modell wirklich geringer ist, wurde als Vergleich der Auszuchtstamm SPRD mit dazu genommen.

Cetrorelixpamoat ist eine Depotformulierung. Die einmalige Applikation von 0,625 mg/kg (Horvath et al. 2004) erfolgte intramuskulär. Aus logistischen Gründen wurde die Studie in zwei Teilen durchgeführt. Aus jeweils 20 Tieren eines Stammes wurden die 10 schwersten Tiere der Gruppe I zugeordnet. Von diesen Tieren wurden 5 ausgewählt und mit Cetrorelixpamoat gelöst in Wasser für Injektionszwecke behandelt. Die anderen 5 Tiere bekamen Wasser für Injektionszwecke i.m. als Kontrolle. Die 10 leichteren Tiere kamen in die Gruppe II, diese wurde eine Woche später genauso behandelt wie die Gruppe I.

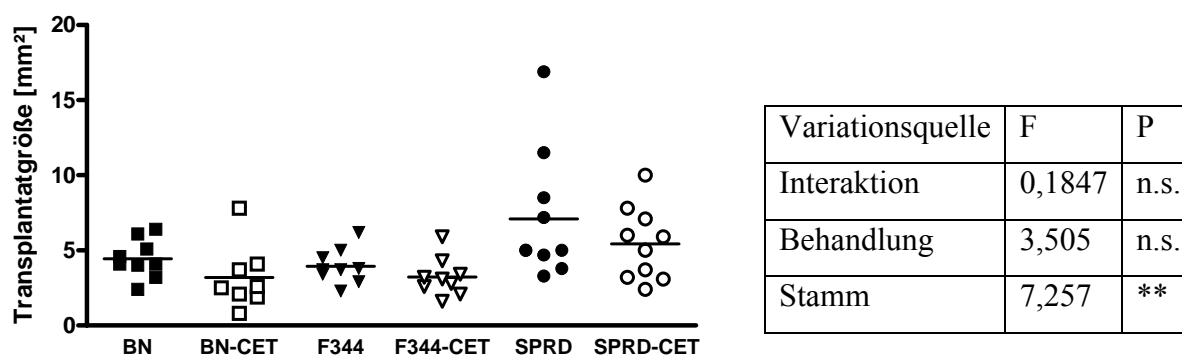
Bei beiden Gruppen wurde ab Tag 2 nach der Autotransplantation zweimal wöchentlich Blut aus der Vena saphena lateralis entnommen, um die Serumkonzentrationen von Estradiol und Progesteron zu überprüfen.

Rohdaten, Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt. Im Folgenden sind die Gesamtergebnisse der Studie dargestellt.

#### 4.2.1 Transplantatgrößen und Transplantatgewichte, Wiederfindungsrate der Transplantate

Die Transplantate der Cetorelix-behandelten Tiere waren kleiner und leichter im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die größten Transplantate entwickelten die SPRD-Ratten. Auch die Differenz zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe war bei diesem Stamm am größten. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Die SPRD-Ratten zeigten als Auszuchtstamm, die höchste Variabilität.

Im Vergleich mit der Studie 1 entwickelten die BN-Ratten der Kontrollgruppe um mehr als 20% kleinere Transplantate. Bei dem Stamm F344 war die Transplantatgröße ähnlich wie in Studie 1.

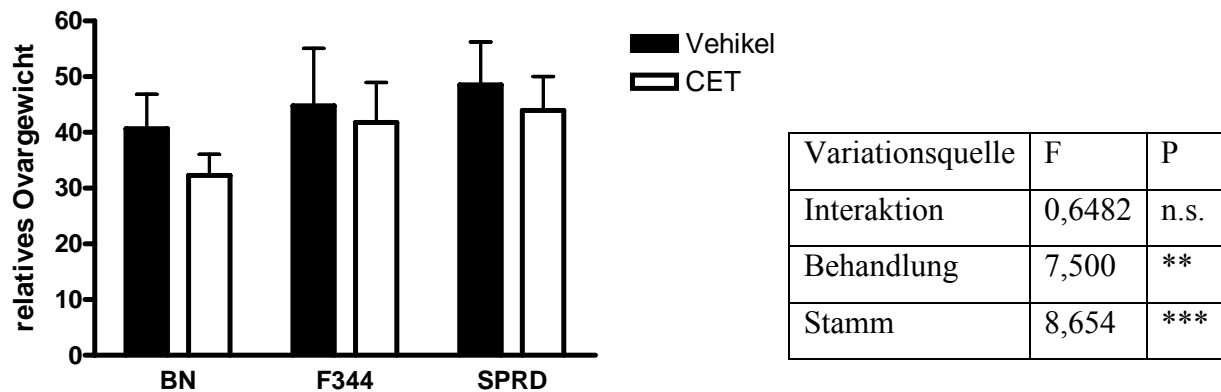


**Abbildung 12: Individuelle und mittlere Transplantatgrößen der Kontrolltiere und der mit Cetorelixpamoat behandelten Tiere**

n = 8-10

#### 4.2.2 Organgewichte

Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Uterus- und das Nebennierengewicht. Die Ovarien der behandelten BN-Ratten waren über 20% leichter als bei den Kontrolltieren. Die Stämme F344 und SPRD zeigten nur geringere Unterschiede.



**Abbildung 13: Relatives Ovargewicht nach der Behandlung mit Cetrorelixpamoat (CET) bei Ratten der Inzuchtstämme BN, F344 und SPRD**

n = 8-10; Mittelwert ± SD

#### 4.2.3 Körpergewicht

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe.

#### 4.2.4 Vaginalzytologie

Drei Tage nach Cetrorelixapplikation befanden sich mehr als 96% der Tiere im Metestrus oder Diestrus. Danach wurden unregelmäßige Zyklen mit verlängerten estrischen und diestrischen Phasen beobachtet.

	20.06.	21.06.	22.06.	23.06.	24.06.	27.06.	28.06.	29.06.	30.06.	01.07.	04.07.	05-07.	06.07.	07.07.	08.07.	11.07.	12.07.	13.07.	14.07.	15.07.	18.07.	19.07.
Vehikel																						
BN 1	3	1	2	-	-																	
5	2/-	1/2	2/-	2	2																	
7	1	2	-	1	1/2																	
9	2/-	1/2	2/-	1	2																	
F3441	2	2	-	1/2	2																	
13	-	1	2	2/-	2/-																	
15	-	1/2	2	2/-	-																	
17	1	2/-	-	2	2/-																	
19	2/-	2	2/-	-	-																	
SD 21	1/2	-	1/2	2	2/-																	
23	1	-	1/2	2	2/-																	
25	2	2	-	1	2																	
29	1	2	2/-	-	1/2																	
BN 31																						
33																						
35																						
37																						
39																						
F34441																						
43																						
45																						
49																						
SD 51																						
53																						
55																						
57																						
59																						
61																						
CET-Pamoat Tier-Nr. 2-30																						
BN 2	1	1	1/2	2/-	-																	
4	2/-	-	1/2	2/-	-																	
6	1/2	2	2/-	-	-																	
10	1	1	1/2	-	-																	
F3441	1/2	2/-	-	-	-																	
14	-	1/2	2	2/-	-																	
18	-	2	2/-	-	-																	
20	-	-	2/-	-	-																	
SD 22	-	-	-	-	-																	
24	1/2	2	-	2	2/-																	
26	-	1/2	-	-	-																	
28	1/2	2	2/-	-	-																	
30	1/2	-	-	-	-																	
34																						
36																						
38																						
40																						
F34442																						
44																						
46																						
48																						
50																						
SD 52																						
54																						
56																						
58																						
60																						
CET-Pamoat Tier-Nr. 34-60																						
34																						
36																						
38																						
40																						
F34442																						
44																						
46																						
48																						
50																						
SD 52																						
54																						
56																						
58																						
60																						

Abbildung 14: Zyklusverlauf der Kontrolltiere und der mit Cetrorelixpamoat behandelten Tiere

1=Proestrus; 2=Estrus; -=Metestrus; --=Diestrus

Die Behandlung mit Cetrorelixpamoat erfolgte um eine Woche versetzt, am 20.06.05 für die erste Hälfte, am 28.06.05 für die andere Hälfte der Tiere.

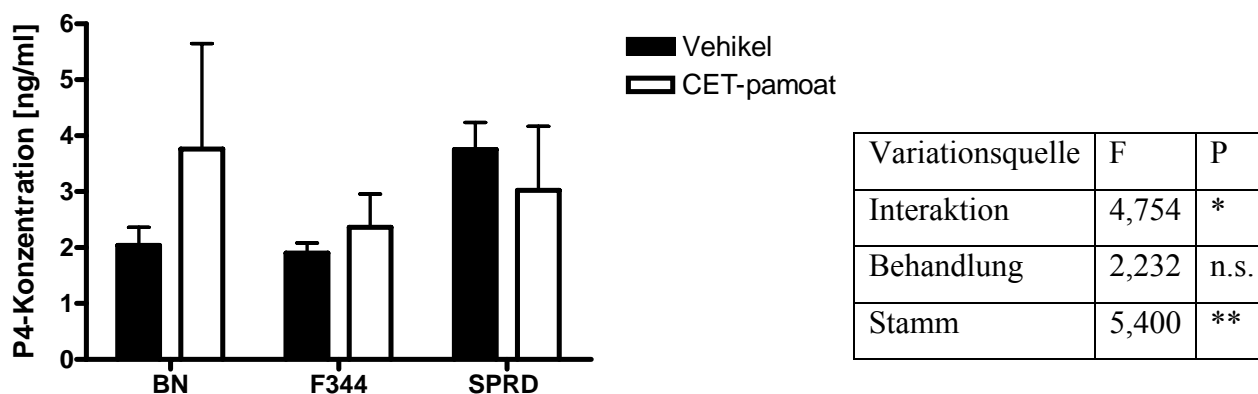
## 4.2.5 Hormonspiegel

### 4.2.5.1 Progesteron

Die Progesteron-Werte wurden am Ende des Experiments bestimmt. Die Kontrollgruppen der Stämme BN und F344 zeigten niedrigere Konzentrationen als die Cetrorelix- behandelten Tiere des jeweiligen Stammes. Bei den SPRD-Ratten war die Progesteronkonzentration in der Behandlungsgruppe niedriger. F344-Tiere zeigen unabhängig von der Behandlung niedrigere



Konzentrationen als die beiden anderen Stämme. Die Stammeszugehörigkeit hat die Höhe der Progesteronkonzentrationen beeinflusst, es gibt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe des jeweiligen Stammes.



**Abbildung 15: Progesteronkonzentrationen im Plasma der Kontrolltiere und der mit Cetorelixpamoat behandelten Tiere**

n = 8-9, Mittelwert  $\pm$  SD

### 4.3 Studie 3: Isogene Transplantation

Die geringe genetische Variabilität zwischen den Individuen eines Inzuchtstammes erlaubt die Transplantation von Geweben eines Donortieres in ein Empfängertier, wodurch in diesem Fall die Entnahme eines Uterushorns entfällt. Damit reduziert sich die Belastung des Tieres durch die Laparotomie. Dies zeigte sich in einer verkürzten Rekonvaleszenz. Die allein durch die ektopische Lokalisation der Transplantate hervorgerufenen Effekte sollten klarer erkennbar sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine Pilotstudie mit jeweils 5 weiblichen Ratten der Inzuchtstämme BN und F344 durchgeführt. Uterusgewebe eines Donortieres aus demselben Stamm wurde nach oben beschriebener Methode transplantiert. Drei BN-Ratten wurden als Kontrolle nicht operiert. Die Zyklussynchronisation erfolgte durch Estradiolapplikation. Fünf Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere seziiert.

Rohdaten, Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt. Im Folgenden sind die Gesamtergebnisse der Studie dargestellt.

### 4.3.1 Transplantatgrößen und Transplantatgewichte, Wiederfindungsrate der Transplantate

Die F344-Ratten entwickelten geringfügig größere und schwerere Transplantate als die BN-Ratten, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die Wiederfindungsrate der Transplantate lag bei 100%.

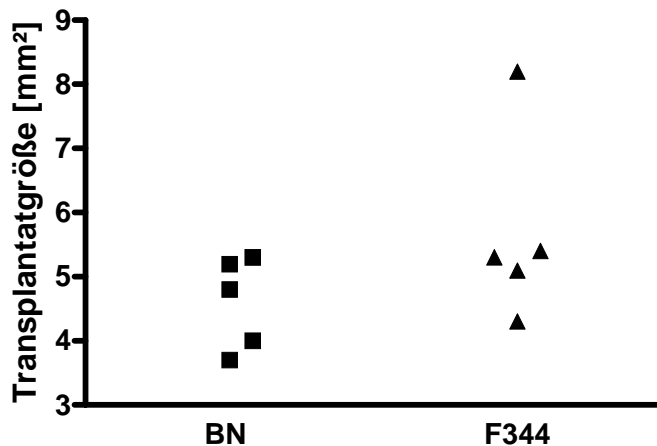


Abbildung 16: Individuelle Werte der Transplantatgröße bei Ratten der Inzuchtstämme BN und F344

### 4.3.2 Organgewichte

Uteri und Nebennieren der operierten BN-Ratten waren geringfügig schwerer, als die der nicht operierten Tiere. Die Ovarien der operierten BN-Ratten wogen durchschnittlich 3g weniger, als die Ovarien der Kontrollgruppe. Im Vergleich der Stämme hatten die F344-Tiere um mehr als 23 % schwerere Ovarien und über 38% leichtere Uteri als die BN-Ratten.

### 4.3.3 Körpergewicht

In der Gewichtszunahme konnte zwischen den operierten und nicht operierten Tieren des Stammes BN kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

#### 4.3.4 mRNA-Expression

Mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse von Uterus- und Transplantatgewebe sollten durch Endometriose ausgelöste Veränderungen der Genexpression bei Mensch und Ratte verglichen werden. Untersucht wurden Gene, die bei der humanen Endometriose als potenzielle Biomarker gelten bzw. die entsprechend den Microarray und qPCR Messungen bei Solvay Pharmaceuticals, in Ratten durch die induzierte Endometriose verändert exprimiert werden (Eiterer et al. 2005).

Verglichen wurde die Expression einer Auswahl von 24 Genen im Uterus und in den Transplantaten von BN Ratten der Studien 1A und den isogen transplantierten Tieren von Studie 3. In der ersten Spalte der Tabelle 6 ist das Verhältnis der Genexpression Transplantat versus Uterus der mit Cetrorelix behandelten Tiere dargestellt. Die zweite Spalte zeigt den Vergleich zwischen Transplantat und Uterus der Kontrollgruppe. Die dritte Spalte beinhaltet das Verhältnis der Genexpression Transplantat versus Uterus bei den operierten, aber nicht behandelten Tiere der Studie 3. In den isogenen Transplantaten wurden 11, in Transplantaten der Vehikelgruppe 12 und in Transplantaten der Cetrorelixgruppe 13 Gene hochreguliert. Eine verminderte Genexpression zeigten 6 Gene in jeder Gruppe. Cetrorelix bewirkte bei 8 Genen eine Verstärkung der Effekte, wobei nur die mindestens anderthalbfachen Veränderungen als relevant angesehen wurden.

In den Abbildungen 17-21 sind die normalisierten Genexpressionslevel für Studie 3 in Einzelnen dargestellt, um die jeweilige Variationsbreite zu verdeutlichen. Tabelle 7 zeigt die jeweiligen Signifikanzlevel.

**Tabelle 6: Verhältnis der normalisierten Genexpressionslevel in Transplantat versus Uterusgewebe vom BN Stamm**

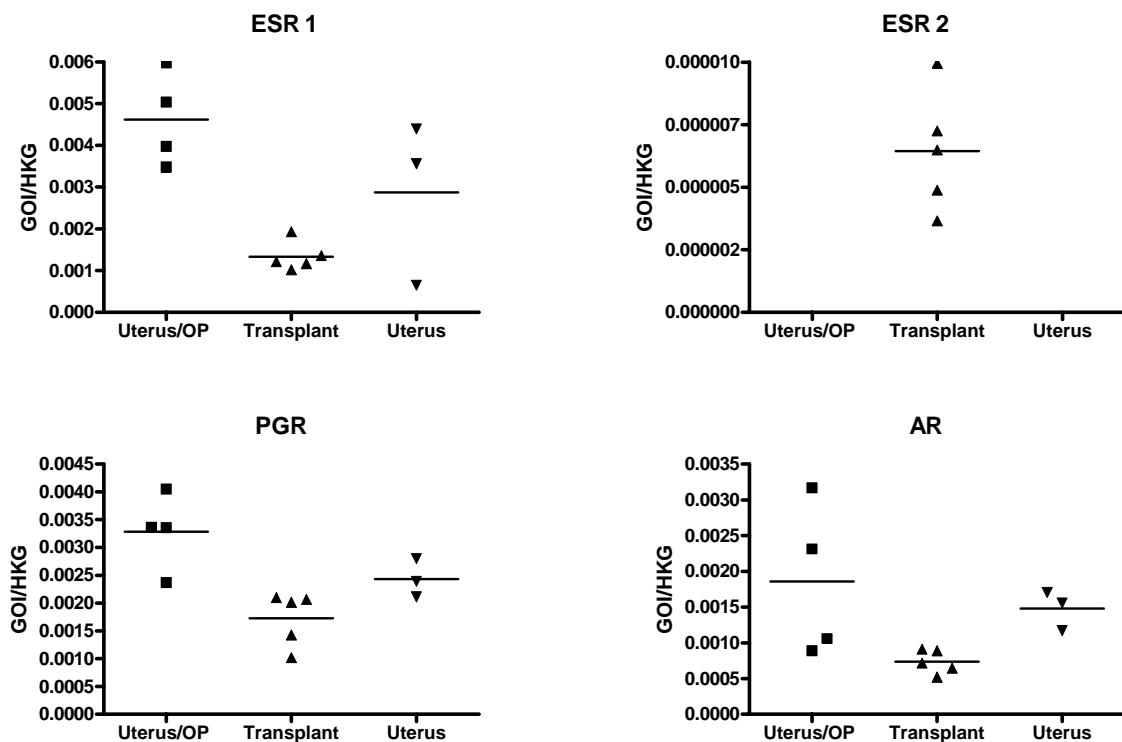
Gensymbol	Studie 1A		Studie 3
	Cetrorelixacetat 50µg/d s.c.	Vehikel	Keine Behand- lung
AR	-2,58	-1,47	-2,53
CYP19A1	*3,71	*1,76	1,18
ESR1	-3,44	-1,7	** -3,45
ESR2	-1,02	1,64	
HSD17B1	-1,44	1,14	1,48
HSD17B2	-1,02	-5,8	-1,35
PGR	*-3,62	-1,42	** -1,9
STS	*1,94	1,37	1,23
GJA1	1,38	1,09	***2,95
GJB2	-5,09	-4,08	*-3,62
C4BPA	18,31	*7,21	**26,4
FABP4	54354	*1587,15	***132,42
FST	*3,89	*3,34	-1,37
GABARAP	*1,09	1,35	*1,59
MMP12	*60,8	*72,74	***50,6
PTGDS2	*-2,3	-1,8	** -3,95
TAC2	*22,52	*6,72	*13,95
CD44	*11,21	*5,69	**7,9
CTHRC1	*24,34	*13,67	15,31
IDI1	*-2,16	*-2,64	** -3,18
LDLR	*1,93	-1,61	1,35
LGALS3	*11,58	*5,01	**4,33
STAR	2,91	1,67	7,39
VCAM1	*10,12	*4,74	*17,05

Veränderungen < -1,5 bzw. < 1,5 werden als nicht relevant angesehen

\* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001

- bzw. grün: Gene, die im Transplantat weniger exprimiert werden als im Uterusgewebe

+ bzw. rot: Gene, die im Transplantat stärker exprimiert werden als im Uterusgewebe



**Abbildung 17: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von Steroidrezeptoren**

ESR1 = Estrogenrezeptor  $\alpha$ ; ESR2 = Estrogenrezeptor  $\beta$ ; PGR = Progesteronrezeptor; AR = Androgenrezeptor

Der Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ESR1) und der Progesteronrezeptor (PGR) wurde im Uterusgewebe signifikant stärker exprimiert als im Transplantat. Der Estrogenrezeptor  $\beta$  (ESR2) konnte ausschließlich in den Transplantaten nachgewiesen werden, wobei die Werte an der unteren Nachweisgrenze liegen. Die Expression des Androgenrezeptors zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede, was vermutlich auf die große Streuung der Messwerte zurückzuführen ist (Abb. 17).

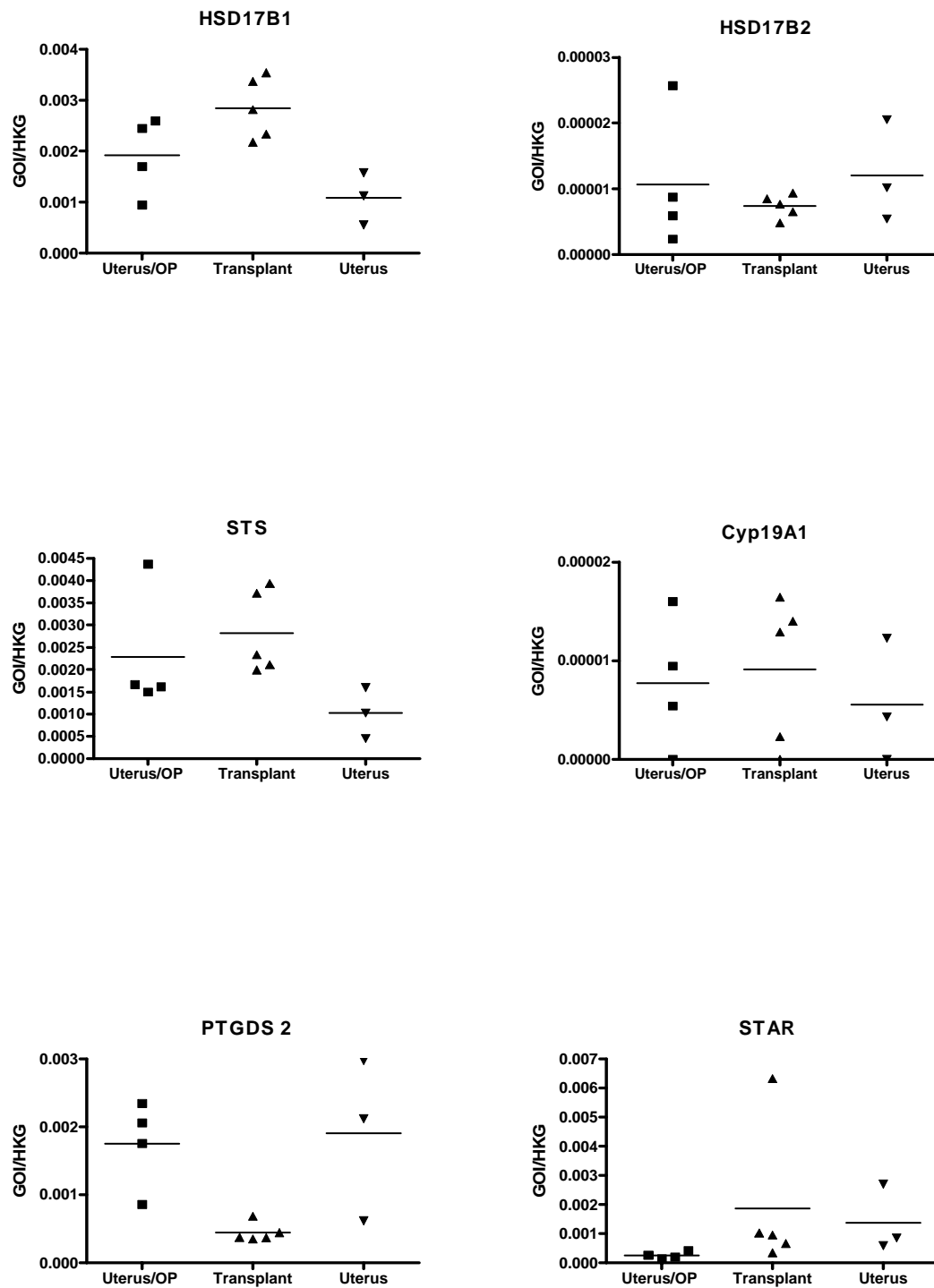
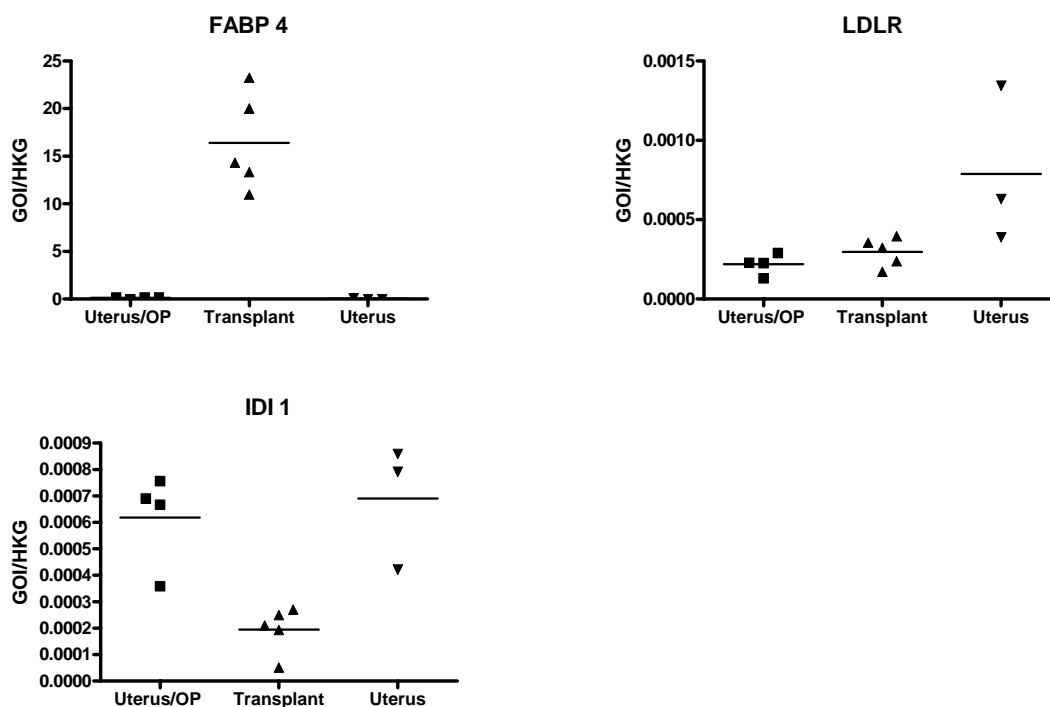


Abbildung 18: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von Enzymen des Steroidstoffwechsels

HSD17B1 = Hydroxysteroid-17 $\beta$ -Dehydrogenase 1; HSD17B2 = Hydroxysteroid-17 $\beta$ -Dehydrogenase 2; STS = Steroidsulfatase; Cyp19A1 = Aromatase (Cytochrom P450, Familie 19, Subfamilie A, Polypeptid 1); PTGDS2 = Prostaglandin-D2-Synthase 2; STAR = Steroidogenes, akutes Regulationsprotein

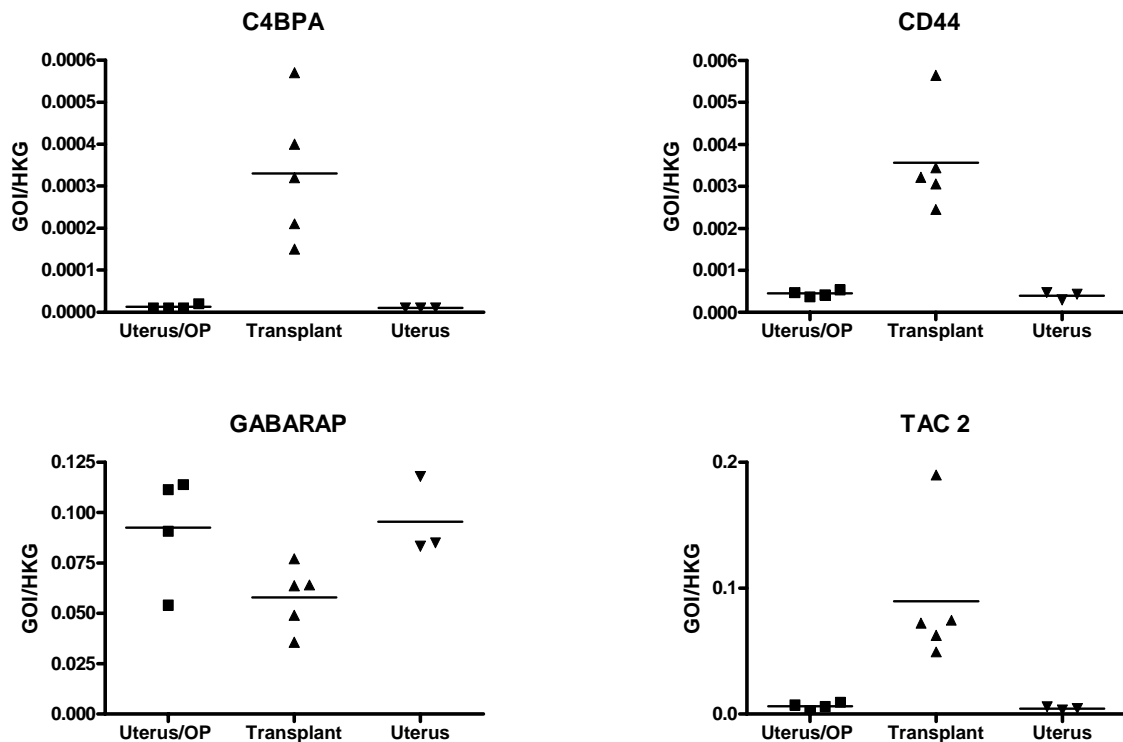
Bei den Enzymen aus dem Steroidstoffwechsel zeigt sich, daß die Prostaglandinsynthase 2 (PTGDS2) im Uterusgewebe signifikant höher exprimiert wird als im Transplantat. Bei den anderen Enzymen ließen sich keine signifikanten Differenzen feststellen (Abb.18).



**Abbildung 19: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von am Fettstoffwechsel beteiligten Proteinen**

FABP4 = Fettsäurenbindendes Protein 4; LDLR = low density Lipoprotein Receptor; IDI1 = Isopentenylidiphosphat- $\delta$ -Isomerase

In der Gruppe der Enzyme, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind, ergaben die Messungen eine signifikant erhöhte Expression des Fettsäure bindenden Proteins 4 (FABP4) in den Transplantaten und der Isopentenylidiphosphat-Deltaisomerase (IDI1) im Uterus (Abb.19).



**Abbildung 20: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von verschiedenen weiteren potentiellen Markern**

C4BPA = Komplementkomponente 4 bindendes Protein; CD44 = CD44 Antigen; GABARAP =  $\gamma$ -Aminobutylsäurerezeptor-assoziiertes Protein; TAC2 = Tachykinin 2

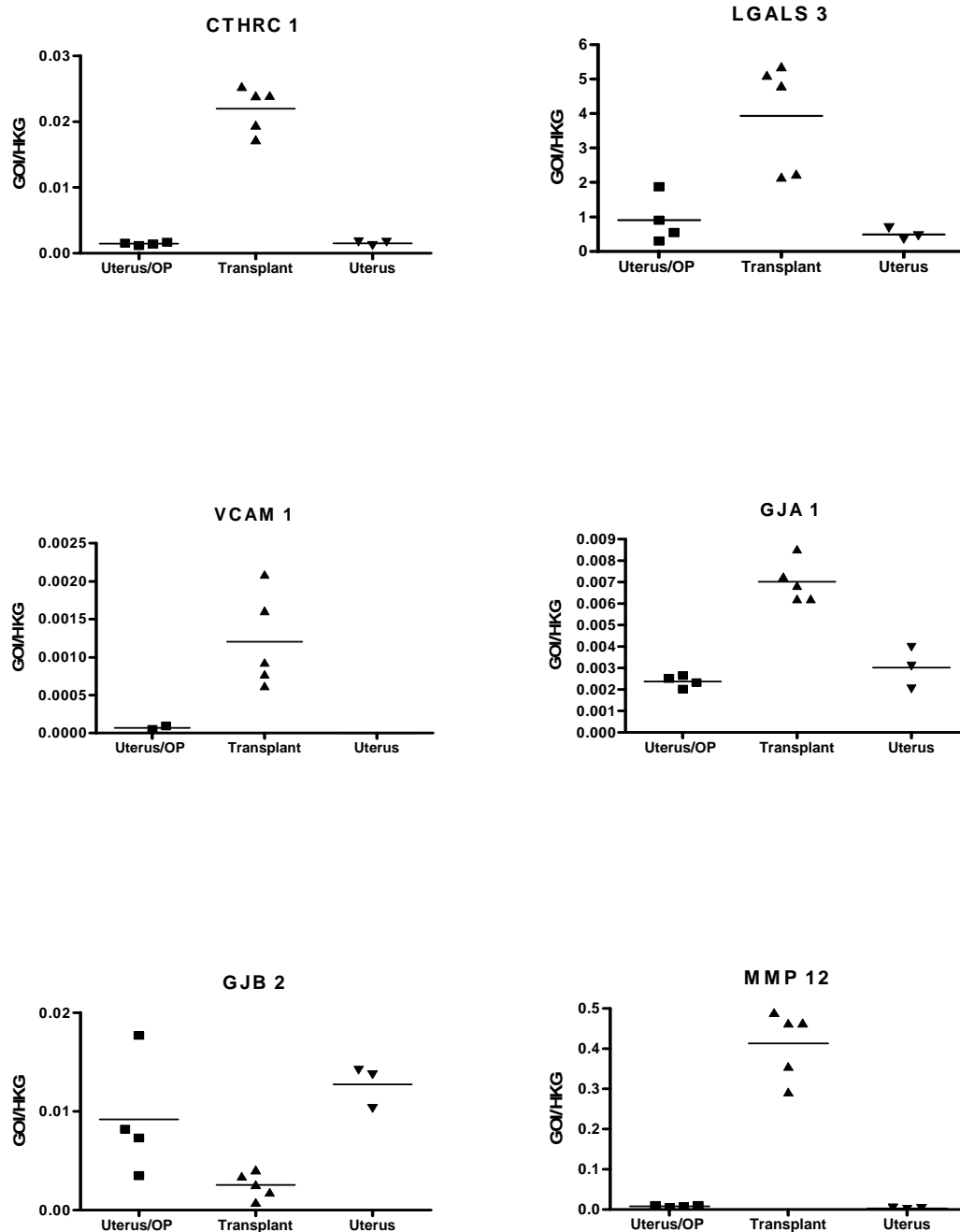
Das Komplementkomponente 4 bindende Protein (C4BPA) und das CD44 Antigen (CD44) sind an immunologischen Prozessen beteiligt. Die Expression dieser Proteine war in den Transplantaten signifikant erhöht, wobei die Expression im Uterus sehr gering war.

Das GABA-Rezeptor assoziierte Protein (GABARAP) und das Tachykinin 2 (TAC2) sind an Vorgängen der Schmerzempfindung beteiligt. GABARAP wurde in den Transplantaten signi-



fikant weniger exprimiert als im Uterus. TAC 2 –Expression war vermehrt im Transplantatgewebe nachweisbar (Abb.20).

Mit Ausnahme des Gap junction Membrankanal Proteins  $\beta 2$  (GJB2), wurden alle Proteine, die an der Gestaltung der extrazellulären Matrix und an interzellulären Verbindungen beteiligt sind, in den Transplantaten signifikant höher exprimiert als im Uterus. GJB2 zeigte eine signifikant hohe Expression im Uterus (Abb.21).



**Abbildung 21: Individuelle und Mittelwerte der normalisierten Genexpressionslevel von am Tissue remodelling beteiligten Proteinen**

CTHRC1 = collagen triple helix repeat containing 1; LGALS3 = Lectin, Galaktosebindend, löslich 3; VCAM1 = vaskuläres Zelladhäsionsmolekül; GJA1 = gap junction-Membrankanalprotein  $\alpha$  1 (Connexin 43); GJB2 = gap junction-Membrankanalprotein  $\beta$  2 (Connexin 26); MMP12 = Matrixmetallopeptidase 12

**Tabelle 7: Statistische Auswertung zu den in Abb. 17-21 dargestellten Daten**

t-Test, normalisierte Genexpressionslevel im Uterus gegen Genexpressionslevel im Transplantat derselben Tiere

Gensymbol	Signifikanz p
AR	n.s.
CYP19A1	n.s.
ESR1	0,0004
ESR2	nur im Transplantat
HSD17B1	n.s.
HSD17B2	n.s.
PGR	0,0052
STS	n.s.
GJA1	< 0,0001
GJB2	0,0452
C4BPA	0,0069
FABP4	0,0004
FST	n.s.
GABARAP	0,0495
MMP12	< 0,0001
PTGDS2	0,0028
TAC2	0,0234
CD44	0,0015
CTHRC1	< 0,0001
IDI1	0,0021
LDLR	n.s.
LGALS3	0,009
STAR	n.s.
VCAM1	0,0382

## **5. DISKUSSION**

Die aktuellen Therapieansätze zur Behandlung der Endometriose basieren auf der Unterdrückung der endogenen Hormonproduktion von Estrogen und Gestagenen. Als Ergebnis der Therapie wird das Wachstum der ektopischen Endometriumherde gehemmt, eine vollständige Heilung tritt in den meisten Fällen jedoch nicht ein. Als zusätzliche Belastungsfaktoren für die Patientinnen treten Nebenwirkungen auf, die auf Dauer unerträglich sein können.

Der Bedarf für neue Substanzen zur Behandlung der Endometriose ist groß. Vor allem werden Medikamente benötigt, deren Wirkungsmechanismus nicht in den Hormonstoffwechsel eingreift und möglichst zur vollständigen Heilung der Erkrankung führt.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von Testsubstanzen und für die weitere Erforschung der der Erkrankung zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen ist der Einsatz eines prädiktiven Tiermodells notwendig. Aufgrund der hohen Tierzahlen, die zur Erarbeitung fundierter Kenntnisse benötigt werden, kommen für die Testung neuer Substanzen nur kleine Labornager in Frage.

Das Ziel dieser Arbeit war es aus den verfügbaren Inzuchtrattenstämmen einen zu identifizieren, der für den Einsatz sowohl bei der Testung neuer Substanzen als auch bei der Erforschung der Pathomechanismen der Endometriose besonders geeignet ist.

### **5.1 Empfindlichkeit für die Entwicklung von induzierter Endometriose**

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig verschiedene Ratteninzuchtstämme auf ihre Eignung als in-vivo Endometriosemodell getestet. Im Gegensatz zu Auszuchtstämmen, sind die Individuen eines Inzuchtstammes phenotypisch uniform und bleiben über Generationen genetisch konstant. Es liegen umfangreiche Informationen über den Ursprung, die Zuchtgeschichte, den Genotyp und die phänotypischen Charakteristika jedes Stammes vor (Festing et al. 2002). Da jeder Stamm unterschiedliche Eigenschaften besitzt, sollte es möglich sein, einen oder mehrere zu finden, die besonders empfindlich auf die Induktion von Endometriose reagieren. Der Einsatz solcher Stämme erlaubt eine Reduktion der benötigten Tierzahlen und macht einen Vergleich von Wiederholungsstudien möglich.

Da Ratten nicht menstruieren und somit spontan keine Endometriose entwickeln können, muss die Erkrankung induziert werden. Aus den Studien von Vernon und Wilson (1985) geht

hervor, daß nur die Transplantation an das Peritoneum überhaupt zu Anheftung und Wachstum des Uterusgewebes führt. Sharpe-Timms (2002) fand heraus, daß das Verbringen der Transplantate an die Mesenterialarkaden zu einer besseren Blutversorgung führt. Daher wurden die Uterustransplantate an den Mesenterialarkaden befestigt. Hohe Anheftungs- und Wachstumsraten, eine zystenförmige Morphologie und gute Durchblutung der Transplantate zeigen, daß mit der beschriebenen Methode die optimale Imitation der Endometriose im Rattenmodell erreicht werden kann. Besonders sensibel präsentierten sich die Stämme BUF und BN.

## **5.2 Induktion durch isogene Transplantation versus Autotransplantation**

Die durch Inzucht entstehende genetische Uniformität der Individuen eines Stammes soll die Transplantation von Geweben eines Donortieres in ein Empfängertier desselben Stammes ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Möglichkeit der isogenen Transplantation bei Ratten genutzt. Hierbei bleiben die Reproduktionsorgane der Empfängertiere intakt, wodurch die humanen Verhältnisse noch exakter simuliert werden können. Die operationsbedingte Belastung der Tiere reduziert sich bei der Induktion der Endometriose auf ein Minimum, die Rekonvaleszenz ist verkürzt. Isogene Transplantate manifestieren sich in gleicher Weise wie Autotransplantate. Auch die in der vorliegenden Studie durchgeführte Genexpressionsanalyse von 24 ausgewählten Genen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung (22 von 24 Genen) der Expressionsmuster in Auto- und Isotransplantaten. Demnach ist anzunehmen, daß zur Induktion der Endometriose die isogene Transplantation eine für die Tiere schonendere Alternative zur Autotransplantation darstellt.

## **5.3 Effekte der Cetrorelix-Gabe auf den ovariellen Steroidhormonstoffwechsel**

Die Behandlung mit Cetrorelix führte nicht zu einer vollständigen pharmakologischen Kastration. Unter der Cetrorelixacetatbehandlung zeigten die Tiere einen regelmäßigen Zyklus mit einer verlängerten diestrischen Phase. Während der ersten 5 Tage der Cetrorelixpamoatbehandlung wurden alle Tiere diöstrisch und zeigten danach einen mehr oder weniger regelmäßigen Zyklus, in dem häufig eine verlängerte Estrusphase zu beobachten war, vergleichbar mit den Erkenntnissen von Horvath et al. (2004), die die Wirkungen von Cetrorelix an gesunden SPRD Ratten untersucht haben.

Hohe Dosen von Cetrorelix führen, als eine Folge des Estrogenentzugs, zu einer erhöhten Gewichtszunahme. Dieser Effekt zeigte sich besonders stark bei den PVG und BN Tieren. Niedrige Dosen beeinflussten das Körpergewicht dagegen nicht, was auf die dosisabhängige Wirkung von Cetrorelix zurückzuführen ist.

Es ist bekannt, daß die Langzeitapplikation hoher Dosen von Cetrorelixpamoat (100µg/Tag) bei Ratten zu einer Abnahme der Serum-Estradiol- und Progesteronkonzentrationen führt (Horvath et al. 2002). Beim Menschen verursachen ähnlich hohe, aber auch niedrigere Dosierungen (1,8mg/Tag) einen Abfall der Serum-Estradiolkonzentration (Gonzalez-Barcena et al. 1997). Vergleichbar fielen auch in vorliegender Studie die Serum-Estradiolkonzentrationen bei allen Stämmen unter die Nachweisgrenze. Die individuellen Serum-Progesteronkonzentrationen lagen bei über 80% der Tiere unter 5ng/ml unabhängig davon, ob sie der Kontroll- oder Cetrorelixgruppe zugeordnet waren. Horvath et al. (2002) detektierten bei unbehandelten Tieren Progesteronkonzentrationen von über 10ng/ml, in der vorliegenden Studie war dies nur bei einem Kontrolltier der Fall. Laut Smith et al. (1975) ist die Serum-Progesteronkonzentration am Morgen des Estrus sehr niedrig. Da die meisten Tiere bei der Sektion sich im Estrus befanden, stellt dies eine mögliche Erklärung für die niedrigen Messwerte dar.

#### **5.4 Effekte der Autotransplantation und der Cetrorelix-Behandlung an Transplantaten und Zielorganen**

Das estrogenabhängige Wachstum des ektopen (Sharpe et al. 1990) und des eutopen Endometriums (Horvath et al. 2002) wird durch die Unterbrechung der Signalkette auf Hypophysenebene mit einem GnRH-Antagonisten gehemmt. Dies zeigt sich in einem geringeren Wachstum der Transplantate und durch die Gewichtsabnahme der estrogenresponsiven Organe wie Uterus und Ovarien (Horvath et al. 2002). In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, daß BN-Ratten besonders stark auf die Behandlung mit hochdosiertem Cetrorelix reagieren. Dieser Stamm zeigte bei jedem Messparameter einen signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppe. Bei den anderen Stämmen waren die Effekte nicht immer eindeutig zu verifizieren.

Die Fähigkeit zur Proliferation scheint eine Voraussetzung für die Persistenz endometriotischer Läsionen zu sein. Mit Hilfe des Ki67 Antigens zum Nachweis sich teilender Zellen

wurden die Verhältnisse im Rattenmodell überprüft. Eine rege proliferative Aktivität konnte in den Epithelzellen des eutopen Endometriums nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren nur in wenigen Transplantaten vereinzelte Ki 67 positive Zellen zu finden. Scotti et al. (2000) kamen beim Vergleich vom humanen eutopen und dem dazugehörigen ektopen Endometrium ebenfalls zu dem Ergebnis, daß ektopes Endometrium eine geringe proliferative Aktivität zeigt. Auch in Nacktmäuse transplantiertes humanes Endometrium verhält sich ähnlich (Nisolle et al. 2000a). Die Autotransplantate scheinen sich demnach ähnlich dem humanen, ektopen Endometrium zu verhalten, wobei die proliferative Aktivität nicht mit der Persistenz der Transplantate korreliert.

Bei Rezeptor-Ligand-Interaktionen spielen sowohl das Vorhandensein des Liganden als auch die Verfügbarkeit des Rezeptors eine wichtige Rolle. In humanen endometriotischen Läsionen sollen im Gegensatz zum eutopen Endometrium mehr Estrogenrezeptoren exprimiert sein (Jones et al. 1995). Im vorliegenden Rattenmodell konnte diese Situation nicht nachgewiesen werden. Uteri und Transplantate der Kontrollgruppen und auch der Cetrorelixgruppen zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster der Estrogenrezeptoren. In jedem Fall waren die Drüsenepithelien stärker angefärbt als das Stroma. Da fast alle Tiere im Proestrus und Estrus waren entspricht dies den physiologischen Gegebenheiten bei Ratten. Nach Untersuchungen von Wang et al. (2000) ist die Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$  bei Ratten im Drüsenepithel insgesamt stärker ausgeprägt als im Stroma, im Proestrus am höchsten und fällt zum Metestrus hin ab.

Progesteronrezeptoren sind in der proestrischen und estrischen Phase bei Ratten nur schwach ausgeprägt (Ohta et al. 1993). Dies bestätigte sich beim immunhistochemischen Nachweis dieser Rezeptoren. Es konnte auch kein Einfluß der Cetrorelixbehandlung festgestellt werden.

Anscheinend führte weder die Induktion der Endometriose, noch die Behandlung mit Cetrorelix zu einer Veränderung der physiologischen Vorgänge bei der Ausprägung von Estrogen- und Progesteronrezeptoren.

### **5.5 Effekte der Autotransplantation und der Cetrorelix-Behandlung auf die Expression von potentiellen Markergenen**

Die Analyse der Genexpression im ektopen Endometrium und der Vergleich mit dem eutopen Endometrium sind bei der Aufdeckung der pathophysiologischen Mechanismen, die zu Krankheitsentstehung führen, sehr hilfreich. Außerdem entsteht durch den Vergleich homologer Gene die Möglichkeit, Erkenntnisse aus Tierversuchen sicherer auf den Menschen zu übertragen. Im Rahmen einer Studie zur Validierung des Endometriosemodells in der Ratte wurde bei Solvay Pharmaceuticals eine Microarray-Analyse an Uterus- und Transplantatgeweben von SPRD Ratten durchgeführt (Eiterer et al. 2005). Für die vorliegende Arbeit wurden 24 Gene aus diesen Microarrays ausgewählt, deren Expression nochmals im Uterus gesunder und transplantierte Tiere, sowie in den Transplantaten mittels qPCR ermittelt wurde. Berücksichtigt wurden Gene, deren Expression bei der Endometriose verändert ist bzw. solche, deren Expression infolge der induzierten Endometriose speziell im Rattenmodell verändert war.

Das Endometrium von gesunden und operierten Ratten zeigt bei 23 Genen ein ähnliches Expressionmuster. Dies lässt die Annahme zu, daß die Induktion der Endometriose bei Ratten keinen Einfluss auf die physiologischen Prozesse im Uterus hat. Im Transplantatgewebe sind starke Abweichungen von diesem Muster zu erkennen, was bedeuten kann, daß das Endometrium von Ratten in der Lage ist, sich veränderten Bedingungen anzupassen, ähnlich wie ektopes, humanes Endometrium.

Die Behandlung mit Cetrorelixacetat bewirkte bei 8 Genen eine Verstärkung der Effekte. Diese Gene könnten demzufolge als Marker für die erfolgreiche Behandlung mit Cetrorelix in Frage kommen.

### **5.6 Schlussbetrachtung**

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, daß das im Rahmen dieser Arbeit optimierte Rattenmodell gut geeignet ist, sowohl für die Darstellung pathophysiologischer Aspekte der humanen Endometriose, als auch für die Testung von Substanzwirkungen.



Der Einsatz von Inzuchttieren und die Zyklussynchronisation am Beginn und am Ende eines Experimentes erlauben eine erhebliche Reduktion der benötigten Tierzahlen. Die isogene Transplantation reduziert die durch die chirurgische Induktion der Endometriose entstehende Belastung der Tiere erheblich.

BN Ratten erweisen sich als besonders empfindlich für die Entwicklung von induzierter Endometriose. Auch bei der Überprüfung der Wirksamkeit vom GnRH-Antagonisten Cetrorelix im Rattenmodell zeigen die BN-Tiere die stärksten Reaktionen. Möglicherweise beruht dies auf einer genetischen Disposition, die beim Menschen als eine mögliche Ursache für das Auftreten der Endometriose diskutiert wird.

Durch eine Genexpressionsanalyse konnte nachgewiesen werden, daß einige Gene, die als potenzielle Marker für Endometriose beim Menschen gelten, sowohl in Autotransplantaten, als auch in isogenen Transplantaten der Ratte ähnliche Veränderungen der Genexpression aufweisen. Diese Übereinstimmung und die Aufdeckung weiterer Markergene könnte die Übertragung von im Tierexperiment gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen erleichtern. Weiterhin konnten Gene identifiziert werden, die durch die Behandlung mit Cetrorelix eine Modifizierung der Expression erfahren. Solche durch die Testsubstanz hervorgerufene Veränderungen könnten zur Bestimmung der Wirkungsmechanismen dieser Stoffe herangezogen werden.

Zur genaueren statistischen Analyse ist es unbedingt erforderlich, die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse anhand von deutlich höheren Fallzahlen zu verifizieren.

Da immunologische Defizite bei der Entstehung der Endometriose einen wichtigen Aspekt der Pathophysiologie darstellen, könnten Untersuchungen auf diesem Gebiet zur weiteren Charakterisierung des Rattenmodells beitragen.

Pathologische Veränderungen des eutopen Endometriums, wie sie beim Menschen beschrieben wurden, konnten in diesem Modell nicht nachgewiesen werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Szilvia Eiterer:

Charakterisierung und Optimierung eines Tiermodells der Endometriose in Ratten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein in der Literatur beschriebenes In-vivo-Modell für Endometriose in Ratten genauer charakterisiert und im Hinblick auf die Testung neuer Substanzen für die Endometriosetherapie verbessert werden.

Erstmals wurden Ratteninzuchtstämme eingesetzt, deren genetische Konformität innerhalb des Stammes einerseits und individuelle Charakteristika jedes Stammes andererseits die Möglichkeit bieten, einen für Endometriose besonders empfindlichen Stamm zu finden. Weiterhin kann bei Inzuchttieren zur Induktion der Endometriose statt der üblichen Autotransplantation von Uterusfragmenten eine als Operation weniger belastende, isogene Transplantation durchgeführt werden. Als Testmedikament wurde der GnRH-Antagonist Cetrorelix eingesetzt. GnRH-Analoga (Agonisten) gehören derzeit zu den effektivsten Therapeutika bei Endometriose. Antagonisten haben den Vorteil der dosisabhängigen Wirkung.

In den Studien 1A und 1B wurden 5 verschiedene Ratteninzuchtstämme verglichen. Die Induktion erfolgte durch Autotransplantation. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden mit 50µg/Tier/d Cetrorelixacetat behandelt, die Kontrolltiere erhielten 0,2ml der Vehikelsubstanz Mannitol (5%) über 3 Wochen. Vor allem die BN Ratten, aber auch die BUF Tiere zeigten eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber der induzierten Endometriose. Sie zeichneten sich durch eine hohe Wiederfindungsrate und starkes Wachstum der Transplantate aus. Die Tiere des BN Stammes spachen auch auf die Behandlung mit Cetrorelixacetat in hohen Dosen am stärksten an. Ein Rückgang der Transplantatgröße und des Transplantatgewichtes, sowie die Abnahme des Uterus- und Ovargewichtes und eine vermehrte Körpergewichtszunahme waren die offensichtlichen Reaktionen auf die Cetrorelixbehandlung. Die Serumestradiolwerte sanken unter die Nachweisgrenze.

Der immunhistochemische Nachweis von Estrogen- und Progesteronrezeptoren zeigte physiologische Verhältnisse. Die proliferative Aktivität der Drüsenzellen in den Transplantaten war im Vergleich mit den Uteri stark herabgesetzt.

In der Studie 2 wurden die Inzuchtstämme mit der geringsten (F344) und mit der höchsten Empfindlichkeit (BN) und der Auszuchtstamm SPRD verglichen. Die Behandlungsgruppe

bekam einmalig 156µg/250g KGW Cetrorelixpamoat (Depotformulierung) intramuscular appliziert, die Kontrollgruppe erhielt nur Vehikel. Die Behandlung mit Cetrorelixpamoat führte zu ähnlichen Effekten wie Cetrorelixacetat, die sich aber nur als Tendenzen zeigten und statistisch nicht signifikant waren.

In der letzten Studie wurde eine isogene Transplantation an BN und F344 Ratten durchgeführt. Diese hat zum Vorteil, daß der Uterus des Empfängertieres intakt bleibt und somit eine weitere Annäherung an das humane Krankheitsbild erreicht wird. Zusätzlich wird die Belastung der Tiere gemindert, was sich durch eine verkürzte Erholungszeit nach dem Eingriff zeigte. Hier erfolgte keine pharmakologische Behandlung.

Mit Hilfe einer mRNA-Expressionsanalyse einer Auswahl möglicher für Endometriose relevanter Gene konnte festgestellt werden, daß einige Transkripte auch im Rattenmodell ähnliche Expressionsveränderungen zeigen, wie bei der humanen Endometriose. Andere scheinen rattenspezifische Marker bei der induzierten Endometriose zu sein. Die Behandlung mit Cetrorelix hatte einen signifikanten Einfluß auf die mRNA-Expression und verstärkte bei den meisten Genen den Unterschied zwischen Transplantat und Uterus.

Mit BN und BUF wurden zwei Inzuchtstämme mit besonderer genetischer Prädisposition für Endometriose identifiziert. Eine bessere Übertragbarkeit zum Menschen wird durch die isogene Transplantation gewährleistet. Dies wird unterstützt durch Übereinstimmungen bei der pathologischen Genexpression von endometriosespezifischen Markergenen bei Mensch und Ratte. Zusätzlich wurde erstmals die Wirksamkeit von Cetrorelix in einem Endometriosemodell gezeigt. Dieses verbesserte Modell könnte in der Zukunft neue Möglichkeiten der Aufdeckung von Prädispositionsfaktoren und diagnostischen Markern eröffnen, aber auch die Testung neuer Medikamente gegen Endometriose effektiver machen.

## 7. SUMMARY

Szilvia Eiterer:

Characterization and validation of a rat endometriosis model

In the present work an in-vivo-model for endometriosis in rats was characterized and optimized with regards to the screening of new drugs for the therapy of endometriosis.

For the first time, rat inbred strains were used for this purpose providing genetic conformity and unique characteristics within each strain and offering the possibility to identify a very sensitive strain for the endometriosis. Furthermore, an isogenic transplantation can be used to induce endometriosis in inbred animals and this should be less harmful than the classical auto-transplantation of uterus fragments. The antagonistic GnRH-Analog Cetrorelix was used as test medication. Today GnRH-analogs are among the most effective therapeutic agents to treat endometriosis. The added-value of antagonists is their dose-dependent effect.

In study 1A and 1B, 5 different rat strains were compared. Induction was performed by auto-transplantation and the animals were treated with 50 $\mu$ g/animal/d of the Cetrorelix acetate, control animals received 0,2ml of the vehicle mannitol (5%) for 3 weeks. Especially the BN rats but as well the BUF animals showed a high susceptibility towards induced endometriosis. They were characterized by a high transplant survival rate and a strong growth of the transplants. The animals of the BN strain also responded most strongly to the treatment with Cetrorelix acetate in high dosage. Obvious effects were reduction of the size and weight of the transplants, reduction of the weights of the uterus and ovary and increase in body weight. Serum estradiol concentrations decreased below detection limit.

Immunohistochemical detection of estrogen- and progesterone receptors reflected a physiological situation. The proliferative activity of glandular epithelial cells in the transplants was strongly reduced compared to the uterus.

In study 2 the inbred strains with the lowest (F344) and with the highest (BN) susceptibility and the outbred strain SPRD were compared. The treatment group received once 156 $\mu$ g/250g body weight Cetrorelix pamoate (depot formulation), the control group received only vehicle. The treatment with Cetrorelix pamoate had similar effects as the treatment with Cetrorelix acetate, but only tendencies could be shown and there was no statistical significance.

In the last study isogenic transplantation was performed in BN and F344 rats. The advantage of this method is, that the uterus of the recipient animal stays intact and more similarity to the human disease is achieved. In addition, the stress of the animals is reduced which is reflected by a shorter recovery rate after surgery. In this study, there was no pharmacological treatment. The mRNA expression analysis of a selection of potential endometriosis-related genes revealed that expression of some genes changes in the rat model in a comparable way as in human endometriosis. Other genes appeared to be rat-specific. The treatment with Cetrorelix had significant effects on the mRNA expression in transplant and uterus and, in general the difference between the tissues was increased.

With BN and BUF two inbred strains with specific genetic predisposition for endometriosis have been identified. An even better predictivity of the model is given by isogenic transplantation. This conclusion is supported by matches between pathological gene expressions of endometriosis-related marker genes in humans and rats. Moreover, the efficacy of Cetrorelix was shown for the first time in an *in vivo* endometriosis model. This optimized model might open new possibilities to reveal predisposition factors and diagnostic markers and the testing of new endometriosis therapies in the future.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

ABU, J.I., J.C. Konje (2000)

Leukotrienes in gynecology: The hypothetical value of anti-leukotriene therapy in dysmenorrhea and endometriosis

Hum Reprod Update, 6, 200-205

BALASCH, J., M. Creus, F. Fabregues, F. Carmona, S. Martinez-Roman, D. Manau et al. (1997)

Pentoxifylline versus placebo in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: A pilot randomized clinical trial

Hum Reprod, 12, 2046-2050

BARRAGAN, J.C., J. Brotons, J. A. Ruiz, P. Acien (1992)

Experimentally induced endometriosis in rats: effect on fertility and the effects of pregnancy and lactation on the ectopic endometrial tissue

Fertil Steril, 58, 1215-1219

BELIARD, A., A. Noël, F. Goffin, F. Frankenne, J. Foidart (2002)

Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice

Fertil Steril 78, 973-978

BERKLEY, K. J., N. Dmitrieva, K. S. Curtis, R. E. Papka (2004)

Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis.

Proc Natl Acad Sci USA, 101, 11094-11098

BLUMENKRANTZ, M.J., N.Gallagher, R.A. Bashore et al. (1981)

Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis

Obstet Gynaecol, 57, 667-672

BOKSER, L., S. Bajusz, K. Groot et al. (1990)

Prolonged inhibition of luteinizing hormone and testosterone levels in male rats with the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75

Proc Natl Acad Sci USA, 87, 7100-7104

BROSENS, I.A., A. Verleyen, F.J. Cornillie (1987)

The morphologic effect of short-term medical therapy of endometriosis

Am J Obstet Gynecol, 157, 1215-1221

BULUN, S.E., S. Yang, Z. Fang, B. Gurates, M. Tamura, S. Sebastian (2002)

Estrogen production and metabolism in endometriosis

Ann NY Acad Sci, 955, 75-85

CASSINA, P.C., M. Hauser, G. Kacel, B. Imthurn, S. Schroder, W. Weder (1997)

Catamenial hemoptysis. Diagnosis with MRI.

Chest 1997, 111, 1447-1450

CASON, A. M., C. L. Samuelsen, K. J. Berkley (2003)  
Estrous changes in vaginal nociception in a rat model of endometriosis  
Hormones and behavior, 44, 123-131

CHISHIMA, F., S. Hayakawa, K. Sugita, N. Kinukawa, S. Aleemuzzman, N. Nemoto, T. Yamamoto, M. Honda (2002)  
Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients  
Am J Reprod Immunol, 48, 50-56

CHUNG, H.W., Y. Wen, S.H. Chun, C. Nezhat, B.H. Woo, M. Lake Polan (2001)  
Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: A rationale for endometriotic invasiveness  
Fertil Steril, 75, 152-159

COTRONEO, M. S., C. A. Lamartiniere (2001)  
Pharmacologic, but not dietary, genistein supports endometriosis in a rat model  
Toxicological sciences, 61, 68-75

COX, K. E., M. Piva, K. L. Sharpe-Timms (2001)  
Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium  
Biol Reprod, 65, 1297-1303

CUMMINGS, A. M., J. L. Metcalf (1995)  
Effects of estrogen, progesterone, and methoxychlor on surgically induced endometriosis in rats  
Fundam Appl Toxicol, 27, 287-290

CUMMINGS, A. M., J. L. Metcalf, L. Birnbaum (1996)  
Promotion of endometriosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats and mice: time-dose dependence and species comparison.  
Toxicol Appl Pharmacol, 138, 131-139

D'ANTONIO, M., F. Martelli, S. Peano, R. Papoian, F. Borrelli (2000)  
Ability of recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) to inhibit the development of experimentally induced endometriosis in rats  
J Reprod Immunol, 48, 81-98

D'HOOGHE, T.M., N. Nugent, S. Cuneo, D. Chai, F. Deer, S. Debrock, J. Mwenda (2001)  
Recombinant human TNF binding protein (r-hTBP-1) inhibits the development of endometriosis in baboons: A prospective, randomized, placebo- and drug-controlled study  
Fertil Steril, 76, suppl 1, S1

- EITERER, S., B. Husen, P. Houba, C. Thaete, H. Hackbarth, H. Thole (2005)  
Susceptibility of different rat strains to the development of experimental endometriosis and effect of treatment with Cetrorelix  
9th World Congress of Endometriosis , abstract 041
- FEDELE, L., S. Bianchi, T. Viezzoli, L. Arcaini, G.B. Candiani (1989)  
Gestrinone versus danazol in the treatment of endometriosis  
Fertil Steril, 51, 781-785
- FESTING, M. F. W., P. Overend, R. G. Das, M. C. Borja, M. Berdoy (2002)  
The Design of Animal Experiments  
The Royal Society of Medicine Press Limited, London  
(Laboratory Animals Handbook Nr. 14)
- FOX, R.I., M.L. Hermann, C.G. Frangou, G.M. Wahl, R.E. Morris, V. Strand et al. (1999)  
Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis  
Clin Immunol, 93, 198-208
- FUHRMANN, U., H. Hess Stumpp, A. Cleve, G. Neef, W. Schwede, J. Hoffmann, K.H. Fritzscheier, K. Chwalisz (2000)  
Synthesis and biological activity of a novel, highly potent progesterone receptor antagonist  
J Med Chem, 43, 5010-5016
- GIAMBERARDINO, M. A., K. J. Berkley, G. Affaitati, R. Lerza, L. Centurione, D. Lapenna, L. Vecchiet (2002)  
Influence of endometriosis on pain behaviors and muscle hyperalgesia induced by ureteral calculosis in female rats  
Pain, 95, 247-257
- GIUDICE, L.C., L.C. Kao (2004)  
Endometriosis  
Lancet, 364, 1789-1799
- GOLAN, A., R. Dargenio, R. M. Winston (1986)  
The effect of treatment on experimentally produced endometrial peritoneal implants.  
Fertil Steril, 46, 954-958
- GONG, Q., L. Peng, D. Shi, M. Yao, L. Chen (2001)  
Inhibitory effect of lilopristone on experimental endometriosis in rats  
Chin J New Drugs Clin Rem, 20, 245-249
- GONZALEZ-BARCENA, D., R. Banuelos Alvarez, E. Pere Ochoa, I. Cardenas Cornejo, A. M. Comaru-Shally, A. V. Shally, J. Engel, T. Reissmann, H. Riethmüller-Winzen (1997)  
Treatment of uterine leiomyomas with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix  
Hum Reprod, 12; nr.9, 2028-2035



- GOTTSCHALK, C., K. Malberg, M. Arndt, J. Schmitt, A. Roessner, D. Schultze, J. Kleinstein, S. Ansorge (2000)  
Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis  
*Adv Exp Med Biol*, 477, 483-486
- GRUENWALD, P. (1942)  
Origin of endometriosis from the mesenchyme of the coelomic walls  
*Am J Obstet Gynecol*, 44, 470-476
- GRÜMMER, R., F. Schwarzer, K. Balczyk, H. Hess-Stumpp, P.-A. Regidor, A. E. Schindler, E. Winterhager (2001)  
Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model  
*Hum Reprod*, 16, No. 8, 1736-1743
- HALBAN, J. (1924)  
Metastatic hysteroadenosis  
*Wien Wochenschr.*, 37, 1205-1206
- HALME, J., M.G. Hammond, J.F. Hulka et al. (1984)  
Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis  
*Obstet Gynaecol*, 64, 151
- HANDBOOK of Experimental Pharmacology (1999)  
Volume 135/I  
Springer Verlag
- HORVATH, J. E., A. M. Bajo, A. V. Schally, M. Kovacs, F. Herbert, K. Groot (2002)  
Effects of long-term treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist Decapeptyl and the LHRH antagonist Cetrorelix on the levels of pituitary LHRH receptors and their mRNA expression in rats  
*PNAS*, 99, No. 23, 15048-15053
- HORVATH, J. E., G. L. Toller, A. V. Schally, A.M. Bajo, K. Groot (2004)  
Effect of long-term treatment with low doses of the LHRH antagonist Cetrorelix on pituitary receptors for LHRH and gonadal axis in male and female rats  
*PNAS*, 101, No. 14, 4996-5001
- INGELMO, J., F. Quereda, P. Acien (1999)  
Intraperitoneal and subcutaneous treatment of experimental endometriosis with recombinant human interferon  $\alpha$ -2b in a murine model  
*Fertil Steril* 71, 907-911
- ISAACSON, K. B., Q. Xu, C. R. Lyttle (1991)  
The effect of estradiol on the production and secretion of complement component 3 by the rat uterus and surgically induced endometriotic tissue

Fertil Steril, 55, 395-402

JARVIS, B., D. Faulds (1999)

Etanercept: A review of its use in rheumatoid arthritis  
Drugs, 57, 945-966

JAVERT, C.T. (1949)

Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis. Including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes.  
Cancer, 2, 399-410

JAVERT, C.T. (1952)

The spread of benign and malignant Endometrium in the lymphatic system with a note of co-existing vascular involvement  
Am J Obstet Gynecol, 64, 780-806

JONES, R. C. (1987)

The effect of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist on experimental endometriosis in the rat.  
Acta Endocrinol (Copenh), 114, 379-382

JONES, R. C. (1984)

The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat.  
Acta Endocrinol (Copenh), 106, 282-288

JONES, R. K., J. N. Bulmer, R. F. Searle (1995)

Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium.  
Hum Reprod 12, 3272-3279

JUBANYIK, K.J., F. Comite (1997)

Extrapelvic endometriosis  
Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 24, 411-440

KATSUKI, Y., Y. Takano, Y. Futamura, Y. Shibutani, D. Aoki, Y. Udagawa, S. Nozawa (1998)

Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats  
Eur J Endocrinol, 138, 216-226

KEENAN, J.A., P.K. Williams-Boyce, P.J. Massey, T.T. Chen, M.R. Caudle, A. Bukovsky (1999)

Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with the immune modulators loxoribine and levamisole

Fertil Steril 72, 135-141

KETTEL, L.M., A.A. Murphy, A.J. Morales, A. Ulmann, E.E. Baulieu, S.S.C. Yen (1996)  
Treatment of endometriosis with the antiprogestone mifepristone (RU486)  
Fertil Steril, 65, 23-28

KOIDE, S.S. (1998)  
Mifepristone: Auxiliary therapeutic use in cancer and related disorders  
J Reprod Med, 43, 551-560

KOKORINE, I., M. Nisolle, J. Donnez, Y. Eeckhout, P.J. Courtoy, E. Marbaix (1997)  
Expression of interstitial collagenase ( matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of  
human endometriotic lesions  
Fertil Steril, 68, 246-251

KRINKE, G. J. (Hrsg.) (2000)  
The laboratory rat  
Verlag Academic Press, London

KRUITWAGEN, R.F.P.M., L.G. Poels, W.N.P. Willemsen et al. (1991a)  
Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase  
Fertil Steril, 55, 297-303

KRUITWAGEN, R.F.P.M., L.G. Poels, W.N.P. Willemsen, P.H.K. Jap et al. (1991b)  
Retrograde seeding of endometrial cells by uterine-tubal flushing  
Fertil Steril, 56, 414-420

KUDOH, M., Y. Susaki, Y. Ideyama, T. Nanya, M. Mori, H. Shikama (1997)  
Inhibitory effects of a novel aromatase inhibitor, YM511, in rats with experimental endome-  
triosis  
J Steroid Biochem Mol Biol, 63, 1-3

LEBOVIC, D.I., M.D. Müller, R.N. Taylor (2001)  
Immunobiology of endometriosis  
Fertil Steril, 75, 1-10

LEYENDECKER, G., M. Herbertz, G. Kunz (2002)  
Neue Aspekte zur Pathogenese von Endometriose und Adenomyose  
Frauenarzt, 43, Nr.3, 297-307

LEYENDECKER, G., G. Kunz, L. Wildt, D. Beil, H. Deininger (1998)  
Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm  
transport in patients with endometriosis and infertility  
Hum Reprod, 11, 1542-1551

LEYENDECKER, G., G. Kunz, M. Noe, M. Herbertz, G. Mall (1998)

Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra  
Hum Reprod Update, 4, 752-762

MAEDA, K., S. Ohkura, H. Tsukamura (2000)  
Physiology of reproduction  
in: KRINKE, G. J. (Hrsg.)  
The laboratory rat  
Verlag Academic Press, London

MANDELL, G. L. (1995)  
Cytokines, phagocytes and pentoxifylline  
J Cardiovasc Pharmacol, 25, Suppl.2, 20-22

MARKHAM, A., H.M. Lamb (2000)  
Infliximab: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis  
Drugs, 59, 1341-1359

MATSUBAYASHI, H., T. Makino, K. Iwasaki, T. Maruyama, N. Ozawa, T. Hosokawa, K. Someya, S. Nozawa (1995)  
Leukocyte subpopulation changes in rats with autotransplanted endometrium and the effect of danazol  
Am J Reprod Immunol, 33, 301-314

METTLER, L. (2000):  
Endometriose  
in: K. DIEDRICH (Hrsg.): Gynäkologie und Geburtshilfe  
Verlag Springer Berlin Heidelberg S. 532-542

MONTGOMERY RICE, V. (2002)  
Conventional Medical Therapies for Endometriosis  
Annals of the New York Academy of Sciences, 955, 343-352

MÜLLER, M.D., E. Dreher, R.N. Taylor (2000)  
Auf der Spur eines Rätsels: Angiogenese und Endometriose  
Geburtsh Frauenheilk, 60, 585-593

MURPHY, A.A., M.H. Zhou, S. Malkapuram, N. Santanam, S. Parthasarathy, N. Sidell (2000)  
RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells  
Fertil Steril, 74, 1014-1019

NELSON, A.R., B. Fingleton, M.L. Rotherberg, L.M. Matrisian (2000)  
Matrix metalloproteinases: Biological activity and clinical applications  
J Clin Oncol, 18, 1135-1149

NISOLLE, M., F. Casanas-Roux, J. Donnez (2000a)

Early-stage endometriosis: Adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice

Fertil Steril 74, 306-312

NISOLLE, M., F. Casanas-Roux, E. Marbaix, P. Jadoul, J. Donnez (2000b)

Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice

Hum Reprod 15, 572-577

NISOLLE, M., M. Donnez (1997)

Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities

Fertil Steril, 68, 585-596

NOBLE, L.S., E.R. Simpson, A. Johns, S.E. Bulun (1996)

Aromatase expression in endometriosis

J. Clin Endocrinol Metab, 81, 174-179

NOTHNICK, W.B., T.E. Curry, M.W. Vernon (1994)

Immunomodulation of rat endometriotic implant growth and protein production

Am J Reprod Immunol, 31, 151-162

NOTHNICK, B. W., T. M. D'Hooghe (2003)

Medical management of endometriosis: Novel targets and approaches towards the development of future treatment regimes

Gynecol Obstet Invest, 55, 189-198

OHTA, Y., T. Sato, T. Iguchi (1993)

Immunocytochemical Localisation of Progesterone Receptor in the reproductive Tract of Adult Female Rats

Biol Reprod, 48, 205-213

OKADA, H., T. Heya, Y. Ogawa, T. Shimamoto (1988)

One-month release injectable microcapsules of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (leuprolide acetate) for treating experimental endometriosis in rats

J Pharmacol Exp Ther, 244, 744-750

OSTEEN, K.G., K.L. Bruner, K.L. Sharpe-Timms (1996)

Steroid growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis

Semin Reprod Endocrinol, 14, 247-255

OTA, H., S. Igarashi, M. Sasaki, T. Tanaka (2001)

Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis

Hum Reprod, 16, 561-566

PINKERT, T.C., C. E. Catlow, R. Straus (1979)

Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma  
*Cancer*, 43, 1562-1567

QUEREDA, F., J. Barroso, P. Acien (1996)  
Individual and combined effects of triptoreline and gestrinone on experimental endometriosis in rats  
*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 67, 35-40

REISSMANN, T., A.V. Schally, P. Bouchard, H. Riethmüller, J. Engel (2000)  
The LHRH antagonist Cetrorelix: a review  
*Human Reproduction Update*, 6, nr.4, 322-331

RIDLEY, J.H. (1968)  
The histogenesis of endometriosis  
*Obstet Gynecol Surv*, 23, 1-35

RODGERS, W., L.M. Matrisian, L.C. Giudice, B. Dsupin, P. Cannon, C. Svitek, F. Gorstein, K.G. Osteen (1994)  
Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones  
*J Clin Invest*, 94, 946-953

ROCK, J. A., S. M. Markham (1992)  
Pathogenesis of endometriosis  
*Lancet*, 340, 1264-1267

ROJAS-CARTAGENA, C., C. B. Appleyard, O. I. Santiago, I. Flores (2005)  
Experimental intestinal endometriosis is characterized by increased levels of soluble TNFRSF1B and downregulation of Tnfrsf1a and Tnfrsf1b gene expression  
*Biol Reprod*, 73, 1211-1218

SAITO, T., H. Mizumoto, K. Kuroki, M. Fujii, S. Mori, R. Kudo (1995)  
Expression of MMP-3 and TIMP-1 in the endometriosis and the influence of danazol  
*Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 47, 495-496

SAITO, T., M. Yoshizawa, Y. Yamauchi, S. Kinoshita, T. Fujii, M. Mieda, H. Sone, Y. Yamamoto, N. Koizumi (2003)  
Effects of the novel orally active antiestrogen TZE-5323 on experimental endometriosis.  
*Arzneimittelforschung*, 53, 507-514

SAKATA, M., N. Terakawa, T. Mizutani, O. Tanizawa, K. Matsumoto, N. Terada, K. Sudo (1990)  
Effects of danazol, gonadotropin-releasing hormone agonist, and a combination of danazol and gonadotropin-releasing hormone agonist on experimental endometriosis.  
*Am J Obstet Gynecol*, 163, 1679-1684

- SAMPSON, J.A. (1925)  
Heterotopic or misplaced endometrial tissue  
Am J Obstet Gynaecol, 10, 649-664
- SAMPSON, J.A. (1927)  
Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity  
Am J Obstet Gynaecol, 14, 422-429
- SARACOGLU, O.F., S. Aksel, P. R. Yeoman, R. H. Wiebe (1985)  
Endometrial estradiol and progesterone receptors in patients with luteal phase defects and endometriosis.  
Fertil Steril, 43, 851-855
- SCHENKEN, R.S. (1989)  
Pathogenesis  
in: R.S. SCHENKEN (Hrsg.): Contemporary Concepts in Clinical Management  
Philadelphia, Lippincott, 1-48
- SCHENKEN, R.S., R.H. Asch (1980)  
Surgical induction of endometriosis in the rabbit: Effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins  
Fertil Steril 34, 581-587
- SCHOR, E., E. C. Baracat, M. J. Simoes, V. de Freitas, O. Giannotti Filho, G. Rodrigues de Lima (1999)  
Effects of conjugated estrogens and progestogen in surgically induced endometriosis in oophorectomized rats  
Clin Exp Obst & Gyn, 26, 158-161
- SCOTTI, S., P.-A. Regidor, A.E. Schindler, E. Winterhager (2000)  
Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis  
Mol Hum Reprod 6, nr.7, 610-617
- SILLEM, M., S. Prifti, B. Monga et al. (1997)  
Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is over-expressed in uterine endometrium from women with endometriosis  
Mol Hum Reprod, 3, 1101-1105
- SILLEM, M., S. Prifti, B. Monga, T. Arslan, B. Runnebau (1999)  
Integrin-mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix proteins is enhanced by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1  
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 87, 123-127
- SILLEM, M., S. Prifti, A. Koch et al. (2001)

Regulation of matrix metalloproteinase and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis  
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 95, 167-174

SHARPE, K. L., M. C. Bertero, M. W. Vernon (1991b)  
Detection of a progesterone-induced secretory protein synthesized by the uteri but not the endometriotic implants of rats with induced endometriosis  
Fertil Steril, 55, 403-410

SHARPE, K. L., M. C. Bertero, K. N. Muse, M. W. Vernon (1991a)  
Spontaneous and steroid-induced recurrence of endometriosis after suppression by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in the rat  
Am J Obstet Gynecol, 164, (1), 187-194

SHARPE-TIMMS, K. L. (2002)  
Using rats as a research model for the study of endometriosis.  
Ann N Y Acad Sci, 955, 318-27

SLAYDEN, O.D., K. Chwalisz, R.M. Brenner (2001)  
Reversible suppression of menstruation with progesterone antagonists in rhesus macaques  
Hum Reprod, 8, 1562-1574

SMITH, M. S., M. E. Freeman, J.D. Neill (1975)  
The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy  
Endo, 96, No. 1, 219-226

SOMIGLIANA, E., P. Viganò, G. Rossi, S. Carinelli, M. Vignali, P. Panina-Bordignon (1999)  
Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis  
Hum Reprod 14, 2944-2950

STEINLEITNER, A., H.Lambert, S. Roy (1991a)  
Immunomodulation with pentoxifylline abrogates macrophage-mediated infertility in an in vivo model: A paradigm for a novel approach to the treatment of endometriosis-associated subfertility  
Fertil Steril 55, 26-31

STEINLEITNER, A., H. Lambert, M. Suarez, N. Serpa, B. Robin, B. Cantor (1991b)  
Perioovulatory calcium channel blockade enhances reproductive performance in an animal model for endometriosis-associated subfertility  
Am J Obstet Gynecol 164, 949-952



STRIETER, R.M., D.G. Remick, P.A. Ward, R.N. Spengler, J.P. Lynch III., J. Larrick et al. (1988)

Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor alpha by pentoxifylline  
Biochem Biophys Res Commun, 155, 1230-1236

STÖCKEMANN, K., C. Hegele-Hartung, K. Chwalisz (1995)

Effects of the progesterone antagonists onapristone (ZK98 299) and ZK136 799 on surgically induced endometriosis in intact rats  
Hum Reprod 10, 3265-3271

STORY, L., S. Kennedy (2004)

Animal Studies in Endometriosis: A Review  
ILAR Journal, 45, Nr.2, 132-138

SULLIVAN, G.W., H.T. Carper, W.J. Novick Jr, G.L. Mandell (1988)

Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on neutrophil function by pentoxifylline  
Infect Immun, 56, 1722-1729

TAKAYAMA, k., K. Zeitoun, R.T. Gunby, H. Sasano, B.R. Carr, S.E. Bulun (1998)

Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor  
Fertil Steril, 69, 709-713

TAMAYA, T., T. Motoyama, Y. Ohono, N. Ide, T. Tsurusaki, H. Okada (1979)

Steroid receptor levels and histology of endometriosis and adenomyosis  
Fertil Steril, 4, 396-400

TJADEN, B., D. Galetto, J. D. Woodruff, J. A. Rock (1993)

Time-related effects of RU486 treatment in experimentally induced endometriosis in the rat.  
Fertil Steril, 59, 437-440

UCHIIDE, I., T. Ihara, M. Sugamata (2002)

Pathological evaluation of the rat endometriosis model  
Fertil Steril, 78, 782-786

VAN SCHIL, P.E., S.R. Vercauteren, P.A. Vermeire, Y.H. Nackaerts, E.A. Van Marck (1996)

Catamenial pneumothorax caused by thoracic endometriosis  
Ann. of Thorac Surg, 62, 585-586

VERNON, M.W., E.A. Wilson 1985

Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat  
Fertil Steril 44, 684-694

VIHINEN, P., V-M. Kahari (2002)

Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets  
Int J Cancer, 99, 157-166

- WANG, H., H. Eriksson, L. Sahlin (2000)  
Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle  
*Biol Reprod*, 63, 1331-1340
- WEISS, J., J. Maeß, K. Nebendahl (Hrsg.) (2003)  
Haus- und Versuchstierpflege  
2. Aufl. Verlag Enke Stuttgart
- WENZL, R.J., H. Heinzl (1998)  
Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants  
*Gynecol Obstet Invest*, 45, 253-257
- WITZ, C.A. (2002)  
Pathogenesis of Endometriosis  
*Gynecol Obstet Invest*, 53(suppl 1), 52-62
- WRIGHT, J. A., K. L. Sharpe-Timms (1995)  
Gonadotropin-releasing hormone agonist therapy reduces postoperative adhesion formation and reformation after adhesiolysis in rat models for adhesion formation and endometriosis.  
*Fertil Steril*, 63, 1094-1100
- YAMAGUCHI, M., N. Mori (1990)  
Prostaglandin and leukotriene concentration of the peritoneal fluid of endometriosis and other gynecologic disorders in the secretory phase  
*Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 39, 43-45
- YANG, J. Z., J. P. Van Dijk-Smith, D.A. Van Vugt, J. C. Kennedy, R. L. Reid (1996)  
Fluorescence and photosensitization of experimental endometriosis in the rat after systemic 5-aminolevulinic acid administration: A potential new approach to the diagnosis and treatment of endometriosis  
*Am J Obstet Gynecol*, 174, 154-160
- YANO, S., Y. Ikegami, K. Nakao (1996)  
Studies on the effect of the new non-steroidal aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride in an endometriosis model in rats  
*Arzneimittelforschung*, 46, 192-195
- YAO, Z., X. Shen, I. Capodanno, M. Donnelly, J. Fenyk-Melody, J. Hausamann, C. Nunes, J. Strauss, K. Vakerich (2005)  
Validation of rat endometriosis model by using raloxifene as a positive control for the evaluation of novel SERM compounds.  
*J Invest Surg*, 18, 177-183
- ZAMAH, N.M., M.G. Dodson, L.C. Stephens, V.C. Buttram, P.K. Besch, R.H. Kaufman (1984)

Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice  
Am J Obstet Gynecol 149, 591-597

ZANAGNOLO, V. L., R. Beck, W. D. Schlaff, M. D. Damewood, D. Bobbie, J. A. Rock  
(1991)

Time-related effects of gonadotropin-releasing hormone analog treatment in experimentally  
induced endometriosis in the rat

Fertil Steril, 55, 411-415

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation Charakterisierung und Optimierung eines Tiermodells der Endometriose in Ratten selbstständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende hilfen Dritter in Anspruch genommen.

---

---

---

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgenden Institutionen angefertigt:

---

---

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, daß ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

---

## **Danksagung**

Diese Arbeit ist durch die Initiative meiner Betreuerin PD Dr. Bettina Husen möglich geworden. Mein aufrichtiger Dank gilt ihr für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive wissenschaftliche Betreuung und nicht zuletzt für ihre unendliche Geduld.

Prof. Hansjoachim Hackbart möchte ich besonders danken für die Übernahme der Betreuung der Dissertation seitens der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Ich danke der Firma Solvay Pharmaceuticals für die Anstellung als Doktorandin, die Bereitstellung des benötigten Equipments und die Möglichkeit meine Dissertation unter besten Bedingungen anfertigen zu dürfen.

Beim Women's Health Team möchte ich mich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Operationen und Sektionen bedanken. Ich danke Sabine Brandes für die detaillierte Einweisung in die Laborarbeiten, die praktischen Ratschläge und ihre ausgeprägte Hilfsbereitschaft. Birgit Kühlein danke ich besonders für die Durchführung der PCR.

Ein wichtiger wissenschaftlicher Teil meiner Dissertation entstand durch die gute Zusammenarbeit mit der TBU Weesp, die die Genexpressionsanalysen vorgenommen hat. Ich möchte mich bei allen Beteiligten, insbesondere bei Kam Yan Au herzlich bedanken.

Der Firma Zentaris, Frankfurt, (Dr. M. Rischer) danke ich für die Überlassung der Testsubstanzen.

Mein großer Dank gilt auch den Tierpflegern, die stets mit Geduld auf meine Sonderwünsche eingegangen sind und Dr. Johanna Grunemann für die tierärztlichen Konzile.

Zum Schluß möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und die Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Ebenfalls danken möchte ich meinen Freunden und meinem Bruder, die stets an mich geglaubt haben und mich mit vielen aufmunternden Gesprächen unterstützt haben.

## 9. ANHANG: ROHDATEN

Legende:

KGW: Körpergewicht

UG: Uterusgewicht

NNG: Nebennierengewicht

OG: Ovargewicht

TG: Transplantatgewicht

mTF: mittlere Transplantatfläche

SD: Standardabweichung

### Studie 1A

Stamm: PVG

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm <sup>2</sup> ]	SD TF
Vehikel										
1	210	137	87	141	65	41	67	60	5.0	2.0
3	206	200	88	75	97	43	36	27	2.1	1.7
5	211	227	88	94	108	42	45	171	13.0	3.4
7	213	147	91	77	69	43	36	30	1.6	1.6
9	200	148	74	105	74	37	53		5.7	7.6
<b>Mittelwert</b>	<b>208</b>	<b>172</b>	<b>86</b>	<b>98</b>	<b>83</b>	<b>41</b>	<b>47</b>	<b>72</b>	<b>5.5</b>	
<b>SD</b>	<b>5</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>24</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>59</b>	<b>3.7</b>	
CET										
2	228	65	51	49	29	22	21	9	1.2	1.3
4	244	72	42	56	30	17	23	21	1.1	1.3
6	218	78	56	50	36	26	23	27	3.1	1.3
8	209	69	51	31	33	24	15	11	1.3	1.1
10	239	75	80	37	31	33	15	1	0.1	0.3
<b>Mittelwert</b>	<b>228</b>	<b>72</b>	<b>56</b>	<b>45</b>	<b>32</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>13.8</b>	<b>1.3</b>	
<b>SD</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>9.2</b>	<b>1.0</b>	
									nicht	gewogen

## Studie 1A

Stamm: F344

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
11	215	151	32	88	70	15	41	19	2.0	1.7
13	216	166	34	92	77	16	43	65	4.7	3.0
15	235	172	39	110	73	17	47	48	3.7	2.1
17	237	192	44	81	81	19	34	34	3.4	1.2
19	212	232	52	86	109	25	41	117	9.3	8.4
<b>Mittelwert</b>	<b>223</b>	<b>183</b>	<b>40</b>	<b>91</b>	<b>82</b>	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>56.6</b>	<b>4.6</b>	
<b>SD</b>	<b>11</b>	<b>28</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>33.8</b>	<b>2.5</b>	
CET										
12	234	113	46	90	48	20	38	45	5.5	3.2
14	228	103	54	62	45	24	27	30	2.8	1.8
16	264	103	50	54	39	19	20	65	5.4	3.2
18	219	84	42	40	38	19	18	16	2.0	1.7
20	228	94	43	64	41	19	28	16	2.8	0.7
<b>Mittelwert</b>	<b>235</b>	<b>99</b>	<b>47</b>	<b>62</b>	<b>42</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>34.4</b>	<b>3.7</b>	
<b>SD</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>18.7</b>	<b>1.5</b>	

## Studie 1A

Stamm: LEW

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
21	217	265	40	79	122	18	36	11	1.9	0.7
23	205	232	41	87	113	20	42	45	5.4	3.2
27	210	220	46	58	105	22	28	23	3.1	2.0
29	210	192	40	65	91	19	31	16	2.3	3.0
<b>Mittelwert</b>	<b>211</b>	<b>227</b>	<b>42</b>	<b>72</b>	<b>108</b>	<b>20</b>	<b>34</b>	<b>23.75</b>	<b>3.2</b>	
<b>SD</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>13.0</b>	<b>1.3</b>	
CET										
22	244	139	52	42	57	21	17	16	2.3	1.1
24	234	105	46	45	45	20	19		0.0	0.0
26	227	135	52	47	59	23	21	16	0.7	1.1
28	234	101	42	81	43	18	35	18	3.0	1.4
30	233	116	52	81	50	22	35	7	1.2	0.7
<b>Mittelwert</b>	<b>234</b>	<b>119</b>	<b>49</b>	<b>59</b>	<b>51</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>14.25</b>	<b>1.4</b>	
<b>SD</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>4.3</b>	<b>1.1</b>	



## Studie 1A

Stamm:BUF

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
31	206	210	33	97	102	16	47	29	2.4	1.0
33	201	165	24	68	82	12	34	97	11.6	11.3
35	207	299	28	53	144	14	26	182	10.7	9.7
37	185	217	33	61	117	18	33	35	3.5	1.0
39	199	215	29	73	108	15	37	46	4.2	1.7
<b>Mittelwert</b>	<b>200</b>	<b>221</b>	<b>29</b>	<b>70</b>	<b>111</b>	<b>15</b>	<b>35</b>	<b>77.8</b>	<b>6.5</b>	
<b>SD</b>	<b>8</b>	<b>43</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>57.4</b>	<b>3.9</b>	
CET										
32										
34	221	103	31	61	47	14	28	10	1.8	1.2
36	231	81	39	41	35	17	18	8	1.0	1.8
38	203	131	19	21	65	9	10	15	1.4	1.2
40	198	136	34	57	69	17	29	53	5.4	2.2
<b>Mittelwert</b>	<b>213</b>	<b>113</b>	<b>31</b>	<b>45</b>	<b>54</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>21.5</b>	<b>2.4</b>	
<b>SD</b>	<b>13</b>	<b>22</b>	<b>7</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>18.4</b>	<b>1.7</b>	

## Studie 1A

Stamm:BN

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
41	184	238	63	39	129	34	21	35	4.0	3.5
43	188	268	50	71	143	27	38	48	6.9	3.7
45	203	247	61	40	122	30	20	69	9.8	7.1
47	190	180	51	78	95	27	41	44	3.3	2.2
49	193	169	73	84	88	38	44	95	7.4	3.0
<b>Mittelwert</b>	<b>192</b>	<b>220</b>	<b>60</b>	<b>62</b>	<b>115</b>	<b>31</b>	<b>33</b>	<b>58.2</b>	<b>6.9</b>	
<b>SD</b>	<b>6</b>	<b>39</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>21.5</b>	<b>2.3</b>	
CET										
42	219	81	68	69	37	31	32	4	0.7	0.8
44	225	101	70	62	45	31	28	43	3.9	1.7
46	243	75	60	29	31	25	12	19	1.5	1.0
48	214	72	58	23	34	27	11	23	1.9	1.8
50	216	84	57	24	39	26	11	8	0.9	1.0
<b>Mittelwert</b>	<b>223</b>	<b>83</b>	<b>63</b>	<b>41</b>	<b>37</b>	<b>28</b>	<b>19</b>	<b>19.4</b>	<b>2.0</b>	
<b>SD</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>1.1</b>	

**Studie 1B****Stamm: PVG**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
1	188	191	92	62	102	49	33	10	0.8	1.2
3	207	231	81	96	112	39	46	31	2.2	1.4
5	198	223	62	77	113	31	39	27	2.5	2.0
7	187	206	84	110	110	45	59	48	3.1	2.0
<b>Mittelwert</b>	<b>195</b>	<b>213</b>	<b>80</b>	<b>86</b>	<b>109</b>	<b>41</b>	<b>44</b>	<b>29</b>	<b>2.1</b>	
<b>SD</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>0.8</b>	
CET										
2	221	89	80	58	40	36	26	31	3.4	1.1
4	228	117	44	50	51	19	22	16	2.7	2.0
6	215	69	65	52	32	30	24	12	2.1	1.0
8	211	71	74	50	34	35	24	11	0.8	0.0
10	209	72	68	54	34	33	26	19	1.2	0.9
<b>Mittelwert</b>	<b>217</b>	<b>84</b>	<b>66</b>	<b>53</b>	<b>38</b>	<b>31</b>	<b>24</b>	<b>17.8</b>	<b>2.0</b>	
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>7.2</b>	<b>0.9</b>	

## Studie 1B

Stamm:F344

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
11	208	237	45	122	114	22	59	15	2.9	1.2
13	206	177	51	77	86	25	37	14	1.3	0.5
15	205	379	52	101	185	25	49	64	5.9	1.8
17	197	206	46	108	105	23	55	18	2.2	1.3
19	211	361	36	78	171	17	37	24	2.4	3.1
<b>Mittelwert</b>	<b>205</b>	<b>272</b>	<b>46</b>	<b>97</b>	<b>132</b>	<b>22</b>	<b>47</b>	<b>27</b>	<b>3.0</b>	
<b>SD</b>	<b>5</b>	<b>82</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>39</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>18.8</b>	<b>1.6</b>	
CET										
12	193	123	48	76	64	25	39		3.2	1.2
14	236	96	49	61	41	21	26	37	2.1	0.7
16	217	111	48	63	51	22	29	34	4.7	2.2
18	221	101	41	68	46	19	31	31	2.3	1.2
20	210	133	46	88	63	22	42	31	2.2	1.1
<b>Mittelwert</b>	<b>215</b>	<b>113</b>	<b>46</b>	<b>71</b>	<b>53</b>	<b>22</b>	<b>33</b>	<b>33.3</b>	<b>2.9</b>	
<b>SD</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>2.5</b>	<b>1.0</b>	
									nicht	gewogen

**Studie 1B****Stamm: LEW**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
21	214	401	47	112	187	22	52	24	3.6	2.9
23	207	299	45	66	144	22	32	18	1.6	1.1
25	197	351	45	89	178	23	45	26	2.5	1.6
27	196	237	46	92	121	23	47	10	1.4	1.4
29	202	244	47	103	121	23	51	22	2.2	1.9
<b>Mittelwert</b>	<b>203</b>	<b>306</b>	<b>46</b>	<b>92</b>	<b>150</b>	<b>23</b>	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>2.3</b>	
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>63</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>5.7</b>	<b>0.8</b>	
CET										
22	243	80	50	45	33	21	19	19	2.0	1.2
26	224	110	44	59	49	20	26	11	1.5	1.2
28	232	90	41	41	39	18	18	5	1.2	2.0
30	228	82	43	51	36	19	22	22	1.6	1.2
<b>Mittelwert</b>	<b>232</b>	<b>91</b>	<b>45</b>	<b>49</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>14.3</b>	<b>1.6</b>	
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6.7</b>	<b>0.3</b>	

**Studie 1B****Stamm:BUF**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
31	185	195	35	67	105	19	36	33	1.8	1.4
33	191	296	29	88	155	15	46	72	4.7	4.3
35	180	195	28	62	108	16	34	30	2.3	1.1
37	177	322	27	82	182	15	46	25	1.8	1.0
39	182	336	27	82	185	15	45	55	5.7	2.8
<b>Mittelwert</b>	<b>183</b>	<b>269</b>	<b>29</b>	<b>76</b>	<b>147</b>	<b>16</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>3.3</b>	
<b>SD</b>	<b>5</b>	<b>62</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>17.8</b>	<b>1.6</b>	
CET										
32	202	69	24	36	34	12	18	31	3.3	1.9
34	214	70	33	40	33	15	19	15	1.6	1.0
36	202	99	23	36	49	11	18	15	1.0	0.7
38	199	86	10	30	43	5	15	18	4.2	2.2
40	181	119	16	38	66	9	21	20	2.7	0.9
<b>Mittelwert</b>	<b>200</b>	<b>89</b>	<b>21</b>	<b>36</b>	<b>45</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>19.8</b>	<b>2.4</b>	
<b>SD</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2.1</b>	<b>1.2</b>	

## Studie 1B

Stamm:BN

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
41	213	256	72	84	120	34	39	66	4.9	4.0
43	188	272	57	74	145	30	39	89	6.9	1.8
45	192	219	67	85	114	35	44	14	2.7	1.1
47	186	152	50	82	82	27	44	166	7.6	5.9
49	199	209	58	55	105	29	28	43	3.7	3.3
<b>Mittelwert</b>	<b>196</b>	<b>222</b>	<b>61</b>	<b>76</b>	<b>113</b>	<b>31</b>	<b>39</b>	<b>75.6</b>	<b>5.2</b>	
<b>SD</b>	<b>10</b>	<b>42</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>51.6</b>	<b>2.1</b>	
CET										
42	227	73	65	64	32	29	28	2	0.5	1.2
44	223	79	71	54	35	32	24	0	0.0	0.0
46	207	87	64	45	42	31	22	131	5.3	7.8
48	216	65	81	52	30	38	24	62	5.5	6.3
50	219	64	72	44	29	33	20	44	2.3	2.2
<b>Mittelwert</b>	<b>218</b>	<b>74</b>	<b>71</b>	<b>52</b>	<b>34</b>	<b>32</b>	<b>24</b>	<b>47.8</b>	<b>3.3</b>	
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>48</b>	<b>2.3</b>	

**Studie 2****Stamm: BN I**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
3	192	178	77	98	93	40	51	17	2.4	2.0
5	187	170	55	61	91	29	33	47	4.6	2.2
7	181	175	39	61	97	22	34	28	6.4	2.2
9	216	136	52	83	63	24	38	28	3.2	2.0
<b>Mittelwert</b>	<b>194</b>	<b>165</b>	<b>56</b>	<b>76</b>	<b>86</b>	<b>29</b>	<b>39</b>	<b>30</b>	<b>4.1</b>	
<b>SD</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>1.3</b>	
CET										
2	171	115	41	49	67	24	29	19	2.5	1.9
4	185	123	51	61	66	28	33	33	3.7	2.7
6	185	202	55	60	109	30	32	15	2.1	1.2
10	211	197	55	85	93	26	40	19	2.6	1.4
<b>Mittelwert</b>	<b>188</b>	<b>159</b>	<b>51</b>	<b>64</b>	<b>84</b>	<b>27</b>	<b>34</b>	<b>21.5</b>	<b>2.7</b>	
<b>SD</b>	<b>14</b>	<b>40</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6.8</b>	<b>0.6</b>	



**Studie 2****Stamm: BN II**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
31	173	95	39	79	55	23	46	80	5.1	3.0
33	161	156	40	69	97	25	43	44	6.1	3.6
35	183	96	44	72	52	24	39	38	4.0	1.4
37	169	151	40	61	89	24	36	22	4.1	1.2
39	175	90	50	80	51	29	46	34	4.1	2.3
<b>Mittelwert</b>	<b>172</b>	<b>118</b>	<b>43</b>	<b>72</b>	<b>69</b>	<b>25</b>	<b>42</b>	<b>43.6</b>	<b>4.7</b>	
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>29</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>19.6</b>	<b>0.8</b>	
CET										
34	171	102	34	59	60	20	35	71	7.8	3.0
36	171	174	51	52	102	30	30	74	4.1	3.0
38	162	105	49	50	65	30	31	7	0.8	0.7
40	192	168	50	53	88	26	28	15	1.9	0.5
<b>Mittelwert</b>	<b>174</b>	<b>137</b>	<b>46</b>	<b>54</b>	<b>78</b>	<b>26</b>	<b>31</b>	<b>41.8</b>	<b>3.7</b>	
<b>SD</b>	<b>11</b>	<b>34</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>30.9</b>	<b>2.7</b>	

## Studie 2

## Stamm: F344 I

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
11	199	204	49	131	103	25	66	37	2.3	1.4
13	204	152	35	80	75	17	39	36	3.7	1.1
15	195	243	32	96	125	16	49	36	3.8	1.6
17	211	164	39	110	78	18	52	45	6.2	3.8
19	187	195		77	104	0	41	41	2.9	1.1
<b>Mittelwert</b>	<b>199</b>	<b>192</b>	<b>39</b>	<b>99</b>	<b>97</b>	<b>15</b>	<b>50</b>	<b>39</b>	<b>3.8</b>	
<b>SD</b>	<b>8</b>	<b>32</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>3.5</b>	<b>1.3</b>	
CET										
12	185	115	38	88	62	21	48	26	3.1	1.5
14	192	126	40	76	66	21	40	34	3.4	1.4
18	201	194	36	55	97	18	27	9	1.6	0.3
20	186	102	43	70	55	23	38	76	4.3	0.9
<b>Mittelwert</b>	<b>191</b>	<b>134</b>	<b>39</b>	<b>72</b>	<b>70</b>	<b>21</b>	<b>38</b>	<b>36.3</b>	<b>3.1</b>	
<b>SD</b>	<b>6</b>	<b>36</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>24.7</b>	<b>1.0</b>	
									eineNN	gefunden

**Studie 2****Stamm: F344 II**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm <sup>2</sup> ]	SD TF
Vehikel										
41	193	73	39	68	38	20	35	43	3.7	1.3
43	197	118	45	94	60	23	48	32	3.4	1.1
45	200	125	48	82	63	24	41	40	5.0	1.8
49	194	137	42	62	71	22	32	48	4.5	4.5
<b>Mittelwert</b>	<b>196</b>	<b>113</b>	<b>44</b>	<b>77</b>	<b>58</b>	<b>22</b>	<b>39</b>	<b>40.8</b>	<b>4.3</b>	
<b>SD</b>	<b>3</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>5.8</b>	<b>0.7</b>	
CET										
42	206	173	39	103	84	19	50	7	2.8	2.3
44	189	193	39	87	102	21	46	18	2.6	0.4
46	204	172	41	77	84	20	38	52	5.9	1.7
48	190	190	53	92	100	28	48	26	2.1	1.3
50	201	141	48	83	70	24	41	29	3.2	1.2
<b>Mittelwert</b>	<b>198</b>	<b>174</b>	<b>44</b>	<b>88</b>	<b>88</b>	<b>22</b>	<b>45</b>	<b>26.4</b>	<b>3.4</b>	
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>1.5</b>	

## Studie 2

## Stamm: SPRD I

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
21	245	147	56	121	60	23	49	56	5.0	1.9
23	210	180	47	87	86	22	41	49	4.7	2.2
25	226	266	52	125	118	23	55	33	3.3	2.2
29	227	219	48	110	96	21	48	79	7.2	2.5
<b>Mittelwert</b>	<b>227</b>	<b>203</b>	<b>51</b>	<b>111</b>	<b>90</b>	<b>22</b>	<b>49</b>	<b>54.3</b>	<b>5.0</b>	
<b>SD</b>	<b>12</b>	<b>44</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>16.5</b>	<b>1.4</b>	
CET										
22	238	228	52	108	96	22	45	75	5.9	3.3
24	215	128	44	84	60	20	39	29	2.4	0.9
26	222	187	46	109	84	21	49	33	3.1	1.0
28	220	225	61	78	102	28	35	67	5.0	2.7
30	238	227	71	93	95	30	39	38	3.7	2.1
<b>Mittelwert</b>	<b>227</b>	<b>199</b>	<b>55</b>	<b>94</b>	<b>87</b>	<b>24</b>	<b>42</b>	<b>48.4</b>	<b>4.0</b>	
<b>SD</b>	<b>10</b>	<b>39</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>18.8</b>	<b>1.3</b>	

## Studie 2

## Stamm: SPRD II

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Vehikel										
51	235	187	59	117	80	25	50	121	11.5	4.4
53	214	100	44	103	47	21	48	216	16.9	8.6
55	232	193	50	90	83	22	39	50	5.0	2.9
57	250	167	57	116	67	23	46	45	5.0	2.0
59	205	177	49	135	86	24	66	82	8.5	2.5
61	248	258	62	107	104	25	43	34	3.8	2.2
<b>Mittelwert</b>	<b>231</b>	<b>180</b>	<b>54</b>	<b>111</b>	<b>78</b>	<b>23</b>	<b>49</b>	<b>91.3</b>	<b>8.4</b>	
<b>SD</b>	<b>16</b>	<b>46</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>62.8</b>	<b>4.6</b>	
CET										
52	215	182	47	99	85	22	46	39	3.2	4.0
54	212	188	31	109	89	15	51	40	6.0	2.1
56	241	196	65	122	81	27	51	115	7.8	2.4
58	225	110	51	107	49	23	48	82	7.1	1.5
60	237	265	68	85	112	29	36	88	10.0	4.7
<b>Mittelwert</b>	<b>226</b>	<b>188</b>	<b>52</b>	<b>104</b>	<b>83</b>	<b>23</b>	<b>46</b>	<b>72.8</b>	<b>6.8</b>	
<b>SD</b>	<b>12</b>	<b>49</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>29.4</b>	<b>2.3</b>	

**Studie 3****Stamm: BN**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Isotrans.										
2	185	880	48	61	476	26	33	59	4.8	3.6
3	166	372	41	77	224	25	46	69	4.0	2.1
4	165	427	37	64	259	22	39	59	5.3	3.5
5	184	565	43	64	307	23	35	62	3.7	1.3
6	172	459	36	55	267	21	32	89	5.2	2.2
<b>Mittelwert</b>	<b>174</b>	<b>541</b>	<b>41</b>	<b>64</b>	<b>306</b>	<b>23</b>	<b>37</b>	<b>68</b>	<b>4.6</b>	
<b>SD</b>	<b>9</b>	<b>181</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>89</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>0.6</b>	
Kontrolle										
8	179	435	39	65	243	22	36			
9	163	589	39	69	361	24	42			
10	156	299	28	68	192	18	44			
<b>Mittelwert</b>	<b>166</b>	<b>441</b>	<b>35</b>	<b>67</b>	<b>265</b>	<b>21</b>	<b>41</b>			
<b>SD</b>	<b>10</b>	<b>118</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>71</b>	<b>2</b>	<b>3</b>			

**Stamm: F344**

Tier-Nr.	KGW [g]	UG [mg]	NNG [mg]	OG [mg]	UG /KGW* 100	NNG /KGW* 100	OG /KGW* 100	TG [mg]	mTF [mm2]	SD TF
Isotrans.										
11	195	422	38	102	216	19	52	109	8.2	4.0
12	191	412	35	104	216	18	54	90	5.4	1.4
13	209	421	46	113	201	22	54	64	5.1	2.7
14	184	392	37	104	213	20	57	67	4.3	2.1
15	214	430	39	98	201	18	46	83	5.3	2.8
<b>Mittelwert</b>	<b>199</b>	<b>415</b>	<b>39</b>	<b>104</b>	<b>212</b>	<b>20</b>	<b>54</b>	<b>82.6</b>	<b>5.7</b>	
<b>SD</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>16.4</b>	<b>1.5</b>	