Arch. Gynäk. 213, 162—175 (1972)
© by J. F. Bergmann München 1972

Zur Wirkung von LH auf den Stoffwechsel isoliert perfundierter menschlicher Ovarien*

E. Stähler, R. Buchholz, L. Spätling, H. D. Bethge und H. O. Neumann

Universitäts-Frauenklinik Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz)

Eingegangen am 10. August 1972

* Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit Unterstützung der Ford-Foundation New York, grant Nr. 66/388.

The Effect of LH on the Metabolism of Isolated Perfused Human Ovaries

Summary. Eight human ovaries with graafian follicles, one of them with a diabetes mellitus, were perfused, in vitro, with a 100% synthetic hemoglobin-free medium and stimulated with LH. The oxygen uptake of the ovaries and the changes in the level of glucose, pyruvate and lactate in the perfusion medium during its five hour circulation were determined. Additionally we tested the activities of the GOT and GPT. As criteria of viability of the perfused ovaries the concentrations of ATP, ADP, glucose, pyruvate, lactate, glycogen and the activities of the GOT, GPT and G-6-PDH were determined in the tissue after the close of the perfusion. The stimulation with 1 μg LH—NIH—S_{12}/ml pm caused an increase in glucose-assimilation and lactate-production, but a decrease in pyruvate-consumption and only a small rise in oxygen uptake. The metabolism of the ovary seems to be interfered in diabetes mellitus. The results confirm the possibility to maintain an intact metabolism in the ovaries for a perfusion-period of five hours.

Zusammenfassung. Acht menschliche Ovarien mit Graafschem Follikel, eines davon bei schwerem Diabetes mellitus, wurden in einem geschlossenen, rezirkulierenden System mit einem vollsynthetischen, hämoglobinfreien Medium isoliert in vitro über 5 Std perfundiert und mit LH stimuliert. Während der Perfusion wurde der O_2-Verbrauch ermittelt, sowie im Medium die Konzentrationsänderungen von Glucose, Pyruvat und Lactat. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der GOT und GPT gemessen. Als Kriterium der Intaktheit des Gewebes nach Perfusionsschluß bestimmten wir im Ovar den Gehalt an ATP, ADP, Glucose, Pyruvat, Lactat und Glykogen sowie die Aktivitäten der GOT, GPT und G-6-PDH. Es konnte gezeigt werden, daß die Ovarien auf eine LH-Stimulation mit einer Zunahme der Lactatproduktion und Glucoseaufnahme trotz aerober Bedingungen reagierten und die Pyruvataufnahme dabei gleichzeitig herabgesetzt war. Bei Steigerung der LH-Dosis um das 4fache nahmen Lactatproduktion und Glucoseaufnahme beide um einen Faktor 1,2 zu, während Pyruvataufnahme und O_2-Verbrauch eine nicht so deutliche Änderung zeigten. Bei diabetischer Stoffwechsellage scheint der Ovarmetabolismus beeinträchtigt zu sein. Die Ergebnisse bestätigen die Möglichkeit, in isoliert perfundierten Ovarien über 5 Std einen zu spezifischen Leistungen noch befähigten Stoffwechsel aufrechtzuerhalten.

Einleitung

Bei Studien zur Aufklärung hormonaler Wirkungsmechanismen am Ovar konnten mehrere Arbeitsgruppen einen deutlichen Effekt der Gonadotropine auf den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel nachweisen. So fand man nach einer (in vivo) LH-Gabe am präpubertalen, luteinisierten Rattenovar einen Anstieg der Glucoseaufnahme und der Lactatproduktion an 4 Std später inkubierten Gewebeschnitten, der Effekt war aber nicht durch Gabe von LH direkt zum Inkubationsmedium reproduzierbar [8]. Auch an ganzen, isoliert inkubierten Rattenovarien mit kleinen Follikeln ließ sich nach LH-Stimulation eine vermehrte Glucoseaufnahme nachweisen, auch wenn das Hormon direkt zum Inkubationsmedium gegeben wurde [1, 9]. In weiteren Untersuchungen zeigte es sich, daß zwischen der LH-Dosis und der Lactatproduktion der Ovarien eine Abhängigkeit bestand [5, 22, 44] und an Ovarien hypophysektomierter Ratten ließ sich in der Tat eine exakte Dosis-Wirkungsrelation aufzeigen [22]. Da aber unter FSH derselbe Effekt auftrat, allerdings nur nach einer wesentlich höheren Dosis, war ein Test für LH hieraus nicht abzuleiten [5]. Die beobachtete Stimulierung des Kohlenhydratstoffwechsels durch LH hat wohl verschiedene Ansatzpunkte, denn einerseits erwiesen sich Membranpermeabilität und -Transport für Glucose, Galaktose und andere Monosaccharide stimulierbar [7, 19], andererseits zeigten sich spezifische Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in ihrer Aktivität durch LH beeinflußbar. Dabei scheint der Glucose-6-PDH und dem Pentose-Phosphatcyclus über die Bereitstellung von NADPH eine besondere Rolle in der Regulierung der Ovarfunktion zuzukommen [27, 36—38, 63]. Innerhalb der Glykolyse unterliegen die Phospho-Fructokinase [7, 29, 32] und die Phospho-Hexose-Isomerase einer endokrinen Kontrolle durch LH [47] und auch andere Schlüsselenzyme des KH-Stoffwechsels erwiesen sich durch LH aktivierbar. So die Glykogenphosphorylase [6, 19, 33, 52, 55] und in isolierten Granulosazellen die Succinatdehydrogenase [3]. Auch der Sauerstoffverbrauch isolierter Granulosazellen stieg unter LH an [23], isolierte Thecazellen zeigten diesen Effekt nur bei FSH.

Wie wir in früheren Untersuchungen schon an isoliert perfundierten Ovarien von Mensch und Rind zeigen konnten [57, 58], fand man nun in isoliert durchströmten Kaninchenovarien auch ohne hormonale Stimulation eine über mehrere Stunden weitgehend linear verlaufende Lactatproduktion [4]. Der ovarielle KH-Stoffwechsel unterliegt also einer endokrinen Kontrolle durch LH, wobei sich die bisher aufgeklärten Einzeleffekte als sehr different erwiesen und möglicherweise durch unabhängig voneinander bestehende Wirkungsmechanismen des Hormons hervorgerufen werden. Obwohl in der Literatur bereits zahlreiche Angaben über

in vitro-Durchströmungsexperimente an Ovarien verschiedener Species vorzufinden sind [4, 13, 15, 16, 18, 39, 41—43, 49, 50, 61, 62], wurde der Einfluß von LH auf den Energiestoffwechsel isoliert perfundierter menschlicher Ovarien noch nicht untersucht. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, zur Klärung gonadotroper Regulationen mit beizutragen.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden durchgeführt an Ovarien regelmäßig menstruierender Frauen, bei denen wegen eines Collum-Carcinom ersten Grades eine Operation nach Wertheim-Meigs vorgenommen wurde. Bis auf einen Fall erhielten alle Patientinnen 3 Wochen vor der Operation eine Radiumeinlage präcervical mit maximal 2000 mgeh. Nach Entnahme der Ovarien wurden diese sofort in gekühlter Pufferlösung gelagert und dann im Labor von der A. ovarica her angeschlossen. Die fast ausschließlich „kalte Ischämie" betrug maximal —15 min. Nach Kanülierung wurde das Ovar mit gekühltem, heparinisierten Medium, dem etwas Methylenblau zugesetzt worden war, blutfrei gespült. So läßt sich am besten beurteilen, ob evtl. arterielle Verzweigungen noch zusätzlich unterbunden werden müssen. Perfundiert wurde, wie schon früher berichtet [57, 58], in einem geschlossenen, rezirkulierenden System mit einem vollsynthetischen, hämoglobinfreien Medium bei 36,5° C und einer Durchströmungsgeschwindigkeit von etwa —2 ml/min/g. Die Perfusion wurde in drei Phasen unterteilt: Vorlauf, Kontrollphase, Stimulationsphase mit LH.

Das Perfusionsmedium (PM) wurde dabei jeweils, wie in den Abbildungen angegeben, ganz erneuert und betrug in der Regel 50 ml. Der Perfusionsdruck (PD) lag zu Beginn meist bei 80—110 mm Hg und sank dann im weiteren Verlauf auf einen konstanteren Wert im Bereich von 60—80 mm Hg. Während der Perfusion kam es zu periodisch auftretenden — wellenförmigen — Druckschwankungen, die möglicherweise durch Spontankontraktionen des Ovars hervorgerufen werden, ein Befund, der auch schon von anderen Autoren berichtet wurde [42]. Überwachung und Registrierung von pH-Wert, PD und pO_2 im arteriellen und venösen Schenkel erfolgte kontinuierlich auf einem Mehrkanalschreiber (Hellige/Frbg.). Nach jeder Perfusionsphase wurden wiederum Keimzahlbestimmungen auf McConkey und N-Agar vorgenommen. Sie lagen nicht über 10^3—10^4 Keime/ml PM. Nach Perfusionsschluß wurde zur Kontrolle das Gefäßbündel am Hilus nochmals mit Methylenblau dargestellt, um sicher zu gehen, daß das PM ausschließlich in das Ovar gelangte.

Analysen

Die Bestimmung des O_2-Verbrauches erfolgte, wie schon früher angegeben, aus der arterio-venösen Differenz der O_2-Partialdrucke. Dabei verwandten wir immer je zwei Elektroden, die im Wechsel geeicht werden konnten, um möglichst genaue Ergebnisse zu erzielen. Nach jeder Perfusionsphase wurde der Gehalt an Glucose, Pyruvat und Lactat sowie die Aktivitäten der GOT und GPT bestimmt. Als Kriterium der Intaktheit des Gewebes post perfusionem ermittelten wir im Ovar die Gewebekonzentrationen von ATP, ADP, Glucose, Pyruvat, Lactat (alle Bestimmungen wie bei [57, 58]) sowie den Glykogengehalt [26] und die Aktivität der Glucose-6-PDH [31], der GOT und GPT (optischer Test

Boehr.). Alle Enzyme und Coenzyme stammten von Boehringer (Mannheim), alle weiteren Chemikalien reinst p. A. von E. Merck (Darmstadt). Rinderserumalbumin-reinst von den Behring-Werken (Marburg).

Ergebnisse

Wie auf den Abb. 1 und 2 zu sehen, bewirkte die Stimulation mit 1 μg LH—NIH—S_{12}/ml PM eine Intensivierung des Stoffwechsels im isoliert durchströmten Ovar, was seinen Ausdruck findet in einer erhöhten Glucoseaufnahme aus dem PM ($p < 0{,}025$), korrelierend mit einer aufsteigenden Tendenz des Sauerstoffverbrauches, die allerdings nicht signifikant war. Die Lactatproduktion nahm unter der LH-Stimulation trotz aerober Bedingungen deutlich zu ($p < 0{,}01$), ein Phänomen, das von anderen Autoren schon an Rattenovarien beobachtet werden konnte [1, 2, 5, 7—9, 22, 44]. Neu war in unseren Experimenten das gegensätzliche Verhalten von Pyruvat, das in der LH-Stimulationsphase signifikant weniger vom Ovar aus dem PM aufgenommen wurde ($p < 0{,}001$). Während des Vorlaufes, einer Phase der Revitalisierung und Reoxygenierung des Organs, traten relativ die größten Veränderungen bei den vier bestimmten Parametern auf, wobei hier die Lactatbildung sicher noch als Ausdruck der anoxischen Streßphase nach Entnahme anzusehen ist. Der starke Pyruvatverbrauch in der Initialphase, den wir hier wie bei allen anderen Perfusionsexperimenten vorfanden, ist als ein Kompensationsmechanismus auf den Wasserstoffanstau nach durchgemachter Anoxie aufzufassen [53, 58]. Es folgt dann in der Kontrollphase der Perfusion ein steady-state, der erst nach der LH-Einwirkung seine oben beschriebenen Veränderungen erfährt. Um zu sehen, ob sich bei den beobachteten Veränderungen nach einer höheren LH-Dosis quantitative Unterschiede ergeben, perfundierten wir ein Ovar desselben Funktionszustandes und stimulierten es mit 4 μg LH—NIH—S_{12}/ml PM. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Wie zu sehen, finden wir hier nach der höheren LH-Dosis wiederum die zuvor in Abb. 1 und 2 schon beschriebenen typischen Veränderungen der vier Parameter, wobei Glucoseaufnahme und Lactatproduktion beide um etwa einen Faktor 1,2 anstiegen. Die Änderungen im Sauerstoffverbrauch und der Pyruvataufnahme waren nicht so ausgeprägt.

Das Experiment der Abb. 4 wurde auch an einem Ovar mit Graafschem Follikel durchgeführt, es stammte von einer Patientin mit einem schweren Diabetes mellitus, der mit 60 E Alt-Insulin/Tag einigermaßen eingestellt war.

Das Ergebnis unserer Messungen wies zu den anderen „normalen Ovarien" erstaunliche Unterschiede auf: Wir fanden nach der Stimulation mit 1 μg LH—NIH—S_{12}/ml PM nicht nur einen Rückgang der Glucose-

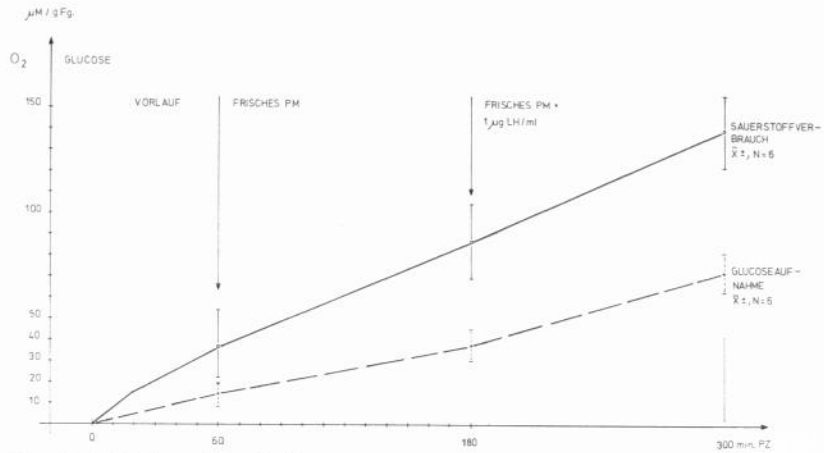

Abb. 1. O_2-Verbrauch und Glucoseaufnahme 6 menschlicher Ovarien mit Graafschem Follikel während einer 5stündigen in vitro-Perfusion und nach Stimulation mit LH—NIH—S_{12}. Gewicht $\bar{x} = 4{,}8$ g, Alter $\bar{x} = 45$ Jahre. Zuvor regelmäßig menstruiert

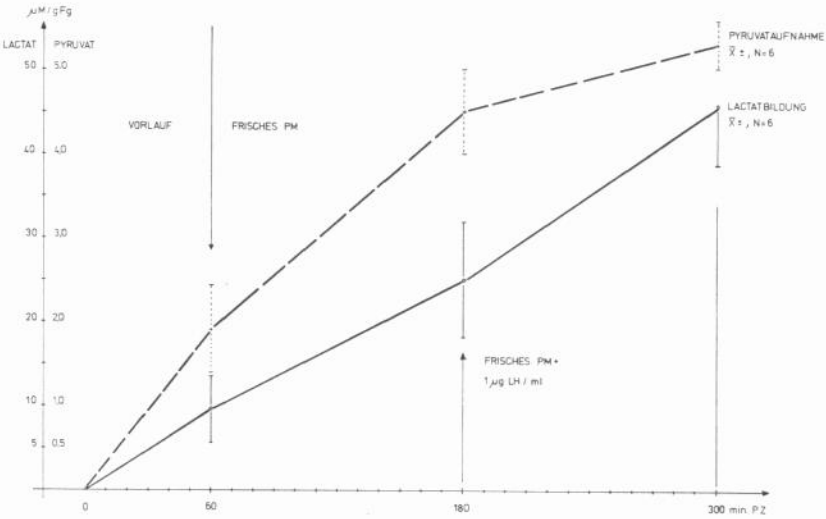

Abb. 2. Lactatbildung und Pyruvataufnahme 6 menschlicher Ovarien mit Graafschem Follikel während einer 5stündigen in vitro-Perfusion und nach Stimulation mit LH—NIH—S_{12}. Gewicht $\bar{x} = 4{,}8$ g, Alter $\bar{x} = 45$ Jahre. Zuvor regelmäßig menstruiert

aufnahme, sondern Glucose wurde zu einem geringen Teil noch in das PM abgegeben. Auch die Lactatproduktion stieg nicht so wie bei den anderen Ovarien an, sondern war rückläufig. Die O_2-Aufnahme zeigte

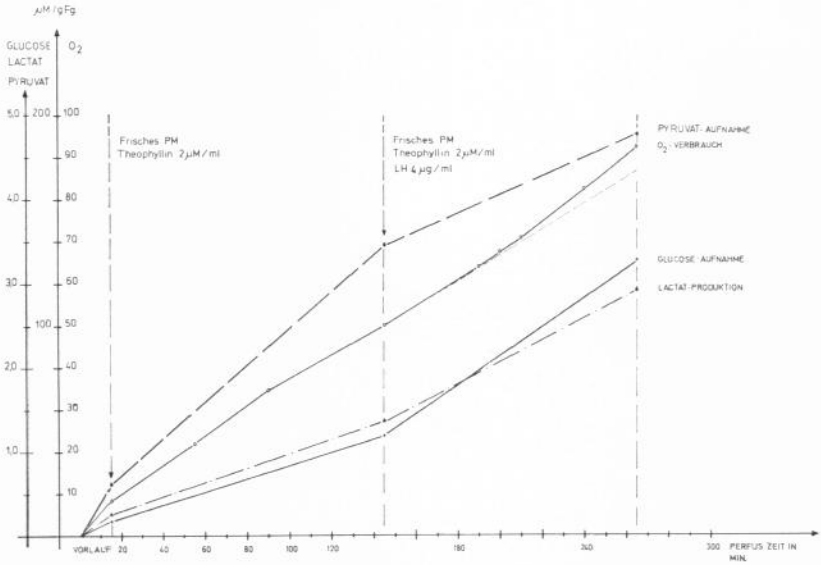

Abb. 3. O_2-Verbrauch, Glucose- und Pyruvataufnahme, sowie Lactatproduktion eines menschlichen Ovars mit Graafschem Follikel während einer mehrstündigen in vitro-Perfusion und nach Stimulation mit LH—NIH—S_{12}. Gewicht 4,3 g, Alter 44 Jahre. Zuvor regelmäßig menstruiert

keine Änderung und lief fast linear weiter. Insgesamt war aber bei dem Ovar die Glucoseaufnahme und der Pyruvatverbrauch niedriger und die Lactatproduktion höher als bei allen anderen Perfusionen. Die Messungen weisen also darauf hin, daß bei stark diabetischer Stoffwechsellage der Ovarmetabolismus mitgestört sein kann.

Bei unseren bisherigen Perfusionsversuchen fiel auf, daß mit zunehmendem Alter der Ovarien auch ein Rückgang der Sauerstoffaufnahme, verbunden mit einer Steigerung der Glucoseaufnahme und Lactatproduktion, zu beobachten war. Dies entspricht einer Umschaltung des Stoffwechsels in Richtung anaerober Glykolyse, als sichtbarer Ausdruck der Reduzierung des generativen Stoffwechsels parallel der Alterung.

Die Ergebnisse in Tabelle 1 weisen im Vergleich zu den Werten, die wir nach 3stündiger Perfusion ohne LH-Stimulation erhielten [58], einige Besonderheiten auf. Wir fanden hier im Gewebe nach LH einen höheren Glucosegehalt, wohl als Folge einer gesteigerten Glucoseaufnahme aus dem PM und eines vermehrten Glykogenabbaus über die Aktivierung der Phosphorylase [6, 19, 33, 55, 52]. Auch der recht niedrige Glykogengehalt im Gewebe spricht dafür.

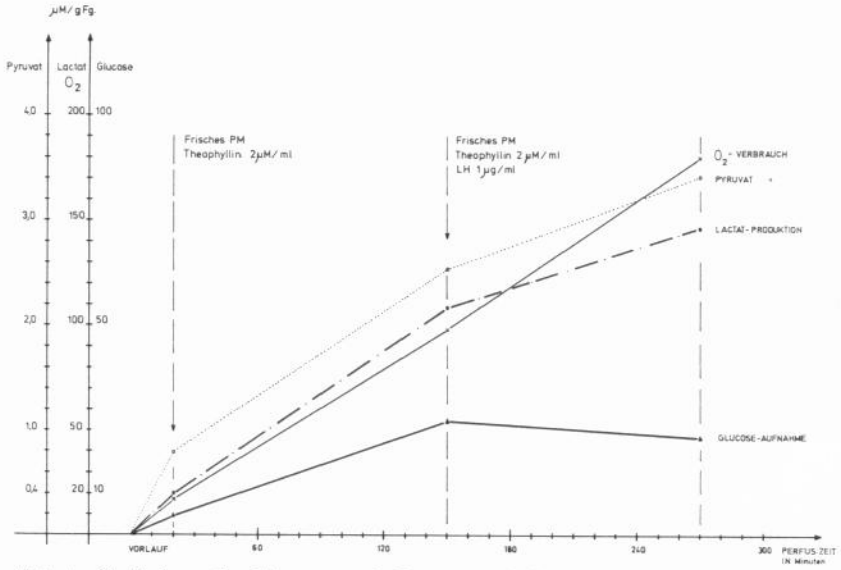

Abb. 4. O_2-Verbrauch, Glucose- und Pyruvataufnahme, sowie Lactatproduktion eines menschlichen Ovars mit Graafschem Follikel während einer mehrstündigen in vitro-Perfusion und nach Stimulation mit LH—NIH—S_{12}. Gewicht 3,8 g, Alter 47 Jahre. Diabetes mellitus eingestellt auf 60 E Alt-Insulin/Tag. Zuvor etwas acyclische Regelblutungen

Tabelle 1. Metabolischer Status im Ovargewebe nach Perfusionsschluß. Gefrierstopp des Gewebes in flüssigem N_2. Zuvor Entnahme einer Gewebeprobe zur Enzymbestimmung, dann Aufarbeitung wie angegeben

Substrat µM/g Fg	1 µg LH—NIH—S_{12} $\bar{x} \pm$, $N = 6$	4 µg LH—NIH—S_{12} $\bar{x} = 1$	Diabetes mellitus 60 E Alt-Insulin/Tag 1 µg LH—NIH—S_{12} $\bar{x} = 1$
Glucose	5,42 ± 1,1	5,03	7,89
Lactat	6,2 ± 1,39	6,8	27,6
Pyruvat	0,198 ± 0,04	0,205	0,190
L/P	31,3	33,2	138,0
ATP	1,80 ± 0,30	1,79	1,68
ADP	0,895 ± 0,16	0,92	0,46
ATP/ADP	2,0	1,95	3,6
Glykogen (Glycosyl-E)	37,6 ± 10,1	23,3	18,4
Enzyme µM/min/g			
G-6-PDH	2,9 ± 0,56	—	1,5
GOT	14,6 ± 3,0	—	—
GPT	2,08 ± 0,38	—	—

Der Pyruvatgehalt im Gewebe ist dagegen auch erhöht, ein Befund, der schon am präpubertalen Rattenovar beobachtet werden konnte [2, 7], wenn auch die Änderungen dort wohl infolge einer wesentlich höheren LH-Dosis ausgeprägter waren. ATP-Gehalt und ATP/ADP-Quotient weisen eine absteigende Tendenz auf, wovon bekannt ist, daß unter LH der ATP-Gehalt abfällt [2, 7]. Dies wiederum hat wahrscheinlich eine Aktivierung der Phospho-Fructokinase zur Folge [7, 29, 32]. Der Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten auf 31,3 im Gewebe weist einerseits auf die erhöhte glykolytische Aktivität nach LH, andererseits aber auch darauf hin, daß bei noch längeren Perfusionszeiten bald die Grenzen einer hämoglobin- und erythrocytenfreien Durchströmung erreicht sind. Die Aktivitäten der GOT, GPT und G-6-PDH im Gewebe nach der Perfusion liegen etwa in der gleichen Größenordnung wie von anderen Autoren angegeben. Rattenovar: GOT 19,9—, GPT 0,3—, G-6-PDH 3,4 μM Substrat/min/g [46]. Corpus luteum (Mensch): G-6-PDH 7,9 μM Substrat/min/g [30]. Rattenovar: G-6-PDH 80,0— [38], 6,2 bis 8,5 [63], bei hypophysektomierten Ratten 1,0 μM Substrat/min/g [63].

Zur Kontrolle des Enzymaustrittes in das PM, als Parameter einer möglichen Gewebeschädigung, bestimmten wir die Aktivitäten der GOT und GPT nach jeder Perfusionsphase. Der Quotient GOT/GPT betrug nach dem Vorlauf 1,4 (7 mU/ml/5 mU/ml), nach der Kontrollphase 1,8 (10 mU/ml/5,5 mU/ml) und am Ende der Stimulationsphase 4,3 (22 mU/ml/5,1 mU/ml). Daraus errechnet sich für die 5stündige Perfusion ein absoluter Enzymverlust des Gewebes an das Medium von 0,395 U/g für die GOT und 0,163 U/g für die GPT. Der intracelluläre Enzymverlust liegt damit bei der GOT um —2,5% und bei der GPT um 7,3%. Die Ergebnisse der Metabolitbestimmungen im diabetischen Ovar weisen auf ein im Verhältnis zu den „normalen Ovarien" unterschiedliches Verhalten hin. Auffallend sind der hohe Glucosegehalt und der stark angestiegene Lactat/Pyruvat-Quotient, was mit einer niedrigen Glykogen und ATP-Konzentration einhergeht. Dieser Befund weist darauf hin, daß beim Diabetes mellitus der Ovarstoffwechsel mitgestört oder zumindest so beeinträchtigt ist, daß der Perfusionsstreß ohne Insulin die metabolische Aktivität stark reduziert. Ob die Glykogensynthese herabgesetzt ist und auch hier, wie in der Leber, eine Blockierung des Glucosetransportes durch die Zellmembran und eine Einschränkung der Atmungskettenphosphorylierung tatsächlich vorliegt, müßte einmal zusätzlich genauer untersucht werden.

Diskussion

Ziel der Untersuchung war es, das Verhalten wichtiger Parameter des ovariellen Energiestoffwechsels unter einer LH-Stimulation am Modell der isolierten in vitro-Perfusion zu überprüfen. Dabei wurde in Fortführung früherer Experimente [57, 58] die Perfusionszeit auf 5 Std aus-

gedehnt, um zugleich die Grenzen einer erythrocytenfreien Durchströmung zu studieren.

Aus der Kenntnis, daß spezifische Stoffwechselleistungen von der Intaktheit des Energiestoffwechsels limitiert werden [56] und daß nach anaerober Präinkubation von Ovarien nachfolgend die Progesteronsyntheseleistung von Gewebeschnitten deutlich herabgesetzt ist [10], lag uns daran, eine Methode mit möglichst standardisierbaren Bedingungen wie z.B. Zusammensetzung des PM, Durchflußgeschwindigkeit, Perfusionsdruck, Temperatur etc. zu entwickeln, die es außerdem erlaubt, Meßgrößen, die für das Funktionieren des Organstoffwechsels repräsentativ sind, kontinuierlich zu überwachen und zu registrieren. Wie wichtig die Konstanz von Temperatur und Durchflußgeschwindigkeit ist, zeigten Untersuchungen am autotransplantierten Ovar, wo die Änderung der Temperatur auch eine Änderung des Blutdurchflusses und der Progesteronsekretion bewirkte [35]. An perfundierten Hoden und Rinderovarien konnte eine Korrelation zwischen der Durchflußgeschwindigkeit und der Glucoseaufnahme festgestellt werden [59, 60]. Bei der Überwachung des Organs scheinen Daten wie Sauerstoffverbrauch, pH-Wert und Perfusionsdruck, der auf Anoxie und Änderung der Wasserstoffionenkonzentration auch empfindlich reagierte, von besonderer Aussagekraft zu sein. Wir haben dem PM zum Teil Theophyllin zugesetzt, von dem bekannt ist, daß es außer einer Vasodilatation eine Hemmung der Phosphodiesterase bewirkt [20]. 5—10 min nach dem Zusatz kam es zu einem Druckabfall, den wir als Ausdruck einer besseren Gewebedurchströmung auffaßten. Die Angaben über den Blutdurchfluß und eine ausreichende Durchströmung von Ovarien bei der Perfusion differieren je nach Technik deutlich: Schafsovar 0,2—0,4 ml/min/g [54], 3,4—6,6 ml/min/g je nach Cyclusphase [34], Schweineovar 0,5—0,6 ml/min/g [48], menschliches Ovar — in vitro Perfusion 10—20 ml/min/Ovar [41], 7—10 ml/min/Ovar [13], —2 ml/min/g [58], Kaninchenovar — in vitro Perfusion 0,3—0,5 ml/min/g [4]. Um den kritischen pO_2 im Gewebe nicht zu unterschreiten, muß die Durchströmungsgeschwindigkeit sich danach richten, ob mit Vollblut oder mit einem erythrocytenfreien PM perfundiert wird. Auch arterio-venöse Shunts, die im Ovar bekannt sind, können Ursache für eine erhöhte Durchströmungsgeschwindigkeit sein. Der von uns ermittelte Wert von etwa 2 ml/min/g beruht darauf, daß hierbei der pH-Wert nicht absank und der Lactat/Pyruvatquotient im Gewebe nach der Perfusion noch in einem physiologischen Bereich lag.

Die Ergebnisse bestätigen die Möglichkeit, Ovarien mit einem erythrocyten- und hämoglobinfreien Medium über 5 Std am Leben zu erhalten, wenn auch der Anstieg des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Gewebe von 19,0 nach 3 Std Perfusion [58] auf 31,3 nach 5 Std zu erkennen gibt, daß wesentlich längere Durchströmungszeiten, wie sie

z. B. für eine in vitro-Ovulation wohl nötig sind, besser mit einem erythrocytenhaltigen PM erreicht werden können. Wichtig ist es, die Phase der „warmen Ischämie", die bei diesen Versuchen nur ein paar Sekunden dauerte, möglichst kurz zu halten, denn sie kann Ursache sein für Störungen und Schwankungen im Bereich der Steroidsekretion, wie sie bei der Perfusion von Rinderovarien nach 40minütiger „warmer Ischämie" gefunden wurden [39]. Zum anderen wird die Vorlaufphase zur Revitalisierung und Reoxygenierung des Organs sehr verlängert und kann bis zu 2 Std betragen [15]. Die von uns überprüften Parameter erlauben eine Beurteilung, wann die restitutio abgeschlossen ist und wann ein unphysiologischer Zustand wieder eintritt. Wie wir in einer früheren Untersuchung schon zeigen konnten [58], beginnt nach einer fast ausschließlich „kalten Ischämie" von 10—15 min erst nach ca. 20 min ein steady-state bei den von uns bestimmten Parametern, der sich auch in einer Normalisierung des pH-Wertes und des Perfusionsdruckes widerspiegelte. Als Kriterium der Intaktheit des Gewebes nach Perfusionsschluß wurde in früheren Untersuchungen nur das „normale histologische Bild" [18] sowie „growth and tissue repair" verwandt [62], Kriterien, die zu einer Funktionsdiagnostik des Stoffwechsels nicht ganz ausreichen. In neueren Arbeiten wurden Enzyme bestimmt, die auf eine Hypoxie empfindlich reagieren, wie z. B. die 3β-OH-Steroid-dehydrogenase (histochemisch) [41] und die Aktivität der Phosphorylase a und b, die in der Hypoxie eine Verschiebung zugunsten der a-Form erfährt [4]. Die von uns bisher gewählte Methode der Überprüfung des metabolischen Status nach Perfusionsschluß erlaubt über die Lactat/Pyruvat- und ATP/ADP-Quotienten, die, wie man von der Leberperfusion her weiß, empfindliche Hypoxieparameter sind [56], eine gute Aussage über die Intaktheit des Gewebes. Eine elektronenmikroskopische Kontrolle der morphologischen Situation wäre zur Ergänzung noch notwendig.

Daß der von uns beobachtete Effekt von LH auf die Parameter des Energiestoffwechsels nicht nur ein scheinbarer war und möglicherweise durch eine schleichende Hypoxie des Gewebes hervorgerufen wurde, schließen wir daraus, daß die O_2-Aufnahme während der Stimulationsphase mit LH leicht zunahm, eine ausreichende Oxygenierung also gewährleistet sein mußte. Und die Pyruvataufnahme, die während der Reoxygenierung des Organs, einer Phase mit O_2-Mangel, immer besonders groß war [57, 58], nahm während der Stimulation mit LH eindeutig ab. Als drittes Kriterium spricht der metabolische Status im Gewebe nach Perfusionsschluß (Tabelle 1) nicht für eine ausgedehnte, hypoxiebedingte Acidose mit einer übermäßigen Steigerung der Glykolyse.

Die Dauer der LH-Einwirkung auf das Ovar war mit 2 Std relativ kurz. Es liegen jedoch Untersuchungen vor, die für eine sehr rasche Einflußnahme von LH auf den Stoffwechsel sprechen. Der Ascorbinsäure-

gehalt des Ovars sinkt nach LH schnell ab [14, 25, 51] und kann bereits nach $^1/_1$—2—4 Std nur noch 30—40% seines Ausgangswertes betragen [51]. Kleine Mengen von Ascorbinsäure aktivieren bei Redoxvorgängen in Mitochondrien schon die NADH-Dehydrierung unter Beschleunigung des O_2-Verbrauches [28]. Auch die Glykogenkonzentration fällt unter LH in kurzer Zeit ab [24], während die Glucosekonzentration schon nach 30 min im Rattenovar zunimmt [11]. Dies sind Befunde, die mit unseren Ergebnissen durchaus im Einklang stehen (Tabelle 1), wenn man sie auch mit den Werten vergleicht, die wir nach 3 Std Perfusion ohne LH erhoben haben [58]. Beim Kaninchen sind bereits 9 Std nach der LH-Gabe morphologische Veränderungen gut nachweisbar: Bildung von RNA-Granula und glattem Endoplasmatischem Reticulum [17]. Nach 12 Std ist der Follikel schon gesprungen. Diese enormen Zelldifferenzierungsvorgänge sind erst die Folge eines zuvor aktivierten Stoffwechsels. Die Zunahme der glykolytischen Aktivität unter LH, wie sie schon in früheren Arbeiten an Rattenovarien festgestellt wurde [11, 12], spiegelt sich auch in unseren Versuchen in einer erhöhten Lactatproduktion und Glucoseaufnahme wieder. Die signifikante Reduzierung der Pyruvataufnahme aus dem PM liegt wohl daran, daß durch die vermehrte Aufnahme und Metabolisierung von Glucose über den Embden-Meyerhof-Weg mehr Pyruvat im Gewebe anfällt, was sich auch in der erhöhten Pyruvat-Gewebekonzentration zeigt (Tabelle 1) [2, 7]. Pyruvat wird dann einerseits zu Lactat hydriert, andererseits zu Acetyl-Coenzym A decarboxyliert, das Ausgangssubstrat für die Cholesterin- und Steroidsynthese ist.

Ob die erhöhte Lactatproduktion und Glucoseaufnahme auch im Zusammenhang steht mit einer lokalen oder generalisierten Ischämie mit anschließender Gewebenekrose, wie sie als ein Faktor zur Ovulation diskutiert wird [40], oder ob alle diese Befunde nur die Folge einer Umschaltung des gesamten Stoffwechsels sind, wofür einiges mehr spricht, kann bisher noch nicht eindeutig beantwortet werden.

Die Bestimmung des intracellulären Enzymverlustes an das PM zeigt, daß vorwiegend die GPT (−7,3%), ein rein cytoplasmatisches Enzym, dem Gewebe verloren geht, während der Verlust der GOT, eines sowohl mitochondrialen als auch cytoplasmatischen Enzyms, mit −2,5% wesentlich geringer war. Der Befund spricht für eine geringe Schädigung der Mitochondrien, in denen der energieliefernde Stoffwechsel abläuft.

Literatur

1. Ahren, K., Kostyo, J. L.: Acute effects of pituitary gonadotrophins on the metabolism of isolated rat ovaries. Endocrinology **73**, 81—91 (1963).
2. Ahren, K., Beviz, A., Hamberger, L., Lundholm, L.: Mechanism for the action of LH on the carbohydrate metabolism of the prepubertal rat ovary. Acta physiol. scand. **73**, 23A—24A (1968).

3. Ahren, K., Hamberger, A. C., Hamberger, L. A.: Action of luteinizing hormone in vitro on respiratory enzyme activity of isolated granulosa cells. Endocrinology **77**, 332—336 (1965).
4. Ahren, K., Janson, P. O., Selstam, G.: Perfusion of ovaries in vitro and in vivo. Karolinska Symposia on Research methods in reproductive endocrinology. 4. Symposium. Perfusion techniques. 11.—13. 10. 71, S. 285 (1971).
5. Ahren, K., Hamberger, L., Perklev, T.: Effects of human menopausal gonadotrophin and ovine follicle stimulatory hormone on lactic acid production by ovaries from prepubertal rats. Endocrinology **82**, 420—422 (1968).
6. Ahren, K., Selstam, G.: Hormonal regulation of ovarian phosphorylase activity (rat: incl. LH, FSH). Acta physiol. scand. **82**, 31 A—32 A (1971).
7. Ahren, K., Hamberger, L., Rubinstein, L.: Acute in vivo and in vitro effects of gonadotrophins on the metabolism of the rat ovary. In: The Gonads (K. W. McKerns, ed.), p. 327—354. North-Holland-Publishing-Company, Appleton-Century-Crofts 1969.
8. Armstrong, D. T., Greep, R. O.: Effect of gonadotrophic hormones on glucose metabolism by luteinized rat ovaries. Endocrinology **70**, 701–710 (1962).
9. Armstrong, D. T., Kilpatrick, R., Greep, R. O.: In vitro and in vivo stimulation of glycolysis in prepubertal rat ovary by luteinizing hormone. Endocrinology **73**, 165—169 (1963).
10. Armstrong, D. T., Black, D. L.: Influence of luteinizing hormone on corpus luteum metabolism and progesterone biosynthesis throughout the bovine estrous cycle. Endocrinology **78**, 937 (1966).
11. Armstrong, D. T.: Stimulation of glycolytic activity of rat corpus luteum tissue by luteinizing hormone. Endocrinology **72**, 908 (1963).
12. Armstrong, D. T.: Effects of LH on glucose metabolism by rat ovarian tissue. Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol. **21**, 197 (1962).
13. Baggish, M. S., Strummer, D., Nair, P. P., Frank, J.: Human ovary under isolated perfusion: A model system. Obstet. Gynec. **38**, 463—471 (1971).
14. Baird, J., Wolf, R., Rennels, E.: Effects of pituitary removal or transplantation on ovarian ascorbic acid depletion in the rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **106**, 362 (1961).
15. Bartosik, D. B., Romanoff, E. B.: The luteotrophic process: Effects of prolactin and LH on sterol and progesterone metabolism in bovine luteal ovaries perfused in vitro. In: The Gonads (K. W. McKerns, ed.). North-Holland-Publishing-Company, Appleton-Century-Crofts 1969.
16. Bartosik, D. B., Romanoff, E. B.: Luteotrophic effects of prolactin in the bovine ovary. Endocrinology **81**, 186 (1967).
17. Blanchette, E. J.: Ovarian steroid cells I. Differentiation of lutein cells from the granulosa follicle cell during the preovulatory stage and under the influence of exogenous gonadotrophins. J. Cell Biol. **31**, 501 (1966).
18. Carrel, A., Lindbergh, C. A.: In: The culture of the organs, p. 1. London: Hamish Hamilton Medical books 1938.
19. Channing, C. P., Ville, C. A.: Effects on uptake and metabolism of hexoses by luteinized rat ovaries. Biochem. biophys. Acta (Amst.) **115**, 205—218 (1966).
20. Dorrington, J. H., Kilpatrick, R.: Effect of adenosine 3,5-cyclic monophosphate on the synthesis of progestational steroids by rabbit ovarian tissue in vitro-Biochem. J. **104**, 725—730 (1967).
21. Engels, J. A., Friedländer, R. L., Eik-Nes, K. B.: An effect in vivo of clomiphene on the rate of conversion of androstendione-C^{14} to estrone-C^{14} and estradiol-C^{14} by the canine ovary. Metabolism **17**, 189 (1968).

22. Hamberger, L., Ahren, K.: Effects of gonadotrophins in vitro on glucose uptake and lactic acid production of ovaries from prepubertal and hypophysectomized rats. Endocrinology **81**, 93—100 (1967).
23. Hamberger, L., Ahren, K.: Action of gonadotrophins on respiratory enzyme activity of isolated ovarian cells from the rat. Acta endocr. (Kbh.) **56**, Suppl. 119, 113 (1967).
24. Hökfelt, B.: Acta physiol. scand. **22**, 231 (1951).
25. Karg, H.: Ascorbinsäuredynamik im Ovar als Gonadotropinnachweis. Klin. Wschr. **35**, 643 (1957).
26. Keppler, D., Decker, K.: Glycogen, Bestimmung mit Amyloglucosidase. Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer), S. 1089. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie 1970.
27. Kidwell, W., Balough, K., Jr., Wiest, W. G.: Effects of luteinizing hormones on glucose-6-phosphat- and 20αHydroxysteroid-dehydrogenase activities in superovulated rat ovaries. Endocrinology **79**, 352—361 (1966).
28. Kirsch, K., Staudinger, H.: Zur Wirkung von Ascorbinsäure und Cytochrom b_5 auf die mikrosomale DPNH-oxydation. Biochem. Z. **331**, 195 (1959).
29. Lowry, O. H.: Phosphofructokinase. In: Energy metabolism (Chance, B., Estabrook, R. W., Williamson, J., eds.), p. 63—64. New York: Academic press 1965.
30. Luh, W., Brandau, H.: Enzymologische Untersuchungen am corpus luteum graviditatis des Menschen. Z. Geburtsh. Gynäk. **162**, 294 (1964).
31. Löhr, G. W., Waller, H. D.: Glucose-6-Phosphatdehydrogenase. Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I (H. U. Bergmeyer), S. 599. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970.
32. Mansour, T. E.: Factors influencing activation of phosphofructokinase. Pharmacol. Rev. **18**, 173—179 (1966).
33. Marsch, J., Savard, K.: The activation of luteal phosphorylase by LH. J. biol. Chem. **239**, 1—7 (1964).
34. Mattner, P. E., Thorburn, G. D.: Ovarian bloodflow in sheep during the estrous cycle. J. Reprod. Fertil. **19**, 547 (1969).
35. McCracken, J. A., Baird, D. T., Goding, J. R.: Factors effecting the secretion of steroids from the transplanted ovary in the sheep. Recent Progr. Hormone Res. **27**, 537 (1971).
36. McKerns, K. W., Criss, M., Criss, W. E.: Gonadotropin regulation of dehydrogenase enzymes in the ovary of squalus acanthias. Bull. Mount Desert Island Biological Laboratory, Salisbury Cove, Maine **7**, 29—32 (1968).
37. McKerns, K. W.: Studies on the regulation of ovarian function by gonadotrophins. In: The Gonads (K. W. McKerns, ed.), p. 137—173. North-Holland-Publishing-Company, Appleton-Century-Crofts 1969.
38. McKerns, K. W.: Gonadotropin regulation of the activities of dehydrogenase enzymes of the ovary. Biochem. biophys. Acta (Amst.) **97**, 542—550 (1965).
39. Mills, R. C., Morisette, M. C.: Progesterone synthesis by perfused bovine ovaries of early and late pregnancy. J. Reprod. Fertil. **22**, 435 (1970).
40. Nalbandov, A.: Control of ovulation (C. Villee). New York: Pergamon Press 1961.
41. Nakajama, T., Arai, K., Nagatomi, K., Satoh, K., Tabei, T., Yanaihara, T., Fujita, Y.: Biogenesis of estrogens by the perfused human ovary I. Conversion of progesterone-C^{14} and androstendione C^{14} to estradiol-17β. Endocr. Jap. **14**, 259 (1967).
42. Palti, Z., Freund, M.: Spontaneous contractions of the human ovary in vitro. J. Reprod. Fertil. **28**, 113—115 (1972).
43. Pathwardhan, V. V., Romanoff, E. B.: Aromatization in vitro of neutral steroids by bovine ovaries. J. Endocr. **41**, 461—470 (1968).

44. Perklev, T., Berglund, H. B., Ahren, K.: Effect of HCG, LH and Anti-HCG-serum on the lactic acid production of the prepubertal rat ovary. Acta endocr. (Kbh.) **68**, 31—40 (1971).
45. Rado, A., McCracken, J. A., Baird, D. T.: The formation of estrogens by the autotransplanted ovary of the ewe perfused in vivo with C^{19}-steroids. Acta endocr. (Kbh.) **65**, 244 (1970).
46. Raig, H., Brandau, H., Luh, W.: Enzymaktivitäten im Ovar androgensterilisierter und normaler weiblicher Ratten. Arch. Gynäk. **206**, 154—180 (1968).
47. Randl, P. J.: Endocrine controle of metabolism. Ann. Rev. Physiol. **25**, 291—324 (1963).
48. Rathemacher, R. P., Anderson, L. L.: Bloodflow and progesterone levels in the ovary of cycling and pregnant pigs. Amer. J. Physiol. **214**, 1014 (1968).
49. Romanoff, E. B.: Steroidogenesis in the perfused bovine ovary. J. Reprod. Fertil., Suppl. **1**, 89—99 (1966).
50. Romanoff, E. B., Pincus, G.: Studies on the isolated perfused ovary: methods and examples of application (cows). Endocrinology **71**, 752 (1962).
51. Seidelmann, J.: Methodik und klinische Anwendung des Ovar-Ascorbinsäuretestes zur Beurteilung von LH-Aktivität. Dissertation Marburg/Lahn. Fachbereich Humanmedizin (1969).
52. Selstam, G., Ahren, K.: Effects of gonadotrophins on ovarian phosphorylase activity (rat). Acta endocr. (Kbh.) **67**, Suppl. 155, 55 (1971).
53. Scholz, R.: In: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber (W. Staib, R. Scholz, eds.), S. 40 u. 29. Konferenz der Ges. f. Biol. Chem. vom 27.—29. 4. 67 in Oestrich/Rheingau. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
54. Setchell, B. P.: In: The Gonads (K. W. McKerns, ed.), chap. 7, p. 203 (discussion). New York: North-Holland-Publishing-Company, Appleton-Century-Crofts 1969.
55. Stansfield, D. A., Robinson, J. W.: Glycogen and phosphorylase in bovine and rat corpora lutea and the effect of LH. Endocrinology **76**, 390—395 (1965).
56. Staib, W., Scholz, R.: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. 3. Konferenz d. Ges. f. Biol. Chem. vom 27.—29. 4. 67 in Oestrich/Rheingau. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
57. Stähler, E., Huch, A.: Untersuchungen an isoliert perfundierten Ovarien des Rindes. Arch. Gynäk. **211**, 527 (1971).
58. Stähler, E., Buchholz, R., Huch, A.: Untersuchungen über den Energiestoffwechsel in isoliert perfundierten Ovarien des Menschen. Arch. Gynäk. **211**, 576 (1971).
59. Stähler, E., Spätling, L., Bethge, H. D.: In Vorbereitung.
60. Van Demark, N. L., Ewing, L. L.: Factors effecting testicular metabolism and function. I. A simplified perfusion technique for short term maintenance of rabbit testis. J. Reprod. Fertil. **6**, 1—8 (1962).
61. Werthessen, N. T., Schwenke, E., Baker, C.: Biosynthesis of estrone and estradiol in the perfused ovary. Science **117**, 380—381 (1953).
62. Werthessen, N. T.: Endocrinology **44**, 109 (1949).
63. Wiest, W., Kidwell, W. R.: The regulation of progesterone secretion by ovarian dehydrogenases. In: The Gonads (K. W. McKerns, ed.). New York: North-Holland-Publishing-Company, Appleton Century Crofts 1969.

Dr. med. E. Stähler
Dpt. of Obstet. Gynec.
D-3550 Marburg a. d. Lahn
Pilgrimstein 3
Bundesrepublik Deutschland