

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Material und Methoden**

#### 3.1.1 Untersuchte Stuten

Die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen wurden an 3 Kleinpferd- und 2 Vollblutstuten durchgeführt. Alle Stuten befanden sich im Besitz der Tierklinik für Fortpflanzung der FU Berlin, FB Veterinärmedizin. Es handelte sich bei allen Stuten um geschlechtsgesunde Tiere. Eine Vollblutstute wies in Ihrer Anamnese eine vestibulovaginale Naht nach inkomplettem Dammriß auf. Die Tiere befanden sich in einem guten bis sehr guten Ernährungszustand und erhielten täglich Weidegang.

#### 3.1.2 Zeitspanne der Untersuchungen und geographische Lage

Die Untersuchungen erfolgten vom 4. April 2000 bis zum 28. Juli 2000 in der Tierklinik für Fortpflanzung in Berlin.

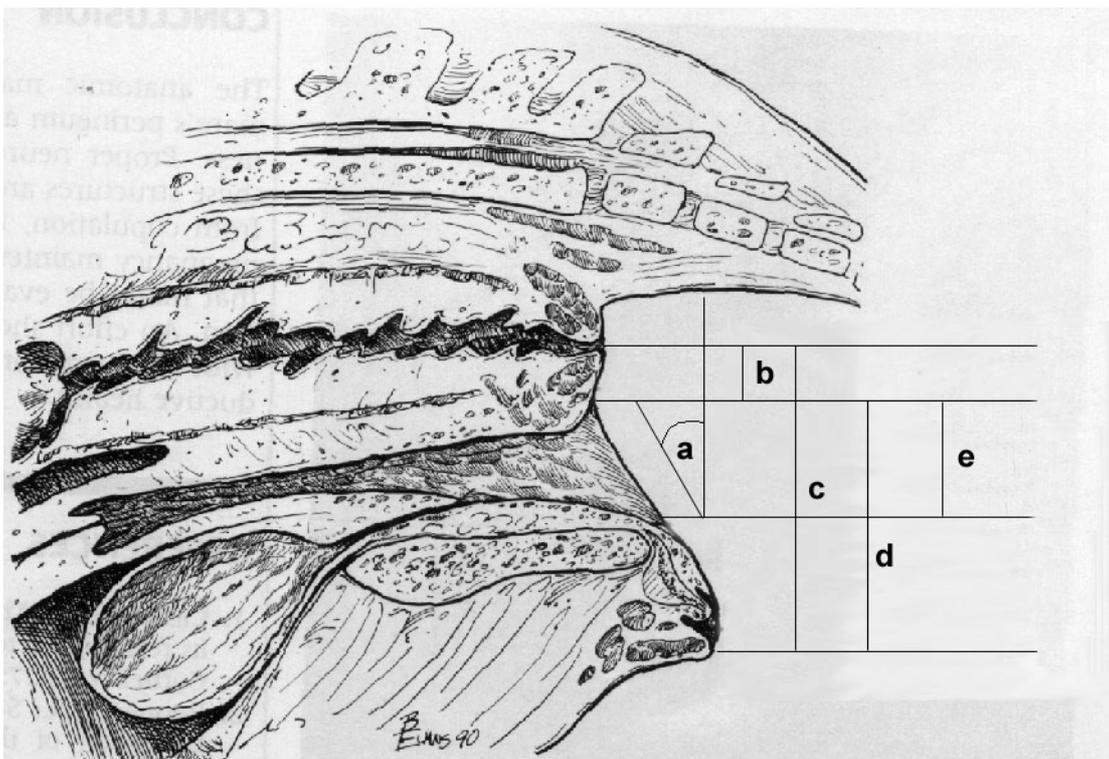
#### 3.1.3 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

Der gesamte, nachfolgend aufgeführte Untersuchungsgang wurde jeweils am 2., 5., 12, 15. und ab dem 17. Tag post ovulationem täglich bis zur Ovulation über jeweils drei Zyklen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten jeweils zwischen 14.30 und 16.30 Uhr.

### 3.1.4 Untersuchungsgang

Die zu untersuchenden Stuten wurden in einen Untersuchungsstand geführt. Nach einer kurzen Allgemeinuntersuchung erfolgte die Adspektion des äußeren Genitale. Mit einem Maßband wurden die Länge folgender Strecken erfaßt: Anusmitte - dorsale Kommissur, Anusmitte - ventrale Kommissur, dorsale Kommissur - ventrale Kommissur sowie nach Einführen eines Besamungskatheters für Pferde (Fa. Minitüb) die Entfernung dorsale Kommissur - Beckenboden. Mit einem Winkelmesser wurde die Winkelung des Perineums erfaßt.

Abb. 1: Schematische Darstellung der Strecken- und Winkelmessung am äußeren Genitale (Evans 1990, modifiziert)



a: Winkelung der Scham

b : Strecke Anusmitte - dorsale Kommissur

c : Strecke Anusmitte - ventrale Kommissur

d : Strecke dorsale Kommissur - ventrale Kommissur

e : Strecke dorsale Kommissur - Beckenboden

Anschließend wurden mit einem eigens für diesen Zweck entwickelten Meßgerät die Druckverhältnisse im Vestibulum, im Hymenalring sowie im Vaginallumen aufgezeichnet. Bis zu diesem Zeitpunkt ist darauf geachtet worden, daß die Stute in der Hinterhand geschlossen stand. Im Anschluß erfolgte die rektale und ultrasonographische Untersuchung zur Ermittlung der Befunde an Zervix, Uterus und Ovarien. Abschließend wurde eine Blutprobe aus der Vena jugularis zur Bestimmung der Progesteron- und Östradiolgehalte entnommen.

### 3.1.5 Untersuchungsmethoden

#### 3.1.5.1 Streckenmessung

Mit einem Maßband werden folgende Strecken erfaßt(siehe Abb. 1): Anusmitte - dorsale Kommissur(b), Anusmitte - ventrale Kommissur (c), dorsale Kommissur - ventrale Kommissur (d) sowie nach Einführen eines Besamungskatheters für Pferde (Fa. Minitüb) dorsale Kommissur - Beckenboden (e). Die Strecken wurden auf einem Befundblatt notiert.

#### 3.1.5.2 Winkelung des Perineums

Mit einem Winkelmesser wurde die Winkelung des Perineums erfaßt. Der Winkelmesser besteht aus einem Zeiger, an dessen Ende ein Lotgewicht angebracht ist. Der Winkel (a) wird als Abweichungswinkel zur Senkrechten des Fußbodens in Grad angegeben (s. Abb. 1). Dabei werden Neigungen zur Körpermitte mit positiven, Neigungen weg von der Körpermitte mit negativen Vorzeichen versehen.

### 3.1.5.3 Entnahme der Blutproben

Die Blutprobenentnahme erfolgte jeweils im Anschluß an die klinische Untersuchung des Tieres durch Punktion der Vena jugularis mittels einer Einmalkanüle der Größe 18G (TERUMO EUROPE, Leuven, Belgien). Als Auffanggefäß diente ein Serumröhrchen der Firma Sarstedt (10 ml Röhrchen Z, Granulat/Gerinnungsförderer; Fa. Sarstedt, Nümbrecht). Nach Zentrifugation wurde das Blutserum bis zur radioimmunologischen Hormonanalyse bei -20°C tiefgefroren. Die Lagerungszeit betrug ein bis fünf Monate.

### 3.1.5.4 Bestimmung des Progesterongehaltes im Blutserum

Die Progesteronkonzentration in den Blutserumproben wurde radioimmunologisch in Direktbestimmung mit dem von Glatzel und Schallenberg (1990) beschriebenen Verfahren ermittelt. Die bei -20°C gelagerten Serumproben wurden unmittelbar vor Analysenbeginn bei Zimmertemperatur aufgetaut und homogenisiert. Anschließend wurde 100 µl Serum in Kunststoffröhrchen vorgelegt und mit 200 µl verdünntem (1/3000) Antiserum sowie 200 µl in RSA-Puffer gelöstem J<sup>125</sup>-markiertem Progesteron- $\alpha$ -Glucoronid (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) versetzt. Im Anschluß an ein dreiminütiges Schütteln des Ansatzes erfolgte die 60-minütige Inkubation im Wasserbad bei 39°C. Hiernach wurde die Proteinbindungsreaktion durch die Überführung für 60 Minuten in ein Eisbad (0°C) gestoppt. Die Trennung von antikörpergebundenem und ungebundenem Progesteron erfolgte durch Zugabe von 500 µl gekühlter und homogenisierter 0,2 %iger Aktivkohle-Dextran-Suspension und anschließender, bei 4°C durchgeführter Zentrifugation (3000 U/min, 10 Minuten). Das freie Progesteron wurde vom Adsorbens gebunden und sedimentierte. Der die gebundene Fraktion enthaltene Überstand wurde abgehebert, in Kunststoffzählröhrchen überführt und schließlich in einen Gammacounter (LG MAG 312, Fa. Berthold) eingebracht. Dieser ermittelte die Impulsrate pro Minute (counts per minute) und errechnete daraus anhand der zuvor erstellten Eichkurve die Progesteronkonzentration in ng/ml Blutserum. Die Eichkurve wurde mittels unterschiedlich stark verdünnten Lösungen nicht markierten Progesterons erstellt. Hierbei kamen Konzentrationen von 0,3 ng/ml, 0,8 ng/ml, 1,5 ng/ml, 3,0 ng/ml, 6,3 ng/ml und 12,7 ng/ml in RSA-Puffer zum Einsatz. Je 100 µl dieser Standardproben

wurden am Anfang eines jeden Testes im Doppelansatz mitgeführt und wie alle anderen Proben bestimmt. Aus den zugehörigen Impulsraten pro Minute ließ sich die Eichkurve erstellen. Der B0-Wert (Bindungsaktivität des zugesetzten Antikörpers) lag bei  $49,08 \pm 5,9\%$ . Zusätzlich wurde zu Kontrollzwecken bei jedem Meßvorgang ein entsprechender Ansatz mit dem Serum eines Bullen, dem einer Kuh in Brunst, dem einer tragenden Kuh, dem einer Stute im Interöstrus und dem einer tragenden Stute mituntersucht. Da sie bei jedem Meßvorgang mitgeführt wurden, ermöglichten sie die Bestimmung des Intra- und des Interassay-Variationskoeffizienten. Die Nachweisgrenze des verwendeten Testes lag bei 0,150 ng Progesteron/ml Serum.

Der verwendete Antikörper wies folgende Kreuzreaktionen auf: mit 17- $\alpha$ -hydroxyprogesteron 0,75 %, mit Kortikosteron 0,75 %, mit Testosteron 3,37 %, mit Östron 0,2 %, mit Androstendion 0,2 % sowie mit Kortisol 0,2 %.

#### 3.1.5.5 Bestimmung des Östradiolgehaltes im Blutserum

Der Gehalt der Serumproben an Östradiol –17 $\beta$  wurde radioimmunologisch mit Hilfe eines Testkits (ImmuChem™ Double Antibody 17 $\beta$ - Estradiol Fa. ICN Biomedicals GmbH; Eschwege) bestimmt.

Der 125I-Estradiol –Assay ist ein Radioimmunoassay (RIA) zur quantitativen Bestimmung von Estradiol (E2) im Serum oder Plasma. Der Test mißt die unkonjugierte Form des Estradiols. Es wird nicht zwischen Proteingebundenem (Albumin, CBG) und freiem Estradiol unterschieden.

Das Prinzip eines kompetitiven Radioimmunoassays entspricht dem unter 3.1.5.4 beschriebenen Assayaufbau zur Bestimmung der Progesteronkonzentration. Zur Abtrennung von antikörpergebundenem und freiem 125 I-Estradiol wird in diesem Test die Doppelantikörpermethode eingesetzt, wobei ein zweiter Antikörper im Überschuß zugegeben wird. Durch Zentrifugation wird der sich gebildete zweite Antikörper-Antikörper- Ag-Komplex abgetrennt, ungebundenes Antigen wird dekantiert und die Radioaktivität im Niederschlag des Teströhrchens mittels eines Gamma- Counters gemessen.

### 3.1.5.6 Statistische Auswertung

Die Analyse der gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des Programmes SPSS<sup>®</sup> für Windows (SPSS Inc. München), Version 10.0.7 in der Standardversion durchgeführt.

Um das Messgerät zu validieren, wurden 4 verschiedene Versuchsschemata geplant:

- A- Ein Versuch um die Wiederholbarkeit der Messwerte unter definierten Laborbedingungen zu ermitteln.
- B- Ein Versuch um die Wiederholbarkeit unter in-vivo Bedingungen am Tier zu ermitteln.
- C- Ein Versuch um die Einflüsse von Untersucher und Stute auf den Messwert zu ermitteln.
- D- Ein Versuch um die Einflüsse von Meßort und Stute auf den Messwert zu ermitteln.

Zu A:

Es wurde als erstes ein Laborversuch geplant, um die Wiederholbarkeit der Messwerte unter festen Bedingungen zu ermitteln. Hierzu wurde der Messkopf in eine definierte Wassertiefe verbracht und der auf die Membranen wirkende hydrostatische Druck durch zehn Wiederholungsmessungen miteinander verglichen. Zur Charakterisierung der Verteilungen der Einzelwerte des Drucks bei den Wiederholungsmessungen (=Meßperioden) werden, wie auch bei den weiteren Validierungsversuchen, als Lagemaße arithmetisches Mittel und Median, als Streuungsmaße Standardabweichung, Variationskoeffizient, Spannweite und Interquartilsbreite sowie Minimum- und Maximum der gemessenen Druckwerte ermittelt. Um zu quantifizieren, wie stark die einzelnen Druckwerte innerhalb der Meßperioden und wie stark darüberhinaus die Mittelwerte der Meßperioden streuen, wird eine Varianzkomponentenschätzung nach dem Typ der "quadratischen unverzerrten Schätzung mit minimaler Norm" (MINQUE) herangezogen. Dabei wird die Gesamtvarianz der einzelnen Druckmessungen des Laborversuchs in die beiden entsprechenden Komponenten (innerhalb der Meßperioden und zwischen den Meßperioden) zerlegt und ihre prozentuale Aufteilung auf die beiden Varianzquellen ermittelt.

Die Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung sind bei den vorliegenden Daten allerdings mit Vorsicht zu interpretieren und können nur grob orientierenden Charakter haben, denn die dargestellten Meßwerteverteilungen lassen daran zweifeln, daß die bei Varianzkomponentenschätzungen oder Varianzanalysen getroffenen Verteilungsannahmen (Normalverteilungen mit vergleichbaren Streuungen) bei den hier ausgewerteten Druckmessungen zutreffend sind. Diese Einschränkung gilt ebenso für die Interpretation der Varianzkomponentenschätzungen und Varianzanalysen der weiteren Validierungsversuche.

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse wurden zum einen die Lage der Mediane für jede einzelne Messperiode dargestellt. Zum anderen wurde zur gemeinsamen Darstellung ein Boxplot gewählt. Bei den verwendeten Boxplots entspricht die Höhe der Box der Interquartilsbreite, die Länge der Whiskers maximal der 1,5-fachen Boxhöhe. Die Lage des Median ist durch eine horizontale Linie innerhalb der Box gekennzeichnet. Ausreißer werden als Kreise dargestellt. Sie sind als Werte definiert, die weiter als die 1,5-fache Interquartilsbreite von der Box entfernt liegen. Extremwerte werden als Kreuze dargestellt und sind als Werte definiert, die weiter als die 3-fache Interquartilsbreite von der Box entfernt liegen.

Zu B:

Nun wurde die Wiederholbarkeit der Messung am Tier überprüft. Hierzu wurden an zwei Ponystuten jeweils neun Meßperioden unmittelbar hintereinander durchgeführt. Messort sowie Untersucher waren immer gleich. Die Vorbereitung der Messung erfolgte analog zu dem bereits im Kapitel 3.2.1.3 aufgeführten Verfahren. Jedoch wurde nach einer jeden Meßperiode das System aus dem Genitale entfernt und anschließend neu inseriert. Gemessen wurde stets in der selben Tiefe im Scheidenvorhof. Nach jeweils drei Meßperioden wurde eine neue Schutzhülle aufgezogen, sowie ein erneuter Nullabgleich vorgenommen, also das System auf 38,0°C erwärmt und anschließend auf den aktuellen, hydrostatischen Druck von 3,3 mm Hg eingestellt, um Fehler durch eventuelle Undichtigkeiten des Systems oder Änderungen des atmosphärischen Druckes zu berücksichtigen. In Analogie zum 1. Versuch interessiert auch hier die zufällige Streuung der einzelnen Druckwerte innerhalb der Meßperioden und die zusätzliche zufällige Streuung der Mittelwerte zwischen den Meßperioden. Diese sind hier aber innerhalb der einzelnen Stuten zu betrachten, eine zusätzliche zufällige Streuung zwischen verschiedenen Stuten kann in der Gesamtstreuung der Druckmessungen dieses Versuches nun noch hinzukommen.

Zur Quantifizierung der verschiedenen Streuungskomponenten wird auch hier eine Varianzkomponentenschätzung vorgenommen. Die Gesamtvarianz wird in drei Komponenten zerlegt: innerhalb der Meßperioden, zwischen den Meßperioden innerhalb der Stuten und zwischen den Stuten.

Zur graphischen Darstellung der Meßergebnisse wurden Boxplots mit den oben genannten Eigenschaften gewählt.

Zu C:

Als Folgeversuch sollte der Einfluß des Untersuchers und der untersuchten Stute überprüft werden. Hierzu wurden bei zwei Stuten jeweils 10 aufeinanderfolgende Meßperioden in der selben Tiefe von 3 verschiedenen Untersuchern durchgeführt. Der Messort blieb wie im vorangegangenen Versuch stets gleich. Die Randomisierung der Untersucherfolge erfolgte durch ein Losverfahren. Die zufällige Streuung der einzelnen Druckwerte innerhalb der Meßperioden und die zusätzliche zufällige Streuung der Mittelwerte zwischen den Meßperioden sind nun innerhalb der Kombinationen von Stuten und Untersuchern zu betrachten. Die Gesamtstreuung der Druckmessungen dieses Versuches kann noch zusätzliche zufällige Streuung zwischen diesen Kombinationen sowie zwischen den Stuten und zwischen den Untersuchern als solchen enthalten.

Zur Quantifizierung der verschiedenen Streuungskomponenten wird wieder eine Varianzkomponentenschätzung vorgenommen. Die Gesamtvarianz wird dabei in fünf Komponenten zerlegt: innerhalb der Meßperioden, zwischen den Meßperioden innerhalb der Stuten und Untersucher, zusätzliche Varianz aufgrund einer Wechselwirkung von Stute und Untersucher, zusätzliche Varianz zwischen den Stuten und zusätzliche Varianz zwischen den Untersuchern. Aus den geschätzten Komponenten wird auch wieder die prozentuale Aufteilung der Gesamtvarianz auf die genannten Varianzquellen ermittelt. Zur graphischen Darstellung der Meßergebnisse wurden Boxplots mit den oben genannten Eigenschaften gewählt.

Zu D:

Schliesslich sollte der Einfluß des Meßortes und der untersuchten Stute auf das Meßergebnis überprüft werden. Es wurde folgendes Versuchsdesign gewählt: Bei 3 Stuten wurden an drei verschiedenen Meßpunkten entlang des Genitalkanals (Vorhof, Hymenalring, kraniale Vagina) jeweils 2 Meßperioden unmittelbar hintereinander durchgeführt (Methodik siehe 3.2.1.3.1). Außerdem wurde die Meßreihe zwei Tage später (Untersuchungstage 22.11.1999 und 24.11.1999) wiederholt. Die zufällige Streuung der einzelnen Druckwerte innerhalb der Meßperioden und die zusätzliche zufällige Streuung der Mittelwerte zwischen den Meßperioden sind bei diesem Versuchsaufbau innerhalb der Kombinationen von Stuten und Meßorten zu betrachten. Zusätzliche zufällige Streuung zwischen den Kombinationen von Stute und Meßort sowie zwischen den Stuten als solchen kann neben systematischen Unterschieden zwischen den Meßorten in der Gesamtstreuung der Druckmessungen dieses Versuches noch hinzukommen.

Zur Quantifizierung der verschiedenen zufälligen Streuungskomponenten werden auch hier Varianzkomponentenschätzungen gewählt. Die zufällige Gesamtvarianz wird dabei in vier Komponenten zerlegt: innerhalb der Meßperioden, zwischen den Meßperioden innerhalb der Stuten und Meßorte, zusätzliche Varianz aufgrund einer Wechselwirkung von Stute und Meßort sowie zusätzliche Varianz zwischen den Stuten.

Bei dem Faktor Meßort wird von festen Effekten auf den als abhängige Größe gemessenen Druck ausgegangen. Um den Einfluß dieses Faktors zu untersuchen, werden Varianzanalysen durchgeführt. Das zugrunde gelegte Modell berücksichtigt einen festen Haupteffekt des Faktors Meßort und einen zufälligen Haupteffekt des Faktors Stute, dann einen zufälligen Wechselwirkungseffekt von Meßort und Stute, und innerhalb dieser Wechselwirkungseffekte noch einen zufälligen Effekt der Meßperiode. Den Rest bilden die einzelnen Druckmessungen innerhalb der Meßperioden. Von Interesse ist dabei vor allem die Bewertung des Wechselwirkungseffektes von Meßort und Stute, der in Bezug zum Effekt der Meßperiode (innerhalb von Meßort und Stute) zu sehen ist, sowie die Bewertung des festen Haupteffektes des Faktors Meßort, der in Bezug zum Wechselwirkungseffekt zu sehen ist.

Von erkennbaren Effekten wird im folgenden ausgegangen, wenn die bei der Varianzanalyse berechneten Überschreitungswahrscheinlichkeiten kleiner als 5% ( $p < 0.05$ ) sind.

Im zweiten Abschnitt, den Untersuchungen über die klinische Bedeutung der intravaginalen Druckverhältnisse und deren Beziehung zu klinischen und endokrinologischen Parametern wurde das Versuchdesign bereits in den Abschnitten 3.1.1 - 3.1.5.5 beschrieben. Zur Darstellung der im Laufe der Zeit ermittelten Messergebnisse im Scheidenvorhof werden Verlaufskurven gewählt, die für jede Stute einzeln gezeichnet werden. Zu einer gemeinsamen Betrachtung der ermittelten Daten, geordnet nach dem Untersuchungstag wird dann zu Boxplots gewechselt und dieses Schema auch bei den anderen Messorten beibehalten, obwohl dabei die Zugehörigkeit der Messergebnisse zu den Stuten verloren geht, und individuelle Verläufe und Besonderheiten damit nicht mehr erkennbar sind.

Für die Datensätze (5 Stuten über drei Zyklen) der erhobenen Parameter (s. 3.1.1 - 3.1.5.5) erfolgte dann die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.