

Aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Einfluss des Wachstumsfaktors Insulin-like growth
factor-I (IGF-I) auf das Follikelwachstum beim
Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Alessandra Quaggio Augusto
aus Curitiba – Brasilien

Leipzig, 2012

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Professor Dr. Almuth Einspanier

Gutachter: Professor Dr. Almuth Einspanier, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig

Professor Dr. habil. Martin Wähler, Tierproduktion, Hochschule Anhalt,
Bernburg

Tag der Verteidigung: 13. Dezember 2011

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Die Follikelgenese	3
2.2 Die endokrine Kontrolle der Follikelentwicklung	4
2.3 Das Intraovarielle Insulin-like Growth Factor (IGF) - System	7
2.3.1 Die Rolle des IGF-I bei der Follikelentwicklung	8
3 MATERIAL UND METHODEN.....	13
3.1 Tiere	13
3.2 Haltungsbedingungen	14
3.3 Zykluskontrolle	15
3.3.1 Blutprobenaufarbeitung	16
3.3.2 Die Ultraschalluntersuchung	16
3.4 Zellkulturen von Granulosazellen des Weißbüschelaffen	17
3.4.1 Die Vorbereitung der Platten	17
3.4.2 Die Gewinnung der Ovarien	18
3.4.3 Die Gewinnung der Granulosazellen	19
3.4.4 Aussaat und Kultur	20
3.5 Analytische Messverfahren	22
3.5.1 Apoptosenachweis	22
3.5.2 Enzymimmunassay (EIA)	23
3.5.2.1 Die Durchführung der Progesteronbestimmung	24
3.5.2.2 Die Durchführung der Östradiolbestimmung	25
3.6 Statistik	25
4 ERGEBNISSE	26
4.1 Zykluskontrolle	26
4.2 Kultivierung von Granulosazellen des Weißbüschelaffen	29
4.2.1 Morphologische Beobachtungen der Zellen während der Kultur	29
4.2.2 Apoptosenachweis	32
4.3 Hormonsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium	33
4.3.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	35
4.3.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	37
4.3.3 Zusammenfassung der Hormonsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	40

4.4 Hormonsekretion der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel im Kulturmedium	42
4.4.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen der präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	44
4.4.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	46
4.4.3 Zusammenfassung der Hormonsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	49
4.5 Zeitabhängige Hormonwirkungen	51
4.5.1 Zeitabhängige Hormonwirkungen - Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs auf die Progesteronsekretion in beiden Granulosazellgruppen	51
4.5.2 Zeitabhängige Hormonwirkungen - Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs auf die Östradiolsekretion in beiden Granulosazellgruppen	56
4.5.3 Zusammenfassung der Zeitabhängigen Hormonwirkungen - Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs auf die Progesteron- und Östradiolsekretion in beiden Granulosazellgruppen	61
5 DISKUSSION	63
5.1 Zykluskontrolle	63
5.1.1 Anzahl und Größe der Follikel und Anzahl der Zellen pro Follikel	63
5.2 Morphologische Beobachtung und Apoptosenachweis	65
5.3 Hormonakkumulationen im Kulturmedium	67
5.3.1 Hormonsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel	67
5.3.1.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	67
5.3.1.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	72
5.3.2 Hormonsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium	74
5.3.2.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	75
5.3.2.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG	79
6 ZUSAMMENFASSUNG	83
7 SUMMARY	85

8 LITERATURVERZEICHNIS	87
9 ANHANG MATERIAL UND METHODEN.....	I
9.1 Kulturmedium	I
9.2 Lösungen der Progesteron- und Östradiolenzymimmunoassays	I
9.3 Antikörper der Enzymimmunoassays	III
9.4 Kreuzreaktionen der in den Enzymimmunoassays verwendeten Antikörper	III
9.5 Intra- und Interassayvarianzen der Progesteron- und Östradiol- Enzymimmunoassays	IV
DANKSAGUNG	V

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abn	Abnahmen
Akk	Akkumulation
Ak	Antikörper
Ag	Antigen
at	atretisch
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CTP	Charcoal treated plasma
CV	Variationskoeffizienten
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
dUTP	2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate
E ₂	Östrogen
EIA	Enzymimmunoassay
et al.	et alterae
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FSH-R	Follikelstimulierendes Hormon-Rezeptoren
g	Gramm
GZ	Granulosazellen
GH	Growth hormone (Wachstumshormon)
GZ	Granulosazellen
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin

IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IGF-II	Insulin-like Growth Factor-II
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IgG	Immunoglobulin G
kDa	KiloDalton
K.I.	Konfidenzintervall
li	Links
L.O.	linkes Ovar
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-R	Luteinisierendes Hormon-Rezeptoren
0	Mittelwert
Min	Minute
MHz	Megahertz
mM	Millimol
mm	Millimeter
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
no	Normal
p	p-Werte Wahrscheinlichkeit
P ₄	Progesteron
P450 _{scc}	Cholesterol side-chain cleavage Enzym
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramm
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
pH	potentia Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
Prä.	Prästimulation
QC	quality-control (Assay-test)

re	Rechts
R.O.	rechtes Ovar
s.	siehe
S	Stimulationsprotokoll
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannte
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
Std	Standard
Tab.	Tabelle
TK	Thekazellen
TMB	Tetramethylbenzin
TdT	Terminal Desoxynucleotidyl-Transferase
u.	und
Udr	Umdrehungen (Drehzahl)
Ut	Uterus
vgl.	vergleiche
vs.	versus
W	Weißbüschelaffen
z.B.	zum Beispiel
μ l	Microliter
μ M	Micromol
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase
σ	Standardfehler

1 EINLEITUNG

Wie kommt es zur Selektion und Ovulation eines Follikels? Dies ist eine zentrale Frage, die seit vielen Jahren Wissenschaftler beschäftigt, da es dabei sowohl um das Verständnis der Physiologie, als auch um die Kontrolle der Reproduktion bei Säugetieren geht. Viele Faktoren scheinen diese Prozesse zu beeinflussen und spiegeln damit auch die Redundanz der Hormone wider.

Die Follikelentwicklung ist ein komplexer physiologischer Prozess, der die extra- und intrafollikulären Faktoren umfasst, d.h. sowohl die Wirkung von Hormonen des endokrinen Systems als auch lokale autokrine und parakrine Aktionen intraovarieller Substanzen, wie z.B. das intraovarielle Insulin-like Growth Factor (IGF) - System. Der Einfluss von IGF-I auf das Follikelwachstum und dessen Mechanismus zur Initiierung des Follikelwachstums sowie dessen Differenzierung ist von großem Interesse, um zu verstehen, wie der primordiale Pool zu aktivieren ist. Eine Klärung dieser Fragen verbessert das Verständnis der Reproduktion von Haustieren und besonders vom Aussterben bedrohter Tierarten (FORTUNE 2003; ABBOTT et al. 2004; VELAZQUEZ et al. 2009). Dabei sind besonders lokale Regulatoren wichtig, wie z.B. IGF-I, die die Zellproliferation vorantreiben. So hat YOSHIMURA (1998) bei verschiedenen Tierarten eine vermehrte Zellproliferation, eine erhöhte Aromataseaktivität und Progesteronsekretion unter IGF-I-Einfluss beobachtet und geschlussfolgert, dass IGF-I für die endgültige Follikelentwicklung, die Oozytenreifung und die Ovulation von entscheidender Bedeutung ist. Zudem konnten MONGET et al. (2002) zeigen, dass IGF-I die Granulosazellproliferation und deren Steroidhormonsekretion bei Säugetieren fördert. Auch BEHL und KAUL (2002) sowie BEG und GINTHER (2006) kommen zu dem Schluss, dass IGF-I eine wichtige Rolle bei der Follikelselektion der Säugetiere spielt. Für den Menschen z.B. wurde bereits festgestellt, dass Störungen im IGF-System zu Veränderungen in der Reproduktion führen können, wie fehlender Eisprung und Unfruchtbarkeit (FRIED et al. 2003; YOSHIMURA 2003; SCHOYER et al. 2007). So finden sich hohe Konzentrationen des zirkulierenden IGF-I bei Frauen mit einem erhöhten Tumor-Risiko in Endometrium, Ovar (GOTLIEB et al. 2006; CAO et al. 2007) und Brust (SCHERNHAMMER et al. 2005; BAGLIETTO et al. 2007). Bei Endometriose und beim polyzystischen Ovarsyndrom haben auch DOI et al. (2005), GADDUCCI et al. (2005), GIUDICE (2006) und ARTINI et al. (2007) eine hohe IGF-I Konzentration im Blut beobachtet.

Trotz der vielen Fortschritte der vergangenen Jahre bezüglich des IGF-I-Einflusses auf die Follikelentwicklung verhält sich IGF-I kontrovers bei den unterschiedlichen Spezies (MAZERBOURG et al. 2003). Diese bestehenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies in Bezug auf die Lokalisierung, die Funktion und die Konzentration des IGF-Systems bereiten Schwierigkeiten, da die Ergebnisse nicht oder nur bedingt auf andere Tierarten oder den Menschen übertragen werden können.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb eigene *in vitro* - Untersuchungen an den Granulosazellen von Weißbüschelaffen, die ein relevantes Primatenmodell für den Menschen darstellen, durchgeführt. Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) aus der Familie der südamerikanischen Krallenaffen, zeichnet sich durch seine geringe Körpergröße, gute Anpassungsfähigkeit und eine hohe Fortpflanzungsrate aus und ist deshalb besonders geeignet für die biomedizinische Forschung (ABBOTT et al. 2003 und 2004). Ein weiterer Grund für die Verwendung ist die Ähnlichkeit mit dem Menschen in Bezug auf die reproduktionsbiologischen Parameter wie z.B. Steroidhormonprofile während des ovariellen Zyklus und Anatomie des Reproduktionstrakts (HILLIER et al. 1987; EINSPANIER et al. 1999).

Dabei wurden folgende Fragen untersucht:

- Welchen Einfluss hat IGF-I in den verschiedenen Follikelstadien?
- Zeigt sich eine unterschiedliche Wirkung des IGF-I bei den kleinen und den präovulatorischen Follikeln?
- Zeigt sich eine Zusammenwirkung zwischen IGF-I und Gonadotropinen auf die Erzeugung des präovulatorischen Follikels?

Dazu wurde die Steroidhormonsekretion in den verschiedenen Follikelstadien gemessen. Speziell wurde die Wirkung des IGF-I auf die Granulosazellen der kleinen und präovulatorischen Follikel und deren Wechselwirkung mit den Gonadotropinen untersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Die Follikelgenese

Die Follikelgenese fängt schon während der pränatalen Periode mit der Entwicklung der Primordialfollikel an. Diese Follikel stellen eine Population von Follikeln im Ruhestadium dar und sind durch Oozyten charakterisiert, die von einem einschichtigen Epithel flacher Prä-Granulosazellen umschlossen sind (CHUN und HSUEH 1998; PICTON und GOSDEN 1998; WONG und ADASHI 1998).

Der Primordialfollikel kann entweder degenerieren oder tritt in die Wachstumsphase ein (LACKER und PERCUS 1991; KAIPIA und HSUEH 1997). Das erste Anzeichen für den Eintritt des Primordialfollikels in die Wachstumsphase, d.h. die Entwicklung zum Primärfollikel, ist die morphologische Veränderung der Prä-Granulosazellen, bei der die flachen Zellen eine kubische bis prismatische Form annehmen (YAO und BAHR 1998; BRITT et al. 2004). Der Primärfollikel schließlich wächst durch die Teilung der Granulosazellen und die Vergrößerung der Oocyte. Der Sekundärfollikel zeichnet sich durch eine weitere Teilung der Granulosazellen aus, wodurch das Epithel mehrschichtig wird (CARR 1998). Mit dem Wachstum der Sekundärfollikel, während der Entwicklung der Tertiärfollikel, differenziert sich auch die äußere Kapsel der stromalen Zellen in zwei unterschiedliche Zonen: die *Theca interna* und die *Theca externa* (MEINHARDT und SEITZ 2003). Im Laufe des folliculären Wachstums bilden sich aufgrund der proliferativen Aktivität der Granulosazellen in der Granulosazellschicht zunächst kleine Interzellularräume, die sich später miteinander verbinden und zu einem zentralen, mit Flüssigkeit gefüllten Hohlraum (Antrum) werden (VOORHIS 1998a). Zusammen mit dieser Antrumbildung entwickeln die Theka- und Granulosazellen eine spezielle Verbindung zwischen den Zellen, die Gap Junctions genannt werden. Diese Gap Junctions ermöglichen eine gewisse molekulare Interaktion zwischen den Zellen. Damit wird die für die Follikelreifung und Ovulation notwendige Kommunikation zwischen den Zellen erlaubt (KIDDER und MHAWI 2002; GERSHON et al. 2008).

Durch Zellteilung und die stärkere Ansammlung von Flüssigkeit im Antrum wächst der kleine antrale Follikel. Je nach Spezies wird eine unterschiedliche Anzahl von Follikeln selektiert und wächst weiter, bis sie die Größe eines ovulatorischen Follikels (sprungreifer Follikel oder Graaf-Follikel) erreicht hat, während die anderen degenerieren (Atresie) (FORTUNE 1994; GREENSTEIN und RAUE 1996). Abbildung 1 zeigt ein Schema der unterschiedlichen Stadien der Follikelentwicklung.

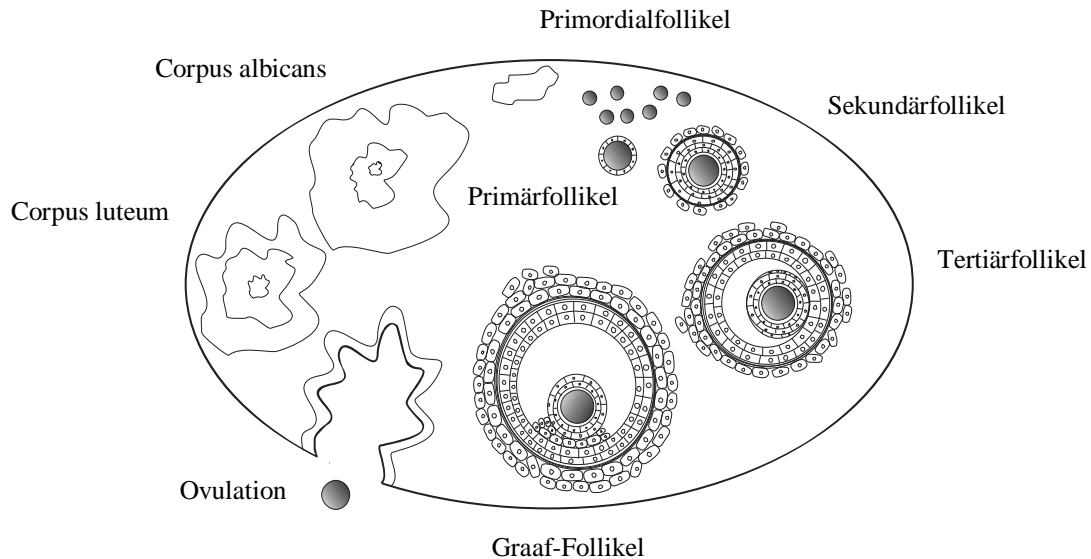


Abb. 1: Unterschiedliche Stadien der Follikelentwicklung. Schema eines Querschnitts durch das Ovar während des Menstruationszyklus der Frau (modifiziert nach YAO und BAHR 1998).

2.2 Die endokrine Kontrolle der Follikelentwicklung

Obwohl die Faktoren, die die Initiierung des Wachstums der Primordialfollikel steuern, bis heute nicht ganz geklärt sind, ist die endokrine Kontrolle des Follikelwachstums schon seit vielen Jahren bekannt (FORTUNE 2003). Die Follikelentwicklung wird sowohl von Hormonen des endokrinen Systems als auch von lokalen autokrinen und parakrinen Aktionen intraovarieller Substanzen, wie z.B. des Wachstumsfaktors IGF beeinflusst (vgl. Abschnitt 2.3 und 2.4) (FORTUNE et al. 2001; WEBB et al. 2003). Die Wechselbeziehungen der Peptide und der Steroidhormone im Ovar sind entscheidend für das Follikelwachstum, die Ovulation und die Luteolyse (RICHARDS et al. 2002; GINTHER et al. 2008). Laut aktueller Forschungsergebnisse, ist die prä-antrale Phase der Follikelentwicklung von lokalen Substanzen abhängig, während die Gonadotropine nur eine unterstützende Funktion einnehmen. Im Gegensatz dazu spielen die Gonadotropine während der antralen Phase eine entscheidende Rolle, während die lokalen Substanzen möglicherweise nur eine unterstützende Rolle einnehmen (MONGET und BONDY 2000; BRITT und FINDLAY 2002).

Der ovarielle Zyklus wird durch neuroendokrine Wechselwirkungen zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Ovar gesteuert. Es kommt dabei zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Gewebe des Reproduktionstrakts (BERGA 1998). Der Hypothalamus befindet sich in der Region des Diencephalus und spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Regulation der weiblichen Reproduktionsfunktion. Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) ist ein Dekapeptid, das vom Hypothalamus (im Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis) über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem in den

Hypophysenvorderlappen gelangt und dort in wenigen Minuten die Synthese und pulsierende Freisetzung von Glykoproteinen bewirkt (FERIN 1998; PETRIDES 2003). Diese werden als Gonadotropine bezeichnet und nehmen als follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH), in einer zeitlich und quantitativ fein abgestimmten Relation, klar definierbare, anatomische Veränderungen am Ovar vor. Zu diesen gehören die Follikelreifung, die Ovulation, die Corpus-luteum-Bildung und die Produktion der Steroidhormone (LEICHTWEIß und SCHRÖDER 1996; KILEN und SCHWARTZ 1998).

Die Gonadotropinrezeptoren sind G-Proteine, die sich in der Zellmembran der Follikelzellen befinden. Dort lagert sich das FSH am FSH-Rezeptor (FSH-R) der Granulosazellen an und das LH am LH-spezifischen Rezeptor, der zunächst nur bei den Thekazellen vorhanden ist. Während der Reifung des präovulatorischen Follikels finden sich die Rezeptoren auch in der Membran der Granulosazellen. LH stimuliert sowohl die Teilung von Thekazellen als auch ihre Androgenproduktion (OLIVER et al. 1998; VOORHIS 1998b). Durch die Anlagerung von LH an den LH-Rezeptor (LH-R) der Thekazellen wird die zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Produktion und die Umwandlung von Cholesterin zu Androgenen stimuliert. Dieses verteilt sich durch die Blutzirkulation und durchdringt die Zellwände der Granulosazellen. Mit der Anlagerung von FSH an den FSH-Rezeptor wird ebenfalls die cAMP-Produktion angeregt, die ihrerseits das aromatisierende Enzym (Aromatase Cytochrom P450) stimuliert, welches notwendig ist, um die Androgene der Thekazellen in Östrogene umzuwandeln (Abb. 2) (HILLIER et al. 1994; YOSHINAGA 1998).

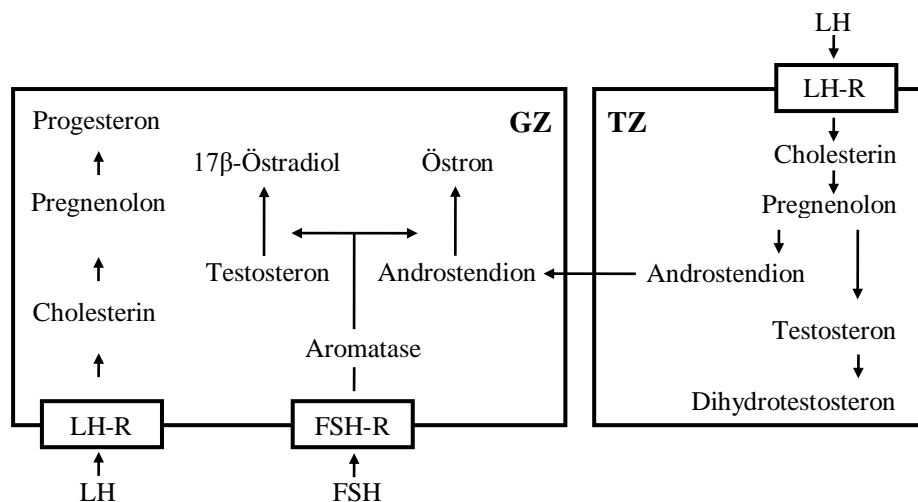


Abb. 2: Zwei-Zell / Zwei-Gonadotropin-Theorie für die Steroidgenese der Follikel (GZ = Granulosazellen, TZ = Thekazellen) (modifiziert nach VOORHIS 1998a).

Der Anstieg des FSH im Blut bewirkt eine Zunahme von FSH-Rezeptoren in den Granulosazellen und dies führt zu einer Steigerung der Östrogensekretion, die eine weitere

Proliferation von Granulosazellen, das Follikelwachstum und einen Anstieg der Östrogenrezeptoren in den Granulosazellen bewirkt (HILLIER 2000; FINDLAY et al. 2001). Die Follikelgröße und die Anzahl der Granulosazellen steigen parallel mit dem Östrogenspiegel an. Bei Frauen bewirkt die zunehmende Östrogenproduktion im Laufe der ersten zwei Wochen des ovariellen Zyklus einen Abfall von FSH (negatives Feedback) und verhindert die Entwicklung von benachbarten Follikeln des dominanten Follikels (GOLENHOFEN 1997; ZELEZNIK 2001). Der dominante Follikel zeigt eine vermehrte Aromataseaktivität im Vergleich zu den anderen Follikeln und bildet so trotz der Senkung der FSH-Konzentration weiterhin Östrogene (GOUGEON 1996; DRUMMOND 2006). Außerdem bildet der dominante Follikel unter anderem in seinen Granulosazellen Inhibin, das zusammen mit dem hohen peripheren Östrogenspiegel in einem negativen Feedback (Hemmung der FSH-Freisetzung) die Reifung der „unterlegenen“ Follikel blockiert (GREENSTEIN und RAUE 1996; YING und ZHANG 1998). Verschiedene Forschungsergebnisse demonstrieren, dass intraovarielle Faktoren wie hohe Konzentration an freiem IGF-I und -II im dominanten Follikel, z.B. für das weitere Wachstum des Follikels und seiner Östrogenproduktion eine Rolle spielen (CHANDRASEKHER et al. (1995), BAKER und SPEARS (1999) und GINTHER et al. (2001)).

Der stark ansteigende Östrogenspiegel löst über ein positives Feedback den LH-Gipfel aus. Dieses Hormon ist mit der Phase der Follikeldominanz verbunden und stimuliert die Endreifung der Oozyte und die Ovulation (GINTHER et al. 2001). Mit dem Anstieg des LH-Spiegels verändern sich die Granulosazellen, die Proliferation ist reduziert und es wird vermehrt Progesteron gebildet. Wichtige Enzyme sind das Cholesterol side chain cleavage enzym (P450_{scc}), das zur Bildung von Pregnenolon durch Cholesterol führt, und das Enzym 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) für die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron (ADASHI 1994). Der Anstieg der Progesteronkonzentration fördert eine weitere Freisetzung von LH (MEINHARDT und SEITZ 2003). In den *in vitro* - Untersuchungen lassen sich folgende direkte Auswirkungen des Progesterons auf die Granulosazellen beobachten: Verstärkung des FSH-Effekts, Hemmung der Mitoseaktivität, Senkung der Östrogenproduktion und Hemmung der Apoptose der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel (PELUSO und PAPPALARDO 1994; LUCIANO und PELUSO 1995). Dies zeigt, dass das Progesteron eine wichtige physiologische Rolle während der präovulatorischen Phase spielt (MAHESH und BRANN 1998; CHAFFIN und STOUFFER 2000 und 2002; SVENSSON et al. 2000).

Während des präovulatorischen Anstiegs von LH kommt es unter Vermittlung von Prostaglandinen zur Freisetzung proteolytischer Enzyme, woraufhin es zur Ovulation kommt. Diese Aktivität der proteolytischen Enzyme ist auch durch den lokalen Anstieg der Progesteronkonzentration im Follikel kurz vor der Ovulation erhöht (GRAHAM und CLARKE 1997; ESPEY 1998). Dieser Prozess des Übergangs vom Follikel zum Gelbkörper

(Corpus luteum), welcher hauptsächlich Progesteron produziert, wird als Luteinisierung bezeichnet (ZELEZNIK 1998). Im Falle der Befruchtung beeinflusst das Progesteron den Transport der Zygote und erzeugt ein Milieu im Uterus, das optimal für die Einnistung einer Blastozyste ist. Falls keine Befruchtung stattfindet, kommt es zur Rückbildung des Corpus luteum (Luteolyse), die sowohl durch uterines Prostaglandin $F_{2\alpha}$ als auch durch die Abnahme der LH-Konzentration ausgelöst wird (MCCRACKEN 1998; MEINHARDT und SEITZ 2003).

2.3 Das Intraovarielle Insulin-like Growth Factor (IGF) - System

Zum besseren Verständnis der Reproduktion sind lokale Regulatoren des Follikelwachstums, wie z.B. IGF-I, von großem Interesse, sodass im Folgenden auf die Bedeutung dieses Hormons näher eingegangen werden soll.

Das derzeit bekannte IGF-System besteht aus IGF-I und -II, zwei Rezeptoren, sechs Bindungsproteinen (IGFBP-1 bis -6) und IGFBP-Proteasen. IGF-I und sein Strukturhomolog IGF-II, gehören zu der Familie der Wachstumsfaktoren, die dem Proinsulin strukturell und funktionell ähnlich sind (ADASHI 1998; BEHL und KAUL 2002). RINDERKNECHT und HUMBEL (1978 a,b) präsentieren erstmals die Isolierung und die Sequenz von IGF-I und IGF-II. Es handelt sich dabei um Peptide von niedrigem Molekulargewicht (ca. 7,5 kDa) mit vielfältigen Wirkungen auf das Zellwachstum und den Stoffwechsel. Bei Frauen zeigen IGF-I und -II eine Homologie von etwa 62 % (HERINGTON 1991; YOSHIMURA 1998) und beide entsprechen auch in 55 % dem Proinsulin (HAMMOND 1998), was darauf hindeutet, dass möglicherweise eine evolutionäre Verbindung zwischen ihnen besteht (GEISTHOVEL et al. 1990; PORETSKY et al. 1999; DOU et al. 2006). Die Leber ist der Hauptort der IGF-I-Synthese und wird vom Wachstumshormon (Growth hormone, GH) und dem Ernährungszustand reguliert bzw. beeinflusst (JANSEN et al. 1983; DRUCKMANN und ROHR 2002; HORN et al. 2002). IGF-I wird aber auch in anderen Geweben gebildet, wie z.B. im Ovar, wo die Produktion sowohl von verschiedenen Faktoren, wie FSH und Östrogenen als auch von GH bestimmt wird (LEROITH und ROBERTS 1991; FINDLAY 1991; YOSHIMURA et al. 1996).

Die physiologische Wirkung von IGF wird durch zwei verschiedene Typen (I und II) von spezifischen Zellmembranrezeptoren vermittelt (HERINGTON 1991). Der Typ I-Rezeptor bindet vorzugsweise IGF-I, der Typ II entsprechend IGF-II (JONES und CLEMMONS 1995; LEROITH et al. 1995). Der Typ I-Rezeptor, ein Glykoprotein mit einer Tyrosinkinaseaktivität, zeigt sich in seiner Struktur und seinen Funktionen ähnlich den Rezeptoren des Insulins (SASAKI et al. 1985; JONES und CLEMMONS 1995). Die Verbindung des IGF fördert die Autophosphorylierung dieses Rezeptors und damit wird eine Enzym-Kaskade von nachfolgenden Ereignissen ausgelöst. Diese Ereignisse dienen als Signal

dafür, dass das Wachstum, der Stoffwechsel und die Ausdifferenzierung der Zellen stimuliert werden (DE MEYTS et al. 1994; LEROITH et al. 1995). Der Typ II-Rezeptor ist strukturell homolog mit dem Mannose-6-Rezeptor und scheint am Abbau des IGF-II mitzuwirken (MONGET et al. 1996). Beide Rezeptoren (Typ I und Typ II) befinden sich in den Granulosazellen des Follikels der bisher erforschten Spezies wie Primaten, Schweinen und Schafen (MAZERBOURG et al. 2003). Der physiologische Effekt von IGF-I wird primär via Typ I-Rezeptor übermittelt, auch scheinen in den meisten Fällen die metabolischen und wachstumsfördernden Aktionen von IGF-II nicht über den Typ II-Rezeptor, sondern über den Typ I zu erfolgen (WILLIS et al. 1998).

Der überwiegende Teil des im Blut oder der Gewebeflüssigkeit zirkulierenden IGF ist an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Die IGFBP sind eine Familie von sechs beschriebenen Proteinen und üben sowohl inhibitorische, als auch stimulierende Einflüsse auf die Funktionen der IGF aus, die für die Koordination und Regulierung der biologischen Aktivitäten der IGF essentiell sind (SPICER und ECHTERNKAMP 1995; HWA et al. 1999). Zu den Funktionen der IGFBP gehören ihre Rolle als Transportsystem für IGF im Plasma, sie verlängern die Halbwertszeit der zirkulierenden IGF, regulieren den Stoffwechsel der IGF und modulieren auch direkt die Wechselwirkung zwischen IGF und seinen Rezeptoren, womit sie indirekt auch seine biologischen Funktionen kontrollieren (MONGET et al. 1996; RAJARAM et al. 1997). Das Zusammenwirken von IGF und IGFBP ist in einigen Prozessen der Reproduktionsphysiologie von Bedeutung, einschließlich der Reifung der Oozyten und der Ovulation. So kann beispielsweise eine Veränderung in diesem IGF-IGFBP System Hormonstörungen und Unfruchtbarkeit verursachen (PORETSKY et al. 1999). Untersuchungen zeigen, dass die Lokalisierung, Synthese und Konzentration der IGFBP während des Follikelwachstums von Granulosa- und Thekazellen sowie von der Größe des Follikels abhängig sind und durch IGF-I und die Gonadotropine reguliert werden (MASON et al. 1993; WEBB et al. 2003).

2.3.1 Die Rolle des IGF-I bei der Follikelentwicklung

Einer der ersten Beweise für die wichtige Rolle des IGF-I im ovariellen System, wird von ADASHI et al. (1985) und von DAVOREN und HSUEH postuliert (1986). Die Rolle der IGFs in der Regulierung der ovariellen Funktionen wird durch Experimente mit IGF-Knockout-Mäusen bestätigt. Dabei wird die Follikelgenese der sog. IGF-Knockout-Mäuse vor der antralen Phase der Follikelentwicklung gestoppt, was zu einer fehlenden Gonadotropinreaktion der Follikel führt (BAKER et al. 1996; ZHOU et al. 1997). Ein anderer Beleg für die Rolle des IGF in der Ovarphysiologie ist die Steigerung der Konzentration des zirkulierenden IGF-I während der Pubertät. Dies ist ein normales Ereignis bei Säugetieren und wird durch Untersuchungen beim Menschen (BLOGOWSKA et al.

2003), bei Pavianen (COPELAND et al. 1982), Schimpansen (COPELAND et al. 1985), sowie Rhesusaffen (STYNE 1991) und Ratten (HINEY et al. 1996) bestätigt. Die IGFs spielen jedoch bei den einzelnen Spezies in den verschiedenen Stadien der Follikelgenese eine unterschiedliche Rolle. Außerdem gibt es Unterschiede bezüglich des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von Komponenten des IGF-Systems. Tabelle 1 veranschaulicht dies. Diese Unterschiede in der Lokalisierung der IGFs zeigen, dass die Faktoren in den einzelnen Phasen verschiedene Funktionen beim Follikelwachstum der Spezies haben.

Tabelle 1: Variation von IGF-I und IGF-II während der Follikelentwicklung*. ++ (hoch exprimiert); + (mäßig exprimiert); 0 (nicht exprimiert); ↑ (Vermehrung); ↔ (kein Unterschied); ↓ (Verminderung); (oz) in Oocyte; (?) kontroverse Ergebnisse bei verschiedenen Untersuchungen; (leere Felder: keine Informationen). Modifiziert nach SPICER und ECHTERNKAMP (1995), SCHAMS et al. 1999, MAZERBOURG et al. (2003) und HASTIE et al. (2004).

		Follikel-			
		Granulosa	Theka	Entwicklung	Atresie
Mensch	IGF-I	0	+		
	IGF-II	+ ^(oz)	0	↑	
Primat [Weißbüschelaffen]	IGF-I	0	0		
	IGF-II	[+]	[+ ^(ab antral F.)]	[↔]	
Schwein	IGF-I	++	+	↑ / ↔ ^(?)	
	IGF-II		+	↑	↔
Rind	IGF-I	+	+	↑	
	IGF-II	0	+	↑ / ↔ ^(?)	↓
Schaf	IGF-I	+	+	↔	
	IGF-II	0	++	↓	↔
Ratte	IGF-I	+			↓
	IGF-II	0	0 ^(?)		
Mäus	IGF-I	+	0	↑	↓
	IGF-II	0	0		

IGF-I kann bezüglich der Steuerung der Ovarfunktion sowohl eine endokrine als auch eine auto/parakrine Wirkung haben. Bei der endokrinen Wirkung wird IGF-I in der Leber produziert und erreicht das Ovar über den Blutkreislauf (ARMSTRONG und WEBB 1997) und bei der auto/parakrinen Wirkung wird es in den Granulosazellen und/oder in den Thekazellen hergestellt und wirkt entweder in den Zellen in denen es gebildet wird oder in den benachbarten Zellen (CHANDRASHEKAR et al. 2004). *In vitro* - Untersuchungen bei Ratten (ADASHI 1995; ADASHI et al. 1997), Schweinen (SAMARAS et al. 1996; ZHOU et al. 1996), Mäusen (WANDJI et al. 1998), Rindern (SCHAMS et al. 1999) und Schafen (HASTIE und HARESIGN 2006) zeigen, dass IGF-I im Ovar exprimiert wird. Es wird vermutet, dass IGF-I eine autokrine Funktion bei den Granulosazellen hat. Im Gegensatz dazu ist mRNA von IGF-I nur in den Thekazellen der kleinen Follikel im humanen Ovar

nachzuweisen (EL-ROEIY et al. 1993). Nach GIUDICE (1992) kann IGF-I möglicherweise in den Thekazellen mit einer parakrinen Funktion den Gonadotropineffekt auf die Mitogenese und die Differenzierung der Granulosazellen unterstützen. Die mRNA von IGF-II ist in höherer Konzentration in Granulosazellen von Frauen (EL-ROEIY et al. 1993 und 1994). IGF-I und IGF-II lassen sich in der Follikelflüssigkeit im Ovar von erwachsenen Frauen nachweisen und es ist zu vermuten, dass IGF-I in der Follikelflüssigkeit aus der peripheren Zirkulation stammt, während IGF-II aus lokaler Produktion des Ovars stammt (ROMÃO 1998; GIUDICE 2001). Diese Beobachtungen lassen die Annahme zu, dass IGF-I eine endokrine und parakrine Wirkung bei der Regulierung der Steroidgenese im humanen Ovar hat.

In vitro - Untersuchungen zeigen weiterhin, dass die Steroidhormonsekretion der Granulosazellen von Frauen durch IGF-I induziert wird (ERICKSON et al. 1989 und 1991; ZHAO et al. 1998). Auch in den Thekazellen von Ratten erhöht IGF-I in Kombination mit LH die Anzahl der LH-Rezeptoren und fördert die Androgensekretion (MAGOFFIN et al. 1990; KHAMSI et al. 2001). GOMEZ et al. (1993), NARDO et al. (2001) und CHOI et al. (2008) zeigen außerdem, dass IGF-I bei Frauen und Mäusen eine Rolle in der Oozytenreifung spielt. Nach LOUHIO et al. (2000); YANG und RAJAMAHENDRAN (2000) wirken IGF-I bei Rindern als ein Überlebensfaktor für die Follikel während der frühen Follikelwachstumsstadien.

Die Lokalisation der intraovariellen Komponenten des IGF-Systems des Weißbüschelaffen unterscheidet sich vom Menschen. RODWAY (1994) hat nachgewiesen, dass die Menge von mRNA von IGF-I mit den folliculären Wachstumsphasen variiert. Bei den Primärfollikeln kommt diese mRNA nur in den Granulosazellen vor. Ab den großen Sekundärfollikeln (Antralfollikel) bis zum Ende der Follikelreifung hingegen ist IGF-I sowohl in den Granulosa- als auch in den Thekazellen nachweisbar. Während der präovulatorischen Phase und auch der Lutealphase lassen sich vergleichbare IGF-Konzentrationen im Ovar messen. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass der Einfluss von IGF-I auf die Steroidgenese in den Granulosazellen sowohl auf parakrine als auch auf autokrine Weise erfolgt. Eine *In vitro* - Untersuchung zeigt, dass der Einfluss des IGF-I auf die ovariellen Zellen von Weißbüschelaffen von der Entwicklungsphase der Follikel abhängt, d.h. dass die Zellen während der Follikelentwicklung die Fähigkeit erwerben, auf IGF-I zu reagieren (SHAW et al. 1993).

Der Einfluss von Wachstumsfaktoren, z.B. IGF-I auf das Wachstum und die Steroidproduktion von Granulosazellen wird in verschiedenen Untersuchungen thematisiert - sowohl beim Menschen (GIUDICE et al. 1996; STEVENSON 2000) als auch bei verschiedenen Tierspezies (bei Primaten: SHAW et al. 1993; RODWAY 1994, Schweinen: HAMMOND et al. 1985; KOLODZIEJCZYK et al. 2003; SIROTKIN 2010, Ratten:

DEMOURA et al. 1997, Mäusen: DEMEESTERE et al. 2004, und Rindern und Schafen: SCHAMS et al. 1988; SPICER et al. 2002). IGF-I induziert sowohl bei Ratten (ADASHI et al. 1992), als auch bei Schweinen (GIUDICE 1992), Menschen (BERGH et al. 1993) und Schafen (MAZERBOURG et al. 2003) die Teilung und die Differenzierung der Granulosazellen, sowie die Steroidgenese in den Thekazellen. RUNE et al. (1992) und TILLMANN et al. (1998) stellen diesbezüglich fest, dass IGF-I beim Weißbüschelaffen das Zellwachstum und die Differenzierung der Zellen fördert, sowie einen Einfluss auf die lokale Steroidgenese hat.

Es scheint, dass die hauptsächliche Funktion der ovariellen IGFs das Zusammenwirken mit den Gonadotropinen ist und dieses in einer Vielfalt von Zellfunktionen, wie Mitogenese und Steroidgenese beobachtet werden kann (SPICER et al. 1993; MONGET und MONNIAUX 1995; RICHARDS 2001; CHANDRASHEKAR et al. 2004; SILVA et al. 2009). Diese Synergie zeigt sich in den Experimenten mit den Granulosazellen von Ratten (ADASHI et al. 1985), Schweinen (GIUDICE 1992; GRADO-AHUIR et al. 2009) und Rindern (STEWART et al. 1995; FORTUNE et al. 2001). Gleichzeitig erhöhen die Gonadotropine die Anzahl von IGF-I-Rezeptoren und stimulieren vermutlich auch die IGF-I-Synthese in den Granulosazellen (LUCY 2000). Beim Weißbüschelaffen vermuten SHAW et al. (1993), dass IGF-I nicht in einer Synergie mit FSH an der Steroidhormonsekretion mitwirkt, sondern mit einem additiven Effekt beiträgt. Im Gegensatz dazu berichten ERICKSON et al. (1989 und 1991) und BERGH et al. (1991), dass es beim Menschen eine synergetische Funktion zwischen IGF-I und FSH gibt. Das wird auch von HUANG et al. (2005) beobachtet, bei deren Untersuchung IGF-I in Kombination mit FSH die Östradiolsekretion bei Granulosazellen induziert. Aber die genaue Rolle des IGF-I in der Regulierung der Steroidhormonsekretion bei Granulosazellen ist noch nicht gänzlich erforscht. Nach MARTINEZ-CHEQUER et al. (2003) erhöht IGF-I im Zusammenspiel mit LH die Progesteronproduktion bei dem sich entwickelnden Follikel. In der gleichen Untersuchung wird festgestellt, dass IGF-I die Produktion von vasoendothelialen Wachstumsfaktoren stimuliert und dass diese wesentlich für die Angiogenese des präovulatorischen Follikels und des Corpus luteum sind.

Die Weißbüschelaffen sind eine Spezies von Primaten, die in Bezug auf den ovariellen Zyklus Ähnlichkeiten mit dem Menschen haben (HILLER et al. 1987). Trotz dieser gewissen Ähnlichkeit in der ovariellen Physiologie von weiblichen Weißbüschelaffen und Frauen muss man hervorheben, dass es auch Unterschiede bezüglich der Lokalisierung eines Teils des IGF-Systems in den Ovarien der beiden Spezies gibt. Die Granulosazellen der Weißbüschelaffen beispielsweise enthalten IGF-I (RODWAY 1994), wohingegen sich in den Granulosazellen von humanen Ovarien fast nur IGF-II nachweisen lässt (ZHOU und BONDY 1993; MAZERBOURG et al. 2003). Trotzdem zeigen *in vitro* - Untersuchungen bei Frauen, dass IGF-I und -II die Sekretion des Östrogens in den Granulosazellen und die Sekretion des

Androgens in den Thekazellen stimulieren (PORETSKY et al. 1999). Trotz der bereits angeführten Forschungsergebnisse ergibt sich kein klares Bild bezüglich der Regulierungsmechanismen, die den Beginn der Follikelphase, die Selektion der Dominantfollikel von den subordinaten Follikel der Kohorte und die Entwicklung der Dominantfollikel bis zur Ovulation steuern (STEVENSON 2000; BEG und GINTHER 2006).

Abschließend lässt sich feststellen, dass IGF-I von besonderer Bedeutung während der Follikelreifung ist. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit der Einfluss von IGF-I sowohl auf die Granulosazellen der kleinen als auch präovulatorischen Follikel und deren Wechselwirkung mit den Gonadotropinen FSH und hCG untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) gehören zur Familie der Krallenaffen (*Callitrichidae*) und leben in den Küstenregenwäldern Ostbrasiens. Sie sind tagaktiv und leben in Familiengruppen (MOYNIHAN 1976). Die Besonderheit im Körperbau, die ihm den Namen gegeben hat, besteht darin, dass er außer bei der Großzehe an Zehen und Fingern Krallen hat (ANKEL-SIMONS 2000). Andere Kennzeichen sind seine geringe Körpergröße, seine gute Anpassungsfähigkeit und seine hohe Fortpflanzungsrate.

Die Geschlechtsreife der Weißbüschelaffen tritt im Alter von 18 – 20 Monaten ein, wobei der Zyklus saisonunabhängig ist. Da die Weibchen keine äußeren Signale für den Östrus, wie zum Beispiel Menstruationsblutungen zeigen (HEARN 1977; ABBOTT und HEARN 1978), muss das Zyklusstadium durch eine Hormonmessung z.B. im Blut (HARLOW et al. 1984) oder durch eine Ultraschalluntersuchung (OERKE et al. 1996) festgestellt werden. Die ovarielle Zyklusdauer beträgt, wie beim Menschen, durchschnittlich 28 Tage. Davon entfallen etwa 10 Tage auf die Follikelphase und 18 Tage auf die Lutealphase (HILLIER et al. 1987). Die Weißbüschelaffen sind polyovulatorische Primaten, d.h. es können pro Zyklus 1–4 präovulatorische Follikel ovulieren. Die Trächtigkeit der Weißbüschelaffen dauert 140 - 145 Tage und es werden Mehrlinge geboren. Innerhalb von zehn Tagen nach der Geburt können die Weibchen wieder schwanger werden (HEARN 1977; TARDIF et al. 2003).

Wegen seiner geringen Größe (Scheitelsteißlänge: 18 - 32 cm, Gewicht: 300 - 500 g), dem leichten Umgang mit ihm, seiner hohen Reproduktionsrate und der ganzjährigen Fortpflanzungsaktivität ist der Weißbüschelaffe für die biomedizinische Forschung im Bereich Reproduktion besonders geeignet (HEARN et al. 1978; MANSFIELD 2003) (Abb. 3). Weitere Gründe sind, dass bereits grundlegende Informationen über die hormonelle Regulation seiner Reproduktion existieren (ABBOTT 1978; HARDING et al. 1982; HARLOW et al. 1984; HODGES 1987; ABBOTT et al. 2003) und die Möglichkeit besteht, den Zyklus mit einer Prostaglandingabe zu kontrollieren (s. Kapitel 3.3).



Abb. 3: Eine kleine Gruppe junger Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) aus der Kolonie des DPZ.

3.2 Haltungsbedingungen

Alle Weißbüschelaffen der Versuche gehören zu der Zuchtkolonie am Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen. Für die Versuche ist jedes Weibchen mit einem männlichen Partner verpaart. Sie leben in Edelstahlkäfigen (0,5 m breit, 0,7 m tief, 1,0 m hoch) mit einer Schlafbox (Edelstahlblech 20 cm x 20 cm x 30 cm). Im Käfig sind mehrere Sitzstangen, Zweige unterschiedlicher Größe, eine Wasserflasche und ein Fressnapf untergebracht. Die Raumtemperatur wird konstant gehalten ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) mit einer Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$. Der Raum wird künstlich zwölf Stunden am Tage beleuchtet, zwölf Stunden dunkel gehalten.

Für die Versuche werden erwachsene, gesunde Weibchen mit einem Alter von drei bis sechs Jahren, einem Gewicht zwischen 290 – 430 g und mit einem regelmäßigen Zyklus genutzt. Die Tabelle 2 zeigt die speziellen Daten wie Tiernummer (W), Gewicht (g), Alter (Jahre) und Zahl vorheriger Schwangerschaften aller Versuchstiere.

Tabelle 2: Versuchstierdaten mit Tiernummer (W), Gewicht (g), Alter (Jahre), Zahl vorheriger Schwangerschaft.

Tier (W Nummer)	Gewicht (g)	Alter (Jahre)	Zahl vorheriger Schwangerschaften
W 411	409	3	0
W 386	426	3	0
W 401	380	3	0
W 435	373	3	0
W 380	408	3	2
W 408	430	4	1
W 453	343	3	0
W 326	336	6	6
W 398	290	5	5
W 454	395	4	0
W 451	378	4	2
W 336	395	6	1
W 351	383	5	6

Die Ernährung ist den Bedürfnissen dieser Spezies angepasst. Weißbüschelaffen sind zwar Allesfresser, haben aber besondere Bedürfnisse in der Form, dass das Futter sehr kalorien- und proteinreich sein muss. Im DPZ besteht der tägliche Speiseplan aus einem Morgenbrei (zusammengestellt aus Milupabrei oder Reisschleim, Obst, Saft, Magerquark, Vitaminen und Mineralien) und einem Mittagessen mit einer Mischung aus Gemüse und Früchten, sowie Reis oder Nudeln, Katzenfutter oder abgekochtem Hühnerfleisch, Wanderheuschrecken oder Mehlwürmern. Zudem gibt es Pellets (SSNIFF, Soest, Deutschland) und Wasser ad libidum.

Die Tiere werden regelmäßig von einer zum DPZ gehörenden Tierärztin veterinärmedizinisch kontrolliert. Um den Stress der Tiere bei den Experimenten zu reduzieren, werden die Weißbüschelaffen vor Versuchsbeginn trainiert selbstständig in ihre Schlafbox zu gehen, damit sie aus dieser mit einem Lederhandschuh entnommen werden können. Bevor sie dann wieder in den Käfig zurück gebracht werden, bekommen sie eine Belohnung in Form einer Multivitaminpaste (Nutri-Cal®; A.Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) oder einer weichen Gummimasse (*Gummi arabicum*).

Diese Versuche wurden, wie im Tierschutzgesetz gefordert, von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt (Nr. 509.42502/08-03.99 (V1)).

3.3 Zykluskontrolle

Sechs Monate vor den Versuchen werden die ovariellen Zyklen der Weibchen kontrolliert, um genau die Zyklusphase zu beobachten und ihre Regelmäßigkeit zu beurteilen. Um den genauen Beginn einer Follikelphase bestimmen zu können, erhalten die weiblichen

Versuchstiere eine einmalige intramuskuläre Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Gabe ($PGF_{2\alpha}$) (Estrumate; Mallinckrodt, Burgwedel, Deutschland) zwischen dem 21. und 23. Zyklustag (10. und 14. Tag der Lutealphase). Durch die Prostaglandingabe wird eine Luteolyse induziert, die zu einem raschen peripheren Abfall der Progesteronblutkonzentration führt. Der Tag nach der Anwendung von $PGF_{2\alpha}$ wird als der erste Tag des neuen Zyklus definiert (SUMMERS et al. 1985; HODGES et al. 1987; EINSPANIER et al. 1997).

Die Kenntnis der Zyklusphase des Weibchens ist notwendig, um den genauen Versuchstag festzulegen. Die Hormonanalyse im Blut ist eine direkte Methode für die Bestimmung des Reproduktionsstatus. Zusätzlich liefert die Ultraschalluntersuchung direkte Ergebnisse über die ovariellen Strukturen (Follikel oder Corpus luteum).

3.3.1 Blutprobenaufarbeitung

Für die Messung des Progesterongehalts wird ein- bis zweimal pro Woche 0,2 ml Blut aus der Vena femoralis mit Hilfe einer 1 ml Einwegspritze (mit Heparin) abgenommen. Die Blutproben werden auf Eis gekühlt und nach Verlassen der Tierräume aufbereitet. Bevor die Tiere in den Käfig zurückkehren, erhalten sie 1 ml eines Eisenpräparats als Anämie-Prophylaxe (Ferrum Hausmann[®]; Sirup; Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg Deutschland), und 1 ml eines Multivitaminpaste als Energiespender. Die Blutproben werden in einer gekühlten Zentrifuge (4 °C) zwanzig Minuten lang bei 4000 Udr/min abzentrifugiert (Universal 30 RF, Zentrifugen Hettich, Lauenau, Deutschland). Anschließend wird das Plasma aliquotiert und bis zur Durchführung der Hormonanalysen nach HEISTERMANN et al. (1993) (s. Kapitel 3.5.2) bei - 20°C eingefroren.

Mit Hilfe des Progesteron-Assays wird der ovarielle Zyklus des weiblichen Weißbüschelaffen über den Progesteronwert im Blut bestimmt. Die Messwerte werden nach HARLOW et al. (1983) eingeordnet. Dies bedeutet, dass sich ein Tier mit einem Progesteronwert kleiner als 10 ng/ml in der Follikelphase befindet. Wird ein Wert über 10 ng/ml erreicht, hat die Ovulation stattgefunden und die Lutealphase beginnt. Die detaillierte Beschreibung für den Progesteron-Assay ist dem Kapitel 3.5.2.1 zu entnehmen.

3.3.2 Die Ultraschalluntersuchung

Eine andere Möglichkeit der Zykluskontrolle ist durch die Ultraschalluntersuchung gegeben. Auf diese Weise ist es möglich, die Struktur der Ovarien und ihre Echotextur zu bestimmen und somit das Vorhandensein von Follikeln sowie deren Wachstum zu überprüfen. Vor jedem Versuch finden zwei Ultraschalluntersuchungen statt, um das Wachstum der Follikel zu beobachten. Für die Untersuchungen, die mit dem GE Logiq 400 Ultraschall-Gerät (Logiq[™] 400, General Electric Medical Systems, Deutschland) mit Color-Doppler und mit

einer linearen Sonde der Frequenz 13 MHz durchgeführt werden, sind die Tiere unsediert und unrasiert. Die generelle Untersuchungszeit beträgt ca. 10 Minuten.

Die erste Untersuchung, am vierten Tag nach der PGF_{2α}-Applikation, wird zur Bestätigung der Follikelphase durchgeführt. An diesem Tag sind schon kleine Follikel zu erkennen. Die antralen Follikel weisen wegen ihres Antrums im Ultraschallbild tief-schwarze Echostrukturen auf. Die Beurteilung erfolgt nach OERKE et al. (1996). Die folgende Ultraschalluntersuchung, drei Tage später (am siebten Tag), dient zur Bestimmung der Anzahl und Größe der präovulatorischen Follikel ($\varnothing > 2$ mm). Bei der Präparation der Ovarien werden die Follikel mit Hilfe eines Messokulars gezählt und die Anzahl dann mit den Daten der Ultraschalluntersuchung verglichen. Die Ultraschalluntersuchung und die Progesteronkontrolle sind die ausschlaggebenden Informationen für den Fortgang des Versuches.

3.4 Zellkulturen von Granulosazellen des Weißbüschelaffen

3.4.1 Die Vorbereitung der Platten

Für die Kulturen der Granulosazellen der Weißbüschelaffen werden Kulturschalen mit vier Vertiefungen benutzt (4-well Platten) (NuncloTM Multischalen; Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE). Ebenso werden Chamber slides (Lab-Tek[®] Chamber SlideTM System; Nalge Nunc International Corp, Naperville, USA), Kulturschalen mit acht Vertiefungen verwendet, deren abnehmbarer Glasboden auch als Objektträger dient, um spezielle histologische Untersuchungen, wie zum Beispiel Übersichtsfärbungen und Apoptosenachweisreaktionen durchzuführen. Die Vorbereitung der Kulturschalen erfolgt am Tag vor dem Versuch, dabei werden die Plattenvertiefungen mit 500 μ l (400 μ l für die Chamber slides) hitze-inaktiviertem (1 h, 56 °C), fetalem Rinderserum (FCS; Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) gefüllt und über Nacht im Brutschrank (CO₂ Brutschrank: B 5061 EK/CO₂; Kendro, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Direkt vor dem Versuch wird das Serum abgesaugt.

Die Zellkulturexperimente erfolgen mit einem serumfreien Medium 199 (M 199) mit 25 mM HEPES (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) (s. Kapitel 9.1 des Anhangs). Der pH-Wert des Mediums ist auf 7,3 eingestellt und wird anschließend mit 20 ml Penicillin /Streptomycin-Lösung (100 IU/ml Penicillin und 100 pg/ml Streptomycin; Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) versetzt. Das Medium wird steril gefiltert und anschließend für 15 min bei 105 °C sterilisiert.

3.4.2 Die Gewinnung der Ovarien

Von insgesamt 13 Weißbüschelaffen werden am 7. Tag der Follikelphase die Ovarien für dieses Projekt gewonnen. Alle Tiere haben reguläre Zyklen, die mindestens sechs Monate lang durch die Induzierung des jeweils neuen Zyklus mit 0,8 µg Cloprosterol (PGF_{2α}) kontrolliert wurden. Der chirurgische Eingriff erfolgt unter Anästhesie mit Saffan (18 mg/Kg) (Calfaxalone + Afadolone; Schering Plough Animal Health, UK) und Diazepam (0,025 mg/Tier) (Ratiopharm, DE). Nach Rasieren des Unterbauches und dessen Desinfektion erfolgt eine mediane Laparotomie unterhalb des Nabels in einer Länge von 2 cm. Nach der Öffnung der *Linea alba* werden Ovarien und Uterus vorgelagert (Abb. 4). Ihre Durchmesser werden mit einer Schublehre ausgemessen und protokolliert. Außerdem wird die Anzahl, Verteilung und Lage der präovulatorischen Follikel festgestellt und protokolliert.

Sodann werden die Ovarien mit Dexon (Dexon HR 13, 5/0 USP, B. Braun-Dexon GmbH, NJ, USA) abgebunden und anschließend mit einer Schere vom übrigen Gewebe abgetrennt und in eine Petrischale überführt, die zuvor mit einem serumfreien, erwärmten Kulturmedium gefüllt wird. Anschließend wird die Bauchdecke wieder in drei Schichten verschlossen: Musculus rectus abdominis, zusammen mit Bauchfell; subkutane Raffungsnaht mit Dexon (Dexon HR 17, 3/0 USP, B. Braun-Dexon GmbH, NJ, USA) und Hautnaht mit Supramid (Supramid HS 15, 3/0 USP, B/Braun Melsungen, Deutschland). Das Tier erhält nach Operationsende eine antibiotische Versorgung und wird nach seinem Erwachen wieder in seinen Käfig mit dem männlichen Partner gesetzt.

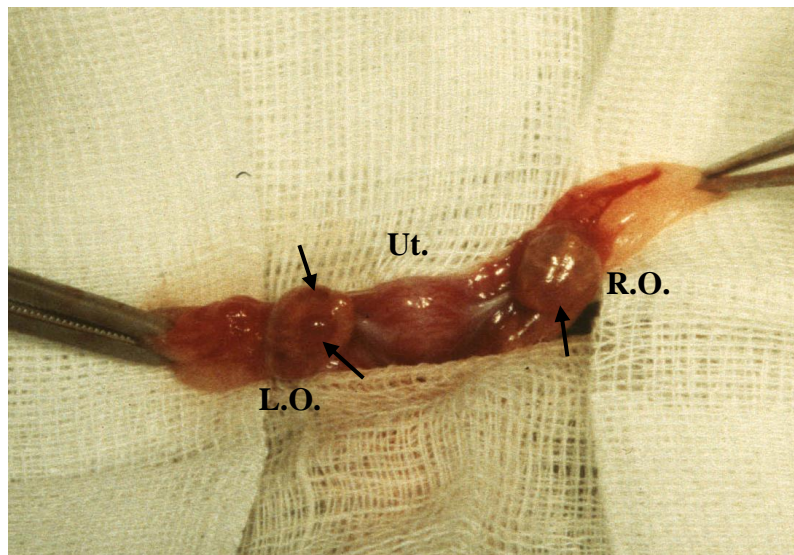


Abb. 4: Ovar und Uterus (Ut) während der Ovariectomie eines Weißbüschelaffenweibchens am Tag 7 der Follikelphase. Das linke Ovar (L.O.) zeigt zwei präovulatorische ($\geq 2\text{mm}$) Follikel (Pfeile). Das rechte Ovar (R.O.) zeigt einen präovulatorischen Follikel (Pfeil).

3.4.3 Die Gewinnung der Granulosazellen

Die Gewinnung der Granulosazellen erfolgt in einer Sterilbank mit Stereolupen (Circular flow: K System, Birkerød, Dänemark; Stereolupen: Stemi SV 8; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einer wärmenden Arbeitsplatte (37 °C). Dabei bleiben die Ovarien die ganze Zeit mit dem Medium in der Petrischale. Die Gewinnung der Granulosazellen und der Zellkulturen erfolgen nach HARLOW et al. (1988) und SHAW et al. (1993).

Zuerst werden die Ovarien mit Hilfe des Messokulars gemessen. Die gewonnenen Ovarien werden unter dem Stereomikroskop mit Hilfe von Pinzetten grob in 2 – 4 Stücke geteilt (Abb. 5). Anschließend erfolgt die Feinpräparation unter dem Mikroskop. Sie hat zum Ziel, die Follikel in zwei Gruppen aufzuteilen: die großen präovulatorischen ($\varnothing > 2$ mm) und die kleinen antralen Follikel ($\varnothing 0,5 - 1$ mm), vgl. HARLOW et al. (1988) und SHAW et al. (1993). Diese Aufteilung erfolgt, um die unterschiedlichen Reaktionen der kleinen und präovulatorischen Follikel auf die verschiedenen Hormonstimulationen zu erforschen. Follikel, die > 1 mm und < 2 mm sind, bilden weniger als 10 % aller Follikel beider Ovarien. Da diese Follikel entweder atretisch sind oder zu den präovulatorischen Follikeln gehören, sind diese Follikel zu vernachlässigen. (SHAW et al. 1993).

Die Follikel werden gezählt und nach ihrer optischen Dichte in normale (= transparente) und atretische (= optisch dichte) Follikel klassifiziert. Nur die normalen werden für die Zellkultur benutzt.



Abb. 5: Aufteilung des Ovars unter dem Stereomikroskop mit Hilfe von Pinzetten.

Die Gewinnung der Granulosazellen erfolgt nach Isolierung der Follikel in beiden definierten Follikelgruppen. Mit der Nadelspitze einer Insulinspritze werden die Follikel

angestochen und die Granulosazellen der kleinen Follikel mit einer feinen Pinzette herausgedrückt. Diese werden dann mittels einer Insulinspritze aufgesogen und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. In gleicher Weise erfolgt die Isolierung der Granulosazellen aus den großen präovulatorischen Follikeln. Als weitere Reinigungsschritte schließen sich ein zweimaliges Zentrifugieren bei 2000 Udr/min für fünf Minuten und das Ersetzen des Überstandes durch ein neues Medium an, und zwar für beide Granulosazellgruppen. Anschließend werden von der Zellsuspension von jeder Gruppe 10 µl entnommen, mit 10 µl Trypanblaulösung (0,4 %: Nr. T 8154; Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland) versetzt und in eine Neubauer Zählkammer (Neubauer, Schütt, Deutschland) pipettiert, um die Konzentration der vitalen Zellen zu bestimmen. Die Farbstofflösung dient hierbei zur Unterscheidung von vitalen und geschädigten Zellen. Das Trypanblau dringt durch die geschädigte Zellmembran und daher werden diese Zellen blau. Die intakten Zellen bleiben farblos und werden gezählt.

3.4.4 Aussaat und Kultur

Die Suspension wird mit dem Kulturmedium auf 5×10^4 vitale Zellen/ml verdünnt und dann werden je 500 µl dieser Zellsuspension in jede Vertiefung der Kulturschalen (4-well Platten) gefüllt. Bei Verwendung von Chamber slides erfolgt die Applikation von 400 µl. Anschließend erfolgt eine Stimulation der Zellen durch Zusätze von humanen FSH (50 ng/ml) (hFSH, United Birmingham Hospitals Trust Funds, Birmingham, England), hCG (50 ng/ml) (hCG, Cr 127; NIH, Bethesda, MD, USA) und IGF-I (10 – 1000 ng/ml) (hIGF-I, lioph.1mg, Lot KJH-101, Product No. GPA Media Grade, Mediagnostic GmbH, Reutlinger, Deutschland) in unterschiedlichen Kombinationen.

Die Tabelle 3 zeigt alle Stimulationsprotokolle. Mit der Kontrollgruppe, d.h. den unstimulierten Zellen gibt es 14 verschiedene Stimulationen. Für jede Kulturplatte wird das gleiche Hormon dreimal für eine 2-tägige Inkubationszeit angesetzt, nur für die Hormonstimulationen S-10 bis S-14 wird eine Prästimulation mit FSH oder mit hCG für die erste Inkubationszeit (1. Abnahme) durchgeführt, sowie eine Stimulation mit IGF-I allein oder in Kombination mit hCG für die zweite und dritte Abnahme. Die genaue Anzahl der Proben (n) werden in der Tabelle 5 (für die Granulosazellen der kleinen Follikel auf Seite 33) und der Tabelle 7 (für die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel auf Seite 43) dargestellt.

Tabelle 3: Stimulationsprotokolle für die kultivierten Granulosazellen der kleinen und präovulatorischen Follikel.

Abkürzung	Abnahmen	Hormonstimulation *
S-0		Kontrolle
S-1		hCG (50 ng/ml)
S-2	1.	FSH (50 ng/ml)
S-3		IGF-I (10 ng/ml)
S-4	2.	IGF-I (50 ng/ml)
S-5	3.	IGF-I (100 ng/ml)
S-6		IGF-I (1000 ng/ml)
S-7		IGF-I (50 ng/ml) + hCG (50 ng/ml)
S-8		IGF-I (100 ng/ml) + hCG (50 ng/ml)
S-9		IGF-I (100 ng/ml) + FSH (50 ng/ml)
		Mit Prästimulation**
S-10	1. 2. und 3.	hCG (50 ng/ml) IGF-I (50 ng/ml)
S-11	1. 2. und 3.	hCG (50 ng/ml) IGF-I (50 ng/ml) + hCG (50 ng/ml)
S-12	1. 2. und 3.	FSH (50 ng/ml) IGF-I (50 ng/ml)
S-13	1. 2. und 3.	FSH (50 ng/ml) IGF-I (50 ng/ml) + hCG (50 ng/ml)
S-14	1. 2. und 3.	FSH (50 ng/ml) IGF-I (100 ng/ml) + hCG (50 ng/ml)

* 1.: erste Stimulation; 2.: zweite Stimulation; 3.: dritte Stimulation

** Prästimulation mit hCG oder FSH für die erste Inkubationszeit (1. Stimulation)

Bereits existierende Untersuchungen (SHAW et al. 1989; SHAW et al. 1993) mit unterschiedlichen Dosierungen von FSH (5 und 30 ng/ml), hCG (1 - 100 ng/ml) und IGF-I (0,3 - 100 ng/ml) ließen noch Fragen offen. In dieser Arbeit werden deshalb verschiedene Dosierungen und deren Kombination untereinander getestet, um ein möglichst umfassendes Bild der Reaktion zu erhalten.

Eine Kulturschale für jede Zellkultur dient als Kontrollmedium, das bedeutet, dass dort während des Versuches keine stimulierenden Hormone zugegeben werden. Die Hormonlösungen werden mit dem Kulturmedium so angesetzt, dass sich mit einem Zusatz von 10 µl die gewünschte Konzentration im Well ergibt. Eine 4-Well-Kulturschale erhält die gleiche Substanzapplikation und Menge. Die plattierten Zellen werden für 48 Stunden in einen Brutschrank bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre (5 % CO₂) inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Medium-Überstand aus den Vertiefungen abgesaugt und gegen je 500 µl Kulturmedium ausgetauscht, das mit Testosteron in der Konzentration 30 µg/100ml Medium (das entspricht: 1 µM/Vertiefung) (4 Androsten 17β-ol-3one, Sigma-Chemical. CO., USA) versetzt ist. Dieses Hormon ist als Vorstufe für die Östradiolproduktion notwendig und erbringt den Beweis, dass die Granulosazellen noch ein intaktes Enzymsystem zur Umwandlung von Testosteron in Östradiol besitzen. Nach weiteren drei Stunden Inkubation

wird das testosteronhaltige Medium abgesaugt und durch neues Medium ohne Testosteron ersetzt. Abschließend erfolgt eine Neustimulation der Zellen mit IGF-I, FSH oder hCG gemäß dem Versuchsprotokoll, wonach die Zellen bis zur neuen Medium-Abnahme nach 48 Stunden im Brutschrank inkubiert werden.

Im Verlauf der Experimente werden drei Inkubationsintervalle von je 48 h durchgeführt, was einer Kulturdauer von sieben Tagen entspricht. Alle gewonnenen Medium-Überstände werden bis zur weiteren Hormonanalyse durch Enzymimmunoassay (EIA) bei - 20°C eingefroren. Die unter Testosteroneinfluss gesammelten Proben, werden auf Östradiol untersucht, während die anderen gesammelten Proben auf ihren Progesterongehalt analysiert werden. Eine optische Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop (CK 2 Inverted Microscope; Olympus Optical CO., Tokyo, Japan) erfolgt im Abstand von 48 h, wofür die Kulturplatten für fünf bis maximal zehn Minuten aus dem Brutschrank genommen werden. Die erste Beurteilung findet schon zwei Stunden nach der Zellaussaat statt, um zu beobachten, ob eine Anheftung der Zellen auf dem Boden der Kulturschalen erfolgt ist. Alle drei Beobachtungen werden protokolliert und fotografiert (Microscope Zeiss, Axiovert 405 M, Deutschland). Die Behandlung der Chamber slides ist identisch. Allerdings folgt hier nach Ende der Kultur eine histologische Untersuchung (s. Kapitel 3.5.1).

3.5 Analytische Messverfahren

3.5.1 Apoptosenachweis

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist durch den physiologischen Prozess einer kontrollierten Auflösung des Kerns charakterisiert. Im Allgemeinen haben Zellen während des Apoptose-Prozesses ein bestimmtes Muster nach dem die Strukturveränderungen in Kern und Zytoplasma erfolgen, einschließlich der schnellen Auflösung der Kerne. Dieser Prozess ist mit einer starken Schädigung des Chromatins und der Spaltung der DNA in Fragmente oligonucleosomaler Länge verbunden und wird durch die Aktivierung von Calcium-abhängigen Endonukleasen eingeleitet. In der Anfangsphase schrumpfen Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien; die Zellmembran bleibt jedoch unbeschädigt. Im Gegensatz dazu erfolgt bei den nekrotischen Zellen eine Kondensation der Kernsubstanz und eine Anschwellung der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran (BURSCH et al. 1990; HENGARTNER 2000).

Um die Apoptose nachzuweisen und von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, erfolgt der Nachweis von fragmentierter DNA, z.B. über die TUNEL-Methode. Die Abkürzung TUNEL steht für „Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) mediated dUTP (deoxyuridine Triphosphate) Nick End Labeling“. Diese Methode ermöglicht eine

in situ - Markierung von DNA-Fragmenten durch Anbindung modifizierter dUTP-Moleküle (GAVRIELI et al. 1992). Das Enzym TdT katalysiert die Polymerisation der Nukleotide an die freien 3'-OH Enden der DNA. Diese Methode bindet vorzugsweise die apoptotischen Zellen im Vergleich zu den nekrotischen Zellen. Die Sensitivität dieser Methode ist extrem hoch, es können einzelne apoptotische Zelle identifiziert werden und das bereits in einer frühen Phase der Apoptose (LUCIANO et al. 2000).

An den in den Chamber Slides kultivierten Zellen wird die TUNEL-Technik mit einem kommerziellen Kit (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche, Mannheim, Deutschland) mit dUTP Molekülen angewandt, die mit einem Fluorescein markiert sind. Nach Beendigung der Kultur werden die Plastikaufsätze von den Objektträgern entfernt und die Zellen an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Es folgt eine Fixierung mit Paraformaldehyd (4 % in PBS, pH 7,4) für 20 Minute und anschließend werden die Objektträger dreimal 5 min in PBS gewaschen. Danach erfolgt eine 60-minütige Inkubation mit der TdT und Fluorescein-dUTP enthaltenden TUNEL-Reaktionslösung (50 µl pro Probe) bei 37 °C in einer dunklen feuchten Kammer. Ein Well pro Objektträger dient als negative Kontrolle und bekommt deshalb nur die Fluorescein-dUTP-Lösung. Nach der Inkubationszeit werden die Lösungen durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt. Und direkt im Anschluss daran werden ein bis zwei Tropfen Dako Fluorescent Mounting Medium (Dakocytomation Inc., Denmark) auf die Objektträger aufgetragen, mit Deckglas übergedeckt und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioPhot mit Fluoreszenzaufsatz, Anregungsfilter: Grün H546; Zeiss, Oberkochen, DE) betrachtet und fotografiert.

3.5.2 Enzymimmunoassay (EIA)

Mit Hilfe des Enzymimmunoassay nach HEISTERMANN et al. (1993) werden die Konzentrationen spezifischer Hormone in den gewonnenen Medium-Überständen wie folgt bestimmt: Das Progesteron wird bei den Granulosazellen nach der Hormonstimulation mit hFSH, hCG und hIGF-I direkt gemessen. Das Östradiol wird bei den Granulosazellen nach drei Stunden Inkubation im testosteronhaltigen Medium (1 µM/Vertiefung) bestimmt. Des Weiteren wird mit dem Enzymimmunoassay in den gewonnenen Plasmaproben Progesteron bestimmt.

Die Vertiefungen der verwendeten Assayplatten (Nunc ImmunoTM Platten, MaxiSorpTM mit 96 Vertiefungen; Nunc GmbH & Co, KG, Wiesbaden, Deutschland) werden zunächst mit spezifischen Antikörpern gegen Immunoglobuline beschichtet (1 µg/150 µl/Vertiefung) und bis zur Verwendung eingefroren (Solid-Phase-Technik). Die immunologische Reaktion in den Vertiefungen der Assayplatten findet an der Plattenwand statt. Die dort platzierten Antikörper (Ak) konkurrieren mit der Hormon-Menge des Medium-Überstands (Antigen - Ag) und den Label-Molekülen (enzymmarkiertes Antigen). Die Markierung des Labels besteht aus einer

Kopplung mit einem Enzym, das in einer zweiten Reaktion ein Substrat umsetzt. Die hiermit verbundene Farbveränderung wird fotometrisch durch Messung der optischen Dichte in einem geeigneten Wellenlängenbereich ermittelt. Auf Grund des Kompetitionsprinzips verhält sich die pro Zeiteinheit gemessene optische Dichte proportional zur Menge des umgesetzten Substrates und umgekehrt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Liganden.

Die verwendeten Ak und Ag, die Kreuzreaktionen der in den EIA verwendeten Antisera sowie die Intra- und Interassayvarianzen sind dem Kapitel 9.3 – 9.5 des Anhangs zu entnehmen.

3.5.2.1 Die Durchführung der Progesteronbestimmung

Die beschichteten Assayplatten mit dem spezifischen Antikörper gegen Immunglobuline wird viermal im Plattenwäscher (Dynatech MRW, Dynatech Technologies, Denkendorf, Deutschland) gewaschen und anschließend ausgeklopft. Danach werden die Proben der Standardkurve, der Granulosazellkulturen sowie der Plasmaproben als Doppelbestimmungen (je 50 µl) in die Vertiefungen pipettiert. Die Standardkurve besteht aus Progesteronstandards, die in Assaypuffer (vgl. Anhang: Kapitel 9.2) verdünnt werden (von 1,25 – 64 pg/50 µl). Dies erfolgt im Falle der Bestimmung des Progesterongehalts in den Plasmaproben im Assaypuffer, der mit Aktivkohle behandeltes Plasma enthält (Charcoal treated plasma, CTP) (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland). Der Anteil von CTP entspricht jeweils der Menge Plasma in den zu messenden Blutproben und dient der Vermeidung von Plasmaeffekten zwischen Standards und Proben. Danach erfolgt in jede Vertiefung die Zugabe von gelabeltem Antigen und polyklonalem Anti-Progesteron IgG zu je 50 µl.

In jedem Assay werden Kontrollproben mit hoher (30 % Bindung, QC high) und niedriger (70 % Bindung, QC low) Progesteronkonzentration eingesetzt. Die Ermittlung von Schwankungen innerhalb und zwischen Assays (Intraassay- und Interassay-Varianz) erfolgt anhand des Variationskoeffizienten (CV %) der Kontrollwerte (vgl. Anhang: Kapitel 9.5).

Die Platten werden mit Frischhaltefolie abgedeckt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert, anschließend gewaschen, auf Zellstoff aufgeklopft und die Vertiefungen mit je 150 µl Substratlösung (17 ml Substratpuffer plus 250 µl TMB-Lösung) (Anhang I) gefüllt. Die nachfolgende Inkubation (1,5 h) unter ständigem Schütteln (Electronic IKA-Schüttler, MTS4, Deutschland) erfolgt bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wird jede Vertiefung mit 50 µl 4 NH₂SO₄ (vgl. Anhang: Kapitel 9.2) gefüllt, um die Reaktion zu stoppen. Dabei verändert sich die Farbe von blau zu gelb.

Die abschließende Messung der optischen Dichte erfolgt in einem Photometer (MRX Elisa Reader: Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland) bei einer Wellenlänge von

405 nm. Die Messergebnisse werden direkt in einen Computer übertragen, wo eine Software aus den Daten automatisch die Standardkurve und die Probenkonzentrationen als Mittelwerte der Doppelbestimmungen errechnet. Wenn der Progesterongehalt der Proben über dem linearen Messbereich des Assays liegt, werden sie mit Assaypuffer entsprechend verdünnt und nochmals gemessen. Die weitere Verarbeitung und Zusammenfassung der Assayergebnisse erfolgt mit einem Excell-Programm (Microsoft® Excell® Office, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3.5.2.2 Die Durchführung der Östradiolbestimmung

Zur Bestimmung der Aromataseaktivität kultivierter Granulosazellen von *Callithrix jacchus* wird die Konzentration von 17 β -Östradiol (E₂) in den Medium-Überständen der Zwischeninkubation bestimmt. Dabei stimmt der Aufbau der EIA im Wesentlichen mit dem bei der Progesteronbestimmung überein. Die Unterschiede liegen in der Anwendung von Östradiol-Standards (0,24 – 100 pg E₂/50 μ l), Label, einem spezifischen Antikörper und einem spezifischen polyklonalen Antikörper (vgl. Anhang: Kapitel 9.3).

Die relative Kreuzaktivität des verwendeten spezifischen Antikörpers gegenüber 17 β -Östradiol und die Intra- und Interassayvarianzen sind dem Kapitel 9.4 und 9.5 des Anhangs zu entnehmen.

3.6 Statistik

Die Daten der einzelnen Versuche (Zellkulturen) und aller Experimente werden analysiert und die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Hormonakkumulation im Medium werden in ng/ml angegeben. Für die Auswertung werden immer zwei Hormonstimulationen in einer Analyse miteinander verglichen, denn die gesamte Anzahl der Hormonstimulationen variiert je nach Zellzahl der Kulturen und folglich der Kulturplatten, deshalb können nicht alle Hormonstimulationen für jedes Versuchstier durchgeführt werden.

Die angewandten Testverfahren erfolgen zuerst als deskriptive Analyse aller Experimente. Danach wird ein weiterer Test - die Mehrebenenanalyse - durchgeführt, um den Durchschnitt der Messwerte aller Tiere vergleichen zu können. Dadurch kann die in der deskriptiven Analyse festgestellte Variabilität berücksichtigt werden. Für alle Tests gilt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Die erhobenen Daten werden mit der Statistiksoftware R-project (Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA) erfasst und analysiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zykluskontrolle

Während der ersten Ultraschalluntersuchung, am vierten Tag nach der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation, sind bereits kleine antrale Follikel beobachtbar. Die Follikel sind als tiefschwarze Echostruktur mit gleichmäßiger Begrenzung zu erkennen (Abb. 6-A). Drei Tage später (am siebten Tag) ermöglicht die gleiche Untersuchung die Bestimmung der Anzahl (Abb. 6-B) und der Größe der präovulatorischen Follikel.

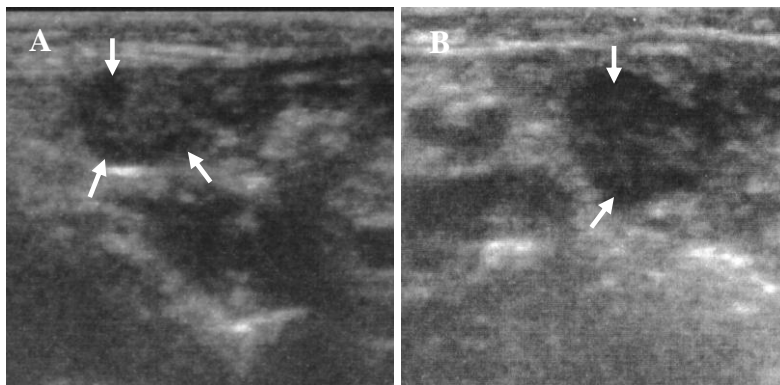


Abb. 6-(A, B): Transabdominale Ultraschallbilder der Ovarien eines Weißbüschelaffen mit einem 13 MHz Schallkopf in transversaler Position. Die Ovarien sind im Ultraschallbild durch ihre echoarme Struktur zu erkennen. (A) Tag 4 der Follikelphase, rechtes Ovar mit drei kleinen Follikeln (Pfeile). (B) Tag 7 der Follikelphase, rechtes Ovar mit zwei präovulatorischen Follikeln (Pfeile).

Die Progesteronwerte im Blut, die auch zur Bestätigung der Follikelphase wichtig sind, werden am vierten und am siebten Tag nach der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation bestimmt. Nur Tiere mit Werten unter 10 ng/ml können für die Zellkultur herangezogen werden (Details verdeutlicht die Tabelle 4).

Die während der Ultraschalluntersuchung festgestellte Größe der präovulatorischen Follikel wird mit der Größe der Follikel während der Zellkulturvorbereitung mittels eines Messokulars verglichen. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Messmethoden zu erkennen (Mittelwerte der Ultraschalluntersuchung $2,99 \pm 0,75$ mm, mit Messokular $3,22 \pm 0,73$ mm)¹. Aufgrund der großen Anzahl von kleinen antralen Follikeln im Ovar, konnte ihre Anzahl nur während der Präparation der Ovarien für die Zellkultur festgestellt werden. Es wurden bis zu 5 präovulatorische Follikel ($2,91 \pm 0,90$) und bis zu 144

¹ (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Student T-test (siehe Tab. 4): $p=0,20$; Größe der präovulatorischen Follikel mittels Ultraschall $n=35$ und mittels Messokulars $n=33$.

kleine Follikel ($97,3 \pm 37,49$) pro Versuch gezählt. Sowohl die Gesamtzahl der Follikel (der kleinen antralen und präovulatorischen) als auch die Anzahl der Granulosazellen variieren beträchtlich zwischen den einzelnen Versuchstieren (vgl. Tab. 4). Durchschnittlich beträgt die Anzahl der Granulosazellen aller kleinen Follikel pro Versuchstier $85,5 \times 10^4$ mit $1,17 \times 10^4$ Zellen pro Follikel und die aller präovulatorischen Follikel 88×10^4 mit 34×10^4 Zellen pro Follikel².

² Bei der Berechnung der Durchschnittswerte wurde die Standardabweichung berücksichtigt.

Tabelle 4: Am 7. Tag der Zellkultur: Plasmaprogesteronwerte (P₄), Ultraschall- und Zellkulturvorbereitungsbefunde bei jedem Versuchstier (W). Die Werte in grau geben die Anzahl der Zellen pro Follikel (x 10⁴) wieder.

Tier	P ₄	Größe (mm) der präovulatorischen Follikel (0 ±SD) A- mittels Ultraschall B- mittels Messokular	Anzahl der präovulatorischen Follikel	Anzahl der kleinen antralen Follikel	Anzahl der Granulosazellen der kleinen (a) und der präovulatorischen (b) Follikel (Zellenanzahl/Follikel) x 10 ⁴	
					a x 10 ⁴ (a/normal)	b x 10 ⁴ (b/Follikel)
	ng/ml	A mm (B mm)	<u>Follikel</u> gesamt (rechts – links)	Follikel gesamt (normal – atretisch)		
W 411	8,65	3,65 ± 0,07 (--)*	2 (2 – 0)	113 (87 – 26)	190 (2,18)	380 (190)
W 386	4,5	4,53 ± 0,15 (4,13 ± 0,15)	3 (2 – 1)	144 (121 – 23)	80 (0,66)	65 (21,66)
W 401	< 1,5	2,76 ± 0,25 (3,63 ± 0,40)	3 (1 – 2)	126 (98 – 28)	98 (1)	106 (35,33)
W 435	1,9	2,50 ± 0,40 (2,70 ± 0,20)	3 (0 – 3)	49 (33 – 16)	17 (0,51)	38 (12,66)
W 380	3,1	2,95 ± 0,42 (3,02 ± 0,17)	4 (1 – 3)	76 (69 – 7)	69 (1)	87 (21,75)
W 408	< 1,5	2,86 ± 0,05 (3,13 ± 0,32)	3 (3 – 0)	120 (106 – 14)	75 (0,70)	31 (10,33)
W 453	4,4	1,46 ± 0,37 (2,16 ± 0,28)	3 (1 – 2)	55 (50 – 5)	94 (1,88)	33 (11)
W 326	3	2,70 ± 0,14 (2,80 ± 0,28)	2 (1 – 1)	50 (45 – 5)	70 (1,55)	37 (18,5)
W 398	< 1,5	3,43 ± 0,20 (4,6 ± 0,36)	3 (1 – 2)	112 (101 – 11)	175 (1,73)	143 (47,66)
W 454	8,1	3,20 ± 0,42 (3,15 ± 0,21)	2 (0 – 2)	156 (137 – 19)	27 (0,19)	20 (10)
W 451	8,2	2,95 ± 0,21 (3,05 ± 0,07)	2 (0 – 2)	82 (76 – 6)	68 (0,89)	20 (10)
W 336	8,5	3,04 ± 0,45 (3,00 ± 0,79)	5 (2 – 3)	57 (54 – 3)	49 (0,90)	96 (19,2)
W 351	8	-	0	125 (50 – 75)	100 (2)	**
gesamt 0 ±SD [n]		2,99 ± 0,75 [35] (3,22 ± 0,73) [33]	2,91 ± 0,90 (re 1,07 ± 0,95) [14] (li 1,61 ± 1,12) [21]	97,3 ± 37,49 [1265] (no 79 ± 32,21) [1027] (at 18,3 ± 19) [238]	85,5 ± 49,8 x 10⁴ [1112 x 10 ⁴] (1,17 x 10⁴)	88 ± 99,9 x 10⁴ [1056 x 10 ⁴] (34 x 10⁴)

* Follikel wurden nicht gemessen

** Für diese Zellen wurde bei diesem Versuchstier keine Zellkultur angelegt

4.2 Kultivierung von Granulosazellen des Weißbüschelaffen

4.2.1 Morphologische Beobachtungen der Zellen während der Kultur

Die morphologische Beobachtung der Zellen soll einen möglichen Unterschied hinsichtlich Struktur und Form der Zellverbände der Kontrollgruppe und der stimulierten Zellen zeigen.

Zwei Stunden nach der Zellaussaat (erste morphologische Beobachtung) heften sich die Zellen an den Boden aller Kulturschalen. Die Erscheinungsform der Zellen ist unter allen Versuchsbedingungen (Kontrolle und IGF-I-, hCG-, FSH-Stimulation) zu diesem Zeitpunkt im Wesentlichen gleich, charakterisiert durch eine homogene Verteilung ohne deutliche Bildung von Zellverbänden (Abb. 7: A1, B1).

Nach 48 Stunden (zweite morphologische Beobachtung) verändert sich das Erscheinungsbild bezüglich Form der Zellen als auch Größe und Struktur der Zellverbände. Diese Veränderung in allen Zellkulturen ist zwischen den Kontrollplatten und den Platten unter Hormonstimulation (IGF-I, FSH, und hCG) zu erkennen. Während der nachfolgenden Beobachtungen, nach 96 und 144 Stunden (dritte und vierte morphologische Beobachtung), sind die gleichen Veränderungen wie nach 48 Stunden zu beobachten. Im Folgenden soll deshalb nur die vierte Beobachtung dargestellt werden.

In der vierten mikroskopischen Beobachtung (nach 144 Stunden) sind auf den Plattenvertiefungen aller Kontrollplatten beider Granulosazellgruppen (der kleinen und präovulatorischen Follikel) deutlich weniger Zellen im Vergleich zu den Platten mit Hormonstimulation zu finden. Sie unterscheiden sich außerdem bezüglich Form und Struktur der Zellverbände. Bei den Granulosazellen der kleinen antralen Follikel zeigen sich zumeist weit verteilte Zellen mit länglichen Formen und wenige, kleine Gruppen mit rundlichen Zellen (Abb. 7: A2). In den Kontrollplatten mit den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel hingegen zeigt die Mehrzahl der Zellen eine rundliche Form, relativ homogen verteilt, und nur ganz vereinzelt Zellen mit länglicher Form (Abb. 7: B2).

Zu diesem Zeitpunkt lassen sich jedoch noch keine charakteristischen Unterschiede zwischen den Zellen mit den jeweiligen Hormonstimulationen beobachten. Deswegen ist es nicht möglich, ein typisches Erscheinungsbild für ein bestimmtes Hormon (z.B. für IGF-I, oder hCG, oder FSH) zu definieren. Allerdings lassen sich folgende Unterschiede beschreiben. Die Mehrzahl der Granulosazellen der kleinen Follikel unter den verschiedenen Hormonstimulationen weist in den unterschiedlichen Formationen von Zellverbänden eine längliche Form auf (Abb. 7: A3). Die Granulosazellen der kleinen antralen Follikel zeigen eine große Anzahl länglicher Zellen mit plasmatischen Ausläufern, die einen größeren Kontakt zwischen den Zellen im Zellverband ermöglichen (Abb. 7: A3). Neben oder über

diesen Zellverbänden befinden sich runde Zellen - vereinzelt oder in kleinen Formationen. Die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel (Abb. 7: B3) zeigen hingegen bei unterschiedlicher Hormonstimulation überwiegend eine rundliche Form und sind homogen oder in kleinen Gruppen verteilt. Seltener sind dagegen längliche Zellen zu beobachten, die sowohl vereinzelt als auch in Gruppen mit plasmatischen Ausläufern auftreten (Abb. 7: B3).

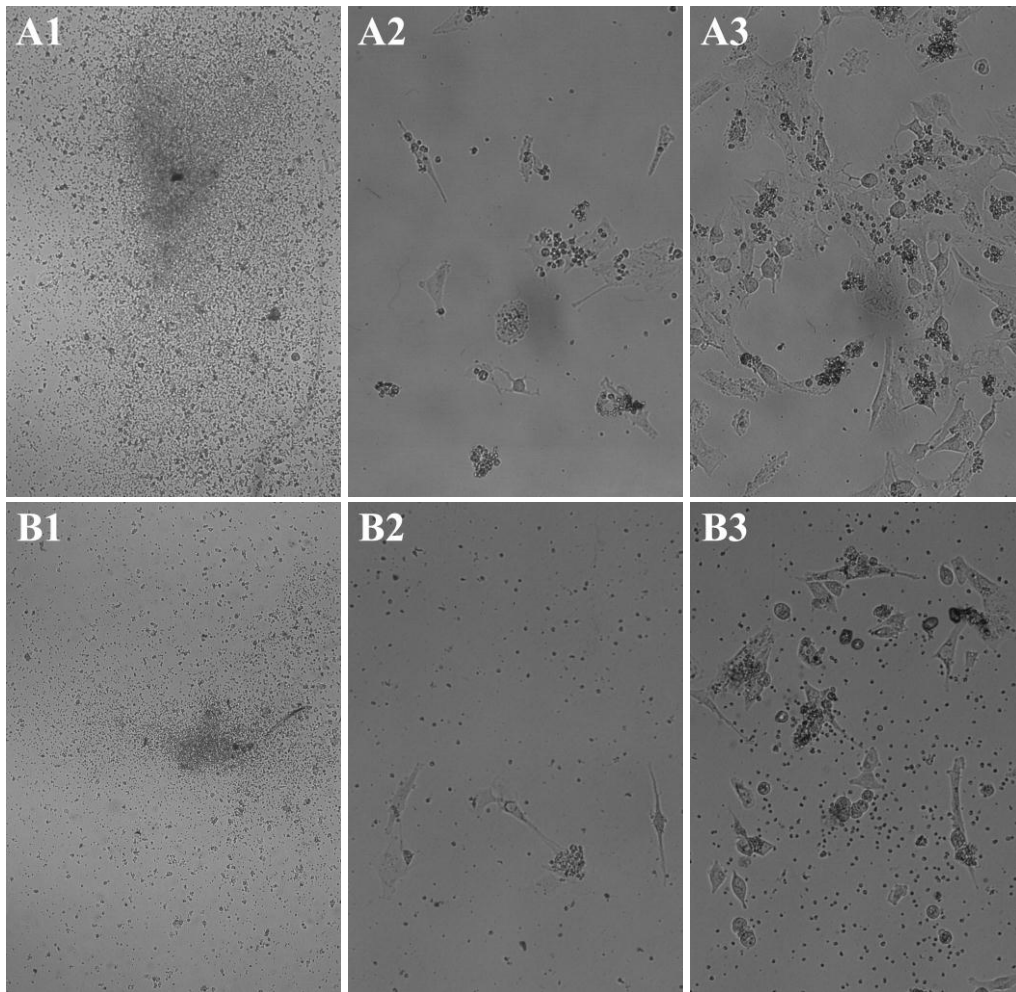


Abb. 7: Optische Beurteilung der Granulosazellen der kleinen antralen (**A**) und der präovulatorischen (**B**) Follikel unter dem Mikroskop.

A1 und B1 (fünffache Vergrößerung: 900): 2 Stunden nach der Zellaussaat. Die Zellen haben eine relativ homogene Verteilung mit einer Zellkonzentration im Zentrum der Plattenvertiefungen.

A2 (zwanzigfache Vergrößerung: 3600): 144 Stunden, Kontrollplatte. In den Plattenvertiefungen gibt es weit verteilte Zellen mit länglichen Formen und wenige, kleine Gruppen mit rundlichen Zellen.

A3 (zwanzigfache Vergrößerung: 3600): 144 Stunden, Zellen unter IGF-I-Stimulation. Die Mehrzahl der Zellen hat eine längliche Form mit plasmatischen Ausläufern in den unterschiedlichen Formationen von Zellverbänden. Neben oder über diesen Gruppen befinden sich runde Zellen.

B2 (zwanzigfache Vergrößerung: 3600): 144 Stunden, Kontrollplatte. Die Mehrzahl der Zellen zeigt eine rundliche Form, relativ homogen verteilt, und nur ganz vereinzelt Zellen mit länglichen Formen.

B3 (zwanzigfache Vergrößerung: 3600): 144 Stunden, Zellen unter einer Kombination von IGF-I und hCG. Die Mehrzahl der Zellen zeigt eine rundliche Form und ist homogen oder in kleinen Gruppen verteilt. Zudem sind ebenfalls längliche Zellen mit plasmatischen Ausläufern zu beobachten.

4.2.2 Apoptosenachweis

Der Apoptosenachweis wird am Ende der Kultur als qualitativer Test durchgeführt, d.h. es wird nur getestet, ob apoptotische Zellen in den Plattenvertiefungen feststellbar sind. Dabei lassen sich apoptotische Zellen mit Hilfe der TUNEL-Technik zur Identifizierung der DNA-Fragmentierung sowohl in den präparierten Objektträgern (Chamber slides) mit den Granulosazellen der kleinen Follikel als auch in denen mit Granulosazellen der präovulatorischen Follikel nachweisen. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen beiden, sind in Abb. 8 nur Granulosazellen der kleinen Follikel dargestellt. Der Zellkern der apoptotischen Zellen leuchtet unter dem Fluoreszenzmikroskop gelblich-grün, die Abbildung 8 verdeutlicht die positiven Zellen als helle Flecken in der Schwarz-Weiß-Aufnahme. Ein deutlicher Unterschied lässt sich dagegen im Vergleich zwischen den Kontrollgruppen und allen Hormonbehandlungen feststellen. Es sind dabei zwar TUNEL-positive Zellen zu erkennen, aber entschieden weniger markierte Zellen als in der Kontrollgruppe ohne Hormonbehandlung (Abb. 8). Zwischen den Hormonbehandlungsgruppen (IGF-I, FSH und hCG) sind unter dem Fluoreszenzmikroskop keine auffälligen Unterschiede feststellbar.

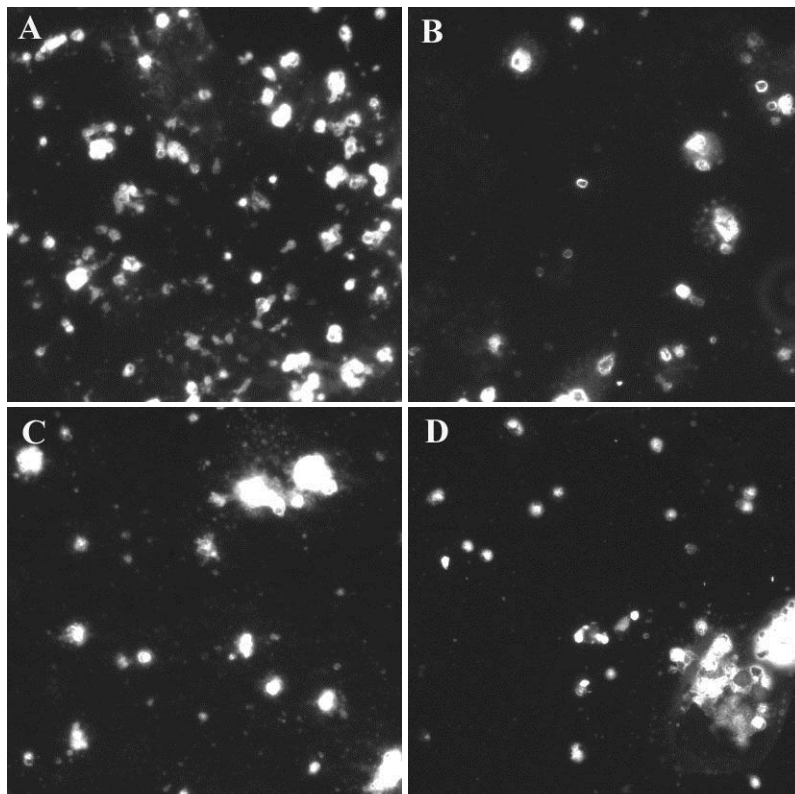


Abb. 8: (zwanzigfache Vergrößerung: 3600) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung des Apoptosenachweises mit TUNEL-Technik an kultivierten Granulosazellen aus kleinen Follikeln. (A) Es lassen sich TUNEL-positive Zellen (weiße Punkte) in den Kontrollplatten beobachten. Für alle Hormonbehandlungsgruppen (B: IGF-I; C: hCG; D: FSH) sind die Befunde im Wesentlichen gleich, zeigen aber deutlich weniger TUNEL-positive Zellen als in der Kontrollgruppe.

4.3 Hormonsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium

Aufgrund der unterschiedlich gewonnenen Menge an Zellen je Versuchstier variieren die Anzahl der Kulturplatten und damit die Anzahl der Hormonstimulationen je Zellkultur. Die Progesteron- und Östradiolakkumulation in den Kulturplatten während des Kulturverlaufs sind als deskriptive Analyse in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Originalwerte der Progesteron- und Östradiolakkumulation (ng/ml) im Medium in den Plattenvertiefungen mit Granulosazellen kleiner Follikel. Dargestellt sind die Anzahl der Proben (n) pro hormoneller Stimulation sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($0 \pm$ SD) in ng/ml während der drei Inkubationszeit - Abnahmen (Abn.). Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-14 mit den Dosierungen findet sich in Tabelle 3 auf Seite 21.

Hormon-stimulation	Progesteronakkumulation (ng/ml)				Östradiolakkumulation (ng/ml)			
		1. Abn.	2. Abn.	3. Abn.		1. Abn.	2. Abn.	3. Abn.
	n	0 (\pm SD)	0 (\pm SD)	0 (\pm SD)	n	0 (\pm SD))	0 (\pm SD)	0 (\pm SD)
S-0	144	0,82 (\pm 1,46)	0,89 (\pm 1,67)	1,06 (\pm 1,07)	108	0,13 (\pm 0,11)	0,10 (\pm 0,06)	0,07 (\pm 0,05)
S-1	144	1,47 (\pm 1,96)	3,41 (\pm 4,10)	4,47 (\pm 4,87)	108	0,19 (\pm 0,14)	0,26 (\pm 0,26)	0,23 (\pm 0,43)
S-2	132	6,56 (\pm 8,81)	21,92 (\pm 19,95)	19,55 (\pm 19,58)	99	0,69 (\pm 0,58)	1,43 (\pm 2,02)	1,07 (\pm 1,71)
S-3	36	1,36 (\pm 1,29)	1,06 (\pm 0,89)	2,90 (\pm 2,84)	18	0,19 (\pm 0,09)	0,17 (\pm 0,05)	0,11 (\pm 0,01)
S-4	96	1,10 (\pm 2,39)	1,47 (\pm 2,04)	4,36 (\pm 4,20)	81	0,18 (\pm 0,15)	0,27 (\pm 0,22)	0,21 (\pm 0,23)
S-5	96	1,32 (\pm 2,35)	1,86 (\pm 2,30)	4,36 (\pm 3,26)	72	0,22 (\pm 0,16)	0,29 (\pm 0,22)	0,24 (\pm 0,20)
S-6	48	2,47 (\pm 3,23)	2,80 (\pm 2,91)	6,03 (\pm 5,89)	36	0,23 (\pm 0,19)	0,20 (\pm 0,12)	0,18 (\pm 0,18)
S-7	72	0,66 (\pm 0,47)	1,75 (\pm 1,97)	3,50 (\pm 3,67)	54	0,15 (\pm 0,04)	0,32 (\pm 0,20)	0,16 (\pm 0,12)
S-8	60	0,66 (\pm 0,47)	2,75 (\pm 2,54)	4,95 (\pm 3,64)	45	0,23 (\pm 0,19)	0,39 (\pm 0,25)	0,25 (\pm 0,15)
S-9	12	4,95 (\pm 0,76)	40,78 (\pm 4,20)	35,80 (\pm 5,08)	9	0,95 (\pm 0,12)	1,55 (\pm 0,06)	1,10 (\pm 0,09)
S-10	24	0,77 (\pm 0,79)	0,05 (\pm 0,03)	0,19 (\pm 0,18)	27	0,09 (\pm 0,07)	0,05 (\pm 0,02)	0,06 (\pm 0,04)
S-11	72	1,38 (\pm 1,28)	1,95 (\pm 1,79)	2,96 (\pm 3,02)	54	0,13 (\pm 0,06)	0,34 (\pm 0,23)	0,17 (\pm 0,11)
S-12	36	1,46 (\pm 1,06)	1,63 (\pm 1,77)	5,35 (\pm 6,19)	36	0,36 (\pm 0,34)	0,24 (\pm 0,28)	0,24 (\pm 0,32)
S-13	84	2,05 (\pm 1,49)	11,13 (\pm 14,76)	17,36 (\pm 29,09)	63	0,45 (\pm 0,35)	1,32 (\pm 2,17)	1,17 (\pm 2,33)
S-14	72	2,39 (\pm 1,96)	9,28 (\pm 12,37)	21,28 (\pm 27,75)	54	0,55 (\pm 0,45)	1,38 (\pm 2,25)	1,44 (\pm 2,69)

Bei den meisten Hormonstimulationsprotokollen ist eine kontinuierlich ansteigende Tendenz der Progesteronsekretion während des Kulturverlaufs zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigt die Östradiolsekretion eine leicht ansteigende Tendenz, obwohl nach der Erhöhung

der Werte in der 2. Abnahme ein geringer Abfall in der 3. Abnahme zu beobachten ist. Sowohl bei der Progesteron- als auch bei der Östradiolsekretion zeigen sich große Schwankungen bezüglich der Hormonsekretion während des Kulturverlaufs. Diese Variabilität spiegelt sich in der Standardabweichung wider (s. Tabelle 5).

Bevor die Ergebnisse weiter analysiert werden können, müssen zwei Probleme, die bei Experimenten mit Tieren auftreten, gelöst werden:

1. Naturgemäß ist die Variation zwischen den Tieren sehr hoch. Um diese Variationen auszugleichen, müsste eine sehr große Anzahl an Versuchstieren verwendet werden.

2. Aus ethischen Gründen ist die Anzahl der Versuchstiere jedoch begrenzt.

Die daraus resultierende hohe Variation der Ergebnisse würde bei Verwendung standardisierter, parametrischer Tests verfälschte Ergebnisse liefern. Die Lösung – um die Vergleichbarkeit und damit die gemeinsame Verwendbarkeit aller Messwerte sicherzustellen – ist die Durchführung einer weiteren Analyse, der Mehrebenenanalyse. Ziel dieser Analyse ist es, durchschnittliche Messwerte aller Tiere zu erhalten, indem die Variation bei ihrer Ermittlung berücksichtigt wird. In der Folge erhält man statt der eigentlichen Messwerte sog. „geschätzte Punktwerte“ (ng/ml). Bei der Analyse werden immer zwei verschiedene Hormonbehandlungen miteinander verglichen. Die Punktwerte spiegeln - jetzt statistisch korrekt - den sog. „zusätzlichen Effekt“ (signifikant, wenn $p < 0,05$) wider. Nur dieser Effekt zeigt quantifizierbar, um wie viel „besser“ eine Hormonbehandlung im Vergleich zu einer anderen ist – und zwar als ein generalisierter, bereinigter und damit vergleichbarer Wert über alle Tiere hinweg. Deshalb wird im Folgenden ausschließlich dieser Begriff verwendet.

Dabei zeigt sich, dass weder die Variabilität der Daten der Versuchstiere (Gewicht, Alter, Zahl vorheriger Schwangerschaften) (s. Tabelle 2) bzw. die Variation der Hormonproduktion der Granulosazellen zwischen den Tieren (s. Tabelle 5) noch die Variation der Anzahl der Zellen pro Follikel (s. Tabelle 4) einen signifikanten Einfluss auf die Progesteron- und Östradiolsekretion haben³. In den Folgenden Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2. werden alle Werte im Detail beschrieben.

³ Mehrebenenanalyse: Anzahl der Beobachtungen: 1128 (P₄) und 864 (E₂); Anzahl der Gruppen: 12. Für P₄ (Gewicht: $p=0,44$; Alter: $p=0,40$; Anzahl vorheriger Schwangerschaften: $p=0,34$; Anzahl der Zellen pro kleiner Follikel: $p=0,81$); für E₂ (Gewicht: $p=0,10$; Alter: $p=0,48$; Anzahl vorheriger Schwangerschaften: $p=0,19$; Anzahl der Zellen pro kleiner Follikel: $p=0,97$).

4.3.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Die Kulturschalen mit den Granulosazellen der kleinen Follikel präsentieren unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (S-1 bis S-14) einen jeweils unterschiedlichen Progesteron Gehalt im Medium im Vergleich zum Kontrollmedium. Die Analyse⁴ aller Zellkulturen unter Berücksichtigung der Abnahmen zeigt einen kontinuierlich ansteigenden Verlauf des Progesteron Gehalts bei den meisten Hormonstimulationsprotokollen. Es zeigt sich kein Effekt ($-2,34 \pm 3,31$ $p=0,16$) in der 1. Abnahme, ein zusätzlicher Effekt von $3,84 \pm 1,22$ ($p<0,0001$) in der 2. Abnahme und schließlich ein größerer zusätzlicher Effekt von $5,96 \pm 1,22$ ($p<0,0001$) in der 3. Abnahme. Die Effekte geben den Unterschied im Progesteron Gehalt bei allen Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen an, wobei der erste Effekt der Progesteronsekretion dem der unstimulierten Zellen entspricht⁵. Vergleicht man die auftretenden Effekte bei den unstimulierten Zellen mit denen der verschiedenen Hormonstimulationen zeigt sich, dass die Zugabe von IGF-I in Kombination mit FSH (S-9) eine starke zusätzliche Wirkung auf die Progesteronsekretion hervorruft. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 graphisch dargestellt.

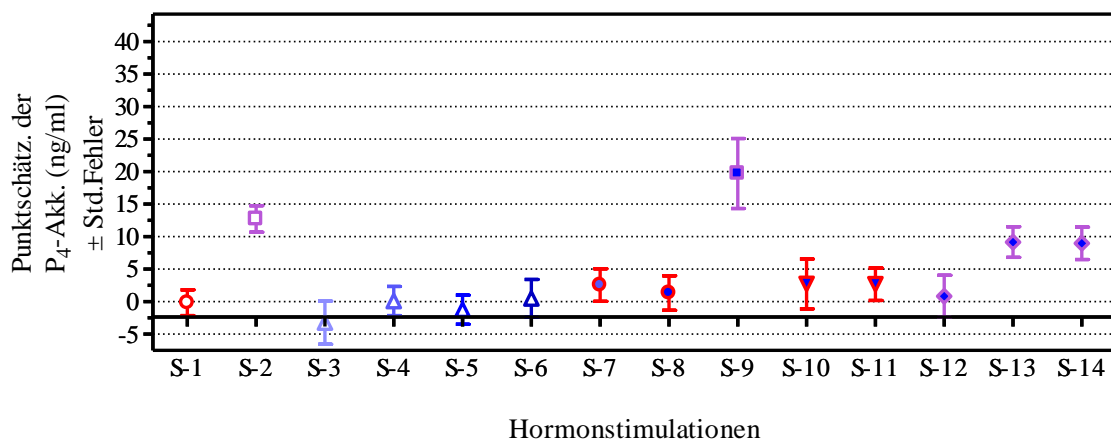


Abb. 9: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Progesteronakkumulation (P₄-Akk.) aller Zellkulturen der Granulosazellen der kleinen Follikel bei den verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zum Kontrollmedium über alle Abnahmen hinweg. Die residuale Modellvariable von 0,37 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (Anzahl der Gruppen: 12; Anzahl der Beobachtungen: 1128). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium S-0. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-14 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

⁴ Mehrebenenanalyse: Für alle Analysen in diesem Abschnitt 4.3.1 sind die Ergebnisse (Messwerte) aller Versuchsbedingungen geschätzte Punktwerte der P₄-Akkumulation $\pm 1,96 \times$ Std.Fehler (K.I. = $[0 \pm 1,96 \sigma]$).

⁵ Die Analyse einer zeitabhängigen Hormonwirkung wird später im Abschnitt 4.5 erläutert.

Ein großer Effekt von $22,04 \pm 5,37$ ($p < 0,0001$) auf die Progesteronsekretion ist bei der Hormonkombination S-9 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu beobachten. Ein zusätzlicher signifikanter Effekt auf den Progesterongehalt im Kulturmedium zeigt sich ebenfalls beim Vergleich von S-9 mit S-5 (alleinige Zugabe von IGF-I) von $20,92 \pm 5,43$ ($p < 0,0001$) bzw. mit S-2 (alleinige Zugabe von FSH) von $6,98 \pm 5,38$ ($p < 0,05$).

Die anderen zwei getesteten Hormonkombinationen (50 ng/ml hCG und 50 ng/ml IGF-I bei S-7 und 50 ng/ml hCG bzw. 100 ng/ml IGF-I bei S-8) produzieren einen geringeren, aber ebenfalls signifikanten zusätzlichen Effekt von $4,90 \pm 2,48$ ($p < 0,001$) bzw. $3,68 \pm 2,64$ ($p < 0,01$) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Ein anderes Ergebnis zeigt sich dagegen beim Vergleich der Effekte der Hormonkombinationen mit den jeweiligen Effekten bei Zugabe der Einzelhormone. Die Kombination mit 100 ng/ml IGF-I (S-8) zeigt keinen Effekt⁶, und die Kombination mit 50 ng/ml IGF-I (S-7) dagegen eine signifikante zusätzliche Progesteronakkumulation im Kulturmedium von $2,71 \pm 2,48$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur alleinigen Zugabe von hCG. Bei Betrachtung von IGF-I allein (S-4) ist dagegen nur ein kleiner additiver Effekt von $2,45 \pm 2,63$ feststellbar, der jedoch nicht signifikant ist ($p = 0,07$).

Wenn IGF-I in verschiedenen Konzentrationen (S-3 bis S-6) allein zugesetzt wird, führen nur 50 und 1000 ng/ml IGF-I (S-4 u. S-6) zu einem geringen signifikanten Effekt von $2,45 \pm 2,24$ ($p < 0,05$) und $2,85 \pm 2,91$ ($p < 0,05$) im Vergleich zum Kontrollmedium. Die anderen zwei Dosierungen von IGF-I (10 und 100 ng/ml) zeigen dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Progesteronsekretion⁷. Betrachtet man alle IGF-I-Applikationen, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Progesteronsekretion⁸.

Vergleicht man beide Gonadotropinstimulationen, hCG (S-1) und FSH (S-2), zeigen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Progesteronsekretion (siehe Abb. 9). Nur die FSH-Zugabe bewirkt eine deutlich erhöhte Progesteronsekretion von $15,05 \pm 2,02$ ($p < 0,0001$) im Vergleich zum Kontrollmedium⁹. Dies bedeutet, dass bei den FSH-stimulierten Zellen ein zusätzlicher Effekt von $12,86 \pm 2,02$ ($p < 0,0001$) auf die Progesteronsekretion im Vergleich zu den hCG-stimulierten Zellen auftritt.

Es schließen sich die Prästimulationsprotokolle S-10 bis S-14 mit den Granulosazellen der kleinen Follikel an. Alle fünf Versuchsbedingungen führen zu einem zusätzlichen signifikanten Effekt auf die Progesteronsekretion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die stärkste Wirkung auf die Progesteronsekretion der Granulosazellen zeigen dabei die

⁶ Hormonkombinationen mit 100 ng/ml IGF-I und 50 ng/ml hCG (S-8): geringer und nicht signifikanter zusätzlicher Effekt von $2,56 \pm 2,79$ ($p = 0,07$) und $1,49 \pm 2,64$ ($p = 0,26$) im Vergleich zu IGF-I allein bzw. hCG allein.

⁷ Effekt von 10 u. 100 ng/ml IGF-I: $-0,86 \pm 3,30$ ($p = 0,60$), $1,12 \pm 2,24$ ($p = 0,32$).

⁸ S-3 vs. S-4 ($-3,31 \pm 3,53$), $p = 0,06$; S-5 ($-1,98 \pm 3,40$), $p = 0,25$; S-6 ($-3,71 \pm 3,71$), $p = 0,05$; S-4 vs. S-5 ($1,33 \pm 2,49$), $p = 0,29$; S-6 ($-0,39 \pm 3,14$), $p = 0,8$;

S-5 vs. S-6 ($-1,73 \pm 3,03$), $p = 0,26$.

⁹ Effekt von hCG: $2,18 \pm 1,96$ ($p = 0,06$).

Hormonkombinationen S-13 und S-14 mit einer vorausgehenden FSH-Prästimulation. Bei beiden sind erhebliche Effekte von $11,50 \pm 2,35$ ($p < 0,0001$) bzw. $11,32 \pm 2,48$ ($p < 0,0001$) beobachtbar. Die anderen drei Stimulationen (S-10 bis S-12) führen zu einem signifikanten, aber schwächeren Effekt von $3,18 \pm 3,23$ ($p < 0,05$) bis $5,06 \pm 3,83$ ($p < 0,01$). Entscheidend ist immer, ob der zusätzliche Effekt auf den Progesteronsekretion auf die Prästimulation zurückgeführt werden kann – also ob mehr Progesteron messbar ist, als bei Zugabe des gleichen Hormons (angesetzt in der zweiten und dritten Abnahme) ohne eine entsprechende Prästimulation. Konkret werden die hCG-Prästimulationen S-10 mit S-4 und S-11 mit S-7 sowie die FSH-Prästimulationen S-12 mit S-4, S-13 mit S-7 und S-14 mit S-8 verglichen. Hier sollte die Prästimulation zu einer signifikanten additiven Progesteronsekretion führen. Es zeigt sich, dass nur die FSH-Prästimulationen bei einer nachfolgenden Hormonkombination mit IGF-I und hCG (S-13 und S-14) einen zusätzlichen signifikanten Effekt von $6,59 \pm 2,69$ ($p < 0,0001$) und $7,63 \pm 2,98$ ($p < 0,0001$) auf die Progesteronsekretion im Vergleich zu S-7 bzw. S-8 aufweisen. Die andere FSH-Prästimulation (S-12) und die beiden hCG-Prästimulationen (S-10 und S-11) zeigen keinen signifikanten Effekt¹⁰.

4.3.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Als Maß für die Aromataseaktivität der kultivierten Granulosazellen der kleinen Follikel dient hierbei die Östradiolakkumulation in den Plattenvertiefungen während einer 3-stündigen Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Hormonstimulationen im testosteronhaltigen Medium. Der Einfluss aller Hormonstimulationen auf die Östradiolsekretion der Zellkulturen mit den Granulosazellen der kleinen Follikel im Vergleich zur Kontrolle ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt und wird im Folgenden diskutiert.

¹⁰ Die Hormonstimulation S-10 im Vergleich zu S-4 zeigt einen Effekt von $2,61 \pm 3,93$ ($p = 0,19$); S-11 im Vergleich zu S-7 einen Effekt von $0,12 \pm 2,78$ ($p = 0,93$) und S-12 im Vergleich zu S-4 einen Effekt von $0,72 \pm 3,35$ ($p = 0,67$).

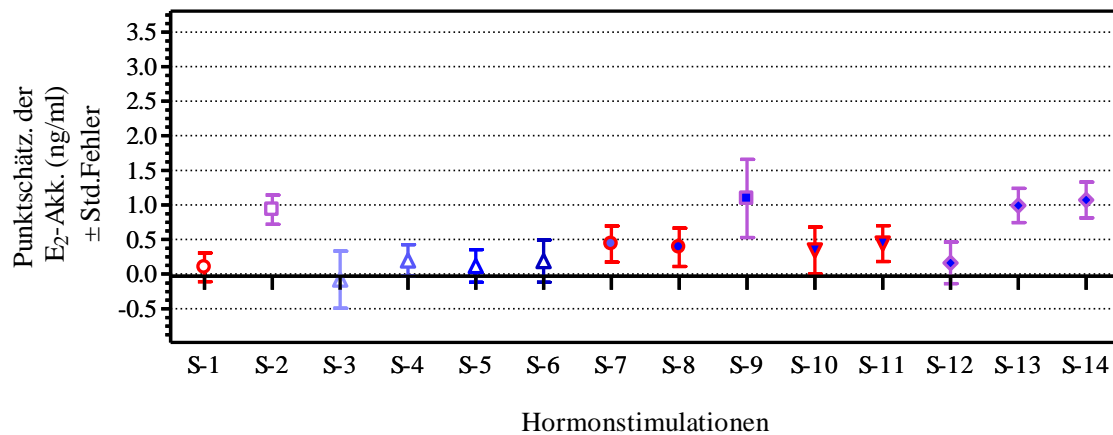


Abb. 10: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Östradiolakkumulation (E_2 -Akk.) aller Zellkulturen der Granulosazellen der kleinen Follikel bei den verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zum Kontrollmedium über alle Abnahmen hinweg. Die residuale Modellvariable von 41 % kann der Variabilität zwischen den Tieren zugeschrieben werden (Anzahl der Beobachtungen: 864 gruppiert in 12 Gruppen). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium (S-0). Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-14 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Die Analyse¹¹ aller Zellkulturen und aller Hormonstimulationen (S-1 bis S-14) unter Berücksichtigung der Mediumabnahmen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zeigt einen ansteigenden Verlauf des Östradiolgehalts im Kulturmedium. Es lässt sich keine Sekretion in der 1. Abnahme beobachten ($-0,03 \pm 0,35$ $p=0,86$), ein zusätzlicher signifikanter Effekt von $0,24 \pm 0,12$ ($p<0,001$) in der 2. Abnahme, und $0,14 \pm 0,12$ ($p<0,05$) in der 3. Abnahme im Vergleich zur 1. Abnahme. Die Effekte geben den Unterschied der Östradiolsekretion der Granulosazellen der kleinen Follikel bei allen Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen an, wobei der erste Effekt der Östradiolsekretion dem der unstimulierten Zellen entspricht¹².

Wenn die auftretenden Effekte bei den unstimulierten Zellen mit den verschiedenen Hormonstimulationen verglichen werden, hat hierbei IGF-I in Kombination mit FSH (S-9), wie bei der Progesteronsekretion, die stärkste zusätzliche Wirkung auf die Östradiolsekretion. Der Effekt ist jedoch geringer als bei der Progesteronsekretion. Die Zugabe dieser Hormonkombination (S-9) führt zu einem signifikanten zusätzlichen Effekt auf die Östradiolsekretion sowohl im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ($1,12 \pm 0,56$ ($p<0,0001$)) als auch bei alleiniger Zugabe von IGF-I ($0,97 \pm 0,57$ ($p<0,001$)). Im Vergleich

¹¹ Mehrebenenanalyse: für alle Analysen in diesem Abschnitt 4.3.2 betragen die Anzahl der Beobachtungen 864 und die Anzahl der Gruppen 12. Die Ergebnisse (Messwerte) sind geschätzte Punktwerte der E_2 -Akkumulation $\pm 1,96 \times$ Std.fehler (K.I. = $[0 \pm 1,96 \sigma]$).

¹² Die Analyse einer zeitabhängigen Hormonwirkung wird später im Abschnitt 4.5 erläutert.

zur alleinigen Zugabe von FSH ist dagegen nur ein kleiner additiver Effekt von $0,16 \pm 0,56$ feststellbar, der nicht signifikant ist ($p=0,57$). Vergleicht man die anderen zwei Hormonstimulationen (50 ng/ml hCG und 50 ng/ml IGF-I bei S-7 und 50 ng/ml hCG und 100 ng/ml IGF-I bei S-8) haben die Granulosazellen der kleinen Follikel sowohl in der Östradiolsekretion als auch in der Progesteronsekretion einen ähnlichen Verlauf. Das heißt, beide Hormonkombinationen rufen eine geringere Östradiolsekretion als S-9 hervor - aber signifikant im Vergleich zu den unstimulierten Zellen - mit einem Effekt von $0,46 \pm 0,26$ ($p<0,001$) für S-7 und von $0,42 \pm 0,27$ ($p<0,005$) für S-8. Vergleicht man jedoch den Effekt der Hormonkombination mit dem einer alleinigen Zugabe des jeweiligen Hormons, bewirkt nur die Hormonkombination mit 50 ng/ml IGF-I und 50 ng/ml hCG (S-7) eine geringe zusätzliche signifikante Östradiolsekretion von $0,33 \pm 0,26$ ($p<0,05$) im Vergleich zur alleinigen Zugabe von hCG¹³.

Wenn IGF-I in verschiedenen Konzentrationen (S-3 bis S-6) allein zugegeben wird, ist im Kulturmedium ein unterschiedlicher zusätzlicher Östradiolgehalt feststellbar. Trotz einer leichten Steigerung der Hormonsekretion von $-0,04 \pm 0,41$ bis $0,22 \pm 0,22$ bei den verschiedenen IGF-I Dosierungen, ist kein signifikanter Effekt zu erkennen ($p>0,05$). Vergleicht man die Effekte der verschiedenen IGF-I-Dosierungen untereinander, sind ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu erkennen¹⁴.

Wenn die beiden Gonadotropine, 50 ng/ml hCG (S-1) und 50 ng/ml FSH (S-2) allein zugesetzt werden, zeigt sich ein Unterschied hinsichtlich der Östradiolsekretion. Nur FSH produziert einen signifikanten zusätzlichen Effekt von $0,96 \pm 0,21$ ($p<0,0001$) auf die Östradiolsekretion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die hCG-Zugabe bedingt dagegen keinen Effekt ($0,12 \pm 0,20$ ($p=0,21$)). Es zeigt sich auch, dass FSH eine stärkere signifikante Wirkung von $0,83 \pm 0,21$ ($p<0,0001$) im Vergleich zu hCG produziert.

Es schließen sich die Prästimulationsprotokolle S-10 bis S-14 mit den Granulosazellen der kleinen Follikel an. Hierbei zeigen alle fünf Versuchsbedingungen eine Erhöhung der Östradiolsekretion im Vergleich zum Kontrollmedium. Nur für S-12 ist der zusätzlich hervorgerufene Effekt von $0,19 \pm 0,30$ nicht signifikant ($p=0,20$). Die stärkste Wirkung auf die Östradiolsekretion wird durch eine FSH-Prästimulation mit einer nachfolgenden Hormonkombination (S-13 und S-14) hervorgerufen. Dabei sind Effekte von $1,02 \pm 0,24$ ($p<0,0001$) bzw. $1,10 \pm 0,26$ ($p<0,0001$) beobachtbar. Die anderen zwei Versuchsbedingungen (S-10 und S-11) führen zu einem signifikanten, aber schwächeren Effekt von $0,37 \pm 0,33$ ($p<0,05$) und $0,47 \pm 0,26$ ($p<0,001$). Auch hier wird überprüft, ob der

¹³ Beide Hormonkombinationen S-7 und S-8 führen zu einer geringen additiven nicht-signifikanten Östradiolsekretion von $0,23 \pm 0,27$ ($p=0,08$) und $0,27 \pm 0,29$ ($p=0,07$) im Vergleich zu IGF-I. Und bei S-8 auch im Vergleich zu hCG ($0,28 \pm 0,27$ ($p=0,05$)).

¹⁴ S-3 vs. S-4 ($-0,27 \pm 0,42$; $p=0,20$), S-5 ($-0,19 \pm 0,42$; $p=0,36$), S-6 ($-0,26 \pm 0,44$; $p=0,24$); S-4 vs. S-5 ($0,07 \pm 0,25$; $p=0,53$), S-6 ($0,008 \pm 0,31$; $p=0,95$); S-5 vs. S-6 ($-0,07 \pm 0,31$; $p=0,65$).

zusätzliche Effekt auf den Östradiolgehalt auf die Prästimulation zurückgeführt werden kann – also ob mehr Östradiol messbar ist, als bei Zugabe des gleichen Hormons (angesetzt in der zweite und der dritte Abnahme) ohne eine entsprechende Prästimulation. Konkret werden die hCG-Prästimulationen S-10 und S-11 mit S-4 bzw. S-7; und die FSH-Prästimulationen S-12, S-13 und S-14 mit S-4, S-7 bzw. S-8 verglichen. Es zeigt sich, dass nur die FSH-Prästimulationen bei einer nachfolgenden Hormonkombination mit IGF-I und hCG (S-13 und S-14) eine zusätzliche signifikante Wirkung von $0,55 \pm 0,28$ ($p < 0,001$) und $0,68 \pm 0,31$ ($p < 0,0001$) auf die Östradiolsekretion im Vergleich zur Zugabe der Hormonkombination ohne Prästimulation (S-7 bzw. S-8) aufweist. Die andere FSH-Prästimulation (S-12) und die beiden hCG-Prästimulationen (S-10 und S-11) zeigen keinen zusätzlichen signifikanten Effekt auf den Östradiolgehalt im Kulturmedium¹⁵.

4.3.3 Zusammenfassung der Hormonsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Betrachtet man alle Kulturmedien mit den Granulosazellen der kleinen Follikel bei allen Hormonstimulationen zeigt sich eine deutlich geringere Östradiolsekretion ($1,12 \pm 0,56$) im Vergleich zu Progesteronsekretion ($22,04 \pm 5,37$). Bei beiden tritt dieser große zusätzliche Effekt bei Zugabe der Hormonkombination FSH und IGF-I (S-9) im Vergleich zum Kontrollmedium auf.

Eine Zusammenfassung der Progesteron- und Östradiolakkumulation im Kulturmedium mit den Granulosazellen der kleinen Follikel unter dem Einfluss der verschiedenen Hormone (S-0 bis S-14) ist in der Tabelle 6 dargestellt.

¹⁵ Die Hormonkombination S-10 im Vergleich zu S-4 zeigt einen Effekt von $0,14 \pm 0,34$ ($p=0,41$); S-11 im Vergleich zu S-7 einen Effekt von $0,006 \pm 0,29$ ($p=0,96$) und S-12 im Vergleich zu S-4 einen Effekt von $-0,03 \pm 0,31$ ($p=0,83$).

Tabelle 6: Überblick über den Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen auf die Progesteron- (P_4) und Östradiolakkumulation (E_2) im Kulturmedium der Granulosazellen der kleinen Follikel. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-14 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Vergleiche	Einfluss auf die P_4 und E_2 -Akkumulation im Kulturmedium der Granulosazellen der kleinen Follikel
P_4 - und E_2 -Akkumulation	P_4 : Kontinuierlich ansteigender Verlauf E_2 : Anstieg in der 2. Abnahme und leichter Rückgang in der 3. Abnahme (Endeffekt aber höher als in 1. Abn.)
S-0 (Kontrolle) vs. Hormonstimulationen: S-1 (hCG) S-2 (FSH) S-3 bis S-6 (IGF-I) S-7 und S-8 (hCG + IGF-I) S-9 (FSH + IGF-I) S-10 und S-11 (hCG-Prä.*) S-12, S-13 und S-14 (FSH-Prä.*)	Stärkster Effekt bei S-9 (IGF-I + FSH) S-9 (IGF-I + FSH): stärkste Steigerung der Steroidhormonsekretion P_4 : IGF-I Dosis (S-3 u. S-5) und hCG (S-1) zeigen keine signifikante Steigerung der Progesteronsekretion. E_2 : S-1, S-3 bis S-6 und S-12 zeigen keine signifikante Steigerung der Östradiolsekretion.
Zwischen den verschiedenen IGF-I-Dosierung (S-3 bis S-6)	Kein signifikanter Unterschied zwischen den Dosierungen
Zwischen S-1 (hCG) und S-2 (FSH)	FSH > hCG**
Hormonkombination: S-7 (hCG + IGF-I) vs. S-4 (IGF-I) oder S-1 (hCG)	(hCG + IGF-I) = (IGF-I) aber > (hCG) **
Hormonkombination: S-8 (hCG + IGF-I) vs. S-5 (IGF-I) oder S-1 (hCG)	(hCG + IGF-I) = (IGF-I) und = (hCG)
Hormonkombination: S-9 (FSH + IGF-I) vs. S-5 (IGF-I) oder S-2 (FSH)	P_4 : (FSH + IGF-I) > (FSH) und > (IGF-I) E_2 : (FSH + IGF-I) = (FSH) aber > (IGF-I)
hCG-Prä*.: S-10 und S-11 vs. S-4 (IGF-I) bzw. S-7 (hCG + IGF-I)	Keine signifikante Steigerung der Steroidhormonsekretion
FSH-Prä*.: S-12, S-13 und S-14 vs. S-4 (IGF-I), S-7 bzw. S-8 (hCG + IGF-I)	Keine signifikante Steigerung der Steroidhormonsekretion bei S-12 Aber zusätzliche signifikante Steroidhormonsekretion bei S-13 und S-14

*Prä = mit Prästimulation

** Lesebeispiel:

(FSH > hCG) bedeutet: Bei der Zugabe von FSH wird eine signifikante Erhöhung der Steroidhormonsekretion wie bei der Zugabe von hCG beobachtet.

(hCG + IGF-I) = (IGF-I) aber > (hCG) bedeutet: Bei Zugabe der Hormonkombination (hCG und IGF-I) wird nicht mehr Steroid (P_4 oder E_2) gebildet, wie bei Zugabe von IGF-I allein. Allerdings lässt sich eine signifikante Steigerung der Steroidhormonsekretion bei Zugabe der Kombination (hCG + IGF-I) im Vergleich zur Zugabe von hCG allein beobachten.

Damit zeigt sich, dass nur die Kombination von IGF-I und FSH (S-9) einen starken Effekt auf die Progesteron- und Östradiolsekretion hervorruft, während IGF-I allein nur einen Effekt auf die Progesteronsekretion bewirkt. Weiterhin lässt sich bei hCG kein Effekt beobachten und deshalb führt vermutlich auch die Kombination dieses Gonadotropins mit IGF-I zu einem geringeren oder zu gar keinem Effekt. Außerdem zeigt die Analyse der Prästimulationen, dass nur die FSH-Prästimulation mit einer nachfolgenden Hormonkombination einen Effekt hervorruft.

4.4 Hormonsekretion der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel im Kulturmedium

Hierbei wird, wie für die Granulosazellen der kleinen Follikel, zunächst eine deskriptive Analyse der Progesteron- und Östradiolsekretion während des Kulturverlaufs unter verschiedenen Hormonstimulationen in der Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Originalwerte der Progesteron- und Östradiolakkumulation (ng/ml) im Medium der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel. Dargestellt sind die Anzahl der Proben (n) pro Hormonstimulation sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($\bar{0} \pm SD$) in ng/ml während der Abnahmen (Abn.). Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-13 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Hormon- stimulation	Progesteronakkumulation (ng/ml)				Östradiolakkumulation (ng/ml)			
		1. Abn.	2. Abn.	3. Abn.		1. Abn.	2. Abn.	3. Abn.
	n	$\bar{0}$ ($\pm SD$)	$\bar{0}$ ($\pm SD$)	$\bar{0}$ ($\pm SD$)	n	$\bar{0}$ ($\pm SD$)	$\bar{0}$ ($\pm SD$)	$\bar{0}$ ($\pm SD$)
S-0	132	0,94 ($\pm 1,08$)	0,55 ($\pm 0,88$)	0,54 ($\pm 0,64$)	99	0,21 ($\pm 0,20$)	0,18 ($\pm 0,19$)	0,12 ($\pm 0,09$)
S-1	120	3,71 ($\pm 5,59$)	2,60 ($\pm 3,77$)	0,93 ($\pm 1,01$)	90	0,36 ($\pm 0,21$)	0,38 ($\pm 0,35$)	0,17 ($\pm 0,12$)
S-2	108	3,66 ($\pm 3,30$)	3,08 ($\pm 2,95$)	0,91 ($\pm 1,16$)	72	0,32 ($\pm 0,19$)	0,34 ($\pm 0,34$)	0,12 ($\pm 0,10$)
S-3	36	0,62 ($\pm 0,58$)	0,30 ($\pm 0,18$)	0,43 ($\pm 0,27$)	18	0,18 ($\pm 0,05$)	0,28 ($\pm 0,06$)	0,15 ($\pm 0,02$)
S-4	72	1,08 ($\pm 0,91$)	0,72 ($\pm 0,50$)	1,35 ($\pm 2,29$)	63	0,25 ($\pm 0,16$)	0,25 ($\pm 0,21$)	0,22 ($\pm 0,27$)
S-5	60	0,70 ($\pm 0,79$)	0,60 ($\pm 0,58$)	1,50 ($\pm 2,27$)	45	0,22 ($\pm 0,13$)	0,26 ($\pm 0,20$)	0,26 ($\pm 0,23$)
S-6	36	0,29 ($\pm 0,22$)	0,16 ($\pm 0,11$)	0,24 ($\pm 0,23$)	18	0,12 ($\pm 0,05$)	0,12 ($\pm 0,09$)	0,08 ($\pm 0,04$)
S-7	84	7,69 ($\pm 8,47$)	5,74 ($\pm 7,59$)	3,30 ($\pm 6,40$)	63	0,62 ($\pm 0,44$)	0,73 ($\pm 1,05$)	0,29 ($\pm 0,40$)
S-8	60	2,45 ($\pm 2,64$)	4,18 ($\pm 5,68$)	1,44 ($\pm 1,29$)	36	0,51 ($\pm 0,26$)	0,74 ($\pm 0,63$)	0,33 ($\pm 0,23$)
S-9	24	0,68 ($\pm 0,51$)	0,90 ($\pm 0,65$)	0,61 ($\pm 0,10$)	9	0,46 ($\pm 0,06$)	0,44 ($\pm 0,01$)	0,16 ($\pm 0,02$)
S-10	36	4,63 ($\pm 4,77$)	3,33 ($\pm 3,32$)	4,59 ($\pm 4,29$)	36	0,68 ($\pm 0,54$)	0,44 ($\pm 0,42$)	0,40 ($\pm 0,32$)
S-11	60	5,59 ($\pm 6,55$)	3,18 ($\pm 3,07$)	1,14 ($\pm 1,44$)	45	0,37 ($\pm 0,22$)	0,33 ($\pm 0,35$)	0,14 ($\pm 0,17$)
S-12	12	1,67 ($\pm 0,05$)	1,52 ($\pm 0,23$)	0,59 ($\pm 0,08$)	9	0,23 ($\pm 0,02$)	0,06 ($\pm 0,03$)	0,04 ($\pm 0,01$)
S-13	24	2,85 ($\pm 1,37$)	3,58 ($\pm 1,37$)	0,57 ($\pm 0,14$)	18	0,39 ($\pm 0,21$)	0,23 ($\pm 0,12$)	0,06 ($\pm 0,01$)

Ein fallender Verlauf der Progesteronsekretion ist ab der 2. oder 3. Abnahme bei der Mehrzahl der Hormonstimulationen beobachtbar. Auch bei der Östradiolsekretion zeigt sich ein Abfall am Ende des Kulturverlaufs. Die in Tabelle 7 dargestellte Standardabweichung repräsentiert sowohl für die Progesteron- als auch für die Östradiolsekretion eine große Schwankung bezüglich der Hormonsekretion innerhalb einer Hormonstimulation.

Wie schon zuvor schließt sich auch hier die Mehrebenenanalyse an, um die Vergleichbarkeit und die gemeinsame Verwendbarkeit aller Messwerte sicherzustellen. Es zeigt sich auch hier, dass weder die Variabilität der Daten der Versuchstiere (Gewicht, Alter, Zahl vorheriger Schwangerschaften) (Tabelle 2) bzw. die Variation der Hormonproduktion der Granulosazellen zwischen den Tieren (Tabelle 5) noch die Anzahlvariation der Zellen pro

Follikel (Tabelle 4) einen signifikanten Einfluß auf die Progesteron- und Östradiolsekretion haben¹⁶. In den folgenden Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2. werden alle Werte beschrieben.

4.4.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen der präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Im Kulturmedium mit den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel wird je nach Hormonstimulation (S-0 bis S-13) eine jeweils unterschiedliche Menge an Progesteron im Vergleich zum Kontrollmedium produziert. Diese Analyse¹⁷ aller Zellkulturen unter Berücksichtigung der Abnahmen zeigt einen leicht kontinuierlich fallenden Verlauf des Progesterongehalts im Kulturmedium bei den meisten Hormonstimulationsprotokollen.

Es zeigt sich eine zusätzliche Progesteronsekretion von $1,42 \pm 1,95$ ($p=0,15$) in der 1. Abnahme, $-0,60 \pm 0,45$ ($p<0,01$) in der 2. Abnahme und $-1,61 \pm 0,45$ ($p<0,0001$) in der 3. Abnahme im Vergleich zur 1. Abnahme. Die Effekte geben den Unterschied im Progesterongehalt bei allen Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen an, wobei der erste Effekt der Progesteronsekretion dem der unstimulierten Zellen entspricht¹⁸.

Alle Hormonstimulationen (S-1 bis S-13) präsentieren einen zusätzlichen signifikanten Effekt auf die Progesteronakkumulation im Medium im Vergleich zum Kontrollmedium. Die Analyse ist in Abbildung 11 dargestellt und wird nachfolgend detailliert beschrieben.

¹⁶ Mehrebenenanalyse: Anzahl der Beobachtungen: 864 (P_4) und 621 (E_2); Anzahl der Gruppen: 11. Für P_4 (Gewicht $p=0,87$, Alter $p=0,84$, Anzahl vorheriger Schwangerschaften $p=0,81$, Anzahl der Zellen pro präovulatorischem Follikel $p=0,61$); Für E_2 (Gewicht $p=0,87$, Alter $p=0,94$, Anzahl vorheriger Schwangerschaften $p=0,56$, Anzahl der Zellen pro präovulatorischem Follikel $p=0,56$).

¹⁷ Mehrebenenanalyse: für alle Analysen im Abschnitt 4.4.1 betragen die Anzahl der Beobachtungen 864 und die Anzahl der Gruppen 11. Die angegebenen Ergebnisse (Messwerte) sind geschätzte Punktwerte der P_4 -Akkumulation $\pm 1,96 \times \text{Std.Fehler}$ (K.I. = $[0 \pm 1,96 \sigma]$).

¹⁸ Die Analyse einer zeitabhängigen Hormonwirkung wird später im Abschnitt 4.5 beschrieben.

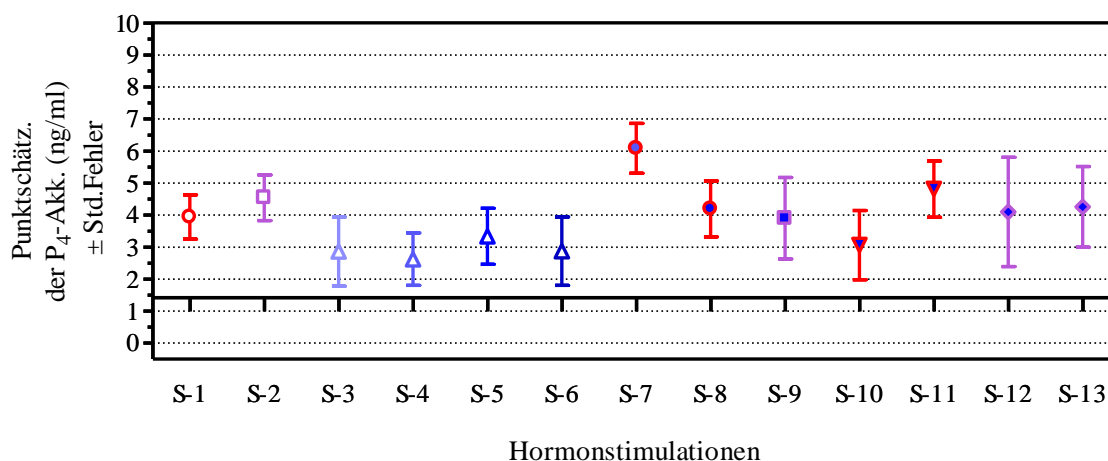


Abb. 11: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Progesteronakkumulation (P₄-Akk.) aller Zellkulturen der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel unter den verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zum Kontrollmedium über alle Abnahmen hinweg. Die residuale Modellvariable von 0,53 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (Anzahl der Gruppen: 11; Anzahl der Beobachtungen: 864). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium (S-0). Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 – S-13 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Die stärkste zusätzliche signifikante Wirkung auf die Progesteronsekretion unter allen Hormonstimulationen wird bei einer Zugabe von IGF-I in Kombination mit hCG (S-7) erreicht. Diese Kombination führt sowohl zu einem signifikanten zusätzlichen Effekt gegenüber den unstimulierten Zellen ($4,66 \pm 0,77$ $p < 0,0001$), als auch im Vergleich zur Zugabe von IGF-I allein ($3,46 \pm 0,89$ $p < 0,0001$) bzw. von hCG allein ($2,14 \pm 0,80$ $p < 0,0001$). Dies bedeutet, dass durch diese Hormonkombination eine größere Steigerung des Progesterongehalts im Kulturmedium hervorgerufen wird, als bei alleiniger Zugabe beider Hormone. Die anderen zwei getesteten Hormonkombinationen (100 ng/ml IGF-I und 50 ng/ml hCG bei S-8 und 100 ng/ml IGF-I und 50 ng/ml FSH bei S-9) führen zu einem geringen zusätzlichen Effekt auf die Progesteronsekretion. Dieser Effekt ist nur im Vergleich zu den unstimulierten Zellen signifikant ($2,77 \pm 0,87$; $p < 0,0001$ für S-8 und $2,47 \pm 1,27$; $p < 0,0001$ für S-9). Das bedeutet, dass diese beiden Hormonkombinationen einen kleinen additiven Effekt auf den Progesterongehalt im Kulturmedium hervorrufen, dieser aber nur unwesentlich höher ist, als bei der einzelnen Zugabe der Hormone¹⁹.

Wenn IGF-I in verschiedenen Dosierungen (S-3 bis S-6) allein eingesetzt wird, zeigt sich im Kulturmedium eine schwächere zusätzliche Progesteronsekretion, als bei IGF-I in Kombination mit den Gonadotropinen. Die Effekte auf die Progesteronsekretion sind

¹⁹ S-8: kleiner Effekt von $0,85 \pm 1,01$ ($p=0,09$) und $0,24 \pm 0,88$ ($p=0,58$) im Vergleich zu IGF-I bzw. hCG. S-9: kleiner Effekt von $0,56 \pm 1,34$ ($p=0,41$) im Vergleich zu IGF-I und von $-0,64 \pm 1,28$ ($p=0,32$) im Vergleich zu FSH.

allerdings bei allen vier IGF-I-Dosen im Vergleich zum Kontrollmedium signifikant. Dabei ruft die Dosis von 100 ng/ml IGF-I den stärksten Effekt hervor ($1,91 \pm 0,87$; $p < 0,0001$)²⁰. Jedoch zeigen die zusätzlichen Effekte keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich untereinander²¹.

Wenn die Gonadotropine, 50 ng/ml hCG (S-1) und 50 ng/ml FSH (S-2) allein zugegeben werden, besteht ein signifikanter zusätzlicher Effekt auf die Progesteronakkumulation im Kulturmedium von jeweils $2,52 \pm 0,68$ ($p < 0,0001$) und $3,12 \pm 0,71$ ($p < 0,0001$) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (S-0). Im Gegensatz zur Progesteronsekretion in den Granulosazellen der kleinen Follikel zeigt sich hier beim Vergleich zwischen beiden keinen signifikante Effekt von $0,60 \pm 0,72$ ($p = 0,10$).

Schließlich wird getestet, ob die Prästimulation mit hCG oder FSH einen förderlichen Einfluss auf die Progesteronakkumulation im Mediumüberstand mit den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel hat. Zu diesem Zweck wird, wie schon für die Granulosazellen der kleinen Follikel, 50 ng/ml hCG oder 50 ng/ml FSH für die erste Inkubationszeit, und IGF-I allein oder in Kombination mit hCG für die zweite Inkubationszeit angesetzt. Alle vier Prästimulationsprotokolle S-10 bis S-13 zeigen einen zusätzlichen Effekt auf die Progesteronsekretion von $1,64 \pm 1,08$ ($p < 0,005$), $3,38 \pm 0,87$ ($p < 0,0001$), $2,67 \pm 1,70$ ($p < 0,005$) bzw. $2,83 \pm 1,26$ ($p < 0,0001$) im Vergleich zum Kontrollmedium. Trotz des signifikanten Effekts bei allen Prästimulationen im Vergleich zum Kontrollmedium, zeigt sich kein signifikanter Effekt, wenn man die Prästimulation S-10 und S-12 mit S-4, d.h. mit der Zugabe von IGF-I allein vergleicht²². Die anderen zwei Prästimulationen (S-11 und S-13), d.h. mit hCG bzw. FSH bei einer nachfolgenden Hormonkombination mit IGF-I und hCG führen zu einem geringeren Progesterongehalt im Medium im Vergleich zur Zugabe von IGF-I und hCG ohne Prästimulation (S-7). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Hormonkombination S-7 einen starken signifikanten Effekt von $1,27 \pm 0,93$ ($p < 0,01$) und $1,83 \pm 1,30$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur gleichen Hormonkombination bei einer Prästimulation mit hCG bzw. FSH hervorruft.

4.4.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Der Einfluss aller Hormonstimulationen auf die Östradiolsekretion aller Zellkulturen mit den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel ist in Abbildung 12 graphisch dargestellt

²⁰ Zusätzlicher Effekt im Vergleich zur Kontrolle: S-3 ($1,43 \pm 1,08$ $p < 0,01$); S-4 ($1,20 \pm 0,81$ $p < 0,005$); S-6 ($1,45 \pm 1,06$ $p < 0,01$).

²¹ S-3 vs. S-4 ($0,23 \pm 1,19$) $p = 0,69$; S-5 ($-0,47 \pm 1,20$) $p = 0,43$; S-6 ($-0,01 \pm 1,31$) $p = 0,98$;
S-4 vs. S-5 ($-0,71 \pm 0,98$) $p = 0,15$; S-6 ($-0,24 \pm 1,15$) $p = 0,67$;
S-5 vs. S-6 ($0,46 \pm 1,16$) $p = 0,43$.

²² Effekt von S-10 und S-12 vs. S-4: $0,44 \pm 1,18$ ($p = 0,46$) bzw. $1,47 \pm 1,75$ ($p = 0,09$).

und wird im Folgenden diskutiert. Hierbei dient ebenfalls die Östradiolsekretion während der 3-stündigen Inkubation der Zellen unter den unterschiedlichen Hormonstimulationen im testosteronhaltigen Medium als Maß für die Aromataseaktivität der kultivierten Zellen.

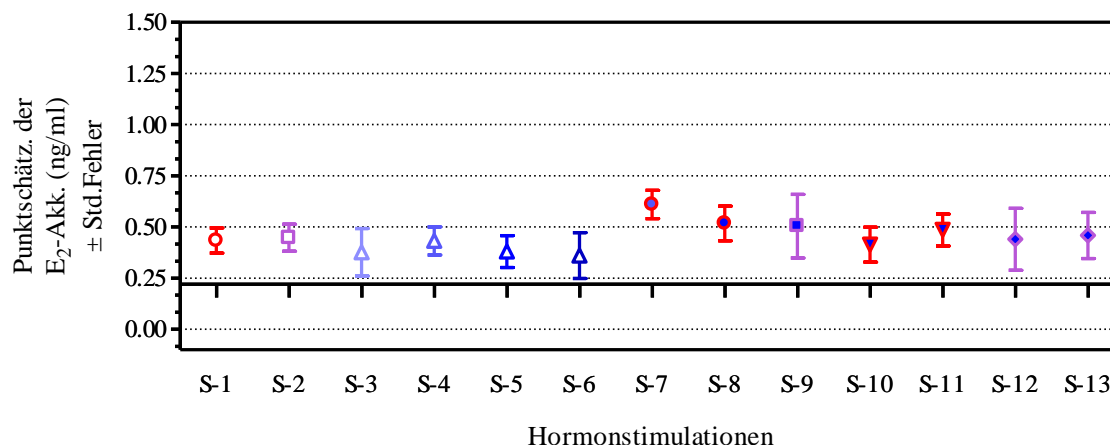


Abb. 12: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Östradiolakkumulation (E₂-Akk.) aller Zellkulturen der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel bei den verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zum Kontrollmedium über alle Abnahmen hinweg. Die residuale Modellvariable von 0,61 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (Anzahl der Gruppen: 11; Anzahl der Beobachtungen: 621). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium S-0. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-13 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Die Kulturmedien mit den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel aller Zellkulturen zeigen unter Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen (S-1 bis S-13) einen variierenden Östradiolgehalt im Vergleich zum Kontrollmedium. Die Analyse²³ aller Zellkulturen unter Berücksichtigung der Abnahmen präsentiert einen leicht fallenden Verlauf am Ende der Kultur beim Östradiolgehalt im Kulturmedium. Es zeigt sich eine zusätzliche Östradiolsekretion von $0,22 \pm 0,20$ ($p < 0,05$) in der 1. Abnahme, von $0,006 \pm 0,04$ ($p = 0,76$) in der 2. Abnahme und von $-0,16 \pm 0,04$ ($p < 0,0001$) in den 3. Abnahme im Vergleich zur 1. Abnahme. Die Effekte geben den Unterschied im Östradiolgehalt bei allen Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen an, wobei der erste Effekt der Östradiolsekretion dem der unstimulierten Zellen entspricht²⁴.

Vergleicht man die auftretenden Effekte bei den unstimulierten Zellen mit den Zellen mit verschiedenen Hormonstimulationen, zeigt die Hormonkombination von IGF-I und hCG (S-7)

²³ Mehrebenenanalyse: für alle Analysen im Abschnitt 4.4.2 betragen die Anzahl der Beobachtungen 621 und die Anzahl der Gruppen 11. Die angegebenen Ergebnisse (Messwerte) sind geschätzte Punktwerte der E₂-Akkumulation $\pm 1,96 \times \text{Std.fehler}$ (K.I. = $[0 \pm 1,96 \sigma]$).

²⁴ Die Analyse einer zeitabhängigen Hormonwirkung wird später im Abschnitt 4.5 erläutert.

den stärksten Effekt ($0,38 \pm 0,06$ $p < 0,0001$) auf die Östradiolsekretion. Diese Hormonkombination zeigt auch im Vergleich zur alleinigen Zugabe von IGF-I (S-4) bzw. hCG (S-1) einen zusätzlichen signifikanten Effekt von $0,17 \pm 0,08$ ($p < 0,0001$) und $0,17 \pm 0,07$ ($p < 0,0001$) auf die Östradiolsekretion.

Bei den anderen zwei Hormonkombinationen (50 ng/ml hCG und 100 ng/ml IGF-I bei S-8 und 50 ng/ml FSH und 100 ng/ml IGF-I bei S-9) lässt sich ein geringerer, jedoch signifikanter zusätzlicher Effekt von $0,29 \pm 0,08$ ($p < 0,0001$) bzw. $0,28 \pm 0,15$ ($p < 0,001$) im Vergleich zum Kontrollmedium feststellen. Ein anderes Ergebnis zeigt sich allerdings, wenn Hormongaben in Kombination oder einzeln verglichen werden. Nur S-8 zeigt einen geringen signifikanten Effekt von $0,13 \pm 0,09$ ($p < 0,01$) im Vergleich zur alleinigen Zugabe von IGF-I. Dies bedeutet, dass die Kombination von IGF-I mit FSH einen kleinen additiven Effekt auf den Östradiolgehalt im Kulturmedium hervorruft, dieser aber nur unwesentlich höher ist, als bei einzelner Zugabe der Hormone²⁵.

Vergleicht man die alleinige Zugabe verschiedener Konzentrationen von IGF-I (10, 50, 100 und 1000 ng/ml) mit der Entwicklung der unstimulierten Zellen des Kontrollmediums, zeigt die Dosis 50 ng/ml (S-4) den größten Effekt von $0,21 \pm 0,06$ ($p < 0,0001$) auf die Östradiolsekretion, die anderen Dosierungen haben geringere Auswirkungen, ($0,15 \pm 0,11$ ($p < 0,01$) für S-3, $0,15 \pm 0,07$ ($p < 0,001$) für S-5 und $0,14 \pm 0,11$ ($p < 0,05$) für S-6). Keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Östradiolgehalts lassen sich aber feststellen, wenn die verschiedenen IGF-I-Dosierungen miteinander verglichen werden²⁶.

Wenn die Gonadotropine hCG (50 ng/ml) (S-1) und FSH (50 ng/ml) (S-2) allein zugegeben werden, zeigt sich ein signifikanter Effekt auf die Östradiolakkumulation im Kulturmedium von jeweils $0,21 \pm 0,06$ ($p < 0,0001$) und $0,22 \pm 0,06$ ($p < 0,0001$) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen des Kontrollmediums. Im Gegensatz zu den Granulosazellen der kleinen Follikel, weisen die Zellen untereinander keinen signifikanten Unterschied ($0,01 \pm 0,06$; $p = 0,68$) auf. Auch der Vergleich zwischen IGF-I und den Gonadotropinen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Es schließt sich die Betrachtung der Prästimulationen mit hCG (S-10 u. S-11) oder FSH (S-12 u. S-13) an; mit einer nachfolgenden Stimulation durch IGF-I allein (S-10 und S-12) oder in Kombination mit hCG (S-11 und S-13). Alle vier Prästimulationen zeigen einen zusätzlichen signifikanten Effekt von jeweils $0,19 \pm 0,08$ ($p < 0,0001$), $0,26 \pm 0,07$ ($p < 0,0001$), $0,21 \pm 0,15$ ($p < 0,005$) und $0,23 \pm 0,11$ ($p < 0,0001$) auf die Östradiolsekretion im Vergleich

²⁵ Effekt der Hormonstimulation S-8 im Vergleich zur isolierten Zugabe von hCG (S-1): $0,08 \pm 0,08$ ($p = 0,06$). Die Hormonkombination von IGF-I und FSH (S-9) zeigen keinen signifikanten Effekt von $0,12 \pm 0,16$ ($p = 0,13$) und $0,05 \pm 0,15$ ($p = 0,48$) im Vergleich zur isolierten Zugabe von IGF-I bzw. FSH.

²⁶ S-3 vs.: S-4 ($-0,05 \pm 0,12$) $p = 0,37$; S-5 ($-0,003 \pm 0,12$) $p = 0,95$, S-6 ($0,02 \pm 0,14$) $p = 0,82$;
S-4 vs.: S-5 ($0,05 \pm 0,08$) $p = 0,22$; S-6 ($0,07 \pm 0,11$) $p = 0,22$;
S-5 vs. S-6 ($0,02 \pm 0,11$) $p = 0,74$.

zum Kontrollmedium. Weiterhin lässt sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Prästimulationen S-10 und S-12 mit S-4, d.h. mit der Zugabe von IGF-I allein²⁷ beobachten. Die anderen zwei Prästimulationen S-11 und S-13 haben ebenfalls keinen zusätzlichen Effekt auf die Östradiolsekretion; beide führen sogar zu einer Senkung des Östradiolgehalts im Medium im Vergleich zur Zugabe von IGF-I in Kombination mit hCG (S-7). Die Hormonkombination S-7 bewirkt einen signifikanten Effekt von $0,12 \pm 0,08$ ($p < 0,005$) im Vergleich zu S-11 (hCG-Prästimulation) bzw. $0,15 \pm 0,11$ ($p < 0,01$) im Vergleich zu S-13 (FSH-Prästimulation). Das bedeutet, dass der entsprechende Effekt durch die Hormonkombination von IGF-I und hCG (S-7) hervorgerufen wird und etwaige Prästimulationen das Ergebnis eher negativ beeinflussen.

4.4.3 Zusammenfassung der Hormonsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter dem Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Generell lässt sich im Kulturmedium mit den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel eine geringere Östradiol- als Progesteronsekretion feststellen. Den größten Effekt ruft die Zugabe der Hormonkombination hCG und IGF-I (S-7) hervor. Dabei ist ein maximal zusätzlicher Effekt von $0,38 \pm 0,07$ auf die Östradiolsekretion und $4,66 \pm 0,77$ auf die Progesteronsekretion beobachtbar. Einen Überblick über den Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen (S-0 bis S-13) gibt Tabelle 8.

²⁷ Effekt der Prästimulationen S-10 oder S-12 im Vergleich zur Zugabe von IGF-I allein (S-4): $-0,02 \pm 0,09$ ($p=0,70$) bzw. $0,008 \pm 0,15$ ($p=0,91$).

Tabelle 8: Überblick über den Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen auf die Progesteron- (P_4) und Östradiolakkumulation (E_2) im Kulturmedium der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 - S-13 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Vergleiche	Einfluss auf die P_4 und E_2 -Akkumulation im Kulturmedium der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel
P_4 - und E_2 -Akkumulation	Leichte Absenkung (signifikante nur am Ende der Kultur)
S-0 (Kontrolle) vs. Hormonstimulationen: S-1 (hCG) S-2 (FSH) S-3 bis S-6 (IGF-I) S-7 und S-8 (hCG + IGF-I) S-9 (FSH + IGF-I) S-10 und S-11 (hCG-Prä.*) S-12 und S-13 (FSH-Prä.*)	Stärkste Wirkung von S-7 (hCG + IGF-I) Alle Hormonstimulationen führen zu einem signifikanten Anstieg der Steroidhormonsekretion
Zwischen den verschiedenen IGF-I-Dosierung (S-3 bis S-6)	Kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Dosierung
Zwischen S-1 (hCG) und S-2 (FSH)	FSH = Hcg
Hormonkombination: S-7 (hCG + IGF-I) vs. S-4 (IGF-I) oder S-1 (hCG)	(hCG + IGF-I): > (hCG) bzw. > (IGF-I)**
Hormonkombination: S-8 (hCG + IGF-I) vs. S-5 (IGF-I) oder S-1 (hCG)	P_4 : (hCG + IGF-I): = (IGF-I) bzw. = (hCG) E_2 : (hCG + IGF-I): > (IGF-I) bzw. = (hCG)
Hormonkombination: S-9 (FSH + IGF-I) vs. S-5 (IGF-I) oder S-2 (FSH)	(FSH + IGF-I): = (IGF-I) bzw. = (FSH)
hCG-Prä.*: S-10 und S-11 vs. S-4 (IGF-I) bzw. S-7 (hCG + IGF-I)	S-10 = S-4 S-7 > S-11
FSH-Prä.*: S-12 und S-13 vs. S-4 (IGF-I) bzw. S-7	S-12 = S-4 S-7 > S-13***

*Prä = mit Prästimulation

Lesebeispiel: ** (hCG + IGF-I): > (hCG) bzw. > (IGF-I) bedeutet: Die gebildete Steroidmenge (P_4 oder E_2) ist bei der Hormonkombination von hCG und IGF-I signifikant höher als nach Zugabe von hCG allein bzw. von IGF-I allein.*** S-7 > S-13 bedeutet: Bei Zugabe der Hormonkombination hCG und IGF-I wurde eine signifikante Steigerung der Steroidhormonsekretion (P_4 oder E_2) beobachtet als bei der Zugabe der gleichen Kombination nach einer Prästimulation mit FSH.

Damit zeigt sich, dass nicht nur die Kombination von IGF-I und hCG (S-7) einen starken Effekt auf die Progesteron- und Östradiolsekretion hervorruft, sondern auch IGF-I allein. Der IGF-I Effekt auf das Östradiolsekretion ist dabei genauso so stark wie der Effekt der Gonadotropine. Obwohl alle Hormonstimulationsprotokolle einen Effekt im Vergleich zur Kontrolle aufweisen, erhöhen die Hormonkombinationen nicht (S-9) oder nur geringfügig

(S-8) die jeweiligen Effekten, die bei Zugabe der Einzelhormone auftreten. Weiterhin führt auch die Prästimulation zu keinem größeren Effekt als die Zugabe des gleichen Hormons ohne die entsprechende Prästimulation. Teilweise lässt sich bei den Prästimulationen sogar eine geringere Hormonsekretion beobachten, wie z.B. bei der hCG-Prästimulation (S-11) und bei der FSH-Prästimulation (S-13) im Vergleich zu S-7 (IGF-I mit hCG).

4.5 Zeitabhängige Hormonwirkungen

4.5.1 Zeitabhängige Hormonwirkungen - Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs auf die Progesteronsekretion in beiden Granulosazellgruppen

Nach der Beschreibung des Gesamteinflusses der verschiedenen Hormonstimulationen unter Berücksichtigung der Abnahmen mit allen Einzelwerten, wird jetzt untersucht, ob ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen von Granulosazellen (kleiner und präovulatorischer Follikel) hinsichtlich einer zeitabhängigen Hormonwirkung auf die Progesteronakkumulation im Kulturmedium besteht²⁸. Da es an dieser Stelle nur um die Betrachtung der Unterschiede geht, beschränkt sich die Beschreibung auf die wichtigsten Ergebnisse. Die Kontrollen beider Granulosazellgruppen produzieren von selbst eine geringe Menge an Progesteron während des Kulturverlaufs. Obwohl diese Basalwerte bei den Granulosazellen der kleinen Follikel leicht ansteigen und sich bei den präovulatorischen Follikeln leicht vermindern, ist bei der Analyse der zeitabhängigen Progesteronsekretion keine signifikante Veränderung feststellbar. Die zeitabhängige Hormonwirkung zeigt hingegen, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel ohne Hormonstimulation signifikant weniger Progesteron als die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel produzieren²⁹. Im Gegensatz zu den Granulosazellen der kleinen Follikel, die bei den meisten Hormonstimulationsprotokollen einen kontinuierlichen Anstieg der Progesteronsekretion zeigen, präsentieren die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel eine kleine Absenkung der Progesteronsekretion (P_4 -Sekretion) während des Kulturverlaufs. Die Abb. 13 (Granulosazellen der kleinen Follikel) und Abb. 14 (Granulosazellen der präovulatorischen Follikel) zeigen graphisch einen Überblick über die Ergebnisse. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 – S-14 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

²⁸ Mehrebenenanalyse: Für die Granulosazellen der kleinen Follikel - Anzahl der Beobachtungen pro Abnahme: 376; Anzahl der Gruppen: 12. Für die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel – Anzahl der Beobachtungen pro Abnahme: 288; Anzahl der Gruppen: 11. Die angegebenen Ergebnisse (Messwerte) sind geschätzte Punktwerte der P_4 -Akkumulation $\pm 1,96 \times$ Std.Fehler (K.I. = $[0 \pm 1,96 \sigma]$).

²⁹ Effekt auf die Progesteronsekretion - Granulosazellen der kleinen Follikel: Effekt von $-2,95 \pm 1,71$ ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel. Mehrebenenanalyse: Für die Progesteronsekretion beider Granulosazellgruppen – Anzahl der Beobachtungen: 1920; Anzahl der Gruppen: 12.

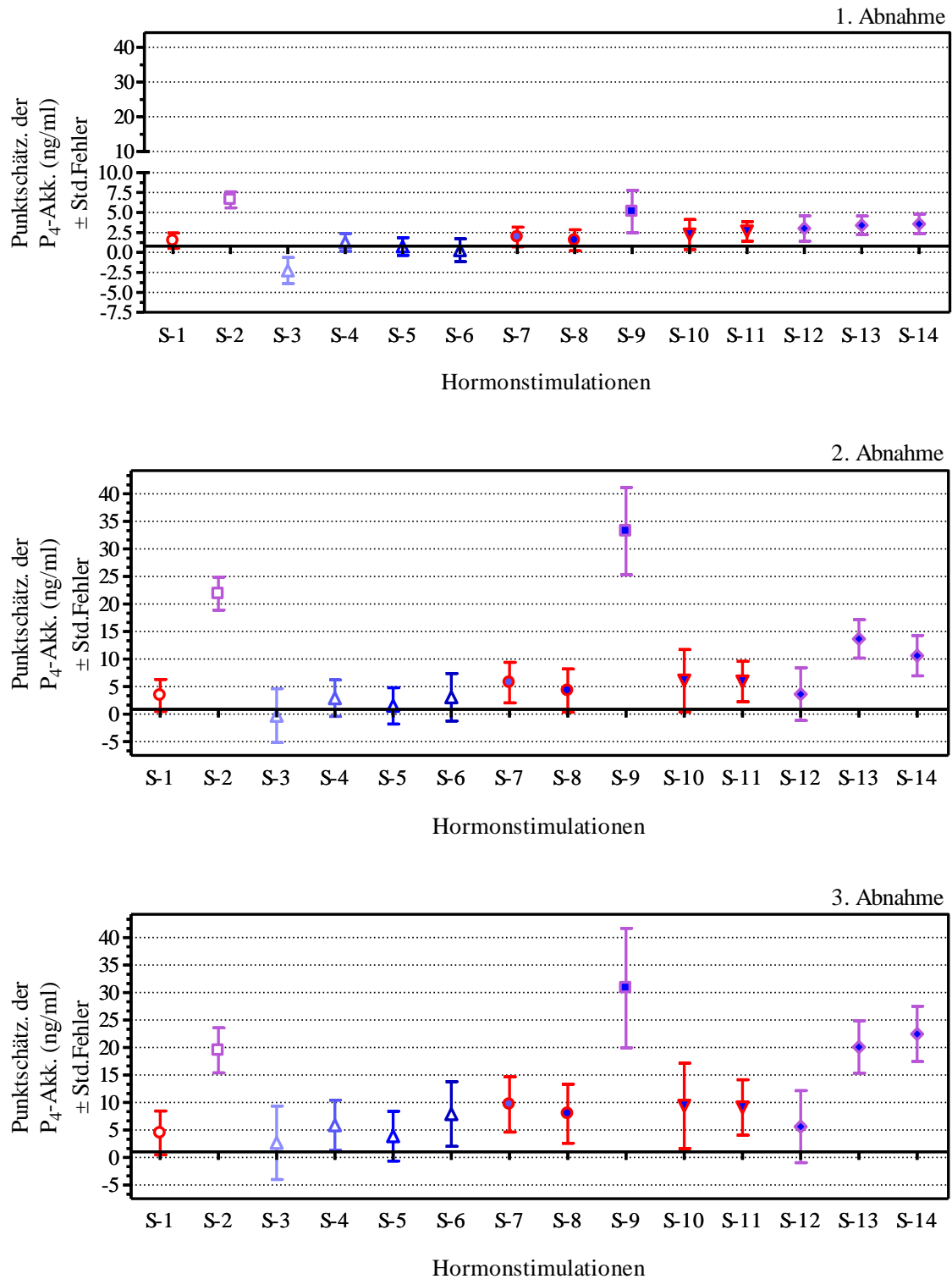


Abb. 13: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Progesteronakkumulation (P4-Akk.) nach der 1., 2. und 3. Abnahme im Kulturmedium der Granulosazellen kleiner Follikel unter verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die residuale Modellvariable von 0,43 % bis 0,54 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (pro Abnahme: Anzahl der Gruppen: 12; Anzahl der Beobachtungen: 376). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium S-0.

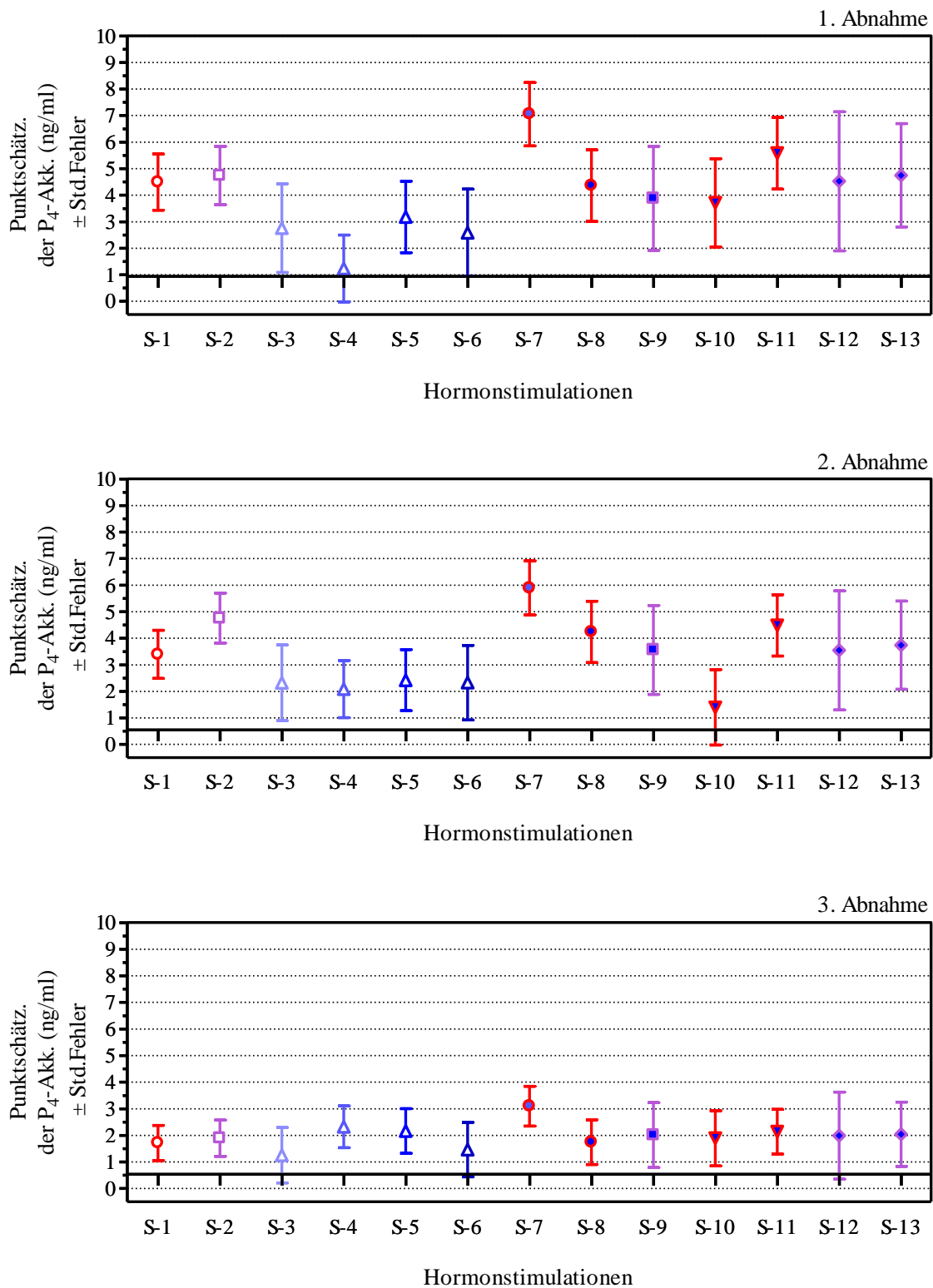


Abb. 14: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Progesteronakkumulation (P₄-Akk.) nach der 1., 2. und 3. Abnahme im Kulturmedium der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel unter verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die residuale Modellvariable von 0,62 % bis 0,65 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (pro Abnahme: Anzahl der Gruppen: 11; Anzahl der Beobachtungen: 288). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium S-0.

Bei den Zellen der kleinen Follikel kann der Effekt eines signifikanten Progesteronanstiegs erst zu einem späteren Zeitpunkt (ab 2. oder 3. Abnahme) beobachtet werden; außer bei Zugabe von FSH allein oder in Kombination mit IGF-I, wo ein starker Effekt schon am Anfang der Kultur auftritt. Dieser schnelle und stärkere Effekt der Hormonkombination zeigt sich bis zum Ende des Kulturverlaufs sowohl im Vergleich zum Kontrollmedium (1. Abn.: $4,3 \pm 2,7$ ($p < 0,005$); 2. Abn.: $32,34 \pm 8,08$ ($p < 0,00001$); 3. Abn.: $29,76 \pm 11,06$ ($p < 0,00001$)) als auch zur isolierten Zugabe von IGF-I (1. Abn.: $4,38 \pm 2,42$ ($p < 0,005$); 2. Abn.: $31,73 \pm 8,18$ ($p < 0,00001$); 3. Abn.: $26,93 \pm 11,2$ ($p < 0,00001$)). Im Vergleich zur alleinigen Zugabe von FSH tritt ein Effekt erst ab der 2. Abnahme auf³⁰. Dies bedeutet, dass die Zellen unter Zugabe der Hormonkombination mehr Progesteron produzieren als die Zellen, bei denen diese beiden Hormone jeweils allein angesetzt werden. Die Hormonkombination mit hCG führt zu einem späteren und geringeren Effekt. Ein signifikanter Anstieg der Progesteronsekretion bei S-7 lässt sich ab der 2. Abnahme jedoch nur im Vergleich zu den unstimulierten Zellen feststellen³¹. Nur am Ende der Kultur wird eine leichte zusätzliche Progesteronsekretion im Vergleich zur alleinigen Zugabe von hCG sichtbar (3. Abn.: $5,19 \pm 5,0$ ($p < 0,005$)). Die höhere Dosis von IGF-I in Kombination mit hCG (S-8) führt nur am Ende der Kultur (3. Abn.: $6,9 \pm 5,3$ ($p < 0,05$)) zu einem signifikanten Anstieg der Progesteronsekretion; dies jedoch nur im Vergleich zum Kontrollmedium.

Die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel zeigen dagegen schon bei der Erstabnahme bei allen Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zum Kontrollmedium einen Anstieg der Progesteronsekretion. Die Hormonkombination von IGF-I mit hCG (S-7) führt zum stärksten Anstieg der Progesteronsekretion ebenfalls schon am Anfang der Kultur (1. Abn.: $6,1 \pm 1,17$ ($p < 0,00001$); 2. Abn.: $5,34 \pm 1,01$ ($p < 0,00001$); 3. Abn.: $2,55 \pm 0,72$ ($p < 0,00001$)). Hierbei präsentiert das Kulturmedium unter der Kombination mit hCG eine kontinuierlich leichte Verminderung der Progesteronsekretion, die jedoch nur am Ende der Kultur signifikant ist. Im Gegensatz zu den Granulosazellen der kleinen Follikel zeigen die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel eine signifikante Progesteronsekretion ab der 1. Abnahme im Vergleich zur Zugabe der Einzelhormone - dies jedoch nur, wenn die Zellen mit der Kombination S-7, d.h. mit IGF-I (50 ng/ml) + hCG (50 ng/ml) angesetzt werden³². Obwohl die IGF-Kombination mit FSH (S-9) zu keinem zusätzlichen Effekt auf die Progesteronsekretion im Vergleich zur alleinigen Zugabe beider Hormone führt, und einen Effekt nur im Vergleich zum Kontrollmedium präsentiert (1. Abn.: $2,93 \pm 1,96$ ($p < 0,005$); 2. Abn.: $3,00 \pm 1,66$ ($p < 0,0005$); 3. Abn.: $1,47 \pm 1,21$ ($p < 0,05$)), hält S-9 die

³⁰ Effekt der S-9 (FSH + IGF-I) im Vergleich zur S-2 (FSH): 2. Abn. $11,36 \pm 8,1$ ($p < 0,01$); 3. Abn. $11,33 \pm 10,1$ ($p < 0,05$).

³¹ Effekt der S-7 (hCG + IGF-I) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 2. Abn. $4,8 \pm 3,66$ ($p < 0,01$); 3. Abn. $8,58 \pm 5,01$ ($p < 0,005$).

³² Effekt der S-7 (hCG + IGF-I) im Vergleich zur S-1 (hCG): 1. Abn. $2,56 \pm 1,23$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $2,50 \pm 1,03$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $1,38 \pm 0,76$ ($p < 0,001$). Effekt der S-7 (hCG + IGF-I) im Vergleich zur S-4 (IGF-I): 1. Abn. $5,81 \pm 1,37$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $3,81 \pm 1,31$ ($p < 0,005$); 3. Abn. $0,77 \pm 0,84$ ($p = 0,07$).

Progesteronsekretion während des Kulturverlaufs aufrecht, da sich die kleine Verminderung der Progesteronsekretion am Kulturrende im Gegensatz zur alleinigen Zugabe von FSH als nicht signifikant erweist.

Wenn man die zeitabhängige IGF-I-Wirkung analysiert, ist die gesteigerte Progesteronsekretion bei den Granulosazellen der kleinen Follikel nur in der 3. Abnahme signifikant – allerdings ausschließlich bei den Dosierungen 50 und 1000 ng/ml IGF-I (S-4: $4,82 \pm 4,5$ ($p < 0,05$) u. S-6: $6,85 \pm 5,88$ ($p < 0,05$)). Im Gegensatz dazu zeigen die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel einen signifikanten Effekt bei einer Dosis von 10 bzw. 100 ng/ml IGF-I (S-3: $1,81 \pm 1,66$ ($p < 0,05$) u. S-5: $2,23 \pm 1,33$ ($p < 0,005$)) schon ab der 1. Abnahme. Bei den anderen IGF-I Dosierungen lässt sich eine signifikante Sekretion ab der 2. Abnahme beobachten. Obwohl eine leichte Absenkung der Progesteronsekretion während des Kulturverlaufs beobachtbar ist, die jedoch nicht signifikant ist, weisen die Zellen am Ende der Kultur nur bei 50 und 100 ng/ml IGF-I (S-4: $1,77 \pm 0,78$ ($p < 0,00001$) u. S-5: $1,62 \pm 0,82$ ($p < 0,0005$)) einen Effekt auf.

Vergleicht man beide Gonadotropinstimulationen, hCG (S-1) und FSH (S-2), zeigen sich Unterschiede hinsichtlich der zeitabhängigen Hormonwirkung. Bei den Granulosazellen der kleinen Follikel bewirkt nur die FSH-Zugabe eine starke zusätzliche signifikante Progesteronsekretion schon ab der 1. Abnahme³³. Im Gegensatz dazu zeigen die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel einen signifikanten Effekt sowohl unter hCG-Zugabe als auch unter FSH-Zugabe schon ab der 1. Abnahme³⁴; ohne zusätzlichen Effekt beim Vergleich zwischen beiden Gonadotropinen. Hierbei ist die kontinuierliche Verringerung der Progesteronsekretion sowohl bei FSH als auch bei hCG nur am Ende des Kulturverlaufs signifikant.

Betrachtet man die Prästimulationsprotokolle mit hCG oder mit FSH zeigt sich bezüglich der Zeitabhängigkeit, dass nur die Granulosazellen der kleinen Follikel eine Veränderung bei einer Gonadotropinprästimulation ab der 2. Abnahme mit ansteigendem Verlauf der Progesteronsekretion aufweisen, allerdings ausschließlich bei FSH-Prästimulation mit nachfolgender Hormonkombination IGF-I und hCG (S-13: 2. Abn. $7,94 \pm 3,97$ ($p < 0,0005$) und S-14: 2. Abn. $6,34 \pm 4,41$ ($p < 0,005$))³⁵. Bei den präovulatorischen Follikeln führen die Prästimulationen S-11 und S-13, wie schon bei der Beschreibung des Gesamteinflusses der verschiedenen Hormonstimulationen im Abschnitt 4.5.1, sogar zu einer schwächeren

³³ Effekt der S-2 (FSH) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $5,77 \pm 0,98$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $20,97 \pm 2,97$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $18,43 \pm 4,07$ ($p < 0,00001$).

³⁴ Effekt der S-2 (FSH) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $3,79 \pm 1,09$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $4,20 \pm 0,92$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $1,35 \pm 0,66$ ($p < 0,0001$).

Effekt der S-1 (hCG) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $3,54 \pm 1,05$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $2,83 \pm 0,90$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $1,17 \pm 0,64$ ($p < 0,001$).

³⁵ S-13 vs. S-7: 3. Abn. $10,45 \pm 5,44$ ($p < 0,0005$); S-14 vs. S-8: 3. Abn. $14,50 \pm 6,01$ ($p < 0,00005$).

Progesteronsekretion (S-11: 2. Abn. $-1,41 \pm 1,22$ ($p < 0,05$) und S-13: 2. Abn. $-2,15 \pm 1,70$ ($p < 0,05$)) im Vergleich zu S-7 (d.h. der gleichen Hormonkombination ohne Prästimulation)³⁶.

4.5.2 Zeitabhängige Hormonwirkungen - Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs auf die Östradiolsekretion in beiden Granulosazellgruppen

Auch bezüglich der Östradiolsekretion wird analysiert, ob es einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen von Granulosazellen bezüglich einer zeitabhängigen Hormonwirkung gibt. Die Analyse³⁷ aller Zellkulturen zeigt, dass im Gegensatz zu den Granulosazellen der kleinen Follikel, die einen kontinuierlichen Anstieg oder eine Aufrechterhaltung der Östradiolsekretion zeigen, die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel entweder eine Aufrechterhaltung der Östradiolsekretion während des gesamten Kulturverlaufs oder eine geringe Absenkung am Ende des Kulturverlaufs präsentieren.

Die Kontrollen beider Granulosazellgruppen produzieren von selbst eine geringe Menge an Östradiol während des Kulturverlaufs. Obwohl sich diese Basalwerte bei beiden Granulosazellgruppen leicht verringern, zeigen sich bei der Analyse der zeitabhängigen Östradiolsekretion in beiden Zellgruppen keine signifikanten Variationen. Die unstimulierten Granulosazellen der kleinen Follikel produzieren signifikant weniger Östradiol als die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel³⁸.

Die Abb. 15 (Granulosazellen der kleinen Follikel) und Abb. 16 (Granulosazellen der präovulatorischen Follikel) zeigen graphisch einen Überblick über die Ergebnisse. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 – S-14 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

³⁶ S-11 vs. S-7: 3. Abn. $-0,95 \pm 0,88$ ($p < 0,05$); S-13 vs. S-7: 3. Abn. $-1,05 \pm 1,23$ ($p = 0,09$).

³⁷ Mehrebenenanalyse: Für Granulosazellen kleiner Follikel - Anzahl der Beobachtungen pro Abnahme: 288; Anzahl der Gruppen: 12. Für Granulosazellen präovulatorischer Follikel – Anzahl der Beobachtungen pro Abnahme: 207; Anzahl der Gruppen: 11. Die angegebenen Ergebniswerte (Messwerte) sind geschätzte Punktwerte der P_4 -Akkumulation $\pm 1,96 \times$ Std.Fehler (K.I. = $[0 \pm 1,96 \sigma]$).

³⁸ Effekt auf die Östradiolsekretion - Granulosazellen der kleinen Follikel: Effekt von $-0,19 \pm 0,17$ ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel. Mehrebenenanalyse: Für Östradiolsekretion beiden Granulosazellgruppen – Anzahl der Beobachtungen: 1431; Anzahl der Gruppen: 12.

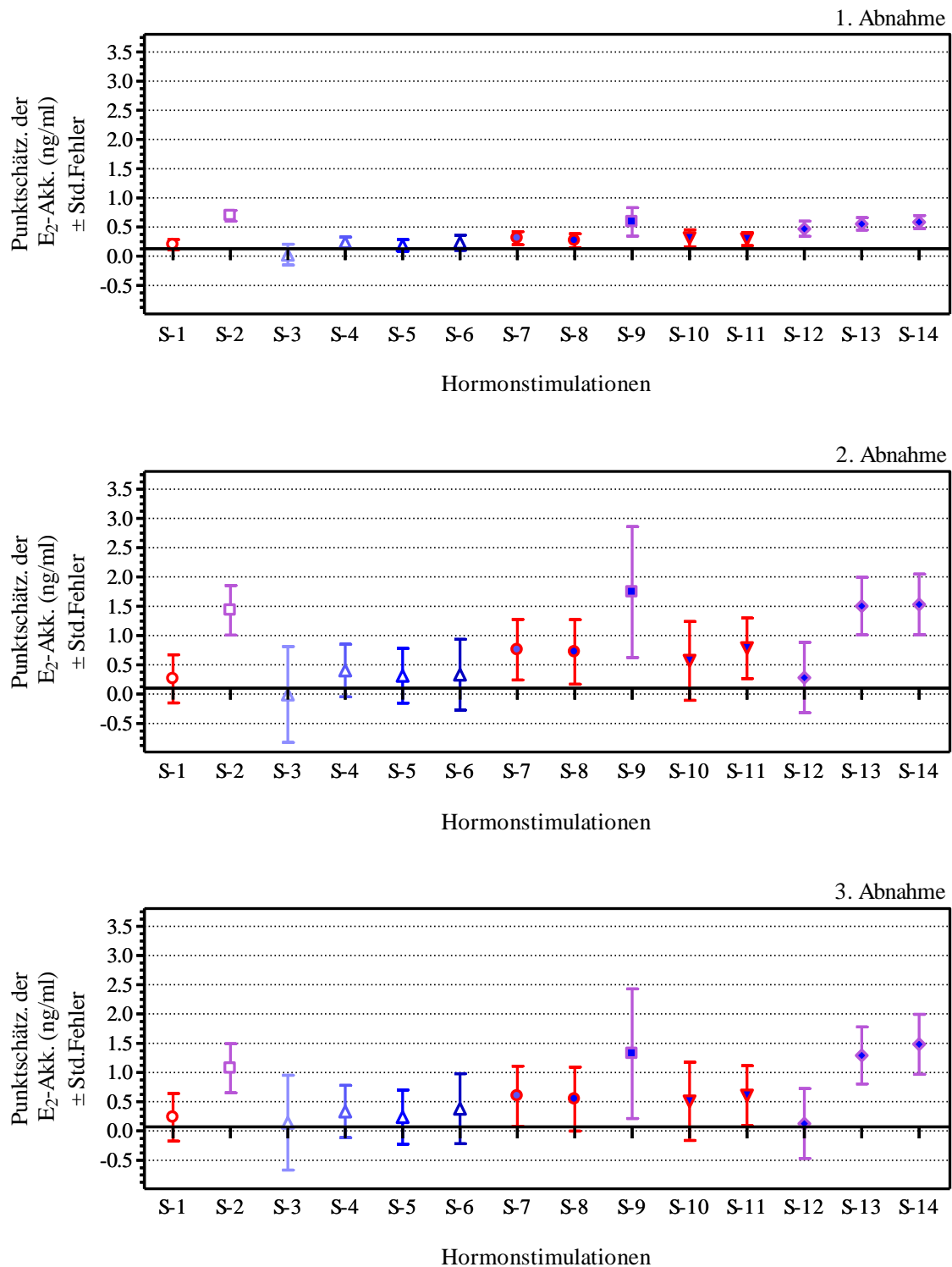


Abb. 15: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Östradiolakkumulation (E₂-Akk.) nach der 1., 2. und 3. Abnahme im Kulturmedium der Granulosazellen der kleinen Follikel unter verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die residuale Modellvariable von 0,44 % bis 0,54 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (pro Abnahme: Anzahl der Gruppen: 12; Anzahl der Beobachtungen: 288). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium S-0.

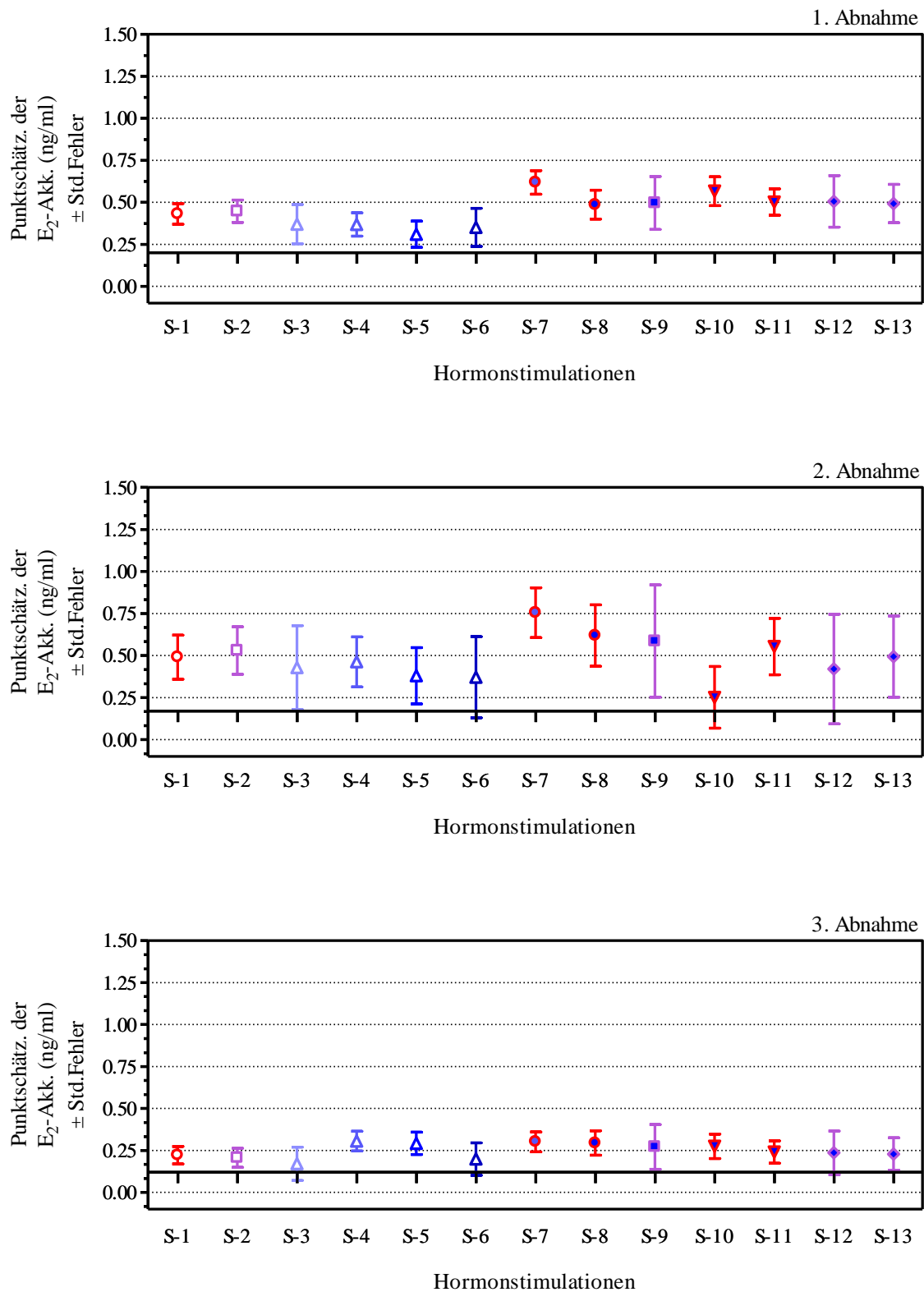


Abb. 16: Geschätzte Punktwerte des zusätzlichen Effekts auf die Östradiolakkumulation (E₂-Akk.) nach der 1., 2. und 3. Abnahme im Kulturmedium der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel unter verschiedenen Hormonstimulationen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die residuale Modellvariable von 0,65 % bis 0,71 % kann der Variabilität zwischen den Tiere zugeschrieben werden (pro Abnahme: Anzahl der Gruppen: 11; Anzahl der Beobachtungen: 207). Die eingezeichnete durchgehende Linie zeigt die Basissekretion der Granulosazellen im Kontrollmedium S-0.

Wie bei der Progesteronsekretion zeigen die Zellen der kleinen Follikel die beobachteten Effekte auf die Östradiolsekretion erst später; auch hier mit Ausnahme der alleinigen FSH-Zugabe bzw. der Kombination mit IGF-I, wo eines starken Anstiegs der Hormonsekretion schon am Anfang der Kultur auftritt. Der schnelle Effekt dieser Hormonkombination tritt im Vergleich zum Kontrollmedium (1. Abn.: $0,45 \pm 0,23$ ($p < 0,0005$); 2. Abn.: $1,64 \pm 1,11$ ($p < 0,005$); 3. Abn.: $1,24 \pm 1,09$ ($p < 0,05$)) und zur alleinigen Zugabe von IGF-I (1. Abn.: $0,40 \pm 0,23$ ($p < 0,005$); 2. Abn.: $1,42 \pm 1,11$ ($p < 0,05$); 3. Abn.: $1,08 \pm 0,98$ ($p \leq 0,05$)) auf. Im Vergleich zur alleinigen Zugabe von FSH ist dagegen während des Kulturverlaufs keine zusätzliche signifikante Steigerung der Steroidhormonsekretion feststellbar³⁹. Bei den anderen Hormonkombinationen (IGF-I und hCG – S-7 und S-8) lässt sich ein geringerer signifikanter Effekt jedoch nur im Vergleich zum Kontrollmedium nachweisen⁴⁰.

Bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel führen im Gegensatz zu den kleinen Follikeln alle Hormonstimulationsprotokolle zu einem signifikanten Effekt schon am Anfang der Kultur im Vergleich zum Kontrollmedium. Die Hormonkombination von IGF-I und hCG (S-7) zeigt den stärksten Effekt (1. Abn. $0,40 \pm 0,05$ ($p < 0,05$))⁴¹. Wenn man die Hormonkombinationen (S-7 oder S-8) mit der einzelnen Zugabe der Hormone vergleicht, zeigt sich nur unter S-7 ein zusätzlicher Effekt auf die Östradiolsekretion schon am Anfang der Kultur (S-7 vs. S-1: 1. Abn.: $0,18 \pm 0,05$ ($p < 0,00001$); 2. Abn.: $0,26 \pm 0,13$ ($p < 0,001$) und S-7 vs. S-4: 1. Abn.: $0,25 \pm 0,05$ ($p < 0,00001$); 2. Abn.: $0,29 \pm 0,15$ ($p < 0,001$)). Jedoch weisen die Zellen am Ende der Kultur nur bei S-7 im Vergleich zur alleinigen Zugabe von hCG einen Effekt auf (S-7 vs. S-1: 3. Abn.: $0,07 \pm 0,05$ ($p < 0,05$)). Bei S-8 ist dagegen ein leichter zusätzlicher Effekt im Vergleich zu IGF-I allein nur am Anfang der Kultur beobachtbar. Bei beiden Hormonkombinationen ist eine Verminderung des Effekts in der 3. Abnahme feststellbar. Die Hormonkombination von IGF-I und FSH (S-9) führt ebenfalls schon ab der 1. Abnahme bis zum Ende des Kulturverlaufes zu einer signifikant höheren Östradiolsekretion; dies jedoch nur im Vergleich zum Kontrollmedium (1. Abn.: $0,28 \pm 0,15$ ($p < 0,0005$); 2. Abn.: $0,40 \pm 0,33$ ($p < 0,05$); 3. Abn.: $0,15 \pm 0,11$ ($p < 0,05$)). Eine leichte zusätzliche Östradiolsekretion ist im Vergleich zur alleinigen Zugabe von IGF-I beobachtbar, jedoch nur am Anfang der Kultur (1. Abn. $0,18 \pm 0,15$ ($p < 0,05$)). Obwohl eine leichte Verminderung des Effekts dieser Hormonkombination am Ende der Kultur im Vergleich zum Kontrollmedium beobachtbar ist, hält S-9 die Östradiolsekretion während des Kulturverlaufs aufrecht, da sich die kleine Verringerung der Östradiolsekretion am Kulturrende als nicht

³⁹ Effekt der S-9 (FSH + IGF-I) im Vergleich zur S-2 (FSH): 1. Abn. $-0,10 \pm 0,23$ ($p = 0,40$); 2. Abn. $0,31 \pm 1,11$ ($p = 0,58$); 3. Abn. $0,24 \pm 1,09$ ($p = 0,66$).

⁴⁰ Effekt der S-7 (hCG + IGF-I) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $0,17 \pm 0,09$ ($p < 0,05$); 2. Abn. $0,65 \pm 0,50$ ($p < 0,05$); 3. Abn. $0,52 \pm 0,50$ ($p < 0,05$);

Effekt der S-8 (hCG + IGF-I) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $0,13 \pm 0,11$ ($p < 0,05$); 2. Abn. $0,62 \pm 0,54$ ($p < 0,05$); 3. Abn. $0,47 \pm 0,52$ ($p = 0,09$);

⁴¹ Effekt der S-7 (hCG + IGF-I) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $0,40 \pm 0,05$ ($p < 0,05$); 2. Abn. $0,57 \pm 0,13$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $0,18 \pm 0,05$ ($p < 0,00001$).

signifikant erweist. Bei der Hormonkombination IGF-I mit FSH oder mit hCG (S-9 und S-7) zeigen sich diesbezüglich ähnliche Effekte.

Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen mit Granulosazellen hinsichtlich der zeitabhängigen Hormonwirkung zeigt sich bei der alleinigen Zugabe von IGF-I in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen aus den präovulatorischen Follikeln präsentieren im Vergleich zum Kontrollmedium einen zusätzlichen Effekt schon bei der 1. Abnahme⁴². Am Ende der Kultur zeigt sich jedoch nur bei 50 und 100 ng/ml IGF-I (S-4: $0,18 \pm 0,05$ ($p < 0,00001$) und S-5: $0,17 \pm 0,06$ ($p < 0,00001$)) ein signifikanter Anstieg der Östradiolsekretion. Die Zellen aus den kleinen Follikeln weisen dagegen während des Kulturverlaufs unter den verschiedenen IGF-I-Dosierungen keine signifikante Steigerung der Östradiolsekretion auf.

Die alleinige Zugabe von hCG (S-1) oder FSH (S-2) ruft wie bei der Progesteronsekretion einen Unterschied hinsichtlich der zeitabhängigen Hormonwirkung auf die Östradiolsekretion hervor. Für die Granulosazellen der kleinen Follikel zeigt nur FSH eine starke zusätzliche und signifikante Östradiolsekretion schon ab der 1. Abnahme⁴³. Die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel dagegen präsentieren unter beiden Gonadotropinen einen zusätzlichen Effekt schon ab der 1. Abnahme⁴⁴ (allerdings nicht im Vergleich untereinander). Dies bedeutet, dass nur die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel auf eine hCG-Stimulation reagieren.

Wie bei der Progesteronsekretion lässt sich bei Betrachtung des zeitabhängigen Einflusses einer Prästimulation kein Unterschied zwischen beiden Gruppen mit Granulosazellen im Vergleich zum Einfluss über alle Abnahmen hinweg feststellen (Abschnitte 4.4.2 und 4.5.2). Dies bedeutet: nur bei den Granulosazellen der kleinen Follikel lässt sich der Einfluss einer Prästimulation mit FSH (S-13 und S-14) ab der 2. Abnahme bei einer nachfolgenden Hormonkombination mit IGF-I und hCG beobachten (S-13: 2. Abn. $0,74 \pm 0,54$ ($p < 0,00001$) und S-14: 2. Abn. $0,81 \pm 0,60$ ($p < 0,01$)⁴⁵. Bei den präovulatorischen Follikeln führen die Prästimulationen S-11 (hCG) und S-13 (FSH) sogar zu einer schwächeren Progesteronsekretion ab der 2. Abnahme (S-11: $-0,20 \pm 0,17$ ($p < 0,05$) und S-13: $-0,26 \pm 0,23$ ($p < 0,05$)) im Vergleich zur gleichen Hormonkombination ohne die entsprechende Prästimulation (S-7).

⁴² 1. Abn. S-3: $0,16 \pm 0,09$ ($p < 0,01$); S-4: $0,15 \pm 0,06$ ($p < 0,00001$); S-5: $0,10 \pm 0,07$ ($p < 0,05$); S-6: $0,14 \pm 0,09$ ($p < 0,05$).

⁴³ Effekt der S-2 (FSH) im Vergleich zur von S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $0,55 \pm 0,07$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $1,33 \pm 0,41$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $0,99 \pm 0,41$ ($p < 0,00001$).

⁴⁴ Effekt der S-2 (FSH) im Vergleich zur S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $0,23 \pm 0,06$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $0,35 \pm 0,13$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $0,09 \pm 0,06$ ($p < 0,005$).

Effekt der S-1 (hCG) im Vergleich S-0 (Kontrolle): 1. Abn. $0,22 \pm 0,06$ ($p < 0,00001$); 2. Abn. $0,31 \pm 0,11$ ($p < 0,00001$); 3. Abn. $0,10 \pm 0,05$ ($p < 0,0005$).

⁴⁵ S-13 vs. S-7: 3. Abn. $0,69 \pm 0,54$ ($p < 0,05$); S-14 vs. S-8: 3. Abn. $0,93 \pm 0,60$ ($p < 0,005$).

4.5.3 Zusammenfassung der Zeitabhängigen Hormonwirkungen - Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs auf die Progesteron- und Östradiolsekretion in beiden Granulosazellgruppen

Generell zeigt sich bei den Granulosazellen der kleinen Follikel ein Anstieg der Hormonsekretion (Progesteron und Östradiol) während des Kulturverlaufs mit einem verzögerten Effekt bei den meisten Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zum Kontrollmedium, außer bei alleiniger FSH-Zugabe oder in Kombination mit IGF-I. Die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel zeigen dagegen eine leichte Absenkung der Hormonsekretion (Progesteron und Östradiol) während des Kulturverlaufs mit einem früheren Effekt bei allen Hormonstimulationsprotokollen im Vergleich zum Kontrollmedium. Hierbei präsentiert die Hormonkombination von IGF-I und hCG den stärksten Effekt. Sowohl IGF-I allein als auch hCG allein führen bei dieser Zellgruppe schon am Anfang der Kultur zu einem signifikanten Effekt. Im Gegensatz dazu zeigt hCG keinen Effekt bei den Granulosazellen der kleinen Follikel und die Zugabe von IGF-I allein führt zu einem signifikanten Effekt auf die Progesteronsekretion nur am Ende der Kultur. Nur bei den Granulosazellen der kleinen Follikel führen die Prästimulationsprotokolle zu einem Anstieg der Hormonsekretion, allerdings nur bei einer FSH-Prästimulation mit einer nachfolgenden Hormonkombination von IGF-I und hCG im Vergleich zur gleichen Hormonkombination ohne die entsprechende Prästimulation. Bei den präovulatorischen Follikeln führen die FSH- und hCG-Prästimulationen, ebenfalls bei einer nachfolgenden Hormonkombination von IGF-I und hCG sogar zu einer schwächeren Hormonsekretion im Vergleich zur gleichen Hormonkombination ohne die entsprechende Prästimulation. Einen Überblick über die zeitabhängigen Hormonwirkungen zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Überblick über die zeitabhängigen Hormonwirkungen – Einfluss der verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs zwischen den Granulosazellen der kleinen (a) und der präovulatorischen (b) Follikel auf die Progesteron- (P_4) und Östradiolsekretion (E_2) im Kulturmedium. Eine Übersicht über die einzelnen Hormonbehandlungen S-0 – S-14 mit den Dosierungen finden Sie in Tabelle 3 auf Seite 21.

Vergleiche	Einfluss während des Kulturverlaufs auf die P_4 - und E_2 -Akkumulation im Kulturmedium. Der Unterschied zwischen den Granulosazellen der kleinen (a) und der präovulatorischen (b) Follikel.
P_4 - und E_2 -Akkumulation	Kontrolle: keine signifikante Veränderung Hormonstimulationen: (a) ansteigender Verlauf / (b) leichte Absenkung
S-0 (Kontrolle) vs. Hormonstimulationen: S-1 (hCG) S-2 (FSH) S-3 bis S-6 (IGF-I) S-7 und S-8 (hCG + IGF-I) S-9 (FSH + IGF-I) S-10 und S-11 (hCG-Prä.*) S-12, S-13 und S-14 (FSH-Prä.*)	(a) - späterer Anstieg der Steroidhormonsekretion (ab 2. oder 3. Abn), außer bei FSH allein oder in Kombination mit IGF-I; - Effekt von IGF-I nur am Ende des Kulturverlaufs und nur auf P_4 ; - kein Effekt von hCG (b) früherer Anstieg der Steroidhormonsekretion (ab 1. Abn) bei allen Hormonstimulationen; stärkste Wirkung bei Kombination S-7
Zwischen den verschiedenen IGF-I-Dosierung (S-3 bis S-6)	(a und b) Kein signifikanter Unterschied zwischen den IGF-I Dosierungen
Zwischen S-1 (hCG) und S-2 (FSH)	(a) FSH > hCG (b) FSH = hCG
Hormonkombination: S-7 (hCG + IGF-I) vs. S-4 (IGF-I) oder S-1 (hCG)	(a) Kein signifikanter Anstieg der Steroidhormonsekretion (aber für P_4 : am Ende der Kultur hCG + IGF-I > hCG) (b) hCG + IGF-I: > hCG bzw. > IGF-I**
Hormonkombination: S-8 (hCG + IGF-I) vs. S-5 (IGF-I) oder S-1 (hCG)	(a und b) hCG + IGF-I: = hCG bzw. = IGF-I
Hormonkombination: S-9 (FSH + IGF-I) vs. S-5 (IGF-I) oder S-2 (FSH)	(a) P_4 : FSH + IGF-I: > IGF-I bzw. > FSH E_2 : FSH + IGF-I: > IGF-I bzw. = FSH (b) FSH + IGF-I: = IGF-I bzw. = FSH
hCG-Prä.*: S-10 und S-11 vs. S-4 (IGF-I) bzw. S-7 (hCG + IGF-I)	(a) S-10 = S-4 und S-11 = S-7 (b) S-10 = S-4 und S-7 > S-11
FSH-Prä.*: S-12, S-13 und S-14 vs. S-4 (IGF-I), S-7 bzw. S-8 (hCG + IGF-I)	(a) S-12 = S-4, S-13 > S-7 und S-14 > S-8 (b) S-12 = S-4 und S-7 > S-13***

*Prä = mit Prästimulation

Lesebeispiel: ** hCG + IGF-I: > hCG bzw. > IGF-I bedeutet: Die gebildete Steroidmenge (P_4 oder E_2) ist bei der Hormonkombination von hCG und IGF-I signifikant höher als nach Zugabe von hCG allein bzw. von IGF-I allein. ***S-7 > S-13 bedeutet: Bei Zugabe der Hormonkombination hCG und IGF-I wurde eine signifikante Steigerung der Steroidhormonsekretion (P_4 oder E_2) beobachtet als bei der Zugabe der gleichen Kombination nach einer Prästimulation mit FSH.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von IGF-I allein oder in Kombination mit den Gonadotropinen in den Zellkulturen mit Granulosazellen kleiner Follikeln (0.5 – 1 mm) und präovulatorischer Follikel (> 2 mm) von Weißbüschelaffen untersucht. Diese Aufteilung erfolgte, um eine möglicherweise unterschiedliche Reaktion bei Zugabe von IGF-I allein oder in Kombination mit den Gonadotropinen auf unterschiedlich reife Follikel zu erforschen. Dazu lässt sich bisher Folgendes festhalten: Am 7. Tag der Follikelphase sind die präovulatorischen Follikel größer als 2 mm und unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch funktionell vom nicht ovulatorischen Follikel (HARLOW et al. 1988; GILCHRIST et al. 2001). Am ersten Tag der Kultur, das entspricht dem Tag 7 der Follikelphase, stehen die Zellkulturen unmittelbar vor dem endogenen LH-Anstieg (HODGES et al. 1987). Zu diesem Zeitpunkt reagieren die Granulosazellen in Abhängigkeit von den Gonadotropinen auf unterschiedliche Art und Weise. Die Granulosazellen der kleinen Follikel reagieren ausschließlich auf eine FSH-Gabe mit einer Steigerung der Progesteron- und der Östradiolsekretion, während die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel sowohl auf eine FSH- als auch auf eine hCG-Gabe (SHAW et al. 1989) ansprechen. Die im Rahmen der vorliegenden Studie kultivierten Zellen wurden während der 7-tägigen Inkubation mit Gaben von IGF-I, FSH und hCG sowie mit Kombinationsgaben von IGF-I/FSH und IGF-I/hCG stimuliert.

Bevor der Einfluss von IGF-I und den Gonadotropinen auf die Östradiol- und Progesteronsekretion der Granulosazellen diskutiert wird, sollen zunächst kurz die Befunde bei der Zellkulturvorbereitung und bei der Kultivierung von Granulosazellen kritisch betrachtet werden.

5.1 Zykluskontrolle

5.1.1 Anzahl und Größe der Follikel und Anzahl der Zellen pro Follikel

Mittels Ultraschalluntersuchungen während des ovariellen Zyklus der Weißbüschelaffen, die der Kontrolle des Zyklus dient, wurde das Vorhandensein von Follikeln sowie deren Wachstum überprüft. Der Vergleich zwischen der festgestellten Größe der präovulatorischen Follikel während der Ultraschalluntersuchung und der Größe der Follikel während der Zellkulturvorbereitung mittels eines Messokulars ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Ultraschalluntersuchung kann somit als eine zuverlässige Methode für die Follikelbeurteilung bei Weißbüschelaffen verwendet werden, was ebenfalls durch die Ergebnisse von OERKE et al. (1996) bestätigt wird.

Der Durchschnitt der Follikelgröße in den vorliegenden Untersuchungen ist ein wenig höher als der nach OERKE et al. (1996) und NUBBEMEYER et al. (1997). In dieser Studie aus dem Jahr 1996 wurde jedoch nur 5 Tiere bzw. 16 Follikel untersucht. Dieser Umstand könnte die Abweichung in den Untersuchungsbefunden erklären. Eine weitere mögliche Erklärung für den Unterschied könnte das eingesetzte Ultraschallgerät bieten. Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein modernes Ultraschallgerät eingesetzt, welches eine höhere Bildauflösung und Visualisierung und damit eine akkuratere Messung der Follikel erlaubt.

Die vorliegende Arbeit bestätigt weiterhin, dass die Anzahl der normalen kleinen Follikel, d.h. der nicht atretischen Follikel, $79 \pm 32,21$ (SD) beträgt und die Anzahl der präovulatorischen Follikel bei $2,91 \pm 0,90$ liegt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von GILCHRIST et al. (1995) vermerkt, wobei 6 Tiere im Durchschnitt 75 kleine Follikel und 2,5 präovulatorische Follikel aufwiesen. Eine weitere Studie des gleichen Autors (GILCHRIST et al. 2001) stellte bei 10 Tieren im Schnitt 2,5 präovulatorische Follikel und 70 kleine Follikel fest. Diese zweite Studie berichtet zudem über eine große Schwankung in der Anzahl der kleinen Follikel zwischen den Versuchstieren (13 bis 158), die höher als die der vorliegenden Arbeit (33 bis 137) ist. Diese Variation konnte in der Studie von GILCHRIST et al. (2001) nicht erklärt werden. Die festgestellte große Variation selbst spielt in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse der Hormonsekretion der Zellkulturen keine Rolle. In der Mehrebenenanalyse lässt sich bei Eingabe aller Daten über die Variabilität der Tiere $p > 0,05$ feststellen (s. Tabelle 4).

Der Prozentsatz der gefundenen normalen kleinen Follikel ist hier ein wenig geringer (82 % im Durchschnitt) als bei GILCHRIST et al. 2001 (90 % im Durchschnitt), ähnelt jedoch den von HILLIER et al. (1987) gefundenen Ergebnissen (70 – 80 %). Die Anzahl der Granulosazellen pro Follikel, sowohl bei den kleinen Follikeln als auch bei den präovulatorischen Follikeln ist niedriger als die bei HILLIER et al. (1987). Während in der vorliegenden Arbeit im Durchschnitt $1,17 \times 10^4$ Granulosazellen pro kleinem Follikel und 34×10^4 Granulosazellen pro präovulatorischem Follikel festgestellt wurden, berichtet HILLIER von durchschnittlich 5×10^4 bzw. 40×10^4 . Dieser Unterschied kann auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückgeführt werden, da die erwähnte Studie mit nur 5 Versuchstieren durchgeführt wurde, wobei keine Angaben über deren Alter gemacht wurden. Da sich die vorliegende Arbeit auf die Daten von 13 Tieren stützt, führt eine mögliche höhere Anzahl der Granulosazellen zu einem genaueren Durchschnitt. Die Variation der Anzahl der Zellen zwischen der Tiere spielt in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse der Hormonsekretion der Zellkulturen keine Rolle, was durch $p > 0,05$ bei der Mehrebenenanalyse belegt wird.

5.2 Morphologische Beobachtung und Apoptosenachweis

Die morphologische Beobachtung in den vorliegenden Untersuchungen hat eine qualitative Analyse zum Ziel, d.h. die Untersuchung möglicher Unterschiede hinsichtlich Form und Struktur der Zellverbände der unstimulierten Zellen (Kontrollgruppe) und der stimulierten Zellen (IGF-I, FSH, hCG). Während der Kulturdauer zeigen die Mehrzahl der Granulosazellen sowohl der kleinen als auch der präovulatorischen Follikel Unterschiede zwischen der Kontrollplatte und den hormonstimulierten Platten hinsichtlich Größe und Struktur der Zellverbände. In den Kontrollplatten lassen sich weniger Zellverbände und eher vereinzelte Zellen im Vergleich zu den hormonstimulierten Platten beobachten. Dies spiegelt sich in der Hormonproduktion (Progesteron und Östradiol) während der Zellkultur wieder, denn die Mehrzahl der Hormonstimulationsprotokolle zeigt einen zusätzlichen signifikanten Effekt auf die Hormonproduktion beider Zellgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 9, 10, 11 und 12). Das Resultat bestätigt die *in vitro* - Ergebnisse mit Weißbüschelaffen von HILLIER et al. (1987) und SHAW et al. (1993).

Der Vergleich der Zellgruppen bei unterschiedlicher Hormonstimulation präsentiert weder bei den Granulosazellen der kleinen Follikel noch bei den präovulatorischen Follikeln ein typisches Erscheinungsbild für eine bestimmte Hormonstimulation. Die Mehrzahl der hormonstimulierten Plattenvertiefungen zeigt unterschiedliche Formationen von Zellverbänden. In den Zellverbänden kommt es zu einer höheren Anzahl von Zell-Zell-Kontakten und das wirkt sich positiv auf die kultivierten Granulosazellen aus. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch RUNE et al. (1992), bei deren Untersuchung die Hormonstimulation (IGF-I und FSH) die Bildung von Zellverbänden förderte; charakteristisch dafür ist die Ausbildung von zahlreichen Gap Junctions zwischen den Zellen. In Studien mit Mäusen von GITTENS et al. (2003 und 2005) wurde beobachtet, dass die Gap Junctions bei der Follikelentwicklung sowie der Oozytenreifung eine wichtige Rolle spielen. Diese bestehenden Kanäle ermöglichen einen direkten und intensiven Austausch kleiner Moleküle, wie z.B. cAMP und Ca^{2+} , und sind damit von großer Bedeutung für die Weiterleitung endo- und parakriner Signale (TONG et al. 2007; NAKAGAWA et al. 2010). Im Primatenovar besteht zwischen den Granulosazellen ein intensiver Kontakt über Gap Junctions (RUNE et al. 1992). Somit scheint es wahrscheinlich, dass diese Kanäle auch bei der Zell-Zell-Kommunikation der kultivierten Granulosazellen des Weißbüschelaffen eine wichtige Rolle spielen.

Das Vorhandensein von rundlichen und länglichen Formen bei den Granulosazellen variiert sowohl bei den Granulosazellen der kleinen als auch bei denen der präovulatorischen Follikel; in der Literatur ließ sich jedoch kein Erklärungsansatz für eine solche Variation finden. Es ist eine Tendenz zu länglichen Formen in der Gruppe kleiner Follikel und zu rundlichen Formen bei der Gruppe der präovulatorischen Follikel erkennbar. Bezogen auf diese zweite Gruppe schrieb auch HILLIER et al. (1987), dass die Granulosazellen zur

Formation von Zellverbänden mit rundlichen Formen tendieren, wenn diese durch FSH stimuliert werden. Nach Erkenntnissen der vorliegenden eigenen Studie handelt es sich jedoch um eine für das Ergebnis der Studie unbedeutende Variation im optischen Erscheinungsbild.

In der vorliegenden Arbeit lassen sich bei beiden Gruppen apoptotische Zellen identifizieren. Ein Unterschied ist zwar hinsichtlich der Stimulationsprotokolle zwischen den unstimulierten Zellen (Kontrollgruppe) und den Zellen unter verschiedenen Hormonstimulationen (IGF-I, FSH und hCG) beobachtbar; jedoch nicht zwischen den einzelnen Hormonbehandlungsgruppen. Die Hormonstimulationen an sich fördern demnach einen anti-apoptischen Effekt in den Granulosazellen. Während der Follikelentwicklung wird nur eine bestimmte Follikelanzahl für die Ovulation selektiert, während die anderen Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien degenerieren (Atresie) (GREENSTEIN und RAUE 1996). Aktuelle Studien mit Granulosazellen von Ziegen und Schweinen zeigen, dass die Follikelatresie aus der Apoptose der Granulosazellen resultiert (YU et al. 2003; SUGIMOTO et al. 2010). Bei Follikeln von Weißbüschelaffen und Frauen fördern sowohl IGF-I als auch FSH durch den vermehrten Zell-Zell-Kontakt den anti-apoptischen Effekt (RUNE et al. 1992) sowie die Aktivierung der Zell-Mitogenese (WRIGHT et al. 1999; LOUHIO et al. 2000; MIHM und EVANS 2008). Auch bei Rindern hat ein vermehrter, durch IGF-I stimulierter Zell-Zell-Kontakt eine Verringerung der Apoptose (LUCIANO et al. 2000; MANI et al. 2010) zur Folge. Diese morphologische Beobachtung lässt sich auch in der vorliegenden Studie feststellen. In Untersuchungen mit Granulosazellen von Rindern und Ziegen wurden ebenfalls weitere anti-apoptische IGF-I und FSH-Effekte festgestellt, wie die Aktivierung der Enzymkaskaden (z.B. Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K) / Proteinkinase), die eine große Bedeutung für verschiedene Zellfunktionen wie Proliferation und Ausdifferenzierung haben (SILVA et al. 2009; MANI et al. 2010) sowie das Überleben der Zellen fördern (Ziege: YU et al. 2003; Rind: HU et al. 2004 und QUIRK et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigt auch hCG einen anti-apoptischen Effekt. Möglicherweise fördert die Erhöhung der Progesteronsekretion in den Zellen unter hCG-Stimulation diesen Effekt. Ähnliches wurde auch von CHAFFIN und STOUFFER (2000) beobachtet, bei deren Untersuchung hCG die Progesteronsekretion der Granulosazellen beim Rhesusaffen induziert hat. Es rief dort einen anti-apoptischen Effekt hervor, der möglicherweise aus der Aktivierung der Enzymkaskade (z.B. Proteinkinase G-Mechanismus) resultiert, die als Überlebensmechanismus wirkt (PELUSO 2003). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch SVENSSON et al. (2000) und YACOBI et al. (2004) bei Untersuchungen an Ratten.

5.3 Hormonakkumulationen im Kulturmedium

Die Arbeit zeigt, dass sich die Variabilität in den Hormonproduktionen (Progesteron und Östradiol) - beobachtet zwischen den Tieren unter den verschiedenen Hormonstimulationen - nicht auf die individuellen biologischen Eigenschaften der Versuchstiere zurückführen lässt. In der Tat beweist die Mehrebenenanalyse, dass weder die Variabilität der demografischen Eigenschaften der Versuchstiere noch die Variation der Anzahl der Zellen pro Follikel einen signifikanten Einfluss auf die Progesteron- und Östradiolakkumulation haben. Die Unterschiede in der Hormonproduktion zwischen den Tieren können nur durch möglicherweise individuelle, nicht sicht- bzw. messbare Eigenschaften der Tiere erklärt werden. Deswegen kann man vermuten, dass solche Unterschiede eher genetisch als biologisch sind. Entscheidend ist jedoch, dass die Variabilität der Hormonproduktion zwischen den Tieren keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der Analyse der Messwerte unter Berücksichtigung aller Tiere hat.

5.3.1 Hormonsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel

Die unstimulierten Granulosazellen der kleinen Follikel haben von selbst eine geringere Quantität sowohl an Progesteron als auch an Östradiol mit einer nicht signifikanten Variation im Verlauf der Kultur produziert. Ähnliche Befunde wurden sowohl in den Granulosazellen bei Frauen (ERICKSON et al. 1989 und 1991) als auch bei Weißbüschelaffen (SHAW et al. 1993) beobachtet. Dies bedeutet, dass die Zellen, ohne Hormonstimulation in einer serumfreien Kultur in der Lage sind, eine geringere Quantität an Steroiden zu produzieren.

5.3.1.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Die Granulosazellen der kleinen Follikel zeigen unter den verschiedenen Hormonstimulationen während des Kulturverlaufs eine kontinuierlich ansteigende Progesteronsekretion; jedoch in den ersten zwei Kulturtagen eine nur geringe oder nicht signifikante Erhöhung der Progesteronsekretion. Dies zeigt, dass sich ein Anstieg der Steroidhormonsekretion bei den Granulosazellen der kleinen Follikel unter den verschiedenen Hormonstimulationen erst nach einem längeren Zeitraum messen lässt - mit zwei Ausnahmen: bei einer alleinigen FSH-Zugabe und bei einer Zugabe von FSH in Kombination mit IGF-I tritt ein starker Effekt schon am Anfang der Kultur auf. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch MONNIEAUX und PISSELET (1992) bei einer Untersuchung von porcinen Granulosazellen kleiner Follikel. In ihren Untersuchungen nahm die Anzahl der Granulosazellen der kleinen Follikel schon während des Kulturverlaufs zu und die Autoren vermuteten, dass z.B. IGF-I diese Mitogenese-Funktion gefördert haben könnte, so auch

MANI et al (2010) bei Rindern. GUTIÉRREZ et al. (1997) haben auch beobachtet, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel die Fähigkeit haben, *in vitro* zu reifen und dann zur Progesteronsekretion befähigt sind. Das bestätigen auch die hier erarbeiteten Ergebnisse beim Weißbüschelaffen. Auf diese Weise kann die Hypothese formuliert werden, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel von Weißbüschelaffen die Fähigkeit haben, *in vitro* zu reifen und damit im Zuge des Kulturverlaufs eine mit den präovulatorischen Follikeln vergleichbare Charakteristik aufweisen. Das wurde ebenso bei *in vitro* - Untersuchungen mit Granulosazellen von Rindern und Pferden beobachtet, bei denen die kleinen Follikel während des Kulturverlaufs ohne die Anwesenheit dominanter Follikel zu reifen beginnen und Merkmale präovulatorischer Follikel aufweisen (BEG und GINTHER 2006).

Die hauptsächliche Funktion des IGF-I bei den Granulosazellen der kleinen Follikel ist die Verstärkung der Gonadotropinwirkung. Diese Wirkung lässt sich allerdings noch durch eine Kombination von IGF-I und FSH verstärken. In der Tat zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass von den verschiedenen, getesteten IGF-I-Konzentrationen, die zu einem kontinuierlichen Anstieg der Progesteronsekretion führen, nur zwei Konzentrationen (50 und 1000 ng/ml) einen signifikanten Effekt am Ende des Kulturverlaufs im Vergleich zum Basalwert präsentieren. Betrachtet man die vier getesteten IGF-I-Konzentrationen untereinander – d.h. nicht im Vergleich zum Basalwert – ergab sich kein signifikanter Unterschied. SHAW et al. (1993) haben ebenfalls den Effekt von IGF-I auf die Granulosazellen der Weißbüschelaffen analysiert und ähnliche Befunden beschrieben. Jedoch gibt es einen kleinen Unterschied im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. Die oben genannten Autoren beschreiben einen kleinen zusätzlichen Effekt von IGF-I schon ab dem vierten Kulturtag. Ein solcher Effekt ließ sich jedoch in der vorliegenden Untersuchung erst am Ende des Kulturverlaufs, d.h. nach 144 Stunden, nachweisen. Das könnte aber an den unterschiedlichen, verwendeten Konzentrationen von IGF-I liegen. Weiterhin zeigt eine detaillierte Analyse der Grafiken von SHAW et al. (1993), dass ein deutlicher Effekt von IGF-I auch nur am Ende der Kultur (nach 144 Stunden) beobachtbar ist.

Eine andere Untersuchung mit Granulosazellen von Frauen (ERICKSON et al. 1991) widerspricht den vorliegenden Ergebnissen von Weißbüschelaffen. Sie beschrieben, dass IGF-I allein keinen Effekt auf die Progesteronsekretion bei den Granulosazellen der kleinen Follikel während des Kulturverlaufs hervorruft. Allerdings wurde ausschließlich mit Konzentrationen von weniger als 50 ng/ml von IGF-I gearbeitet. Auch in der vorliegenden Arbeit lässt sich bei einer Dosis von 10 ng/ml IGF-I kein Effekt beobachten. Es zeigen jedoch alle Arbeiten, dass die Granulosazellen bzw. die Follikel während ihrer Entwicklung die Fähigkeit erwerben, auf IGF-I zu reagieren, so auch GUTHRIE et al. (1998) bei Schweinen und GLISTER et al. (2001) bei Rindern. Dies lässt vermuten, dass während der Follikelentwicklung IGF-I die Anzahl der Zell-Rezeptoren für IGF-I erhöht und so die Fähigkeit der Zellen verbessert, IGF-I zu binden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch

EL-ROEIY et al. (1993) sowie PORETSKY et al. (1999) bei Untersuchungen mit Granulosazellen von Frauen.

Der Anstieg in der Progesteronproduktion bei Zugabe der Hormonkombination (IGF-I und Gonadotropine) beweist, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel schneller auf IGF-I reagieren können, wenn diese Peptide gemeinsam mit FSH wirken. So steigert die Hormonkombination den Effekt von IGF-I schon ab dem zweiten Kulturtag; ab dem vierten Tag zeigt sich ein erhöhter Effekt auch im Vergleich zur alleinigen FSH-Zugabe. Da die Granulosazellen der kleinen Follikel bereits frühzeitig eine starke Kapazität aufweisen, auf FSH zu reagieren, kann man vermuten, dass der beobachtete Effekt in den ersten Kulturtagen nur durch FSH verursacht wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch HILLIER et al. (1987) bei Untersuchungen mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass ein Zusammenwirken von IGF-I und FSH in der vorliegenden Arbeit existiert, da diese Kombination ab dem vierten Kulturtag zu einer stärkeren Progesteronsekretion als bei der einzelnen Zugabe beider Hormone führt.

Ein Unterschied wurde in einer Studie mit Granulosazellen von Frauen (ERICKSON et al. 1991) gefunden. Dort riefen die Hormonkombination unterschiedliche Reaktionen hervor. Mitunter ließ sich ein Anstieg der IGF-I- und FSH-Wirkung bereits ab dem zweiten Tag beobachten, mit einer Verstärkung des Effekts von FSH, wenn die Dosierung von IGF-I gesteigert wurde. In anderen Fällen zeigte sich aber auch keinerlei Zusammenwirken beider Hormone. Eine Erklärung hierfür könnte sowohl sein, dass andere Hormonkonzentrationen verwendet wurden und der Test der Kombination IGF-I und FSH an nur sechs Follikeln durchgeführt wurde, während in der vorliegenden Untersuchung $79 \pm 32,21$ Follikel verwendet wurden.

SHAW et al. (1993) beobachteten in einer Studie mit Weißbüschelaffen, dass die Hormonkombination einen stärkeren Effekt als die alleinige IGF-I-Gabe hervorruft, jedoch im Gegenteil zu der vorliegende Arbeit konnten die oben genannten Autoren keine Erhöhung des FSH-Effekts beobachten. Man könnte vermuten, dass die FSH-Dosis zu gering war (5 ng/ml). In der vorliegenden Untersuchung wurde 50 ng/ml FSH verwendet. In der Tat zeigen auch weitere Studien mit verschiedenen Tierspezies, dass der stärkste Effekt auf die Progesteronsekretion auftritt, wenn IGF-I mit FSH kombiniert wird (Rinder: z.B. SPICER et al. 1993, Mäuse: z.B. ZHOU et al. 1997 und ADASHI et al. 1997, Schweine: z.B. HICKEY et al. 2004).

Die Steigerung des IGF-I-Effekts könnte mit einer Stimulierung der FSH-Rezeptoren zusammenhängen, und damit zu einer Verstärkung des FSH-Effekts führen (positives Feedback), wie in der vorliegenden Studie ab dem vierten Kulturtag zu beobachten. Möglich ist aber auch, dass IGF-I einen direkten oder indirekten Effekt hervorruft. ZHOU et al. (1997) legen nach *in vitro* - Untersuchungen an Mäusen folgende Erklärungsversuche vor. Sie

vermuten, dass diese Peptide direkt die FSH-Rezeptoren stimulieren können (siehe auch MANI et al. 2010 in ihren Untersuchung mit Rindern). Ein indirekter Effekt hingegen wird ihrer Meinung nach durch die Stimulierung der Zellreifung von IGF-I hervorgerufen, da dies zu einer Steigerung der Anzahl der Gonadotropinrezeptoren führt, was mit einer stärkeren FSH-Wirkung einhergeht. Der beobachtete stärkere Effekt von IGF-I in der vorliegenden Studie legt die Hypothese nahe, dass FSH möglicherweise die IGF-I-Rezeptoren in den Granulosazellen der kleinen Follikel der Weißbüschelaffen stimuliert (siehe auch ADASHI 1998; MAZERBOURG et al. 2003 in ihren Untersuchungen mit Ratten).

In einer weiteren Untersuchung mit Granulosazellen von Ratten erklären MINEGISHI et al. (2000) den Wirkungsmechanismus von IGF-I auf die FSH-Rezeptoren. Die Autoren konnten zeigen, dass IGF-I in Anwesenheit von FSH die Aktivität der Gonadotropinrezeptoren verlängert und damit eine indirekte Erhöhung der mRNA-Expression für diese Rezeptoren stimuliert. Ein wichtiges Detailergebnis der Untersuchung war, dass der erhöhte FSH-Effekt bei Zugabe einer Hormonkombination von FSH und IGF-I erst nach 72 Stunden auftrat. Dies erklärt, warum in der vorliegenden Arbeit die Hormonkombinationen in den ersten 48 Stunden nur die Wirkung von IGF-I steigern, und sich erst in der zweiten Abnahme (nach 96 Stunden) auch eine gesteigerte Wirkung von FSH feststellen lässt.

Die Analyse der Enzyme, die für die Progesteronproduktion verantwortlich sind, war nicht Ziel dieser Studie. Untersuchung an Granulosazellen von Ratten (DEMOURA et al. 1997; EIMERL und ORLY 2002) zeigen jedoch, dass die Hormonkombination eine Erhöhung der Expression verschiedener Enzyme, wie P450_{scc} und 3 β -HSD stimuliert. Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle ergänzt werden, dass das eine weitere Hypothese für die Erhöhung der Progesteronsekretion sein könnte, der aber hier nicht weiter nachgegangen wird.

Andere Untersuchungen bieten weitere Erklärungsansätze für die Steigerung der Progesteronproduktion. YU et al. (2003) beobachteten in einer Untersuchung mit Granulosazellen von Ziegen, dass FSH und IGF-I jeweils allein die Progesteronsekretion steigern, aber besonders stark als Kombinationsgabe. Diese Autoren gehen davon aus, dass FSH möglicherweise durch den Proteinkinase A-„Pathway“ (PKA-Pathway) die IGF-Produktion und so den Effekt beider Hormone steigert. PKA beeinflusst nach YU et al. (2003) direkt die Expression und/oder die Aktivität der Aromatase und des Steroidogenic acute regulatory protein (StAR-Proteins). LAVOIE et al. (2004) beobachteten, dass eine Hormonkombination von IGF-I und FSH in Granulosazellkulturen von Schweinen einen zusätzlichen Effekt auf das StAR-Protein hervorruft. StAR ist ein Protein, das für den Transport von Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran sorgt. Es kommt zu einer Abspaltung einer Seitenkette des Cholesterins durch das P450_{scc}, wobei das

Steroid Pregnenolon gebildet wird, wodurch es letztendlich zu einer Steigerung der Progesteronproduktion kommt (STOCCO 1998; JAMNONGJIT und HAMMES 2006).

Im Gegensatz zu FSH beeinflusst IGF-I kaum den hCG-Effekt. Diese Hormonkombination führt zu einem geringen signifikanten Effekt ab dem vierten Kulturtag im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Eine leichte Steigerung des hCG-Effekts lässt sich jedoch nur am Ende der Kultur beobachten. In den bisherigen Veröffentlichungen lassen sich nur wenige Hinweise auf den Effekt der Hormonkombination IGF-I und hCG bei den Granulosazellen der kleinen Follikel finden. Die beobachteten Befunde können möglicherweise auf die alleinige Wirkung von IGF-I zurückgeführt werden, da dieses Peptid am Ende der Kultur zu einem signifikanten Effekt auf die Progesteronsekretion führt. Man könnte aber auch vermuten, dass diese Hormonkombination bei den Granulosazellen der kleinen Follikel möglicherweise dazu führt, dass vermehrt cAMP oder Enzyme der Steroidgenese gebildet werden. Das könnte erklären, warum die Granulosazellen unter der Hormonkombination nach einigen Kulturtagen mehr Progesteron bilden, als die unstimulierten Zellen. Eine höhere Dosis von IGF-I mit hCG zeigt keinen Effekt und es lässt sich auch kein Unterschied zwischen beiden Hormonstimulationen beobachten. Dieser Befund beweist, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel mehr Zeit benötigen, um einen Effekt bei Zugabe der Hormonkombination IGF-I und hCG zu zeigen.

Durch die Ergebnisse der alleinigen Zugabe der Gonadotropin lässt sich auch bestätigen, dass die Zugabe von FSH zu einem stärkeren und schnelleren Effekt im Vergleich zur hCG-Zugabe führt. Das FSH erhöht bereits während der ersten 2 Tage die Progesteronsekretion, während hCG keinen Effekt hervorruft, trotz einer kleinen Steigerung der Progesteronsekretion. Dieser Effekt war zu erwarten, denn die kleinen Follikel bilden während der Follikelentwicklung zuerst FSH-Rezeptoren und danach hCG-Rezeptoren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden von HILLIER et al. (1987) und von SHAW et al. (1989) aus *in vitro*-Experimenten mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen, die unmittelbar vor dem endogenen LH-Anstieg (Tag 7 nach einer PGF_{2α}-Gabe) gesammelt wurden. Die starke Erhöhung der Progesteronproduktion bei den Granulosazellen der kleinen Follikel unter der FSH-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen wurde schon bei anderen Untersuchungen mit Weißbüschelaffen (HILLIER et al. 1987; HARLOW et al. 1988; SHAW et al. 1993) und mit Frauen (ERICKSON et al. 1991) beschrieben. MULHERON et al. (1990) und SHANMUGAM et al. (2009) beobachteten ebenfalls bei *in vitro*-Untersuchungen mit Granulosazellen von Schweinen bzw. von Rindern, dass die Zellen aus den kleinen Follikeln unter FSH-Zugabe eine deutlich höhere Progesteronsekretion im Vergleich zu den Zellen der präovulatorischen Follikel aufweisen. Das könnte zum Beispiel eine Folge der starken FSH-Abhängigkeit der Granulosazellen der kleinen Follikel sein.

Eine Vorinkubation mit FSH hat keine fördernde Wirkung, wenn IGF-I erst 48 und 96 Stunden nach der FSH-Zugabe zugegeben wird. Eine zeitgleiche Gabe von FSH und IGF-I als Hormonkombination bedingt allerdings eine Steigerung der Effekte beider Hormone. Es ist deshalb zu vermuten, dass der Effekt auf die Progesteronproduktion nur durch das Zusammenwirken beider Hormone zustande kommt.

Eine FSH-Prästimulation erhöht allerdings den Effekt, wenn nachfolgend die Hormonkombination hCG und IGF-I zugegeben wird. Dies deutet darauf hin, dass FSH die Granulosazellen auf die Wirkung von hCG sensibilisiert, wovon auch HILLIER et al. (1987) und SHAW et al. (1989) ausgehen. Diese Autoren haben beschrieben, dass die Granulosazellen der kleinen antralen Follikel des Weißbüschelaffen nach einer 48-stündigen FSH-Vorinkubation wie die Granulosazellen der großen antralen Follikel in der Lage sind, auf die Stimulation mit hCG mit einer gesteigerten Progesteronsekretion zu reagieren. Folglich ist die Ausbildung der LH/CG-Sensitivität vom Reifungsgrad der Granulosazellen abhängig, wobei die Reifung der Zellen durch FSH vorangetrieben wird. Weitere Studien an Granulosazellen von Frauen (SULLIVAN et al. 1999) sowie über die Follikelselektion bei Primaten (ZELEZNIK 2001) unterstützen die Hypothese, dass FSH die Expression von hCG-Rezeptoren induziert. An Untersuchungen mit Granulosazellen von Ratten (HIRAKAWA et al. 1999; MINEGISHI et al. 2004) ließ sich außerdem zeigen, dass FSH die mRNA für LH-Rezeptoren erhöht und IGF-I diesen Vorgang unterstützt. Im Prinzip hemmt IGF-I den Abbau der LH-Rezeptoren und erhöht so die Halbwertszeit dieser Rezeptoren. Diese Beobachtungen weisen möglicherweise auf eine wichtige Abhängigkeit zwischen den Gonadotropinen und IGF-I bei der Erzeugung des präovulatorischen Follikels hin und beeinflussen somit auch den darauf folgenden Eisprung.

Eine Prästimulation mit hCG hat dagegen keinen Einfluss. Eine solche Prästimulation führt bei einer nachfolgenden IGF-I-Gabe – allein oder in Kombination mit hCG – zu keiner Erhöhung der Progesteronsekretion im Vergleich zur Zugabe der gleichen Hormone ohne eine entsprechende Prästimulation. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel zu Beginn der Zellkultur nicht in der Lage sind, auf hCG zu reagieren, da sie keine hCG-Rezeptoren besitzen. Auch SHAW et al. (1989) weisen in einer Studie mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen darauf hin, dass diese Zellen mehr Zeit brauchen, um auf hCG reagieren zu können.

5.3.1.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen kleiner Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Im Allgemeinen kann bei den meisten stimulierten Zellen in den ersten 48 Stunden eine geringe oder gar keine signifikante Erhöhung beobachtet werden, allerdings mit einer kontinuierlich ansteigenden Tendenz der Östradiolsekretion. Dieses Ergebnis war zu

erwarten, da die Aromataseaktivität bzw. die Östradiolsekretion mit der Follikelentwicklung ansteigt. Mit der Analyse der Östradiolproduktion kann auch bestätigt werden, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel die Fähigkeit haben, sich *in vitro* zu entwickeln. Dies wurde ebenfalls bei der Analyse der Progesteronproduktion beschrieben (GUTIÉRREZ et al. 1997; BEG und GINTHER 2006).

IGF-I allein führt bei den Granulosazellen der kleinen Follikel zu keiner signifikanten Erhöhung der Östradiolsekretion in der hier vorgestellte Studie. Auch zeigen die unterschiedlichen Konzentrationen von IGF-I bei zeitabhängiger Betrachtung nur schwache bzw. variable Effekte. SHAW et al. (1993) legen dar, dass IGF-I bei Weißbüschelaffen allein zu einem leichten Anstieg der Östradiolsekretion am Ende der Kultur führt. Bei genauer Analyse der Ergebnisse der Autoren zeigt sich jedoch, dass IGF-I zu keiner deutlichen Erhöhung der Östradiolsekretion im Vergleich zu den Basiswerten führt. Im Gegensatz zum Effekt von IGF-I auf die Progesteronsekretion am Ende der Kultur, zeigt sich kein Effekt auf die Östradiolsekretion dieses Peptids. Man kann vermuten, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel IGF-I-Rezeptoren besitzen, da diese Zellen auf IGF-I allein reagieren und eine Erhöhung der Progesteronsekretion zeigen. Diese Rezeptoren scheinen jedoch nicht mit der Östradiolsekretion verbunden zu sein, was darauf hindeutet, dass IGF-I die Sekretion des Progesterons und des Östradiols unterschiedlich reguliert.

Die Hormonkombination von IGF-I und FSH wirkt sich auf die Östradiolsekretion aus. Diese Kombination zeigt einen signifikanten Unterschied sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Hormonzugabe als auch im Vergleich zur alleinigen IGF-I-Gabe. Der Effekt ist allerdings vergleichbar stark wie bei der alleinigen Zugabe von FSH. Nach SHAW et al. (1993) erhöht Östradiol die Wirkung von IGF-I, was darauf hindeutet, dass die Zellen weiter entwickelt sein müssen, um auf IGF-I reagieren zu können. Die oben genannten Autoren konnten keine fördernde Wirkung von IGF-I bei den FSH-stimulierten Granulosazellen von Weißbüschelaffen beobachten. Der stärkere Effekt der Hormonkombination im Vergleich zum Effekt bei alleiniger Zugabe von IGF-I, der sich schon ab dem zweiten Kulturtag zeigt, lässt vermuten, dass die Granulosazellen der kleinen Follikel schneller auf IGF-I reagieren können, wenn eine entsprechende FSH Konzentration vorliegt.

Obwohl sich eine leichte Steigerung des hCG-Effekts unter der Hormonkombination von IGF-I und hCG bei der Analyse des Gesamteinflusses der verschiedenen Hormonstimulationen (siehe 4.4.2) beobachten lässt, zeigt die Analyse der zeitabhängigen Hormonwirkung erwartungsgemäß ein anderes Bild. Die Hormonkombination ruft während des Kulturverlaufs im Vergleich zur alleinigen Zugabe beider Hormone keinen zusätzlichen Effekt hervor. Beide Analysen zusammen (die zeitabhängige Hormonwirkung und der Gesamteinfluss der verschiedenen Hormonstimulationen) ermöglichen eine genauere

Beobachtung des Hormon-Effekts. Die Granulosazellen der kleinen Follikel brauchen mehr Zeit, um auf hCG und IGF-I mit einer Steigerung der Steroidproduktion (Progesteron und Östradiol) reagieren zu können. Trotzdem führt diese Hormonkombination zu einer geringen Erhöhung der Östradiolsekretion im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Bisher ist derartiges Verhalten nicht publiziert worden. Möglicherweise könnte diese Hormonkombination die Synthese von cAMP steigern und damit zu einer Erhöhung der Östradiolsekretion führen.

Die Wirkung auf die Östradiolsekretion bei alleiniger Zugabe beider Gonadotropine führt zum gleichen Effekt wie bei der Progesteronsekretion. Nur FSH führt zu einer starken und signifikanten Steigerung der Östradiolsekretion bei den Granulosazellen der kleinen Follikel, da diese Zellen schon FSH-Rezeptoren aufweisen. Sie haben aber noch nicht die Fähigkeit, auf hCG zu reagieren, da die hCG-Rezeptoren noch fehlen.

Wie für die Progesteronsekretion führt die Gonadotropinprästimulation zu einem Effekt auf die Östradiolsekretion nur dann, wenn die Zellen unter einer FSH-Prästimulation bei einer nachfolgenden Hormonkombination von hCG und IGF-I stimuliert werden. Dies deutet darauf hin, dass FSH auch bei der Östradiolsekretion die Zellen auf hCG sensibilisiert. Ähnliches wurde auch von MINEGISCHI et al. (2004) bei Untersuchung mit Granulosazellen von Ratten beschrieben. Es lässt sich vermuten, dass FSH möglicherweise die hCG/LH-Rezeptoren stimuliert und dieser Effekt mit IGF-I gesteigert auftritt. Bei den anderen Prästimulationen lässt sich kein Effekt beobachten, wie schon für die Progesteronsekretion erklärt wurde.

5.3.2 Hormonsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium

Sowohl Progesteron als auch Östradiol werden während der Kultur bei den unstimulierten Granulosazellen der präovulatorischen Follikel synthetisiert. Dies bedeutet, dass diese Zellen auch ohne Hormonstimulation in serumfreier Kultur in der Lage sind, eine basale Sekretion von Steroiden zu produzieren, wie schon bei den Granulosazellen der kleinen Follikel beobachtet werden konnte. Trotz eines geringen Abfalls bei beiden Hormonen am Ende der Kultur, produzieren diese Zellen signifikant höhere Basalwerte als die Granulosazellen der kleinen Follikel. Der geringe Abfall der Hormonproduktion am Ende der Kultur lässt sich auch unter anderen Hormonstimulationen beobachten und entspricht Befunden von ERICKSON et al. (1991) und STEVENSON (2000) bei Untersuchungen mit Granulosazellen der präovulatorischen Follikel von Frauen. Die erhöhte Östradiolsekretion bei den unstimulierten Granulosazellen der präovulatorischen Follikel im Vergleich zu den kleinen Follikel war zu erwarten, da die Granulosazellen im Laufe der Follikelentwicklung eine hohe Konzentration und eine stärkere Aktivität der Aromatase und damit eine erhöhte

Produktion von Östradiol aufweisen. Dies ließ sich ebenfalls bei Untersuchungen mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen (HILLIER et al. 1987; HODGES 1987), von Frauen (WILLIS et al. 1998) sowie bei anderen Spezies wie z.B. Schafen (ARMSTRONG et al. 1996) nachweisen.

5.3.2.1 Progesteronsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Im Gegensatz zu den Granulosazellen der kleinen Follikel fördert IGF-I bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel einen Progesteronanstieg schon mit Kulturbeginn. Ähnliche Befunde, d.h. ein Effekt von IGF-I auf die Progesteronsekretion ab dem vierten Tag zeigen die Untersuchungen von SHAW et al. (1993). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die IGF-I-Dosierungen von 50 und 100 ng/ml eine konstante Progesteronsekretion während der Zellkultur hervorrufen. Eine geringere Dosis scheint jedoch nicht auszureichen, um den gewünschten Anstieg hervorzurufen. Dies zeigt sich bei der in dieser Untersuchung verwendeten Dosis von 10 ng/ml und in einer weiteren Untersuchung mit Granulosazellen von Frauen (ERICKSON et al. 1991), bei der die Verwendung einer Dosis von 30 ng/ml von IGF-I zu keinem deutlichen Anstieg der Progesteronsekretion bei der Zellkultur unter IGF-I-Stimulation führte. Der Effekt von IGF-I allein in der vorliegenden Studie zeigt, dass dieses Peptid unabhängig von den Gonadotropinen eine erfolgreiche Progesteronproduktion bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel hervorrufen kann. Dies deutet darauf hin, dass das IGF-I eine wichtige Rolle als lokaler Regulator während der Entwicklung und des Wachstums des dominanten Follikels spielt.

Wie in dieser Untersuchung dargestellt, erwerben die Granulosazellen der Weißbüschelaffen während der Follikelentwicklung die Fähigkeit, auf IGF-I zu reagieren. Deshalb lässt sich im Verlauf eine Steigerung der Steroidgenese beobachten. Dies liegt wahrscheinlich an der Zunahme der IGF-I-Rezeptoren, wie entsprechende Untersuchungen mit Granulosazellen von Frauen (EL-ROEIY et al. 1993; PORETSKY et al. 1999), Rindern (SCHAMS et al. 1999) und Geflügel (TOSCA et al. 2008) nahelegen.

Die IGF-BPs wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen; andere Studien zeigen jedoch (SUIKKARI et al. 1989; ADASHI et al. 1997; BRIDGES et al. 2002; SPICER 2004), dass diese Proteine, die im Ovar produziert werden, Auswirkungen auf die Regulierung des Effekts von IGF-I haben. Einige Studien mit verschiedenen Tierspezies (Nagetiere und Schweine: PORETSKY et al. 1999, Primaten: GIUDICE 2001, Rinder: WEBB et al. 2003, Pferde: BRIDGES et al. 2002; WATSON et al. 2004 und Schafe: HASTIE und HARESIGN 2006) zeigen, dass sich während der Follikelentwicklung die Konzentration der IGF-BPs verringert und es zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von IGF bzw. zu einer Steigerung des Effekts von IGF auf die Granulosazellen kommt. Auch hier soll der Vollständigkeit halber

ergänzt werden, dass dies ein weiterer Erklärungsansatz für die Erhöhung der Progesteronsekretion sein könnte, der aber nicht vertieft wird und eventuell Ausgangspunkt einer Hypothese für weitere Studien sein könnte.

Im Gegensatz zu den Granulosazellen der kleinen Follikel zeigt die Hormonkombination von IGF-I und hCG bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel eine schnellere und stärkere Wirkung auf die Progesteronsekretion. Hintergrund ist, dass diese Hormonkombination die Progesteronsekretion schon am Anfang der Kultur im Vergleich zur alleinigen Zugabe des jeweiligen Hormons stimuliert. Dieses beobachtete Resultat entspricht den Befunden von Experimenten mit Granulosazellen von Frauen (ERICKSON et al. 1991). Die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel entwickeln die LH/CG-Sensitivität bereits vor dem endogenen LH-Anstieg am 7. Zyklustag. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen (HODGES et al. 1987; HARLOW et al. 1988; HILLIER et al. 1988; SHAW et al. 1989). Dabei stimuliert LH/CG von selbst die Anzahl der Rezeptoren (YONG et al. 1992) und IGF-I verstärkt diesen Effekt, da es die Halbwertszeit dieser LH-Rezeptoren erhöht (HIRAKAWA et al. 1999; JAMNONGJIT und HAMMES 2006). Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass IGF-I mit den Gonadotropinen bei der Reifung und der Differenzierung der Follikel hilft. Ein weiterer Erklärungsansatz für den stärkeren Effekt der IGF-I/hCG-Kombination ist die Hypothese, dass dieses Gonadotropin einige IGF-BPs hemmt und damit die Bioverfügbarkeit bzw. die Wirkung von IGF-I steigert (GIUDICE 1992; GINTHER et al. 2001). Man könnte allerdings auch vermuten, dass dieses Gonadotropin möglicherweise direkt die Expression von IGF-I erhöht (GINTHER et al. 2001).

Es zeigt sich weiterhin, dass die Hormonkombination von hCG mit einer höheren IGF-I-Dosis keinen größeren Effekt als die alleinige Zugabe beider Hormone hervorruft. Es lässt sich allerdings nicht bestätigen, dass eine höhere Dosis dieser Peptide in Kombination mit hCG die Produktion von Progesteron behindert bzw. die Zelldifferenzierung beeinträchtigt, da sie mit einem Anstieg der Progesteron-Basalwerte einhergeht. Nach DOI et al. (2005) und GIUDICE (2006) könnte eine hohe zirkulierende IGF-I-Konzentration zusammen mit anderen physiologischen Störfaktoren möglicherweise das Risiko des Auftretens eines polyzystischen Ovarsyndroms erhöhen.

Möglicherweise lässt sich die Steigerung der Progesteronsekretion bei der Hormonkombination mit der Einzelwirkung der Hormone IGF-I und FSH erklären, da der Effekt nur im Vergleich zu den Basalwerten auftritt. In jedem Fall erhält die Hormonkombination aber die Progesteronproduktion bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel aufrecht. In anderen Untersuchungen mit Granulosazellen der präovulatorischen Follikel von Weißbüschelaffen (SHAW et al. 1993) und Frauen (ERICKSON et al. 1991) wird ebenfalls berichtet, dass IGF-I in Kombination mit FSH keine

Steigerung des Effekts von FSH bewirkt. Im Unterschied zur vorliegenden Studie berichten die genannten Autoren von einer Steigerung des Effekts von IGF-I allein. Eine detaillierte Analyse des Ergebnisses zeigt aber, dass dieser Effekt bei der Untersuchung mit den Granulosazellen von Frauen ab dem vierten Tag der Kultur gering ausfällt und bei der anderen Untersuchung mit Weißbüschelaffen eher additiv als synergetisch ist. Diese sich widersprechenden Ergebnisse könnten sich aber durch die unterschiedlich verwendete Dosis erklären. Allerdings kann das nicht beobachtete Zusammenwirken von FSH und IGF-I auch darauf hindeuten, dass beide Hormone in völlig unabhängiger Weise und möglicherweise an verschiedenen Orten der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel wirken (SHAW et al. 1993).

Es scheint, dass der Hintergrund für den nicht eingetretenen unterschiedlich großen Effekt auf die Progesteronsekretion bei Zugabe der Hormonkombination im Vergleich zur Zugabe der Einzelhormone wohl nicht der Umstand war, dass eine gleiche FSH-Dosis sowohl für die Granulosazellen der kleinen Follikel als auch für die präovulatorischen Follikel verwendet wurde, um die Wirkung auf beide Zellgruppen vergleichen zu können. Frühere Arbeiten (HILLIER et al. 1987) haben in diesem Zusammenhang bereits bestätigt, dass die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel sensibler auf FSH reagieren und deshalb eine geringere Dosis benötigen. Hinzu kommt, dass eine höhere Dosis von FSH zu einer geringen Absenkung der Progesteronsekretion führt. In anderen Arbeiten, bei denen sowohl niedrigere (SHAW et al. 1993) als auch höhere (ERICKSON et al. 1991) FSH- und IGF-I-Dosierungen getestet wurden, ließ sich kein unterschiedlicher Effekt auf die Progesteronsekretion bei Verwendung einer Hormonkombination im Vergleich zu einer isolierten FSH-Gabe erkennen. Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit die gleiche Dosis für beide Granulosazellengruppen verwendet worden.

Bei der Analyse des Gonadotropineffekts bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel lässt sich bestätigen, dass die FSH-Stimulation ungefähr viermal schwächer als bei den kleinen Follikeln ist. Ähnliche Untersuchungen mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. Auch hier ließ sich bei den kleinen Follikeln ein zwei- bis sechsmal stärkerer Effekt auf die Steroidhormonsekretion feststellen (HILLIER et al. 1987; HARLOW et al. 1988; SHAW et al. 1993). Eine Erklärung bietet die geringere FSH-Abhängigkeit der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel, die zu einer schwächeren Progesteronsekretion im Vergleich zu den Basalwerten führt. Bereits am Anfang der Kultur ist die hCG-Wirkung auf die Progesteronsekretion mit der FSH-Wirkung vergleichbar. Im Gegensatz zu den kleinen Follikeln weisen Granulosazellen der präovulatorischen Follikel eine LH/CG-Sensitivität bereits vor dem endogenen LH-Anstieg auf. Am Ende des Kulturverlaufs lässt sich eine Verringerung der Progesteronsekretion unter beiden Gonadotropinen beobachten. Auch ERICKSON et al. (1991) konnten bei *in vitro*-Untersuchung mit Granulosazellen von Frauen diese

Verringerung feststellen. Sie könnte zum Beispiel an der geringeren FSH-Abhängigkeit dieser Zellen liegen oder auch an einer Verringerung der Anzahl der Zellen während der Zellkultur (MONNIEAUX und PISSELET 1992). In jedem Fall lässt sich jedoch sagen, dass die Zellen noch die Fähigkeit besitzen, auf beide Gonadotropine zu reagieren, da am Ende der Kultur ein Effekt auf die Progesteronsekretion besteht.

Bei einer Analyse der Prästimulation mit hCG oder FSH lässt sich beobachten, dass zwar die Basalwerte, jedoch nicht der Effekt von IGF-I ansteigt. In den bisherigen Veröffentlichungen ließ sich kein Hinweis auf das in der vorliegenden Studie beobachtete Phänomen finden. Es lässt sich jedoch vermuten, dass ein möglicher Effekt von hCG auf das IGF-I in den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel nur dann auftritt, wenn beide Hormone gemeinsam zugegeben werden. Ein anderer Erklärungsansatz geht davon aus, dass der hCG-Effekt während der ersten 48 Stunden der Kultur reduziert auftritt und damit keine Steigerung des IGF-I-Effekts beobachtbar ist. Der Effekt von IGF-I wurde nicht durch eine FSH-Prästimulation gesteigert. Möglicherweise liegt das daran, dass die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel ihre Abhängigkeit von FSH vermindern und damit kein verstärkender Effekt von FSH auf die IGF-I-Wirkung beobachtbar ist. Dies lässt sich ebenfalls bei der Hormonkombination von FSH und IGF-I feststellen.

Die Kombination von IGF-I und hCG nach der Prästimulation bewirkt dagegen nur einen signifikanten Anstieg der Progesteronsekretion im Vergleich zu den Zellen ohne Hormonstimulation. Es zeigt sich sogar ein negativer Effekt, da bei beiden Gonadotropinprästimulationen ein geringerer Progesterongehalt im Kulturmedium im Vergleich zur gleichen Hormonkombination ohne die entsprechende Prästimulation beobachtbar ist. Dies ist ein schwierig zu deutendes Ergebnis; es könnte jedoch mit den Gonadotropinrezeptoren zusammenhängen. Man könnte vermuten, dass nach der Steigerung der Progesteronsekretion bei einer Prästimulation mit FSH oder mit hCG möglicherweise der „Pathway“ für die Steroidgenese transitorisch unterbrochen wird und damit die nachfolgende Stimulation von hCG und IGF-I nicht zum erwarteten Anstieg der Progesteronsekretion führt.

Hintergrund dieses Erklärungsansatzes sind die Ergebnisse von MENON et al. (2004 und 2007) Sie berichten von einer transitorischen Desensibilisierung der Rezeptoren nach einer LH/CG-Stimulation. Die Autoren gehen davon aus, dass ein LH-Rezeptor mRNA-Bindungsprotein (LRBP) durch die Verbindung mit LH/CG mit deren Rezeptoren stimuliert wird, was zu einem Abbau der mRNA Expression bei den Rezeptoren führt und damit eine Reduktion des hCG-Effekts hervorruft. Die Autoren haben ebenfalls gezeigt, dass eine schwache Expression der LH/CG-Rezeptoren 48 Stunden nach einer Gonadotropinstimulation erneut beginnt und nach 72 Stunden die Normalwerte noch nicht erreicht werden. Dies erklärt, warum in der vorliegenden Arbeit die Hormonkombination von IGF-I und hCG nach einer hCG-Stimulation eine geringere Progesteronsekretion als die gleiche Kombination ohne die

Prästimulation hervorruft. Während der Follikelentwicklung kommt es nach einem LH-Anstieg oder nach einer LH/CG-Dosis zu einer Stimulierung der cAMP bzw. zu einer Erhöhung der Steroidgenese. Dann tritt durch die Verringerung der LH-Rezeptoren („Down-regulation“) eine transitorische Abschaltung einer Reihe von metabolischen Prozessen ein, die für die Steigerung der Steroidgenese benötigt werden. So wird eine übermäßige Steroidgenese verhindert. Nach der Entwicklung des Corpus luteum steigt die Expression der LH-Rezeptoren weiter an (NAIR et al. 2006).

5.3.2.2 Östradiolsekretion der Granulosazellen präovulatorischer Follikel im Kulturmedium unter Einfluss von IGF-I, FSH und hCG

Die Aromataseaktivität der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel wird durch IGF-I stimuliert, da verschiedene IGF-I-Konzentrationen schon am Anfang der Kultur zu einer signifikanten Steigerung der Östradiolsekretion führen. Am Ende der Kultur zeigen aber nur zwei Dosierungen (50 und 100 ng/ml) einen Effekt. Wenn die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel bereits eine erhöhte Aromataseaktivität aufweisen und damit mehr Östradiol produzieren, steht offenbar die Fähigkeit der Zellen auf IGF-I zu reagieren im Zusammenhang mit der Östradiolkonzentration in der Follikelflüssigkeit (siehe dazu auch ERICKSON et al. (1989) und SHAW et al. (1993) bei Versuchen mit Granulosazellen der kleinen Follikel bei Frauen und bei Weißbüschelaffen). Die Autoren (SHAW et al. 1993) haben eine intensive Reaktion auf IGF-I gemeinsam mit einer Steigerung der Aromataseaktivität bei den Zellen beobachtet, wenn das IGF-I zusammen mit Östradiol in der Zellkultur eingesetzt wird.

Außer dem beobachteten Effekt von IGF-I bestätigt die vorliegende Arbeit, dass der Effekt dieser Peptide bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel genauso stark ist, wie der Effekt von FSH und hCG auf die Östradiolsekretion. Auch GUIDICE (1992) und YOSHIMURA (1998) konnten diesen Effekt beobachten. Außerdem berichten die Autoren ebenfalls vom Zusammenwirken von IGF-I sowohl mit FSH als auch mit hCG bei der Förderung bzw. der Aufrechterhaltung einer hohen Östradiolsekretion in diesen Zellen. Das deutet darauf hin, dass IGF-I auf die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel wirkt und außerdem für die Regulierung der Östradiolsekretion verantwortlich ist. IGF-I hat möglicherweise sowohl eine autokrine als auch eine parakrine Wirkung, da nach RODWAY (1994) die mRNA von IGF-I in den Granulosa- und Thekazellen ab den kleinen antralen Follikeln exprimiert wird. IGF-I spielt bei Frauen bei der Förderung der Mitogenese und der Differenzierung der Granulosazellen eine Rolle. Es hat eine endokrine und parakrine Wirkung bei der Regulierung der Steroidgenese, da es nur in den Thekazellen der kleinen Follikel und in der Flüssigkeit des dominanten Follikels exprimiert wird (EL-ROEIY et al. 1993; GIUDICE et al. 1996; GIUDICE 2001).

Ein ähnlicher Effekt lässt sich beim Zusammenwirken von IGF-I und den Gonadotropinen auf die Östradiolproduktion in den vorliegenden Untersuchungen beobachten. Wie schon bei der Progesteronproduktion beschrieben wurde, stimulieren beide Hormonkombinationen die Basalwerte. Jedoch steigert nur die Kombination mit hCG den Effekt im Vergleich zur alleinigen Zugabe beider Hormone (IGF-I und hCG). Dies deutet darauf hin, dass hCG möglicherweise auch bei der Östradiolsekretion die Anzahl der Rezeptoren stimuliert und die Kombination mit IGF-I diese Wirkung durch eine Stabilisierung der hCG-Rezeptoren steigert (HIRAKAWA et al. 1999). Bezüglich der Wirkung auf die Progesteronproduktion lassen sich folgende Unterschiede beschreiben: Die Hormonkombination von IGF-I und FSH erhöht die Wirkung von IGF-I am Anfang der Kultur und die Hormonkombination von IGF-I und hCG zeigt eine geringere Auswirkung auf die Stimulierung des Östradiols im Vergleich zum Progesteron. Damit ist der Unterschied zwischen der Kombination mit hCG und mit FSH nicht so deutlich wie beim Progesteron. Dies lässt vermuten, dass das IGF-I bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel zusammen mit den Gonadotropinen die Zelldifferenzierung fördert (MIHM und EVANS 2008).

Die kleine Absenkung der Östradiolsekretion am Ende der Kultur ist nur für die Hormonkombination von IGF-I und hCG signifikant. Ähnliche Befunde finden sich bei ERICKSON et al. (1989). Eine Hypothese ist, dass diese Senkung dem physiologischen Mechanismus ähnelt, da die Luteinisierung der Granulosazellen nach dem Gonadotropinanstieg mit einer Verminderung der Aromataseaktivität einhergeht und folglich auch die Östradiolsekretion beeinflusst (CHAFFIN et al. 2000; GLISTER et al. 2001).

Bei der Hormonkombination hCG und IGF-I – in einer hohen Dosis – lässt sich eine geringere Auswirkung auf die Östradiolproduktion feststellen und ein Effekt auf IGF-I nur am Anfang der Kultur. Diese Hormonkombination erhöht die Basalwerte und es ist kein Unterschied zwischen beiden IGF-I-Dosierungen ab dem vierten Kulturtag messbar. Man kann daher vermuten, dass sich eine höhere IGF-I-Dosis in Kombination mit hCG negativ auf die Östradiolsekretion auswirkt. Allerdings kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Hormonkombination die Follikelentwicklung beeinträchtigt, da sie mit einem Anstieg der Östradiolbasalwerte einhergeht.

Die Hormonkombination von IGF-I und FSH steigert die basale Aromataseaktivität bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel. Es könnte jedoch sein, dass diese Wirkung durch den isolierten Effekt der Einzelhormone hervorgerufen wird, da die Kombination beider Hormone keinen größeren Effekt als die Einzelzugabe der Hormone hervorruft. Nur am Anfang der Kultur ist ein höherer Effekt im Vergleich zur alleinigen Zugabe von IGF-I beobachtbar, wie in der Ergebnisbeschreibung zum Einfluss des Gesamteffekts bereits erläutert wurde. Das könnte zum Beispiel einerseits durch eine

unabhängige Wirkung von IGF-I und FSH auf die Östradiolsekretion erklärt werden, wie andere Untersuchungen mit Weißbüschelaffen (SHAW et al. 1993) und mit Rindern (GUTTIÉRREZ et al. 1997) nahelegen. Andererseits kann nach HILLIER et al. (1987) das Testosteron zusammen mit FSH zu einer Verminderung der Aromataseaktivität bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel führen. Dies deutet darauf hin, dass eine „Down-Regulation“ der Androgen-Rezeptoren in den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel existiert, um einen „Schutz“ gegen die inhibitorische Androgen-Wirkung bei diesen Zellen aufzubauen (TETSUKA und HILLIER 1996; HILLIER et al. 1997). Auch SPICER et al. (2002) beobachten eine negative Wirkung der Hormonkombination von IGF-I und FSH auf die Östradiolsekretion bei bovinen präovulatorischen Follikeln.

Bei alleiniger Zugabe beider Gonadotropine reagieren die Granulosazellen wie auch bei der Progesteronsekretion schon am Anfang der Kultur sowohl auf den FSH- als auch auf den hCG-Stimulus. Der Effekt der FSH-Stimulation bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel war nur ca. halb so stark im Vergleich zu den Basalwerten der gleichen Stimulation bei den kleinen Follikeln. Auch SHAW et al. (1993) konnten diesen Effekt bei Weißbüschelaffen beobachten. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte möglicherweise die geringere FSH-Abhängigkeit der Granulosazellen der präovulatorischen Follikel während der Follikelentwicklung sein. Schon am Anfang der Kultur wird durch die hCG-Zugabe die Östradiolsekretion in gleichem Maße gesteigert, wie bei der FSH-Zugabe (siehe dazu auch SULLIVAN et al. 1999 bei Versuchen zur Follikelentwicklung bei Frauen). Dies zeigt, dass die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel bereits vor dem endogenen LH-Anstieg über eine LH/CG-Sensitivität verfügen. Wichtig ist, dass die Granulosazellen der präovulatorischen Follikel die Fähigkeit besitzen, auf den hCG-Stimulus zu reagieren. Die Zellen erwerben diese Fähigkeit während der Follikelentwicklung, um einen „Schutz“ gegen die physiologische FSH-Absenkung aufzubauen (ZELEZNIK 2001). Bei der *in vivo*-Follikelentwicklung findet eine Absenkung der Östradiolsekretion nach dem Gonadotropinanstieg statt (CHAFFIN et al. 2000; GLISTER et al. 2001), um eine übermäßige Steroidgenese zu vermeiden (MENON et al. 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein leichter Abfall unter beiden Gonadotropinen am Ende der Kultur.

Wie für die Progesteronsekretion, führt die alleinige Zugabe von IGF-I 48 und 96 Stunden nach einer Prästimulation zu keinem stärkeren Effekt auf die Östradiolsekretion im Vergleich zur gleichen Stimulation ohne die Prästimulation. Dies lässt vermuten, dass der Effekt von hCG oder FSH während der ersten 48 Stunden der Kultur sinkt, oder dass nur eine gemeinsame Zugabe der Gonadotropine mit IGF-I zu einer Erhöhung der Östradiolsekretion führt. Ähnliches zeigt sich auch bei der Hormonkombination von IGF-I mit hCG während der Kultur und auch mit FSH während der ersten 48 Stunden.

Wenn nach der FSH- oder hCG-Prästimulation die Hormonkombination IGF-I und hCG zugegeben wird, ist ein transitorischer Abfall der Östradiolsekretion im Vergleich zum Versuch ohne Prästimulation beobachtbar. Wie für die Progesteronsekretion zeigt dieses Ergebnis, dass eine hCG-Prästimulation möglicherweise zu einer „Down-Regulation“ führt. Aufgrund des transitorischen Verlustes der Fähigkeit auf LH zu reagieren, produzieren die Zellen weniger Östradiol, um eine übermäßige Steroidgenese zu vermeiden (MENON et al. 2004; NAIR et al. 2006).

In den bisherigen Veröffentlichungen findet sich kein Hinweis auf die transitorische „Down-regulation“ nach einer FSH-Prästimulation bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel. Nach HILLIER et al. (1987) verändert das Androgen zusammen mit FSH während der Follikelreifung seine Wirkung auf die Steroidgenese: zuerst wirken beide stimulierend, später inhibitorisch. Eine Untersuchung mit Granulosazellen von Ratten (TETSUKA und HILLIER 1996) demonstriert, dass sich während der präovulatorischen Phase die Anzahl der Androgen-Rezeptoren verringert. Dies geschieht, um die Granulosazellen vor einer übermäßigen Stimulation durch das Androgen zu schützen, da dieses Hormon bereits durch die LH-Stimulation in den Thekazellen erhöht ist. Allerdings konnten die oben genannten Autoren nicht zeigen, dass das FSH allein zu einer Verringerung der Androgen-Rezeptoren führt, wie in der vorliegenden Arbeit, wo die Prästimulation mit FSH bei IGF-I allein keinen Effekt hervorruft. Eine andere Untersuchung mit Granulosazellen von Weißbüschelaffen (HILLIER et al. 1997) demonstriert ebenfalls, dass sich die Testosteron-Rezeptoren in den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel durch FSH und lokale Faktoren während der präovulatorischen Phase verringern. Das lässt vermuten, dass die Hormonkombination von IGF-I und hCG nach einer FSH-Prästimulation aufgrund der Verringerung der Anzahl der Testosteron-Rezeptoren zu einer Reduzierung der Östradiolsekretion führt und dies würde sich auch mit dem vorliegenden Ergebnis decken.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Alessandra Quaggio Augusto

Einfluss des Wachstumsfaktors Insulin-like growth factor-I (IGF-I) auf das Follikelwachstum beim Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)

Aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im September 2010

(86 S., 16 Abb., 9 Tab., 225 Lit., 4 S. Anhang)

Schlüsselwörter: Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), Granulosazellen, Steroidhormone (Östradiol, Progesteron), Gonadotropine (FSH, hCG)

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle von IGF-I und das Zusammenwirken mit den Gonadotropinen (FSH, hCG) auf die Sekretion der Steroidhormone (Progesteron, Östradiol) kultivierter Granulosazellen von 13 Weißbüschelaffen untersucht, um zu prüfen, ob und wie weit IGF-I die Sekretion und Reifung der Granulosazellen beeinflusst. Für die *in vitro*-Experimente wurden Zellkulturen mit Granulosazellen kleiner (\varnothing 0,5 - 1 mm) und präovulatorischer Follikel (\varnothing > 2 mm) von Ovarien am 7. Tag der Follikelphase verwendet. Vor jedem Versuch wurde das Wachstum der Follikel durch zwei Ultraschalluntersuchungen kontrolliert. Während der Kultur wurden drei Inkubationsintervalle von je 48 h durchgeführt. Die Zellen wurden mit IGF-I allein oder in Kombination mit FSH bzw. hCG stimuliert. Zum Teil wurden die Gonadotropine auch zur Prästimulation verwendet. Das Signifikanzniveau der Hormoneffekte lag bei $p < 0,05$.

Bei den Granulosazellen kleiner Follikel lässt sich durch die alleinige Gabe von IGF-I nur am Ende der Kultur (144 h) eine signifikante Erhöhung der Progesteronsekretion feststellen. Bei einer Kombinationsgabe von IGF-I und FSH findet sich schon am Anfang (48 h) ein signifikanter Einfluss auf die Sekretion von Progesteron und Östradiol. Bei der Progesteronsekretion ist der Effekt der Kombination signifikant höher als bei Einzelgabe beider Hormone. Dagegen ist bei der Östradiolsekretion der Effekt der Kombination zwar nicht höher als bei einer alleinigen Gabe von FSH, aber die Zellen reagieren wesentlich schneller auf IGF-I, wenn sie zusammen mit FSH stimuliert werden. Keine signifikante Wirkung in der Steroidhormonsekretion ruft die Hormonkombination IGF-I und hCG im Vergleich zur alleinigen Gabe der beiden Hormone hervor. Bei dem Vergleich beider Gonadotropine ist eine signifikante Erhöhung der Steroidhormonsekretion nur bei alleiniger Gabe von FSH zu beobachten. Bei den Experimenten mit Prästimulationen (FSH oder hCG) lässt sich nur bei der FSH-Prästimulation mit einer nachfolgenden Kombinationsgabe von hCG und IGF-I eine signifikante Erhöhung der Steroidhormonsekretion feststellen. Dies

bedeutet, dass FSH die kleinen Granulosazellen auf die Wirkung von hCG sensibilisiert, wobei IGF-I diesen Vorgang unterstützt.

Im Gegensatz zu den kleinen Follikeln lässt sich bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel ein signifikanter Effekt von verschiedenen Hormonstimulationen schon früh beobachten. Durch alleinige IGF-I-Gabe lässt sich bereits am Anfang der Kultur (48 h) eine signifikante Erhöhung der Steroidhormonsekretion feststellen. Eine Kombinationsgabe von IGF-I und der Gonadotropine (FSH oder hCG) zeigt, dass die Kombination mit FSH zu einer signifikanten Erhöhung beider Steroide im Vergleich zur Kontrolle führt. Dagegen zeigt sich bei einer Kombination von IGF-I und hCG eine signifikante Erhöhung der Steroidhormonsekretion schon ab 48 h sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur alleinigen Gabe dieser Hormone. Bei der Untersuchung des Effekts beider Gonadotropine (FSH oder hCG) ist schon ab 48 h ein signifikanter Effekt auf beide Steroidhormone zu erkennen. Beide Gonadotropinprästimulationen (FSH oder hCG) mit nachfolgender Hormonkombination (hCG und IGF-I) führen bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel zu einer signifikant geringeren Steroidhormonsekretion im Vergleich zur Gabe von hCG und IGF-I ohne Prästimulation. Die Zellen reagieren offenbar in dieser Art und Weise, um eine mögliche übermäßige Steroidgenese, und somit eine pathologische Situation, zu verhindern.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass IGF-I bei den kleinen und präovulatorischen Follikeln unterschiedliche Wirkungen hervorruft. Es scheint, dass IGF-I die Sekretion von Progesteron und Östradiol auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst, und dass die Granulosazellen der Weißbüschelaffen erst während der Follikelentwicklung die Fähigkeit erwerben, auf IGF-I entsprechend zu reagieren. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass IGF-I bei den Granulosazellen der kleinen Follikel eine eher unterstützende Rolle für die Gonadotropine spielt, und dass IGF-I mit den Gonadotropinen bei der Reifung und der Differenzierung der Follikel mitwirkt. Möglicherweise spielt IGF-I auch während der Entwicklung und des Wachstums des präovulatorischen Follikels sowie bei der Regulierung der Progesteronsekretion eine Rolle. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass IGF-I zusammen mit hCG die Zelldifferenzierung bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel fördert. Außerdem kann vermutet werden, dass bei den Granulosazellen der präovulatorischen Follikel IGF-I zusammen mit FSH in unabhängiger Weise wirkt. Abschließend kann gesagt werden, dass ein Zusammenwirken zwischen den Gonadotropinen und IGF-I in Bezug auf die Bildung des präovulatorischen Follikels und die darauffolgende Ovulation existiert, dies gilt es auch bei pathologischen Situationen der Follikelreifung und Ovulation zu berücksichtigen.

7 SUMMARY

Alessandra Quaggio Augusto

**Impact of Insulin-like growth factor-I (IGF-I) on follicle development in marmosets
(*Callithrix jacchus*)**

Institute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2010

(86 pp., 16 figures, 9 tables, 225 references, 4 pp. appendices)

Keywords: IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I), Granulosa cells, Steroid hormones (estradiol, progesterone), Gonadotropins (FSH, hCG)

In the present study, the role of IGF-I and its interactions with gonadotrophins (FSH, hCG) on the steroid hormone secretion (estradiol, progesterone) of cultured granulosa cells from 13 marmoset monkeys were investigated to check whether and to what degree IGF-I influences the secretion of steroid hormones and the differentiation of granulosa cells. For the *in vitro* – experiments, granulosa cells from small follicles (\varnothing 0.5 – 1 mm) and large preovulatory follicles (\varnothing > 2 mm) were cultured on day 7 of the follicular phase. Prior to each experiment, the follicular growth was monitored by two ultrasound examinations. During the experiments, three incubation intervals of 48 h each were carried out for each set of cells. The cells were stimulated with IGF-I alone or in combination with FSH or hCG. In part, the gonadotrophins were used for pre-stimulation. For all hormonal effects, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

In granulosa cells from small follicles IGF-I alone provoked an increase in progesterone secretion at the end of the culture period (144 h) only. When IGF-I and FSH were applied in combination, an effect on the secretion of both progesterone and estradiol occurred already after 48 h. The effects of the combination treatment on progesterone secretion were higher than the effects of either hormone alone. In contrast, the effects of the combination treatment on the estradiol secretion did not differ from the effects of FSH alone, but granulosa cells responded earlier to IGF-I when co-incubated with FSH. Combination of IGF-I and hCG did not result in significant changes in secretion of steroid hormones compared to treatment with each of both hormones separately. Comparing the impact of gonadotrophins, a significant effect on steroid secretion was observed only when FSH was given alone. Interestingly, in the experiments with pre-incubation with either gonadotrophin, only the FSH pre-incubation followed by a combination of hCG and IGF-I induced a significant increase in steroid hormone secretion. This indicates that FSH induces hCG responsiveness in granulosa cells from small follicles, and that IGF-I supports this process.

In contrast to the small follicles, the effects of different hormone applications to granulosa cells from large preovulatory follicles were observed much earlier. The application of IGF-I alone provoked a significant increase in steroid hormone secretion already at the

beginning of the culture period (48 h). A combination of IGF-I and gonadotrophins (FSH or hCG) demonstrated that the combination with FSH increased the secretion of both steroid hormones in comparison to the controls. The combination of IGF-I and hCG, however, provoked a significant increase of the steroid hormone secretion as early as 48 h, compared to both the controls and separate applications of the hormones. Both gonadotrophins (FSH and hCG) induced a significant effect on the secretion of both steroid hormones from 48 h onwards. Pre-incubations with either gonadotrophin (FSH or hCG) followed by the combination of hCG and IGF-I yielded a significantly lower steroid secretion in the granulosa cells from preovulatory follicles in comparison to cells treated with the same combination but without pre-incubation. Apparently, the cells behave like this in order to prevent a possibly excessive steroid production, and, thus, pathological conditions.

The present study showed that the granulosa cells from small and preovulatory follicles respond in different ways to IGF-I, suggesting that progesterone and estradiol secretion are regulated differently by IGF-I, and that the granulosa cells of common marmosets acquire the ability to respond to IGF-I during their follicular development. Furthermore, the results indicate that IGF-I plays rather a supporting role for the gonadotrophin effects on granulosa cells from small follicles and that IGF-I together with gonadotrophins has impact on follicular maturation and differentiation. Moreover, IGF-I also seems to play a potential role on promoting development and growth of the preovulatory follicle and to regulate its progesterone secretion. The present results support the hypothesis that IGF-I promotes cell differentiation in granulosa cells from preovulatory follicles in combination with hCG. It can be also speculated that IGF-I and FSH operate in an independent manner in granulosa cells of preovulatory follicles.

In conclusion, a relevant interaction between gonadotrophins and IGF-I could be demonstrated concerning the development of the preovulatory follicle and the subsequent ovulation. This relationship should be also taken into consideration when dealing with pathological conditions of follicular development and ovulation.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abbott DH. The physical, hormonal and behaviour development of the common marmoset, *Callithrix jacchus*. In: Rothe H, Wolters H-J, Hearn JP, editors. Biology and behaviour of marmosets. Proceedings of Marmoset Workshop; 1977 Sep 2-5; Göttingen; Germany. Göttingen: Eigenverlag Hartmut Rothe; 1978. p. 99-106.

Abbott DH, Hearn JP. Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil*. 1978;53(1):155-66.

Abbott DH, Barnett DK, Colman RJ, Yamamoto ME, Schultz-Darken NJ. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comp Med*. 2003 Aug;53(4):339-50.

Abbott DH, Foong SC, Barnett DK, Dumesic DA. Nonhuman primates contribute unique understanding to anovulatory infertility in women. *Ilar Journal*. 2004;45(2):116-31.

Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrin Rev*. 1985;6(3):400-20.

Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarellie E, Hernandez ER, Roberts CT, et al. The intra-ovarian IGF system. *Growth Regulation*. 1992;2:10-5.

Adashi EY. Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod*. 1994;9(5):815-27.

Adashi EY. Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. *Soc Gynecol Invest*. 1995;2(6):721-6.

Adashi EY, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, et al. The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from the rat paradigm. *Endocrinology*. 1997;138(9):3881-90.

Adashi EY. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol*. 1998;39:13-9.

Ankel-Simons F. Primate anatomy an introduction. 2. Aufl. London: Academic Press; 2000.

Armstrong DT, Hogg CO, Campbell BK, Webb R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effects of IGF-I, gonadotropin, and follicle size. *Biol Reprod.* 1996;55:1163-71.

Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod.* 1997;2:139-46.

Artini PG, Monteleone P, Parisen TMR, Matteucci C, Ruggiero M, Cela V, et al. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Exp Rev Endocrinol Metabol.* 2007;2(2):215-23.

Baglietto L, English DR, Hopper JL, Morris HA, Tilley WD, Giles GG. Circulating insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(4):763-8.

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, et al. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol.* 1996;10(7):903-18.

Baker SJ, Spears N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum Reprod Update.* 1999;5(2):153-65.

Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction.* 2006;132(3):365-77.

Behl R, Kaul R. Insulin like growth factor I and the regulation of ovarian function in mammals. *Indian J Exp Biol.* 2002;40:25-30.

Bergh C, Olsson J-H, Hillensjö T. Effect of insulin-like growth factor I on steroidogenesis in cultured human granulosa cells. *Acta endocrinol.* 1991;125(2):177-85.

Bergh C, Carlsson B, Olsson J-H, Selleskog U, Hillensjö T. Regulation of androgen production in cultured human theca cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril.* 1993;59(2):323-31.

Berga SL. Menstrual cycle. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998. p. 189-94.

Blogowska A, Rzepka-Górska I, Krzyzanowska-Swiniarska B. Growth hormone, IGF-1, insulin, SHBG, and estradiol levels in girls before menarche. *Arch Gynecol Obstet.* 2003;268(4):293-6.

Bridges TS, Davidson TR, Chamberlain CS, Geisert RD, Spicer LJ. Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentration, and proteolytic activity during equine follicular development. *J Anim Sci.* 2002;80:179-90.

Britt KL, Findlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. *J Endocrinol.* 2002;175:269-76.

Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod.* 2004;71:1712-23.

Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The Biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 1990;68(9):1071-4.

Cao Z, Liu LZ, Dixon DA, Zheng JZ, Chandran B, Jiang BH. Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. *Cell Signal.* 2007;19(7):1542-53.

Carr BR. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, editors. *Williams Textbook of Endocrinology.* 9. Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998. p. 751-61.

Chaffin CI, Stouffer RL. Role of gonadotrophins and progesterone in the regulation of morphological remodelling and atresia in the monkey peri-ovulatory follicle. *Hum Reprod.* 2000;15(12):2489-95.

Chaffin CL, Dissen GA, Stouffer RL. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. *Mol Hum Reprod.* 2000 Jan;6(1):11-8.

Chaffin CI, Stouffer RL. Local role of progesterone in the ovary during the periovulatory interval. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3:65-72.

Chandrasekher YA, Van Dessel HJ, Fauser BC, Giudice LC. Estrogen- but not androgen-dominant human ovarian follicular fluid contains an insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Sep;80(9):2734-9.

Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol Reprod.* 2004;71:17-27.

Choi J, Lee B, Lee E, Yoon BK, Choi D. Effect of activin A and insulin-like growth factor-I on in vitro development of preantral follicles isolated from cryopreserved ovarian tissues in the mouse. *Cryobiology.* 2008;57(3):209-15.

Chun SY, Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol.* 1998;39(1-2):63-75.

Copeland KC, Kuehl TJ, Castracane VD. Pubertal endocrinology of the baboon: elevated somatomedin-C/insulin-like growth factor I at puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55(6):1198-201.

Copeland KC, Eichberg JW, Parker CR, Bartke A. Puberty in the chimpanzee: somatomedin-C and its relationship to somatic growth and steroid hormone concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(6):1154-60.

Davoren JB, Hsueh AJW. Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I in vivo. *Endocrinology.* 1986;118(2):888-90.

Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod.* 2004;70:1664-9.

De Meyts P, Wallach B, Christoffersen CT, Urso B, Gronskov K, Latus LJ, et al. The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res.* 1994;42(4-5):152-69.

DeMoura MD, Choi DS, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod.* 1997;56(4):946-53.

Doi SAR, Towers PA, Scott CJ, Al-Shoumer KAS. PCOS: an ovarian disorder that leads to dysregulation in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Jan 10;118(1):4-16.

Dou T, Ji C, Gu S, Xu J, Xu J, Ying K, et al. Co-evolutionary analysis of insulin/insulin like growth factor I signal pathway in vertebrate species. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:380-8.

Druckmann R, Rohr UD. IGF-I in gynaecology and obstetrics: update 2002. *Maturitas.* 2002;41 Suppl 1:S65-83.

Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006 Apr 10;4:16-26.

Eimerl S, Orly J. Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone:differential responses of cytochrome p450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 2002;67:900-10.

Einspanier A, Jurdzinski A, Hodges JK. A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod.* 1997;57(1):16-26.

Einspanier A, Nubbemeyer R, Schlote S, Schumacher M, Ivell R, Fuhrmann K, et al. Relaxin in the marmoset monkey: secretion pattern in the ovarian cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 1999;61:512-20.

El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT, Yen SSC. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1993;77(5):1411-8.

El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasaki S, Ling N, LeRoith D, et al. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1994;78(6):1488-96.

Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1989;69(4):716-24.

Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Progesterone production by human granulosa cells cultured in serum free medium: effects of gonadotrophins and insulin-like growth factor I (IGF-I). *Human Reprod.* 1991;6(8):1074-81.

Espey LL. Ovulation. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 605-14.

Ferin M. Ovarian cycle, mammals. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 547-52.

Findlay JK. The ovary. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1991 Dec;5(4):755-69.

Findlay JK, Britt K, Kerr JB, O'Donnell L, Jones ME, Drummond AE, Simpson ER. The road to ovulation: the role of oestrogens. *Reprod Fertil Dev*. 2001;13:543-7.

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 1994;50:225-32.

Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*. 2001 Sep;65(3):648-54.

Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003 Oct 15;78(3-4):135-63.

Fried G, Remaeus K, Harlin J, Krog E, Csemiczky G, Aanesen A, et al. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 2003 May;20(5):167-76.

Gadducci A, Gargini A, Palla E, Fanucchi A, Genazzani AR. Polycystic ovary syndrome and gynecological cancers: Is there a link? *Gynecol Endocrinol*. 2005 Apr;20(4):200-8.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992 Nov;119(3):493-501.

Geisthovel F, Moretti-Rojas I, Rojas FJ, Asch RH. Insulin-like growth factors and thecal-granulosa-cell function. *Hum Reprod*. 1990;5(7):785-99.

Gershon E, Plaks V, Dekel N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Jan;282(1-2):18-25.

Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod*. 1995;52:1234-43.

Gilchrist RB, Wicherek M, Heistermann M, Nayudu PL, Hodges JK. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset. *Biol Reprod.* 2001;64:127-35.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod.* 2001;65:638-47.

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. *Anim Reprod Sci.* 2008 May;105(3-4):417-23.

Gittens JE, Mhawi AA, Lidington D, Oullette Y, Kidder GM. Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Apr;284(4):880-7.

Gittens JE, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci.* 2005 Jan 1;118:113-22.

Giudice LC. Insulin-like growth factors and the ovarian follicular development. *Endocr Rev.* 1992 Nov;13(4):641-69.

Giudice LC, Cataldo NA, Van Dessel HJ, Yap OW, Chandrasekher YA. Growth factors in normal ovarian follicle development. *Semin Reprod Endocrinol.* 1996 Aug;14(3):179-96.

Giudice LC. Insulin-like growth factor family in graafian follicle development and function. *J Soc Gynecol Investig.* 2001;8 Suppl 1:S26-9.

Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;20(2):235-44.

Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 2001 Oct;65(4):1020-8.

Golenhofen K. *Physiologie.* München: Urban & Schwarzenberg; 1997.

Gomez E, Tarin JJ, Pellicer A. Oocyte maturation in humans: The role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril.* 1993 Jul;60(1):40-6.

Gotlieb WH, Bruchim I, Gu J, Shi Y, Camirand A, Blouin MJ, et al. Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006 Feb;100(2):389-96.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996 Apr;17(2):121-55.

Grado-Ahuir JA, Aad PY, Ranzenigo G, Caloni F, Cremonesi F, Spicer LJ. Microarray analysis of insulin-like growth factor-I-induced changes in mRNA expression in cultured porcine granulosa cells: Possible role of IGF-I in angiogenesis. *J Anim Sci.* 2009 Jun;87(6):1921-33.

Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 1997;18(4):502-19.

Greenstein B, Raue F. *Endokrinologie. Menü Medizin.* Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag; 1996.

Guthrie HD, Garrett WM, Cooper BS. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod.* 1998 Feb;58(2):390-6.

Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 1997 Mar;56(3):608-16.

Hammond JM, Baranao JL, Skaleris D, Knight AB, Romanus JA, Rechler MM. Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 1985 Dec;117(6):2553-5.

Hammond JM. IGF (Insulin-like growth factor). In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998. p. 781-89.

Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet.* 1998 May 9;351(9113):1393-6.

Harding RD, Hulme MJ, Lunn SF, Henderson C, Aitken RJ. Plasma progesterone levels throughout the ovarian cycle of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Med Primatol*. 1982;11(1):43-51.

Harlow CR, Gems S, Hodges JK, Hearn JP. The relationship between plasma progesterone and the timing of ovulation and early embryonic development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Zool Lond*. 1983;201:273-82.

Harlow CR, Hearn JP, Hodges JK. Ovulation in the marmoset monkey: endocrinology, prediction and detection. *J Endocr*. 1984 Oct;103(1):17-24.

Harlow CR, Shaw HJ, Hillier SG, Hodges JK. Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity. *Endocrinol*. 1988 Jun;122(6):2780-7.

Hastie PM, Onagbesan OM, Haresign W. Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-I, IGF-II, type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Anim Reprod Sci*. 2004 Aug;84(1-2):93-105.

Hastie PM, Haresign W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci*. 2006 May;92(3-4):284-99.

Hearn JP. The Endocrinology of reproduction in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. In: Kleiman DG, editor. *The Biology and Conservation of the Callitrichidae*. Washington (DC): Smithsonian Institution Press; 1977. p. 163-171.

Hearn JP, Abbott DH, Chambers PC, Hodges JK, Lunn SF. Use of common marmoset, *Callithrix jacchus*, in reproductive research. *Primate Med*. 1978;10:40-9.

Heistermann M, Tari S, Hodges JK. Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in new world primates, Callitrichidae. *J Reprod Fertil*. 1993 Sep;99(1):243-51.

Hengartner MO. The Biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6.

Herington AC. Insulin-like growth factors: biochemistry and physiology. In: Robertson DM, Herington AC, editors. *Clinical Endocrinology and Metabolism*. London: Baillière Tindall; 1991;5(4). p. 531-51.

Hickey TE, Marrocco DL, Gilchrist RB, Norman RJ, Armstrong DT. Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. *Biol Reprod.* 2004 Jul;71(1):45-52.

Hillier SG, Harlow CR, Shaw HJ, Wickings EJ, Dixson AF, Hodges JK. Granulosa cell differentiation in primate ovaries: the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) as a laboratory model. In: Stouffer RL, editor. *The primate ovary*. New York: Plenum Press; 1987. p. 61-73.

Hillier SG, Harlow CR, Shaw HJ, Wickings EJ, Dixson AF, Hodges JK. Cellular aspects of pre-ovulatory folliculogenesis in primate ovaries. *Hum Reprod.* 1988 May;3(4):507-11.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the "two-cell, two-gonadotropin" model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 1994 Apr;100(1-2):51-4.

Hillier SG, Tetsuka M, Fraser HM. Location and development regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum Reprod.* 1997 Jan;12(1):107-11.

Hillier SG. The parkes lecture: Controlled ovarian stimulation in women. *J Reprod Fertil.* 2000 Nov;120(2):201-10.

Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology.* 1996 Sep;137(9):3717-28.

Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Ibuki Y, Miyamoto K. A role of insulin-like growth factor I in luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells. *Endocrinology.* 1999 Nov;140(11):4965-71.

Hodges JK. The ovarian cycle and control of ovulation. *J Zool Lond.* 1987;213:383-93.

Hodges JK, Cottingham PG, Summers PM, Liang YN. Controlled ovulation in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) with human chorionic gonadotropin following prostaglandin-induced luteal regression. *Fertil Steril.* 1987 Aug;48(2):299-305.

Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, et al. *Biochemie des menschen. Das lehrbuch für das medizinstudium.* 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.

Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Quirk SM. Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2004 Feb;18(2):326-38.

Huang HF, Wang B, Yang XF, Luo Q, Sheng JZ. Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17 β -estradiol production in human granulosa cells. *Biol Reprod*. 2005 Jan;72(1):102-6.

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*. 1999 Dec;20(6):761-87.

Jamnonjit M, Hammes SR. Ovarian Steroids: The good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle*. 2006 Jun;5(11):1178-83.

Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gabbay KH, et al. Sequence of cDNA encoding insulin-like growth factor I precursor. *Nature*. 1983 Dec 8-14;306(5943):609-11.

Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995 Feb;16(1):3-34.

Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:349-63.

Khamsi F, Roberge S, Yavas Y, Lacanna IC, Zhu X, Wong J. Recent discoveries in physiology of insulin-like growth factor-1 and its interaction with Gonadotropins in folliculogenesis. *Endocrine*. 2001 Dec;16(3):151-65.

Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2002 May;123(5):613-20.

Kilen SM, Schwartz NB. Estrous cycle. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 131-6.

Kolodziejczyk J, Gertler A, Leibovich H, Rzasa J, Gregoraszczyk EL. Synergistic action of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on proliferation and estradiol secretion in porcine granulosa and theca cells cultured alone or in coculture. *Theriogenology*. 2003 Aug;60(3):559-70.

Lacker HM, Percus A. How do ovarian follicles interact? A many-body problem with unusual symmetry and symmetry-breaking properties. *J Statist Physics*. 1991 Jun;63(5/6):1133-61.

LaVoie HA, Singh D, Hui YY. Concerted regulation of the porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in granulosa cells involves GATA-4 and CCAAT/enhancer binding protein β . *Endocrinology*. 2004 Jul;145(7):3122-34.

Leichtweiß HP, Schröder HJ. Sexuallfunktionen, Schwangerschaft und Geburt. In: Klinker R, Silbernagl S, editors. *Lehrbuch der Physiologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1996. p. 486-90.

LeRoith D, Roberts CT. Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine versus local action? *Mol Cell Endocrinol*. 1991 May;77(1-3):57-61.

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*. 1995 Apr;16(2):143-63.

Louhio H, Hovatta O, Sjöberg J, Tuuri T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod*. 2000 Aug;6(8):694-8.

Luciano AM, Peluso JJ. Effect of in vivo gonadotropin treatment on the ability of progesterone, estrogen, and cyclic adenosine 5'-monophosphate to inhibit insulin-dependent granulosa cell mitosis in vitro. *Biol Reprod*. 1995 Sep;53(3):664-9.

Luciano AM, Modina S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT. Effect cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Biol Reprod*. 2000 Dec;63(6):1580-5.

Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*. 2000 Jul;83(7):1635-47.

Magoffin DA, Kurtz KM, Erickson GF. Insulin-like growth factor-I selectively stimulates cholesterol side-chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Mol Endocrinol*. 1990 Mar;4(3):489-96.

Mahesh VB, Brann DW. Regulation of preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids*. 1998 Dec;63(12):616-29.

Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma MK, Sing D, Wathes DC. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*. 2010 Jan;139(1):139-51.

Mansfield K. Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med*. 2003 Aug;53(4):383-92.

Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA. Insulin-like growth factors-1 and -2 but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2003 Apr;68(4):1112-8.

Mason HD, Margara R, Winston RML, Seppala M, Koistinen R, Franks S. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inhibits production of IGF-binding protein-1 while stimulating estradiol secretion in granulosa cells from normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 May;76(5):1275-9.

Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod Dom Anim*. 2003 Aug;38(4):247-58.

McCracken JA. Luteolysis. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 1083-5.

Meinhardt A, Seitz J. Fortpflanzung. In: Schmidt RF, Unsicker K, editors. *Lehrbuch Vorklinik Teil C*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2003. p. 532-53.

Menon KMJ, Munshi UM, Clouser CL, Nair AK. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod*. 2004 Apr;70(4):861-6.

Menon KMJ, Nair AK; Wang L, Peegel H. Regulation of luteinizing hormone receptor mRNA expression by a specific RNA binding protein in the ovary. *Moll Cell Endocrinol*. 2007 Jan;2(260-262):109-16.

Mihm M, Evans AC. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Domest Anim.* 2008 Jul;43 Suppl 2:48-56.

Minegishi T, Hirakawa T, Kishi H, Abe K, Abe Y, Mizutani T, Miyamoto K. A role of insulin-like growth factor I for follicle-stimulating hormone receptor expression in rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 2000 Feb;62(2):325-33

Minegishi T, Hirakawa T, Abe K, Kishi H, Miyamoto K. Effect of insulin-like growth factor-1 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of luteinizing hormone receptors in cultured granulosa cells. *Environ Sci.* 2004;11(1):57-71.

Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:321-33.

Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Monniaux D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm Res.* 1996;45(3-5):211-7.

Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 May 25;163(1-2):89-93.

Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen J-M, Mazerbourg S, et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 2002 Jul;23(1-2):139-54.

Monnieaux D, Pisselet C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod.* 1992 Jan;46(1):109-19.

Moynihan M. The new world primates. Adaptive radiation and the evolution of social behaviour, languages, and intelligence. New Jersey: Princeton University Press; 1976.

Mulheron GW, Wise TH, Stone RT, Ford JJ. Follicle-stimulating hormone regulation of cytochrome P-450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acid accumulation by porcine granulosa cells isolated from small and medium follicles. *Biol Reprod.* 1990 Nov;43(5):828-34.

Nair AK, Peegel H, Menon KMJ. The role of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor-specific mRNA binding protein in regulating receptor expression in human ovarian granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2239-43.

Nakagawa S, Maeda S, Tsukihara T. Structural and functional studies of gap junction channels. *Curr Opin Struct Biol.* 2010 Aug;20(4):423-30.

Nardo LG, Bellanca SA, Burrello N, Longo G, D'Agata R, Nardo F, et al. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in the follicular fluid of women undergoing ovarian hyperstimulation with different gonadotropin preparations. *Gynecol Endocrinol.* 2001 Dec;15(6):413-20.

Nubbemeyer R, Heistermann M, Oerke AK, Hodges JK. Reproductive efficiency in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a longitudinal study from ovulation to birth monitored by ultrasonography. *J Med Primatol.* 1997 Jun;26(3):139-46.

Oerke AK, Einspanier A, Hodges JK. Noninvasive monitoring of follicle development, ovulation, and corpus luteum formation in marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by ultrasonography. *Am J Primatol.* 1996;39:99-113.

Oliver RH, Chen GD, Yeh J. Graafian follicle. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998. p. 565-8.

Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone and cell-cell adhesion interact to regulate rat granulosa cell apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 1994 Nov-Dec; 72(11-12):574-51.

Peluso JJ. Progesterone as a regulator of granulosa cell viability. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Jun;85(2-5):167-73.

Petrides PE. Endokrine funktionen IV: Hypothalamisch-hypophysäres system und zielgewebe. In: Löffler G, Petrides PE, editors. *Biochemie und Pathobiochemie.* 7. Aufl. Berlin: Springer; 2003. p. 865-908.

Picton HM, Gosden RG. Oogenesis, in mammals. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998. p. 488-91.

Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.* 1999 Aug;20(4):535-82.

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 2004;82 E-Suppl:E40-52.

Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev.* 1997 Dec;18(6):801-831.

Richards JS. Perspective: The ovarian follicle – a perspective in 2001. *Endocrinology.* 2001 Jun;142(6):2184-93.

Richards JS, Russel DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:195-220.

Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978(a) April 25;253(8):2769-76.

Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS lett.* 1978(b) May 15;89(2):283-6.

Rodway MR. Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in marmoset ovary. *Biol Reprod.* 1994;50 Suppl 1:S122.

Romão GS. [Correlation between IGF-I concentration in serum and in the follicular fluid]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1998;20(6):361-2.

Rune GM, Pretzer D, Beuthe W, Merker H-J. Intercellular communication between cultured granulosa cells of the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Cell Tissue Res.* 1992 May;268(2):369-76.

Samaras SE, Canning SF, Barber JA, Simmen FA, Hammond JM. Regulation of insulin-like growth factor I biosynthesis in porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 1996 Nov;137(11):4657-64.

Sasaki N, Rees-Jones RW, Zick Y, Nissley SP, Rechler MM. Characterization of insulin-like growth factor I-stimulated tyrosine kinase activity associated with the beta-subunit of type I insulin-like growth factor receptors of rat liver cells. *J Biol Chem.* 1985 Aug 15;260(17):9793-804.

Schams D, Koll R, Li CH. Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J Endocr.* 1988 Jan;116(1):97-100.

Schams D, Berisha B, Kosmann M, Einspanier R, Amselgruber WM. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domest Anim Endocrinol.* 1999 Oct;17(2-3):279-85.

Schernhammer ES, Holly JM, Pollak MN, Hankinson SE. Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Mar;14(3):699-704.

Schoyer KD, Liu HC, Witkin S, Rosenwaks Z, Spandorfer SD. Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3) in IVF patients with polycystic ovary syndrome: correlations with outcome. *Fertil Steril* 2007 Feb;88(1):139-44.

Shanmugam M, Pandita S, Palta P. Effects of FSH an LH on steroid production by buffalo (*bubalus bubalis*) granulosa cells cultured in vitro under serum-free conditions. *Reprod Domest Anim.* 2009 May 28.doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01464.x. PubMed PMID: 19497023.

Shaw HJ, Hillier SG, Hodges JK. Development changes in luteinising hormone/human chorionic gonadotropin steroidogenic responsiveness in marmoset granulosa cells: effects of follicle-stimulating hormone and androgens. *Endocrinology.* 1989 Apr;124(4):1669-77.

Shaw HJ, Boddy SE, Hodges JK. Developmental changes in marmoset granulosa cells responsiveness to insulin-like growth factor-I: interactions with follicle-stimulating hormone and estradiol. *Biol Reprod.* 1993 Sep;49(3):568-76.

Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology.* 2009 May; 71(8):1193-208.

Sirotkin AV. Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to hormones. *J Exp Biol.* 2010 Jun 15;213(12):2125-30.

Spicer LJ, Alpizar E, Echternkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol

production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci.* 1993 May;71(5):1232-41.

Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 1995 Jul;12(3):223-45.

Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)- induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol.* 2002 Jun;22(4):237-54.

Spicer LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod.* 2004 May;70(5):1223-30.

Stevenson AF. Human granulosa cells in vitro: characteristics of growth, morphology and influence of some cytokines on steroidogenesis. *Indian J Exp Biol.* 2000 Dec;38(12):1183-91.

Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine theca cells: Involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci.* 1995 Dez;73(12):3719-31.

Styne DM. Serum insulin-like growth factor 1 concentrations in the developing rhesus monkey. *J Med Primatol.* 1991 Sep;20(7):334-7.

Stocco DM. Recent advances in the role of StAR. *Rev Reprod.* 1998 May;3(2):82-5.

Sugimoto M, Kagawa N, Morita M, Kume S, Wongpanit K, Jin H. Changes in the expression of decoy receptor 3 in granulosa cells during follicular atresia in porcine ovaries. *J Reprod Dev.* 2010. Epub 2010 Jul 5. PubMed PMID: 20519830.

Suikkari AM, Jalkanen J, Koistinen R, Bützow R, Ritvos O, Ranta T, Seppälä M. Human granulosa cells synthesize low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *Endocrinology.* 1989 Feb;124(2):1088-90.

Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jan;84(1):228-32.

Summers PM, Wennink CJ, Hodges JK. Cloprosterol-induced luteolysis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil.* 1985 Jan;73(1):133-8.

Svensson EC, Markström E, Andersson M, Billig H. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod.* 2000 Nov;63(5):1457-64.

Tardif SD, Smucny DA, Abbott DH, Mansfield K, Schultz-Darken N, Yamamoto ME. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comp Med.* 2003 Aug;53(4):364-8.

Tetsuka M, Hillier SG. Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology.* 1996 Oct;137(10):4392-7.

Tillmann IN, Einspanier R, Einspanier A. Expression and influence of IGF-I and relaxin in ovarian cells from the marmoset monkey. *Exp Clin Endocrinol. Diabetes.* 1998;106 Suppl 1:S55.

Tong D, Li TY, Naus KE, Bai D, Kidder GM. In vivo analysis of undocked connexin43 gap junction hemichannels in ovarian granulosa cells. *J Cell Sci.* 2007 Nov;120(22):4016-24.

Tosca L, Chabrolle C, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. IGF-1 receptor signaling pathways and effects of AMPK activation on IGF-1-induced progesterone secretion in hen granulosa cells. *Domestic Anim Endocrinol.* 2008 Feb;34(2):204-16.

Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. The role of IGF 1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction.* 2009 Feb;137(2):161-80.

Voorhis BJV. Follicular development. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998(a). p. 376-89.

Voorhis BJV. Follicular steroidogenesis. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998(b). p. 389-95.

Wandji SA, Wood TL, Crawford J, Levison SW, Hammond JM. Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology.* 1998 Dec;139(12):5205-14.

Watson ED, Bae SE, Thomassen R, Thomson SR, Woad K, Armstrong DG. Insulin-like growth factors-I and -II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction*. 2004 Sep;128(3):321-9

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl*. 2003;61:71-90.

Willis DS, Mason HD, Watson H, Franks S. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1998 Apr;83(4):1256-9.

Wong KHH, Adashi EY. Granulosa cells. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 569-72.

Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S, Hardy K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Hum Reprod*. 1999 Jun;14(6):1555-62.

Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology*. 2004 Apr;145(4):1943-51.

Yang MY, Rajamahendran R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod*. 2000 May;62(5):1209-17.

Yao HHC, Bahr JM. Ovary, overview. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 590-97.

Ying SY, Zhang Z. Ovarian hormones, Overview. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. California: Academic Press; 1998. p. 578-82.

Yong EL, Turner M, Baird DT, Hillier SG. Molecular basis of gonadotrophin action on human granulosa cell function. *Ann Acad Med Singapore*. 1992 Jul;21(4):510-6.

Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol Reprod.* 1996 Jul;55(1):152-60.

Yoshimura Y. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J Obstet Gynaecol Res.* 1998 Oct;24(5):305-23.

Yoshimura Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins: potential relevance to reproductive physiology. *Reprod Med Biol.* 2003 Mar;2(1):1-24.

Yoshinaga K. Regulation of estrogen secretion. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998. p. 108-14.

Yu Y, Li W, Han Z, Luo M, Chang Z, Tan J. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cells apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. *Theriogenology.* 2003 Dec;60(9):1691-704.

Zelevnik AJ. Luteinization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction.* California: Academic Press; 1998. p. 1076-83.

Zelevnik AJ. Follicle selection in primates: "Many are called but few are chosen". *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):655-9.

Zhao H, Luo L, Liu Y. The effect of insulin-like growth factor-I on steroidogenesis and ultrastructures of cultured human granulosa cells in vitro. *Zhongghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1998 Sep;33(9):546-8.

Zhou J, Bondy C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod.* 1993 Mar;48(3):467-82.

Zhou J, Adesanya OO, Vatzias G, Hammond JM, Bondy CA. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovarian follicular selection. *Endocrinology.* 1996 Nov;137(11):4893-901.

Zhou J, Kumar R, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol.* 1997 Dec;11(13):1924-33.

9 ANHANG MATERIAL UND METHODEN

9.1 Kulturmedium

Medium 199 with HEPES 25 mM

Zusammensetzung von 1000 ml Medium 199:

15,9 g Medium 199

+ 2,2 NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat, Merck 6329, Merck, Darmstadt, FRG)

+ 1,0 g BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma A 4503, Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG)

+ 20 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies, UK) (=100 I.U/ml Penicillin/100 pg/ml Streptomycin in Medium)

auf 1000 ml mit Aqua bidest. Auffüllen

pH 7,2 – 7,4

Steril filtrieren (Corning 500 ml Bottle Top Filter w/45 mm Neck 0,22 µm PES, New York, USA)

9.2 Lösungen der Progesteron- und Östradiolenzymimmunoassays

Assay-Puffer (P₄)

2,42 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan z.A., Baker Analysed Reagent, NL)

23,3 g NaCl (Natriumchlorid, Merck 6404)

1 g BSA Fraktion V (Bovines Serum albumin, Sigma A 4503, Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG)

0,5 g Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat, ICI America Inc.)

ad 1000 ml, pH 7,5

Assay-Puffer (E₂)

5,96 g Na₂HPO₄ (Natriumhydrogenphosphat, Merck 6586)

8,5 g NaCl (Merck 6404)

1,0 g BSA Fraktion V (Sigma A 4503)

in 1000 ml H₂O, pH 7,2

Coating-Puffer (P₄, E₂)

1,59 g NaCO₃ (Natriumcarbonat, Merck 6392)

2,93 g NaHCO₃ (Merck 6329)

in 1000 ml H₂O, pH 9,8

Substrat-Puffer (Ellie) (P₄, E₂)

5-fache Konzentration

47,5 Citronensäure (MW 192.1)

39 g Na₂HPO₄ (MW 142.0)

2,5 g Harnstoffperoxid (MW 94.1)

lösen in 1000 ml H₂O bidest., auf pH 3,9 einstellen

Vor Gebrauch 1:5 mit bidest. Verdünnen und pH auf 3,8 einstellen

TMB-Lsg (Ellie) (P₄, E₂)

250 mg TMB (Tetramethylbenzin) lösen (über Nacht gerührt)

in 20 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)

in dunkler Flasche aufbewahren

Substratlösung

17 ml Gebrauchslösung (Substrat Ellie)

250 µl TMB

Kurz vor gebrauchmischen

4 NH₂SO₄ (Stoplösung)

446,7 ml H₂O

53,3 ml H₂SO₄ (98.08 g/mol)

zuerst Wasser, dann Säure

Waschlösung (P₄, E₂)

0,5 % Tween 20 (Polyoxylethylensorbitanmonooleat, Merck 822184) 5 ml

400 ml PBS-Konzentrat

ad 10 l H₂O

PBS (Phosphate Balanced Salt Solution)-Konzentrat (P₄, E₂)

0,136 M NaCl 397,5 g (Merck, 6404)

8,1 mM Na₂HPO₄ 57,5 g (Merck, 6586)

2,7 mM KCl 10,0 g (Kaliumchlorid, roth, Carl Roth, Karlsruhe, FRG)

1,5 mM KH₂PO₄ 10,0 g (Kaliumhydrogenphosphat, Merck)

in 2 l H₂O, pH 7,2

9.3 Antikörper der Enzymimmunoassays

Beschichtungs-IgG:

- P₄: Rabbit-Anti-Sheep IgG (Sigma S 1265, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, DE)
 E₂: Sheep-Anti-Rabbit (Quartett F1880-3, DPZ, DE)

Spezifischer Ak:

- P₄: Sheep-Anti- α -Progesteron, polyklonal (S 1509/14, Ridgeway Science Lim., Alvington, UK)
 Endverdünnung 1:25000
 E₂: Rabbit-Anti-Estradiol-17 β -hemisuccinate-bovine serum albumin (Freising, DE)
 Endverdünnung 1:300000

Label:

- P₄: Progesteron-3-(O-Carboxymethyl) oxime-meerrettichperoxidase (DehnhardEXXXII, Berlin, DE)
 Endverdünnung 1:500
 E₂: (E₂-6-HRP) E₂-6-Carboxymethyl-meerrettichperoxidase (DPZ, Göttingen, DE)
 Endverdünnung 1:15000

9.4 Kreuzreaktionen der in den Enzymimmunoassays verwendeten Antikörper

Progesteron-Antikörper

	%
Progesteron	100
11 α -Hydroxyprogesteron	74
5 α -Pregnan-3,20-dion	43
5 α -Dihydroprogesteron	14,6
5 α -Pregnan-3-ol-20-on	2,4
17 α -Hydroxyprogesteron	1,3
5 α -Pregnan-3 α -ol-20-on	0,7
5 α -Pregnan-20 α -ol-3-on	< 0,06
5 α -Pregnan-20 β -ol-3-on	< 0,06

Östradiol-Antikörper

	%
Östradiol (E2)	100
Östron (E1)	100
17 α -Östradiol	66
Ethynylöstradiol	14
Östriol	1,5
Östradiol-3-benzoate	< 0,1
Trenbolone	< 0,1
19-Nortestosteron	0,01
Progesteron	< 0,01
Testosteron	< 0,01

9.5 Intra- und Interassayvarianzen der Progesteron- und Östradiol-Enzymimmunoassays

EIA	Intraassayvarianz [%]	Interassayvarianz [%]
P ₄	8,3	10,3
E ₂	8,2	7,9

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Almuth Einspanier für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung und intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit und für die freundschaftliche Zusammenarbeit während der Durchführung und Fertigstellung.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. J.K. Hodges, dem Leiter der Abteilung Reproduktionsbiologie des Deutschen Primatenzentrums Göttingen, für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst-DAAD danke ich für die Möglichkeit hier in Deutschland meine wissenschaftlichen Kenntnisse zu verbessern, sowie eine andere Sprache und eine andere Kultur kennenzulernen, die mein Herz erobert haben.

Für die Hilfe bei den Laparotomien möchte ich Frau Susanne Rensing danken.

Mein Dank gilt ebenfalls auch Angelika Jurdzinski und Kerstin Fuhrmann für die Hilfe bei der Planung und Durchführung der Zellkulturen, sowie für die Hilfe bei der Blutprobenentnahme und für die freundliche Beratung in allen Fragen der Durchführung der analytischen Messverfahren.

Weiterhin danke ich Dr. Angela Brüns, Dr. Christina Simon und Dr. Nicola Beindorff für das freundliche und gute Klima in unserem Doktorandenzimmer.

Besonders möchte ich Nicola Beindorff für die Einführung in die Enzymimmunoassays, für ihre Freundschaft, für unsere gemeinsame Zeit am DPZ sowie für die guten und konstruktiven Anregungen, die mir bei der Erstellung der Dissertation sehr hilfreich waren, danken. Außerdem möchte ich Herrn Professor Dr. Winfried Brenner für seine Englischhilfe ganz herzlich danken.

Während meiner Zeit in Göttingen möchte ich Christine Mann und in Italien Ulrike Ansorge für ihre unermüdlichen Deutschkorrekturen ganz herzlich danken.

Professor Luca Grassetti, Universität Udine-Italien, möchte ich für seine selbstlose unterstützende Hilfe an der Auswertung der Statistik und guten Ratschläge ganz herzlich danken.

Nicht zuletzt einen ganz besonderen Dank an meine Eltern und meinen Mann, die mich immer unterstützt und motiviert haben.