

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Zusammensetzung des Sediments von wiederholten standardisier-
ten Spülungen von Uteri der Stute mit besonderer Berücksichtigung
der Vitalität der dabei gewonnenen Epithelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
-Doctor medicinae veterinariae-
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mariana Ingrid Peer
Tierärztin aus Ludwigsburg

Berlin 2014

Journal-Nr: 3705

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopfleisch
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Peter-Henning Clausen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): Mares, uterus, flushing, endometrium, cells

Tag der Promotion: 28. April 2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-485-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinem Vater,
Gregory Victor Peer
(in memoriam)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Literaturübersicht | 2 |
| 2.1 | Anatomie und Physiologie von Uterus und Endometrium | 2 |
| 2.1.1 | Uterus | 2 |
| 2.1.2 | Endometrium | 3 |
| 2.2 | Pathologie von Uterus und Endometrium | 5 |
| 2.2.1 | Uterus | 5 |
| 2.2.2 | Endometrium | 9 |
| 2.3 | Diagnostik von Uterus und Endometrium | 13 |
| 2.3.1 | transrektale Palpation | 13 |
| 2.3.2 | transrektale Sonographie | 14 |
| 2.3.3 | Hysteroskopie | 16 |
| 2.3.4 | Endometriumzytologie | 17 |
| 2.3.5 | Endometriumbiopsie | 20 |
| 2.4 | Vitalitätsbeurteilung von Zellen | 25 |
| 3. | Material und Methoden | 27 |
| 3.1 | Versuchsaufbau | 27 |
| 3.2 | Probengewinnung und –aufbereitung | 27 |
| 3.2.1 | Vorbereitung | 27 |
| 3.2.2 | Uterusspülung | 29 |
| 3.3 | Zytologie | 33 |
| 3.3.1 | Zelldichte | 33 |
| 3.3.2 | Lebend-Tot-Analyse | 36 |
| 3.3.3 | Diff-Quick-Färbung | 39 |
| 3.3.4 | May-Grünwald-Giemsa-Färbung | 45 |
| 3.3.5 | PAP-Quick-Färbung | 45 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.6 | GramFärbung | 45 |
| 3.4 | Immunhistologische Färbung der aktiven Caspase-3 | 46 |
| 3.4.1 | Herstellung der Schnittpräparate | 46 |
| 3.4.2 | Prüfung der Primärantikörper | 47 |
| 3.4.3 | Immunhistochemische Färbung mit dem Vectastain® Elite® ABC-Kit | 48 |
| 4. | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | Uteri | 50 |
| 4.1.1 | Größe | 50 |
| 4.1.2 | Schleimhautoberfläche | 50 |
| 4.2 | Ovarien | 50 |
| 4.2.1 | Größe | 50 |
| 4.2.2 | Funktionsgebilde | 50 |
| 4.3 | Uterusspülung | 51 |
| 4.3.1 | Rückgewinnungsvolumen | 51 |
| 4.3.2 | Konsistenz der Spülflüssigkeit | 53 |
| 4.3.3 | Zeitintervalle | 55 |
| 4.3.4 | Osmolalität | 56 |
| 4.4 | Zellgehalt der Spüllösung | 56 |
| 4.4.1 | Epithelzellen | 56 |
| 4.4.2 | Blutzellen | 58 |
| 4.5 | Vitalität der Epithelzellen | 60 |
| 4.5.1 | Beurteilung unter Trypanblaufärbung | 60 |
| 4.5.2 | aktivierte Caspase-3 | 62 |
| 4.6 | Zytologie des Spülsediments | 64 |
| 4.6.1 | Diff-Quick-Färbung | 64 |
| 4.6.2 | May-Grünwald-Giemsa-Färbung | 70 |
| 4.6.3 | PAP-Quick-Färbung | 74 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.6.4 | Gram-Färbung | 79 |
| 5. | Diskussion | 80 |
| 5.1 | Ziel der Arbeit | 80 |
| 5.2 | Uterusspülung | 80 |
| 5.2.1 | Rückgewinnungsrate | 80 |
| 5.2.2 | Trübung | 82 |
| 5.2.3 | Zeitintervalle | 83 |
| 5.3 | Zellgehalt der rückgewonnenen Spülflüssigkeit | 83 |
| 5.4 | Vitalität der Epithelzellen | 85 |
| 5.4.1 | Apoptose | 86 |
| 5.5 | Analyse des Spülsediments | 89 |
| 5.5.1 | Qualität der Ausstriche | 89 |
| 5.5.2 | Zusammensetzung des Spülsediments | 91 |
| 5.6 | Conclusio | 95 |
| 6. | Zusammenfassung | 96 |
| 7. | Summary | 98 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 100 |
| | Danksagung | 110 |
| | Erklärung | 111 |

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µl | Microliter |
| µm | Micrometer |
| Abb. | Abbildung |
| BSA | bovines Serum Albumin |
| BZ | Blutzellen |
| bzw. | beziehungsweise |
| C 0 | Konzentration 0 |
| C 1 | Konzentration 1 |
| cm | Zentimeter |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| et al. | et alii |
| EZ | Epithelzellen |
| frEZ | fragliche Epithelzellen |
| g | Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| KF | Konzentrationsfaktor |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mm | Millimeter |
| mm Hg | Millimeter Quecksilbersäule |
| mm ³ | Kubikmillimeter |
| m-RNA | messenger-Ribonukleinsäure |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|---|
| MW | Mittelwert |
| n | Probenzahl |
| ng | Nanogramm |
| Ö | Östrus |
| p | Signifikanzwert |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| pH | pH-Wert |
| PMN | polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| SA | Standardabweichung |
| Tab. | Tabelle |
| tEZ | tote Epithelzellen |
| vEZ | vitale Epithelzellen |
| VF | Verdünnungsfaktor |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZK | Zellkern |
| ZP | Zytoplasma |

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| Abb. 1 | Vermessung von Uterus und Ovarien |
| Abb. 2 | Formel zur Errechnung der endometrialen Oberfläche |
| Abb. 3 | Uterus-Spülvorrichtung |
| Abb. 4 | modifizierter Ballonkatheter |
| Abb. 5 | Schutz vor Flüssigkeitsaustritt, Zervix |
| Abb. 6 | Uterus in Spülvorrichtung |
| Abb. 7 | vitale Epithelzellen, 200fache Vergrößerung, Trypanblaufärbung |
| Abb. 8 | vitale und avitale Epithelzelle gemeinsam in einem Bildausschnitt, 200fache Vergrößerung, Trypanblaufärbung |
| Abb. 9 | avitale Epithelzelle, 200fache Vergrößerung, Trypanblaufärbung |
| Abb. 10 | Typ 1 |
| Abb. 11 | Typ 2 |
| Abb. 12 | Typ 3 |
| Abb. 13 | Typ 4 |
| Abb. 14 | Typ 5 |
| Abb. 15 | Typ 6 |
| Abb. 16 | Typ 7 |
| Abb. 17 | Typ 8 |
| Abb. 18 | Typ 9 |
| Abb. 19 | Typ 10 |
| Abb. 20 | PMN |
| Abb. 21 | PMN |
| Abb. 22a | Detrituslevel -0 |
| Abb. 22b | Detrituslevel -0 |
| Abb. 23a | Detrituslevel -1 |
| Abb. 23b | Detrituslevel -1 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| Abb. 24a | Detrituslevel -2 |
| Abb. 24b | Detrituslevel -2 |
| Abb. 25a | Detrituslevel -3 |
| Abb. 25b | Detrituslevel -3 |
| Abb. 26 | aktive Caspase-3, Tonsillen, Mensch |
| Abb. 27 | aktive Caspase-3, Darm, Pferd |
| Abb. 28 | Volumina der Spülvorgänge 1 bis 3 in ml |
| Abb. 29 | Volumina der Spülvorgänge 1-3 in Prozent des Ausgangsvolumens |
| Abb. 30 | Konsistenz des Rückgewinnungsvolumen aller 90 Spülungen (Anteile in %) |
| Abb. 31 | Konsistenz des Rückgewinnungsvolumen Spülung 1-3 im Vergleich |
| Abb. 32 | Zeitintervalle Tod – Spülung – Zellzählung in Stunden |
| Abb. 33 | Epithelzellgehalt der Spülung 1-3 vergleichend |
| Abb. 34 | Blutzellgehalt der Spülung 1-3 vergleichend |
| Abb. 35 | Anteil der verschiedenen Zellgruppen innerhalb der Gesamtzahl an Epithelzellen |
| Abb. 36 | Anteil der aktivierten Caspase-3-positiven Zellen innerhalb der Gesamtepithelzellzahl |
| Abb. 37 | Bakterienvorkommen in Uterus 16, Spülung 1 (a) und 2 (b) |

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

| | |
|---------|---|
| Tab. 1 | Faktoren zur Resuspension und Trypanblaufärbung |
| Tab. 2 | Berechnung der Epithel- und Blutzellkonzentrationen |
| Tab. 3 | Berechnung der vitalen Epithelzellen |
| Tab. 4 | Lokalisationen der zytologischen Auswertung |
| Tab. 5 | Isolierte Strukturen in der Spülflüssigkeit |
| Tab. 6 | Produktinformation der Caspase-3 Antikörper |
| Tab. 7 | Rückgewinnungsvolumina der Spülvorgänge nach Instillation von 250 ml Ringer-Laktat-Lösung |
| Tab. 8 | Zusammenhang zwischen Rückgewinnungsvolumen und Zyklusstand |
| Tab. 9 | Konsistenz der rückgewonnenen Spülflüssigkeit aller 90 Spülungen |
| Tab. 10 | Konsistenz des Rückgewinnungsvolumen von Spülung 1 – 3 im Vergleich |
| Tab. 11 | Zeitintervalle |
| Tab. 12 | Epithelzellgehalt der Spülungen 1-3 pro μl Originalsubstrat in Zellen |
| Tab. 13 | Zusammenhang zwischen der Epithelzellzahl pro μl Originalsubstrat und dem Zyklusstand |
| Tab. 14 | Zusammenhang zwischen der Epithelzellzahl pro μl Originalsubstrat und der Oberfläche des Endometrium |
| Tab. 15 | Blutzellgehalt der Spülungen 1-3 pro μl Originalsubstrat in Zellen |
| Tab. 16 | Zusammenhang zwischen dem Blutzellgehalt pro μl Originalsubstrat und dem Zyklusstand |
| Tab. 17 | Anteile der verschiedenen Epithelzellgruppen in Prozent |
| Tab. 18 | Zusammenhang zwischen der Vitalität der gewonnenen Epithelzellen und dem Zyklusstand |
| Tab. 19 | Zusammenhang zwischen der Vitalität der erspülten Epithelzellen und der Chronologie der Spülungen 1-3 |
| Tab. 20 | Anteil der aktivierte Caspase-3-positiven Zellen in Prozent |
| Tab. 21 | Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von aktivierte Caspa- |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---------|---|
| | se-3 positiven Zellen und dem Zyklusstand |
| Tab. 22 | Qualität der Ausstriche – Intensität der Färbung – Diff-Quick |
| Tab. 23 | Qualität der Ausstriche – Abgrenzbarkeit der Objekte - Diff-Quick |
| Tab. 24 | Qualität der Ausstriche – Hintergrundfärbung – Diff-Quick |
| Tab. 25 | Qualität der Ausstriche – Färbeartefakte – Diff-Quick |
| Tab. 26 | Detritus – Diff-Quick |
| Tab. 27 | Durchschnittlich gezählte Anzahl isolierter Strukturen pro Objektträger – Diff-Quick |
| Tab. 28 | Durchschnittliche Anteile der verschiedenen Morphologietypen – Diff-Quick |
| Tab. 29 | Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Morphologietypen und dem Zyklusstadium – Diff-Quick |
| Tab. 30 | Zusammenhang zwischen dem Anteil der verschiedenen Morphologietypen und der Chronologie der Spülungen 1-3 – Diff-Quick |
| Tab. 31 | Qualität der Ausstriche – Intensität der Färbung – May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 32 | Qualität der Ausstriche – Abgrenzbarkeit der Objekte – May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 33 | Qualität der Ausstriche – Hintergrundfärbung - May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 34 | Qualität der Ausstriche – Färbeartefakte - May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 35 | Detritus - May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 36 | Durchschnittlich gezählte Anzahl isolierter Strukturen pro Objektträger - May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 37 | Durchschnittliche Anteile der verschiedenen Morphologietypen – May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 38 | Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Morphologietypen und dem Zyklusstadium - May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 39 | Zusammenhang zwischen dem Anteil der verschiedenen Morphologietypen und der Chronologie der Spülungen 1-3 – May-Grünwald-Giemsa |
| Tab. 40 | Qualität der Ausstriche – Intensität der Färbung – PAP-Quick |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---------|--|
| Tab. 41 | Qualität der Ausstriche – Abgrenzbarkeit der Objekte – PAP-Quick |
| Tab. 42 | Qualität der Ausstriche – Hintergrundfärbung - PAP-Quick |
| Tab. 43 | Qualität der Ausstriche – Färbeartefakte - PAP-Quick |
| Tab. 44 | Detritus - DiffQuick |
| Tab. 45 | Durchschnittliche Anzahl isolierter Strukturen pro Objektträger – PAP-Quick |
| Tab. 46 | Durchschnittliche Anteile der verschiedenen Morphologietypen – PAP-Quick |
| Tab. 47 | Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Morphologietypen und dem Zyklusstadium - PAP-Quick |
| Tab. 48 | Zusammenhang zwischen dem Anteil der verschiedenen Zelltypen und der Chronologie der Spülungen 1-3 – Diff-Quick |

Einleitung

1. Einleitung

Die Gebärmutterspülung der Stute ist ein Routineverfahren in der zytologischen Diagnostik von Uterus und Endometrium. Sie erreicht neben der Tupferprobenentnahme und der Zytologiebürstchen-Methode die größte Schleimhautoberfläche und gilt daher, als repräsentativere Methode. Zudem stellt die Uterusspülung mit geringem Volumen ein für den Patienten schonendes Verfahren mit geringer Invasivität dar.

Da sie sich in der Durchführung jedoch aufwändiger darstellt als die übrigen genannten Methoden, rangiert die Gebärmutterspülung für die Routinediagnostik momentan noch nicht auf dem selben klinischen und praktischen Stellenwert. Die Vorteile der höheren Erreichbarkeit von endometrialer Oberfläche, sowie die Unversehrtheit der im Spülsubstrat extrahierten Zellen veranlassen jedoch dazu, weitergehend zu analysieren, welche Informationen sich aus der rückgewonnenen Spülflüssigkeit in Erfahrung bringen lassen.

Gegenstand dieser Studie war es daher mit einem standardisierten Verfahren jeweils drei Reihenspülungen an 30 schlachtfrischen Uteri durchzuführen, um diese auf verschiedene grundlegende Faktoren zu untersuchen. Hauptgegenstand der Analyse waren unter anderem die Dichtemessung der rückgewonnenen Spülflüssigkeit auf den Gesamtgehalt an vorhandenen endometrialen Epithelzellen, sowie die Ermittlung des vitalen Anteils dieser Zellen. Der vitale Epithelzellanteil ist vor allem von Interesse für weiterführende m-RNA-Analysen zur Untersuchung der Genexpression im Uterus von Stuten.

Die Arbeit soll langfristig eine Basis an Daten bieten, um die klinische und labordiagnostische Spülflüssigkeitsanalyse im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung weiterzuentwickeln und um sinnvolle ergänzende Informationen zur reinen bakteriologischen und zytologischen Untersuchung von Uterus und Endometrium zu liefern.

2. Literaturübersicht

2.1 Anatomie und Physiologie von Uterus und Endometrium

2.1.1 Uterus

Die Gebärmutter der Stute ist ein Uterus bicornis, welcher als ein Hohlorgan in der peritonealen Beckenhöhle und der Bauchhöhle zu liegen kommt. Sie besteht aus dem kaudal lokalisierten Uterushals (Cervix uteri), dem nach kranial folgenden Uteruskörper (Corpus uteri) und den zwei abschließenden Uterushörnern (Cornua uteri). Auf Höhe des fünften Lendenwirbels, kaudal der Nieren befinden sich die Eierstöcke (Ovarien), welche durch den Eileiter mit den kranialen Uterushornspitzen verbunden sind. Die gesamte Struktur ist durch das breite Mutterband an der seitlichen Bauch- und Beckenwand fixiert.

Der Uterushals (Cervix uteri) befindet sich im kranialen Teil der Beckenhöhle und erstreckt sich auf etwa 7 cm Länge. Mit seiner derben bindegewebig-muskulären Wand funktioniert er im Diöstrus und in der Gravidität wie ein Schließmuskel, der das Uterusmilieu vor äußeren Einflüssen schützt. Die Begrenzung zum Scheidenvorhof (Vestibulum vaginae) stellt der äußere Muttermund (Ostium uteri externum) und die zum Uteruskörper der innere Muttermund (Ostium uteri internum) dar. Aufgrund seiner kräftigen Struktur ist er von rektal gut palpierbar.

Der Uteruskörper (Corpus uteri) hat bei nichttragenden Stuten eine Durchschnittslänge von etwa 25 cm und ragt in den hinteren Teil der Bauchhöhle. Er bildet vom inneren Muttermund bis zur Bifurkation ein trichterförmiges, geräumiges Lumen.

An der Bifurkation spalten sich die beiden Uterushörner (Cornua uteri) nach kranial vom Uteruskörper ab und kommen mit einer Durchschnittslänge von ebenfalls etwa 25 cm mit ihren Hornspitzen kaudal der Ovarien zu liegen. Sie verlaufen in kranio-ventralen Bögen, welche leicht nach dorsal und zur jeweils seitlichen Bauchwand gerichtet sind (König u. Probst, 2008; Leiser, 2004).

2.1.2 Endometrium

Betrachtet man die Uteruswand im Querschnitt, so zeichnet sie sich durch drei Hauptschichten aus. Die äußerste Schicht, das Perimetrium, stellt das innere Blatt des Bauchfells (Peritoneum viscerale) dar, von welchem alle Bauchhöhlenorgane umhüllt sind. In der Mitte liegt das Myometrium, eine glatte Muskelschicht, die aus einer äußeren Längs- und einer inneren Zirkulärschicht besteht. Zwischen diesen beiden wird eine bindegewebige Lage von Gefäßen durchzogen, das Stratum vasculare. Von innen wird der Uterus durch eine Schleimhaut, das Endometrium, ausgekleidet, welche zahlreiche glanduläre Drüsen enthält (Kenney, 1978; König u. Probst, 2008).

Während das Myometrium notwendig für alle Kontraktionsvorgänge der Gebärmutter ist, liegt eine der wichtigen Aufgaben des Endometriums darin, dem Embryo ein optimales Milieu zu bieten und ihn vor der Implantation mit ausreichend Nährstoffen (Uterinmilch bzw. Embryotrophe) zu versorgen. Die Gesundheit des Endometriums ist ein essentieller Aspekt für die Fertilität von Stuten (Hoffmann et al., 2008; Kenney, 1978).

Betrachtet man das Endometrium näher, so ist es in zwei Schichten unterteilt. Zum Lumen hin besteht es aus einem einfachen zylindrischen, teilweise kinozilientragenden Epithel, welches von einer Basalmembran und einer drüsenhaltigen Lamina propria unterlegt wird.

Die Lamina propria teilt sich in ein schmales Stratum compactum, welches subepithelial lokalisiert ist und ein breiteres Stratum spongiosum. Während das Stratum compactum eine hohe Dichte an spindelförmigen Stromazellen aufweist, sind im Stratum spongiosum vor allem Blut- und Lymphgefäße und die vielfach verzweigten Äste der Uterindrüsen eingebettet. Diese leiten sich von der inneren Epithelschicht des Endometriums ab und bahnen ihre Ausführungsgänge über das Stratum compactum ins Uteruslumen (Ginther, 1992; Kenney, 1978).

Da Stuten saisonal polyöstrische Tiere sind, erstreckt sich deren zyklische Aktivität auf die Monate mit zunehmender Tageslichtlänge, wobei es rassebedingte und individuelle Unterschiede gibt. Der Zyklus ist definiert als der Zeitraum zwischen zwei Ovulationen und dauert bei der Stute im Mittel 21-22 Tage. Er wird unterteilt in zwei Hauptphasen, die Rosse, auch folliculäre Phase oder Östrus genannt und die Zwischenrosse, auch Lutealphase oder Diöstrus. Während dieser Phasen ist sowohl das

Literaturübersicht

äußere Verhalten der Stute als auch die Gebärmutter deutlichen Veränderungen durch die Ausschüttung ovarieller Hormone unterworfen (Handler u. Aurich, 2008).

Die Zwischenrosse ist geprägt von der Anwesenheit eines funktionellen Gelbkörpers (Corpus luteum), welcher aus der frischen Ovulationsgrube eines Ovars hervorgeht. Dieser produziert in den Theka- und Granulosazellen das Steroidhormon Progesteron, dem eine Schlüsselrolle im Zyklus und in der Graviditätserhaltung aller domestizierten Säugetiere zukommt. Es erreicht bei der Stute Maximalwerte von 8-16 ng/ml sobald der Gelbkörper voll ausgereift ist (Löfstedt, 2011).

Die Stute ist im Diöstrus nicht paarungs- oder konzeptionsbereit und zeigt keinerlei äußerer Rosseanzeichen. Auf den Ovarien findet eine Follikelrekrutierung von meist einer Follikelwelle statt, aus der am Ende der Lutealphase ein dominanter Follikel hervorgeht. Das Endometrium befindet sich in der Sekretionsphase, um den Uterus auf eine Konzeption vorzubereiten. Durch den hohen Progesteronspiegel ist das Myometrium mittelgradig kontraktionsbereit (Hayes u. Ginther, 1986).

Im transrektalen Ultraschall stellt sich der Uterus aufgrund seiner glatten Oberfläche nahezu homogen dar. Die vaginale Schleimhaut ist blass und wenig feucht, bei der vaginalen Inspektion zeigt sich die Zervix geschlossen und zapfen- bis rosettenförmig. Sie bildet während dieser Phase einen Pfropf aus zäh-viskösem Schleim, der das uterine Milieu zur Scheide hin verschließt. Das Ende der Lutealphase, die Luteolyse, findet physiologischerweise etwa zwei Wochen nach der Ovulation statt und ist gekennzeichnet durch die Rückbildung des hormonell aktiven Gelbkörpers, was eine Regression der Progesteronsynthese mit sich zieht (Handler u. Aurich, 2008; Löfstedt, 2011; Vanderwall, 2011).

In der Rosse dominieren vor allem Östrogene das Hormonbild. Es besteht eine erhöhte Paarungsbereitschaft und die Stute zeigt meist deutliche äußere Rosse Symptome. Uterus und Zervix haben eine palpatorisch verminderte Kontraktionsbereitschaft und auf dem Ultraschallbild präsentieren sich die inneren Rosse Symptome in Form von ein bis mehreren präovulatorischen Follikeln auf den Ovarien, sowie einer östrogenbedingt zunehmenden Ödematisierung der Uteruswand bis kurz vor der Ovulation. Diese stellt sich im Querschnitt der Uterushörner als typische Radspeichenstruktur dar. Der Muttermund zeigt sich bei der vaginalen Inspektion ein bis drei fingerbreit passierbar, die Schleimhaut der Zervix ist aufgrund der gesteigerten Durchblutung rosarot, der Zervikal- und Vaginalschleim feucht und

weniger viskös. Etwa 24 Stunden nach der Ovulation endet auch das äußere Rosseverhalten der Stute, was durch das Abschlagen des Hengstes sichtbar wird (Handler u. Aurich, 2008; McCue, et al., 2011).

Auch auf histologischer Ebene finden hormonell bedingte Umbauprozesse statt. Da beim Pferd der Trophoblast nicht invasiv ist und sich bis zum 16. Tag der Gravidität frei in der Uterushöhle bewegt, ist die synchrone Umstrukturierung des Endometriums essentiell für die erfolgreiche Einnistung und Aufrechterhaltung der Gravidität (Hoffmann et al., 2008; Schoon et al., 1997; Zavy et al., 1978).

Das bedeutet, dass im Endometrium während des Diöstrus unter Progesteroneinfluss und somit bei eventuell erfolgter Bedeckung einige Umbauprozesse zur Steigerung der Sekretionsleistung ablaufen. Die Ödematisierung der Schleimhaut nimmt ab, die Dichte der Drüsen steigt und die sekretorische Aktivität nimmt zu. Das luminale Epithel ist anfangs hochprismatisch und wird gegen Ende des Diöstrus flacher. Das glanduläre Epithel ist durch vermehrte Mitosen gekennzeichnet. Es ist das Stadium, das entweder den Anfang einer Tächtigkeit darstellt oder in einer Luteolyse mündet, wenn kein Signal des möglicherweise vorhandenen Embryos erfolgt.

Während des Östrus befindet sich das Endometrium in der Proliferationsphase. Die oberflächlichen Epithelzellen zeigen zahlreiche Mitosen, erscheinen hochprismatisch und die Zellkerne sind vergrößert und oval. In den Venolen haben die neutrophilen Granulozyten die Tendenz sich nahe am Lumen saumartig anzusammeln. Auch einzelne freie Erythrozyten sind im Stratum compactum vorzufinden. Durch die östrogenbedingte Ödematisierung lockert das Gewebe auf und die Drüsen erscheinen im Stroma weniger dicht gelagert. Die Ausführungsgänge stellen sich im Schnittbild weniger stark geschlängelt dar (Kenney, 1978; Schoon et al., 1992).

2.2 Pathologie von Uterus und Endometrium

2.2.1 Uterus

Im Uterus gibt es eine Vielzahl an Erkrankungen, die den natürlichen Zyklus und die Fertilität beeinflussen können.

Entwicklungsanomalien der Gebärmutter sind selten und entstehen in der Regel, wenn die Ausbildung der Müllerschen Gänge teilweise oder ganz gehemmt wird. Ursprünglich entstehen die inneren weiblichen Geschlechtsorgane durch die kaudale

Literaturübersicht

Vereinigung der vorerst getrennten Müllerschen Gänge und bilden dann den Uterus, die Zervix und die kranialen zwei Drittel der Vagina. Die äußeren Geschlechtsorgane gehen aus dem Urogenitalsinus hervor (Rüsse, 1991). Zwischen diesen beiden Ursprungsgeweben befindet sich eine dünne Schicht an mesodermalem Gewebe, welches später das Hymen formt. An dieser Lokalisation, obwohl prinzipiell selten, werden Entwicklungsanomalien vielfach beobachtet (Freeman u. England, 1997).

Das Hymen persistens ist die am häufigsten vorkommende Anomalie im inneren Genitaltrakt der Stute. Es kann in seiner Vollständigkeit variieren, was davon abhängt, in welchem Grad die Müllerschen Gänge mit dem Urogenitalsinus verschmolzen sind. Obwohl dieser Zustand nicht notwendigerweise eine Infertilität mit sich bringt, birgt der mechanisch gestörte Sekretabtransport aus dem Uterus doch das Risiko einer bakteriellen Infektion und somit einer Unfruchtbarkeit. Auch eine Mukometra kann aus dem Sekretstau resultieren (Hughes, 1993).

Seltener kommt es vor, dass die kaudale Vereinigung der Müllerschen Gänge gehemmt wird, und eine doppelt angelegte Zervix zurück bleibt. Deren Erscheinung variiert hinsichtlich der Vollständigkeit ihrer Trennung. Es können zwei komplett getrennte Zervixkörper mit doppelt angelegtem Os cervix externum vorliegen (Kelly u. Newcombe, 2009; Macrae, 1935; Volkmann u. Gilbert, 1989). Ebenfalls wurde von einem zweigeteilten Uteruskörper berichtet, der durch ein Septum getrennt angelegt worden war (Blue, 1985). Zwei Fälle von Stuten wurden beschrieben, bei denen Unfruchtbarkeit aus einer Zervixhypoplasie hervorging. Der physiologische Verschluss funktionierte nicht mehr und so resultierte ein Pneumouterus (Blanchard et al., 1982; Witte et al., 2011). Auch ein Fall von Zervixaplasie bei einer Ponystute wurde beschrieben (Schlotthauer u. Zollmann, 1956).

Entzündliche Prozesse können jede Schicht des Uterus oder die Zervix betreffen. In der Mehrzahl kommen Endometritiden vor, welche im folgenden Kapitel behandelt werden.

Die Infektion des Myometrium (Myometritis, Metritis) ist eine schwere Erkrankung, denn sie erfasst die gesamte Muskelschicht der Gebärmutter, was die Passage für Keime in den Blutkreislauf ermöglicht. Eine Metritis zieht oftmals noch eine Perimetritis mit sich, da die Ursache meist in einer massiven Keimbelastung liegt. Häufig ist diese Erkrankung mit einer schweregeburtsinduzierten Perforation des Gewebes verbunden. Es kann eine Peritonitis oder Septikämie daraus resultieren und zu einem

Literaturübersicht

lebensbedrohlichen Umstand für die Stute werden (Asbury u. Lyle, 1993; Aurich u. Palm, 2008).

Eine Entzündung der Zervix (Cervicitis) geht in der Regel mit einer Endometritis oder Vaginitis einher und kann sowohl bei trächtigen als auch nichtträchtigen Stuten vorkommen. Sie kann sich im Auftreten von Vaginalausfluss äußern. Verursacher sind schädigende Noxen oder anatomische Gegebenheiten wie Mikroorganismen, Pneumovagina, Urovagina und lokal in den Uterus applizierte, reizende Medikamente (Sertich, 1993).

Traumata des inneren Genitaltraktes entstehen bei der Stute vor allem in Verbindung mit Schweregeburten oder iatrogen. Dabei führen sowohl Fruchtteile, die entweder zu groß oder nicht lagegerecht sind, aber auch Geburtshilfetechniken zu Verletzungen.

Zu große Fohlen, die im Geburtsweg stecken bleiben, können Drucknekrosen hervorrufen, was eine Passage von Keimen in die Blutbahn mit der Folge einer Sepsis nach sich ziehen kann. Einem Einreißen der Zervix liegt meist ein unzureichender Öffnungsgrad während der Austreibungsphase oder während des manuellen Auszuges zugrunde. Aber auch bei Lage-, Stellungs- oder Haltungsanomalien und einer normal geöffneten Zervix kann es bei der Geburt zum Einreißen des Gebärmutterhalses kommen. Eine unsachgemäß durchgeführte oder lang andauernde Fetotomie kann zu Schnitt- und Rißverletzungen führen. Wenn nach der Heilung Strikturen durch Narbengewebe entstehen und sich kein vollständiger Zervixschluss im Diöstrus mehr abzeichnet, dann ist die Prognose für eine weitere erfolgreiche Trächtigkeit als schlecht zu stellen. Eine chirurgische Intervention kann als Therpieversuch jedoch noch angewandt werden (Aurich u. Palm, 2008; Aurich, 2008a).

Zu Perforationen der Uteruswand kann es während der Trächtigkeit infolge anderer pathologischer Zustände, wie Torsio uteri oder Eihautwassersucht kommen. Während der Geburt führen vor allem Haltungsanomalien oder unsachgemäße geburtshilfliche Eingriffe zu einem Einreißen der Uteruswand. Ob noch eine Uteruswandschicht intakt ist oder eine komplette Peforation vorliegt, kann durch manuelle Exploration und ein Bauchhöhlenpunktat geprüft werden. Sind alle Schichten betroffen, kann die Stute nur durch einen chirurgischen Eingriff und Schocktherapie behandelt werden (Aurich, 2008b).

Eine allgemeine Vergrößerung des Gebärmuttervolumens kann die Folge eines Pneumouterus, einer Mucometra oder Pyometra sein. Ein Pneumouterus, die An-

Literaturübersicht

sammlung von Luft im Uteruslumen, entsteht meist infolge einer Pneumovagina. Wenn die Zervix in der Rosse geöffnet oder aufgrund anderer Umstände wie Verletzungen oder Narbenstrikturen durchlässig ist, kann die Luft ungehindert eintreten und im chronischen Fall zu Endometritiden und Infertilität führen (Van Camp, 1993). Durch chirurgische Intervention an den äußeren Schamlippen, in der Regel einer Caslick-Operation, wird einer Pneumovagina bei Zuchtstuten entgegengewirkt (Aurich et al., 2008; Van Camp, 1993).

Eine Pyometra ist die Ansammlung von Eiter im Uteruslumen. Dieser Zustand entsteht durch einen Entzündungsprozess in der Gebärmutter, der mit einer fast oder komplett undurchlässigen Zervix gekoppelt ist. Das eitriges Exsudat fließt nicht mehr ab und kann Volumina von bis zu 60 Litern erreichen. Eine Pyometra kann sich nach Schweregeburten mit Verletzungen im Bereich der Zervix entwickeln, wenn diese zu Wundadhäsionen oder Verwachsungen mit komplettem Verschluss des Lumens geführt haben. Betroffene Stuten sind oft lange Zeit symptomlos, wobei sich der Uterus ultrasonographisch als stark flüssigkeitsgefüllt mit massiv dilatierter Wand präsentiert, welche entweder verdickt und fibrotisch oder dünn und fragil sein kann (Aurich u. Palm, 2008; Aurich, 2008a; Van Camp, 1993).

Eine Mucometra ist die vermehrte Füllung des Uterus mit sterilem, serösem Sekret und entsteht, wenn der Abfluß nach außen ebenfalls unterbunden ist, oder eine vermehrte uterine Sekretion stattfindet. Gestörter Abfluß aus dem Uterus kann durch ein Hymen persistens hervorgerufen werden (Aurich u. Palm, 2008). Bei älteren Stuten mit Mucometra wurde eine zystische Hyperplasie des Endometriums beobachtet (Van Camp, 1993).

Neoplasien von Zervix und Uterus kommen bei der Stute sehr selten vor und können prinzipiell aus allen Geweben hervorgehen. Beschrieben wurden Fibrosarkome des Uterus (Govaere et al., 2011), sowie Tumore des Myometriums, sogenannte Myome, welche eine massive Umfangsvermehrung erlangen können (Aurich u. Palm, 2008; Berezowski, 2002).

2.2.2 Endometrium

Entzündungen des Uterus betreffen in der Mehrzahl das Endometrium und werden als der Hauptgrund für Infertilität bei der Stute angesehen (Hurtgen, 2006; Liu u. Troedsson, 2008).

Prinzipiell können zwei verschiedene Formen dieser Erkrankung unterschieden werden. Zum einen die erregerinduzierte Entzündung als Folge einer bakteriellen Besiedelung und zum anderen die persistierende Endometritis nach künstlicher Besamung oder dem Deckakt (Troedsson, 2006; Troedsson, 2011).

Anhand dieser Pathogenese und Ätiologie existieren unterschiedliche Einteilungsformen:

- akut infektiös
- chronisch infektiös
- besamungsinduziert
(LeBlanc, 2010)
- sexuell übertragbar durch obligat pathogene Erreger
- chronisch-infektiös durch bedingt pathogene Erreger
- persistierend nach Besamung
(Aurich u. Palm, 2008)

Schoon et al. (1997) bezeichnen alle entzündlichen Prozesse, die hinsichtlich Qualität und Quantität über die physiologische zyklische, endometriale Selbstreinigung hinausgehen unabhängig von ihrer Ätiologie als Endometritis.

In dieser Arbeit wird die Erkrankung nach folgenden Kriterien unterteilt:

- Vorkommen spontan
besamungsinduziert
postpartal
- Klinik apparent
inapparent
- Bakteriologie mit Erregernachweis
ohne Erregernachweis

Literaturübersicht

- Morphologie eitrig/nicht eitrig
oberflächlich/tiefgreifend
erosiv/destruierend
Mischformen

Bakterielle Endometritis:

Die bakterielle oder erregerinduzierte Endometritis ist dann gegenwärtig, wenn ein positiver Keimnachweis erfolgt ist. Dabei können sowohl obligat pathogene Keime, die spezifisch durch den Deckakt übertragen werden, als auch bedingt pathogene Keime die Ursache darstellen.

Die am häufigsten aus dem Genitaltrakt der Stute isolierten Erreger sind (Troedsson, 2011):

- *Streptococcus equi zooepidemicus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae*

Diese zählen zu den bedingt pathogenen Erregern, welche bei einer Vorschädigung oder verminderten Resistenzlage des Geschlechtstraktes eine Besiedlung vornehmen können. Sie kommen häufig als persistierende Keime auf den äußeren Genitalien von gesunden Stuten vor. Jegliche Struktur, wie Vulva, Vagina, Zervix und Hymenarling kann jedoch funktionell beeinträchtigt und damit prädisponierend für eine Infektion mit den genannten Keimen sein (Hurtgen, 2006). Aurich und Palm (2008) erweitern diese Auswahl an fakultativen Erregern noch um die Hefen der Gattung *Candida* und Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Mucor*.

Streptococcus equi zooepidemicus gilt als Teil der Hautflora des Pferdes und persistiert vorwiegend bei unzureichender Vitalität der endometrialen Epithelzellen im Uterus. Die Besiedlung ist jedoch wegbereitend für weitere Keime. *Escherichia coli* findet man häufig bei Stuten die aufgrund anatomischer Abweichungen unter fäkalen Verunreinigungen am Genitaltrakt leiden (Aurich u. Palm, 2008; Troedsson, 2011).

Akute Prozesse haben vor allem exsudativen Charakter. Ist die Erkrankung mittel- bis hochgradig, kann sogar serös bis eitriges Sekret als vaginaler Ausfluss beobach-

Literaturübersicht

tet werden (Aurich, 2008a). Das Zellbild ist dabei geprägt von neutrophilen Granulozyten, wobei meist nur das luminale Epithel mit Stratum compactum betroffen ist und der Prozess lokal begrenzt in der Gebärmutter bleibt. Bei der chronischen Form kann sich das Geschehen bis in das Stratum spongiosum erstrecken und als bakteriologisch und zytologisch negativ erweisen. Das Zellbild ist von Lymphozyten und Plasmazellen geprägt (Kenney u. Doig, 1986). Am sichersten ist die Diagnose durch eine Biopsie zu stellen (Schoon et al., 1992).

Über die bedingt pathogenen Keime hinaus existieren noch weitere Erreger von Geschlechtskrankheiten, die rein durch den Deckakt übertragen werden. Ein wichtiger Vertreter ist *Taylorella equigenitalis*, der Erreger der kontagiösen equinen Metritis (englisch: CEM / contagious equine metritis). Diese leicht übertragbare Krankheit hat vernichtende Folgen auf die Fruchtbarkeit von Stuten (Troedsson, 2011).

Besamungsinduzierte Endometritis:

Physiologischerweise kommt es bei jeder Stute nach der künstlichen Besamung oder nach dem Deckakt zu einer vorübergehenden Entzündungsreaktion des Endometriums. Dabei reagiert die Gebärmutter auf die Spermien, das Seminalplasma oder den Verdünner zunächst wie auf Fremdmaterial und es kommt zu einer Flüssigkeitsansammlung im Uteruslumen, begleitet von einer Rötung der vaginalen Schleimhäute. Durch natürliche Selbstreinigungsmechanismen, wie Phagozytose und verstärkter Kontraktilität des Myometriums wird jedoch bei gesunden Stuten innerhalb von 24 bis maximal 48 Stunden ein normales uterines Milieu wiederhergestellt (Katila, 1996).

Sind über diesen Zeitraum hinweg noch immer Entzündungsanzeichen feststellbar, so kann die Ursache in einer eingeschränkten Abwehrlage und gestörten uterinen Clearance der Stute liegen. Man spricht dann von einer persistierenden besamungsinduzierten Endometritis (Aurich u. Palm, 2008; Troedsson, 2011).

Vor allem im höheren Alter, bei bakterieller Vorbelastung oder aufgrund anatomisch prädisponierender Faktoren steigt die Wahrscheinlichkeit für die Stute betroffen zu sein (Hurtgen, 2006). So wurde in einer Studie gezeigt, dass die gestörte uterine Clearance aufgrund eines eingeschränkten zervikalen Abflusses bei Stuten sich extrem förderlich auf die Entstehung von uterinen Entzündungsreaktionen auswirkt (Ljepina et al., 2010). Auch Versuche, die sich auf Szintigraphie stützen, zeigten zum einen, dass die uterine Clearance bei anfälligen Stuten verzögert ist (LeBlanc et al.,

Literaturübersicht

1994) und zum anderen, dass Uteri, die nach cranioventral über den Beckenboden positioniert sind, eher zu Flüssigkeitsretention neigen (LeBlanc et al., 1998). Stuten mit einer Vorgeschichte von Unfruchtbarkeit oder der Zugehörigkeit in Biopsieklasse IIb – III sind ebenfalls anfälliger (Kenney u. Doig, 1986).

Von der Endometritis abgegrenzt werden muss die Endometrose, ein Sammelbegriff aller chronisch-degenerativen Erkrankungen des Endometriums mit bleibender Beeinträchtigung der Uterusfunktion (Kenney, 1978).

Sie ist geprägt durch fibrotische Veränderungen, periglanduläre Bindegewebszubildungen und alternierende lokale Drüsenatrophie und Drüsennestbildung, hat aber keinen entzündlichen Charakter und ist daher nur durch eine Biopsieprobe zu diagnostizieren. Es handelt sich um eine progredient fortschreitende Krankheit, welche durch zunehmende Anteile an Myofibroblasten zur Zerstörung der Uterindrüsen führt (Hoffmann et al., 2009).

Endometrose ist als eine der Hauptursachen für Fertilitätsstörungen anzusehen, weil durch die histomorphologischen Veränderungen vor allem die physiologische Funktion des Endometriums eingeschränkt ist. Als Folge wird die uterine Sekretion gestört, was starke Auswirkungen auf den frühen Konzeptus hat. Dessen Einnistung ist abhängig von einem optimalen uterinen Milieu, welches nur geschaffen wird, wenn das Endometrium sich synchron zur Entwicklung des Konzeptus umstrukturieren kann (Aurich u. Palm, 2008; Schoon et al., 1997).

Bei multiparen, häufig umrossenden Stuten kann das Auftreten von Endometriumzysten ursächlich verantwortlich sein. Der Ursprung liegt zum einen in einer Lymphstase mit in der Folge ausgedehnten Lymphlakunen und zum anderen in der Ausdehnung und Füllung von Uterindrüsen. Da aufgrund dieser Veränderungen die fetomaternale Kommunikation in der Frühträchtigkeit gestört wird, kann je nach Schweregrad der Veränderung eine erfolgreichen Bedeckung gefährdet sein (Aurich u. Palm, 2008).

2.3 Diagnostik von Uterus und Endometrium

2.3.1 Transrektale Palpation

Die transsrektale Palpation ist ein grundlegendes Verfahren bei der Untersuchung des weiblichen Genitaltraktes. Der Untersucher führt hierbei seinen Arm in das Rektum des Tieres ein und betastet vorsichtig durch die Darmwand die zu beurteilenden Organe.

Wird diese Methode von einer erfahrenen Person durchgeführt, liefert sie wertvolle Informationen über die Anatomie und Form als auch den funktionellen Zustand der inneren Geschlechtsorgane einer Stute. Der Untersucher sollte über umfassende Kenntnisse der Anatomie und Physiologie verfügen, um Befunde sinnvoll zu interpretieren und Rückschlüsse auf den Zyklusstand und die Zuchttauglichkeit zu ziehen. Diese bilden die Basis für alle weiterfolgenden diagnostischen Tests und Therapien aus. Kann eine Trächtigkeit nicht ausgeschlossen werden, sollte vor jedem invasiven Untersuchungsgang ebenfalls transrektal palpirt und sonographiert werden.

Obwohl es sich um eine Routineuntersuchung handelt, muss bei jeder Durchführung auf adäquate Sicherheitsmaßnahmen geachtet werden. Der Schutz von Tierarzt, Pfleger und Pferd hat gleichermaßen höchste Priorität und kann nur durch geeignete Fixation und Limitation der Stute realisiert werden. Außerdem sollte die Prozedur grundsätzlich ruhig erfolgen und am Kopf des Pferdes immer eine erfahrene Person positioniert werden.

Untersuchungsstände eignen sich dafür am besten und sollten wann immer möglich auch genutzt werden. Die Seitenteile aus festem Material limitieren die Bewegung der Stute auch zu den Seiten hin ohne dass die Situation einer Zwangsmaßnahme entsteht. Wenn sie bis hin zum Boden reichen bieten sie ein hohes Maß an Sicherheit.

Auch an anderen Orten kann eine transrektale Palpation durchgeführt werden, allerdings müssen dabei dieselben Grundsätze eingehalten werden. Sollte ein Pferd trotz Sicherungsmaßnahmen zu erhöhter Schreckhaftigkeit oder wehrhaftem Verhalten neigen, kann auch eine medikamentelle Ruhigstellung mit Minor Tranquilizern oder alpha-2-Agonisten erfolgen.

Vor der Palpation muss der Untersucher seinen Arm von Schmuck und Kleidung befreien. Anschließend wird ein schulterlanger Rektalhandschuh übergezogen und mit

Literaturübersicht

reichlich Gleitmittel befeuchtet, welches auf die Handfläche, Fingerknöchel und den Unterarm aufgetragen wird.

Die transrektale Palpation ist eine Technik, die unter höchster Vorsicht durchgeführt wird. Zunächst wird mit der stets geschlossenen Hand der Kot aus der Ampulle entfernt und der Arm dabei rundum auf Blutspuren geprüft. Peristaltikwellen können passiv abgewartet, bei der Stute jedoch darf nicht dagegen angegangen werden. Anschließend kann der Arm in das Lumen des Rectums eingeführt und mit der Hand Zervix, Corpus uteri und Ovarien, sowie Gefäße und Bänder palpiert werden.

Die Zervix ist eine tubuläre Struktur, die etwa mittig auf dem knöchernen Beckenboden zu liegen kommt und als solches auch für den Untersucher, der horizontal konkav über den Beckenboden streicht, tastbar ist. Sie wird bezüglich ihrer Länge, Breite und Konsistenz beurteilt. Im Diöstrus hebt sich ihre feste Beschaffenheit vom Uterus ab und auch die tubuläre Form ist gut tastbar. Im Östrus ist sie aufgrund ihrer Relaxation und Ödematisierung schwerer auszumachen, da die Konsistenz dem Uteruskörper sehr ähnlich ist.

Kranial des knöchernen Beckeneinganges wird der Uteruskörper mit seiner mittigen Bifurkation aufgesucht. Beidseits lateral davon verlaufen bis zur seitlichen Bauchwand aufgehängt die Uterushörner. Es werden bei der Palpation des Uteruskörper und der Hörner Größe, Symmetrie, Kontraktilität und eventuelle Besonderheiten wie Trächtigkeitsstadien, fühlbare Zysten oder Flüssigkeit protokolliert. Bei nicht graviden Stuten kann die Gebärmutter in ihrer kompletten Größe durchpalpiert werden. Am Ende der Uterushornspitzen gleitet man am Ligamentum ovarii proprium bis zu den Ovarien. Hier wird der Durchmesser geschätzt und eventuell fühlbare Funktionskörper notiert (Bowman, 2011; Handler, 2008).

2.3.2 Transrektale Sonographie

Die transrektale Sonographie ist ein wichtiger Routinebestandteil, und ein grundlegendes Werkzeug für eine präzise und nicht invasive Untersuchung der weiblichen inneren Geschlechtsorgane (Bowman, 2011). Das Prinzip des Ultraschalls beruht auf dem Impulsechoverfahren. Von einem piezoelektrischen Kristall werden Schallwellen in ein Gewebe gesendet und das Echo wieder aufgenommen. Wenn die beschallten Gewebe von unterschiedlicher Echogenität sind, werden die Wellen an den Grenzflächen in ihrer Richtung verändert und erzeugen daraufhin unterschiedliche

Literaturübersicht

Echoimpulse. Diese werden verstärkt und auf einem Bildschirm sichtbar gemacht (Reef, 1998). Es werden häufig Linearerschallköpfe im Bereich von 5 MHz verwendet.

Die Untersuchung wird unter denselben Sicherheitsaspekten vorgenommen wie eine transrektale Palpation, welche der Ultraschalluntersuchung vorausgeht. Es wird der Schallkopf von der hohlen Hand umschlossen und in das Rektum eingeführt. Dabei ist die Schallfläche nach ventral aus der Handöffnung heraus gerichtet. Es werden nun hintereinander Zervix, Uteruskörper, -hörner und Ovarien dargestellt und beurteilt.

Da der Schallkopf immer mit der Spitze nach cranial gehalten wird, kann die Zervix nur im Längsschnitt beurteilt werden. Sie hebt sich durch ihre typisch hyperechogene, längsgerichtete Struktur vom umliegenden Gewebe ab und kann in Homogenität und ihrem Durchmesser erfasst werden.

Der Uteruskörper und die Hörner werden auf ihre Wandbeschaffenheit beurteilt und können ebenfalls im Durchmesser erfasst werden. Ihre Struktur ist im Diöstrus nahezu homogen grau, wobei sich im Östrus die starke Verdickung und Fältelung der Wand abzeichnet, welche auf eine östrogenbedingte Ödematisierung des Gewebes zurückzuführen ist. In den Uterushörnern spricht man deshalb von der typischen Radspeichenstruktur.

Der gesamte Uterus wird ebenfalls auf Flüssigkeitsansammlungen oder Zysten untersucht, welche in ihrem Ausmaß und ihrer Lokalisation notiert werden. Bei einer Trächtigkeitsuntersuchung wird die Gebärmutter ohne Unterbrechung in einem Durchgang untersucht, da der frühe Konzeptus noch sehr mobil ist.

Die Ovarien werden in ihrer Größe vermessen und auf Funktionskörper untersucht. Follikel erscheinen stark hypoechogen und rund in verschiedenen Größen. Kurz nach der Ovulation zeigen sich erste wabige Durchbauungen und die Struktur ist nicht mehr prall rund. Der typische Gelbkörper hat eine eher hypochechogene Beschaffenheit, oft mit einem anechogenen Hohlraum in der Mitte. Pathologische Veränderungen an den Ovarien wie Hämatome, Abszesse und Neoplasien können per Ultraschall festgestellt werden, müssen aber im Verlauf weiterbeobachtet oder biopsiert werden, um gefestigte Diagnosen zu erzielen (Handler, 2008; Pycoc, 2011).

2.3.3 Hysteroskopie

Als Hysteroskopie bezeichnet man die endoskopische Untersuchung des Gebärmutterlumens. Dabei wird ein flexibles Endoskop über den Zervikalkanal in den Uterus eingeführt und das Lumen mit Kamera und Lichtquelle exploriert. Indiziert ist diese Untersuchungsmethode, wenn im Rahmen einer gynäkologischen Untersuchung außergewöhnliche Begebenheiten vorliegen oder bereits gewonnene Erkenntnisse näher spezifiziert werden sollen (Card, 2011; Handler, 2008). Auch die Entnahme eines uterotubalen Tupfers oder kleine chirurgische Eingriffe, wie die Entfernung von Endometriumzysten und -polypen können hiermit unter Sichtkontrolle durchgeführt werden (Wilson, 1983).

Zur Hysteroskopie wird die Stute in einen Untersuchungsstand verbracht und in der Regel mit einem alpha-2-Agonisten und Butorphanol sediert, um ihre Mobilität einzuschränken und sie selbst und die Arbeitsgeräte zu schützen. Der Schweif wird ausgebinden zur Seite fixiert und das Perineum feucht gereinigt. Für die Durchführung der Untersuchung sind zwei Personen notwendig, eine Person im direkten Kontakt mit dem Pferd, die das Endoskop durch die Zervix führt und eine Person, für die Steuerung. Als Gerät eignet sich ein Videoendoskop von mindestens einem Meter Länge, 10 mm Durchmesser und einem Arbeitskanal für die Entnahme von Flüssigkeits- oder Gewebeprobe. Die Endoskopspitze ist flexibel steuerbar. Es sollte vorher sterilisiert und mit destilliertem Wasser gereinigt werden. Der Untersucher am Pferd benötigt einen sterilen Rektalhandschuh und chirurgischem Handschuh darüber, um das Instrument sauber durch die Zervix in den Uterus zu verbringen (Card, 2011; Handler, 2008; Wilson, 1983).

Sobald die Endoskopspitze vollständig im Gebärmutterlumen verbracht ist, kann der Helfer gefilterte Luft in das Uteruslumen insufflieren. Dies ist notwendig, um die Innenwände der Gebärmutter voneinander abzuheben und eine Beurteilung der Schleimhaut mit allen Strukturen möglich zu machen. Der optimale Arbeitsdruck, bei dem eine effiziente Hysteroskopie durchgeführt werden kann und eine vollständige Entfaltung des Cavum uteri besteht, liegt bei 17,8 mm Hg. Wenn die Obergrenze von 30 mm Hg nicht überschritten wird, kann in der Regel auf einen manuell unterstützten Zervixschluss verzichtet werden (Bartmann u. Schiemann, 2003). Im Dioestrus funktioniert die Luftinsufflation aufgrund der herabgesetzten Kontraktibilität des Uterus unter normalen Umständen besser als im Oestrus (Bracher u. Allen, 1992).

Literaturübersicht

Es werden Zervix, Uteruskörper, Bifurkation und die Hörner bis in die Spitzen zur Eileiterpapille aufgesucht und beurteilt. Außerdem werden Beobachtungen wie Flüssigkeitsansammlungen, endometriale Unregelmäßigkeiten, sichtbare Degenerationen, Zysten, Adhäsionen oder isolierte intraluminale Strukturen notiert (Bracher et al., 1992; Card, 2011; Handler, 2008).

Die Zervix sollte im Diöstrus blassrosa, eng geschlossen und gestreckt vorzufinden sein. Das Endometrium liegt in zarten Falten und ist ebenso wie die Eileiterpapille blassrosa. Im Östrus erscheint die Zervix schlaff und hyperämisch. Dieselbe Farbveränderung weisen auch das Endometrium sowie die Eileiterpapille auf, außerdem ist die Oberfläche durch erhöhte Sekretbildung feuchter. Im Endometrium findet aufgrund der Ödematisierung des Gewebes eine sehr prominente Faltenbildung statt, die bei direkter Aufsicht eine regelmäßige Struktur hat (Bracher u. Allen, 1992; Card, 2011).

2.3.4 Endometriumzytologie

Die Endometriumzytologie ist eine diagnostische Methode, die im Rahmen der Endometritisdiagnostik etabliert wurde (Knudsen, 1964). Mittlerweile ist sie ein wichtiges Verfahren, um bei einer bakteriologischen Untersuchung des Uterus gesichertere Informationen über den Gesundheitszustand des Reproduktionstraktes zu erhalten (LeBlanc, 2011; Walter u. Wehrend, 2009). Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen bakteriologischen und zytologischen Befunden des Endometriums (Ball et al., 1988; Brook, 1985; Couto u. Hughes, 1984; Knudsen, 1964; Riddle et al., 2007).

Da es bei der Entnahme eines Tupfers zur bakteriologischen Untersuchung aufgrund unsauberer Handhabung zur Kontamination des Tupfers kommen kann, beweist ein positives Kulturergebnis allein keine Endometritis. Umgekehrt kann ein negatives Kulturergebnis ebenso aufgrund von Schwierigkeiten bei der Anzucht falsch-negativ sein.

Es wurde beschrieben, dass die exfoliative Endometriumzytologie sensitivere Ergebnisse bezüglich akuter Inflammationsprozesse liefert als die bakteriologische Untersuchung mittels Tupferprobenentnahme allein (Riddle et al., 2007). Allerdings können mitunter auch falsch-negative Ergebnisse nach der zytologischen Auswertung vorkommen, was an unsachgemäßer Zellgewinnung oder an verfrühter Untersuchung im Entzündungsprozess liegen kann (LeBlanc, 2011). Ein großer Vor-

Literaturübersicht

teil liegt in der einfachen Gewinnung und Auswertbarkeit der Proben. Das gewährleistet die schnelle Verfügbarkeit von Ergebnissen, so dass eine unmittelbare Therapie der Stute erfolgen kann (Walter u. Wehrend, 2009).

Es gibt unterschiedliche Arten der Probengewinnung für einen Abstrich der Gebärmutterschleimhaut. Die optimale Methode mit höchster Aussagekraft würde darin bestehen, von einer größtmöglichen Gebärmutteroberfläche so viele unbeschädigte Zellen wie möglich zu erhalten, ohne dabei den Geschlechtstrakt zu verletzen.

In der Praxis stehen als Entnahmeverfahren der umhüllte Wattetupfer, das Zytologiebürstchen (CytologyBrush®, Minitube, Tiefenbach, Germany), sowie die Gewinnung von Uterussekret durch Flüssigkeitsaspiration oder eine Low-Volume-Uterusspülung zur Verfügung. Auch das Ausstreichen einer Biopsieprobe ist eine weitere Möglichkeit Zellen zu gewinnen (Nielsen, 2005). Der Abstrich wird optimalerweise im Östrus genommen wenn die Zervix relaxiert und leicht passierbar ist (Couto u. Hughes, 1984).

Die Tupferprobenentnahme bietet den Vorteil, dass sie einfach durchzuführen ist (Cocchia et al., 2012), vaginale Kontamination minimiert (Card, 2005) und zusätzlich zur Zytologie noch die bakteriologische Untersuchung beinhaltet. Allerdings repräsentiert diese Probe nur 1-2 cm der Uterusinnenfläche und kann bei lokalen Prozessen nicht zur sicheren Diagnostik dienen. Außerdem werden bei dieser Methode viele der gewonnenen Zellen verzerrt, was in der Humanmedizin unter anderem dazu geführt hat, sie nicht mehr anzuwenden.

Es wird die Stute hierzu in einen Stand verbracht, das Rektum entleert, der Schweif bandagiert zur Seite fixiert und der Perianalbereich gewaschen und gesäubert (Card, 2005). Anschließend wird der Tupfer entweder manuell oder mithilfe eines Polanski-Spekulums unter Sichtkontrolle doppelt behüllt in den Uterus eingeführt, dann aus der Hülle vorgeschoben und 30 Sekunden dort in Kontakt mit Endometrium belassen (Bourke et al., 1997; Walter u. Wehrend, 2009).

Das Verfahren mit Zytologiebürstchen ist ähnlich in der Durchführung, nur dass hierbei eine leichte Rollbewegung auf der Schleimhaut stattfindet, um Zellen aufzugreifen. Diese Technik wird nicht nur in der Gynäkologie, sondern auch in der Ophthalmologie zur Zellgewinnung genutzt (Allgoewer et al., 2001). Es wurde bereits gezeigt, dass es mehr unbeschädigte Zellen und auch eine höhere absolute Anzahl an Zellen erzielt als das Verfahren mit Baumwolltupfer (Bourke et al., 1997; Trimbois u. Arentz,

Literaturübersicht

1986). Folglich wäre es die sinnvollere Methode, um Veränderungen des Endometriums wie chronische Entzündungsprozesse oder Neoplasien zu beurteilen (Bourke et al., 1997).

Die Spülung des Uterus mit einem niedrigen Volumen an Flüssigkeit erreicht von allen Methoden die größte Endometriumfläche und ist damit repräsentativer als die Tupferprobenentnahme oder das Zytologiebürstchen. Allerdings ist eine Uterusspülung aufwändiger in der Durchführung und nicht immer ergibt sich sofort eine Rückgewinnung an Flüssigkeit, so dass unter Umständen eine Erhöhung des Volumens notwendig ist. Außerdem kann es zu Kontaminationen mit Zervikal- oder Vaginalflora kommen, da die Methode nur semi-behüllt ist (Cocchia et al., 2012).

Zur Prozedur wird das Pferd wie zuvor beschrieben vorbereitet. Dann führt der Untersucher einen Ballonkatheter mit der steril behandschuhten Hand mit dem Zeigefinger durch die Zervix in den Uterus ein, wobei der Ballon leer belassen (LeBlanc et al., 2007) oder mit Luft gefüllt werden kann (Ball et al., 1988). Anschließend wird ein geringes Volumen an Spülflüssigkeit in den Uterus instilliert und für kurze Dauer unter manueller Manipulation belassen. Die Wiedergewinnung erfolgt schwerkraftgesteuert in ein steriles Behältnis (LeBlanc et al., 2007).

Der Vergleich von Tupferproben, die zum einen direkt aus der Gebärmutter zum anderen aus der Uterusspülflüssigkeit derselben Stuten entnommen wurden, zeigte, dass die Identifizierung von Stuten mit Endometritis signifikant höher ausfällt, wenn der Tupfer aus der Spülflüssigkeit entnommen wurde (LeBlanc et al., 2007).

Nach der Gewinnung werden die Zellen auf einen Objektträger verbracht und fixiert. Zur Herstellung eines Abstriches kann der Tupfer oder das Zytologiebürstchen über den Objektträger gerollt und das aufgebrachte Material anschließend fixiert werden. Es kann aber auch das Pellet der Spülflüssigkeit resuspendiert, auf die Oberfläche verbracht und ausgestrichen werden. Es besteht auch die Möglichkeit eine Biopsie vor der Fixierung auszustreichen (Nielsen, 2005).

Die Eosin-Thiazin-Färbung (Diff-Quick[®]) hat sich als gute Methode etabliert, mit der neutrophile Granulozyten gut von uterinen Epithelzellen unterschieden werden können. Aber auch Bakterien und Pilzhyphen können hiermit einfach identifiziert werden. Es empfiehlt sich daher immer mehrere Abstriche anzufertigen, falls weitergehende Färbungen und Untersuchungen nötig werden sollten (Walter u. Wehrend, 2009).

Literaturübersicht

Die Beurteilung erfolgt mikroskopisch, wobei es keine allgemeingültigen Richtlinien für die Interpretation der Befunde gibt. Das Hauptaugenmerk in der Diagnostik von Endometritiden liegt auf dem Vorhandensein von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Manche Autoren beurteilen dabei die absolute Anzahl pro Ausstrich oder High Power Field, andere bestimmen den Prozentsatz im Verhältnis zu uterinen Epithelzellen oder zum Gesamtzellgehalt, um eine Aussage über das Vorhandensein eines entzündlichen Prozesses geben zu können (Card, 2005).

2.3.5 Endometriumbiopsie

Als prognostisches Mittel gehört die Endometriumbiopsie mit der histopathologischen Klassifizierung nach Kenney und Doig zu einem Routineverfahren der Zuchttauglichkeitsuntersuchung (Handler, 2008; Kenney u. Doig, 1986; Love, 2011). Aus den histologischen Veränderungen des Endometriums von güsten Stuten lassen sich verschiedene Befunde diagnostizieren, die eine Aussage über die zu erwartende Abfohlrate zulassen (Handler, 2008; Kenney, 1978; Kenney u. Doig, 1986). Durch die Klassifizierung der Biopsieprobe kann die prozentuale Abfohlwahrscheinlichkeit angegeben werden (Kenney u. Doig, 1986).

Die Untersuchung ist vor allem bei älteren Stuten indiziert und sinnvoll, die zum ersten Mal belegt werden sollen oder Stuten, die vorberichtlich Probleme mit Resorption, Abort oder Infertilität haben. Außerdem bietet sie, im Hinblick auf die Rentabilität eine Entscheidungshilfe für die eventuelle Durchführung von Therapien des Geschlechtstraktes (Handler, 2008; Kenney u. Doig, 1986; Ricketts, 1975b; Schoon et al., 1992). Sie hat als Ergänzung zur gynäkologischen Untersuchung deshalb einen derart hohen Stellenwert, da klinisch inapparente Veränderungen des Endometriums diagnostisch sicher erfasst und in den Gesamtkontext des Patienten eingefügt werden können (Schoon et al., 1992). Die Entnahme einer Biopsie mit der anschließenden bakteriologischen und zytologischen Untersuchung dieser Probe gilt als der verlässlichste Test für die Diagnose von Endometritis oder uterinen Infektionen (Nielsen, 2005). Obwohl die Größe der Biopsie nur 0,1 % der Fläche des Endometriums widerspiegelt und nebenbei viele andere Faktoren zu einer ausreichend langen Tragzeit und erfolgreichen Geburt beitragen, besteht doch eine erstaunlich hohe Korrelation zur histologischen Beschaffenheit dieses Organs (Kenney u. Doig, 1986).

Literaturübersicht

Die Entnahme einer Gewebeprobe ist bei tragenden und frisch belegten Stuten kontraindiziert, weshalb vor einer Biopsie niemals auf eine gründliche Anamnese und ultraschall-gestützte Voruntersuchung verzichtet werden sollte (Love, 2011).

Die Entnahmetechnik der Endometriumbiopsie wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (Brandt u. Manning, 1969; Kenney, 1978; Kenney u. Doig, 1986; Ricketts, 1975a; Ricketts, 1975b). Sie wird als sichere Methode angesehen, die der Stute keine Schmerzen verursacht und kaum Fixationsmaßnahmen benötigt (Ricketts, 1975b).

Das zu gewinnende Gewebestück sollte nach Kenney und Doig (1986) eine minimale Größe von 10-20 x 3 x 3 mm aufweisen, wobei es sinnvoll wäre jeweils von Ober- und Unterseite des rechten und linken Horns und des Uteruskörpers eine Probe zu entnehmen. Aufgrund der sterilen Bedingungen unter denen sie stattfindet und der damit verbundenen Vorbereitung der Stute ist eine routinemäßige Entnahme von sechs Biopsien jedoch nicht praktikabel. Für den Fall, dass bei der rektalen Voruntersuchung Unregelmäßigkeiten oder Abweichungen in der Uterusstruktur festgestellt wurden, sollten sowohl an den gleichförmigen wie auch an den veränderten Bereichen jeweils eine Biopsie entnommen werden (Bracher u. Allen, 1992; Kenney, 1978; Kenney u. Doig, 1986; Ricketts, 1975b; Waelchi u. Winder, 1987). Erscheint der Uterus von der Textur durchgehend homogen ist eine ungezielte Entnahme der Biopsie an beliebiger Stelle möglich (Kenney u. Doig, 1986).

Es werden unterschiedliche Instrumente zur Gewinnung von Endometriumbiopsieproben beschrieben. Zum einen teilbare Zangen, die durch einen Zugmechanismus bedient werden (Nielsen, 2005), die Yeoman Biopsiezange mit korb- (Ricketts, 1975a) oder maßangefertigte Stücke mit alligator-ähnlichen Schneideschenkeln (Kenney, 1978), zum anderen flexible Instrumente, die unter Sichtkontrolle durch den Arbeitskanal eines Videoendoskops bedient werden können (Bracher u. Allen, 1992). Häufig trifft man auf die Biopsiezange nach Kevorkian, welche eine Länge von 60 cm und korb-ähnliche, glatte, Schenkel mit scharfen Schneidekanten hat, um eine Quetschung des Gewebes zu vermeiden (Love, 2011; Schoon et al., 1992).

Der beste Zeitpunkt zur Probenentnahme wird mit dem Diöstrus angegeben, da hier die geringste Variabilität des Endometriums vorliegt und somit die Wahrscheinlichkeit von Fehlinterpretationen reduziert wird (Kenney u. Doig, 1986).

Literaturübersicht

Das Rektum der Stute muss vor der Probenentnahme von Kotballen befreit sowie die transrektale palpatorische und sonographische Voruntersuchung durchgeführt werden (Kenney u. Doig, 1986; Ricketts, 1975b). Das Perineum wird gründlich gesäubert und der Schweif bandagiert zur Seite fixiert. Der Untersucher benutzt einen sterilen Rektalhandschuh, der mit sterilem Gleitmittel befeuchtet ist, um die Biopsiezange in der Hand geschützt durch die Vagina und mit dem Zeigefinger durch die Zervix zu führen. Sobald die geschlossene Zange im Uterus zu liegen kommt wird die Untersucherhand entfernt und der Handgriff um neunzig Grad gedreht, so dass die Schneideschenkel bei Öffnung horizontal gerichtet sind. Die behandschuhte Untersucherhand drückt nun vorsichtig von rektal Uterusgewebe in die geöffnete Zange, was ermöglicht, dass beim schnellen Schließen ein ausreichend großes Stück Gewebe ohne Verzerrung oder Quetschung entnommen werden kann (Kenney u. Doig, 1986).

Die Interpretation einer Endometriumbiopsie erfordert viel Erfahrung und sollte grundsätzlich von erfahrenem Personal durchgeführt werden (Handler, 2008; Kenney u. Doig, 1986). Vom anatomischen Gesichtspunkt her umfasst die Analyse das luminale Epithel, die Uterindrüsen sowie das Stratum compactum und spongiosum der Gebärmutter Schleimhaut.

Im gynäkologischen Kontext können Endometriumbiopsien zur Bestimmung des Zyklusstandes herangezogen werden, da das Gewebe in dessen Verlauf ständigen Veränderungen unterworfen ist. Im pathologischen Kontext können atrophische und degenerative Prozesse, wie Endometrose oder Angiopathien der Lymph- und Blutgefäße, festgestellt werden. Akute, subakute und chronische Entzündungsprozesse können voneinander unterschieden werden. Außerdem können Lymphstauungen, die zu intraendometrialen oder luminalen Zysten führen identifiziert werden (Handler, 2008; Schoon et al., 1997).

Kenney und Doig (1986) haben ein international anerkanntes Klassifizierungssystem geschaffen, das einen Zusammenhang zwischen dem Zustand des Endometriums und der Wahrscheinlichkeit ein lebendes Fohlen zur Welt zu bringen herstellt. Dabei werden die Stuten je nach Schweregrad der Veränderungen in vier Kategorien eingeteilt.

Literaturübersicht

- Kategorie I
 - physiologisches Endometrium ohne Veränderungen
 - leichte, weit verstreute Fibrosierungs- oder Entzündungsherde
- Kategorie IIa
 - gering- bis mittelgradige solitär auftretende entzündliche, fibrotische, lymphatische oder atrophische Veränderungen
- Kategorie IIb
 - zwei gleichzeitig auftretende Pathologien der Kategorie IIa
 - bei Auftreten eines der Merkmale aus Kategorie IIa, wenn Stute zusätzlich bei der Befundung bereits seit zwei Jahren güst ist.
- Kategorie 3
 - hochgradig entzündliche, fibrotische oder lymphatische Veränderungen
 - oder starke endometriale Atrophie während der physiologischen Zuchtsaison

Die zu erwartenden Abfohlraten liegen hinsichtlich der Kategorien bei folgenden Prozentsätzen (Kenney u. Doig, 1986):

| | |
|----------------|--------|
| Kategorie I: | 80-90% |
| Kategorie IIa: | 50-80% |
| Kategorie IIb: | 10-50% |
| Kategorie III: | <10% |

Literaturübersicht

Eine Beurteilung des Patienten darf jedoch niemals auf der Klassifizierung der Endometriumbiopsie allein beruhen, sondern sollte immer durch einen ausführlichen Vorbericht, Angaben zu Management und Reproduktionsstatus sowie weiterführenden Untersuchungsbefunden aus Klinik, Mikrobiologie und Zytologie erweitert werden (Handler, 2008; Kenney, 1978; Kenney u. Doig, 1986; Schoon et al., 1992; Schoon et al., 1997; Waelchli u. Winder, 1987). Im Falle einer gezielten Therapie sollte der Behandlungserfolg grundsätzlich durch eine Zweitbiopsie überprüft werden, da nur so der effiziente Verlauf richtig gesteuert werden kann (Schoon et al., 1992).

2.4 Vitalitätsbeurteilung von Zellen

Die Vitalitätsbeurteilung von Zellen ist ein wichtiges Verfahren zur Qualitätsbeurteilung bei der Arbeit mit lebenden Zellen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Vitalität von Zellen nachzuweisen oder auszuschließen. Sie bedienen sich dem Nachweis oder Ausschluss der typischen Eigenschaften lebender Zellen. Dazu gehören Proteinbiosynthese, Integrität der Zellmembran, Membrantransport von Stoffen ins Zellinnere oder Vermehrung. Es gibt mehrere Methoden, mit denen man Vitalität nachweisen oder ausschließen kann: Färbungen mit bestimmten Farbstoffen bzw. Fluoreszenzfarbstoffen und immunhistochemische oder enzymatische Nachweisverfahren.

Bei den auf Diffusion basierenden Färbemethoden dringen die Farbstoffe in tote Zellen ein und erbringen folglich einen Perforationsnachweis. Die Färbung mit Trypanblau ist die am häufigsten genutzte Methode und gehört zu einem Farbausschlussverfahren. Es beruht darauf, dass Trypanblau nur in Zellen mit defekter Zellmembran aufgenommen wird und diese sich dann blau präsentieren. Allerdings kann es aufgrund der Toxizität des Farbstoffes bei empfindlichen Zellen zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, da diese angegriffen werden und verfrüht absterben (Altman et al., 1993). Auch kanzerogene (Ford u. Becker, 1982) und teratogene Eigenschaften wurden für den Farbstoff in Ratten nachgewiesen (Turbow, 1966). In der Augenchirurgie beim Menschen wird Trypanblau genutzt, um verschiedene Membranen des Auges besser voneinander abzugrenzen und somit die Operationszeit und Präzision zu verbessern (Vote et al., 2004).

Eine wichtige Methode bei der Vitalfärbung von Zellen ist die Fluoreszenzfärbung. Sie kann sowohl mikroskopisch als auch mithilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet werden und basiert auf der Zugabe von Substanzen, die zu Fluoreszenz angeregt werden können. Das Grundprinzip ist dabei die Anlagerung eines Fluorophores an Strukturen im Inneren der toten Zellen (Geng et al., 1996). Die Färbung von Nukleinsäuren durch Acridin-Orange resultiert beispielsweise in der Anlagerung des Farbstoffes an die fragmentierten sowohl Doppel-, als auch Einzelstrang-DNA-Stücke in den Zellkernen von zugrunde gehenden Zellen (Geng et al., 1996; McMaster u. Car-michael, 1977; Ribble et al., 2005).

Eine weiterentwickelte Methode ist die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung. Sie findet unter der Zugabe zweier Substanzen statt, welche lebende und tote Zellen gleichzei-

Literaturübersicht

tig unterschiedlich anfärben. Bei vitalen Zellen wird in der Regel eine Substanz verstoffwechselt, die als grüner Farbstoff erkennbar wird, bei den avitalen Zellen kann aufgrund der beschädigten Zellmembran die zweite Substanz, meist Propidiumiodid oder Ethidiumbromid (Ribble et al., 2005), ins Zellinnere gelangen, sich an der DNA anlagern und als roter Farbstoff identifiziert werden.

Eine weitere Methode ist der Nachweis der aktivierten Caspase-3 in Zellen, die in die Kaskade der Apoptose eingetreten sind. Apoptose ist der programmierte Zelltod. Der bedeutende Unterschied zur Nekrose, dem Absterben der Zelle, ist, dass der Vorgang von der Zelle selbst aktiv ausgeführt und das umliegende intakte Gewebe dabei geschützt wird. Bei der Nekrose schwillt die Zelle an, die Membran wird zerstört und ein Austreten der Zellorganellen und Enzymen zieht das umliegende Gewebe in Mitleidenschaft. Bei der Apoptose, welche durch Traumata, Hypoxie oder Zytokine aktiviert wird, schrumpft die Zelle langsam (Kerr et al., 1972) und es findet eine geordnete Zerlegung der DNA durch Endonukleasen statt (Haslett, 1997). Die Schlüsselenzyme, durch die die Apoptosekaskade aktiviert wird, sind proteolytische Enzyme aus der Familie der Caspasen (Thornberry u. Lazebnik, 1998). Über Initiator-Caspasen werden Effektor-Caspasen angeschaltet (Alberts et al., 2008; Van De Water et al., 2004), was als sicheres Ereignis genutzt wird, um Zellen mit ausgelöster Apoptose immunhistologisch nachzuweisen. Das Effektor-Enzym, das hier nachgewiesen wird, ist die aktivierte Caspase-3. Eine andere Möglichkeit apoptotische Zellen mit Zellkerndegeneration nachzuweisen ist die TUNEL-Methode. Dabei wird ein spezifisches Enzym an die Hydroxygruppen der geschädigten DNA-Fragmente angelagert und unter Fluoreszenz sichtbar gemacht (Gavrieli et al., 1992). Allerdings detektiert das Verfahren auch eine hohe Rate an falsch-positiven Zellen, die der Nekrose erliegen (Frankfurt u. Krishan, 2001). Im Endometrium der Stute wurden apoptotische Vorgänge bereits mit beiden Methoden nachgewiesen (Roberto da Costa et al., 2007).

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Der Versuch gliederte sich in die standardisierte Probengewinnung und den analytischen Teil.

Die Probengewinnung umfasste die Präparation und Spülung der Uteruslumina. Die Uteri wurden in ihrer Größe vermessen und der Zyklusstand anhand der Sektion der Ovarien und Untersuchung der Funktionskörper bestimmt.

Der analytische Teil bestand aus der Dichtemessung und Lebend-Tot-Färbung der Epithelzellen in den Spülflüssigkeiten. Des Weiteren wurde eine zytologische Untersuchung mit den vier Färbeverfahren Diff-Quick, PAP-Quick, May-Grünwald-Giemsa und Gram durchgeführt. Apoptotische Epithelzellen wurden immunhistologisch über das aktivierte Enzym Caspase-3 sichtbar gemacht.

3.2 Probengewinnung und -aufbereitung

3.2.1 Vorbereitung

Als Untersuchungsmaterial dienten Uteri, welche schlachtfrisch von einem Brandenburger Pferdeschlachthof bezogen wurden. Das Material umfasste insgesamt 30 unbeschädigte und nicht tragende Gebärmütter. Klinische Angaben zu den Spendertieren, wie Rasse, Alter und Reproduktionsstatus, waren nicht verfügbar. Der Todeszeitpunkt wurde notiert.

In einem Kühlraum (4°C Raumtemperatur) wurden die schlachtfrischen, gekühlten Präparate mit Skalpell (Klingengröße 20) und Schere von Organ- und Geweberesten befreit und äußerlich grob mit 0,9%iger Kochsalzlösung von Blut, Fett und Schmutz gereinigt. Dabei wurden die Uterushörner bis zum Uteruskörper entlang des breiten Mutterbandes von Gewebe freipräpariert sowie Vagina und Vulva 2-3 cm caudal des palpatorisch fühlbaren äußeren Muttermundes abgesetzt. Es wurden anschließend die Höhe und Breite von Uteruskörper und -hörnern, die Größe der Ovarien sowie die Stangenbreite der Hornaufhängung erfasst. Die Hornlänge wurde von der Uterushornspitze bis zur Bifurkation gemessen, der Uteruskörper von der Bifurkation bis

Material und Methoden

zum palpatorisch fühlbaren inneren Muttermund. Die Breite beider Strukturen wurde locker hängend gemessen (Abb. 1).

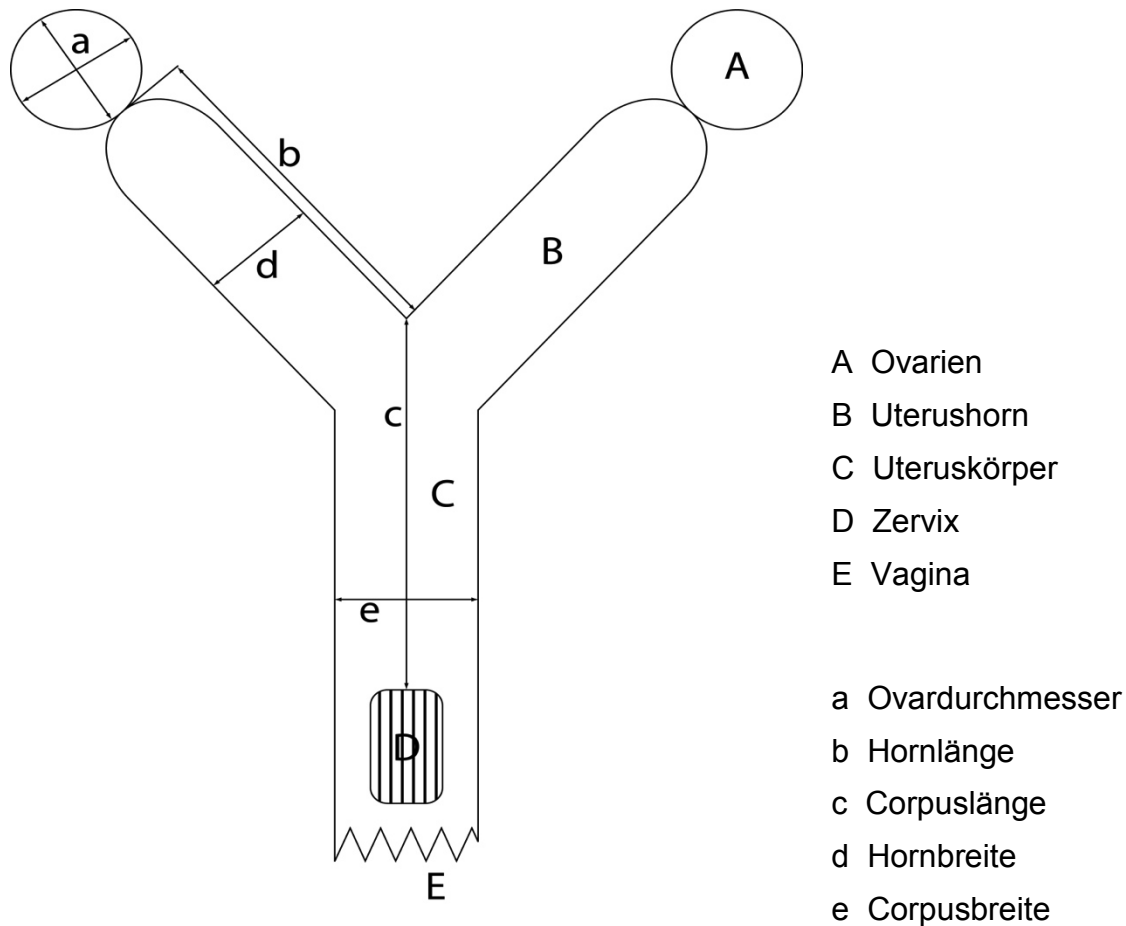


Abb. 1: Vermessung von Uterus und Ovarien

Die Innenfläche der Gebärmutter konnte mit den Vermessungsparametern Corpuslänge und -breite sowie Hornlänge und -breite näherungsweise berechnet werden (Abb. 2). Somit konnte die Oberfläche der Uterusschleimhaut, beziehungsweise des Endometriums dokumentiert werden.

$$\begin{aligned}
 & \left(\text{Corpus } \varnothing \cdot \sqrt{\text{Horn } \varnothing^2 - \left(\frac{\text{Corpus } \varnothing}{2} \right)^2} \right) \\
 & + \left(\text{Corpuslänge} \cdot \sqrt{\text{Horn } \varnothing^2 - \left(\frac{\text{Corpus } \varnothing}{2} \right)^2} \right) \\
 & + \left(\text{Hornlänge} - \frac{\text{Horn } \varnothing}{2} \right) \cdot \text{Horn } \varnothing \cdot 2 \\
 & + \left(\frac{\text{Horn } \varnothing^2}{2} \right) \cdot 3,14159265 \cdot 2 \\
 & \hline
 & 100
 \end{aligned}$$

Abb. 2: Formel zur Errechnung der endometrialen Oberfläche

Zur Ermittlung des Zyklusstandes wurden die Ovarien mit einem Skalpell aufgeschnitten und deren Funktionskörper analysiert. Es wurde das Vorhandensein eines oder mehrerer Gelbkörper festgehalten, multiple Follikel wurden mit Durchmesser angegeben, von dominanten Follikeln wurden die beiden maximalsten Durchmesser im rechten Winkel zueinander notiert.

3.2.2 Uterusspülung

Um eine standardisierte, stabile Positionierung der Gebärmutter während der Spülungen zu erzielen, wurden die Uteri mittels Kabelbinder (200 x 4,6 mm, LUX-Tools, Wermelkirchen, Germany) nahe den Hornspitzen an dieser Vorrichtung fixiert. Mithilfe an der Konstruktion angebrachter Messbänder, konnten Höhe und Breite der Uterusaufhängung während der Instillation, des Schwenkens der Gebärmutter und schließlich der Rückgewinnung der Spülflüssigkeit immer in nachvollziehbar konstanter Positionierung gehalten werden.

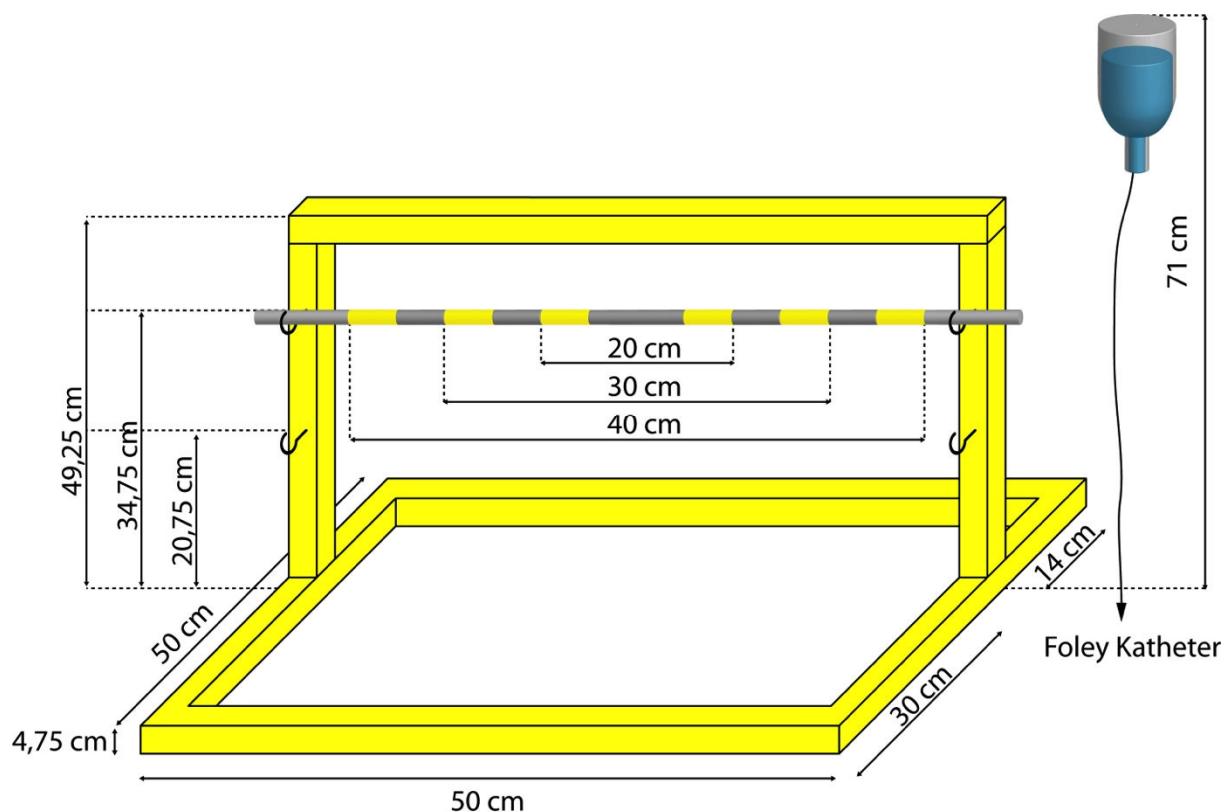


Abb. 3: Uterus-Spülvorrichtung

Die Vorrichtung (Abb. 3) bestand aus Holzleisten, die einen quadratischen Grundkörper mit den Maßen 50 x 50 cm bildeten und einem rechteckigen Bogen in der Höhe von 49,25 cm und Breite von 50 cm, der im hinteren Drittel des Grundkörpers angebracht war.

An diesen Bogen wurden jeweils zwei Hakenschaublen in die beiden vertikalen Leisten in 20,75 und 34,75 cm Höhe angebracht. Eine Metallstange zur Befestigung der Uterushörner konnte somit eingesetzt und in der Höhe variiert werden.

Markierungen im Abstand von 20, 30 und 40 cm auf der waagrechten Stange ermöglichten, dass jeder Uterus, individuell der Größe angepasst, an den Hornspitzen aufgehängt und die verwendete Stangenbreite dokumentiert werden konnte. Ziel war es, die Hörner für jede Spülung in möglichst gestreckter Position aufzuhängen und eine Neigung der Uterushörner nach kraniodorsal, ähnlich der Situation intra vitam, zu erreichen.

Ein Foley-Katheter (10,0 x 300 mm, Cuff 5-15 ml, Teleflex Medical GmbH, Kernen, Germany) wurde in die Zervix eingeführt und vor dem inneren Muttermund mit 15 ml

Material und Methoden

Luft geblockt, um ein geschlossenes System zu schaffen. Der Katheter wurde modifiziert, indem die Spitze mit den beiden lateralen Flüssigkeitseintrittslöchern direkt auf Höhe des kranialen Endes des Ballonkatheters abgesetzt wurde, so dass sich bei Luftinsufflation eine nach kranial gerichtete, breite Öffnung auf Niveau des Ballons befand (Abb. 4).

Um eine weitere Barriere gegen Flüssigkeitsaustritt aus dem Uteruslumen zu schaffen, wurde ein Kabelbinder (290 x 4,6 mm, LUX-Tools, Wermelkirchen, Germany) zirkulär um die Zervix, einschließlich des darin befindlichen Foleykatheters, geschnürt (Abb. 5).

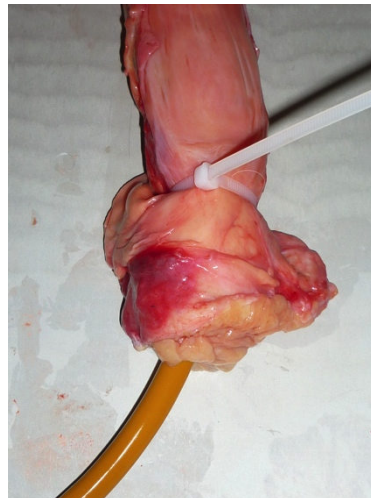


Abb. 4: modifizierter Ballonkatheter

Abb. 5: Schutz vor Flüssigkeitsaustritt, Zervix

Abb. 6: Uterus in Spülvorrichtung

Zur Flüssigkeitsinstillation wurde der Uteruskörper auf ein 4,75 cm über Bodenniveau befindliches Tablett auf dem Grundgerüst der Spülvorrichtung positioniert. Die Uterushörner wurden an der waagrechten Spülstange fixiert, welche für diese Prozedur immer auf einer Höhe von 16 cm über Tablett- und Korpus- bzw. 20,75 cm über Bodenniveau befestigt war (Abb. 6).

Mit einem Infusionsbesteck (Braun, Melsungen, Germany) wurden 250 ml Ringer-Infusionslösung (Braun, Melsungen, Germany) an das Ende des Foley-Katheters angeschlossen und unter Schwerkraft komplett in den Uterus instilliert, wobei die Infusionsflasche in dieser Phase immer auf einer Höhe von 67 cm über Tablett- bzw. 71 cm über Bodenniveau fixiert war. Der Zeitpunkt der Spülung wurde notiert.

Material und Methoden

Der Instillation folgte eine standardisierte Schwenkphase von 2 Minuten, in welcher die Uteri alle 30 Sekunden alternierend zuerst für 5 Sekunden am Körper nach kaudodorsal und 30 Sekunden später für 5 Sekunden an den Hörnern nach kraniodorsal angehoben wurden. Dadurch wurde erreicht, dass pro Schwenkung der Flüssigkeitsspiegel im Uterus jeweils von den Hörnern in den Körper und wieder zurück gelangte.

Die Flüssigkeit wurde nach der Schwenkphase über die große Öffnung des Foley-Katheters schwerkraftgesteuert in einen gläsernen Meßzylinder (250 ml, Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany) abgelassen, wobei der Uterus für diese Prozedur mit seinen Hornspitzen immer auf einer Höhe von 30 cm über Tablettniveau aufgehängt wurde. Im Falle einer Unterbrechung der Flüssigkeitsrückgewinnung wurde der Katheter, ähnlich wie unter Praxisbedingungen, gedreht oder vorsichtig kranial des inneren Muttermundes vorgeschoben und zurückgezogen.

Die Rückgewinnung der Spülflüssigkeit wurde als abgeschlossen betrachtet, wenn ein Volumen von 225 bis 250 ml erzielt wurde, kein spontaner Flüssigkeitsaustritt mehr stattfand und der Uterus adspektorisch nicht mehr mit Flüssigkeit gefüllt war.

Die beschriebene Vorgehensweise wurde pro Uterus dreimal in Folge durchgeführt, so dass von jedem Organpräparat drei Spülsubstrate gewonnen wurden.

Die erhaltenen Volumina, Farbe, Konsistenz und eventuell vorhandene Beimengungen wurden bei jeder Durchführung dokumentiert. Das Volumen wurde am Messzylinder abgelesen. Die Farbe der Flüssigkeit wurde im gläsernen Gefäß vor weißem Hintergrund beurteilt und mit Worten beschrieben. Die Konsistenz wurde vor dunklem Hintergrund beurteilt und mit einem Score von 0 bis 3 (0 = wässrig, klar, 1 = wässrig, gerade sichtbare Trübe, 2 = wässrig, sichtbare Trübe, 3 = wässrig, deutlich sichtbare Trübe, noch nicht molkig) bewertet. Als Beimengungen wurden adspektorisch sichtbare Partikel definiert und entsprechend ihres Charakters beschrieben.

Die Osmolalität jeder Spülcharge wurde mit einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Germany) gemessen, indem vor der Zentrifugation je 1 ml des Ursprungssubstrates abgenommen und 50 µl für die Messung verwendet wurde. Vor jedem Versuchsdurchlauf wurde die Osmolalität der Ringer-Infusionslösung gemessen und dokumentiert. Die Osmolalität ist ein Messwert, der die Teilchenzahl von osmotisch wirksamen Substanzen in einem Kilogramm Lösungsmittel widerspiegelt und diente in diesem Versuch der Selbstüberprüfung, damit die Probe als gültig betrachtet werden konnte.

3.3 Zytologie

3.3.1 Zelldichte

Die Spülflüssigkeiten wurden konstant bei einer Temperatur von 4 °C weiter bearbeitet: zuerst die der ersten, dann die der zweiten und zuletzt die der dritten Spülung pro Gebärmutter.

Von jeder Spülcharge wurde anfangs 1 ml Flüssigkeit in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen für die Osmolalitätsmessung der Ursprungssubstanz aufbewahrt. Dann wurde die Spülflüssigkeit mit einem gläsernen Messzylinder (100 ml, Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany) in 50 ml-Aliquots in Falconröhrchen (50 ml, Greiner BIO ONE GmbH, Frickenhausen, Germany) aufgeteilt und zentrifugiert (4°C, 2000 g, 10 min, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Germany).

Der Überstand über dem Zellpellet wurde vollständig abpipettiert. Das Pellet wurde dann einem Quick-Run bis zum Erreichen von 2000 g unterzogen, um Flüssigkeitsreste an der Innenseite des Röhrchens zu beseitigen. Der wenige Überstand wurde wiederum abpipettiert. Mit Ringer-Infusionslösung (Braun, Melsungen, Germany) wurde dann eine Resuspension des Zellpellets hergestellt. Die Flüssigkeitsmenge dafür war entweder 5 oder 1 ml bzw. 500 oder 100 µl und wurde so gewählt, dass die Zellen sich in der Zählkammer als möglichst gut zählbar darstellten. Waren die Zellen zu dicht gelagert oder überlagerten sich, wurde die Verdünnung erhöht. Das verwendete Resuspensionsvolumen wurde jeweils im Protokoll festgehalten und ergab als Divisor des Ursprungsvolumens einen Konzentrationsfaktor (KF). Mit diesem wurde eine Berechnung vorgenommen, die die Zelldichte pro µl Originalsubstrat angab (Tab. 1).

Die Resuspension wurde mit Trypanblau-Lösung (Sigma-AldrichChemie GmbH, Steinheim, Germany) im Verhältnis 1:1 gefärbt und in das Zählfach einer Zählkammer nach Bürker-Türk verbracht. Es ergab sich dadurch ein Verdünnungsfaktor von 2. Unter Phasenkontrastmikroskopie (Nikon H550S, Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) wurden die vorhandenen Epithelzellen und Blutzellen in 200facher Vergrößerung gezählt. Der Zeitpunkt der Dichtezählung wurde notiert.

Material und Methoden

Tab. 1: Faktoren zur Resuspension und Trypanblaufärbung

| Volumen Ursprung | Volumen Re-suspension | Konzentrationsfaktor (KF) | Trypanblaufärbung Lösung : Substrat | Verdünnungsfaktor (VF) |
|------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 50 ml | 5 ml | 10 | 1:1 | 2 |
| 50 ml | 1 ml | 50 | 1:1 | 2 |
| 50 ml | 500 µl | 100 | 1:1 | 2 |
| 50 ml | 100 µl | 500 | 1:1 | 2 |

Material und Methoden

Die Zählkammer bestand aus einem Zählfach, das von zwei Hauptkammern mit ihren weiteren Unterteilungen gebildet wurde. Jede Zellsuspension wurde nach demselben Verfahren bearbeitet und gezählt.

In die Zählung der Epithelzellen (EZ) gingen pro Kammerseite je 4 Großquadrate à 16 Felder ein, was pro Seite ein durchzähltes Flüssigkeitsvolumen von 0,4 mm³ ergab. In die Zählung der Blutzellen (BZ) gingen pro Kammerseite auch je 4 Großquadrate aber mit jeweils 25 Kleinfeldern ein, was einem Volumen von 0,016 mm³ entsprach. Aus den Ergebnissen beider Seiten wurde der Mittelwert (MW) gebildet. Die Anzahl der Zellen wurde anschließend auf die Konzentration pro µl des Originalsubstrates rückgerechnet (Tab. 2).

Tab. 2: Berechnung der Epithel- und Blutzellkonzentrationen

| | |
|----------------------------------|--|
| MW (EZ) x 2,5 x VF = C1 (EZ) | C1 (EZ) = Zellzahl EZ / µl Resuspension |
| MW (BZ) x 62,5 x VF = C1 (BZ) | C1 (BZ) = Zellzahl BZ / µl Resuspension |
| C1 x KF = C0 | C0 = Zellzahl (EZ)/(BZ) / µl Originalsubstrat |

Abkürzungen: MW: Mittelwert, EZ: Epithelzellen, VF: Verdünnungsfaktor, BZ: Blutzellen, C0: Konzentration 0, C1: Konzentration 1, KF: Konzentrationsfaktor

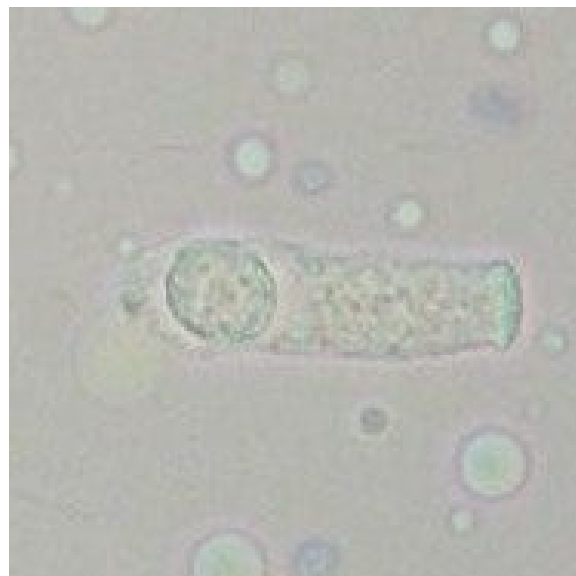
Material und Methoden

3.3.2 Lebend-Tod-Analyse

Parallel zur Dichtezählung wurde unter der Zählkammer eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen mithilfe der Trypanblau-Lösung durchgeführt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), welche nur tote Zellen in einem dunklen Blau-ton anfärbt und Zellen mit intakten Membranen ungefärbt lässt. Transparente Zellen, welche sich darstellen wie im Nativpräparat, wurden als vitale Epithelzellen (vEZ) und Zellen jeglicher Blaustufen als tote Epithelzellen (tEZ) angesprochen. Was gräulich erschien, wurde als fraglich (frEZ) eingestuft (Abb. 7-9).



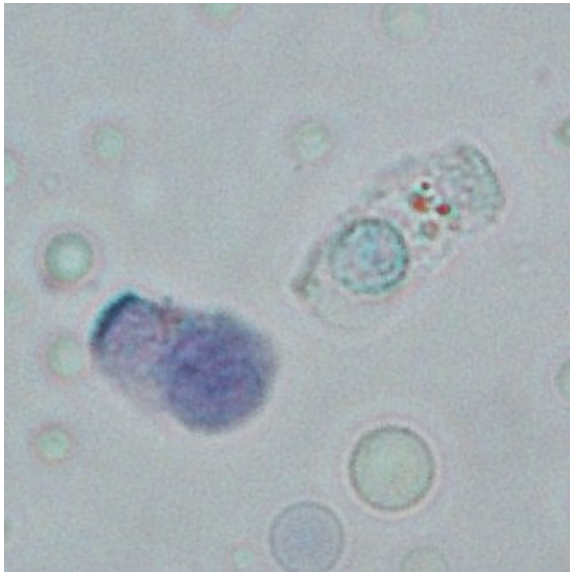
7 - a



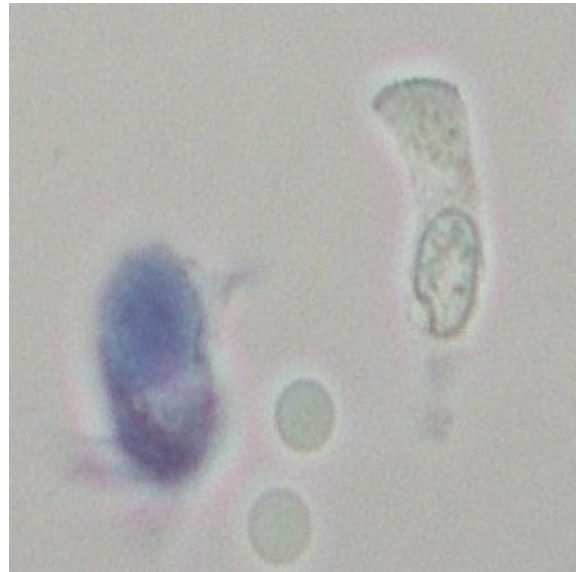
7 - b

Abb. 7: vitale Epithelzellen, 200fache Vergrößerung, Trypanblaufärbung

Material und Methoden



8 - a



8 - b

Abb. 8: vitale und avitale Epithelzelle gemeinsam in einem Bildausschnitt, 200fache Vergrößerung, Trypanblaufärbung



9 - a



9 - b

Abb. 9: avitale Epithelzelle, 200fache Vergrößerung, Trypanblaufärbung

Material und Methoden

Dokumentiert wurden jeweils die absoluten Zahlen der vitalen, fraglichen oder avitalen Zellgruppen, welche in der Summe die Gesamtepithelzellzahl der Dichtezählung ergab. Es konnte damit sowohl die Quantifizierung von vitalen Epithelzellen pro μl Originalsubstrat gemacht werden (Tab. 2), als auch die Rückrechnung auf den prozentualen Anteil an lebenden Zellen im Gesamtepithelzellgehalt (Tab. 3).

Tab. 3: Berechnung der vitalen Epithelzellen

| | |
|---|--|
| $vEZ \times 2,5 \times VF = C1 (vEZ)$ | $C1 (vEZ) = \text{Zellzahl } vEZ / \mu\text{l Resuspension}$ |
| $C1 (vEZ) \times KF = C0 (vEZ)$ | $C0 (vEZ) = \text{Zellzahl } vEZ / \mu\text{l Originalsubstrat}$ |
| $vEZ / (vEZ + tEZ + frEZ) * 100 = vEZ \%$ | $vEZ \% = \text{Prozentanteil der } vEZ \text{ an } EZ$ |

Abkürzungen: vEZ: vitale Epithelzellen, tEZ: tote Epithelzellen, frEZ: fragliche Epithelzellen, VF: Verdünnungsfaktor, C0: Konzentration 0, C1: Konzentration 1

Material und Methoden

3.3.3 Diff-Quick-Färbung

Für alle Färbungen wurden jeweils 4 Ausstriche mit derselben Technik angefertigt.

Ein unverarbeitetes Pellet von 50 ml Ursprungssubstrat wurde nach Zentrifugation (4°C, 2000 g, 10 min, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Germany) von Überstand befreit und je nach adspektorischer Größe mit 100-500 µl Ringer-Infusionslösung resuspendiert. Mit Deckgläsern (21 x 26 mm, Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) wurden 5 µl der Flüssigkeit auf Mattrand-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) in einem 45°-Winkel ausgestrichen und luftgetrocknet. Ziel war es eine möglichst dichte Resuspension herzustellen, so dass ein gleichmäßiger Zellrasen auf dem Objektträger entstand.




Für die Diff-Quick-Färbung (Medion Diagnostics AG, Düringen, Switzerland) wurden die getrockneten Objektträger jeweils 10 Sekunden zuerst in Fixationslösung, dann in Xanthen-Farbstoff und zuletzt in Thiazin-Farbstoff gedippt. Alle Präparate wurden gründlich mit Aqua demineralisata abgespült und luftgetrocknet.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch mit 400facher Vergrößerung (Nikon H550S, Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany). Es wurde die Qualität des Ausstriches bewertet, indem die Intensität der Färbung (blass, kräftig oder überfärbt) und die Abgrenzbarkeit einzelner Zellen (gut, erkennbar oder schlecht) beurteilt wurde. Außerdem wurde notiert ob eine Hintergrundfärbung (ja oder nein) und Färbeartefakte vorlagen (ja, nein, oder am Anfang des Ausstriches).

Material und Methoden

Zur quantitativen und qualitativen Analyse der morphologisch unterscheidbaren Strukturen wurden an 3 verschiedenen Lokalisationen des Objektträgers jeweils 100 Objekte berücksichtigt. Es ergab sich somit pro Objektträger eine angestrebte Gesamtzahl von 300 beurteilten Strukturen (Tab 4). Zuerst wurde dabei der Objektträger am rechten Rand, dann mittig und dann am linken Randbezirk des Ausstriches mäanderförmig durchsucht, bis jeweils 100 Objekte pro Lokalisation gezählt waren. Enthielt der Ausstrich aufgrund zu geringer Dichte nicht genügend Strukturen wurde die Anzahl gesondert notiert.

Tab. 4: Lokalisationen der zytologischen Auswertung

| Lokalisation 1 | Lokalisation 2 | Lokalisation 3 |
|--|--|--|
|  |  |  |

Es wurden 11 verschiedene Typen an isolierten Strukturen beschrieben und quantifiziert. Dabei wurden, wenn anwendbar, als Parameter die Farbe des Zytoplasmas, die Form der Zellränder, das Vorhandensein eines Zellkerns, seine Morphologie und das Größenverhältnis von Kern zu Zytoplasma berücksichtigt (Tab 5, Abb. 10-21).

Es wurde weiterhin angegeben, ob ein Bakterienvorkommen beobachtet wurde oder nicht. Im positiven Falle wurde deren Anordnung (in Gruppen, einzeln, in Ketten, in Trauben), Lokalisation (am Zellrand haftend, nahe Zellkern, in Zelle, frei liegend) und Menge (geringgradig, mittelgradig, hochgradig) beschrieben.

Die Menge des Detritus wurde mit einem Score von 0 bis 3 (0 = kein, 1 = geringgradig, 2 = mittelgradig, 3 = hochgradig) angegeben. Dabei war bei Level 0 überhaupt kein Detritus, bei Level 1 waren geringgradige, bei Level 2 mittelgradige und bei Level 3 hochgradige Mengen zu verzeichnen (Abb. 22a – 25b).

Material und Methoden

Tab. 5: Isolierte Strukturen in der Spülflüssigkeit

| | | |
|--------|------------------|---|
| Typ 1 | (Abb. 10) | klassische Epithelzellstruktur, hochprismatisch, Zilien tragend, ZK rund oder oval, gut von ZP abgrenzbar, Zellrand glatt |
| Typ 2 | (Abb. 11) | kuboide Zellstruktur, ZK dicht, rund, Zytoplasma hell, gut von ZK abgrenzbar, Zellrand glatt |
| Typ 3 | (Abb. 12) | polygonale Zellen, ZK dicht, rund, ZP hell, Zellränder ausgezogen erscheinend |
| Typ 4 | (Abb. 13) | runde Zellstruktur, ZK dicht, rund, fast Zelle füllend, ZP geringgradig heller, schwer vom ZK abgrenzbar, Zellrand glatt |
| Typ 5 | (Abb. 14) | Struktur mit erkennbarer Zellmembran, ZK nicht mehr vom ZP abgrenzbar, deutlich vergrößerte Vakuolen |
| Typ 6 | (Abb. 15) | nicht erkennbare Zellen, beschädigt, überlagert, uneindeutig gefärbt |
| Typ 7 | (Abb. 16) | runde, dichte isolierte Struktur, Zellmembran erkennbar, kein ZP erkennbar |
| Typ 8 | (Abb. 17) | schollig, runde, dichte, isolierte Struktur, keine Zellmembran erkennbar, kein ZK erkennbar, homogen |
| Typ 9 | (Abb. 18) | schollig, runde, aufgelockerte, isolierte Struktur, keine Zellmembran erkennbar, kein ZK erkennbar, homogen |
| Typ 10 | (Abb. 19) | schollig, runde, aufgelockerte, isolierte Struktur, keine Zellmembran erkennbar, kein ZK erkennbar, mit vakuolisierten Einschlüssen |
| PMN | (Abb. 20 und 21) | eindeutig polymorphkernige, neutrophile Granulozyten |

Abkürzungen: ZK: Zellkern, ZP: Zytoplasma

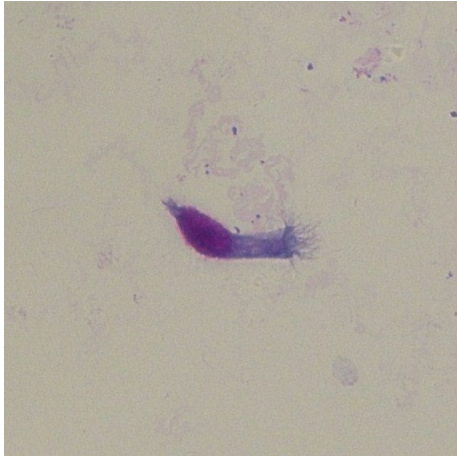


Abb. 10 Typ 1

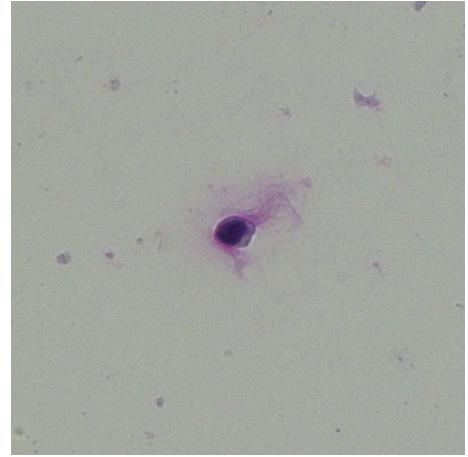


Abb. 11 Typ 2

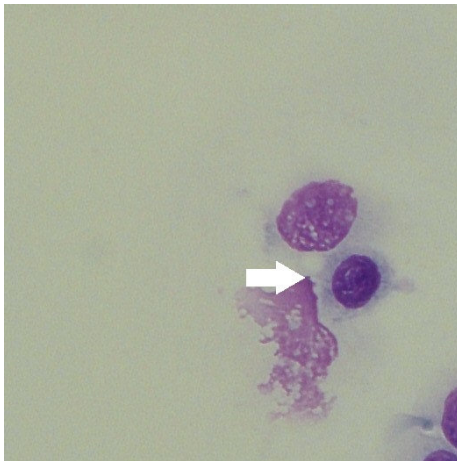


Abb. 12 Typ 3

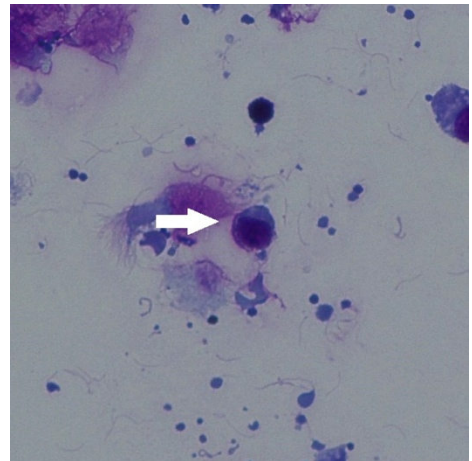


Abb. 13 Typ 4

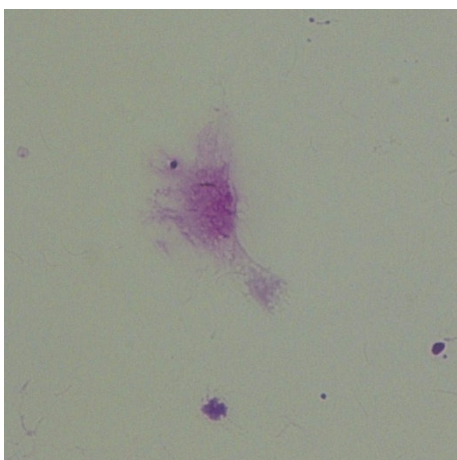


Abb. 14 Typ 5

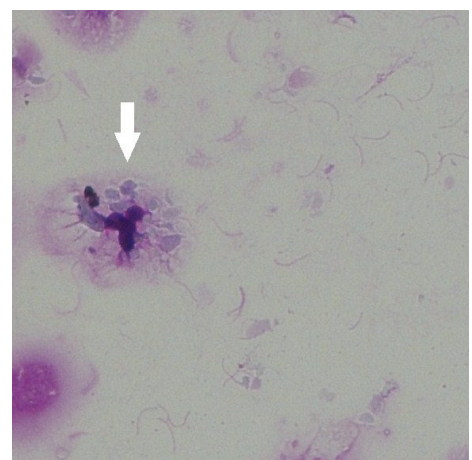


Abb. 15 Typ 6

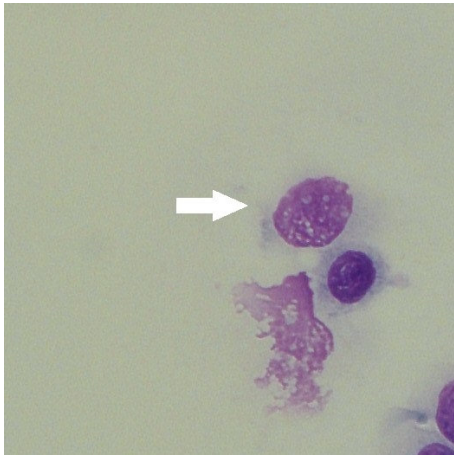


Abb. 16 Typ 7

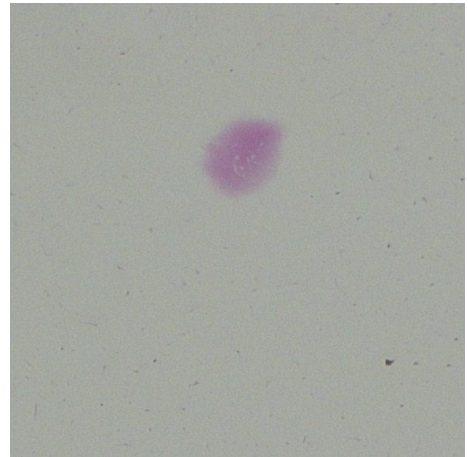


Abb. 17 Typ 8

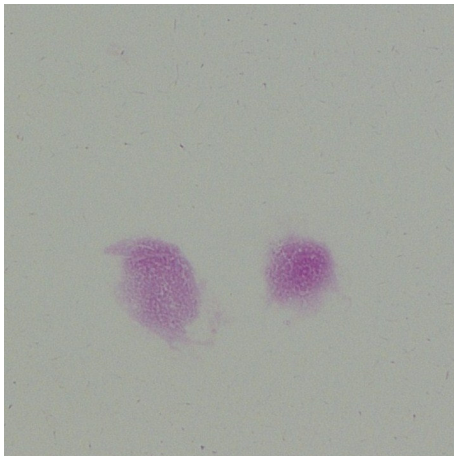


Abb. 18 Typ 9

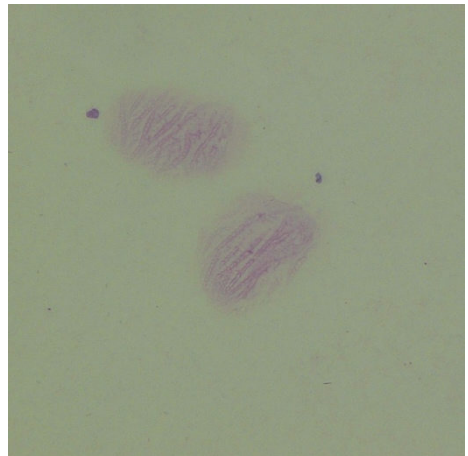


Abb. 19 Typ 10

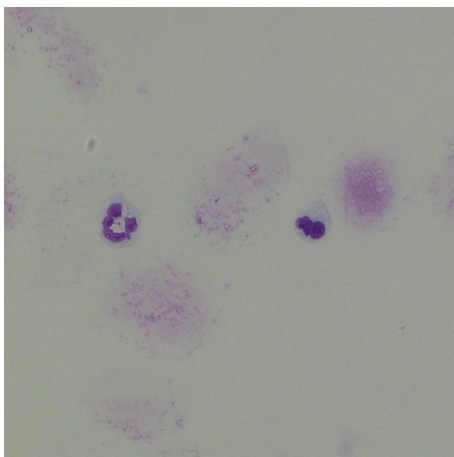


Abb. 20 PMN

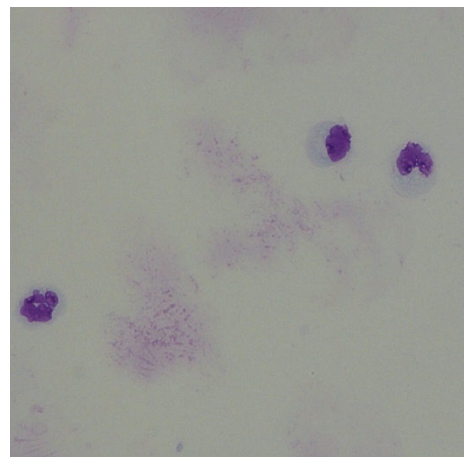


Abb. 21 PMN

Material und Methoden

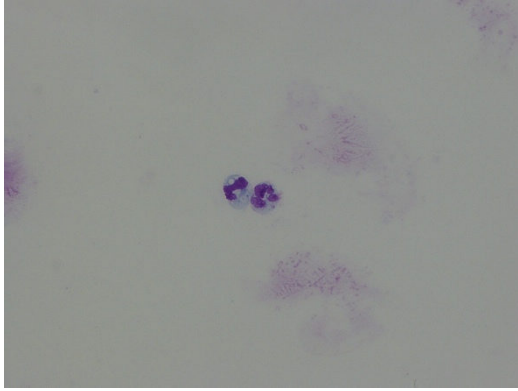


Abb. 22a: Detrituslevel -0

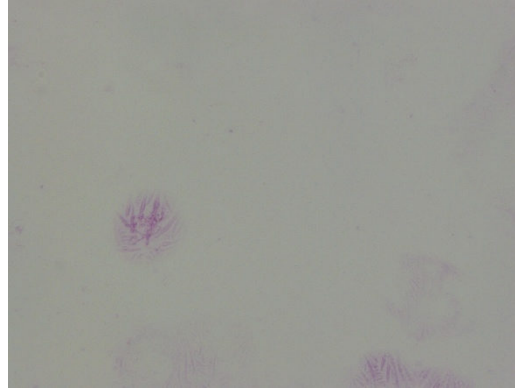


Abb. 22b: Detrituslevel -0

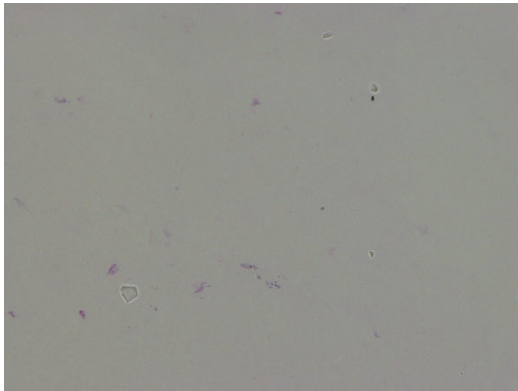


Abb. 23a: Detrituslevel -1

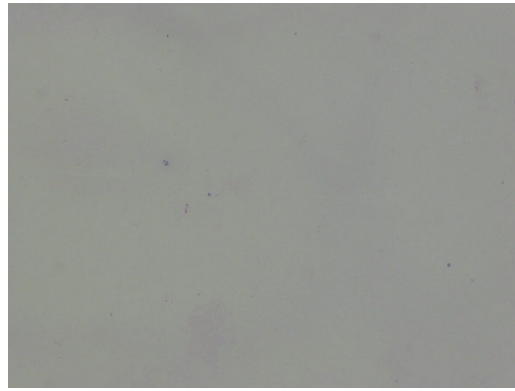


Abb. 23b: Detrituslevel -1

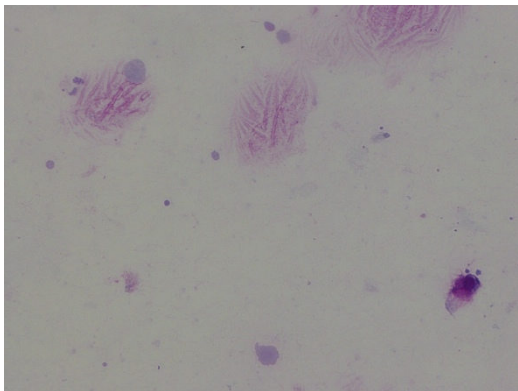


Abb. 24a: Detrituslevel -2

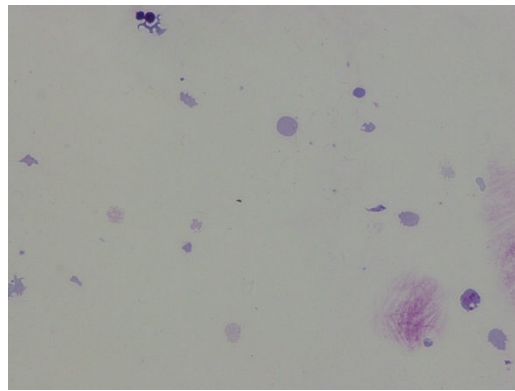


Abb. 24b: Detrituslevel -2

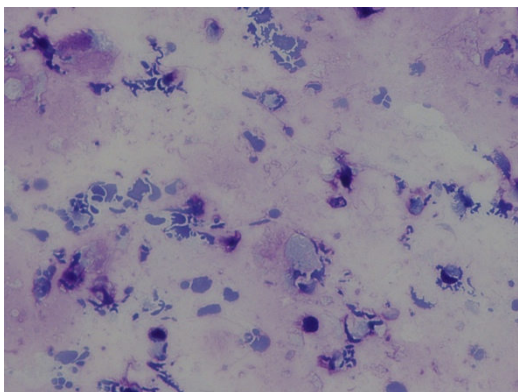


Abb. 25a: Detrituslevel -3

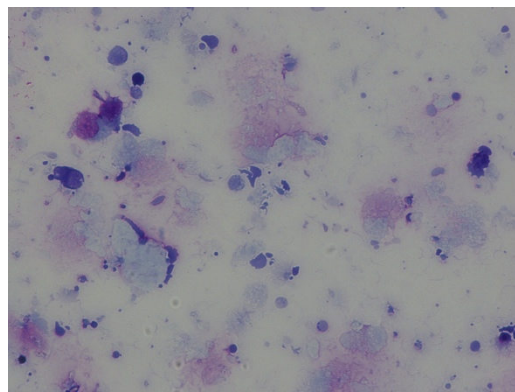


Abb. 25b: Detrituslevel -3

Material und Methoden

3.3.4 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Für die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) wurden die Ausstriche zuerst 2-5 Minuten in May-Grünwald-Lösung belassen, dann wenige Sekunden in Aqua demineralisata geschwenkt, anschließend 20 Minuten in Giemsa-Lösung belassen und zuletzt gründlich mit Leitungswasser abgespült und luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Germany) nach demselben Protokoll wie bei der Diff-Quick-Färbung mit 200facher Vergrößerung.

3.3.5 PAP-Quick-Färbung

Für die PAP-Quick-Färbung (Master Diagnostica, Granada, Spain) wurden die Ausstriche initial 30 Sekunden in Aqua demineralisata gewässert. Die folgenden Färbeschritte waren in der Reihenfolge 2 Minuten FIX-Rapid-Lösung, 10 Sekunden Aqua demineralisata, 1 Minute HEM-Rapid-Lösung, 10 Sekunden Aqua demineralisata, 30 Sekunden phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Lonza, Verviers, Belgium), 10 Sekunden Aqua demineralisata, 10 Sekunden 70%iger Ethanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany), 1 Minute PAP-Rapid-Lösung und 10-30 Sekunden Aqua demineralisata mit anschließender Lufttrocknung.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach demselben Protokoll wie bei der Diff-Quick-Färbung mit 400facher Vergrößerung (Nikon H550S, Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany).

3.3.6 Gram-Färbung

Für die Gram-Färbung (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) wurden die Ausstriche zuerst für 2-3 Minuten großzügig mit Karbol-Gentianaviolett benetzt, dann abgegossen und gründlich mit Aqua demineralisata gespült. Weitere Schritte waren 1 Minute Färbung mit Kaliumjodid-Lösung nach Lugol, Abgießen, gründliches Abspülen mit Aqua demineralisata, Schwenkung in Grams Entfärber-Lösung bis keine Schlieren sichtbar waren, 1 Minute Färbung mit Karbol-Fuchsin-Lösung, Abgießen, gründliches Abspülen mit Aqua demineralisata und anschließender Lufttrocknung.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach demselben Protokoll wie für die Diff-Quick-Färbung mit 400facher Vergrößerung (Nikon H550S, Nikon GmbH, Düsseldorf,

Material und Methoden

Germany). Die Beurteilung der Qualität des Ausstriches und die Quantifizierung des Detritus erfolgten wie bei der Diff-Quick-Färbung. Im Falle von Bakterienvorkommen wurden diese in der Färbung (gram positiv, gram negativ), der Morphologie (kokkoid, stäbchenförmig, sonstiges) und der Menge (geringgradig, mittelgradig, hochgradig) beurteilt. Außerdem wurde die Lokalisation (am Zellrand haftend, nahe Zellkern, in Zelle, frei liegend) und die Anordnung (in Gruppen, einzeln, in Ketten, in Trauben) beschrieben.

3.4 Immunhistologische Färbung der aktiven Caspase-3

3.4.1 Herstellung der Schnittpräparate

Nach Zentrifugation von 50 ml Originalsubstrat wurde jeweils eines der Zellpellets restlos von Überstand befreit und mit 1,5%iger, flüssiger Universalagarose-Lösung (Bio & Sell, Feucht bei Nürnberg, Germany) resuspendiert. Es wurde sofort auf Eis verbracht und nach Erkalten in 5%igem Formalin (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Germany) fixiert. Vierundzwanzig Stunden später erfolgten die automatisierte Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin. Es wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms Schnitte in einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf adhäsive Objektträger (Star Frost, R. Langenbrink, Teningen, Germany) verbracht.

Material und Methoden

3.4.2 Prüfung der Primärantikörper

Als Primärantikörper wurde der unkonjugierte, polyklonale Kaninchen-anti-Human/Maus aktivierte Caspase-3 Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet (Tab. 6).

| Tab. 6: Produktinformation der Caspase-3 Antikörper | |
|--|--|
| Spezies Reaktivität: | Mensch und Maus |
| Spezifität: | unterscheidet apoptotische von nicht-apoptotischen Zellen in der Immunhistochemie; detektiert p17 Untereinheit der Caspase-3 |
| Katalog-Nr.: | AF835 |
| Quelle: | polyklonaler IgG-Antikörper, im Kaninchen hergestellt |
| Aufreinigung: | für Antigenaffinität |
| Immunogen: | synthetisches KLH- gekoppeltes Peptid, der humanen Caspase-3 entsprechend (CRGTELDCGIETD, Zugangsnr: P42574) |

Um zu prüfen, ob der Caspase-3 Antikörper funktionsfähig ist, wurde er an Gewebeschnitten von menschlichen Tonsillen (Abb. 26) und des equinen Gastrointestinaltrakts (Abb. 27) getestet. Die Schnitte wurden entsprechend der Uteruspülsubstrate, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, verarbeitet. Caspase-positive Zellen erkennt man an einer gleichmäßigen, dunklen Braunfärbung.

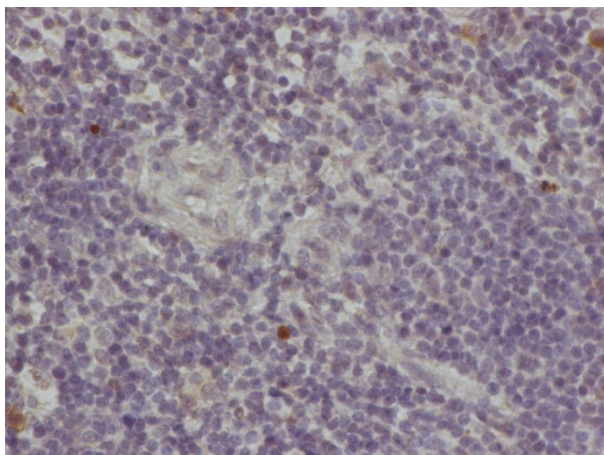


Abb. 26: aktivierte Caspase-3, Tonsillen, Mensch

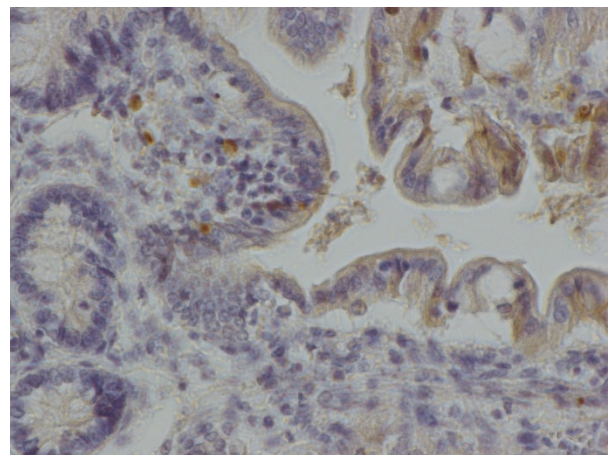


Abb. 27: aktivierte Caspase-3, Darm, Pferd

Material und Methoden

3.4.3 Immunhistochemische Färbung mit dem Vectastain® Elite® ABC-Kit

Um das Enzym aktivierte Caspase-3 darzustellen wurde eine immunhistologische Färbung durchgeführt.

Die Entparaffinisierung der Schnitte erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe gefolgt von der Rehydrierung durch drei aufeinanderfolgende Spülvorgänge in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Proben mit 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol weiterbehandelt. Dieser Schritt ist notwendig, damit das Chromogen DAB später nicht mit der endogenen Peroxidase reagiert und zu falsch-positiven Ergebnissen führt.

Als optionaler Schritt wurde eine Antigen-Demaskierung durch 12minütiges Erwärmen in der Mikrowelle (600 Watt) in 10 mM Zitronensäure bei pH 6,0 durchgeführt.

Zur Proteinblockierung wurden die Schnitte mit Ziegen-Normalserum als 1:5 Verdünnung in PBS-Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt soll verhindern, dass sich der Primärantikörper später in Form von Ionenbindungen an unspezifische Bindungsstellen des Gewebes oder der Zellen anlagert. Es wurde Ziegen-Normalserum verwendet, da der Sekundärantikörper auch aus der Ziege stammt und somit keine spezifischen Bindungen in Form von Immunkomplexen zustande kommen würden.

In einer Verdünnungsreihe in den Verdünnungsstufen von 1:200 bis 1:2000 wurde der unkonjugierte, polyklonale Kaninchen-anti-Human/Maus aktivierte Caspase-3 Primärantikörper (R&D Systems, Minneapolis, USA) auf den Proben getestet, um die beste Arbeitskonzentration zu ermitteln. Das Verdünnungsmedium stellte PBS-Lösung mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) dar. Als optimal und aussagekräftig für die Auswertung gilt, wenn die aktivierte Caspase-3-positiven Zellen als eindeutig erkennbare, braun gefärbte Strukturen vorliegen und der Hintergrund sowie das restliche Gewebe möglichst wenig gefärbt und klar abzugrenzen sind. Es wurde eine optimale Arbeitskonzentration von 1:200 ermittelt und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Ziegen-anti-Kaninchen Antikörper in einer 1:200 Verdünnung mit PBS-Pufferlösung 30 Minuten bei Raumtemperatur verwendet. Er bindet spezifisch an den Primärantikörper, der aus dem Kaninchen stammt.

Material und Methoden

Für die Färbung der aktiven Caspase-3 wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Kit Vectastain[®] Elite[®] ABC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California) nach den Angaben im Protokoll des Herstellers verwendet. Die Gebrauchslösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese beinhaltet Streptavidin, welches sich an das Biotin des Sekundärantikörpers anlagert. Streptavidin ist zusätzlich konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.

Die Inkubation des Chromogensubstrates DAB erfolgte 2 Minuten lang. Durch Zugabe dieses Chromogens, welches als Substrat für die Peroxidase dient, entstand eine braune Farbentwicklung, an den Lokalisationen des gesuchten Antigens.

Nach jedem Arbeitsschritt, außer der Blockierung wurde jeweils dreimal gründlich mit PBS-Pufferlösung gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt. Fortlaufende Schnitte wurden routinemäßig mit Haematoxylin und Eosin gefärbt, um die Verteilung und das Vorhandensein der Zellen im Agarosepellet zu kontrollieren.

4. Ergebnisse

4.1 Uteri

4.1.1 Größe

Die freipräparierten Uteri wiesen von der Bifurkation bis zum inneren Muttermund eine durchschnittliche Corpuslänge von $16,2 \pm 5,3$ cm (Minimalwert: 6,5 cm, Maximalwert: 28,0 cm) auf. Von der Uterushornspitze bis zur Bifurkation war eine durchschnittliche Uterushornlänge von $14,5 \pm 38,3$ cm (Minimalwert: 7,0 cm, Maximalwert: 23,0 cm) zu messen. Das Corpus uteri wies einen mittleren Durchmesser von $4,6 \pm 1,3$ cm (Minimalwert: 2,5 cm, Maximalwert: 9,0 cm) auf, die Uterushörner maßen durchschnittlich $3,5 \pm 1,0$ cm (Minimalwert: 2,0 cm, Maximalwert: 6,0 cm), was bei beiden Strukturen locker hängend gemessen wurde.

4.1.2 Schleimhautoberfläche

Die Gesamtoberfläche des Endometriums konnte mit den Parametern Corpuslänge und -breite, Hornlänge und -breite, sowie mithilfe der Formel aus Abb. 2 näherungsweise errechnet werden. Die durchschnittliche endometriale Oberfläche aller Gebärmütter belief sich nach dieser Formel auf einen Mittelwert von $184,8 \pm 92,6$ cm² (Minimalwert: 52,1 cm², Maximalwert: 461,6 cm²).

4.2 Ovarien

4.2.1 Größe

Die Größe der Ovarien variierte auf beiden Seiten in der Breite zwischen 2 bis 10 cm und in der Länge zwischen 2 – 7,5 cm.

4.2.2 Funktionsgebilde

Bei insgesamt 25 Gebärmüttern wurde mindestens ein funktioneller Gelbkörper auf einem der Ovarien dokumentiert, bei einem Präparat war ein Restgelbkörper in Kombination mit multiplen Follikeln vorhanden. Die Ovarien von insgesamt vier Präparaten wiesen Tertiärfollikel bis zu einem Durchmesser von mindesten 40 mm

Ergebnisse

ohne Gelbkörper auf. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass sich bei der Schlachtung 26 Stuten im Diöstrus und 4 Stuten im Östrus befanden.

4.3 Uterusspülung

4.3.1 Rückgewinnungsvolumen

Bei jeder Gebärmuttersspülung wurden nach Flüssigkeitsinstillation unterschiedliche Volumina an Spülflüssigkeit schwerkraftgesteuert zurückgewonnen. Diese variierten unabhängig von der Größe der Uteri zwischen einem Maximalvolumen von 262 ml, was einem Anteil von 104,8 % entspricht und einem Minimalvolumen von 226 ml, was einem Anteil von 90,4 % der ursprünglich instillierten Menge an Flüssigkeit entspricht. Der prozentuale Anteil des Rückgewinnungsvolumens vom ursprünglich instillierten Volumen nahm mit dem Verlauf der Spülungen 1 bis 3 signifikant zu. Der durchschnittliche Volumenertrag lag bei $244,5 \pm 8,8$ ml ($97,8 \pm 3,5$ %).

Auch die Rückgewinnungsvolumina der Einzelspülungen zeigten eine signifikante Steigerung vom ersten bis zum letzten Durchgang ($p < 0,0001$). Bei der ersten Spülung lag das durchschnittlich erspülte Volumen bei $236,7 \pm 5,3$ ml (Minimalvolumen: 226,0 ml, Maximalvolumen: 248,0 ml), bei der zweiten Spülung bei $246,7 \pm 7,2$ ml (Minimalvolumen: 232,0 ml, Maximalvolumen: 258,0 ml), bei der dritten überschritt der Mittelwert von $250,1 \pm 7,6$ ml (Minimalvolumen: 232,0 ml, Maximalvolumen: 262,0 ml) das Ausgangsvolumen, welches zuvor in die Gebärmutter instilliert wurde (Abb. 28, 29, Tab. 7). Das Rückgewinnungsvolumen wies keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Zyklusstand der Stute auf (Tab. 8).

Tab. 7: Rückgewinnungsvolumina der Spülvorgänge nach Instillation von 250 ml Ringer-Laktat-Lösung

| | Spülung 1 | | Spülung 2 | | Spülung 3 | | gesamt | |
|--------------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|--------|--------|-------|
| | ml | % | ml | % | ml | % | ml | % |
| Mittelwert | 236,73 | 94,69 | 246,70 | 98,68 | 250,10 | 100,04 | 244,51 | 97,80 |
| Standardabweichung | 5,32 | 2,12 | 7,17 | 2,87 | 7,62 | 3,04 | 8,80 | 3,52 |

Einheiten: ml: erspültes Volumen je Spülvorgang in Milliliter, %: erspülter Anteil des instillierten Volumens in Prozent

Ergebnisse

Tab. 8: Zusammenhang zwischen Rückgewinnungsvolumen und Zyklusstand

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| | p | p | p |
| Volumen ml | 0,758 | 0,462 | 0,518 |
| Volumen % | 0,758 | 0,462 | 0,518 |

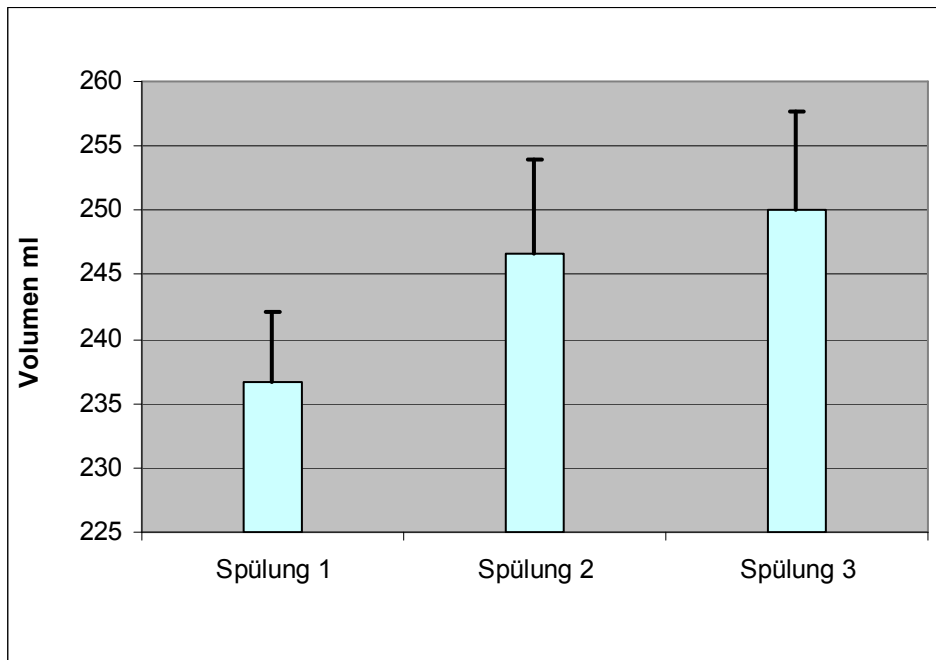


Abb. 28: Volumina der Spülvorgänge 1 bis 3 in ml

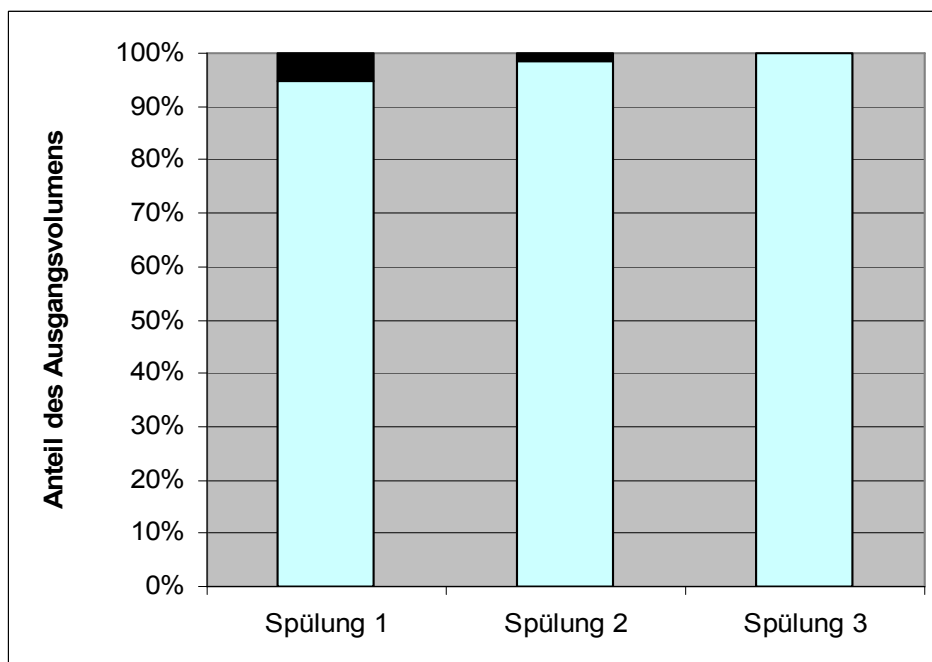


Abb. 29: Volumina der Spülvorgänge 1-3 in Prozent des Ausgangsvolumens

Ergebnisse

4.3.2 Konsistenz der Spülflüssigkeit

Die rückgewonnene Flüssigkeit aller Spülungen wurde in einem gläsernen Messzylinder vor dunklem Hintergrund von derselben Person auf ihre Konsistenz beurteilt. Dabei wurde ein Bewertungsschlüssel von 0 bis 3 angewendet.

Betrachtet man alle Spülungen ohne Augenmerk auf deren Chronologie, so ließ sich mit 41,1 % und 37 Counts am häufigsten eine wässrig klare Lösung zurückgewinnen. Dagegen erzielten nur drei Spülungen (3,3 %) eine deutlich sichtbare Trübe (Abb. 30, Tab. 9).

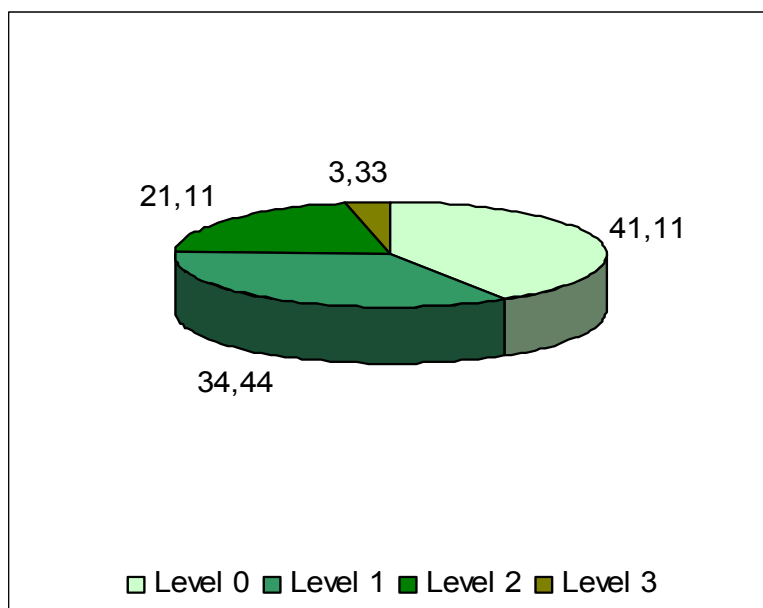


Abb. 30: Konsistenz des Rückgewinnungsvolumen aller 90 Spülungen (Anteile in %)

Tab. 9: Konsistenz der rückgewonnenen Spülflüssigkeit aller 90 Spülungen

| Konsistenz | Beschreibung | n | % |
|------------|-----------------------------------|----|-------|
| Level 0 | wässrig, klar | 37 | 41,11 |
| Level 1 | wässrig, gerade sichtbare Trübe | 31 | 34,44 |
| Level 2 | wässrig, sichtbare Trübe | 19 | 21,11 |
| Level 3 | wässrig, deutlich sichtbare Trübe | 3 | 3,33 |

Ergebnisse

Betrachtet man nun die drei Spülvorgänge getrennt, so treten bei Spülung 1 mit einem Anteil von 56,66 % am häufigsten Konsistenzstufen des Level 2 auf, bei der zweiten Spülung treten mit 56,66 % die meisten des Level 1 auf und mit 86,66 % liegt bei Spülung drei der Hauptanteil bei Level 0. Eine deutliche Trübe von Level drei kommt dreimal, jeweils bei der ersten Spülung vor (Tab. 10).

Im chronologischen Verlauf von Spülung 1 bis 3 nimmt die Trübung der rückgewonnenen Flüssigkeit signifikant ab ($p < 0,0001$) (Abb. 31).

Tab. 10: Konsistenz des Rückgewinnungsvolumen von Spülung 1 – 3 im Vergleich

| Konsistenz | Spülung 1 | | Spülung 2 | | Spülung 3 | |
|------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | n | % | n | % | n | % |
| Level 0 | 0 | 0 | 11 | 36,66 | 26 | 86,66 |
| Level 1 | 10 | 33,33 | 17 | 56,66 | 4 | 13,33 |
| Level 2 | 17 | 56,66 | 2 | 6,66 | 0 | 0 |
| Level 3 | 3 | 10,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |

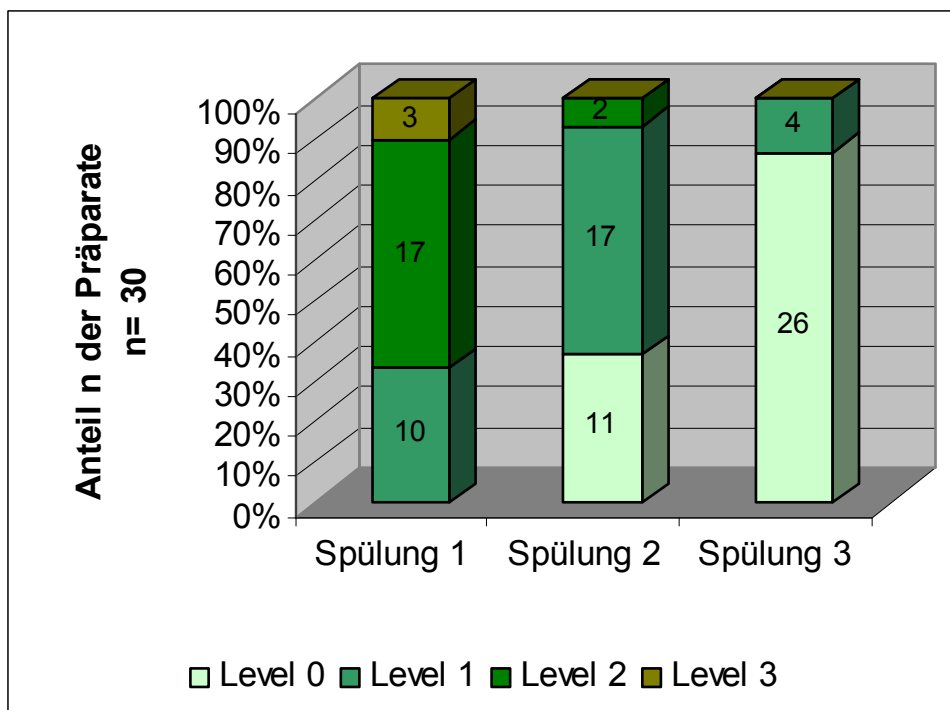


Abb. 31: Konsistenz des Rückgewinnungsvolumen Spülung 1-3 im Vergleich

Ergebnisse

4.3.3 Zeitintervalle

Es wurden die Zeitintervalle zwischen dem Tod des Tieres und der Gebärmutterspülung, zwischen dem Tod und der Zählung vitaler Epithelzellen und zwischen der Spülung und der Zellzählung gemessen. Dabei betrug die Maximaldauer zwischen dem Tod der Stute bis hin zur Zählung der vitalen Epithelzellen 16,5 Stunden. Die Minimaldauer betrug 4,5 Stunden und der Mittelwert wurde mit $10,17 \pm 2,95$ Stunden berechnet (Abb. 32, Tab. 11).

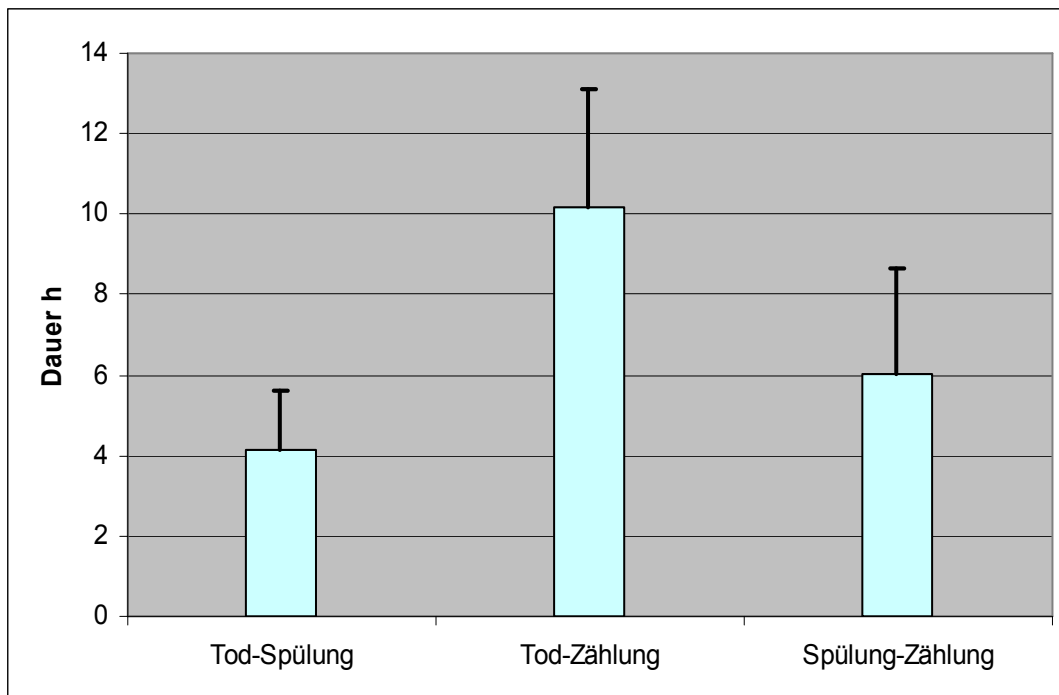


Abb. 32: Zeitintervalle Tod – Spülung – Zellzählung in Stunden

Tab. 11: Zeitintervalle

| | Tod-Spülung | Tod-Zählung | Spülung-Zählung |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| | h | h | h |
| Maximaldauer | 7,50 | 16,50 | 12,90 |
| Mittelwert | 4,13 | 10,17 | 6,04 |
| Standardabweichung | 1,51 | 2,95 | 2,62 |
| Minimaldauer | 2,50 | 4,50 | 1,50 |

Ergebnisse

4.3.4 Osmolalität

Die Osmolalität wurde jeweils aus dem Originalsubstrat zur Selbstüberprüfung gemessen. Zwischen der Osmolalität und der Reihenfolge der Spülungen 1 bis 3 besteht kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,656$). Auch zwischen der Osmolalität und dem Zyklusstadium besteht weder bei Spülung 1 ($p=0,399$), 2 ($p=0,279$) oder 3 ($p=0,098$) ein signifikanter Zusammenhang.

4.4 Zellgehalt der Spüllösung

4.4.1 Epithelzellen

Die Ursprungskonzentration (C_0) der Epithelzellen variierte bei allen Spülungen ohne Berücksichtigung der Chronologie zwischen 0,01 und 620,50 Zellen pro μl Originalsubstrat. Im Durchschnitt betrug sie $59,49 \pm 112,73$ Zellen pro μl .

Betrachtet man alle drei Spülungen isoliert voneinander, so beträgt der Mittelwert der ersten Spülung $113,87 \pm 153,06$ Zellen pro μl , derjenige der zweiten $39,38 \pm 72,54$ Zellen pro μl und der der dritten Spülung $25,22 \pm 74,95$ Zellen pro μl Originalsubstrat (Abb. 33, Tab. 12).

Der Gesamtwert an gewonnenen Epithelzellen pro μl Originalsubstrat nimmt im Laufe von der ersten bis zur dritten Spülung signifikant ab ($p < 0,0001$). Betrachtet man die Gewinnung von Epithelzellen im Zusammenhang mit dem Zyklusstand der Tiere, so weisen Spülung 1 und 2 im Östrus signifikant mehr Zellen auf als im Diöstrus (Tab. 13).

Ebenso steigt bei umso höherer Gesamtzellzahl pro μl der jeweiligen Spülcharge bei Spülung 2 ($p = 0,010$) und Spülung 3 ($p = 0,044$) der durchschnittliche Level der Flüssigkeitstrübung signifikant an. Bei Spülung 1 ist dies nicht der Fall ($p = 0,326$).

Betrachtet man die Korrelation zwischen Epithelzellzahl und der Schleimhautoberfläche der jeweiligen Gebärmutter so besteht diese mit einem Korrelationsfaktor von 0,51 bei Spülung 1. Es besteht ebenso eine signifikante Steigerung der Epithelzellzahl im Originalsubstrat mit zunehmender Uterusgröße bei Spülung 1 ($p=0,004$) (Tab. 14).

Ergebnisse

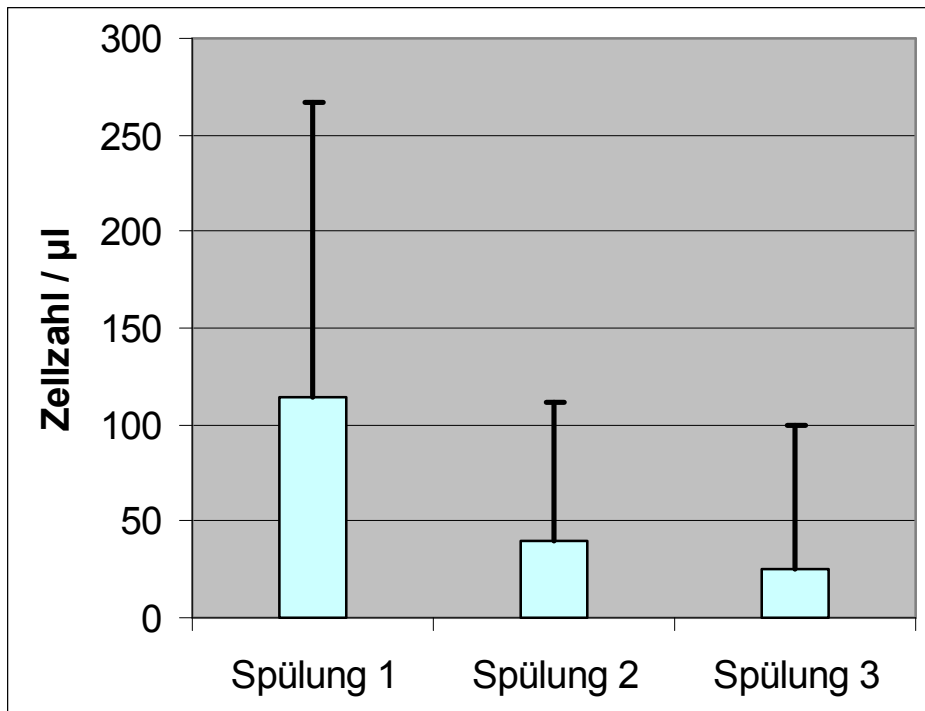


Abb. 33: Epithelzellgehalt der Spülung 1-3 vergleichend

Tab. 12: Epithelzellgehalt der Spülungen 1-3 pro µl Originalsubstrat in Zellen

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| | n | n | n |
| Mittelwert | 113,87 | 39,38 | 25,22 |
| Standardabweichung | 153,06 | 72,54 | 74,95 |

Tab. 13: Zusammenhang zwischen der Epithelzellzahl pro µl Originalsubstrat und dem Zyklusstand

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| | p | p | p |
| EZ /µl | Ö *0,032 | Ö *0,014 | 0,067 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Tab. 14: Zusammenhang zwischen der Epithelzellzahl pro µl Originalsubstrat und der Oberfläche des Endometrium

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| Korrelationswert | 0,506 | 0,351 | 0,131 |
| p- Wert | *0,004 | 0,057 | 0,488 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

4.4.2 Blutzellen

Zur Zählung der Blutzellen wurde dieselbe Resuspension verwendet, wie für die Zählung der Epithelzellen. Da die Dichte der Blutzellen erheblich höher war, als die der Epithelzellen wurden pro Kammerseite je 25 Kleinfelder in den 4 Großquadraten ausgezählt, was ein Flüssigkeitsvolumen von insgesamt $0,016 \text{ mm}^3$ ergab. Das veränderte die Errechnung der Ursprungskonzentration (C_0) um einen Flächenfaktor (Tab. 2), weiterhin wurde jedoch analog zur Zählung der Epithelzellen verfahren.

Die Ursprungskonzentration (C_0) variierte unter allen Spülungen ohne Berücksichtigung der Chronologie zwischen $0,18$ Zellen und 10475 Zellen pro μl . Im Durchschnitt betrug sie $666,54 \pm 1488,56$ Zellen pro μl . Der Mittelwert der ersten Spülung lag bei $1434,29 \pm 2288,18$ Zellen pro μl , der der zweiten bei $413,46 \pm 724,16$ Zellen pro μl und der der dritten Spülung bei $151,88 \pm 300,10$ Zellen pro μl Originalsubstrat. Auch hier nimmt der Zellgehalt im Fortschreiten der Spülungen ab, wobei der Gesamtblutzellgehalt erheblich höher ist als der der Epithelzellen (Abb. 34, Tab. 15).

Es wurde gezeigt, dass die gezählte Anzahl an Blutzellen pro μl Originalsubstrat im Östrus sowohl bei Spülung 1, 2 und 3 signifikant erhöht ist, wenn man diese mit dem Blutzellgehalt im Diöstrus vergleicht (Tab. 16).

Ergebnisse

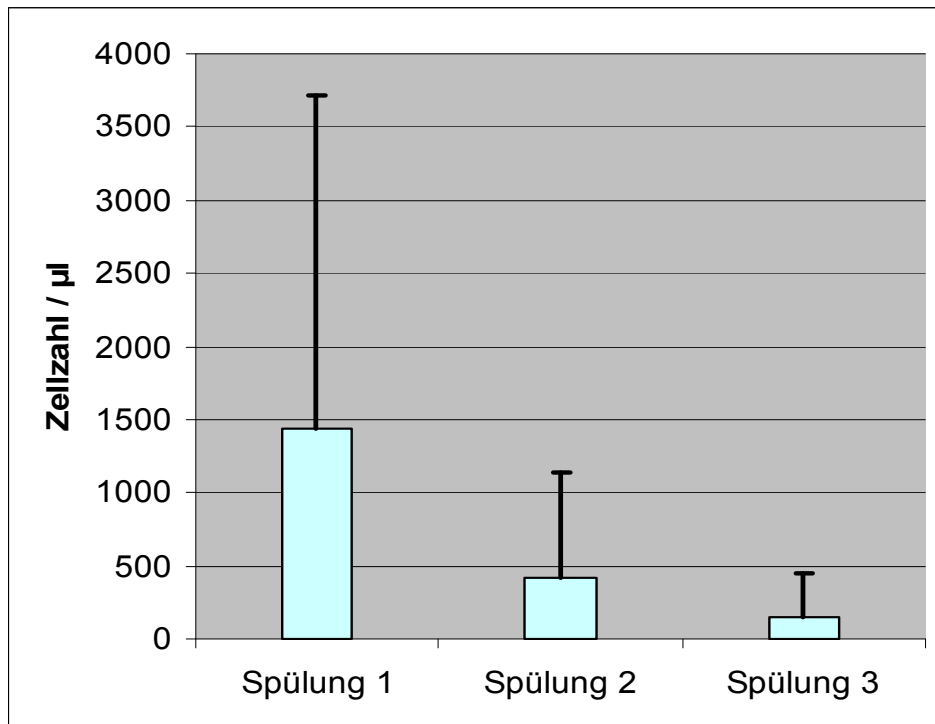


Abb. 34: Blutzellgehalt der Spülung 1-3 vergleichend

Tab. 15: Blutzellgehalt der Spülungen 1-3 pro µl Originalsubstrat in Zellen

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| | n | n | n |
| Mittelwert | 1434,29 | 413,46 | 151,88 |
| Standardabweichung | 2288,18 | 724,16 | 300,10 |

Tab. 16: Zusammenhang zwischen dem Blutzellgehalt pro µl Originalsubstrat und dem Zyklusstand

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|----------------|------------------|------------------|------------------|
| | p | p | p |
| Blutzellen /µl | Ö *0,014 | Ö *0,007 | Ö*0,012 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

4.5 Vitalität der Epithelzellen

4.5.1 Beurteilung unter Trypanblaufärbung

Der durchschnittliche Gehalt aller Spülungen an vitalen Epithelzellen betrug $2,88 \pm 4,62$ %, während durchschnittlich $0,66 \pm 0,80$ % der Zellen als fraglich und $96,45 \pm 5,04$ % als tot eingestuft wurden. Unter den verschiedenen Spülschritten war der höchste mittlere Prozentsatz an vitalen Zellen mit einem Wert von $3,37 \pm 4,87$ bei Spülung 1 zu beobachten. Spülung 2 erbrachte durchschnittlich $3,22 \pm 5,41$ und Spülung 3 $2,05 \pm 3,37$ % vitale Epithelzellen (Abb. 35, Tab. 17).

Vergleichend wurde untersucht ob das Zyklusstadium einen Einfluss auf die Verteilung an vitalen, fraglichen und avitalen Zellen im Spülsubstrat hat. Bei Spülung 2 wurden signifikant erhöht fragliche Epithelzellen, die weder als vital noch avital einzustufen waren, gezählt (Tab. 18).

Die Anteile an vitalen, fraglichen und avitalen Zellen unter Trypanblaufärbung waren im Verlauf der Spülung 1 bis 3 nicht signifikant verändert (Tab. 19).

Zwischen der Dauer der Zeitintervalle vom Tod der Tiere bis zur Zählung der vitalen Epithelzellen und der resultierenden Gesamtzahl an vitalen Epithelzellen besteht ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang.

Tab. 17: Anteile der verschiedenen Epithelzellgruppen in Prozent

| | Spülung 1 | | Spülung 2 | | Spülung 3 | | gesamt | |
|----------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|--------|------|
| | MW | SA | MW | SA | MW | SA | MW | SA |
| | % | % | % | % | % | % | % | % |
| Vital | 3,37 | 4,87 | 3,22 | 5,41 | 2,05 | 3,37 | 2,88 | 4,62 |
| Fraglich | 0,56 | 0,57 | 0,76 | 0,98 | 0,66 | 0,82 | 0,66 | 0,80 |
| Tot | 96,06 | 5,09 | 96,01 | 6,10 | 97,27 | 3,69 | 96,45 | 5,04 |

Ergebnisse

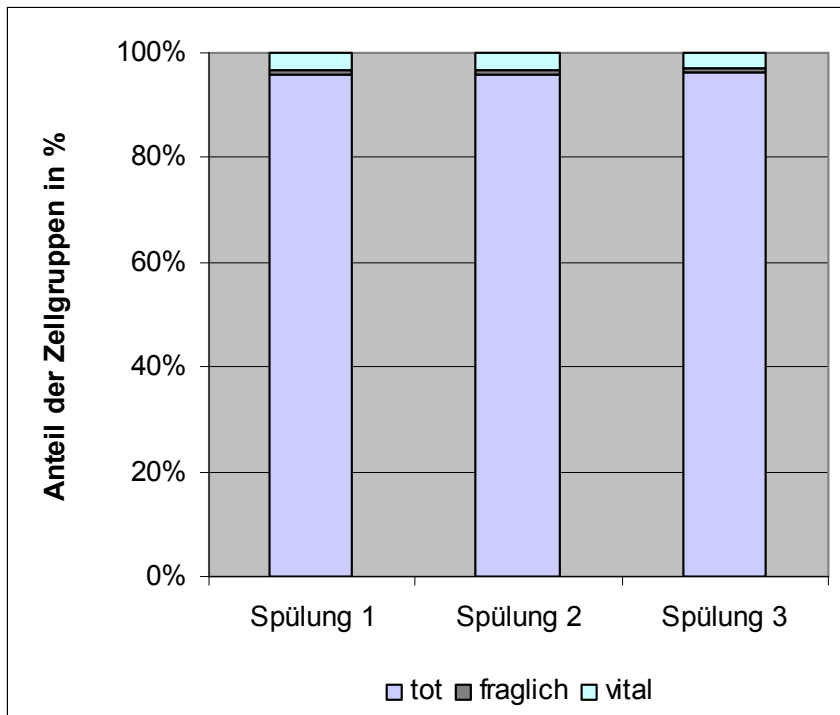


Abb. 35: Anteil der verschiedenen Zellgruppen innerhalb der Gesamtzahl an Epithelzellen

Tab. 18: Zusammenhang zwischen der Vitalität der gewonnenen Epithelzellen und dem Zyklusstand

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| | p | p | p |
| vital % | 0,901 | 0,250 | 0,328 |
| fraglich % | 0,057 | *0,026 | 0,350 |
| avital % | 0,902 | 0,244 | 0,287 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Tab. 19: Zusammenhang zwischen der Vitalität der erspülten Epithelzellen und der Chronologie der Spülungen 1-3

| | p-Wert |
|---------------------------|--------|
| Anteil vitale Zellen % | 0,494 |
| Anteil fragliche Zellen % | 0,852 |
| Anteil avitale Zellen % | 0,496 |

Ergebnisse

4.5.2 aktivierte Caspase-3

Der Anteil an Zellen, der als aktivierte Caspase-3-positiv und somit zum Zeitpunkt der Färbung im Vorgang der Apoptose eingestuft wurde lag bei allen drei Spülungen im Durchschnitt bei $2,14 \pm 2,44$ % (Maximalwert 11,11 %, Minimalwert 0 %). Betrachtet man die drei Spülungen chronologisch, waren bei der ersten Spülung durchschnittlich $2,99 \pm 3,00$ (Maximalwert 11,11 %, Minimalwert 0 %), bei der zweiten $1,84 \pm 1,64$ (Maximalwert 5,04 %, Minimalwert 0 %) und bei der dritten Spülung $1,59 \pm 2,34$ % (Maximalwert 10,26 %, Minimalwert 0 %) der Zellen positiv (Abb. 36, Tab. 20). Der Ertrag an aktivierten Caspase-3-positiven Zellen nahm im chronologischen Verlauf der drei Spülungen ab. Bei Spülung 1 lagen signifikant mehr ($p=0,047$) Caspase 3- positive Zellen vor als bei den Spülungen 2 und 3. Zwischen dem Auftreten von Caspase 3-positiven Zellen und dem Zyklusstadium bestand bei keiner Spülung ein signifikanter Zusammenhang (Tab. 21).

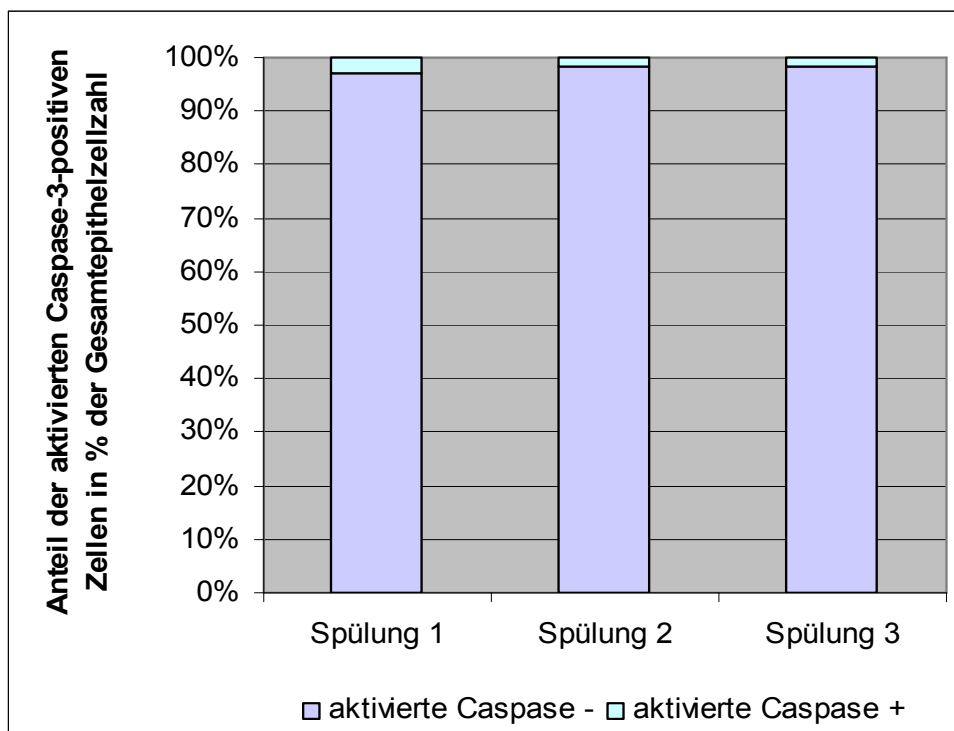


Abb. 36: Anteil der aktivierten Caspase-3-positiven Zellen innerhalb der Gesamt-epithelzellzahl

Ergebnisse

Tab. 20: Anteil der aktivierte Caspase-3-positiven Zellen in Prozent

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | % | % | % | % |
| Mittelwert | 2,99 | 1,84 | 1,59 | 2,14 |
| Standardabweichung | 3,00 | 1,64 | 2,34 | 2,44 |

Tab. 21: Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von aktivierte Caspase-3 positiven Zellen und dem Zyklusstand

| Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|------------------|------------------|------------------|
| p | p | p |
| 0,130 | 0,285 | 0,083 |

Ergebnisse

4.6 Zytologie des Spülsediments

4.6.1 Diff-Quick-Färbung

Jeder der 90 Ausstriche wurde nach vier Qualitätsparametern beurteilt. Die Intensität untergliederte sich in 5 Stufen, wobei eine kräftige Färbung mit Level 2 am häufigsten festzustellen war (Tab. 22).

Tab. 22: Qualität der Ausstriche – Intensität der Färbung – Diff-Quick

| Intensität | Beschreibung | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|-------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | | n | n | n | n |
| Level 0 | nicht beurteilbar | 1 | 2 | 12 | 15 |
| Level1 | blass | 5 | 6 | 2 | 13 |
| Level 2 | kräftig (optimal) | 22 | 20 | 16 | 58 |
| Level 2,5 | kräftig, teils überfärbt | 1 | 2 | 0 | 3 |
| Level 3 | überfärbt | 1 | 0 | 0 | 1 |

Die Intensität der Färbung unterschied sich hinsichtlich der Verteilungen der beiden Scores zwischen der Diff-Quick-Färbung und der PAP-Quick-Färbung bei Spülung 2 signifikant ($p= 0,015$).

Die Abgrenzbarkeit der Objekte untergliederte sich in 4 Stufen von Level 0 bis Level 3 (Tab. 23).

Tab. 23: Qualität der Ausstriche – Abgrenzbarkeit der Objekte - Diff-Quick

| Intensität | Beschreibung | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|-------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | | n | n | n | n |
| Level 0 | nicht beurteilbar | 1 | 2 | 11 | 14 |
| Level1 | gut (optimal) | 27 | 24 | 16 | 67 |
| Level 2 | erkennbar | 2 | 3 | 3 | 8 |
| Level 3 | schlecht | 0 | 1 | 0 | 1 |

Ergebnisse

Vergleicht man die Verteilung der beiden Scores der Diff-Quick-Färbung mit der PAP-Quick-Färbung hinsichtlich der Abgrenzbarkeit der Objekte, so unterschieden sich diese bei Spülung 2 ($p=0,018$) und 3 signifikant ($p=0,048$).

Es wurde pro Ausstrich dokumentiert, ob eine gleichmäßige Hintergrundfärbung vorlag oder nicht. Hinsichtlich dieser unterschieden sich die Verteilungen der beiden Scores der Diff-Quick-Färbung und der May-Grünwald-Giemsa-Färbung in Spülung 3 signifikant ($p<0,001$) (Tab. 24).

Tab. 24: Qualität der Ausstriche – Hintergrundfärbung – Diff-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | n | n | n | n |
| nicht beurteilbar | 1 | 2 | 11 | 14 |
| ohne Hintergrundfärbung | 25 | 27 | 18 | 70 |
| mit Hintergrundfärbung | 4 | 1 | 1 | 6 |

Tab. 25: Qualität der Ausstriche – Färbeartefakte – Diff-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | n | n | n | n |
| nicht beurteilbar | 1 | 2 | 11 | 14 |
| ohne Färbeartefakte | 26 | 28 | 18 | 72 |
| mit Färbeartefakten | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Färbeartefakte am Rand | 1 | 0 | 1 | 2 |

Bezüglich der Färbeartefakte unterschieden sich die Verteilungen der beiden Scores der Diff-Quick-Färbung und der May-Grünwald-Giemsa-Färbung in Spülung 3 signifikant ($p<0,001$) (Tab. 25).

Ergebnisse

Die unterschiedlichen Dichtestufen an Detritus wurden mit einem Score von Level 0 bis Level 3 bewertet (Tab. 26, Abb. 22a - 25b). Mit der Anzahl von 57 Präparaten wurde insgesamt am häufigsten Level 1 als Dichtestufe notiert.

Tab. 26: Detritus – Diff-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|---------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | n | n | n | n |
| Level 0 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| Level 1 | 9 | 22 | 26 | 57 |
| Level 2 | 15 | 6 | 1 | 22 |
| Level 3 | 6 | 1 | 0 | 7 |

Die angestrebte Zahl an isolierten Strukturen pro Objektträger wurde mit 300 Objekten festgelegt. Dabei wurden jeweils 100 Stück an verschiedenen Lokalisationen eines Objektträgers gezählt. Einhundert am rechten Rand, 100 in der Mitte und 100 am linken Rand des Ausstriches (Tab. 4). Der Durchschnittswert lag bei der Diff-Quick-Färbung bei $201,68 \pm 121,74$ (Maximalwert: 300, Minimalwert: 0) Strukturen pro Objektträger, wobei die Anzahl der gezählten Objekte mit der Reihenfolge der Spülungen abnahm (Tab. 27).

Tab. 27: Durchschnittlich gezählte Anzahl isolierter Strukturen pro Objektträger – Diff-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | n | n | n | n |
| Mittelwert | 280,76 | 209,90 | 114,40 | 201,68 |
| Standardabweichung | 67,78 | 109,60 | 120,24 | 121,74 |

Die Gesamtheit aller morphologisch unterscheidbaren Strukturen wurde mit den drei Färbungen Diff-Quick, May-Grünwald-Giemsa und PAP-Quick nach den verschiedenen isolierten Typen (Tab. 5) differenziert und quantifiziert. Mit einem anteiligen Durchschnittswert von $46,05 \pm 30,25$ % der Gesamtobjektzahl wurde bei der Diff-Quick-Färbung der morphologische Typ 10 beobachtet, welcher eine schollige, aufgelockerte, runde Erscheinung mit vakuolisierten Einschlüssen zeigt.

Ergebnisse

Die Struktur, die mit einem Anteiligen Durchschnittswert von $20,02 \pm 23,54$ % der Gesamtobjektzahl am zweithäufigsten gezählt wurde war Typ 1, die klassische, zilien-tragende, hochprismatische Epithelzelle, am dritthäufigsten mit $6,60 \pm 17,35$ % polymorphkernige neutrophile Granulozyten (Tab. 28).

Tab. 28: Durchschnittliche Anteile der verschiedenen Morphologietypen – Diff-Quick

| | Spülung 1 | | Spülung 2 | | Spülung 3 | | gesamt | |
|--------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|--------|-------|
| | MW | SA | MW | SA | MW | SA | MW | SA |
| | % | % | % | % | % | % | % | % |
| Typ 1 | 21,90 | 24,18 | 20,33 | 23,01 | 17,81 | 24,04 | 20,02 | 23,54 |
| Typ 2 | 0 | 0 | 0,01 | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0,03 |
| Typ 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0,16 | 0 | 0,09 |
| Typ 4 | 2,09 | 2,94 | 0,94 | 1,77 | 0,48 | 1,06 | 1,17 | 2,16 |
| Typ 5 | 4,18 | 7,29 | 3,57 | 4,21 | 2,60 | 3,91 | 3,45 | 5,34 |
| Typ 6 | 5,32 | 5,39 | 5,41 | 6,84 | 5,37 | 8,62 | 5,37 | 6,99 |
| Typ 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Typ 8 | 0,46 | 1,41 | 1,80 | 7,27 | 0,90 | 2,86 | 1,05 | 4,57 |
| Typ 9 | 2,11 | 3,99 | 4,51 | 7,92 | 10,60 | 22,23 | 5,74 | 14,13 |
| Typ 10 | 50,86 | 27,44 | 50,24 | 29,91 | 37,05 | 32,17 | 46,05 | 30,25 |
| PMN | 12,08 | 24,08 | 5,45 | 16,03 | 2,27 | 5,92 | 6,60 | 17,35 |

Ergebnisse

Es wurde außerdem untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Strukturtypen innerhalb der Gesamtobjektzahl und dem Zyklusstadium besteht (Tab. 29). Im Östrus kommen bei Spülung 1 und 2 der Diff-Quick-Färbung signifikant vermehrt polymorphkernige neutrophile Granulozyten vor, bei Spülung 3 häuft sich signifikant der Morphologietyp 4, eine runde Zellstruktur mit dichtem Zellkern, der die Zelle fast ausfüllt und schwer vom Zytoplasma abgrenzbar ist.

Tab. 29: Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Morphologietypen und dem Zyklusstadium – Diff-Quick

| Zelltyp | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| | p | p | p |
| Typ 1 | 0,371 | 0,474 | 0,491 |
| Typ 2 | 1,000 | 0,904 | 1,000 |
| Typ 3 | 1,000 | 1,000 | 0,904 |
| Typ 4 | 0,290 | 0,097 | Ö*0,047 |
| Typ 5 | 0,250 | 0,221 | 0,472 |
| Typ 6 | 0,292 | 0,620 | 0,415 |
| Typ 7 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| Typ 8 | 0,421 | 0,479 | 0,884 |
| Typ 9 | 0,215 | 0,419 | 0,492 |
| Typ 10 | 0,321 | 0,624 | 0,597 |
| PMN | Ö*0,033 | Ö*0,028 | 0,052 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

Es wurde weiterhin untersucht, ob im Verlauf von der ersten bis zur dritten Spülung pro Ausstrich eine signifikante Veränderung der Anteile an verschiedenen Morphologietypen zu verzeichnen ist. Bei der Diff-Quick-Färbung nimmt die Anzahl an Objekten vom Morphologietyp 4 und polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten im Verlauf der drei Spülvorgänge signifikant ab (Tab. 30).

Tab. 30: Zusammenhang zwischen dem Anteil der verschiedenen Morphologietypen und der Chronologie der Spülungen 1-3 – Diff-Quick

| | p |
|--------|----------|
| Typ 1 | 0,229 |
| Typ 2 | 0,367 |
| Typ 3 | 0,367 |
| Typ 4 | *0,014 |
| Typ 5 | 0167 |
| Typ 6 | 0,453 |
| Typ 7 | 1,000 |
| Typ 8 | 0,854 |
| Typ 9 | 0,253 |
| Typ 10 | 0,121 |
| PMN | *0,035 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

4.6.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Tab. 31: Qualität der Ausstriche – Intensität der Färbung – May-Grünwald-Giemsa

| Intensität | Beschreibung | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | | n | n | n | n |
| Level 0 | nicht beurteilbar | 0 | 4 | 7 | 11 |
| Level 1 | blaß | 9 | 9 | 12 | 30 |
| Level 2 | kräftig (optimal) | 20 | 17 | 11 | 48 |
| Level 2,5 | kräftig, teils überfärbt | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Level 3 | überfärbt | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tab. 32: Qualität der Ausstriche – Abgrenzbarkeit der Objekte – May-Grünwald-Giemsa

| Intensität | Beschreibung | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | | n | n | n | n |
| Level 0 | nicht beurteilbar | 0 | 4 | 7 | 11 |
| Level 1 | gut (optimal) | 18 | 19 | 17 | 54 |
| Level 2 | erkennbar | 12 | 5 | 6 | 23 |
| Level 3 | schlecht | 0 | 2 | 0 | 2 |

Tab. 33: Qualität der Ausstriche – Hintergrundfärbung - May-Grünwald-Giemsa

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | n | n | n | n |
| nicht beurteilbar | 0 | 4 | 7 | 11 |
| ohne Hintergrundfärbung | 19 | 15 | 18 | 52 |
| mit Hintergrundfärbung | 11 | 11 | 5 | 27 |

Tab. 34: Qualität der Ausstriche – Färbeartefakte - May-Grünwald-Giemsa

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | n | n | n | n |
| nicht beurteilbar | 0 | 4 | 7 | 11 |
| ohne Färbeartefakte | 16 | 10 | 17 | 43 |
| mit Färbeartefakten | 7 | 3 | 1 | 11 |
| Färbeartefakte am Rand | 7 | 13 | 5 | 25 |

Ergebnisse

Tab. 35: Detritus - May-Grünwald-Giemsas

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|---------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | n | n | n | n |
| Level 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Level 1 | 6 | 15 | 28 | 49 |
| Level 2 | 17 | 13 | 2 | 32 |
| Level 3 | 7 | 1 | 0 | 8 |

Der Durchschnittswert an isolierten Strukturen pro Objektträger lag bei der May-Grünwald-Giemsas-Färbung bei $202,18 \pm 118,26$ (Maximalwert: 300, Minimalwert: 0) Stücken pro Objektträger, wobei die Anzahl der gezählten Objekte mit der Reihenfolge der Spülungen abnahm (Tab. 36).

Tab. 36: Durchschnittliche Anzahl isolierter Strukturen pro Objektträger - May-Grünwald-Giemsas

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | n | n | n | n |
| Mittelwert | 281,50 | 199,83 | 125,23 | 202,18 |
| Standardabweichung | 59,18 | 118,34 | 113,03 | 118,26 |

Mit einem anteiligen Durchschnittswert von $20,30 \pm 24,51$ % der Gesamtobjektzahl wurden bei der May-Grünwald-Giemsas-Färbung klassische, hochprismatische, ziliert tragende Zellen vom morphologischen Typ 1 beobachtet (Tab. 37).

Am zweithäufigsten, mit einem Durchschnittswert von $17,65 \pm 18,85$ %, folgte Typ 9 mit schollig, aufgelockerter, homogener Morphologie. Typ 10, morphologisch von Typ 9 nur durch das Vorhandensein von vakuolisierten Einschlüssen ergänzt, trat am dritthäufigsten mit einem Durchschnittswert von $14,64 \pm 17,73$ % der Gesamtobjektzahl auf (Tab. 37).

Ergebnisse

Tab. 37: Durchschnittliche Anteile der verschiedenen Morphologietypen – May-Grünwald-Giemsä

| | Spülung 1 | | Spülung 2 | | Spülung 3 | | gesamt | |
|--------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|--------|-------|
| | MW | SA | MW | SA | MW | SA | MW | SA |
| | % | % | % | % | % | % | % | % |
| Typ 1 | 22,68 | 24,10 | 20,40 | 23,84 | 17,80 | 26,10 | 20,30 | 24,51 |
| Typ 2 | 0,01 | 0,06 | 0,14 | 0,79 | 0,02 | 0,12 | 0,05 | 0,46 |
| Typ 3 | 0,17 | 0,47 | 0,17 | 0,93 | 0,22 | 0,80 | 0,19 | 0,75 |
| Typ 4 | 2,61 | 6,78 | 2,76 | 7,78 | 1,57 | 5,47 | 2,32 | 6,69 |
| Typ 5 | 8,11 | 10,28 | 5,64 | 9,61 | 4,90 | 9,84 | 6,22 | 9,90 |
| Typ 6 | 11,82 | 8,08 | 12,15 | 13,22 | 11,50 | 13,79 | 11,83 | 11,84 |
| Typ 7 | 3,25 | 6,67 | 1,48 | 5,52 | 4,43 | 14,03 | 3,05 | 9,49 |
| Typ 8 | 1,95 | 5,00 | 2,53 | 5,80 | 3,44 | 6,11 | 2,64 | 5,63 |
| Typ 9 | 16,03 | 13,13 | 23,56 | 24,98 | 13,36 | 15,38 | 17,65 | 18,85 |
| Typ 10 | 15,70 | 17,79 | 13,73 | 17,25 | 14,48 | 18,68 | 14,64 | 17,73 |
| PMN | 17,38 | 29,04 | 7,35 | 17,93 | 4,15 | 11,80 | 9,63 | 21,38 |

Tab. 38: Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Morphologietypen und dem Zyklusstadium - May-Grünwald-Giemsä

| Zelltyp | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| | p | p | p |
| Typ 1 | 0,450 | 0,576 | 0,467 |
| Typ 2 | 0,904 | 0,904 | 0,904 |
| Typ 3 | 0,883 | Ö*0,038 | 0,725 |
| Typ 4 | 0,135 | 0,344 | 0,884 |
| Typ 5 | 0,633 | 0,201 | 0,161 |
| Typ 6 | 0,969 | 0,866 | 0,434 |
| Typ 7 | 0,500 | 0,268 | 0,644 |
| Typ 8 | 0,124 | 0,089 | 0,708 |
| Typ 9 | 0,605 | 0,221 | 0,400 |
| Typ 10 | 0,310 | 0,958 | 0,324 |
| PMN | Ö*0,013 | 0,401 | 0,136 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

Bei den östrischen Stuten traten bei Spülung 1 der May-Grünwald-Giemsa-Färbung signifikant gehäuft polymorphkernige, neutrophile Granulozyten auf, bei Spülung 2 war dies der Fall bei isolierten Strukturen vom Morphologietyp 3, polygonalen, ausgezogen erscheinenden Epithelzellen mit dichtem Zellkern (Tab. 38).

Bei der May-Grünwald-Giemsa-Färbung nimmt die Anzahl an isolierten Strukturen vom Typ 7 im Verlauf der drei Spülvorgänge signifikant ab (Tab. 39).

Tab. 39 Zusammenhang zwischen dem Anteil der verschiedenen Morphologietypen und der Chronologie der Spülungen 1-3 – May-Grünwald-Giemsa

| | p |
|--------|----------|
| Typ 1 | 0,182 |
| Typ 2 | 0,999 |
| Typ 3 | 0,157 |
| Typ 4 | 0,175 |
| Typ 5 | 0,085 |
| Typ 6 | 0,277 |
| Typ 7 | *0,001 |
| Typ 8 | 0,633 |
| Typ 9 | 0,115 |
| Typ 10 | 0,637 |
| PMN | 0,088 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

4.6.3 PAP-Quick-Färbung

Tab. 40: Qualität der Ausstriche – Intensität der Färbung – PAP-Quick

| Intensität | Beschreibung | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | | n | n | n | n |
| Level 0 | nicht beurteilbar | 0 | 2 | 9 | 11 |
| Level 1 | blaß | 1 | 2 | 0 | 3 |
| Level 2 | kräftig (optimal) | 29 | 26 | 21 | 76 |
| Level 2,5 | kräftig, teils überfärbt | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Level 3 | überfärbt | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tab. 41: Qualität der Ausstriche – Abgrenzbarkeit der Objekte – PAP-Quick

| Intensität | Beschreibung | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | | n | n | n | |
| Level 0 | nicht beurteilbar | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Level 1 | gut (optimal) | 29 | 26 | 9 | 64 |
| Level 2 | erkennbar | 1 | 2 | 21 | 24 |
| Level 3 | schlecht | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tab. 42: Qualität der Ausstriche – Hintergrundfärbung - PAP-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | n | n | n | n |
| nicht beurteilbar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ohne Hintergrundfärbung | 24 | 27 | 25 | 92 |
| mit Hintergrundfärbung | 6 | 3 | 5 | 8 |

Tab. 43: Qualität der Ausstriche – Färbeartefakte - PAP-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | n | n | n | n |
| nicht beurteilbar | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ohne Färbeartefakte | 28 | 25 | 23 | 76 |
| mit Färbeartefakten | 2 | 5 | 7 | 14 |
| Färbeartefakte am Rand | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ergebnisse

Tab. 44: Detritus - DiffQuick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|---------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | n | n | n | n |
| Level 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Level 1 | 14 | 19 | 25 | 58 |
| Level 2 | 13 | 10 | 5 | 28 |
| Level 3 | 3 | 1 | 0 | 4 |

Der Durchschnittswert an isolierten Strukturen pro Objektträger lag bei der PAP-Quick-Färbung bei $187,31 \pm 128,09$ (Maximalwert: 300, Minimalwert: 0) Stücken pro Objektträger. Hier nimmt die Anzahl der gezählten Objekte mit der Reihenfolge der Spülungen ebenfalls ab (Tab. 45).

Tab. 45: Durchschnittliche Anzahl isolierter Strukturen pro Objektträger – PAP-Quick

| | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 | gesamt |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | n | n | n | n |
| Mittelwert | 274,36 | 201,43 | 86,13 | 187,31 |
| Standardabweichung | 71,73 | 117,44 | 113,06 | 128,09 |

Ergebnisse

Mit einem anteiligen Durchschnittswert von $33,86 \pm 27,33$ % der Gesamtobjektzahl wurden bei der PAP-Quick-Färbung ebenfalls klassische, hochprismatische, ziliert tragende Epithelzellen vom morphologischen Typ 1 beobachtet.

Am zweithäufigsten trat mit einem Durchschnittswert von $20,20 \pm 17,24$ % Typ 6 auf. Dabei handelte es sich um nicht erkennbare, beschädigte oder überlagerte Zellen.

Typ 10, schollig, aufgelockert, mit vakuolisierten Einschlüssen trat am dritthäufigsten mit einem Durchschnittswert von $17,23 \pm 16,60$ % der Gesamtobjektzahl auf. Alle übrigen Strukturtypen waren mit Anteilen unter 5 % vertreten (Tab. 46).

Tab. 46: Durchschnittliche Anteile der verschiedenen Morphologietypen – PAP-Quick

| | Spülung 1 | | Spülung 2 | | Spülung 3 | | gesamt | |
|--------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|--------|-------|
| | MW | SA | MW | SA | MW | SA | MW | SA |
| | % | % | % | % | % | % | % | % |
| Typ 1 | 36,11 | 23,89 | 36,12 | 25,53 | 29,35 | 32,23 | 33,86 | 27,33 |
| Typ 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Typ 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Typ 4 | 4,47 | 5,92 | 2,67 | 5,00 | 1,71 | 5,94 | 2,95 | 5,69 |
| Typ 5 | 4,71 | 6,54 | 3,22 | 4,69 | 3,24 | 6,64 | 3,72 | 6,00 |
| Typ 6 | 22,41 | 10,72 | 22,25 | 17,31 | 15,94 | 21,66 | 20,20 | 17,24 |
| Typ 7 | 0,11 | 0,40 | 0,90 | 4,86 | 0,61 | 2,99 | 0,54 | 3,28 |
| Typ 8 | 0,28 | 1,13 | 0,38 | 1,82 | 0,44 | 2,25 | 0,37 | 1,77 |
| Typ 9 | 1,65 | 3,17 | 3,40 | 7,50 | 1,69 | 6,03 | 2,25 | 5,84 |
| Typ 10 | 19,58 | 14,22 | 18,19 | 13,08 | 13,91 | 21,32 | 17,23 | 16,60 |
| PMN | 9,73 | 16,98 | 5,93 | 13,24 | 3,04 | 10,18 | 6,23 | 13,87 |

Ergebnisse

Bei der PAP-Quick-Färbung traten im Östrus bei Spülung 1 signifikant gehäuft isolierte Strukturen vom Typ 7 und polymorphkernige, neutrophile Granulozyten auf. Bei Spülung 2 häuften sich signifikant runde, dichte Zellstrukturen vom Typ 4 und ebenso polymorphkernige, neutrophile Granulozyten (Tab. 47).

Tab. 47: Zusammenhang zwischen den prozentualen Anteilen der verschiedenen Morphologietypen und dem Zyklusstadium - PAP-Quick

| Zelltyp | Spülung 1 | Spülung 2 | Spülung 3 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| | p | p | p |
| Typ 1 | 0,102 | 0,076 | 0,254 |
| Typ 2 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| Typ 3 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| Typ 4 | 0,167 | Ö*0,021 | 0,205 |
| Typ 5 | 0,406 | 0,217 | 0,706 |
| Typ 6 | 0,351 | 0,862 | 0,388 |
| Typ 7 | Ö*0,019 | 0,813 | 0,813 |
| Typ 8 | 0,813 | 0,725 | 0,813 |
| Typ 9 | 0,334 | 0,678 | 0,548 |
| Typ 10 | 0,394 | 0,071 | 0,555 |
| PMN | Ö*0,031 | Ö*0,112 | 0,227 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

Ergebnisse

Bei der PAP-Quick-Färbung nimmt die Anzahl an Objekten vom Morphologietyp 4, 10 und polymorphkernige, neutrophile Granulozyten im Verlauf der drei Spülvorgänge signifikant ab (Tab. 48).

Tab. 48: Zusammenhang zwischen dem Anteil der verschiedenen Zelltypen und der Chronologie der Spülungen 1-3 – Diff-Quick

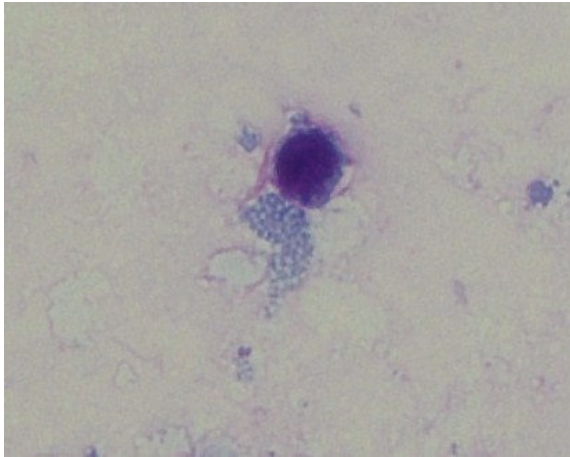
| | p |
|--------|----------|
| Typ 1 | 0,267 |
| Typ 2 | 1,000 |
| Typ 3 | 1,000 |
| Typ 4 | *0,001 |
| Typ 5 | 0,103 |
| Typ 6 | 0,006 |
| Typ 7 | 0,883 |
| Typ 8 | 0,883 |
| Typ 9 | 0,147 |
| Typ 10 | *0,020 |
| PMN | *0,010 |

* Signifikanzniveau = < 0,05

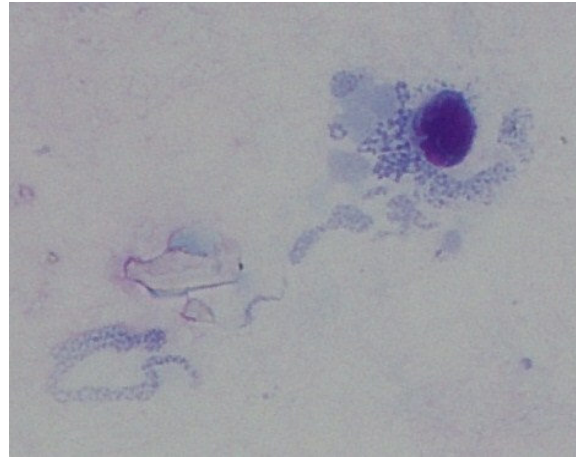
Ergebnisse

4.6.4 Gram-Färbung

Das Vorkommen von Bakterien konnte nur bei den Spülungen 1 und 2 von Uterus 16 festgestellt werden. Es lag eine kokkoide Morphologie und Anordnung in Gruppen vor. Die Bakterien waren frei und in Zellen lokalisiert (Abb. 37a, 37b). Alle übrigen Spülsubstrate zeigten keinerlei Hinweise auf Bakterienvorkommen.



a



b

Abb. 37: Bakterienvorkommen in Uterus 16, Spülung 1 (a) und 2 (b)

5. Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die standardisierte Spülung der Lumina von 30 Uteri Aussagen über die zu erzielende Gesamtzelldichte, die Zusammensetzung der gewonnenen Zellen, im Besonderen über den Anteil an vitalen Epithelzellen im Rückgewinnungssubstrat, und die morphologischen Strukturen zu machen. Die Uterusspülung sollte gerade im Hinblick auf ihre Eignung zur Gewinnung von Zellen für weiterführende Untersuchungen, wie z. B. m-RNA-Analysen, evaluiert werden, da sie sich als wenig invasives und belastendes Verfahren grundsätzlich gut für den wiederholten Einsatz bei Versuchs- und Patientestuten und somit für viele klinisch angewandte Studien eignen würde.

5.2 Uterusspülung

5.2.1 Rückgewinnungsrate

Jede Gebärmutter wurde standardisiert mit 250 ml Ringer-Laktat-Infusionslösung gespült. Alle Uteri waren groß genug, um die gesamte Menge aufzunehmen. Die Rückgewinnungsvolumina variierten zwischen 90,4 % und 104,8 % und lagen durchschnittlich bei 97,8 %. In einer Studie zur Low-Volume-Uterusspülung von LeBlanc (2007) wurde bei einer Anzahl von 401 gespülten Uteri eine Durchschnittsmenge von 56 % des ursprünglich instillierten Volumens von 60 ml zurückgewonnen (LeBlanc et al., 2007).

Die sogenannte Low-Volume-Flush, die Uterusspülung mit einer geringen Menge an Flüssigkeit, wurde etabliert, um mit einem minimalen Volumen an Flüssigkeit eine verlässliche Aussage über den zytologischen Zustand des Endometriums zu machen. Zahlreiche Autoren berichten über die Verwendung von 60 ml Spülflüssigkeit (Ball et al., 1988; Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Walter u. Wehrend, 2009), wobei die Aussagen über das Rückgewinnungsvolumen stark variieren. So berichtet Card (2005) wiederum, dass durchschnittlich 10 % der instillierten 60 ml rückgewinnbar waren (Card, 2005).

Beide Studien wurden am lebenden Patienten durchgeführt und lassen daher auf erschwerte Bedingungen gegenüber den eigenen Untersuchungen am

Diskussion

Schlachtpräparat schließen. Außerdem lässt eine geringere Spülmenge, je nach Größe der endometrialen Oberfläche des Patienten, höhere prozentuale Flüssigkeitsverluste vermuten, da immer ein Anteil der Flüssigkeit an der Schleimhautfläche haften bleibt. Dies wird unterstützt durch die Studie von Kasimanickam (2005), welcher bei Uterusspülungen am Rind feststellte, dass die Rückgewinnungsrate negativ mit dem Durchmesser des Uterus korreliert (Kasimanickam et al., 2005).

Ein Aspekt der hohen Rückgewinnungsrate mag die beliebig lang ausführbare, schwerkraftgesteuerte Entleerung sein. Am Patienten kommt hinzu, dass bei Stuten unterschiedlichster Reproduktionsanamnese der Uterus verschieden anatomisch positioniert sein kann. Das Rückgewinnungsvolumen mit einem Durchschnitt von 97,8 % kann demnach als hoch bezeichnet werden.

Prinzipiell ist eine Uterusspülung sowohl mit einem Liter als auch mit 60 ml Spülflüssigkeit möglich, beide Verfahren ermöglichen die Gewinnung einer repräsentativen Zellfraktion (Dascanio, 2003), allerdings wird in einer weiteren Studie darauf verwiesen, dass ein Volumen von 60 ml vorteilhafter sei, da das erhaltene Zellsediment für die Auswertung zufriedenstellend und die Verarbeitung im Labor erleichtert sei (Roszel u. Freeman, 1988), denn obligatorisch ist immer die komplette Auswertung der rückgewonnenen Flüssigkeit. In der vorliegenden Studie wurde ein Volumen von 250 ml gewählt, um ausreichend Probenmaterial zu gewinnen und alle Reihenversuche mit derselben Spülcharge durchführen zu können.

Im Verlauf von der ersten bis zur dritten Spülung war eine signifikante Erhöhung des Rückgewinnungsvolumens zu verzeichnen. Diese Steigerung ist am wahrscheinlichsten mit dem verbleibenden Restvolumen nach Spülung 1 und 2 im Uterus zu erklären, was bedeutet, dass in Spülung 3 Restflüssigkeit der vorangegangenen Spülung mit gewonnen wurde.

Zwischen der Rückgewinnungsrate und dem Zyklusstand der Tiere bestand in dieser Studie kein signifikanter Zusammenhang, wobei am Schlachtpräparat auch nicht alle Faktoren in Betracht gezogen werden können. Da die Kontraktilität des Uterus der Stute in der späten Lutealphase am höchsten ist (Katila, 1999), könnte in vivo eine höhere Rückgewinnung erwartet werden, was jedoch am Schlachtpräparat nicht überprüfbar ist. In humanmedizinischen Studien wurde bei Uterusspülungen der Frau gezeigt, dass während der Menstruation eine signifikant höhere Menge des Spülvolumens gewonnen werden kann (Hamilton et al., 1998). Ebenso wurde beschrieben,

dass der Rückgewinnungsprozess bei Frauen mit beidseits verlegten Eileitern signifikant erhöht ist (Hamilton et al., 1998).

Für die Stute liegen zu anatomischen Variationen der Papilla uterina des Eileiters keine Untersuchungen im Zusammenhang mit Uterusspülung vor. Basierend auf der Studie von Kasimanickam (2005) ist auch anzunehmen, dass bei pluriparen Stuten, welche über ein größeres Uterusvolumen verfügen, weniger Flüssigkeit rückgewonnen wird. In der eigenen Studie war jedoch über die Reproduktionsanamnese der Tiere nichts bekannt.

5.2.2 Trübung

Die Konsistenz oder Trübung ist ein visueller Eindruck, der durch das Vorkommen von nicht löslichen Partikeln in einer Flüssigkeit entsteht. Die Trübung wurde bei allen Spülungen von derselben Person nach einem Beurteilungsschlüssel ermittelt.

Nur drei aller Proben von Spülung 1 wiesen eine deutliche Trübung (Score 3) auf. Im Verlauf von Spülung 1 bis 3 nahm die Trübung der Spülflüssigkeit signifikant ab. Daher kann im Verlauf mehrerer Spülungen hintereinander auf eine Abnahme an Partikeln in der Flüssigkeit geschlossen werden. Während die Korrelation zwischen Trübung und dem Vorkommen von Bakterien in der Spülflüssigkeit beschrieben wurden (LeBlanc et al., 2007), waren keine Untersuchungen über die Beziehung zur Zelldichte der Epithelzellen im Rückgewinnungssubstrat von Uterusspülflüssigkeiten bei der Stute zu finden.

In der vorliegenden Studie fällt die Höhe des Konsistenzlevels bei Spüldurchgang 2 und 3 parallel mit der durchschnittlichen Gesamtzellzahl signifikant ab. Dass zwischen diesen beiden Parametern ein Zusammenhang besteht, stimmt mit der Feststellung von LeBlanc (2007) überein, dass ein erhöhter Gehalt an Bakterien und/oder Zellen mit einer verstärkten Trübung einhergeht.

5.2.3 Zeitintervalle

Die Zeitintervalle zwischen dem Tod des Tieres und der Zählung der vitalen Epithelzellen variierten zwischen 4,5 und 16,5 Stunden und lagen im Mittel bei 10,17 Stunden. Dies ist dadurch zu erklären, dass pro Schlachttag unterschiedlich viele Stuten geschlachtet und somit unterschiedlich viele Uteri bearbeitet wurden. Lagen weniger Uteri vor, verkürzte sich dementsprechend das Intervall von der Schlachtung bis hin zur Zellzählung. Es bestand allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil an gewonnenen vitalen Epithelzellen und der Länge des Intervalls zwischen dem Tod des Tieres und der Zellzählung im Labor. Im Hinblick auf zukünftige Studien lässt dies den Schluss zu, dass die vitalen Epithelzellen bei Belassung im gekühlten Uterus bis zu 16,5 Stunden bei gleichbleibender Menge und Qualität – zumindest auf Basis der von uns durchgeführten Vitalitätsbestimmung – extrahierbar sind. Bisher liegen keine Beschreibungen zur Überlebensdauer intakter, vitaler equiner Epithelzellen nach Uterusspülung vor. Allerdings berichten mehrere Arbeitsgruppen von der Gewinnung boviner, endometrialer Epithelzellen für die Zellkultur von Uteri, die 10 bis 30 Minuten nach der Schlachtung auf Eis verbracht wurden. Es fehlen jedoch genauere Informationen über den Weiterverarbeitungszeitpunkt im Labor (Fortier et al., 1988; Horn et al., 1998; Skarzynski et al., 2000).

5.3 Zellgehalt der rückgewonnenen Spülflüssigkeit

Die Uterusspülung ist ein Zellgewinnungsverfahren, welches, verglichen mit dem Zytologiebürstchen und der Tupferprobenentnahme, die größere Fläche Endometrium erreicht. Somit ist es bei korrekter Durchführung ein durchaus repräsentatives Verfahren für ein Gesamtzellbild der Gebärmutter und ist sensitiver für die Identifizierung von Stuten mit Endometritis (LeBlanc et al., 2007; Handler, 2008). In dieser Arbeit wurde der Zellgehalt des Rückgewinnungsvolumens mit dem Fokus auf Zelldichte, Zellvitalität und Qualität ermittelt.

Die Gewinnung von Epithel- und Stromazellen zum Zwecke der Zellkultur wurde bereits beim Menschen (Liu u. Tseng, 1979), bei der Ratte (McCormack u. Glasser, 1980), beim Kaninchen (Fortier et al., 1987) und beim Rind (Fortier et al., 1988; Horn et al., 1998; Skarzynski et al., 2000) beschrieben. Diese wurden durch eine Kombination aus enzymatischer und mechanischer Loslösung der Zellen vom Schlachtpräparat extrahiert ohne Informationen zum absoluten Epithelzellgehalt. Die-

Diskussion

ses Verfahren ist jedoch nicht am lebenden Patienten durchführbar und daher nicht vergleichbar mit einer geschlossenen Uterusspülung, da die Zellgewinnung sowohl am freipräparierten Endometrium, als auch mithilfe von Verdauungsenzymen erfolgt.

Die Methode zur Ermittlung des Zellgehalts für die eigenen Untersuchungen wurde in mehreren Vorversuchen getestet und war in Ihrer Reproduzierbarkeit und Genauigkeit überzeugend. Die rückgewonnene Flüssigkeit wurde zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und alle Konzentrations- und Verdünnungsstufen protokolliert, so dass später eine genaue Rückrechnung auf die Zellzahl pro μl der Rückgewinnungsflüssigkeit erfolgen konnte. Anschließend wurde die Resuspension mit der Zählkammer nach Bürker-Türk ausgewertet, wobei hintereinander zuerst die Epithelzellen und anschließend die Blutzellen gezählt wurden. Die manuelle Zellzählung im Hämozytometer ist ein Standardverfahren in naturwissenschaftlichen Forschungseinrichtungen und der Industrie, um Aufschluss über Zellkonzentrationen oder -verteilungen zu erhalten.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, wie sich der Gesamtzellgehalt innerhalb von drei Folgespülungen verändert. Die Menge an gewonnenen Epithelzellen variierte unter allen Spülungen sehr stark mit Werten zwischen 0,01 bis 620,50 Zellen pro μl . Durchschnittlich war ein Ertrag von 59,49 Zellen pro μl zu verzeichnen. Es liegen bislang keine Untersuchungen zu Serienspülungen und deren Zellausbeute vor. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit jeder Folgespülung die Ausbeute an Zellen signifikant abnimmt. Lag der Durchschnitt bei Spülung 1 bei 113,87 Zellen, so betrug er bei Spülung 2 nur noch 39,38 und bei Spülung 3 25,22 Zellen pro μl . Für die routinemäßige Analyse des Zellbildes in der Endometritisdiagnostik ist in der Regel eine einzelne Spülung ausreichend (Ball et al., 1988; LeBlanc et al., 2007). Es liegen jedoch keine Beschreibungen zu Reihenspülungen und deren Gesamtzellgehalt vor.

Betrachtet man den Ertrag an Epithelzellen im Zusammenhang mit dem Zyklusstadium in dem die Spülung erfolgte, so fällt auf, dass sowohl bei Spülung 1 als auch bei Spülung 2 signifikant mehr Zellen im Östrus gewonnen wurden als im Diöstrus. Im Gegensatz dazu beschreibt Lechner (2008) in einer Studie über die Kultivierung von primären bovinen Uterusepithelzellen, dass die tendentiell geringste Zellausbeute im Östrus zu verzeichnen war. Bei dieser Studie wurden Epithelzellen jedoch mechanisch mit einem Metallspatel vom Endometrium losgelöst. Der Nachteil der Zellgewinnung mittels Uterusspülung im Östrus ist der Öffnungsgrad der Zervix. Für

Diskussion

eine möglichst keimarme Extraktion kann der herabgesetzte Tonus des Muttermundes hinderlich sein. Ein geschlossenes Spülsystem ist im Diöstrus eher gegeben, da die Zervix den Spülkatheter hier mit höherem Tonus umschließt. In der vorliegenden Studie wurde die Abdichtung des Systems daher mit einem Kabelbinder, der zirkulär um die Zervix angebracht wurde, unterstützt.

Bei Spülung 1 bestand eine Korrelation zwischen der Innenfläche des Uterus und der Ausbeute an Epithelzellen pro μl . Mit zunehmender, endometrialer Oberfläche ist ein signifikanter Zugewinn an Epithelzellen im Rückgewinnungsvolumen zu beobachten. Der Grund hierfür mag im signifikanten Abfall von Zellen pro μl liegen, der bereits im chronologischen Verlauf jeder Folgespülung gezeigt wurde. Das lässt den Schluss zu, dass mit der ersten Spülung ein für die Schleimhautoberfläche repräsentativer Anteil an Epithelzellen erzielt wurde. Auch hier liegen keine vergleichbaren Studien über die Zusammenhänge zwischen Uterusgröße und Zellgehalt in der Uterusspülflüssigkeit vor.

5.4 Vitalität der Epithelzellen

Es ist bekannt, dass uterine Epithelzellen vom Rind isoliert und in Zellkulturen verarbeitet werden können, um auf Stoffwechselaktivität und die Produktion bestimmter Stoffe wie Prostaglandine (Fortier et al., 1988; Herath et al., 2006) oder Zytokine (de Moraes et al., 1999) untersucht zu werden.

Es ist jedoch nichts über die Vitalität und Stoffwechselaktivität von Epithelzellen der Stute post mortem oder nach Extraktion durch Uterusspülung bekannt. In dieser Studie wurde parallel zur Dichtemessung der Epithelzellen die Vitalität der Zellen im Rückgewinnungssubstrat der Uterusspülung mittels Trypanblaufärbung untersucht. Die manuelle Differenzierung von Zellen mit der Trypanblaufärbung in einer Zählkammer ist ein vielfach angewendetes Routineverfahren in der Arbeit mit Zellkulturen (Lechner 2008; Skarzynski et al., 2000), obwohl es in der Exaktheit von der technisch aufwändigeren Durchflusszytometrie übertroffen wird (Altman et al., 1993; Kim et al., 2011). Im Hämozytometer wird dabei mikroskopisch der Anteil an vitalen, ungefärbten, Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl von nativen und blaugefärbten Zellen ermittelt, um Aufschluß über die Vitalität und somit Qualität der Zellkultur zu erhalten.

Der Gehalt an vitalen Epithelzellen lag bei allen Spülungen im Durchschnitt bei 2,88 % mit einer Spannweite von 0 bis 27,84 %. Die vergleichende Betrachtung zeigt je-

Diskussion

doch, dass im Verlauf von Spülung 1 bis 3 kein signifikanter Abfall dieser Anteile vorliegt. Studien, in denen Epithelzellen mechanisch-enzymatisch zum Zwecke der Kultivierung gewonnen wurden, wiesen eine Vitalität von 90 % beim Kaninchen (Fortier et al., 1987) und bis zu über 95 % beim Rind (Fortier et al., 1988; Skarzynski et al., 2000) auf. Daraus wird deutlich, dass die Methode der Uterusspülung mit PBS ohne weitere Zusätze einen deutlich geringeren Anteil an vitalen Epithelzellen aus dem Substrat hervorbringt, da hier nur ein Maximalwert von 27,84 % erreicht wurde.

Obwohl die Zeitintervalle vom Tod der Tiere bis zur Zellzählung stark variierten, konnte keine signifikante Reduzierung vitaler Zellen mit Verlängerung des Intervalls festgestellt werden. Schulz (1991) berichtet, dass die postmortale Autolyse des Endometriums aufgrund fehlender enzymatischer Aktivität langsamer voranschreitet als in anderen Hohlorganen wie beispielsweise dem Gastrointestinaltrakt. Bei pathologischen Veränderungen, insbesondere wenn im Lumen eine pathologische Sekretfüllung vorliegt, wird diese aber wiederum beschleunigt.

Verschiedene Studien mit bovinen Epithelzellkulturen berichten von verbesserter Zellvitalität bei Entnahme der Zellen im frühen Diöstrus (Fortier et al., 1988; Horn et al., 1998). Es bestand hier jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Zyklusstand der Stuten und dem Anteil an gewonnenen, vitalen Epithelzellen.

In dieser Studie konnte somit kein Parameter beschrieben werden, der eine Extraktion von vitalen Epithelzellen im Rahmen einer Uterusspülung beeinflussen oder begünstigen würde. Für eine Aufreinigung der Epithelzellen im Hinblick auf die Weiterverarbeitung mit Methoden, für die ein hoher Anteil an vitalen Zellen essentiell ist, wäre die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie mit einem Zellsorter anzudenken (Altman, et al., 1993).

5.4.1 Apoptose

Der immunhistologische Nachweis des Enzyms aktivierte Caspase-3 ermöglicht die Identifikation von Zellen, in denen der Vorgang der Apoptose, dem programmierten Zelltod, angeschaltet wurde (Myers u. McGavin, 2007). Es ist der natürliche Prozess der Gewebeerneuerung innerhalb intakter Zellverbände. So findet man apoptotische Zellen vor allem in sich entwickelnden, aber auch in alternden oder entzündeten Geweben (Vaux u. Strasser, 1996).

Diskussion

Die Funktionalität der Antikörper für die immunhistologische Färbung des Enzyms wurde in mehreren Vorversuchen an menschlichem Tonsillen- und an equinem Gastrointestinalgewebe geprüft, da in diesen Geweben physiologischerweise apoptotische Aktivität vorliegt. Die Affinität erwies sich als positiv und reproduzierbar, so dass die Weiterverarbeitung der Epithelzellpellets zu färbbaren Schnittpräparaten erfolgte. Es wurde dabei an Protokolle angelehnt, die in der biologischen Forschung routinemäßig als Basis für weiterführende Tests angewendet werden (Bothe et al., 2008; Leverkus u. Gruber, 2002; Van Cruchten et al., 2003).

Der Anteil an Zellen, in denen das Enzym aktivierte Caspase-3 immunhistologisch nachgewiesen werden konnte, lag bei den erspülten Epithelzellen durchschnittlich bei 2,14 % der Gesamtepithelzellzahl mit einer Spannweite von 0 bis 11,11 %. Bislang liegen noch keine Studien zum Gehalt an apoptotischen Epithelzellen im Uterusspülsubstrat von Stuten vor. Die Ermittlung des apoptotischen Zellanteils in Geweben dient oft dazu die Zellerneuerungsrate bei Entzündungs- oder Umbauprozessen zu untersuchen. So zeigte eine aktuelle Studie an Ratten, denen vor Ovariectomie das Zytostatikum Cladribin subkutan appliziert wurde, mit einem Durchschnittswert von 73,2 % aktivierte Caspase-3-positiven Zellen, eine signifikante Apoptosesteigerung im histologischen Querschnitt des Ovargewebes. Die Kontrollgruppe, die als physiologischer Normwert hier von Interesse ist, verzeichnete einen Anteil von 32,3 % (Jedrych et al., 2013), was weitaus über dem Anteil, der in dieser Studie erspülten apoptotischen Zellen liegt. Allerdings ist bei den Präparaten aus Ovargewebe in Betracht zu ziehen, dass es sich um Zellverbände handelt, die möglicherweise andere Kaskaden des Zellunterganges durchlaufen, als Epithelzellen, die einer Basallamina anhaften. Hinzu kommt der Fakt, dass bei einer Uterusspülung, anders als bei einem histologischen Schnittpräparat, Zellen ebensogut mechanisch aus ihrer Verankerung gelöst werden können, was möglicherweise den relativen Anteil an apoptotischen Zellen vermindert. Prinzipiell können beide Gewebe sowohl von ihrer Struktur, als auch von den Zelltypen, als auch von der zyklischen Erneuerung her nicht endgültig miteinander verglichen werden.

In der Reihenfolge der Spülvorgänge lagen bei Spülung 1 mit durchschnittlich 2,99 % signifikant mehr apoptotische Zellen im Rückgewinnungsvolumen der Uterusspülung vor als bei Spülung 2 und 3, was daran liegen kann, dass apoptotische Epithelzellen aufgrund des angeschalteten Zelltodmechanismus bereits etwas reduzierter in der Basalmembran verankert sind als vitale Zellen, sich durch den Spülvorgang leichter

Diskussion

lösen lassen und somit zum größten Anteil in der ersten Spülung zu beobachten sind. Diese Tatsache kann dem physiologischen Vorgang der Zellerneuerung zugrunde liegen.

Wenn nun der Verlauf des Gehaltes an vitalen Epithelzellen von Spülung 1 bis 3 vergleichend betrachtet wird, fällt auf, dass hier im Gegensatz zum Gehalt an apoptotischen Zellen kein signifikanter Abfall erfolgt. Apoptotische Zellen lassen sich im ersten Spüldurchlauf in signifikant höherer Menge erspülen, vitale Epithelzellen bleiben von Spülung 1 bis 3 anteilig konstant. Dies bekräftigt die These, dass apoptotische Zellen möglicherweise loser in der Basalmembran verankert sind als vitale Epithelzellen und daher zu Anfang in größerer Menge gewonnen werden.

Die Erkenntnis, dass die vitalen Epithelzellen bei Belassung der Uteri in gekühlter Umgebung bis zu 16,5 Stunden überlebensfähig sind, legt die Vermutung nahe, dass die übrigen avitalen Zellen nicht notwendigerweise der postmortalen Autolyse unterliegen, sondern ebenfalls ein Ausdruck physiologischer Zellerneuerung sind.

In der vorliegenden Studie konnte bei keiner der drei Spülungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Caspase-3 Aktivität und dem Zyklusstand der Stuten nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass der Anteil apoptotischer Zellen, welcher von der luminalen Epithelzellschicht der equinen Gebärmutter erspült wurde innerhalb der Gesamtzellzahl keine signifikanten zyklusbedingten Schwankungen aufweist. Das bedeutet jedoch nicht, dass innerhalb der im Zellverband verbleibenden Zellen keine zyklusabhängigen Unterschiede auftreten können. So wurde in einer früheren Studie an histologischen Gewebeschnittpräparaten gezeigt, dass während des Diöstrus der Stute eine gesteigerte aktivierte Caspase-3 Expression in den oberflächlichen Epithelzellen und den Drüsenzellen des Endometriums vorliegt, wobei während des Östrus eine höhere Aktivität in den Stromazellen zu finden ist (Roberto da Costa et al., 2007).

Studien bei der Hündin beschreiben eine erhöhte apoptotische Aktivität in den basalen Drüsen des Endometriums während des frühen Diöstrus (Chu et al., 2006) oder späten Metöstrus (Van Cruchten et al., 2003) und bestätigen, dass gesteigerte Apoptose mit der bereits bekannten Karyopyknose und Keratinisierung der oberflächlichen Epithelzellen der Vaginalschleimhaut einhergeht (Wright u. Parry, 1989). Auf der endometrialen Oberfläche wird von einem insgesamt sehr geringen Anteil apoptotischer Zellen berichtet, wobei dieser im Anöstrus trotzdem signifikant höher ist als im frühen

Metöstrus (Chu et al., 2006; Van Cruchten et al., 2003). Eine humanmedizinische Arbeitsgruppe zeigte wiederum, dass in der späten sekretorischen Phase des Menstruationszyklus der Frau die Expression des Enzyms Caspase-3 gegenüber den übrigen Phasen höchst signifikant gesteigert ist (Abe et al., 2006).

5.5 Analyse des Spülsediments

5.5.1 Qualität der Ausstriche

Die zytologische Untersuchung des Spülsediments wurde nach einem gängigen Routineverfahren durchgeführt. Zur Selbstüberprüfung wurde jeder Ausstrich zusätzlich auf seine Qualität beurteilt. Dabei war die Mehrheit aller Präparate jeder Färbung kräftig gefärbt, ohne Artefakte oder Hintergrundfärbung und die morphologischen Strukturen (Zellen) waren gut voneinander abgrenzbar. Von jedem Einzelausstrich wurden Reservepräparate erstellt, um sicherzugehen, dass bei Beschädigung eine weitere ungehinderte Auswertung folgen konnte.

Die Dichte an Detritus wurde während der Auswertung auf jedem Ausstrich parallel zur Auswertung der verschiedenen Strukturen (Zellverteilung) evaluiert. Dabei war vor allem von Interesse, ob sich der Gehalt an Detritus im Fortschreiten der Spülvorgänge minimiert. Für eine optimale Auswertung der morphologisch unterscheidbaren Objekte (Zellen) wurde ein Detrituslevel von 0 und 1 erachtet (Abb. 22a, 22b, Abb. 23a, 23b). Der größte Anteil an Detritus war bei allen drei Färbungen bei Spülung 1 zu beobachten, während sich bei Spülung 2 und 3 der Anteil verringerte. So lagen bei Spülung 2 mehr als die Hälfte und bei Spülung 3 über 83% der Ausstriche im optimalen Bereich von Level 1 oder 0. Um Uteruszellen mit einem möglichst geringen Anteil an Detritus für weitere Untersuchungen zu gewinnen, eignen sich auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Folgespülgänge 2 und 3, wobei allerdings bedacht werden muss, dass hier mit einer deutlich geringeren Zelldichte gerechnet werden muss.

Zum Gehalt an Debris in aufeinanderfolgenden Uterusspülungen liegen bisher keine Untersuchungen vor, jedoch postuliert eine frühere Studie, dass der Vorgang der

Diskussion

Zentrifugation von Spülsubstrat möglicherweise den Gehalt an Detritus erhöht, da fragile Zellen hierbei leichter beschädigt werden könnten (LeBlanc et al., 2007).

Erwiesen ist jedoch, dass das Vorkommen von *E. coli* mit einem gesteigerten Gehalt an Detritus verbunden ist (LeBlanc et al., 2007). In der vorliegenden Studie kann dieses Erkenntnis anhand einem Fall mit positivem Bakterienvorkommen bekräftigt werden, da in diesem Fall bei Spülung 1 bei allen drei Färbungen jeweils ein Detrituslevel von 2 oder 3 festgestellt wurde. Auch bei Spülung 2 war die Mehrzahl noch mit Level 2 beurteilt worden, was über dem Gesamtdurchschnitt der Ausstriche ohne Bakterienvorkommen liegt. Eine genaue Bakteriendifferenzierung wurde allerdings in dieser Studie nicht vorgenommen.

Zudem wurde bereits beobachtet, dass erhöhter Debris eher mit einem geringen Vorkommen von neutrophilen Granulozyten verbunden ist (LeBlanc et al., 2007), was jedoch hier nicht bestätigt werden kann. Im vorliegenden Fall ergab Spülung 1 bei allen drei Färbungen einen durchschnittlichen Anteil von über 50 % an neutrophilen Granulozyten.

Die durchschnittliche Zahl der morphologisch unterscheidbaren Strukturen, die auf den Objektträgern an allen drei Lokalisationen von allen 3 Folgespülungen insgesamt zählbar waren, erreichte einen Höchstwert von 202,18 Objekten. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit jeder weiteren Uterusspülung eine signifikante Abnahme von Zellen und Strukturen pro μl zu verzeichnen war und damit vor allem im Laufe der Folgespülungen die Anzahl von 300 Objekten pro Ausstrich nicht erreicht werden konnte.

Bei Spülung 1 lag die durchschnittlich zählbare Anzahl von verschiedenen Strukturen pro Objektträger jedoch bei mindestens 274,36 Stück (PAP-Quick-Färbung) oder höher. Das bedeutet, dass die anfängliche Epithelzellendichte von 113,87 Zellen pro μl Originalsubstrat zuzüglich der übrigen morphologisch unterscheidbaren Strukturen für die Erstellung qualitativ guter Ausstrichpräparate ausreichte

Bei Spülung 2 mit einer Epithelzellendichte von nur noch 39,38 Zellen pro μl Originalsubstrat war dieses optimale Ergebnis nicht mehr zu erreichen; der höchste zählbare Gehalt lag pro Objektträger bei 209,90 morphologisch unterscheidbarer Strukturen (Diff-Quick-Färbung). Eine ähnliche Reduktion der Objektzahl war von Spülung 2 zu 3 zu verzeichnen.

Diskussion

Bei kaum sichtbaren Pellets und niedrigen Zellzahlen wurde zwar mit der geringsten Menge an Flüssigkeit resuspendiert, die nötig war, um die geforderte Anzahl an Objektträgern zu bestücken. Doch die Untersuchung zeigt, dass die Erstellung eines Ausstrichpräparates, mit dem Ziel jeweils 100 Objekte an drei verschiedenen Stellen auszuzählen, mit einer Mindestanzahl an Zellen und Strukturelementen im Spülsediment verbunden ist. Für die Beschickung von 16 Objektträgern mit jeweils 5 µl Spülsubstrat erwies sich eine Dichte von über 39,38 Zellen pro µl im originalen Spülsediment als gut geeignet, wobei man beachten muss, dass die als nicht eindeutige Zellen zu identifizierenden Strukturen in dieser Menge nicht impliziert sind.

Bei hohen Zellzahlen pro µl im Originalsubstrat wurde das Spülsediment jeweils soweit verdünnt, dass ein gleichmässiger (Zell-) Rasen von Strukturelementen auf dem Ausstrich auszuwerten war. Dies wurde wiederholt mikroskopisch überprüft und lieferte gute Ergebnisse.

5.5.2 Zusammensetzung des Spülsediments

Insgesamt wurden zehn verschiedene morphologisch unterscheidbare Strukturen zuzüglich polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten mit den drei verschiedenen Färbemethoden Diff-Quick, PAP-Quick und May-Grünwald-Giemsa beurteilt. Alle Ausstriche einer Charge wurden aus demselben Aliquot erstellt. Zur gleichen Zeit nach der Lufttrocknung wurden die jeweils verschiedenen Färbungen der Präparate angefertigt.

Es fällt auf, dass trotz identischer Bearbeitungsprozedur und der Beurteilung durch denselben Untersucher Schwankungen in den Häufigkeiten der Zellen vorkommen, wenn man die verschiedenen Färbungen vergleicht. Dies lässt die Vermutung zu, dass trotz einheitlicher Vorgehensweise in der Anfertigung von Ausstrichpräparaten, die Färbung die subjektive Beurteilung des Untersuchers beeinflusst. So ist plausibel, dass bei der PAP-Quick-Färbung, welche Kernkomponenten filigran darstellt, aber das Zytoplasma weniger kontrastreich vom Kern abgrenzt, das Vorkommen nicht erkennbarer Zellen erhöht ist, da die Beurteilung von Zellstrukturen sich auch auf die Abgrenzbarkeit von Kern und Zytoplasma stützt.

Als primäre Zellstruktur wurde die klassische Epithelzelle als Strukturtyp 1 festgehalten. Diese zeigte eine hochprismatische und zillientragende Morphologie und deren dichter Zellkern war gut vom Zytoplasma abzugrenzen. Obwohl dieser Typ im Ge-

Diskussion

gensatz zu anderen Strukturen einen hohen Anteil an der Gesamtheit der morphologischen Strukturen bildete, wurden im Zusammenhang mit diesem und den Parametern Chronologie oder Zyklus keine signifikanten Häufungen oder Abnahmen beobachtet.

Zu den Typen 2, 3 und 4 wurden zellartige Strukturen mit erkennbarer Zellmembran zugeordnet, welche sich in ihrer Form und Zytoplasmadichte unterschieden. Typ 2 hatte eine kuboide Form, Typ 3 war von polygonalen ausgezogenen Zellrändern geprägt, Typ 4 hatte einen etwas dichteren Zellkern, der schwer vom Zytoplasma abzugrenzen war. Die Typen 2 und 3 kamen bei jeder Färbung nur sehr vereinzelt vor. Strukturtyp 5, war charakterisiert durch die deutlich erkennbare Zellmembran, aber starke Vakuolisierung, Typ 6, die nicht erkennbare Zellstruktur, wurde als solche deklariert und in die Zählung mit einbezogen, da es sich um eine als deutlich isoliert erkennbare Strukturen handelte. Bei Typ 7 handelte es sich um runde Strukturen, bei denen zwar eine glatte Zellmembran, aber kein Unterschied zwischen Zellkern und Zytoplasma zu verzeichnen war. Weiterhin wurden drei schollige Strukturtypen unterschieden, welche von keiner sichtbar intakten Zellmembran mehr umgeben waren. Darunter fiel der runde, dichte, homogene Typ 8, der aufgelockerte, runde, homogene Typ 9, sowie der aufgelockerte vakuolenhaltige Typ 10.

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten waren eindeutig zu erkennen und wurden gesondert festgehalten.

Der häufigste Strukturtyp, der mithilfe der Diff-Quick-Färbung anteilig festgehalten wurde war der schollig, aufgelockerte, vakuolenhaltige Typ 10, mit einem Mittelwert von 46,05 %. Mit 20,02 % war am zweithäufigsten der klassische hochprismatische, zilienträgende Epithelzelltyp 1 vertreten. Alle weiteren Typen kommen zu Anteilen <6% vor, wobei Zelltypen 2 und 3, die kuboiden und polygonalen Strukturen, jeweils nur vereinzelt auftraten. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten verzeichnen einen Wert von 6,60 %.

Mithilfe der May-Grünwald-Giemsa-Färbung wurde mit einem Mittelwert von insgesamt 20,30 % der klassische Epithelzelltyp 1 am häufigsten beobachtet. Gefolgt wird dieser Wert von Typ 9, der aufgelockerten Scholle mit 17,65 %, dann weiterhin von Typ 10, der vakuolisierten Scholle mit 14,64 % und Typ 6, der nicht erkennbaren, beschädigten Zelle mit 11,83 %. Der Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten beträgt 9,63 %.

Diskussion

Bei der PAP-Quick-Färbung wurde mit einer Häufigkeit von 33,86 % ebenso der klassische Epithelzelltyp am zahlreichsten beobachtet. Gefolgt wird dieser mit 20,20 % von Struktur 6, der nicht erkennbaren Zelle, weiterhin mit 17,23 % gefolgt vom Typ 10, der vakuolisierten Scholle. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten waren hier mit 6,23 % vertreten.

Insgesamt ähnelten die scholligen Strukturtypen 8, 9 und 10 Strukturen, die in einer Studie über die degenerierenden Uterindrüsen von Stuten gefunden wurden (Walter et al., 2003). Bei diesen handelte es sich um kalzifizierte, korpuskuläre Bestandteile mit eosinophilem Charakter, welche gehäuft in dilatierten und fibrotischen Drüsen im Endometrium von Stuten vorkamen. Für die Übereinstimmung mit den Strukturtypen 8, 9 und 10 spricht, dass diese sich morphologisch sehr ähnlich darstellen und auch ein Herausspülen aus dilatierten Drüsen per se denkbar ist.

Dagegen spricht die gleichmäßige Erscheinung der Typen 8, 9 und 10, wohingegen man bei mineralisiertem Drüsensekret unterschiedlichere Morphologien bezüglich Größe und Form erwarten würde. Dieser Sachverhalt kann hier jedoch nicht eindeutig geklärt werden, da der Fokus der Arbeit nicht auf die grundlegende Identifizierung der einzelnen Bestandteile des Spülsekretes ausgerichtet war.

Während des Östrus waren vermehrt polymorphkernige neutrophile Granulozyten im Spülsubstrat nachzuweisen. Bei der ersten Spülung kamen sie bei östrischen Stuten signifikant gehäuft vor und ließen sich mit allen drei Färbungen nachweisen. Dies widerspricht einer früheren Studie, in der in Tupferproben zwar signifikante Unterschiede des Nachweises von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zwischen Zervix- und Gebärmutter Schleimhaut festgestellt wurden, jedoch nicht zwischen östrischen und diöstrischen Stuten (Aguilar, et al., 2006).

Zu Uterusreihenspülungen stehen derzeit noch keine Untersuchungen zur Verfügung. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in der Zusammensetzung der Strukturen jedoch eine deutliche Abnahme der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und der Strukturen vom Morphologietyp 4 im Zusammenhang mit der Reihenfolge der Spülungen. Bei beiden Strukturen war die Abnahme im Spülverlauf unter den Diff-Quick- und PAP-Quick-gefärbten Präparaten übereinstimmend signifikant.

Ursächlich für die Beobachtung dieser relativen Zellabnahme kann die Ursprungslokalisation der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den uterinen Epithelzellen sein. Während Granulozyten durch eine temporär permeable

Diskussion

Blutgefäßwand ins Uteruslumen gelangen, werden uterine Epithelzellen im Zellverband gelockert und nach vollständiger Loslösung von der Basalmembran im Uterinsekret integriert. Wird somit bei der ersten Spülung der Großteil an polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten erspült, fällt der Ertrag bei den Folgespülungen signifikant ab. Im Unterschied dazu werden bereits gelöste Uterusepithelzellen zwar im ersten Rückgewinnungssubstrat aufgefangen, aber durch die mechanische Wirkung der Folgespülungen 2 und 3 werden möglicherweise gelockerte Zellen in ihrer Verankerung vollständig gelöst und weiterhin aufgefangen.

Der Morphologietyp 4 ist rund, hat einen ebenfalls runden, fast die Zelle füllenden Zellkern und unterscheidet sich von den PMN durch das Fehlen der Segmentierung des Zellkernes und weniger bis kaum sichtbarem Zytoplasma, was die Vermutung zulässt, dass es sich um eine jüngere Form von neutrophilem Granulozyten mit unsegmentiertem Kern handeln könnte. Nach der Größe und Dichte der Kernstruktur zu urteilen ist jedoch auch die Beobachtung eines Lymphozyten in Betracht zu ziehen. Die Bezeichnung Morphologietyp 4 ist weiterhin als korrekt zu sehen, da hier keine genaue Zuordnung getroffen werden kann.

Nimmt man nun an, dass dieser Typ in die Sparte der neutrophilen Granulozyten einzuordnen ist, dann bestätigt dies die Beobachtung, dass im chronologischen Verlauf der Reihenspülungen polymorphkernige neutrophile Granulozyten in ihrem Vorkommen abnehmen. Würde man annehmen, es handele sich bei Typ 4 um einen Lymphozyten, dann würde dies konform gehen mit der Beobachtung, dass weiße Blutzellen, sowohl Granulozyten als auch Lymphozyten, aufgrund ihrer Ursprungslokalisation im zeitlichen Verlauf von Spülung 1 bis 3 mit einer deutlichen Abnahme aus den Uteri gespült werden.

Bei jeweils einer Färbung war eine signifikante Abnahme des Morphologietypen 7 und des scholligen, vakuolisierten Morphologietypen 10 festgestellt worden. Es ist anzunehmen, dass diese Strukturen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit die Oberfläche dominieren oder nicht so stabil in der Basallamina verankert sind, als der übrige Anteil an klassischen Epithelzellen. Da Typ 7 insgesamt sehr selten vertreten ist und auch die Beobachtung der Zellabnahme bei nur einer Färbung der Fall war, ist dessen Relevanz jedoch fraglich. Bei der Diff-Quick-Färbung waren 0 %, bei der PAP-Quick-Färbung 0,54 % als anteiliger Mittelwert aller Spülungen unter der Gesamtzahl an isolierten Strukturen zu verzeichnen.

5.6 Conclusio

Mit dem hier angewendeten Verfahren der standardisierten Uterusspülung waren ungeachtet der Reihenfolge maximal 620,50 Zellen und durchschnittlich 59,49 Zellen pro μl Rückgewinnungssubstrat zu verzeichnen. Der höchste durchschnittliche Gehalt innerhalb der drei Reihenspülungen lag mit 113,87 Zellen pro μl bei Spülung 1, wobei der Gesamtzellgehalt mit jeder Folgespülung signifikant absank.

Der Anteil an vitalen Epithelzellen, der aufgrund weiterführender Analysen interessant ist, variierte innerhalb der Serienspülungen nicht signifikant. Daher kann man als für den höchsten Ertrag an vitalen Epithelzellen erbringend Spülung 1 betrachten, welche in dem Fall auch den höchsten Gesamtzellgehalt erbringt.

Da wir innerhalb Spülung 1 einen mittleren Anteil von 3,37 % vitalen Zellen feststellten ergibt sich als höchster durchschnittlicher Gewinn eine errechnete Dichte von 2,0 vitalen Epithelzellen pro μl Rückgewinnungssubstrat.

Da dieser Ertrag je nach Weiterverwendung möglicherweise als gering einzustufen ist, ist zukünftig vor der weiteren Analyse auch eine Zelltrennung, wie beispielsweise die Zellfraktionierung durch Gradientenzentrifugation oder weitere geeignete Verfahren anzuwenden, um ein möglichst reines Substrat zu erhalten.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden schlachtfrische Uteri in einer festgelegten Prozedur jeweils drei Reihenspülungen unterzogen und das Rückgewinnungssubstrat auf verschiedene Faktoren untersucht.

Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der bisher noch nicht beschriebenen Dichtemessung von uterinen Epithelzellen in der rückgewonnenen Spülflüssigkeit, sowie der Ermittlung des Anteils an vitalen Epithelzellen mithilfe der Trypanblaufärbung. Darüber hinaus wurden von jeder Spülcharge Ausstrichpräparate angefertigt, die unter verschiedenen Färbungen auf Qualität und vorhandene Strukturelemente untersucht wurden.

Es wurde beobachtet, dass im chronologischen Verlauf der Reihenspülungen die Dichte der gewonnenen Epithelzellen signifikant abnahm und bei östrischen Stuten bei Spülung 1 und 2 signifikant mehr Zellen zu verzeichnen waren als bei diöstrischen. Der Anteil an vitalen Epithelzellen innerhalb der Gesamtzahl war bei Spülung 1 am höchsten, im chronologischen Verlauf ergab sich zu Spülung 2 und 3 jedoch keine signifikante Abnahme dieses Anteils. Die leicht variierenden Todeszeitpunkte der Stuten hatten ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf den Anteil der vitalen Epithelzellen.

In der Untersuchung auf Strukturelemente in den Ausstrichpräparaten wurde ersichtlich, dass eine routinemäßige Analyse nach morphologischen Gesichtspunkten, anders als eine Zählung im Zählgitter, immer durch subjektive Eindrücke geprägt ist. So kamen die Ausstriche aus den selben Aliquots, jedoch mit verschiedenen Färbemethoden untersucht, trotz einheitlich doppelter Untersuchung zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. Eine konstante Beobachtung zeigte sich in der Abnahme der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im chronologischen Verlauf der drei Spülungen. Bei der PAP-Quick- und der Diff-Quick-Färbung war diese Beobachtung signifikant, bei der May-Grünwald-Giemsa-Färbung deutlich, jedoch ohne Signifikanz.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der höchste mittlere Prozentsatz von $3,37 \pm 4,87$ vitalen Epithelzellen in der rückgewonnenen Spülflüssigkeit als gering einzuschätzen ist, obwohl es bisher keine Vorerfahrungen hierzu gibt. Andere Methoden an herausgelösten Stücken von frischtotem Rinderendometrium ergaben einen weit aus höheren Anteil, dies setzt jedoch die Entnahme der Gebärmutter oder die Tötung

Zusammenfassung

des Patienten voraus. Im vorliegenden Fall diente die Studie als Vorlaufstudie für weitere Untersuchungen am lebenden Patienten, daher können die Werte als neue Richtlinie für den Ertrag an vitalen Epithelzellen und die Dichte der Gesamtepithelzellzahl, gewonnen durch Uterusspülung, in Betracht gezogen werden.

7. Summary

Composition of the sediment of repetitive standardised flushings of equine uteri with special focus on the vitality of the obtained epithelial cells.

In the current study uteri from recently slaughtered mares were flushed in a series-connected defined pattern three times in succession. The recovered fluid was analysed for different factors.

The main interest was to determine the density of uterine epithelial cells in the recovered fluid and to quantify the amount of living cells among those with the method of trypan blue staining. Both investigations haven't been described before. Smear prepares from each flushing procedure were made with different staining methods to analyse them for their quality and various corpuscular structures in the fluid.

The study demonstrates that the density of epithelial cells significantly decreased according to the sequence of flushings. In the first and second flush a significantly higher amount of cells was observed in mares during estrus compared to mares in diestrus. The amount of vital epithelial cells within all epithelial cells reached the highest value with the first of the three flushing procedures and decreased in each of the continuous two, however with no significance. The time of exitus didn't have any significant effect on the amount of vital epithelial cells.

The analysis of the smear prepares revealed the fact, that each routine testing for morphological aspects, manually done by an examiner, is always subjectively influenced. Smears from same aliquots, even though equally analysed, led to partly different results among the different staining methods. The reduction of polymorphonuclear neutrophil granulocytes according to the chronology of flushing procedures though was consistently observed with significance among PAP-Quick and Diff-Quick, noticeably, but without significance under May-Grünwald-Giemsa staining.

In conclusion we can say that the average value of $3,37 \pm 4,87$ vital epithelial cells in the recovered fluid seems to be low, even though references in literature don't exist. In studies with cuts of cattle uterus the methods generate a many times higher amount of vital cells but require the excision of the uterus or euthanizing of the patient. The current studies aim was to serve as a prestudy for further investigations in

Summary

the living patient. The results, including density and vital amount of epithelial cells obtained by uterine flushing can therefore be considered as a new guideline.

8. Literaturverzeichnis

Abe, H., Shibata, M. A., Otsuki, Y. (2006): Caspase cascade of Fas-mediated apoptosis in human normal endometrium and endometrial carcinoma cells. *Mol Hum Reprod.* 12, 535-541.

Aguilar, J., Hanks, M., Shaw, D. J., Else, R., Watson, E. (2006): Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology.* 66, 423-430.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008): *Molecular Biology of the Cell.* 5, Garland Science, New York, 1115-1129.

Allgoewer, I., Schaffer, E. H., Stockhaus, C., Vogtlin, A. (2001): Feline eosinophilic conjunctivitis. *Vet Ophthalmol.* 4, 69-74.

Altman, S. A., Randers, L., Rao, G. (1993): Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 9, 671-674.

Asbury, A. C., Lyle, S. K. (1993): Infectious Causes Of Infertility. In: McKinnon, A. O. and Voss, J. L.: *Equine Reproduction.* 1, Wiley-Blackwell, West Sussex, 381-395.

Aurich, C., Palm, F. M. (2008): Erkrankungen von Vulva, Vagina, Zervix, Uterus und Eileiter. In: Aurich, C.: *Reproduktionsmedizin beim Pferd.* 2, Parey, Stuttgart, 81-103.

Aurich, J. E. (2008a): Erkrankungen im Puerperium, Geburtsverletzungen und deren Operationen. In: Aurich, C.: *Reproduktionsmedizin beim Pferd.* 2, Parey, Stuttgart, 209-223.

Aurich, J. E. (2008b): Geburtshilfe. In: Aurich, C.: *Reproduktionsmedizin beim Pferd.* 2, Parey, Stuttgart, 175-208.

Ball, B. A., Shin, S. J., Patten, V. H., Lein, D. H., Woods, G. L. (1988): Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology.* 29, 1269-1283.

Bartmann, C. P., Schiemann, V. (2003): Untersuchungen zur Entwicklung eines intrauterinen Distensionsdruckes für die Hysteroskopie beim Pferd. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 110, 43-48.

Literaturverzeichnis

- Berezowski, C. (2002): Diagnosis of a uterine leiomyoma using hysteroscopy and a partial ovariohysterectomy in a mare. *Can Vet J.* 43, 968-970.
- Blanchard, T. L., Evans, L. H., Kenney, R. M., Hurtgen, J. P., Garcia, M. C. (1982): Congenitally incompetent cervix in a mare. *J Am Vet Med Assoc.* 181, 266.
- Blue, M. G. (1985): A uterocervical anomaly (Uterus bicorpor bicollis) in a mare, and the manual disruption of early bilateral pregnancies. *N Z Vet J.* 33, 17-19.
- Bothe, M. K., Braun, J., Mundhenk, L., Gruber, A. D. (2008): Murine mCLCA6 is an integral apical membrane protein of non-goblet cell enterocytes and co-localizes with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Histochem Cytochem.* 56, 495-509.
- Bourke, M., Mills, J. N., Barnes, A. L. (1997): Collection of endometrial cells in the mare. *Aust Vet J.* 75, 755-758.
- Bowman, J., T. R. (2011): Direct Rectal Palpation. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction.* 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 1904-1913.
- Bracher, V., Allen, W. R. (1992): Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: I. Findings in normal fertile mares. *Equine Vet J.* 24, 274-278.
- Bracher, V., Mathias, S., Allen, W. R. (1992): Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. *Equine Vet J.* 24, 279-284.
- Brandt, G. W., Manning, J. P. (1969): Improved uterine biopsy technics for diagnosing infertility in the mare. *Vet Med Small Anim Clin.* 64, 977-983.
- Brook, D. (1985): Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *J Equine Vet Sci.* 5, 16-22.
- Card, C. (2005): Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology.* 64, 580-588.
- Card, C. E. (2011): Endoscopic Examination. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction.* 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 1940-1950.
- Chu, P. Y., Lee, C. S., Wright, P. J. (2006): Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch. *Theriogenology.* 66, 1545-1549.

Literaturverzeichnis

- Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., Paraggio, G., Pasolini, M. P. (2012): Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. 77, 89-98.
- Couto, M. A., Hughes, J. P. (1984): Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 4, 265-273.
- Dascanio, J. J. (2003): Endometrial Cytology. In: Robinson, N. E.: *Current Therapy in Equine Medicine*. Elsevier, St. Louis, 226-228.
- De Moraes, A. A., Paula-Lopes, F. F., Chegini, N., Hansen, P. J. (1999): Localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the bovine reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 42, 135-145.
- Ford, R. J., Becker, F. F. (1982): The characterization of trypan blue-induced tumors in Wistar rats. *Am J Pathol*. 106, 326-331.
- Fortier, M. A., Boulanger, M., Boulet, A. P., Lambert, R. D. (1987): Cell-specific localization of prostaglandin E2-sensitive adenylate cyclase in rabbit endometrium. *Biol Reprod*. 36, 1025-1033.
- Fortier, M. A., Guilbault, L. A., Grasso, F. (1988): Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil*. 83, 239-248.
- Frankfurt, O. S., Krishan, A. (2001): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. *J Immunol Methods*. 253, 133-144.
- Freeman, S. L., England, G. C. W. (1997): Vestibulo-vaginal hypoplasia in a mare. *Veterinary Record*. 141, 521-522.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 119, 493-501.
- Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K., Libby, P. (1996): Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16, 19-27.

Literaturverzeichnis

- Ginther, O. J. (1992): Reproductive Anatomy. In: Ginther, O. J.: Reproductive Biology Of The Mare: Basics and Applied Aspects. 2, Equiservices, Wisconsin, 1-40.
- Govaere, J., Maes, S., Saey, V., Blancke, W., Hoogewijs, M., Deschauer, C., Smits, K., Roels, K., Vercauteren, G., de Kruif, A. (2011): Uterine fibrosarcoma in a Warmblood mare. *Reprod Domest Anim.* 46, 564-566.
- Hamilton, J. A., Iles, R. K., Gunn, L. K., Wilson, C. M., Lower, A. M., Chard, T., Grudzinskas, J. G. (1998): Concentrations of placental protein 14 in uterine flushings from infertile women: validation of the collection technique and method of expression of results. *Hum Reprod.* 13, 3357-3362.
- Handler, J. (2008): Gynäkologische Untersuchung (Zuchttauglichkeitsuntersuchung) bei der Stute. In: Aurich, C.: Reproduktionsmedizin beim Pferd. 2, Parey, Stuttgart, 31-51.
- Handler, J., Aurich, J. E. (2008): Physiologie des Sexualzyklus der Stute. In: Aurich, C.: Reproduktionsmedizin beim Pferd. 2, Parey, Stuttgart, 15-29.
- Haslett, C. (1997): Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull.* 53, 669-683.
- Hayes, K. E. N., Ginther, O. J. (1986): Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. *Theriogenology.* 25, 581-590.
- Herath, S., Fischer, D. P., Werling, D., Williams, E. J., Lilly, S. T., Dobson, H., Bryant, C. E., Sheldon, I. M. (2006): Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology.* 147, 562-570.
- Hoffmann, B., Leiser, R., Schuler, G. (2008): Physiologie und Anatomie der Trächtigkeit, Trächtigkeitsdiagnostik. In: Aurich, C.: Reproduktionsmedizin beim Pferd. 2, Parey, Stuttgart, 125-154.
- Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., Schoon, H.-A. (2009): The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci.* 111, 261-278.
- Horn, S., Bathgate, R., Lioutas, C., Bracken, K., Ivell, R. (1998): Bovine endometrial epithelial cells as a model system to study oxytocin receptor regulation. *Hum Reprod Update.* 4, 605-614.

Literaturverzeichnis

- Hughes, J. P. (1993): Developmental Anomalies Of The Female Reproductive Tract. In: McKinnon, A. O. and Voss, J. L.: Equine Reproduction. 1, Wiley-Blackwell, 408-416.
- Hurtgen, J. P. (2006): Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. Theriogenology. 66, 560-566.
- Jedrych, M., Wawryk-Gawda, E., Jodlowska-Jedrych, B., Chylinska-Wrzos, P., Jasinski, L. (2013): Immunohistochemical evaluation of cell proliferation and apoptosis markers in ovarian surface epithelial cells of cladribine-treated rats. Protoplasma. 250, 1025-1034.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H. (2005): A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. Can Vet J. 46, 255-259.
- Katila, T. (1996): Uterine defence mechanisms in the mare. Anim Reprod Sci. 42, 197-204.
- Katila, T. (1999): Uterine contractility in nonpregnant mares. Pferdeheilkunde. 15, 574-578.
- Kelly, G. M. M., Newcombe, J. R. (2009): Uterus bicorpora bicollis as a possible cause of infertility in a mare. Veterinary Record. 164, 20-21.
- Kenney, R. M. (1978): Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. J Am Vet Med Assoc. 172, 241-262.
- Kenney, R. M., Doig, P. A. (1986): Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D. A.: Current therapy in theriogenology. 2, Saunders, Philadelphia, 723-729.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 26, 239-257.
- Kim, J. S., Nam, M. H., An, S. S., Lim, C. S., Hur, D. S., Chung, C., Chang, J. K. (2011): Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. J Clin Lab Anal. 25, 90-94.

Literaturverzeichnis

- Knudsen, O. (1964): Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. *Cornell Vet.* 54, 415-422.
- König, H. E., Probst, A. (2008): Anatomie der Geschlechtsorgane beim Pferd. In: Aurich, C.: *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. 2, Parey, Stuttgart, 1-14.
- LeBlanc, M. M. (2010): Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod Domest Anim.* 45 Suppl 2, 21-27.
- LeBlanc, M. M. (2011): Uterine Cytology. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction*. 2, Wiley-Blackwell, West-Sussex, 1922-1928.
- LeBlanc, M. M., Magsig, J., Stromberg, A. J. (2007): Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. 68, 403-412.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D., Klapstein, E. (1994): Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Vet J.* 26, 109-113.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D. (1998): Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*. 50, 49-54.
- Lechner, S. (2008): Interaktionen von Inseminationsbestandteilen mit Epithelzellen und Leukozyten im Uterus des Rindes. *Diss. med. vet., Klinik für Wiederkäuer, Ludwig-Maximilians-Universität München*. 33-35.
- Leiser, R. (2004): Weibliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia feminina. In: Nickel, E., Schummer, U. J. K. and Seiferle, E.: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band II*. 9, Parey, Stuttgart, 393-440.
- Leverkoehne, I., Gruber, A. D. (2002): The murine mCLCA3 (alias gob-5) protein is located in the mucin granule membranes of intestinal, respiratory, and uterine goblet cells. *J Histochem Cytochem.* 50, 829-838.
- Liepina, E., Alamo, M. M. R. d., Reilas, T., Katila, T. (2010): IL-6 and TNF-[alpha] expression in uterine fluids of mares with induced delay in uterine clearance. *Anim Reprod Sci.* 121, 107-108.

Literaturverzeichnis

- Liu, H. C., Tseng, L. (1979): Estradiol metabolism in isolated human endometrial epithelial glands and stromal cells. *Endocrinology*. 104, 1674-1681.
- Liu, I. K., Troedsson, M. H. (2008): The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology*. 70, 415-420.
- Löfstedt, R. M. (2011): Diestrus. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction*. 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 1728-1731.
- Love, C. C. (2011): Endometrial Biopsy. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction*. 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 1929-1939.
- Macrae, D. R. (1935): Double Os Uteri In A Mare. *The Veterinary Record*. 15, 1100.
- McCormack, S. A., Glasser, S. R. (1980): Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol. *Endocrinology*. 106, 1634-1649.
- McCue, P. M., Scoggin, C. F., Lindholm, A. R. G. (2011): Estrus. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction*. 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 1716-1727.
- McMaster, G. K., Carmichael, G. G. (1977): Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74, 4835-4838.
- Myers, R., K., McGavin, M. D. (2007): Schädigung von Zellen und Geweben. In: McGavin, M. D. and Zachary, J., F.: *Pathologie der Haustiere*. Elsevier, München, 1-59.
- Nielsen, J. M. (2005): Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*. 64, 510-518.
- Pycock, J. F. (2011): Ultrasonography. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction*. 2, Wiley-Blackwell, 1914-1921.
- Reef, V. B. (1998): Physics and instrumentation. In: Reef, V. B.: *Equine Diagnostic Ultrasound*. 1, Saunders, Philadelphia, 1-23.
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., Shellman, Y. G. (2005): A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol*. 5, 12.
- Ricketts, S. W. (1975a): Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*. 341-345.

Literaturverzeichnis

- Ricketts, S. W. (1975b): The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. *Equine Vet J.* 7, 102-108.
- Riddle, W. T., LeBlanc, M. M., Stromberg, A. J. (2007): Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology.* 68, 395-402.
- Roberto da Costa, R. P., Serrao, P. M., Monteiro, S., Pessa, P., Silva, J. R., Ferreira-Dias, G. (2007): Caspase-3-mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev.* 19, 925-932.
- Roszel, J. F., Freeman, K. P. (1988): Equine endometrial cytology. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 4, 247-262.
- Rüsse, I. (1991): Harn- und Geschlechtsorgane. In: Rüsse, I. and Sinowatz, F.: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* 1, Parey, Berlin, 304-34.
- Schlotthauer, C. F., Zollman, P. E. (1956): The occurrence of so-called white heifer disease in a white Shetland pony mare. *J Am Vet Med Assoc.* 129, 309-310.
- Schoon, H.-A., Schoon, D., Klug, E. (1992): Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen. *Pferdeheilk.* 8, 355-362.
- Schoon, H.-A., Schoon, D., Klug, E. (1997): Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilk.* 13, 453-64.
- Schulz, L. C. (1991): Weibliche Geschlechtsorgane. In: Schulz, L. C.: *Pathologie der Haustiere.* Gustav Fischer Verlag, Jena, 576-655.
- Sertich, P. L. (1993): Cervical Problems In The Mare. In: McKinnon, A. O. and Voss, J. L.: *Equine Reproduction.* 1, Wiley-Blackwell, West Sussex, 404-407.
- Skarzynski, D. J., Miyamoto, Y., Okuda, K. (2000): Production of prostaglandin F(2alpha) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor alpha: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol Reprod.* 62, 1116-1120.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998): Caspases: enemies within. *Science.* 281, 1312-1316.
- Trimbos, J. B., Arentz, N. P. (1986): The efficiency of the Cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears. *Acta Cytol.* 30, 261-263.

Literaturverzeichnis

- Troedsson, M. H. (2006): Breeding-induced endometritis in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 22, 705-712.
- Troedsson, M. H. T. (2011): Endometritis. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction.* 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 2608-2619.
- Turbow, M. M. (1966): Trypan blue induced teratogenesis of rat embryos cultivated in vitro. *J Embryol Exp Morphol.* 15, 387-395.
- Van Camp, S. D. (1993): Uterine Abnormalities. In: McKinnon, A. O. and Voss, J. L.: *Equine Reproduction.* 1, Wiley-Blackwell, West Sussex, 392-396.
- Van Cruchten, S., Van den Broeck, W., Duchateau, L., Simoens, P. (2003): Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology.* 60, 1595-1608.
- Van De Water, T. R., Lallemand, F., Eshraghi, A. A., Ahsan, S., He, J., Guzman, J., Polak, M., Malgrange, B., Lefebvre, P. P., Staecker, H., Balkany, T. J. (2004): Caspases, the enemy within, and their role in oxidative stress-induced apoptosis of inner ear sensory cells. *Otol Neurotol.* 25, 627-632.
- Vanderwall, D. K. (2011): Progesterone. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. and Varner, D. D.: *Equine Reproduction.* 2, Wiley-Blackwell, West Sussex, 1637-1641.
- Vaux, D. L., Strasser, A. (1996): The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 2239-2244.
- Volkman, D. H., Gilbert, R. O. (1989): Uterus bicollis in a Clydesdale mare. *Equine Vet J.* 21, 71.
- Vote, B. J., Russell, M. K., Joondeph, B. C. (2004): Trypan blue-assisted vitrectomy. *Retina.* 24, 736-738.
- Waelchi, R. O., Winder, N. C. (1987): Die Biopsie der Uterusschleimhaut bei der Stute zur Ergänzung der Zuchttauglichkeitsuntersuchung. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 129, 399-415.

Literaturverzeichnis

Walter, I., Helmreich, M., Handler, J., Aurich, C. (2003): Mineralized deposits in uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. *Vet. Rec.* 153, 708-710.

Walter, J., Wehrend, A. (2009): Exfoliative Endometriumzytologie bei der Zuchtstute – Probenentnahme und Befundinterpretation. *Tierärztliche Praxis.* 37, 409-416.

Wilson, G. L. (1983): Hysteroscopic examination of mares. *Vet Med Small Anim Clin.* 78, 568-578.

Witte, T. S., Nover, M., Overbeck, W., Hecht, W., Heuwieser, W. (2011): Incompetent cervix and pneumouterus in a maiden mare. *Equine Veterinary Education.* 24, 343-346.

Wright, P. J., Parry, B. W. (1989): Cytology of the canine reproductive system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 19, 851-874.

Zavy, M. T., Bazer, F. W., Sharp, D. C. (1978): A non-surgical technique for the collection of uterine fluid from the mare. *J Anim Sci.* 47, 672-676.

Danksagung

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. J. Handler, Leiter der Abteilung Reproduktionsmedizin der Klinik für Pferde des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die fachliche Betreuung am Arbeitsplatz, sowie für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Durchsicht der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. R. Klopffleisch und dem Team des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin für die freundliche und kompetente Unterstützung bei der Umsetzung der immunhistologischen Analysen.

Insbesondere Frau Dr. M. Bothe danke ich für entscheidende Ratschläge bei der Versuchsdurchführung und für die Hilfe bei der Auswertung der immunhistologischen Präparate.

Der Firma Nikon GmbH, Düsseldorf, speziell Herrn Dr. N. Senghaas, danke ich für die Bereitstellung des Mikroskopes H550S und die überaus hilfreiche Betreuung zu jeder Zeit.

Der Roßschlächtereier Walter, Genthin, danke ich für Überlassung der frischen Gebärmutterpräparate.

Ich danke Marie Rodewald, Anna Kläring, Johanna Loschelder, Ina Beckmann und Inga Lindenberg für liebevoll zubereitete Nachtmenüs und all die extrem guten Momente, die wir bei unserer gemeinsamen Arbeit hatten.

Dr. Pizzi Arnan danke ich für ihre Großartigkeit und die immerwährend spontane Bereitstellung von Clara.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Internkolleginnen und Freundinnen Anna Ehrle und Johanna Zauscher, dass sie zur gleichen Zeit am gleichen Ort waren. Es geht nichts über unsere gegenseitige fachliche und persönliche Unterstützung, ein frisches Bettchen und wenn Emergencyteam Ausgang in Berlin hatte...

Meinen engen Freunden und meiner Familie, vor allem meinen beiden Schwestern und Ela, danke ich für den unglaublichen Zusammenhalt und das Selbstverständnis bis wir alt und grau sind.

Außerdem danke, dass ich einst auf dem schönsten Berg der Welt gelandet bin.

Erklärung

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Heilbronn, den 11.11.2013

Mariana Peer