

5. Material und Methodik

5.1. Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen wurden an Syrischen Goldhamstern durchgeführt, die aus eigener Zucht stammten (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar). Gesunde, weibliche, geschlechtsreife Tiere im Alter von ca. 8-10 Wochen mit einem Gewicht von 60-90g dienten sowohl als Spendertiere zur Entnahme von Endometrium und Ovarien, als auch als Empfängertiere zur Implantation der Rückenhautkammer. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Tiere in Einzelkäfigen in einem klimatisierten Raum mit einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Es bestand freier Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage). Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt.

5.2. Modell

5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Nahrungsmittelkomponenten auf die Angiogenese von Endometrioseherden wurde als Modell die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters verwendet [Menger et al., 2002] (*Abbildung 1*). Diese enthält quergestreifte Skelettmuskulatur, subkutanes Gewebe und Haut und macht es möglich, intravitalmikroskopische Untersuchungen am wachen oder am narkotisierten Versuchstier über einen Zeitraum von 2-3 Wochen durchzuführen [Endrich et al., 1980]. Mit Hilfe intravenöser Applikation von Fluorochromen kann mittels Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie sowohl die komplette Mikrozirkulation der freipräparierten Rückenhautmuskulatur, als auch die Entwicklung neuer Gefäße innerhalb transplanterter Gewebe beurteilt werden. Durch kombinierte Transplantation von Endometrium und ovariellen Follikeln in die Rückenhautkammer [Laschke et al., 2008b] war es in der vorliegenden Arbeit möglich, gleichzeitig die Wirkung verschiede-

dener Nahrungsmittelkomponenten auf sich entwickelnde Endometrioseherde und ovarielles Gewebe zu untersuchen.

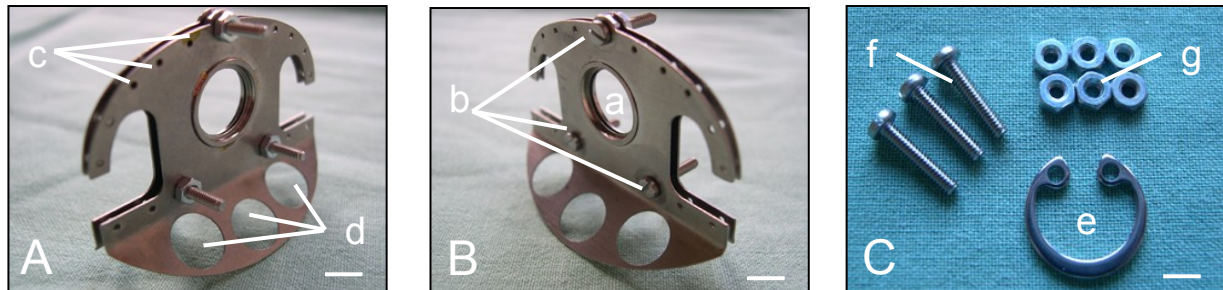


Abbildung 1: (A) Vorderansicht der Rückenhautkammer, welche sich aus zwei durch Schrauben verbundene, spiegelbildlich konstruierte Titanrahmen zusammensetzt (Gewicht 4,5g). (B) Rückansicht der Rückenhautkammer. (C) Verbindungsschrauben und Sprengring. (a) Beobachtungsfenster. (b) Bohrungen mit Verbindungsschrauben. (c) Bohrungen für Fixationsfäden. (d) Materialaussparungen zur Gewichtsreduktion. (e) Sprengring zur Fixation des Deckglases. (f, g) Verbindungsschrauben und Schraubenmutter. Maßstab: A, B = 8mm; C = 3,4mm.

5.2.2. Implantation der Rückenhautkammer

Um mit der Implantation der Rückenhautkammer beginnen zu können, wurde das Versuchstier zunächst mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (50mg/kg Körpergewicht (KG); Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos) narkotisiert. Im Anschluss daran erfolgte die Entfernung des Rückenhautfells durch elektrische Rasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen) und chemische Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen). Dann wurde die enthaarte Körperpartie mit warmem Wasser gesäubert und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. In Bauchlage konnte nun die zuvor angehobene Rückenhaut des Versuchstieres entlang der Mittellinie mit zwei 5.0 Haltefäden senkrecht aufgespannt werden (*Abbildung 2A*). Diese Vorgehensweise ermöglichte es, unter Gegenlichtkontrolle den rückseitigen Rahmen der aus zwei Titan-Rahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer an seinem oberen Rand mit 5.0 Seidefäden an der Hautfalte zu befestigen (*Abbildung 2B*). Im Anschluss wurden zwei kleine Inzisionen für die Verbindungsschrauben zur Vorderseite der Kammer an der Basis der Hautfalte ausgeführt, ohne dabei die beiden Hauptgefäßstämme der Rückenhaut zu verletzen. Nach Entfernen der Haltefäden wurden zwei Gefäßklemmen auf die beiden Verbindungsschrauben des rückseitigen Rahmens gesetzt und der Hamster in Seitenlage gebracht (*Abbildung 2C*). Somit war es mit Hilfe eines Stereo-Operationsmikroskopes (Wild M650; Leitz, Schweiz) möglich,

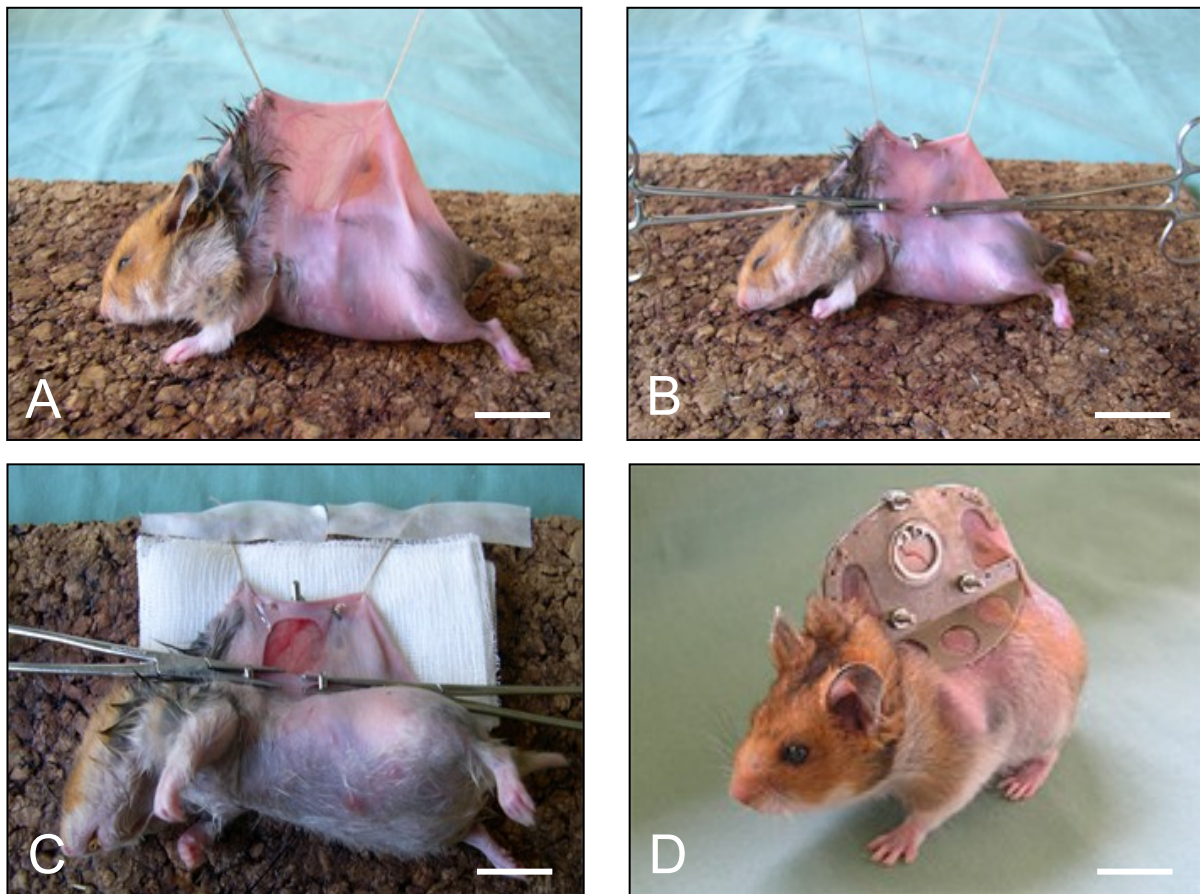


Abbildung 2: Präparation einer Rückenhautkammer. **(A)** Darstellung der Hautgefäße unter Gegenlichtkontrolle. **(B)** Implantation des rückseitigen Titanrahmens. **(C)** Einseitige Entfernung von Cutis, Subcutis, quergestreiftem Unterhautmuskel und den beiden Schichten des Retraktormuskels. **(D)** Wächer Hamster mit implantierter Rückenhautkammer. Maßstab: A = 18mm; B = 22mm; C, D = 17mm.

im Bereich des späteren Beobachtungsfensters der Kammer, die dem Fenster zugewandte Cutis, die Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel sowie die beiden Schichten des Retraktormuskels zu resezierem. Um eine Kompression des Gewebes und eine daraus resultierende Beeinträchtigung der Blutversorgung nach Befestigung des vorderseitigen Kammerrahmens zu verhindern, wurde die Größe des tatsächlichen Beobachtungsfensters (11mm) mit einem zirkulären Schnitt von circa 15mm Durchmesser etwas überschritten. Der vorderseitige Kammerrahmen wurde nach steriler Spülung (NaCl 0,9%) der verbleibenden Gewebeschichten, bestehend aus gegenüberliegendem quergestreiften Hautmuskel, Subcutis und Cutis, mit Stahlmuttern auf den Verbindungsschrauben in einem Abstand von 400-500µm zur Rückseite der Kammer positioniert. Daraufhin konnte das Deckglas des Beobachtungsfensters eingesetzt und mit einem Sprengring im Titanrahmen der Kammervorderseite fixiert

werden (*Abbildung 2D*). Auf diese Weise war es möglich, während der Versuche durch Abnehmen des Deckglases jederzeit Zugang zur präparierten Gewebefläche zu erhalten.

Schließlich wurde auch der vordere Titanrahmen der Kammer an der Hautfalte mit 5.0 Seidefäden fixiert. Im Anschluss an die Kammerpräparation konnten sich die Tiere 48 Stunden von der Narkose und dem chirurgischen Eingriff erholen.

5.2.3. Hormonelle Vorbehandlung

Hamster werden mit einem Alter von 6-8 Wochen geschlechtsreif, wobei weibliche Hamster unter physiologischen Bedingungen einen 4-tägigen Zyklus aufweisen. Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Tieren einer Gruppe hinsichtlich des Geschlechtshormonspiegels ausschließen zu können, wurden alle Tiere nach der Methode von Gross [Gross, 1977] hormonell synchronisiert. Hierzu erhielten die Hamster im Abstand von 24 Stunden zwei subkutane Injektionen mit 55µg/kg KG E2 (17β-Östradiol; Sigma, Taufkirchen), gefolgt von einer Progesteron-Injektion (7,5mg/kg KG; Sigma), die 20 Stunden nach der letzten E2-Injektion verabreicht wurde. Dies führte dazu, dass sich alle Tiere zum Zeitpunkt der Entnahme und Transplantation von Endometrium und Ovar im Östrus befanden. Die Kammerpräparation (*siehe 5.2.2.*) erfolgte 6 Tage nach der ersten Östrogeninjektion.

5.2.4. Isolierung von Endometrium

Im Unterschied zu Säugetieren besitzen Nagetiere einen getrennt angelegten Uterus mit zwei Uterushörnern, einen sogenannten Uterus duplex. Bei dieser Studie wurde jeweils nur das rechte Uterushorn zur Isolierung von Endometrium entfernt, um das Operationstrauma so gering wie möglich zu halten.

Das Endometrium wurde aus den Hamstern isoliert, bei denen zuvor bereits eine Rückenhautkammer implantiert wurde. Zunächst wurde das jeweilige Versuchstier mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG; Narcoren) narkotisiert und anschließend der Bauch rasiert. Nach Hautdesinfektion mit 70%igem Alkohol und Fixierung des Tieres in Rückenlage konnte eine mediane Laparotomie durchgeführt werden. Unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskopes (Wild M650) konnten Uterus und Ovar eingesehen werden. Nach Ligaturen am proxi-

malen und distalen Ende des rechten Uterushornes und elektrischer Kauterisierung zur Blutstillung erfolgte die aseptische Entnahme des Gewebes. Anschließend wurde die Bauchdecke nach Spülung mittels physiologischer Kochsalzlösung wieder mit 5.0 Seidefäden verschlossen.

Das explantierte Uterushorn wurde in eine Petrischale (30mm Durchmesser) transferiert, welche 37°C warmes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum (FCS), 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe) und den Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (H33342; 200µg/ml; Molekulargewicht (MG) 562; Sigma) enthielt (*Abbildung 3*). Dieser Farbstoff ermöglichte eine

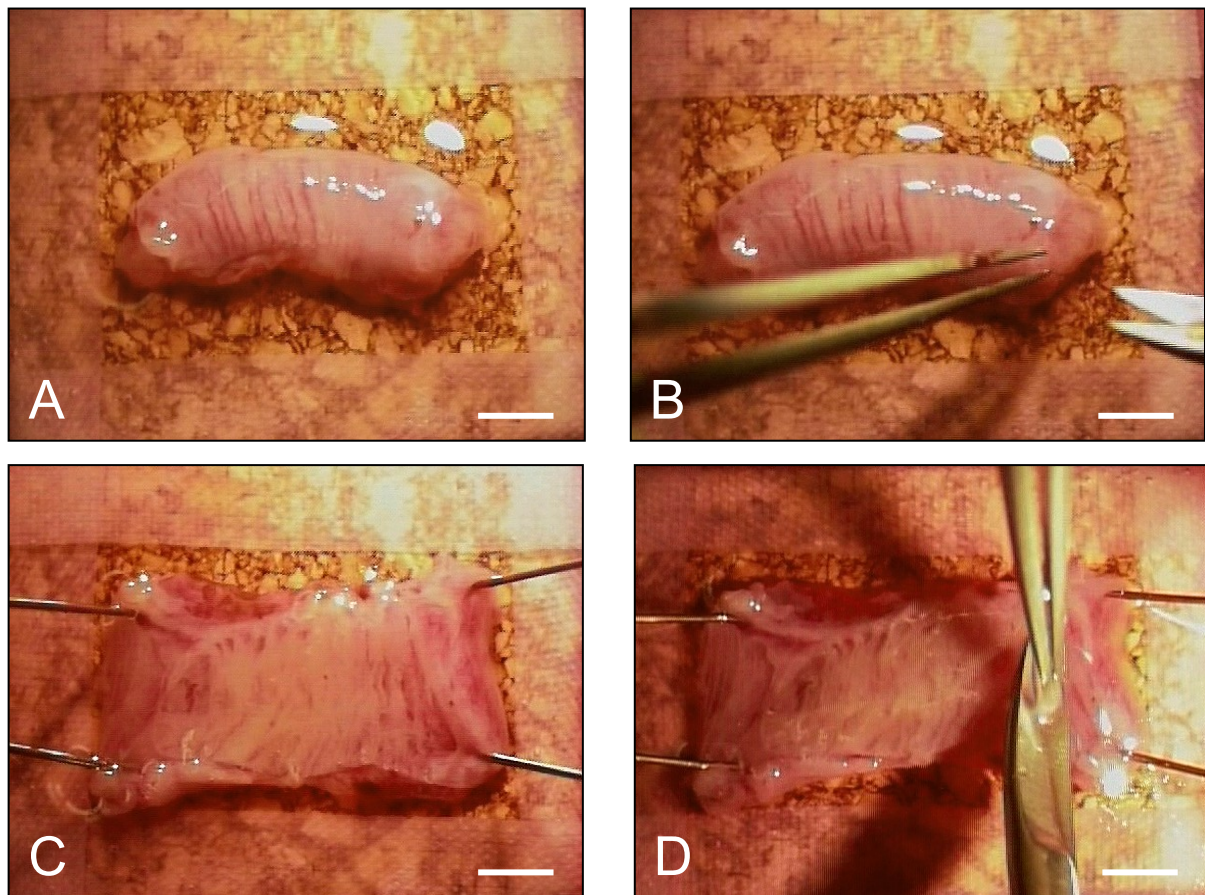


Abbildung 3: Isolierung von Endometrium aus einem Uterushorn. (A) Isoliertes Uterushorn in DMEM. (B) Longitudinale Eröffnung des Uterushorns mittels Mikroschere. (C) Auf einer Korkplatte aufgespanntes, eröffnetes Uterushorn. (D) Präparation des Endometriums vom Myometrium mittels Mikroschere. Maßstab: A-D = 2,2mm.

einfache Differenzierung des kernhaltigen Endometriums vom nicht gefärbten umgebenden Trägergewebe nach Transplantation in die Rückenhautkammer. Danach wurde das Uterushorn der Länge nach mit Hilfe einer Mikroschere aufgeschnitten, auf einer Korkplatte aufgespannt und das Endometrium unter dem Stereomikroskop vorsichtig vom Myometrium getrennt (*Abbildung 3*). Das Endometrium wurde dann in 37°C warmes Bisbenzimid-freies DMEM transferiert und in kleine Gewebefragmente vergleichbarer Größe geschnitten.

5.2.5. Isolierung von Follikeln

Zur Isolierung ovarieller Follikel wurde bei einem Spendertier nach intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG; Narcoren) eine mediane Laparotomie durchgeführt.

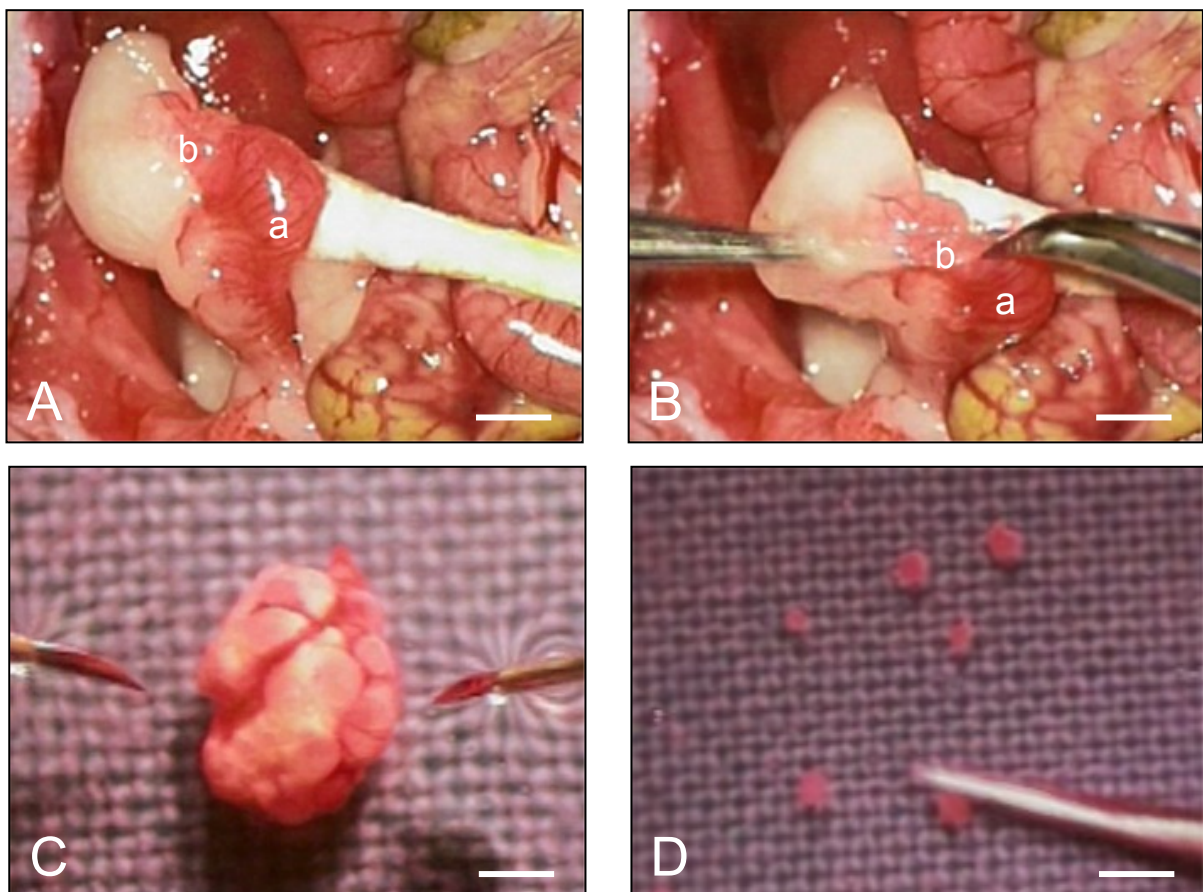


Abbildung 4: Isolierung ovarieller Follikel. (A,B) Operationssitus mit Darstellung von rechtem Uterushorn (a) und Ovar (b) durch Entfernen des periovariellen Fettgewebes. (C) Ovar in DMEM nach Entnahme aus einem Spendertier. (D) Isolierte Follikel in DMEM. Maßstab: A,B = 5mm; C = 1,4mm; D = 1,3mm.

Um eine gute Sicht auf die weiblichen Geschlechtsorgane zu erhalten, erfolgte die Auslagerung des Darmes. Unter Zuhilfenahme des Stereo-Operationsmikroskopes wurden durch vorsichtiges Entfernen des periovariellen Fettgewebes zunächst das rechte Uterushorn und Ovar dargestellt (*Abbildung 4A und B*). Die vollständige Entfernung des Ovars erfolgte nach Durchtrennung der versorgenden Gefäße. Anschließend wurde das Gewebe in eine Petrischale mit 37°C warmem DMEM und dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 transferiert (*Abbildung 4C*). Nach Entfernen von umgebenden Bindegewebsresten konnte das Ovar mit Hilfe zweier steriler 27-Gauge Nadeln zerkleinert werden. Diese Prozedur ermöglichte die Isolierung einzelner Follikel vergleichbarer Größe für die anschließende Transplantation. Identisch wurde beim linken Ovar verfahren. Die isolierten Follikel wurden in 37°C warmes Bisbenzimid-freies DMEM überführt (*Abbildung 4D*). Das Spendertier wurde im Anschluss an den Eingriff durch eine Überdosis des Narkosemittels eingeschláfert.

5.2.6. Transplantation von Endometrium und ovariellen Follikeln

Zur Gewebetransplantation wurden die narkotisierten Hamster auf eine Plexiglasbühne gelegt und mit einem Faden fixiert (*Abbildung 5*).

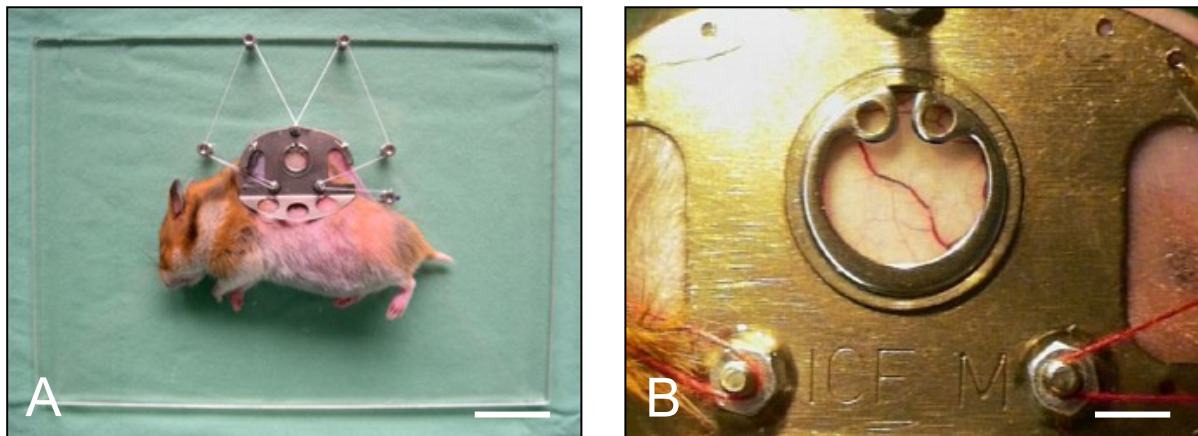


Abbildung 5: (A) Narkotisierter und fixierter Hamster auf einer Plexiglasbühne. (B) Nahaufnahme einer implantierten Rückenhautkammer mit sichtbaren Blutgefäßen des freipräparierten, quergestreiften Unterhautmuskels im Beobachtungsfenster. Maßstab: A = 32mm; B = 4,4mm.

Nach Lösen des Sprenglings wurde das Deckglas des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer kurzzeitig entfernt und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Unter operationsmikroskopischer Sicht konnten jeweils zwei Endometriumfragmente (vom jeweiligen Tier mit Rückenhautkammer) und Follikel (vom syngenem Spendertier) in ausreichendem Abstand voneinander (Größe des Beobachtungsfensters ca. 95mm²) auf die quergestreifte Muskulatur der Kammer transplantiert werden. Im Anschluss daran wurde die Kammer wieder mit einem neuem Deckglas und einem Sprengling verschlossen.

5.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Angiogenese von transplantiertem Endometrium und ovarialen Follikeln erfolgte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Diese Technik eignet sich sehr gut zur Erfassung dynamischer Vorgänge, wie z.B. der Gefäßneubildung.

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden die Hamster am Tag der Transplantation (Tag 0) sowie an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 mit Pentobarbital (50mg/kg KG; Narcoren) narkotisiert und auf einer Plexiglasbühne so fixiert, dass sie sich für das spätere Mikroskopieren in einer geeigneten horizontalen Position befanden. Zuvor wurde jedem Tier 0,1ml des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran (5% Fluorescein Isothiocyanat, MG 150.000 D; Sigma) zur Kontrastverstärkung durch Anfärbung des Blutplasmas appliziert. Aufgrund seines Molekulargewichts verbleibt dieser Farbstoff unter physiologischen Bedingungen intravaskulär. Die intravenöse Injektion erfolgte retrobulbär. Für die Mikroskopie wurde ein modifiziertes Leitz Orthoplan Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar) mit Auf- und Durchlicht-Einrichtung verwendet. Zur Durchführung der Auflicht-Technik wurde eine 100W Quecksilber (HBO) Lichtquelle an ein Ploemo-Pak-Illuminator System mit blauen, grünen und ultravioletten Filterblöcken angeschlossen. Dadurch war eine Anregung und Filterung des Lichtes mit verschiedenen Wellenlängen möglich. Für die Übersichtsaufnahmen dienten ein 4x Objektiv (Numerische Apertur [n.a.] 0,16; Olympus, Graz, Österreich) und ein 6,3x Objektiv (n.a. 0,16; Zeiss, Jena) mit langem Arbeitsabstand. Für die Detailaufnahmen der neugebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Transplantate wurden ein

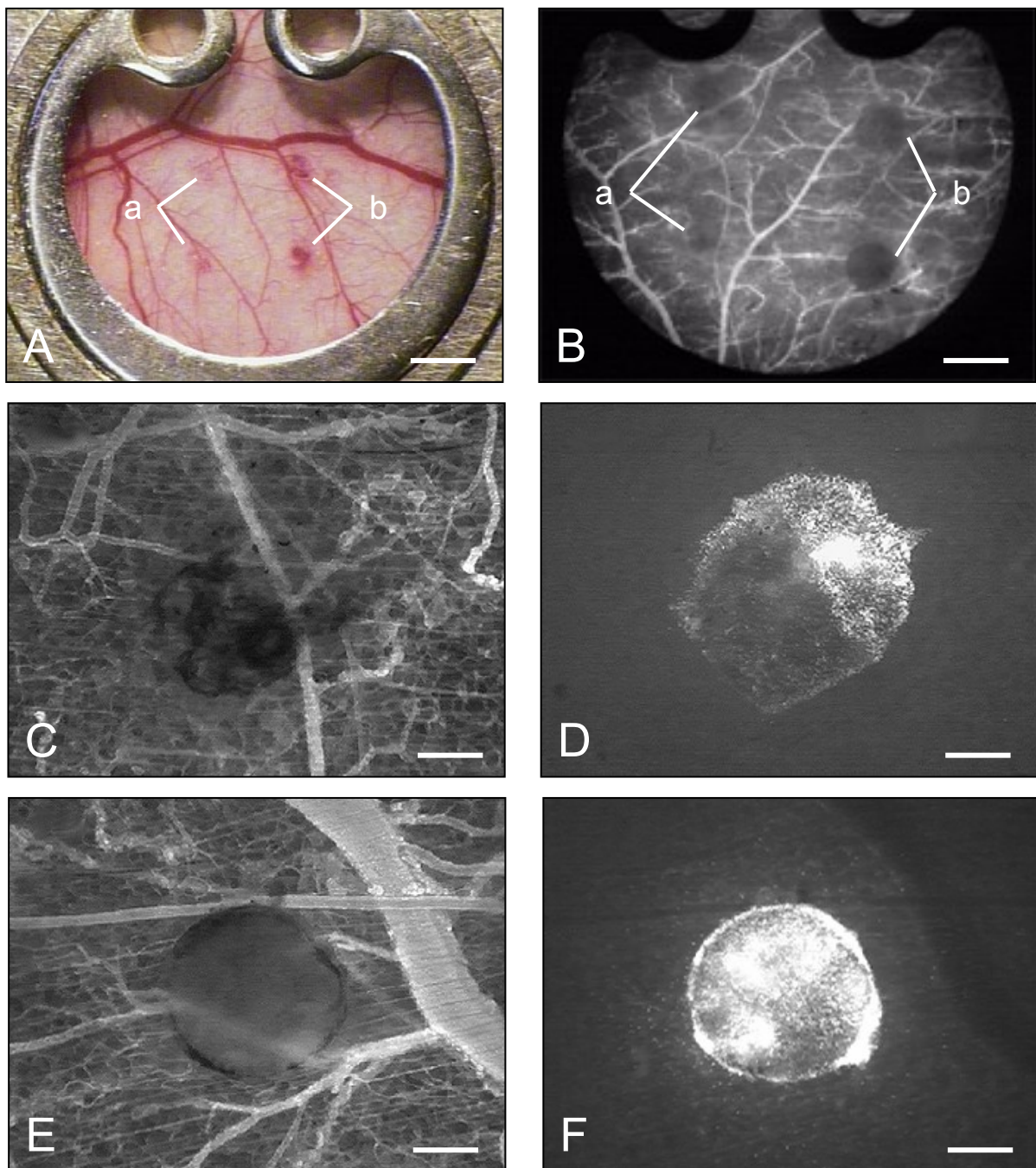


Abbildung 6: (A) Operationsmikroskopische Aufnahme des Beobachtungsfensters einer Rückenhautkammer am 2.Tag nach Gewebetransplantation. (B) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des Beobachtungsfensters am Tag der Gewebetransplantation. In jede Kammer wurden 2 Endometriumfragmente (a) und 2 ovariellen Follikel transplantiert (b). (C-F) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines Endometriumfragments (C, D) und eines ovariellen Follikels (E, F) direkt nach Transplantation in die Rückenhautkammer. Nach Anfärbung der Transplantate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 können diese einfach vom umgebenden Trägergewebe in Ultraviolett-Epi-Illumination unterschieden werden (D, F). Die Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrasverstärkung durch Anfärbung des Blutplasmas mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5% FITC-Dextran erlaubt die Visualisierung der Gefäße innerhalb der Rückenhautkammer (C, E). Maßstab: A = 1600µm; B = 1300µm; C-F = 300µm.

10x (n.a. 0,3; Zeiss) bzw. ein 20x Objektiv (n.a. 0,32; Zeiss) mit langem Arbeitsabstand verwendet. Mittels einer Charged Coupled Device (CCD) Videokamera (CF8/1 FMC; Kappa GmbH, Gleichen) konnten Bilder mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde auf einen Monitor (PVM 1444; Sony, Japan) übertragen werden. Mit Hilfe dieser optischen Systeme wurden Vergrößerungen von x86, x136, x216 und x432 unter Verwendung eines Vario-Zooms auf dem Monitor erreicht. Über einen Videotimer (VTG33, FOR-A; Japan), der zur Aufzeichnung von Versuchstiernummer und Untersuchungszeitpunkt verwendet wurde, konnten die mikroskopischen Bilder durch Kopplung an ein Video-Rekorder-System (Panasonic AG 7350; Japan) aufgezeichnet werden.

5.3.1. Mikrozirkulatorische Parameter

Die gesamten Analysen der mikroskopischen Bilder wurden off-line, d.h. nach Ende der Mikroskopie durch Wiederspielen des Videobandes mit dem computer-assistierte Bildverarbeitungssystem CapImage (Zeintl, Heidelberg) durchgeführt. Unter Verwendung des 4x, 6,3x und 10x Objektivs wurden die Fläche der neu gebildeten Gefäßnetzwerke sowie die Fläche der Transplantate gemessen. Das 20x Objektiv konnte dazu genutzt werden, um die funktionelle Kapillardichte neu entstandener Gefäßareale sowie mikrohämodynamische Parameter wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit der neugebildeten Gefäße zu bestimmen.

5.3.1.1. Fläche

Um die Transplantatgröße sowie die revaskularisierten Gewebeareale der transplantierten Endometriumfragmente und Follikel zu messen, wurden zunächst die entsprechenden Stellen am Bildschirm umrandet und durch Erfassung aller sich darin befindlicher Bildschirmpunkte der Flächeninhalt in mm² berechnet. Dazu wurden Endometriumfragmente und Follikel vor der Transplantation in DMEM mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 markiert (*siehe 5.2.4. und 5.2.5.*), um die Transplantate vom umliegenden Gewebe der Rückenhautkammer differenzieren zu können. Der Farbstoff färbt Zellkerne, indem er sich an AT-reiche Abschnitte der DNS anlagert. Dieser Effekt kann bei lebenden, unfixierten Zellen über mehrere Zellgenerationen erhalten bleiben. Zur Bestimmung der revaskularisierten Fläche der

Transplantate (in %) wurde an den jeweiligen Tagen der Untersuchung das Verhältnis zwischen der gemessenen Netzwerkfläche und der Transplantatgröße berechnet.

5.3.1.2. Funktionelle Kapillardichte

Zur Messung der funktionellen Kapillardichte wurde die Länge der neu gebildeten Kapillaren pro Beobachtungsfeld in cm/cm^2 berechnet. Hierbei wurden nur solche Gefäße berücksichtigt, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung schon mit Erythrozyten durchflossen waren. Gefäße ohne Perfusion oder solche, die nur mit Plasma gefüllt waren, wurden nicht gewertet. Die Messungen erfolgten jeweils in drei Feldern innerhalb der Transplantate. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der aus den 3 Feldern gewonnenen Messergebnisse gebildet.

5.3.1.3. Kapillardurchmesser

An den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden die Einzeldurchmesser von zehn Kapillaren pro Transplantat gemessen. Dazu war es notwendig, am stehenden Aufnahmebild zwei Randpunkte des jeweiligen Gefäßes durch eine senkrecht zum Verlauf des Gefäßes liegende Strecke miteinander zu verbinden. Dabei ermöglichte es der Plasma-Marker 5% FITC-Dextran, die Gefäßgrenzen genau zu visualisieren. Zur Standardisierung bzw. Randomisierung wurden nur solche Gefäße innerhalb eines vaskularisierten Bereiches ausgewählt, welche die waagerechte und senkrechte Mittelachse eines virtuellen Achsenkreuzes auf dem Auswertebildschirm schnitten. Dieses Achsenkreuz war auf eine Folie aufgezeichnet, welche zu den Messungen auf den Bildschirm aufgelegt wurde. Im Anschluss daran konnte aus den 10 Einzeldurchmessern das arithmetische Mittel gebildet werden.

5.3.1.4. Blutzellgeschwindigkeit

Zur Berechnung der Blutzellgeschwindigkeit wurden die Gefäße verwendet, an denen zuvor schon die Messung der Gefäßdurchmesser erfolgte. Wie bereits bei der Ermittlung der Durchmesser wurde hier ebenfalls das arithmetische Mittel der Messwerte von 10 Einzelgefäßen bestimmt. Mittels der computer-assistierten Line-Shift-Diagramm-Methode [Klyscz et al., 1997] konnte die Berechnung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgen. Hierbei legt man eine Messlinie fest, die in Richtung des Blut-

flusses des zu messenden Gefäßes zentral im Lumen liegt. Daraufhin wird die Videoaufnahme für etwa zehn Sekunden in Echtzeit wiedergegeben. In dieser Zeit wird für jedes Halbbild entlang der zuvor festgelegten Messlinie ein Grauwertprofil erstellt, welches in einem Bildspeicher aufgenommen wird. Nun kann der Computer anhand der aneinandergereihten Grauwertprofile ein Line-Shift-Diagramm erstellen, in welchem man helle und dunkle schräge Linien sehen kann. Diese entstehen, wenn sich während der Messung Erythrozyten bzw. Plasmalücken entlang der Messlinie bewegt haben. Die Blutzellgeschwindigkeit kann nun aus der Steigung dieser Linien in $\mu\text{m/s}$ berechnet werden.

5.3.1.5. Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss

Aus Blutzellgeschwindigkeit v und Gefäßdurchmesser d kann mit folgender Formel der mikrovaskuläre Blutvolumenfluss errechnet werden:

$$\text{Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times v/K$$

K steht hierbei für den Baker Wayland Proportionalitätsfaktor [Baker und Wayland, 1974]. Dieser Proportionalitätsfaktor gleicht die Abweichung zwischen der Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom gegenüber der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit aus. Normalerweise berechnet man den Blutvolumenfluss für größere Gefäße, indem man die Blutzellgeschwindigkeit mit dem Gefäßquerschnitt multipliziert. Bei kleineren Gefäßen würde dies zur Überschätzung der Fließgeschwindigkeiten führen, da die Randgeschwindigkeiten im Vergleich zu denen im Zentralstrom geringer sind. Es handelt sich hierbei um ein Geschwindigkeitsprofil in Form einer Parabel. Da bei den Messungen durchschnittliche Gefäßdurchmesser von 5-20 μm auftraten, wurde hier ein Korrekturfaktor von 1,3 verwendet [Lipowsky und Zweifach, 1978].

5.4. Histologie

5.4.1. Konventionelle Histologie

Am Ende der jeweiligen Versuchsreihen wurden die exzidierten Rückenhautkammer-Präparationen in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C für 24 Stunden fixiert.

Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin und eine Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schnittdicke von 4µm.

Jeweils jeder sechste Schnitt der exzidierten Rückenhautkammer-Präparationen wurde nach histologischem Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt alle sauren/basophilen Strukturen blau (Zellkern, DNA) an, während Eosin alle basischen/acidophilen Strukturen (Zellplasmaproteine) rot markiert. Die Analyse der Schnitte erfolgte im Anschluss unter einem Lichtmikroskop (BX60 Olympus, Hamburg).

Zur Auswertung der Querschnittsfläche von einzelnen Endometrioseherden, ihrer Drüsen- und Stromaanteile sowie der Querschnittsflächen ovarieller Follikel mittels computer-assistierter Flächenmessung, wurden Schnitte durch eine zentrale Ebene von Endometrioseherden und ovariellen Follikeln aufgenommen. Dabei wurde jeweils die größte angeschnittene Querschnittsfläche dargestellt.

Um Ovarien histomorphologisch auf Follikelatresie untersuchen zu können, wurden diese nach entsprechender hormoneller Vorbehandlung der Spendertiere entnommen, und wie die exzidierten Rückenhautkammer-Präparationen für 24 Stunden in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C fixiert. Die Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schnittdicke von 4µm erfolgte nach Einbettung in Paraffin. Im Anschluss daran wurde jeder sechste Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin nach Standardprotokoll gefärbt. Waren auf den Schnitten ovarielle Follikel nachweisbar, so wurde der vorherige und nachfolgende Schnitt für weitere immunhistochemische Färbungen verwendet.

5.4.2. Immunhistochemie

Zur Identifizierung atretischer Follikel in einzelnen Ovarien wurde eine immunhistochemische Markierung apoptotischer Zellen mittels eines polyklonalen Kaninchen-anti-Caspase-3-Antikörpers als Primärantikörper durchgeführt (1:200; Merck Biosciences, Schwalbach). Anschließend wurde als Sekundärantikörper ein Ziegenanti-Kaninchen-Antikörper (1:200; GE Healthcare Amersham, Freiburg) zugegeben. Als Farbstoff wurde 3,3'-Diaminobenzidin verwendet. Danach erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalun. Die Schnitte wurden anschließend lichtmikroskopisch analysiert (BX60; Olympus). Wenn die Follikel Caspase-3-positive Granulosazellen ent-

hielten, wurden sie als atretisch definiert und hieraus der Anteil atretischer Follikel an allen Follikeln pro Schnitt ermittelt.

5.5. Primärkulturen endometrialer Zellen

Für zusätzliche in vitro Analysen erfolgte eine Isolierung endometrialer Stroma- und Drüsenzellen aus dem Uterus von 10 Spenderhamstern. Zu diesem Zweck wurden beide Uterushörner, wie unter 5.2.4. beschrieben, isoliert. Die Uterushörner wurden längs aufgeschnitten, um anschließend unter einem Stereomikroskop kleine endometriale Fragmente ($\approx 1\text{-}2\text{mm}^3$) vorsichtig vom Myometrium abpräparieren zu können. Die Gewebestücke wurden anschließend für zwei Stunden in 37°C warmem DMEM inkubiert, welches 0,07% Kollagenase V (Sigma) und 0,017% DNase I (Sigma) enthielt. Nach dieser enzymatischen Digestion konnten die endometrialen Stromazellen, die als Einzelzellen oder kleine Aggregate vorlagen, einen $40\mu\text{m}$ Zellfilter passieren (BD Biosciences, Heidelberg). Die endometrialen Drüsenschläuche, die zu diesem Zeitpunkt noch intakt waren, wurden dabei im Filter zurückgehalten. Durch Spülung mit DMEM konnten sie vom Filter separiert werden. Um die Drüsen in eine Einzelzell-Suspension aufzutrennen, wurde die drüsenhaltige Fraktion zunächst in 3 ml 0,25% Trypsin/EDTA Lösung (PAA, Cölbe) resuspendiert. Dann konnten die Drüsen durch sorgfältiges Pipettieren in Einzelzellen aufgetrennt werden. Das Trypsin wurde mit DMEM/10% FCS inaktiviert. Die isolierten Stroma- und Drüsenzellen konnten danach pelletiert, in DMEM/10% FCS resuspendiert und für 2 und 5 Tage im Brutschrank bei 37°C kultiviert werden, um die Subkonfluenz der Zellen für die Western Blot Untersuchungen zu erreichen. Weiterhin wurden 2×10^4 endometriale Stromazellen und 4×10^4 endometriale Drüsenzellen pro Well in eine 96 Well-Platte transferiert (BD Biosciences), um WST (Water-Soluble Tetrazolium) -1-Assays durchführen zu können.

5.6. Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine quantitative Methode zur Ermittlung der Proteinexpression in einer Gewebeprobe [Burnette et al., 1981]. Um im Studienabschnitt Glycin den Effekt von Glycin auf die Proteinexpression von Proliferating Cell

Nuclear Antigen (PCNA), Caspase-3, p53 und NF- κ B (p65 Untereinheit) in eutopem Endometrium und Ovar zu untersuchen, wurden sowohl Endometrium als auch Ovarien von 4 zusätzlichen Glycin-behandelten Tieren und 4 Kontrolltieren entnommen und in Flüssigstickstoff für die Western Blot Analyse aufbewahrt.

Zur Analyse der Wirkung von EGCG auf die Proteinexpression von PCNA und VEGF in kultivierten endometrialen Stroma- und Drüsenzellen wurden die Zellen im Studienabschnitt Epigallocatechin-3-Gallat 40 μ M EGCG (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), 1 μ M E2 (Sigma) oder einer Kombination von beiden Stoffen ausgesetzt. Zellen, die der Trägersubstanz ausgesetzt waren (DMSO = Dimethylsulfoxid und Maisöl), dienten als Kontrolle. Alle Versuche wurden in dreifachem Ansatz ausgeführt. Nach 48h wurden die Zellen mit Accutase (PAA) abgeerntet und in Flüssigstickstoff für die Western Blot Analysen asserviert.

Für die Extraktion der gesamten Proteinfraction wurden gefrorene Gewebeschnitte in Lysis-Puffer homogenisiert (10mM Tris pH 7,5; 10mM NaCl; 0,1mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), 0,5% Triton-X 100; 0,02% NaN₃; 0,2mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und Protease-Inhibitor Cocktail (1:100 v/v; Sigma)). Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis und eine 30-minütige Zentrifugation bei 16000g (4°C). Der Überstand (Gesamtzell-Lysat) wurde abpipettiert und zur Proteinbestimmung verwendet.

Die Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung eines Lowry Assays [Lowry et al., 1951] bestimmt. Diese Methode beruht auf einer Farbreaktion mit Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz und Kupfersulfat. Der so entstandene Farbkomplex konnte photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer bovinen Serumalbumin (BSA)- Standard Kurve ermittelt werden. Anschließend wurden pro Bande 60 μ g (für den Studienabschnitt Glycin) und 15 μ g (für den Studienabschnitt Epigallocatechin-3-Gallat) des Proteins auf ein Polyacrylamid-Gel aufgebracht und im elektrischen Feld nach Molekulargewicht separiert. Durch dieses elektrische Feld wanderten die Proteine auf einer Polyvinylidendifluorid Membran (BioRad, München). Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnten nun die Proteine quantifiziert werden, welche an die Membran gebunden waren. Die Dauer der Inkubation betrug 2 Stunden. Hier-zu wurden für den Studienabschnitt Glycin ein monoklonaler Maus-anti-PCNA-Antikörper (1:1000); Dako, Hamburg), ein polyklonaler Kaninchen-anti-

cleaved-Caspase-3-Antikörper (1:400; Cell Signaling, Frankfurt), ein monoklonaler Maus-anti-p53-Antikörper (1:300; BD Pharmingen, Heidelberg) und ein polyklonaler Kaninchen-anti-NF- κ B(p65)-Antikörper (1:200; Santa Cruz, Heidelberg) verwendet. Danach wurde ein HRP (horseradish peroxidase)-konjugierter Sekundärantikörper aufgebracht (1:5000; GE Healthcare).

Für den Studienabschnitt Epigallocatechin-3-Gallat wurden ein monoklonaler Maus-anti-PCNA-Antikörper (1:2000; Dako, Hamburg) und ein polyklonaler Kaninchen-anti-cleaved-VEGF-Antikörper (1:100; Cell Signaling) eingesetzt. Im Anschluss daran erfolgte ebenfalls der Einsatz eines HRP konjugierten Sekundärantikörpers (1:5000; GE Healthcare). Für VEGF wurden die beiden detektierten Banden (Isoformen 189 und 165) in die densitometrische Analyse mit eingeschlossen.

Unter Einsatz eines Chemilumineszenz-Substrates (GE Healthcare), welches enzymatisch zu einem Licht emittierenden Produkt umgesetzt werden kann, konnte die Proteinexpression detektiert werden. Danach erfolgte die Aufzeichnung durch Autoradiographie auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; GE Healthcare). Ein monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5000; Sigma) wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers als interner Standard eingesetzt. In sämtlichen Western Blot Analysen wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte $\times$ Fläche (mm^2) auf die gleiche β -Aktin-Konzentration korrekturgerechnet. Die Röntgenfilme konnten mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel-Doc; BioRad) und einem entsprechenden Quantifizierungsprogramm (Quantity one; BioRad) ausgewertet werden.

5.7. WST-1-Assay

Um die zelluläre Aktivität von kultivierten, endometrialen Stroma- und Drüsenzellen zu beurteilen, wurde ein kolorimetrischer WST-1-Assay durchgeführt (Roche, Mannheim). Dieser Assay basiert auf der Erkenntnis, dass lebende Zellen dazu fähig sind, mittels mitochondrialer Dehydrogenasen rötlich gefärbtes WST-Salz in dunkelrotes Formazan zu spalten [Hamasaki et al., 1996; Ishiyama et al., 1996]. Formazan wird in das Kulturmedium abgesondert, dessen Absorptionsvermögen anschließend mit einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen werden kann. Der WST-1-Assay wurde

gemäß Herstellerangaben ausgeführt. Hierzu wurden die Zellen unter Anwesenheit von 40µM EGCG (Cayman Chemical Company), 1µM E2 (Sigma) oder einer Kombination von beiden kultiviert. Bei einer Dosis von 40µM EGCG wurde bereits in früheren Studien eine Hemmung des Zellwachstums und der VEGF-Expression nachgewiesen [Chen et al., 1998; Jung et al., 2001]. Zellen, die der Trägersubstanz ausgesetzt waren (DMSO und Maisöl) dienten als Kontrolle. Die Ausführung aller Experimente erfolgte in vierfachem Ansatz. Nach 48 Stunden wurde jeder Platte 10µl WST-1 Reagenz/100µl Medium hinzugefügt. Nach einer Stunde bei 37°C konnte unter der Verwendung eines Mikroplatten-Lesegerätes und nach Korrektur bezogen auf Standards (= Medium ohne Zellen) die Absorption bei 450nm mit 620nm als Referenz-Wellenlänge gemessen werden.

5.8. Reproduktive Funktion

Um den Einfluss von Glycin auf die reproduktive Funktion von Hamstern zu untersuchen, wurden 6 weibliche Tiere separat in Einzelkäfige gesetzt. Sie erhielten Glycinangereichertes Futter (10% wt/wt; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) für die Dauer von 5 Tagen. Danach wurden sie in Käfige zusammen mit einem männlichen Hamster gesetzt. 6 zusätzliche weibliche Hamster, die Standard Pellet Futter erhielten (ssniff), dienten als Kontrollgruppe. Anschließend wurde die Zeit bis zum Wurf (d.h. die Zeit zwischen Verpaarung und Wurfstag), die Anzahl lebensfähiger Nachkommen am Tag der Geburt und das Gewicht der einzelnen Jungen, sowohl am Tag der Geburt als auch nach 10 und 21 Tagen, gemessen. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Jungen auf teratogene Stigmata.

5.9. Experimentelles Protokoll

5.9.1. Versuchsablauf

Damit sich alle Tiere für die Versuche im gleichen Zyklusstadium befanden, wurden sie zunächst hormonell synchronisiert (*siehe* 5.2.3.). Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte 6 Tage nach der ersten Östrogeninjektion. Die Tiere konnten sich nach Implantation der Rückenhautkammer für 48 Stunden erholen, um Einflüsse

des chirurgischen Präparationstraumas auf die nachfolgenden Versuche ausschließen zu können. Im Anschluss daran erfolgte die Implantation von jeweils 2 Endometriumfragmenten und 2 ovariellen Follikeln pro Tier in die Kammer. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurde makroskopisch das Aussehen der Rückenhautkammer und der darin befindlichen Transplantate täglich qualitativ beurteilt und dokumentiert.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Tag der Transplantation (Tag 0) und an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14. Hierzu wurde den Hamstern kurz vor dem Mikroskopieren eine retrobulbäre Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes 5% FITC Dextran appliziert (*siehe 5.3.*). Die Dauer der jeweiligen mikroskopischen Untersuchung betrug pro Tier ca. 20 Minuten. Folgende Parameter wurden bestimmt:

- 1.) *Transplantatfläche (siehe 5.3.1.1.)*
- 2.) *Fläche der revaskularisierten Gewebeareale (siehe 5.3.1.1.)*
- 3.) *Funktionelle Kapillardichte (siehe 5.3.1.2)*
- 4.) *Kapillardurchmesser neugebildeter Gefäße (siehe 5.3.1.3.)*
- 5.) *Blutzellgeschwindigkeit (siehe 5.3.1.4.)*
- 6.) *Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss (siehe 5.3.1.5.)*

Am letzten Tag der Intravitalmikroskopie, d.h. an Tag 14 nach Gewebetransplantation, wurden die Tiere mit einer Überdosis des Narkosemittels eingeschläfert und die Rückenhautkammer-Präparationen zur histologischen Untersuchung exzidiert.

5.9.2. Versuchsgruppen

5.9.2.1 Epigallocatechin-3-Gallat

Das Ziel dieses Studienabschnitts war es, den Einfluss des Polyphenols EGCG auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden und ovariellen Follikeln mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (*siehe 5.3.*) und konventioneller Histologie (*siehe 5.4.1.*) zu analysieren. Weiterhin wurde die Wirkung von EGCG auf eutopes Endometrium und Ovar bzw. isolierte endometriale Stroma- bzw. Drüsenzellen mit Hilfe von Western Blot Analysen (*siehe 5.6.*) und WST-1-Assays (*siehe 5.7.*) untersucht.

1) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

a) Gruppe „EGCG-behandelt“:

Eine Gesamtzahl von 14 Endometriumfragmenten und 14 ovariellen Follikeln wurde in die Rückenhautkammer von 7 weiblichen Hamstern transplantiert. Diese wurden täglich ab dem Tag der Transplantation mit EGCG behandelt (65mg/kg Körpergewicht i.p., gelöst in 200µl DMSO (Cayman Chemical Company). Jung et al. [2001] konnten bereits zeigen, dass diese EGCG-Dosis effektiv das Wachstum von Tumoren in vivo hemmt.

b) Gruppe „DMSO-behandelt“ (Kontrolle):

Eine Gesamtzahl von 20 Endometriumfragmenten und 20 ovariellen Follikeln wurde in die Rückenhautkammer von 10 DMSO-behandelten (200µl/d, i.p.) Kontrollhamstern transplantiert. Die Tiere erhielten DMSO, welches als Träger-substanz für EGCG diente, ab dem Tag der Transplantation.

2) Konventionelle Histologie

Am Ende der Versuchsreihe wurden die Präparationen der Rückenhautkammern für histologische Untersuchungen entnommen.

3) Western Blot

Um den Effekt von EGCG auf eutopes Endometrium und Ovar zu analysieren, wurden täglich jeweils 3 zusätzliche Tiere mit EGCG (65mg/kg KG i.p., gelöst in 200µl DMSO) bzw. DMSO (200µl/d i.p.) behandelt. Am Tag 3 wurden die Uterushörner und die Ovarien isoliert, um die Expression von PCNA und VEGF mittels Western Blots untersuchen zu können. Für die Analysen von endometrialen Stroma- und Drüsenzellen erfolgte zunächst eine Zellisolierung gemäß Abschnitt 5.5., um hier ebenfalls die Expression von PCNA und VEGF mit Hilfe von Western Blots zu analysieren. Die Zellen wurden mit EGCG, E2 oder einer Kombination von beiden kultiviert. Die Kontrollzellen waren der Trägersubstanz ausgesetzt (DMSO und Maisöl).

4.) WST-1-Assay

Für den WST-1-Assay musste zunächst Endometrium aus den Uterushörnern von insgesamt 10 Spenderhamstern isoliert werden (*siehe 5.2.4.*). Um Primärkulturen von endometrialen Stroma- und Drüsenzellen zu erhalten wurde wie in Abschnitt 5.5. beschrieben verfahren. Die Zellen wurden dann mit EGCG, E2 oder einer

Kombination von beiden kultiviert. Als Kontrolle dienten Zellen, die der Trägersubstanz ausgesetzt waren.

5.9.2.2. Glycin

Das Ziel dieses Studienabschnitts war es, den Einfluss der nicht-essentiellen Aminosäure Glycin auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden und ovariellen Follikeln mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie (*siehe 5.3.*) und konventioneller Histologie (*siehe 5.4.1.*) zu analysieren. Weiterhin wurde die Wirkung von Glycin auf Endometrioseherde und ovarielle Follikel mit Hilfe von Western Blot Analysen (*siehe 5.6.*) und Immunhistochemie sowie dessen Auswirkung auf die reproduktive Funktion von weiblichen Hamstern untersucht (*siehe 5.8.*). Die Tiere erhielten Glycin über das Standard-Pellet-Futter, welches damit angereichert war (*Tabelle 1*).

1) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

a) Gruppe „Glycin-behandelt“:

Eine Gesamtzahl von 16 Endometriumfragmenten und 16 ovariellen Follikeln wurde in die Rückenhautkammer von 8 weiblichen Hamstern transplantiert.

	Kontrollgruppe	Glycingruppe
Glycin-Zusatz (%)	0	10,0
Gesamt-Glycin (%)	0,8	10,8
Roh-Fett (%)	20,0	29,7
Roh-Protein (%)	3,5	3,2
Roh-Fett (%)	8,0	7,2
Roh-Faser (%)	7,1	6,5
Stickstoff-freier Anteil (%)	49,7	43,0
ME* (MJ/kg)	11,8	13,0

Tabelle 1: Zusammensetzung des Futters der Kontrollgruppe und Glycingruppe nach Herstellerangaben (* = umsetzbare Energie).

Das Standard Pellet Futter war angereichert mit 10% Glycin (98% Reinheit; Acros Organics, Geel, Belgien). Bei dieser Konzentration wurden bereits effektive inhibitorische Effekte auf die Angiogenese in Tumoren und heilenden Wunden nachgewiesen [Amin et al., 2003].

b) Gruppe „Unbehandelt“ (Kontrolle):

Eine Gesamtzahl von von 16 Endometriumfragmenten und 16 ovariellen Follikeln wurde in die Rückenhautkammer von 8 weiblichen Hamstern transplantiert. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standard Pellet Futter (ssniff).

2) Konventionelle Histologie

Am Ende der Versuchsreihe wurden die Präparationen der Rückenhautkammern für histologische Untersuchungen entnommen.

3) Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Identifizierung atretischer Follikel in einzelnen Ovarien wurden Ovarien von jeweils 3 zusätzlichen Hamstern beider Untersuchungsgruppen in toto entnommen.

4) Western Blot

Um den Einfluss von Glycin auf die Proteinexpression von PCNA, Caspase-3, p53 und NF- κ B zu analysieren, wurden sowohl Endometrium als auch Ovarien von jeweils 4 zusätzlichen Glycin-behandelten Tieren und 4 Kontrolltieren verwendet.

5) Reproduktive Funktion

Zur Analyse des Einflusses von Glycin auf die reproduktive Funktion von Hamstern wurden jeweils 6 weitere weibliche Hamster beider Gruppen verwendet (*siehe 5.8.*)

5.9.2.3. Genistein

Das Ziel dieses Studienabschnitts war es, den Einfluss des Isoflavons Genistein auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden und ovariellen Follikeln mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie (*siehe 5.3.*) und konventioneller Histologie (*siehe 5.4.1.*) zu analysieren.

1) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

a) Gruppe „Genistein-behandelt“:

Eine Gesamtzahl von 20 Endometriumfragmenten und 20 ovariellen Follikeln wurde in 10 weibliche Hamster transplantiert. Diese wurden täglich ab dem Tag der Transplantation bis zum Ende des Versuches mit Genistein behandelt. 6 Tiere erhielten 50mg/kg KG i.p. und 4 Tiere erhielten 200mg/kg i.p., jeweils in 100 μ l DMSO gelöst (LC Laboratories, Woburn, MA, USA).

Frühere Studien konnten zeigen, dass die Dosis von 50mg/kg Genistein effektiv das Wachstum und die Angiogenese von Tumoren hemmt [Gu et al., 2005]. Um die Dosis-abhängigen Effekte von Genistein zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Gruppe von Tieren analysiert, welche die höhere Dosis von 200mg/kg erhielten.

b) Gruppe „Kontrolle/ DMSO-behandelt“:

Eine Gesamtzahl von insgesamt 12 Endometriumfragmenten und 12 ovariellen Follikeln wurde in 6 weibliche Hamster transplantiert. Diese wurden täglich ab dem Tag der Transplantation bis zum Ende des Versuchs mit der Trägersubstanz DMSO behandelt (100µl/d i.p. DMSO)

2) Konventionelle Histologie

Am Ende der Versuchsreihe wurden die Präparationen der Rückenhautkammern für histologische Untersuchungen entnommen.

5.10. Statistik

Sämtliche Werte werden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben, wobei die Mittelwerte der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter an den entsprechenden Untersuchungstagen aus den Einzelwerten der transplantierten Endometriumfragmente bzw. ovariellen Follikel errechnet wurden.

Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und Standardabweichung untersucht. Bei einer Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen an den entsprechenden Untersuchungstagen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA), gefolgt vom Student`s t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Mit Hilfe des gepaarten Student`s t-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen wurden signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe geprüft.

Für den Fall, dass eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte ein Gruppenvergleich mit der Kruskal Wallis Varianzanalyse und der

paarweise Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dementsprechend wurden signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe durch die Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt vom Wilcoxon Paar Test mit Korrektur des alpha-Fehlers für statistische Berechnungen bei Messwiederholungen bestimmt.

Die gesamten statistischen Tests wurden mit Hilfe des Software Pakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Bei Prüfung wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.