

Aus dem
Institut für Veterinär-Pathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

**Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der equinen Endometrose
unter besonderer Berücksichtigung endometrialer Proteine und Kohlenhydrate**

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

eingereicht von
Christine Hoffmann
aus Weinheim a. d. Bergstraße

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon

Gutachter: Prof Dr. Heinz-Adolf Schoon

Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Sobiraj

Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

PD Dr. Harald Sieme

Niedersächsisches Landesgestüt in Celle

Tag der Verteidigung: 26.01.2006

*Meinen Eltern,
Katja und Andreas*

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Morphologie des Uterus der Stute	2
2.2	Der endometriale Zyklus	2
2.2.1	Allgemeine Betrachtungen	2
2.2.1.1	Histomorphologie des Endometriums in den Zyklusphasen	2
2.2.1.2	Physiologische Inaktivität (Winteranöstrus)	4
2.2.1.3	Physiologische Asynchronizität (Übergangszyklen)	4
2.2.2	Regulation des endometrialen Zyklus	4
2.2.2.1	Steroidhormonwirkung	4
2.2.2.2	Parakrine Regulationsmechanismen	5
2.2.3	Immunhistologische Untersuchung des endometrialen Zyklus der Stute	7
2.2.3.1	Östrogen- und Progesteronrezeptoren, Ki-67-Antigen	7
2.2.3.2	Intermediärfilamente, Basallamina	9
2.3	Plazentation der Stute	9
2.4	Sekretorische Aktivität des Uterus	9
2.4.1	Allgemeine Betrachtungen	9
2.4.2	Endometriale Proteine	10
2.4.2.1	Uteroglobulin/Sekretoglobulin	10
2.4.2.2	Uteroferrin	11
2.4.2.3	Uterokalin	12
2.4.2.4	Calbindin _{D9k}	13
2.4.3	Endometriale Kohlenhydrate	13
2.4.3.1	Glykogen	13
2.4.3.2	Proteoglykane	14
2.4.4	Nachweis der Proteine und Kohlenhydrate während des endometrialen Zyklus	14
2.4.5	Regulation der uterinen Sekretion	14
2.5	Die Endometriumbiopsie	18

2.6	Pathologie des Endometriums	20
2.6.1	Glanduläre Fehldifferenzierungen	20
2.6.2	Endometritis	21
2.6.3	Entzündliche und degenerative Gefäßveränderungen	21
2.6.4	Lymphlakunen	22
2.6.5	Die equine Endometrose	22
2.6.5.1	Allgemeine Betrachtungen	22
2.6.5.2	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Endometrose	23
2.6.5.3	Auswirkung der Endometrose auf die uterinen Proteine und Kohlenhydrate	27
2.6.5.4	Die Endometrose während der Trächtigkeit und im Puerperium	28
2.7	Allgemeine Pathogenese der Fibrose	29
2.7.1	Fibroblasten/Myofibroblasten	29
2.7.2	Extrazelluläre Matrix	31
2.7.3	Pathogenetische Faktoren in der Entstehung einer Fibrose	31
2.7.3.1	Wachstumsfaktoren und Zytokine	31
2.7.3.2	Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren	32
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	34
3.1	Tiergut	34
3.1.1	Nähere Charakterisierung des Tiergutes	34
3.2	Methoden	36
3.2.1	Histologische Präparation	36
3.2.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen	36
3.2.2.1	Beurteilung des Endometriums anhand der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Biopsien	36
3.2.3	Spezielle histochemische Untersuchungen	37
3.2.4	Immunhistologische Methoden	38
3.2.5	Immunhistologische Kontrollen	39
3.2.6	Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen	39
3.2.7	Statistische Untersuchungen	40

4	ERGEBNISSE	41
4.1	Histomorphologische Charakterisierung der Endometrose und statistische Auswertung	41
4.1.1	Histomorphologische Charakterisierung der Endometrose im Untersuchungsgut	41
4.1.2	Statistische Auswertung unter Berücksichtigung anamnestischer Daten	43
4.1.2.1	Altersverteilung	43
4.1.2.2	Reproduktionsstatus	43
4.2	Untersuchungen potenzieller Einflussfaktoren auf den Verlauf der Endometrose	43
4.2.1	Untersuchungen möglicher saisonal und zyklisch bedingter Einflüsse	44
4.2.2	Untersuchungen zum möglichen Einfluss der Gravidität	44
4.2.3	Untersuchungen eines möglichen Einflusses von Endometritiden	45
4.2.4	Die Endometrose und andere Alterationen des Endometriums	47
4.3	Histomorphologische, histochemische und immunhistologische Untersuchungen der unterschiedlichen Erscheinungsformen der Endometrose	48
4.3.1	Aktive Endometrose	48
4.3.2	Inaktive Endometrose	52
4.3.3	Aktive destruierende Endometrose	55
4.3.4	Inaktive destruierende Endometrose	59
4.3.5	Vergleichende, gruppenspezifische Zusammenfassung der histopathologischen Befunde und statistische Auswertung der erhobenen Daten	62
4.4	Endokrinologische Ergebnisse und immunhistologische Steroidhormonrezeptor-Analyse der Zyklusstuten (Kontrollstuten ohne Endometrose)	64
4.5	Immunhistologische und histochemische Untersuchungen der endometrial synthetisierten Proteine und des Glykogens im Verlauf des Zyklus	65
4.5.1	Uteroglobin/Sekretoglobin	65
4.5.2	Uteroferrin	67
4.5.3	Calbindin _{D9k}	68
4.5.4	Uterokalin	70
4.5.5	Glykogen	72
4.5.6	Vergleichende Zusammenfassung der während des Zyklus (Kontrollstuten) erhobenen histopathologischen Befunde	73

4.6	Immunhistologische und histochemische Untersuchungen zum Nachweis der endometrialen Proteine und Kohlenhydrate im Rahmen der Endometrose	75
5	DISKUSSION	78
5.1	Ziel der Arbeit	78
5.2	Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials und der Untersuchungsmethoden	78
5.3	Die equine Endometrose	79
5.3.1	Allgemeine Betrachtungen	79
5.3.2	Einflussfaktoren auf den Verlauf der Endometrose	80
5.3.3	Erscheinungsformen der Endometrose	82
5.4	Hypothesen zur Ätiopathogenese der equinen Endometrose	86
5.5	Zyklische Veränderungen der endometrial synthetisierten Proteine und des Glykogens	90
5.5.1	Uteroglobulin (UGL)/Sekretoglobin	90
5.5.2	Uteroferrin (UF)	91
5.5.3	Calbindin _{D9k} (CAL)	92
5.5.4	Uterokalin (UKA)	92
5.5.5	Glykogen (GLY)	93
5.6	Veränderungen des glandulären Protein- und Kohlenhydratmusters im Rahmen der Endometrose	94
5.7	Funktionelle Bedeutung der im Rahmen der Endometrose auftretenden Veränderungen des glandulären Protein- und Kohlenhydratmusters	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	99
7	SUMMARY	101
8	LITERATURVERZEICHNIS	103
9	ANHANG	137

9.1	Charakterisierung des Tiergutes	137
9.2	Verdauung mit testikulärer Hyaluronidase zum Nachweis von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat A, C	140
9.3	Verdauung mit Streptomyces Hyaluronidase zum Nachweis von Hyaluronsäure	140
9.4	Für die Immunhistologie verwendete Primärantikörper und Positivkontrollen	141
9.5	Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen	142
9.5.1	Vorbehandlung	142
9.5.2	Besondere Verfahren	142
9.5.3	Antigennachweis mittels monoklonaler AK nach der PAP-Methode	143
9.5.4	Antigennachweis mittels polyklonaler AK nach der PAP-Methode	143
9.5.5	Standard zur Nachbehandlung	144
9.5.6	Verwendete Antikörper und Seren	144
9.5.7	Lösungen und Puffer	146
9.6	Bilddokumentation	148

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abf.	Abfohlung
α -GMA	Glattmuskulatur- α -Aktin
Anz.	Anzahl
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAL	Calbindin _{D9k}
Ca-Mg-ATPase	Calcium-Magnesium-Adenosintriphosphatase
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Östrogen
ECM	extrazelluläre Matrix
ED	Einzeldrüse
EGF	Epidermal Growth Factor
EM	Endometrose
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii
f	folgende Seite
ff	folgende Seiten
ges.	gesamt
ggf.	gegebenenfalls

Abkürzungsverzeichnis

ggr.	geringgradig
GLY	Glykogen
hgr.	hochgradig
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
HRE	Hormone-Responsive-Element
IGF	Insulin-like Growth Factor
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin Gamma
ina.	inaktiv
Int.	Interöstrus
Irr.	Irregulär
IRS	Immunreaktiver Score
J.	Jahre
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
M	Molar
mab	monoclonal antibody
mgr.	mittelgradig
min.	Minuten
mM	milli-Molar
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n.b.	nicht beurteilbar
Ne	Drüsennest
ng	Nanogramm
o.A.	ohne Angabe
o.b.B.	ohne besonderen Befund
o.g.	oben genannten

Abkürzungsverzeichnis

Ov.	Ovulation
P	Progesteron
pab	polyclonal antibody
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PAS	Periodic-acid-Schiff
PBS	Phosphate-buffered-saline
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PG	Proteoglykane
pg/ml	Pikogramm/Milliliter
p.inf.	post infectionem
PLA2	Phospholipase A2
p.ov.	post ovulationem
PR	Progesteronrezeptor
Prol.	Proliferation
S.	Seite
s.	siehe
Sek.	Sekretion
SI	Staining Intensity
SSc	Sekretions-Score
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered-saline
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
u.	und
u.a.	unter anderem
üb.	überwiegend

Abkürzungsverzeichnis

UGL	Uteroglobulin
UF	Uteroferrin
UKA	Uterokalin
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WF	Wachstumsfaktoren
z.T.	zum Teil
μl	Mikroliter

1 Einleitung

Die Endometrose der Stute bezeichnet eine aktive oder inaktive (RAILA 2000) periglanduläre und/oder stromale endometriale Fibrose einschließlich der glandulären Alterationen innerhalb der fibrotischen Areale (SCHOON et al. 1995). Die Ätiologie und Pathogenese dieser fertilitätsrelevanten, irreversiblen Erkrankung ist unklar. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher, den Einfluss zyklus- und jahreszeitlich bedingter endokriner Variationen, entzündlicher sowie degenerativer endometrialer Erkrankungen, sowie trächtigkeitsassoziiierter Veränderungen auf den Verlauf und die Form der Endometrose zu prüfen. Darüber hinaus wird eine systematische morphologische und immunhistologische Charakterisierung verschiedener Formen der Endometrose durchgeführt.

Die im Rahmen der Endometrose auftretenden Alterationen umfassen glanduläre Fehldifferenzierungen und epitheliale Degenerationserscheinungen. Die Folge ist eine Veränderung des sekretorischen Proteinmusters, die zu einer Störung des intrauterinen Milieus führt und so einen embryonalen Früh Tod begünstigt. Während mehrere Autoren bei Analysen von Uteruspülproben infertiler Stuten eine Veränderung des uterinen Mikromilieus feststellen können, existieren nur einzelne morphologisch-funktionelle Untersuchungen des endometrialen Protein- und Kohlenhydratmusters im Rahmen der Endometrose. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher, die endometrial synthetisierten Proteine Uteroglobin, Uteroferrin, Uterokalin und Calbindin_{D9k} sowie das Glykogen im Verlauf des Zyklus darzustellen. Darüber hinaus werden in einer detaillierten Untersuchung die Auswirkungen der Endometrose auf das glanduläre Protein- und Kohlenhydratmuster charakterisiert.

Die histomorphologische Beurteilung von Endometriumbiopsien der Stute stellt, eingebunden in eine umfassende klinische Untersuchung, ein wichtiges Hilfsmittel für die Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen dar. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse bilden die Basis für nachfolgende, problembezogene Behandlungskonzepte und erlauben gleichzeitig eine Prognose der Fertilitätsaussichten der Stute. Die hier durchgeführte histomorphologische Charakterisierung der verschiedenen Endometroseformen und die Darstellung der durch die Endometrose bedingten Alterationen des glandulären Protein- und Kohlenhydratmusters ermöglichen in Zukunft eine präzisere funktionelle Interpretation der im Rahmen der Routinediagnostik erhobenen Befunde.

2 Literaturübersicht

2.1 Morphologie des Uterus der Stute

Der Uterus der Stute besteht aus der Mukosa (Endometrium), der Muskularis (Myometrium) und der Serosa (Perimetrium) (HAMMOND u. WODZICKI 1941).

Nach KENNEY (1978) setzt sich das Endometrium aus dem einfachen, teils kinozilientragenden luminalen Epithel und der, aus spinozellulärem Bindegewebe bestehenden, Lamina propria zusammen. Letztere besteht aus dem subepithelialen, kapillar- und zellreichen Stratum compactum und dem darunterliegenden Stratum spongiosum, das neben zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen auch die Glandulae uterinae enthält. Diese stellen Epithelschläuche dar, die sich vom Oberflächenepithel aus in die Tiefe senken, wobei von den mittleren und basalen Anteilen zehn oder mehr Äste abgehen, von welchen wiederum Sekundäräste abzweigen. Zwischen dem Endo- und dem Myometrium liegt das drüsenarme, aber gefäßreiche Stratum subglandulare (VOGEL u. HUMKE 1973). Das, aus glatten Muskelzellen bestehende, Myometrium wird in eine innere zirkuläre und eine äußere longitudinale Schicht unterteilt. Zwischen beiden Anteilen findet sich das gefäßreiche Stratum vasculare (LIEBICH 1993). Die Serosa ist der Muskularis aufgelagert (KENNEY 1978).

2.2 Der endometriale Zyklus

2.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Stute ist saisonal polyöstrisch. Im späten Herbst und Winter sind die Ovarien und das Endometrium physiologischerweise inaktiv (KENNEY u. DOIG 1986, SCHOON et al. 1992). Die durchschnittliche Zykluslänge beträgt 22 Tage (AURICH u. KLUG 1993) und wird funktionell in die ca. 8 Tage dauernde Proliferationsphase, bestehend aus Präöstrus (3 Tage), Östrus (2-3 Tage) und Postöstrus (3 Tage), die ca. 9 Tage dauernde Sekretionsphase (früher und mittlerer Interöstrus) und in die ca. 4 Tage dauernde Phase der Involution (später Interöstrus) unterteilt (BRUNCKHORST u. SCHOON 1990, SCHOON et al. 1992).

2.2.1.1 Histomorphologie des Endometriums in den Zyklusphasen

Der endometriale Zyklus ist durch typische, hormonabhängige, morphologische und funktionsassoziierte Umbauvorgänge des luminalen und glandulären Epithels, sowie der Stromazellen gekennzeichnet. Anhand der in Tab. 2.1. (S. 3) aufgelisteten Merkmale können die verschiedenen endometrialen Zyklusphasen der Stute histologisch unterschieden werden.

Tab. 2.1: Histomorphologische Charakteristika des endometrialen Zyklus der Stute

	Präöstrus	Östrus	Postöstrus	Sekretionsphase	Involutionsphase
luminales Epithel	kubisch bis zylindrisch ^{1,2,3,5,6,12,14} z.T. pseudogeschichtet ^{1,6,14} wenig Mitosen ^{3,12}	zylindrisch, teils pseudogeschichtet ^{2,3,5,11,12} große, runde, hypochromatische Kerne ^{12,13} zahlreiche Mitosen ^{2,3,12}	hochprismatisch, teils pseudogeschichtet ^{3,11,13} große, rundovale, hypochromatische Kerne ³ zahlreiche Mitosen ³	hochprismatisch, ⁵ später isoprismatisch bzw. kubisch ^{2,6,7,11,12,13,14} ovale Kerne, später rundlich ^{5,13}	einreihig flach ^{2,3,12} , bis kubisch ^{8,13} , später Zunahme der Höhe ^{6,7,14} kleine, dunkle, ovale bis rundliche und unregelmäßige Kerne ¹³
glanduläres Epithel	kubisch ^{1,8} , iso- ⁵ bis hochprismatisch, ⁴ z.T. pseudogeschichtet ^{1,2} kleine, rundliche Kerne, ^{5,13} relativ chromatinreich ^{5,8} einige Mitosen ⁸	hochprismatisch, ^{1,5,8,9,10,13} z.T. pseudogeschichtet ¹³ ovale bis rundovale, hypochromatische Kerne ^{3,9,13} wenig Mitosen ^{3,12}	ähnliche Befunde wie im Östrus, jedoch intensiver	verminderte Höhe ^{3,9,14} basale, rundliche, mäßig chromatinhaltige Kerne ^{3,5,12} apikale Sekretionsvakuolen, Sekretfäden ^{3,4,5,9,13} Abnahme der Mitosenanzahl ^{8,9,12}	geringe Höhe ^{1,3,10,14} kleine, rundliche, hyperchromatische, an der Basalmembran lokalisierte Kerne ^{3,5,12,13}
Drüsenanordnung	beginnende Streckung ^{2,3,4,5,10, 12,14,15} Nesterbildung durch ödematisiertes Stroma ^{1,5,6,7,12} meist enge Lumina ohne Sekret ⁴	gestreckte Drüsen ^{1,2,3,4,5,12,14} erhöhte Drüsenzahl ^{1,4} und Drüsendurchmesser ^{1,4,8,11} geringere Drüsendichte ^{4,6,14} z.T. Sekret in Lumina ¹¹	Extension der Drüsen erreicht ihren Höhepunkt ^{3,4,12,14} hohe Mitoserate	hohe Drüsendichte ^{1,3,5,6,13,14} zunehmende Drüenschlängelung ^{1,5,6,7,11,13,14} weite ⁷ , sekrethaltige Lumina ¹³	dicht gelagerte Drüsen, ^{3,12,14} später Abnahme der Schlängelung ^{5,13} geringer Durchmesser ^{1,5} ggr. dilatierte Lumina ¹³
Stroma	ungleichmäßiges Ödem ^{5,6,7,12} kleine, spindelförmige ⁵ bis große ¹³ Kerne zahlreiche Mitosen ^{3,12}	Ödem ^{1,2,4,5,8,13} undifferenzierte ⁵ , große ^{3,12} Kerne hohe Mitoserate ^{3,13}		Ödemrückgang ^{3,4,6,13,14} größter Kernumfang in der Sekretionsphase ^{3,5,12}	abnehmende ^{6,13,14} bis fehlende Ödematisierung ¹ ovale, hypochromatische Kerne ¹³

Legende zu Tab. 2.1

1. BRANDT (1970)
2. BRUNCKHORST u. SCHOON (1990)
3. BRUNCKHORST et al. (1991)
4. GORDON u. SARTIN (1978)

5. HÄFNER (1999)
6. KENNEY (1978)
7. KENNEY u. DOIG (1986)
8. KNUDSON u. VELLE (1961)

9. RAILA (2000)
10. RICKETTS (1989)
11. ROSSDALE u. RICKETTS (1980)
12. SCHOON et al. (1992)

13. STRANKMEYER (1993)
14. Van CAMP (1988)
15. VOGEL u. HUMPKE (1973)

2.2.1.2 Physiologische Inaktivität (Winteranöstrus)

Der Winteranöstrus kann von November bis Februar bestehen (RÜSSE u. SINOWATZ 1991). In dieser Zeit tritt physiologischerweise infolge der ovariellen Inaktivität eine Atrophie des equinen Endometriums auf (KENNEY u. DOIG 1986, BRUNCKHORST et al. 1991). Das luminale und glanduläre Epithel ist dabei einreihig und kubisch mit kleinen, basophilen Zellkernen. Das Stroma ist nicht ödematisiert, und die Stromazellen haben eine spindelförmige Gestalt. Die Drüsen erscheinen gestreckt, englumig und in ihrer Anzahl reduziert (GORDON u. SARTIN 1978, KENNEY 1978, BRUNCKHORST et al. 1991).

2.2.1.3 Physiologische Asynchronizität (Übergangszyklen)

Die Übergangsperiode des Uterus von der physiologischen Inaktivität zur vollen Aktivität bzw. von dieser zum Anöstrus hin, tritt im Frühjahr bzw. Herbst auf. Dabei besteht zwischen der endometrialen Differenzierung und dem klinisch erhobenen Zyklusstand eine Asynchronizität (KENNEY 1978, GROSS u. LeBLANC 1984). In der Übergangszeit vom Anöstrus zur zyklischen Aktivität erscheinen die luminalen Epithelien und die Ausführungsgänge aktiver (KENNEY 1978, KENNEY u. DOIG 1986) als die in der Tiefe des Endometriums liegenden Uterindrüsen (GROSS u. LeBLANC 1984). Ursächlich wird eine verspätete Reaktion des Uterus auf den Anstieg der ovariellen Steroide angenommen (KENNEY 1978, KENNEY u. DOIG 1986). Während des Wechsels zum Anöstrus findet KENNEY (1978) noch hypertrophe Drüsen innerhalb schon atrophischer Endometrien.

2.2.2 Regulation des endometrialen Zyklus

2.2.2.1 Steroidhormonwirkung

Während Östrogene die Proliferation des Endometriums sowie die Hypertrophie und erhöhte Spontankontraktilität des Myometriums bedingen, ruft Progesteron nach vorausgegangener Östrogenwirkung u.a. die Sekretionsmorphologie des Endometriums hervor (DÖCKE 1994).

Die hormonellen Effekte werden im Endometrium durch die Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) vermittelt. Diese gehören zur Familie der Nuklearrezeptoren und stellen Transkriptionsfaktoren dar, die über ihre hochaffine, reversible Ligandenbindung die Genaktivität direkt im Zellkern regulieren (EVANS 1988, HAM u. PARKER 1989, AGARWAL 1990, PARKER 1990). Nach Bindung des spezifischen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die wiederum die Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz, das sogenannte Hormone-Responsive-Element (HRE), ermöglicht (TSAI u. O'MALLEY 1994). Letzteres ist in allen durch Steroide regulierten Genen zu finden (JENSEN 1990) und stellt einen hormonabhängigen Transkriptions-Verstärker dar (YAMAMOTO 1985). Die Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an das HRE bewirkt somit die Stimulation der Transkription (HAM

u. PARKER 1989). Neben „positiven“ HRE existieren auch „negative“, die eine Repression der Genexpression bedingen (AKERBLOOM u. MELLON 1991), so dass Östrogen und Progesteron die Transkription bestimmter Gene induzieren und gleichzeitig die Expression anderer Gene supprimieren können (LANDERS u. SPELSBERG 1992).

Bei progesteronabhängigen Genen treten auf der Ebene der DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung Interaktionen zwischen dem aktivierten Rezeptor und spezifischen, regulatorisch auf das Ausmaß der Genexpression einwirkenden Proteinen auf. Des Weiteren besteht ein funktioneller Synergismus zwischen ER und PR (BRADSHAW et al. 1991). Auch die Chromatinstruktur, die ebenfalls Bindungsstellen für Steroidhormonrezeptoren besitzt, zeigt einen direkten Einfluss auf die Genregulation, denn die Zugänglichkeit einer HRE-Sequenz in einem bestimmten Gen entscheidet letztlich darüber, ob es aktiviert wird oder nicht (SPELSBERG et al. 1989, BEATO et al. 1996). Auch posttranskriptionell entfalten Steroidhormone eine Wirkung auf die Genexpression. Sie können das mRNA-Processing, die RNA-Stabilität, die Translation, das Protein-Processing und die Sekretion beeinflussen (SPELSBERG et al. 1989).

Östrogene und Progesteron beeinflussen die Konzentration ihrer spezifischen Rezeptoren gleich- und wechselseitig. So können zahlreiche Autoren *in vitro* und *in vivo* eine Stimulation der ER- und PR-Expression durch Östrogene nachweisen (PIVA et al. 1988, JENSEN 1990, SWANECK u. FISHMAN 1991, BERGMANN et al. 1992, WATHES et al. 1996, AUPPERLE et al. 2000). Im Gegensatz dazu bewirkt Progesteron eine Hemmung dieser östrogenvermittelten stromalen und epithelialen Expression von ER und PR (IWAI et al. 1995, WATHES et al. 1996, AUPPERLE et al. 2000).

2.2.2.2 Parakrine Regulationsmechanismen

Die zelluläre Proliferation des Endometriums wird über parakrine Wirkungsmechanismen vermittelt, die auf den dreidimensional organisierten stromal-epithelialen Wechselwirkungen unter Einbeziehung der Extrazellulärmatrix (ECM) beruhen (TOOLE 1991, ARNOLD et al. 2001, BIGSBY 2002). So können COOKE et al. (1997) im Mausmodell und PIERRO et al. (2001) *in vitro* nachweisen, dass die mitogene Wirkung des Östrogens auf die Epithelien durch stromale ER vermittelt wird. Die Autoren vermuten, dass die Bindung des Östrogens an seinen stromalen Rezeptor die Synthese parakriner Faktoren bedingt, welche wiederum in der Lage sind, die Proliferation des Epithels zu stimulieren. Die stromalen PR hingegen vermitteln die anti-proliferative Wirkung des Progesterons, wobei mehrere Wirkungsmechanismen (s. Abb. 2.1, S. 6) denkbar sind (KURITA et al. 1998): Progesteron beeinträchtigt möglicherweise die intrazelluläre Synthese bzw. die Sekretion von östrogenabhängigen parakrinen Faktoren (1). Es könnte jedoch auch ein Faktor induziert werden, der die Wirkung östrogenabhängiger Mediatoren inhibiert (2) oder Progesteron hemmt indirekt die epitheliale Proliferation über einen parakrinen Faktor (3)

YANG et al. (2001) beobachten *in vitro*, nach Aktivierung stromaler PR, die Freisetzung von Faktoren, die in den benachbarten Epithelien die Transkription der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase induzieren, ein Enzym, das die Konversion des aktiven Östradiols in das inaktive Östron katalysiert. Ein reziproker Wirkungsmechanismus, d.h. die Beeinflussung des Stromas durch epitheliale Faktoren, wird ebenfalls vermutet (BIGSBY et al. 1993, BIGSBY 2002). So sehen IRWIN et al. (1991) die Epithelien als Quelle eines Wachstumsfaktors an, welcher in Verbindung mit Progesteron die Stromazellproliferation stimuliert.

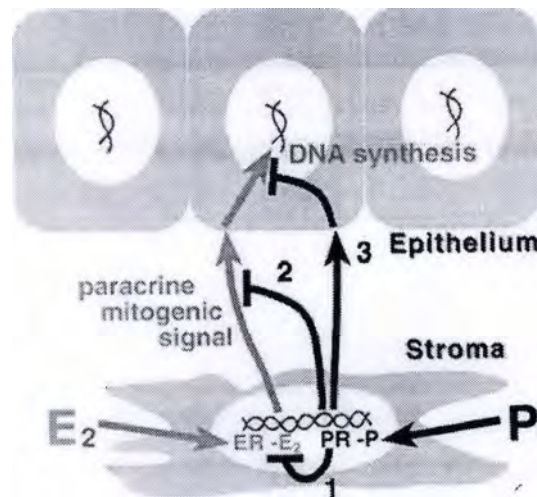


Abb. 2.1: Schematische Darstellung möglicher parakriner Wirkungsmechanismen von Östradiol und Progesteron (nach KURITA et al. 1998). Abkürzungen: E2 = Östradiol, P = Progesteron, ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor

Im Gegensatz zur zellulären Proliferation wird die Synthese östrogenabhängiger epithelialer Sekretionsprodukte, wie beispielsweise Laktoferrin und C3, nur in Anwesenheit beider, d.h. stromaler und epithelialer ER induziert. Der Wirkungsmechanismus dieser Regulation ist bisher unklar (BUCHANAN et al. 1999).

Eine wesentliche Bedeutung in den parakrinen Regulationsmechanismen kommt der ECM, insbesondere der Basalmembran zu. So kann die Bindung parakriner Faktoren an die Proteoglykane der ECM deren Wirkung durch Speicherung und verzögerte Freisetzung verlängern bzw. potenzieren, diese aber auch sequestrieren und neutralisieren (RUOSLAHTI u. YAMAGUCHI 1991, TOOLE 1991). Zudem können ARNOLD et al. (2001) mittels eines *in vitro* Modells, das epitheliale und stromale Anteile sowie Basalmembrananteile enthält, nachweisen, dass nur subepitheliale Stromazellen eine parakrin aktive phänotypische Differenzierung aufweisen, möglicherweise bedingt durch einen von der Basalmembran ausgehenden Stimulus. Des Weiteren scheint die Basalmembran ein Mediator der vom Stroma ausgehenden regulatorischen Signale zu sein. Die Autoren vermuten daher, dass eine intakte parakrine Beziehung zwischen Stroma und

Epithel auf die beidseitigen Wechselwirkungen mit der Basalmembran angewiesen ist. Weitere Hinweise auf die Beeinflussung der zellulären Differenzierung durch die ECM ergeben die *in vitro* Untersuchungen von LIN und BISSELL (1993) bzw. STREULI et al. (1995), die nur in Anwesenheit von Basalmembran-Komponenten bzw. von Laminin die Expression des sekretorischen Proteins β -Casein in epithelialen Zellen der Mamma induzieren können. Eine deutlich alterierte Basalmembran und ECM, die eine Beeinträchtigung stromal-epithelialer Kontakte bedingt, weisen zudem HORBELT et al. (1994) bei hyperplastischen endometrialen Epithelien nach.

Einige dieser Interaktionen zwischen den Epithelien und der umgebenden ECM werden durch eine Klasse von Transmembranrezeptoren, den sog. Integrinen übertragen (GIANELLI et al. 2003). Diese Zelloberflächen-Glykoproteine (LESSEY u. ARNOLD 1998) vermitteln über ihre Bindung an die ECM-Makromoleküle einerseits die Zelladhäsion und Migration, andererseits übertragen sie intrazelluläre Signale, welche die zelluläre Differenzierung und Proliferation sowie die Apoptose beeinflussen (ALBELDA u. BUCK 1990, FRIEDL et al. 1998, LOHI et al. 1998).

Darüber hinaus existieren zahlreiche, zyklusabhängige Wachstumsfaktoren und Zytokine. Eine repräsentative Auswahl zeigt Tab. 2.2. (S. 8), wobei die angegebenen Daten sich auf den humanen Menstruationszyklus beziehen.

2.2.3 Immunhistologische Untersuchung des endometrialen Zyklus der Stute

2.2.3.1 Östrogen- und Progesteronrezeptoren, Ki-67-Antigen

Die Expression der Steroidhormonrezeptoren kann mittels immunhistochemischer Methoden dargestellt werden. Die Konzentration der Rezeptoren wird dabei mit Hilfe eines immunreaktiven Scores veranschaulicht, der neben der Anzahl positiver Zellen auch deren Färbeintensität berücksichtigt (BRUNCKHORST et al. 1991, ÖZGEN et al. 1997).

AUPPERLE et al. (2000) beobachten bei der Expression der ER und PR eine enge Korrelation zu den peripheren Plasmahormonkonzentrationen, wobei jedoch Stromazellen und Epithelien ein unterschiedliches Reaktionsmuster aufweisen. So zeigen die glandulären Epithelien im Östrus und Postöstrus einen Anstieg der ER- und PR-Expression, erreichen im frühen Interöstrus (Tag 5) einen maximalen Wert und fallen in der Sekretionsphase wieder ab (ÖZGEN et al. 1997, RAILA et al. 1997, AUPPERLE et al. 2000).

Ein entsprechendes Reaktionsmuster zeigt der Proliferationsmarker Ki-67-Antigen. Die ausgeprägteste Expression wird am Tag 5 des Zyklus erreicht, während im Verlauf der Sekretionsphase eine deutliche Verminderung der Proliferationsaktivität zu beobachten ist (AUPPERLE et al. 2000). Die Stromazellen besitzen die höchste ER-Konzentration vor dem Östrus (BRUNCKHORST et al. 1991) bzw. zum Zeitpunkt der Ovulation (AUPPERLE et al. 2000). Mit Beginn des Interöstrus kommt es zu einer Verminderung der Expression, die in einer nur schwachen

Reaktivität in der Lutealphase resultiert (AUPPERLE et al. 2000). Im Gegensatz dazu erreicht die PR-Expression ihre intensivste Ausprägung im späten Interöstrus, während des frühen Interöstrus hingegen sind nur niedrige Konzentrationen nachweisbar (ÖZGEN 1999, AUPPERLE et al. 2000). Auch hier zeigt sich eine Übereinstimmung mit der nur während des Präöstrus deutlich nachweisbaren Ki-67-Antigen Expression (AUPPERLE et al. 2000).

Tab. 2.2: Ausgewählte Wachstumsfaktoren und ihre Wirkungen im endometrialen Zyklus des Menschen

Name	Lokalisation	Zeiträume des Nachweises	Funktion
EGF	Epithel ^{7,11,12} Stromazellen ^{7,9}	späte ¹¹ Proliferationsphase ⁹	vermittelt Effekte von E ^{7,25} , induziert epitheliale ⁷ und stromale ^{3,16} Proliferation steigert die Glukoneogenese und Glukolyse, die Sensitivität von PR ²³ und hemmt die stromale Synthese von Prolaktin, Laminin, Fibronektin ¹²
TGF-α	Epithel ^{8,10,11,22} Stromazellen ¹⁰	späte ¹¹ Prolifera- tionsphase ^{8,10,22}	P-abhängige Stimulation der Stromazellproliferation ¹²
TGF-β_1 TGF-β_2 TGF-β_3	vorwiegend ⁴ Epithel ²⁴ Stroma- zellen ^{4,6,24}	späte Proliferations- bis mittlere Sekretionsphase ^{2,3} Stroma: -TGF- $\beta_1,2$: Sekretionsphase ^{6,15} -TGF- β_3 : Proliferationsphase ¹	Regulation der epithelialen Differenzierung ^{15,24} Inhibition der endometrialen Proliferation ²⁴ Stimulation von Proteaseinhibitoren und Bildung von ECM-Komponenten ¹⁹ TGF- $\beta_1/2$: <i>in vitro</i> stromale Induktion von Apoptosen ¹⁷ TGF- β_1 : Autoinduktion, Suppression von TGF- β_3 , Stimulation von PDGF ¹
PDGF	Plättchen Makrophagen ¹⁸ Stromazellen ³	keine zyklusab- hängigen Variabili- täten ³	Steuerung der epithelialen Proliferation ¹⁸ , stromale Proliferation in Anwesenheit von P ³ synergistische Wirkung mit EGF ³
IGF I	vorwiegend ²⁴ Epithel ²¹ Stroma- zellen ^{21,26}	vorwiegend späte Proliferations- phase ^{21,24,26}	vermittelt Effekte von E auf Epithelien ⁵ und induziert epitheliale Proliferation ²⁰ Stimulation der Stromazellproliferation zusammen mit EGF und P ¹⁴ Synergistisch mit EGF und PDGF ²⁴
IGF II	Epithel ²¹ Stroma- zellen ^{21,26}	Sekretionsphase ^{21,26}	Differenzierung des Endometriums in der Sekretionsphase bzw. in der Postimplantationsperiode ⁵ Mitogen für Stromazellen bei der Dezidualisierung ¹³

Legende zu Tab. 2.2.: E = Östrogen, P = Progesteron, EGF = Epidermal Growth Factor, TGF = Transforming Growth Factor, PDGF = Platelet Derived Growth Factor, IGF = Insulin-like Growth Factor

- | | | |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1. ARICI et al. (1996) | 10. HOROWITZ et al. 1993 | 19. NOBLE et al. (1992) |
| 2. CASSLEN et al. (1998) | 11. IMAI et al. (1995) | 20. PIERRO et al. (2001) |
| 3. CHEGINI et al. (1992) | 12. IRWIN et al. (1991) | 21. SBRACIA et al. (1997) |
| 4. CHEGINI et al. (1994) | 13. IRWIN et al. (1993) | 22. SLOWEY et al. (1994) |
| 5. GIUDICE et al. (1993) | 14. IRWIN et al. (1994) | 23. TAKETANI et al. (1989) |
| 6. GOLD et al. (1994) | 15. MARSHBURN et al. (1994) | 24. TANG et al. (1994) |
| 7. HAINING et al. (1991) | 16. MELLOR u. THOMAS (1995) | 25. WATSON et al. (1994) |
| 8. HANSARD et al. (1997) | 17. MOULTON (1994) | 26. ZHOU et al. (1994) |
| 9. HOFMANN et al. (1991) | 18. MUNSON et al. (1995) | |

Nach RAILA et al. (1997) sowie AUPPERLE et al. (2000) ist der endometriale Funktionszustand der Proliferation durch eine intensive glanduläre Expression des Ki-67-Antigen sowie der ER und PR charakterisiert. Die Autoren unterscheiden somit zwei Phasen der endometrialen Proliferation: die stromale im Präöstrus und die epitheliale während des frühen Interöstrus. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch BRUNCKHORST et al. (1991) und GERSTENBERG et al. (1999).

2.2.3.2 Intermediärfilamente, Basallamina

Zyklusunabhängig exprimieren die endometrialen Epithelien physiologischerweise ausschließlich Zytokeratin, die Stromazellen hingegen ausschließlich Vimentin (AUPPERLE 1997, RAILA 2000, AUPPERLE et al. 2004).

Die anhand der Lamininexpression dargestellte Basallamina der Uterindrüsen erscheint im unveränderten, zyklisch aktiven Endometrium kräftig und kontinuierlich (RAILA 2000).

2.3 Plazentation der Stute

Die equine Plazenta ist eine Placenta epitheliochorialis (GROSSER 1909), bei der ein maternofetaler Stoffaustausch über eine Barriere, die u.a. zwei intakte epitheliale Strukturen enthält, erfolgt (STEVEN 1982). Die vom 36. bis zum 120. Tag der Gravidität nachweisbaren *endometrial cups* stellen eine Besonderheit der equinen Plazenta dar. Sie entstehen aus Trophoblastzellen, die in das endometriale Epithel eindringen, dieses phagozytieren und im endometrialen Stroma ausdifferenzieren. Aufgrund einer verstärkten Bildung von Embryotrophe während der Destruktion des maternalen Epithels, tragen diese Bereiche möglicherweise auch zur Ernährung des frühen Konzeptus bei (MICHEL 1995). Die fetale Plazenta entwickelt sich in der 7. Trächtigswoche mit Ausbildung der Mikrokotyledonen, die jedoch erst ab der 14. Woche das gesamte Allantochorion besetzen (SILVER et al. 1973, VANNIEKERK u. ALLEN 1975, MICHEL 1995). Die Mikrokarunkeln, Vertiefungen des maternalen Epithels, nehmen die Mikrokotyledonen auf, es bildet sich ein Mikroplazentom (GINTHER 1992). Zwischen den Mikrokotyledonen befinden sich Ausführungsgänge der Uterindrüsen, die in *arcade spaces* münden (GINTHER 1992). Die Trophoblastzellen dieser netzwerkartig über die Plazentaoberfläche verteilten *arcade spaces* sind wahrscheinlich zum Abbau endometrialer Sekrete befähigt (SAMUEL et al. 1977).

2.4 Sekretorische Aktivität des Uterus

2.4.1 Allgemeine Betrachtungen

Vor Implantation und Ausbildung der Plazenta erhält der Konzeptus die für seine Entwicklung essenziellen Nährstoffe von der im Uterus sezernierten „Uterinmilch“. Spezies mit einer langen Präimplantationsperiode, wie das Pferd produzieren und sezernieren dabei eine umfangreichere Histiotrophe als andere Tierarten. Die epitheliochoriale Plazentation der Stute bedingt zudem eine

kontinuierliche, bis zum Ende der Gravidität bestehende endometriale Sekretion, die der Versorgung des Fetus dient (STEWART et al. 2000b). Die Histiotrophe besteht aus einer Vielzahl nieder- bis hochmolekularer Komponenten, die teils Transsudate des Serums und teils endometrialen Ursprungs sind (BEIER 1974, BEIER 1978). Im folgenden werden repräsentativ ausgewählte, im Endometrium synthetisierte Proteine und Kohlenhydrate vorgestellt.

2.4.2 Endometriale Proteine

2.4.2.1 Uteroglobulin/Sekretoglobin

Das Uteroglobulin (UGL), ein evolutionsbiologisch konserviertes Protein der Vertebraten, wird u. a. von allen sekretorischen Epithelien, die mit der Aussenwelt in Kontakt stehen, synthetisiert (MUKHERJEE et al. 1999). Die Erstbeschreibung des UGL erfolgte durch BEIER (1966) als Bestandteil der uterinen Sekretion trächtiger Kaninchen. Zahlreiche Proteine dieser Familie wurden seither nach dem Gewebe ihrer Erstbeschreibung benannt, so dass eine Vielzahl von Namen existiert (u.a. Clara Cell Secretory Protein, Mouse Urinary Protein, Mammaglobin B). KLUG et al. (2000) schlagen daher die einheitliche Verwendung des Namens Sekretoglobin vor.

Beim Pferd handelt es sich um ein globuläres Homodimer (MORNON et al. 1980) mit einem Molekulargewicht von <6,5 kDa (BEIER-HELLWIG et al. 1995) und besteht aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundene Aminosäureketten (MORIZE et al. 1987) sowie einer zentral gelegenen hydrophoben Tasche (MORNON et al. 1980, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2002), die ausschließlich streng lipophile Liganden, wie Steroide, Phospholipide und Inositole binden kann (MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2002).

Das UGL ist ein multifunktionales Protein, u.a. eines der potentesten endogenen immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Moleküle, dessen Zugehörigkeit zu einer neuen Zytokinfamilie diskutiert wird (MUKHERJEE et al. 1999). Diese Eigenschaften bewirken einen Schutz der Integrität der Gewebe gegen eine übermäßige Aktivierung entzündlicher Prozesse, v.a. in Organen, die mit der Außenwelt kommunizieren (MUKHERJEE et al. 1988, MIELE et al. 1994). DIERYNCK et al. (1996) bezeichnen daher das UGL als einen natürlichen Immunsuppressor. Dabei sind verschiedene Wirkungsmechanismen des Proteins bekannt: eine der wichtigsten Eigenschaften (MUKHERJEE et al. 1999) ist die Hemmung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und Monozyten (SCHIFFMANN et al. 1983, VASANTHAKUMAR et al. 1988). Zudem inhibiert UGL die Thrombin-induzierte Plättchenaggregation (MANJUNATH et al. 1987), die Synthese und Funktion von Interferon- γ (IFN- γ) (DIERYNCK et al. 1995) sowie die durch Interleukin-2 stimulierte Freisetzung von Tumor-Necrosis-Factor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (DIERYNCK et al. 1996). Eine bei allen Spezies übereinstimmende Funktion des UGLs (MUKHERJEE et al. 1999) ist die Inhibition der proinflammatorischen Phospholipase A2 (PLA2), die zu einer Down-Regulation entzündlicher Reaktionen führt (LEVIN et al. 1986, SINGH u.

KATYAL 2000) und wahrscheinlich einige der beschriebenen Eigenschaften des UGLs bedingt (FACCHIANO et al. 1990). So ist die PLA2 u.a. in den Signal-Transduktions-Mechanismus von IFN- γ involviert (DIERYNCK et al. 1995), und sie ist als Schlüsselenzym an der Synthese der Arachidonsäure beteiligt, welche wiederum das Ausgangssubstrat für die immunmodulatorischen Eikosanoide (Prostaglandine, Leukotriene) darstellt (KIKUKAWA et al. 1988). Diese durch UGL vermittelte Abnahme der lokalen Prostaglandin-Konzentration könnte zudem einen Schutz des implantierenden Konzeptus vor einem durch übermäßige Kontraktilität ausgelösten Abort darstellen (LEVIN et al. 1986, KIKUKAWA et al. 1988).

Neben der möglichen Suppression entzündlicher Reaktionen im Uterus, hemmt UGL in Anwesenheit der Transglutaminase die immunologische Reaktion gegenüber alloenen Zellen, indem es deren Oberflächenantigene maskiert. Damit bewirkt es möglicherweise einen Toleranzeffekt gegenüber den Spermien bzw. dem Embryo (MUKHERJEE et al. 1982, MUKHERJEE et al. 1983, MANJUNATH et al. 1984).

Weiterhin weist UGL eine suppressive Wirkung bei Gewebsfibrosen auf. Es inhibiert einerseits indirekt die Migration von Fibroblasten durch seine Wirkung auf die PLA2 (LESUR et al. 1995), andererseits bindet es dosisabhängig an Fibronectin (FARROW et al. 2000) und verhindert somit dessen zur Fibrillogenese führende Selbstaggregation und Ablagerung in der extrazellulären Matrix (PATTABIRAMAN et al. 2000, ZHANG et al. 2000). So weisen ZHANG et al. (2000) mit Hilfe transgener Mäuse, welchen das UGL-Gen fehlt, eine hochgradige Glomerulopathie mit massiver Fibronectinablagerung und parenchymatöser Fibrose nach.

Eine weitere für UGL diskutierte Funktion ist die eines Tumorsuppressors (KUNDU et al. 2000, PERI et al. 2000). *In vitro* kann bei verschiedenen Karzinom-Zelllinien kein (KUNDU et al. 2000) bzw. nur sehr wenig (LINNOILA et al. 2000) UGL nachgewiesen werden. Eine UGL-Expression in tumorösen Zellen hemmt die Zellproliferation, die Invasion extrazellulärer Matrix sowie das unabhängige Wachstum (KUNDU et al. 2000, LINNOILA et al. 2000, PERI et al. 2000). Darüber hinaus weisen transgene (UGL-*knock-out*) Mäuse eine deutlich erhöhte Inzidenz maligner Neoplasien auf (MUKHERJEE et al. 1999).

2.4.2.2 Uteroferrin

Das 1972 erstmals von MURRAY et al. beschriebene Uteroferrin (UF) ist die am besten untersuchte Komponente in der Histiotrophe des Schweines (ROBERTS u. BAZER 1984). Es kann auch beim Pferd nachgewiesen werden, wobei es ausgeprägte physikalische, enzymatische und immunologische Übereinstimmungen mit dem porzinen Protein zeigt (ZAVY et al. 1979a, McDOWELL et al. 1982).

Das UF ist ein basisches Glykoprotein, das zu 4,8% aus Kohlenhydraten besteht (SAUNDERS et al. 1985), ein Molekulargewicht von 35 kDa besitzt und zwei gebundene Eisenatome trägt

(McDOWELL et al. 1982, ROBERTS and BAZER 1988). Durch Reduktion eines Eisenatoms entsteht die Form des UFs, welche saure Phosphatase-Aktivität besitzt (SCHLOSNAGLE et al. 1974). Weiterhin ist UF in der Lage, eine Lipidperoxidation zu induzieren (VALLET 1995), die durch andere, ebenfalls in das Uteruslumen sezernierte Proteine (Transferrin, Retinol-Binding-Protein), gehemmt werden kann (VALLET et al. 1996). Es kann zudem nichtkovalent mit sogenannten UF-assoziierten-Glykoproteinen ein Heterodimer bilden (MURRAY et al. 1989), dessen genaue Rolle noch nicht eindeutig geklärt ist. Eine Schutzfunktion gegenüber der peroxidativen Wirkung des UFs wird jedoch diskutiert (VALLET 1995, VALLET et al. 1996). Zusammen mit anderen Enzymen (z.B. humanes Typ-5-Isozym der Milz) wird UF einer stetig größer werdenden Klasse strukturell ähnlicher, Eisen enthaltender saurer Phosphatasen zugeordnet (KETCHAM et al. 1985).

Zweierlei Funktionen des Proteins sind bekannt. BAZER et al. (1991a) können *in vitro* eine speziesunabhängige Induktion der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen durch UF nachweisen, die nicht mit dem gebundenen Eisen zusammenhängt (MICHEL et al. 1992). LAURENZ et al. (1997) bestätigen *in vivo* indirekt diese Wirkung durch einen verminderten myelosuppressiven Effekt bei gleichzeitiger Gabe von UF und einem Chemotherapeutikum. Aufgrund der engen zeitlichen Korrelation zwischen dem Maximum der UF Sekretion und der fetalen Hämatopoese gehen die Autoren daher von einer primären Funktion als hämatopoetischer Wachstumsfaktor aus. Darüber hinaus wird das von UF gebundene Eisen in das fetale Hämoglobin eingebaut (BUHI et al. 1982), so dass das UF wahrscheinlich Teil eines primären Eisentransport-Mechanismus vom maternalen Endometrium zum Konzeptus ist (BAZER et al. 1975, DUCSAY et al. 1986, McDOWELL et al. 1987). Unklar sind hingegen Ursache und Funktion einer, bei Erkrankungen des hämatopoetischen Gewebes (Haarzelleukämie, Gaucher-Disease) verstärkt nachweisbaren, dem UF eng verwandten, sauren Phosphatase (KETCHAM et al. 1985).

2.4.2.3 Uterokalin

Das von ZAVY et al. (1982) und von HINRICHS und KENNEY (1989) als U1 und von CROSSETT et al. (1996) als P19 beschriebene Uterokalin (UKA) stellt ein besonderes Protein der uterinen Sekretion der Stute dar (BEIER-HELLWIG et al. 1995). Möglicherweise ist es ein evolutionsbiologisch altes Protein, das mit fortschreitender phylogenetischer Entwicklung der Plazentation seine Funktion bei anderen Tierarten verloren hat (SUIRE et al. 2001).

Das zur Familie der Lipokaline gehörende UKA (STEWART et al. 2000b) kann aufgrund strukturell variabler Eigenschaften Molekulargewichte zwischen 18 und 22 kDa annehmen (CROSSETT et al. 1996) und bindet ohne Selektivität (SUIRE et al. 2001) an Fettsäuren und zahlreiche kleine Lipide (STEWART et al. 2000b). Die ungewöhnliche und sehr exponierte Tryptophan-Seitenkette (STEWART et al. 2000b) ist wahrscheinlich für die Bindung und

Aufnahme des Proteins durch den Trophoblasten verantwortlich (SUIRE et al. 2001).

Während der frühen Trächtigkeit ist das Protein ein integraler Teil der, den equinen Embryo umgebenden, azellulären Glykoproteinkapsel, durch die alle maternal sezernierten Nährstoffe gelangen müssen (STEWART et al 1995). Es bindet zahlreiche, für die zelluläre Differenzierung und Organogenese des Embryos essenziellen Lipide, die ohne ein solches Transportprotein aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften degradiert würden. Es stellt damit dem Konzeptus diese Nährstoffe während der Präimplantationsperiode zur Verfügung. Möglicherweise stellt auch das Protein selbst und nicht nur seine Liganden eine Quelle der Proteinversorgung für den Konzeptus dar (SUIRE et al. 2001).

2.4.2.4 Calbindin_{D9k}

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Proteinen ist das Calbindin_{D9k} (CAL) kein sekretorisches Protein, sondern Bestandteil einer Familie intrazellulärer Kalzium-bindender Proteine (FULLMER u. WASSERMAN 1985).

Das CAL ist ein kleines, hitzestabiles, saures, aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 75 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa (FULLMER u. WASSERMAN 1981). Es enthält zwei Domänen, die mit hoher Affinität Kalzium (WASSERMAN et al. 1968), aber auch andere Kationen binden (FULLMER et al. 1985).

Eine wichtige Rolle kommt dem Protein im intrazellulären Kalzium-Transport zu (WASSERMAN u. FULLMER 1983), basierend auf dem Prinzip der erleichterten Diffusion (NIKITENKO et al. 1998). Im Endometrium ermöglicht es den Transfer des Kalziums von der basolateralen Seite zur Spitze der Zelle und damit den Transport vom Blut in das Drüsenlumen (WOODING et al. 1996). Gleichzeitig wird die, für die zelluläre Homoöstase notwendige, intrazelluläre Konzentration an freiem Kalzium durch die Bindung der Kalzium-Ionen an das CAL aufrechterhalten (WASSERMAN et al. 1992). Das Protein reguliert damit einerseits die intraluminale Kalzium-Konzentration während des Zyklus (TATSUMI et al. 1999), andererseits ermöglicht es den aktiven materno-fetalen Transport von Kalzium, v.a. in der späten Trächtigkeit, in der die Ossifikation des fetalen Skelettes zu einem erhöhten Bedarf an Kalzium führt (MATHIEU et al. 1989, NIKITENKO et al. 1998). Zusätzlich könnte das CAL an der Exozytose uteriner glandulärer Sekretionsprodukte beteiligt sein (INPANBUTR et al. 1994), da eine Stimulation sowohl der Ca-Mg-ATPase als auch der Kalzium-Pumpe durch das intestinale CAL nachweisbar ist (WALTERS 1989).

2.4.3 Endometriale Kohlenhydrate

2.4.3.1 Glykogen

Das Glykogen (GLY), das intrazelluläre Reserve-Kohlenhydrat tierischer Zellen (KARLSON 1988), ist ein hoch verzweigtes Polysaccharid, aufgebaut aus Ketten, die aus einzelnen

Glukosemolekülen bestehen, wobei an jedem 8. bis 12. Glukoserest eine Verzweigung angeknüpft ist. Die relative Molekülmasse ist daher außerordentlich variabel und schwankt erheblich (KARLSON 1988).

Die in der frühen Trächtigkeit zu beobachtende Abnahme der endometrialen GLY-Konzentration kann, aufgrund des hohen GLY-Verbrauchs des Konzeptus (WOLLENHAUPT et al. 1984), auf eine direkte Nährstoffversorgung zurückgeführt werden (JAFFE et al. 1985, WOLLENHAUPT et al. 1988). Eine Verwertung des GLYs im Stoffwechsel der essenziellen Proteoglykane und Glykoproteine wird ebenfalls vermutet (JAFFE et al. 1985).

2.4.3.2 Proteoglykane

Die auch als Mukopolysaccharide bzw. Glykosaminoglykane bezeichneten Proteoglykane (PG) bestehen aus einer Polypeptidkette, an die zahlreiche, aus Glukuronsäure sowie azetylierten und sulfatierten Aminozuckern bestehende Oligosaccharid-Seitenketten angeknüpft sind (KARLSON 1988). Sie dienen v.a. als Gerüstsubstanzen des Bindegewebes, treten jedoch bei zahlreichen Spezies (ENDO et al. 1976, STANEVA 1990, WALTER u. BAVDEK 1997, CAMPBELL et al. 2000) auch im uterinen Epithel auf, wobei bei der Stute vorwiegend karboxylierte und nur wenig sulfatierte Muzine beobachtet werden (FREEMAN et al. 1990, CAUSEY et al. 2000)

Die Funktion der PG ist nicht eindeutig geklärt, eine gesteigerte epitheliale Synthese unklarer Genese kann in entzündlich infiltrierten Endometrien (CAUSEY et al. 2000, FREEMAN et al. 1990) sowie in präkanzerösen Veränderungen und Adenokarzinomen des Endometriums beobachtet werden (LURIE et al. 1988). Die PG sind möglicherweise Bestandteil eines endometrialen mukoziliären Apparates und damit Teil eines protektiven Mechanismus, der bei der bakteriellen Clearance eine Rolle spielt (CAUSEY 1995, CAUSEY et al. 2000). Weitere mögliche Funktionen werden in der Aufrechterhaltung der Spermien-Vitalität und -Motilität (HAFEZ 1978) und in einer Beteiligung an den zur Zeit der Implantation auftretenden embryo-epithelialen Wechselwirkungen gesehen (CARSON et al. 1987, APLIN et al. 1996).

2.4.4 Nachweis der Proteine und Kohlenhydrate während des endometrialen Zyklus

Bei der Stute liegen lediglich für das UKA umfangreiche, den Zyklusverlauf betreffende Untersuchungen vor. Während nur wenige Studien sich mit dem Nachweis des UGLs, des GLYs und der PG beschäftigen, existieren für das equine UF nur auf Uterusspülproben basierende Untersuchungen. Daten über die zyklusabhängige Expression des CALs bei der Stute fehlen. In den Tabellen 2.3. (S. 15) und 2.4. (S. 16) erfolgt eine speziesübergreifende Darstellung.

2.4.5 Regulation der uterinen Sekretion

Sowohl die Viskosität als auch die biochemische Zusammensetzung (Elektrolytkonzentration, Proteoglykane, Glykogen, Peptide, Proteine) der Histiotrophe ändert sich in Abhängigkeit vom

Steroidhormoneinfluss (BEIER-HELLWIG et al. 1989) und dabei v.a. entsprechend dem Östrogen/Progesteron-Verhältnis (BEIER 1982). So können BEIER et al. (1970) beim Kaninchen ein um 2-5 Tage verzögertes, asynchrones, für die Blastozysten-Entwicklung ungünstiges uterines Sekretionsmuster durch eine postkoitale Injektion von Östradiol erzeugen. Das „rezeptive uterine Milieu“ hingegen stellt die optimal synchronisierte uterine Umwelt mit dem für die Embryogenese essentiellen Sekretionsmuster der Lutealphase dar (BEIER et al. 1972, BEIER-HELLWIG et al. 1989, 1994, 1995).

Es liegen umfangreiche Untersuchungen zur Regulation der UGL- und der UF-Genexpression vor, die speziesunabhängige Gemeinsamkeiten aufweisen. Beide Proteine werden daher gemeinsam dargestellt.

Uteroglobin, Uteroferrin:

In der Reaktion auf **Progesteron** weisen beide Proteine ausgeprägte Übereinstimmungen auf:

Tab. 2.3: Nachweis der endometrialen Proteine während des Zyklus verschiedener Spezies

Name	Lokalisation	Nachweiszeitraum
UGL	nicht zilierte Zellen des luminalen Epithels ¹ und glanduläre Epithelien ⁵ Golgi-Apparat, sekretorische Granula ⁵	frühe bis mittlere Lutealphase, Maximum in der späten Lutealphase ^{7,8} Stute: 1.-10. Tag p.ov., Max. ab dem 5. Tag p.ov. ⁹
UF	glanduläres Epithel ^{4,13} Golgi-Apparat, apikale sekretorische Vesikel ¹³	späte Lutealphase, Maximum zwischen dem 12.-14. Tag p.ov. ^{15,16} , rasche Abnahme ab dem 18. Tag p.ov. ¹⁴ rasseabhängige Variationen im Zyklus und während der Trächtigkeit des Schweines ²
UKA	zunächst basales glanduläres Epithel (2. Tag p.ov.), im weiteren Zyklusverlauf auch luminales Epithel (16. Tag p.ov.) ³	im Östrus kleine Mengen im Lumen der Drüsen ¹¹ , Anstieg in der frühen bis mittleren Lutealphase ³ , Max. 12. Tag p.ov. ¹⁰ , Abfall ab dem 18. Tag p.ov. ¹⁰ nicht nachweisbar bei saisonal anöstrischen und präpubertären Stuten ¹¹
CAL	luminale, vorwiegend jedoch tiefere glanduläre Epithelien ^{6,12} homogen im Zytoplasma und Nukleoplasma, nicht an Zellorganellen assoziiert ^{12,13}	Maximum in der Lutealphase ⁶ Untersuchungen bei der Stute fehlen

Legende zu Tab. 2.3.: UGL = Uteroglobin, UF = Uteroferrin, UKA = Uterokalin, CAL = Calbindin_{D9k}, p.ov =: post ovulationem; Max. = Maximum

1. AUMÜLLER et al. 1985

2. BAZER et al. 1991b

3. CROSSET et al. 1998

4. DUCSAY et al. 1982

5. HEGELE-HARTUNG u. BEIER 1986

6. INPANBUTR et al. 1994

7. MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 1999

8. MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2000

9. MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2003

10. STEWART et al. 1995

11. STEWART et al. 2000a

12. WOODING et al. 1996

13. WOODING et al. 2000

14. ZAVY et al. 1979a

15. ZAVY et al. 1979b

16. ZAVY et al. 1982

Im endometrialen Epithel ist sowohl *in vitro* (MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2000) als auch *in vivo* (McDOWELL et al. 1987, BEIER-HELLWIG et al. 1995, KRUSCHE et al. 2000) eine progesteronabhängige Stimulation der Synthese beider Proteine nachweisbar. Die Transkription

basiert dabei beim UGL-Gen auf mehreren HRE, bestehend aus zwei starken und zwei schwachen PR-Bindungsstellen (JANTZEN et al. 1987). Während die Sekretion des UGL lediglich bis zu einer bestimmten Konzentration des Progesterons dosisabhängig ist und darüber hinausgehende Applikationen keinen Effekt zeigen (BEIER 2000), kommt es mit steigender Dosierung (McDOWELL et al. 1987) und zunehmender Dauer (HINRICHS u. KENNEY 1989) der Progesteroneinwirkung zu einem Anstieg der UF-Konzentration. Beide Proteine weisen eine Verzögerung von mehreren Tagen in der durch Progesteron bedingten Induktion des Proteins auf (KNIGHT et al. 1973, SCHLOSNAGLE et al. 1974, SHEN et al. 1983, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2000).

Tab. 2.4: Nachweis der endometrialen Kohlenhydrate während des Zyklus verschiedener Spezies

Name	Lokalisation	Nachweiszeitraum
GLY	in zilierten und nicht zilierten Zellen ^{2,4} des luminalen ⁷ und glandulären ^{2,8} Epithels eng assoziiert an Polysomen und an das endoplasmatische Retikulum ⁸ zunächst basal, mit zunehmender Synthese auch apikal im Zytoplasma ¹	zunehmende intrazelluläre Ablagerung im Übergang von der späten Proliferations- zur frühen Sekretionsphase ⁸ , Maximum in der Lutealphase ^{6,7} , ab dem letzten Drittel der Lutealphase im Drüsenlumen nur geringe Konzentration während des Winteranöstrus und der Übergangszyklen der Stute ⁵
PG	nicht zilierte Zellen des luminalen Epithels und der Ausführungsgänge ³ supranukleär, zeitweise auch apikal ⁵	intrazelluläre Akkumulation im Östrus, luminale Akkumulation im Interöstrus ^{3,5} nicht bei saisonal anöstrischen Stuten, nur geringe Mengen in den Übergangszyklen ⁵

Legende zu Tab. 2.4: GLY = Glykogen, PG = Proteoglykane, p.ov = post ovulationem

1. ARMSTRONG et al. 1973

2. BUSCH u. WÜRSCHMIDT 1986

3. CAUSEY et al. 2000

4. DEMIR et al. 2002

5. FREEMAN et al. 1990

6. MILDWITZKY et al. 1980

7. SCHNURRBUSCH u. ERICES 1979

8. SPORNITZ 1992

Östrogene zeigen ebenfalls einen Effekt auf die Proteinsynthese; wobei jedoch bzgl. der posttranskriptionellen Ereignisse zwischen beiden Proteinen Unterschiede bestehen:

Während UGL unter alleinigem Östrogeneinfluss zwar intrazellulär nachweisbar ist, jedoch nicht freigesetzt wird (BEIER 2000), beeinflusst das Östradiol auch die posttranskriptionellen Prozesse des UF (SIMMEN et al. 1988) und erklärt so die von McDOWELL et al. (1987) beobachtete synergistische Wirkung beider Steroidhormone auf die UF-Konzentration im Uterussekret.

Da bei der UGL-Genexpression die Effekte des Progesterons durch geringe Mengen Östradiol potenziert werden (SHEN et al. 1983), bedingt eine sequenzielle Applikation von Östradiol und Progesteron eine Steigerung der UGL-Gen-Transkription (MÜLLER u. BEATO 1980). Der genaue Mechanismus der Östrogenwirkung ist dabei noch nicht geklärt, bekannt ist jedoch, dass erst durch den Kontakt der Zelle mit Östrogen und Progesteron die Bereiche des UGL-Promoters, die die HREs für ER und PR besitzen, aufgelockert und für die Rezeptoren zugänglich werden (JANTZEN

et al. 1987). Darüber hinaus beeinflusst das Östrogen möglicherweise auch die an das UGL-Gen bindenden Transkriptionsfaktoren (KLEIS-SANFRANCISCO et al. 1993). Hohe Dosen an Östradiol hingegen zeigen einen antiprogestagenen Effekt bei der Synthese von UGL und UF (SHEN et al. 1983, SIMMEN et al. 1988).

Zusätzlich bestehen dynamische Interaktionen von **Prolaktin** mit Progesteron bzw. Östrogen:

So verstärkt Prolaktin die durch Progesteron induzierte Genexpression des UGLs (CHILTON u. DANIEL 1987, RANDALL et al. 1991) und führt zu einem deutlichen Anstieg der Synthese und der Sekretion des Proteins (DANIEL u. JUNEJA 1989, KLEIS-SANFRANCISCO et al. 1993). Der molekulare Wirkungsmechanismus ist in Teilen geklärt: der Prolaktin-Rezeptor wird durch Progesteron aufreguliert (CHILTON et al. 1988), Prolaktin wiederum verstärkt die DNA-Bindung von vier progesteronabhängigen nukleären Proteinen, den sog. RUSH-Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren auf die Promoter-Region des Gens einwirken (KLEIS-SANFRANCISCO et al. 1993, HEWESTON u. CHILTON 1997).

Eine Verstärkung der UF-Promoter Aktivität kann *in vitro* bei mit Östradiol und Prolaktin vorbehandelten Zellen, nicht jedoch bei unbehandelten bzw. lediglich mit einem Hormon behandelten Zellen beobachtet werden (FLISS et al. 1991). Auch hier vermuten die Autoren eine physiologische Relevanz bei der Interaktion der Hormone, da Östrogen und Prolaktin eine epitheliale Akkumulation an funktionalen PR induzieren, welche, durch Progesteron besetzt, eine Kaskade auslösen, die zur Biosynthese der UF-mRNA führt (VALLET et al. 1998).

Die bei beiden Proteinen zu beobachtende Zeitverzögerung in der durch Progesteron bedingten Induktion der mRNA kann durch zwei zeitraubende Mechanismen erklärt werden: einerseits durch die Differenzierung des glandulären Epithels (KNIGHT et al. 1973, SIMMEN et al. 1988, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2000), welche unter dem kontinuierlichen Einfluss des Progesterons aufrechterhalten wird (KRUSCHE 1998), andererseits durch die Zunahme der Prolaktin-Rezeptoren, die zu einer Sensitivitätssteigerung gegenüber Progesteron führt (FLISS et al. 1991).

Uterokalin:

Eine Progesteronabhängigkeit des UKAs ist wahrscheinlich, da dessen Synthese nicht nur eine enge Korrelation zu den zyklischen Progesteron-Konzentrationen im Blutplasma aufweist, sondern auch durch exogenes Progesteron stimuliert werden kann (STEWART et al. 1995, CROSSETT et al. 1996, 1998). Im Gegensatz zum UGL und UF deutet die früh im Zyklus ansteigende UKA-Expression auf eine schnelle Reaktion des epithelialen Syntheseapparates auf die ansteigenden Serumprogesteron-Konzentrationen hin (CROSSETT et al. 1998). Weitere, bisher unbekannte Regulationsmechanismen sind vermutlich für den, trotz bestehender hoher Serumprogesteron-Konzentrationen, deutlich verringerten Nachweis des Proteins während der Gravidität

verantwortlich (STEWART et al. 1995, CROSSETT et al. 1996).

Calbindin_{D9k}:

Die Regulation der endometrialen CAL-Synthese weist deutliche Speziesunterschiede auf. So unterliegt diese im bovinen (INPANBUTR et al. 1994) und murinen (TATSUMI et al. 1999) Uterus dem Einfluss des Progesterons, während Östrogene allein keinen signifikanten Effekt zeigen. Im Gegensatz dazu weist das Östradiol bei der Ratte eine stimulatorische (DELORME et al. 1983) und das Progesteron eine inhibitorische Wirkung auf (L`HORSET et al. 1993). Ebenfalls inhibitorisch wirkt das Progesteron bei der Sau (KRISINGER et al. 1995). Untersuchungen bei der Stute liegen nicht vor.

Glykogen:

Ein Anstieg der intrazellulären GLY-Konzentration kann sowohl *in vitro* (KOHORN u. TCHAO 1969, SHAPIRO et al. 1980) als auch *in vivo* (JAFFE et al. 1985, SECCHI et al., 1987 WOLLENHAUPT et al. 1988) nach einer Stimulation durch Progesteron beobachtet werden. Der genaue Wirkungsmechanismus des Progesterons ist dabei noch unklar. Der wichtigste Faktor der Glukoneogenese ist die GLY-Synthetase (KARLSON 1988), deren Aktivität eine dem GLY entsprechende Zyklus-Variabilität aufweist (MILWIDSKY et al. 1980) sowie durch Progesteron bei ovariektomierten Tieren stimuliert werden kann (JAFFE et al. 1985). Eine direkte Stimulation der Gentranskription durch Progesteron (HARRIS et al. 1994) bzw. ein Progesteron-Responsive-Element (SU et al. 1996) konnte bisher nicht nachgewiesen werden, so dass eine Veränderung des Katabolismus verschiedener, die Enzymaktivität beeinflussender Phosphatasen und Kinasen diskutiert wird (SU et al. 1996).

2.5 Die Endometriumbiopsie

Eine Indikation für die Entnahme einer Endometriumbiopsie, einem diagnostischem Routineverfahren in der Pferdegynäkologie, besteht bei jeder subfertilen, nichttragenden Stute. Eingebunden in eine umfassende, klinisch-gynäkologische Untersuchung, erlaubt deren Untersuchung die Diagnose von endometrial bedingten Fertilitätsstörungen, da sowohl der Funktionszustand des Endometriums als auch Qualität und Quantität entzündlicher und degenerativer Veränderungen erfassbar sind (SCHOON et al. 1994b, 1997).

Obwohl die Endometriumbiopsie nur ca. 0,1% der Gesamtoberfläche reflektiert (KENNEY 1975), gilt sie als repräsentativ, wenn sie aus einem klinisch unauffälligen Uterus entnommen wird bzw. wenn vorhandene pathologische Veränderungen diffus verteilt sind (BERGMANN u. KENNEY 1975, WAELCHLI u. WINDER 1987). Klinisch erfassbare, fokale Alterationen sollten jedoch durch eine zusätzliche, gezielte Probenentnahme berücksichtigt werden (SCHOON et al. 1994a).

Höchste Repräsentanz weisen Proben aus dem dorsalen Abschnitt des Überganges zwischen Körper und Horn auf, zervixnahe Proben hingegen sind als nicht repräsentativ anzusehen (BLANCHARD et al. 1987, RUNGE 1995).

Tab. 2.5: Kategorisierungsschema von KENNEY und DOIG (1986), modifiziert von SCHOON et al. (1992)

Kategorie I/Abfohlrate 80-90 %	Kategorie IIa/Abfohlrate 10-50%
keine Veränderungen vereinzelt ggr. Fibrosierungs- und Entzündungs-herde	ggr.-mgr. diffuse Entzündungszellinfiltrate im Stratum compactum, zahlreiche disseminierte Herde in Stratum compactum/spongiosum ggr.-mgr. disseminierte periglanduläre Fibrose und fibrotische Nester (1-3 Lagen; > 2 Herde/5mm) ggr. Lymphlakunen partielle Atrophie in der physiologischen Decksaison
Kategorie IIb/Abfohlrate 50-80 %	Kategorie III/Abfohlrate < 10 %
Kategorie IIa-Stuten, mehr als zwei Jahren güst Kombination zweier Kategorie IIa-Befunde mgr. diffuse/hgr. fokale Entzündungszellinfiltrate mgr. gleichmäßig verteilte periglanduläre Fibrose und fibrotische Nester (5-10 Schichten; 2-4 Herde/5mm) mgr. Lymphlakunen	Kombination zweier Kategorie IIb-Befunde hgr. diffuse Entzündungszellinfiltrate hgr. gleichmäßig verteilte periglanduläre Fibrose und fibrotische Nester (>10 Schichten; >4 Herde/5mm) Atrophie in der physiologischen Decksaison

Legende zu Tab. 2.5: ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, hgr. = hochgradig

Anhand der histopathologischen Befunde und der Günstzeit ist eine Kategorisierung nach dem Schema von KENNEY und DOIG (1986), modifiziert von SCHOON et al. (1992), möglich, wobei die Kategorien einer voraussichtlich zu erwartenden Abfohlrate (s. Tab. 2.5) entsprechen. Diese Art der Schematisierung ist nach SCHOON und SCHOON (2003) jedoch nicht mehr zeitgemäß. Bei der Beurteilung von Endometriumbiopsien sollten Befunde, die bisher unberücksichtigt bleiben (endometriale Fehldifferenzierungen, Qualität der Endometrose, schwere Angiosklerosen, Reversibilität bzw. Irreversibilität pathologischer Veränderungen) sowie das Alter der Stute, das nach HEILKENBRINKER et al. (1997) einen signifikanten Effekt auf die zu erwartende Abfohlrate ausübt, in Betracht gezogen werden, um die prognostische Aussagekraft bzgl. der Abfohlrate zu korrigieren und zu konkretisieren (SCHOON et al. 1997, SCHOON u. SCHOON 2003). Diese Einschätzung deckt sich mit den Ergebnissen von HEILKENBRINKER et al. (1997), nach denen Stuten der Kategorie I mit einer Abfohlrate von 63% deutlich und Stuten der Kategorie IIa mit einer Abfohlrate von 45,8% etwas hinter den nach KENNEY und DOIG (1986) zu erwartenden Abfohlraten bleiben. SCHOON und SCHOON (2003) halten daher die individuelle Beurteilung jeder einzelnen Stute einschließlich einer vollständigen Epikrise, die den aktuellen Status, das Alter des Tieres und die Reversibilität der Befunde berücksichtigt, für notwendig.

2.6 Pathologie des Endometriums

2.6.1 Glanduläre Fehldifferenzierungen

Während der physiologischen Zuchtsaison der Stute kann bereits mittels einer H.-E. Färbung neben der sicheren Datierung des Zykluszeitpunktes eine endometriale Fehldifferenzierung diagnostiziert werden. Eine zusätzliche immunhistologische Analyse der Steroidhormonrezeptoren präzisiert dabei die Diagnose (SCHOON u. SCHOON 2003).

Die irreguläre endometriale Differenzierung bezeichnet ein nicht zyklusphasensynchrones morphologisch-funktionelles Erscheinungsbild, mit inaktiven oder hyperaktiven Drüsen, die eine dominierende Sekretions- bzw. Proliferationsmorphologie aufweisen. Es kann jedoch auch eine „Irregularität“ von Drüsen und Stroma, die keiner Zyklusphase zuzuordnen ist, beobachtet werden (SCHOON et al. 1997). Nach HÄFNER et al. (2001) besteht eine Polymorphie aller bzw. der Mehrheit der Drüsenanschnitte einer Biopsie, wobei innerhalb eines Drüsenquerschnittes sekretorische, proliferative, hypertrophische, hyperplastische oder auch atrophische Differenzierungsmerkmale vereint sein können. Ätiologisch werden v.a. endokrine Imbalancen vermutet (SCHOON et al. 1999, 2000), HÄFNER et al. (2001) gehen aufgrund der hohen ER- und Ki-67 Antigenexpression in den irregulären Epithelien von einer übermäßigen Östrogenwirkung mit anschließender verminderter Down-Regulation durch Progesteron aus. ELLENBERGER (2003) kann nachweisen, dass endokrin aktive ovarielle Dysfunktionen eine potenzielle Ursache reversibler endometrialer Funktionsstörungen sind.

Verschiedene Funktionszustände innerhalb einer Biopsie treten bei der „ungleichmäßigen endometrialen Differenzierung“ auf. Areale, die hinsichtlich ihrer funktionellen Morphologie dem jeweiligen Zyklusstand entsprechen, kommen neben nicht-fibrotischen Herden mit abweichender Differenzierung vor (SCHOON et al. 1999, 2000). Diese Veränderungen sind wahrscheinlich Ausdruck eines partiell hormonrefraktären Endometriums, bedingt durch herdförmige endometriale Alterationen (SCHOON et al. 1999, HÄFNER et al. 2001).

Bei der „Atrophie während der physiologischen Decksaison“ zeigt das Endometrium ein dem Winteranöstrus entsprechendes Erscheinungsbild (RICKETTS 1975, BRUNCKHORST et al. 1991). Ovardysfunktionen, ein hormonrefraktäres Endometrium und ein gynäkologisches Senium werden als Ursache diskutiert (RICKETTS u. BARRELET 1997, SCHOON et al. 1997). Die „glanduläre Hypoplasie“ hingegen tritt bei juvenilen Stuten mit kongenitaler Inaktivität der Geschlechtsorgane auf (RICKETTS 1975, KENNEY 1978). Eine verzögerte endometriale Involution nach Fruchtresorption, Abort bzw. Geburt ist wahrscheinlich für das Auftreten der „glandulären Hyperplasie“ verantwortlich (RICKETTS 1975, RICKETTS u. BARRELET 1997).

2.6.2 Endometritis

Als Endometritis werden alle entzündlichen Prozesse bezeichnet, die hinsichtlich Qualität und Quantität über die physiologische zyklische endometriale Selbstreinigung des Endometriums hinausgehen (SCHOON et al. 1994a, 1997). Ätiologisch kommen infektiöse und allergische Faktoren sowie chemische, physikalische und thermische Noxen in Betracht (HUGHES 1975, FREEMAN et al. 1986, PUGH et al. 1986).

Während bei der akuten Endometritis vor allem im luminalen Epithel und dem Stratum compactum überwiegend neutrophile Granulozyten auftreten, ist für die chronische Endometritis eine Dominanz von Lymphozyten und Plasmazellen neben Makrophagen und Mastzellen charakteristisch. Die mononukleären Zellen treten dabei diffus oder follikulär aggregiert im Stratum compactum und spongiosum auf (RICKETTS 1975, KENNEY 1978, KENNEY u. DOIG 1986, Van CAMP 1988, SCHOON et al. 1992). Eine eigene Entität unbekannter Genese stellt die Endometritis eosinophila dar (SCHOON et al. 1997, BLÜTHGEN 2002).

Post inseminationem bzw. nach dem Deckakt treten regelmäßig transiente, geringgradige eitrige Endometritiden auf (BÜCHI et al. 1991, SCHOON et al. 1997). Während bei den „*resistant-mares*“ (Endometritis-resistente Stuten) diese Entzündung nach zwei bis drei Tagen nicht mehr nachzuweisen ist, zeigen die „*susceptible-mares*“ (Endometritis-empfindliche Stuten) eine gestörte endometriale Clearance und die Endometritis besteht länger (PYCOCK et al. 1997), so dass aufgrund persistierender embryotoxischer Substanzen eine Trächtigkeit ausbleibt (BALL 1988, ASHBURY u. LYLE 1993).

2.6.3 Entzündliche und degenerative Gefäßveränderungen

Im Endometrium der Stute stellen nichteitrig Perivaskulitiden, besonders kleiner Venulen, die häufigste entzündliche Gefäßalteration dar (KRIESTEN 1995, GRÜNINGER 1996). Sie sind insbesondere während der Zuchtsaison zu beobachten, jedoch unabhängig von Alter und Reproduktionsstatus der Stute und ohne eindeutigen Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Auftreten von Endometritiden (SCHOON et al. 1997). Liegen sie multifokal vor, besitzen sie einen negativen Einfluss auf die Fertilität (KRIESTEN 1995).

Degenerative Gefäßveränderungen (Angiosen) sind alters- und trächtigkeitsbedingte Erkrankungen (GRÜNINGER 1996), wobei die Häufigkeit mittel- bis hochgradiger Angiosen positiv mit der Anzahl der Abfohlungen und dem Grad der Endometrose korreliert ist (KRIESTEN 1995, GRÜNINGER 1996, WREDE 1999). Unveränderte Gefäße treten nur bei jungen Maidenstuten auf, ältere weisen überwiegend geringgradige Peri- und Intimasklerosen auf (GRÜNINGER et al. 1998). Multipare Stute hingegen zeigen Fibrosen, Elastosen und Fibroelastosen mit teils destruierendem Charakter (GRÜNINGER 1996, LUDWIG 2003). Ätiologisch kommen hämodynamisch und hormonell bedingte Umbauvorgänge während der Trächtigkeit und des Puerperiums in Betracht,

wobei kurze Trächtigkeitpausen, chronische Entzündungen und altersbedingte Reparaturmüdigkeit den Prozess begünstigen (GRÜNINGER 1996). Angiosen zeigen einen indirekt fertilitätsmindernden Effekt, da sie eine reduzierte Perfusion und Drainage des Endometriums bedingen und möglicherweise an der Pathogenese der Endometrose beteiligt sind (GRÜNINGER et al. 1998, SCHOON u. SCHOON 2003).

2.6.4 Lymphlakunen

Lymphlakunen sind entweder sehr ausgedehnte, auch im Stratum compactum nachweisbare endothel ausgekleidete Lymphangiektasien oder große, mit Lymphe gefüllte Gewebsspalten (SCHOON et al. 1993). Sie stellen eine Folgeerscheinung obliterierender/obstruierender Angiosklerosen mit Beeinträchtigung der Lymphdrainage dar und sind als Ausdruck systemischer uteriner Perfusionsstörungen zu werten (SCHOON et al. 1993, 1997, GRÜNINGER 1996). Ab einer kritischen Größe zeigen sie auch einen direkten fertilitätsmindernden Effekt, indem sie ein mögliches Hindernis für die Mobilität des Konzeptus darstellen (LEIDL et al. 1987) und eine Störung der mechanischen Clearance bedingen (SCHOON et al. 1993, 1997).

2.6.5 Die equine Endometrose

2.6.5.1 Allgemeine Betrachtungen

Der Begriff „Endometrose“ wurde von KENNEY (1992) als Sammelbezeichnung degenerativer Veränderungen des equinen Endometriums eingeführt und löste die bis dahin verwendete Bezeichnung „chronisch degenerative Endometritis“ (RICKETTS 1975) ab. Dies berücksichtigt, dass nur bei einem kleinen Teil der untersuchten Stuten neben fibrotischen gleichzeitig auch entzündliche Prozesse vorhanden sind (SCHOON et al. 1995). KENNEY (1992) subsummiert unter dem Begriff Endometrose insgesamt 14 qualitativ und quantitativ variable pathologische Alterationen. Neben der Fibrose zählt er „Lymph-Flüssigkeitsansammlungen“, Aussackungen des Uterus, transluminale Adhäsionen, Tunnel- und Divertikelbildungen sowie Effekte einer Urovagina dazu. Nach SCHOON et al. (1995) handelt es sich dabei aber, außer bei den fibrotischen Prozessen, um Symptome differierender Grunderkrankungen bzw. um eindeutig zu bezeichnende, eigenständige Krankheitsbilder. Daher definieren SCHOON et al. (1995, 1997) die Endometrose einschränkend als eine periglanduläre und/oder stromale endometriale Fibrose einschließlich der glandulären Alterationen innerhalb der fibrotischen Areale.

Die durch klinische Untersuchungen nicht feststellbare Endometrose stellt eine der Hauptursachen equiner Fertilitätsstörungen dar (ROSSDALE u. RICKETTS 1980, KENNEY u. DOIG 1986) und ist bei 95% der seit zwei oder mehr Jahren güst gebliebenen Stuten nachweisbar (SCHOON et al. 1997). Die Diagnose gelingt nur mit Hilfe einer Endometriumbiopsie (SCHOON et al. 1992, 1994a). Der Grad der Endometrose nimmt alterassoziert zu, es besteht jedoch keine Abhängigkeit

von der Anzahl der Abföhlungen (DOIG et al. 1981, RICKETTS u. ALONSO 1991, SCHOON et al. 1994a, 1995, 1997). Nach SCHOON et al. (1995) tritt bei der Mehrzahl der untersuchten Stuten die Endometrose allein, ohne weitere histopathologisch erfassbare Befunde auf, ist jedoch in einem Drittel der Fälle mit einer chronischen lymphoplasmazellulären Entzündung vergesellschaftet. FLORES et al. (1995) hingegen beobachten, abhängig vom Grad der Endometrose, eine Zunahme der gleichzeitig auftretenden Endometritiden. Inwieweit Endometritiden jedoch an der Ätiopathogenese der Endometrose beteiligt sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Seltener ist die Endometrose mit Lymphlakunen oder mit einem inaktiven, atrophischen Endometrium assoziiert (SCHOON et al. 1995). Therapieversuche mittels chemischer oder mechanischer Kürettage blieben erfolglos, die Erkrankung gilt als irreversibel (Van CAMP 1988, LEY 1994, SCHOON et al. 1995, 1997). Ätiologie und Pathogenese sind unklar.

Diese degenerative Erkrankung des equinen Endometriums darf nicht mit dem Begriff der „Endometriose“ verwechselt werden. Dabei handelt es sich um das heterotope Auftreten von endometrialen Gewebe, welches dem ortsständigen Endometrium morphologisch und funktionell ähnlich ist (LEIDENBERGER 1992).

2.6.5.2 Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Endometrose

Einteilung der Endometrose:

Die periglanduläre Fibrose kann Einzeldrüsen betreffen oder sogenannte Drüsennester bilden (KENNEY 1978, SCHOON et al. 1995), in fortgeschrittenen Stadien der Endometrose können subepitheliale Fibrosen (FLORES et al. 1995) sowie Stromafibrosen auftreten (SCHOON et al. 1995). Anhand der Zahl periglandulärer Bindegewebsschichten und der Zahl fibrotischer Herde pro definierter Fläche im Endometrium kann nach KENNEY (1978) eine Quantifizierung des Fibrosegrades erfolgen (s. Tab. 2.6.).

Tab. 2.6: Ermittlung des Endometrosegrades nach KENNEY (1978)

Fibrosegrad	Anzahl Binde- gewebsschichten	Anzahl fibrotischer Herde*
geringgradig	1-3	≤ 2
mittelgradig	4-10	2-4
hochgradig	> 10	≥ 4

* bezogen auf ein lineares Feld von 5,5 mm bei vier untersuchten Gesichtsfeldern

FLORES et al. (1995) teilen die Endometrose anhand des Schweregrades der Fibrose und der damit assoziierten Veränderungen in eine initiale, intermediäre und finale Phase ein. EVANS et al. (1998) hingegen schlagen die Bestimmung des relativen Kollagengehaltes zur Objektivierung des Endometrosegrades vor.

Stromazellen:

Während unveränderte endometriale Stromazellen im Verlauf des Zyklus eine typische Differenzierungsdynamik aufweisen (s. Tab. 2.1, S. 3), treten innerhalb der fibrotischen Herde unterschiedlich fehdifferenzierte Stromazellen auf (s. Abb. 2.2, S. 25). Nach RAILA (2000) sind in frühen Endometrosestadien sogenannte Stromazellen vom Typ I (große, polymorphe Zellen mit hypochromatischen Zellkernen) nachweisbar, die durch ein vermehrtes Zytoplasma und die Ausbildung eines Syntheseapparates mit Bildung kollagener Fasern, auffallen. Die Autorin vermutet, dass sich während der „beginnenden Fibrose“ diese Stromazellen aufgrund chemotaktisch wirksamer Mediatoren periglandulär anlagern und Alterationen der Basallamina bedingen. Daraus resultierende epithelial/mesenchymale Wechselwirkungen könnten weitere stromale Fehdifferenzierungen begünstigen. So treten in fortgeschrittenen Fibrosen sogenannte Stromazellen vom Typ II auf, die durch einen länglichen Zelleib mit schmalen zytoplasmatischen Ausläufern und einem zentral liegenden, länglich-ovalen Zellkern charakterisiert sind. Sie können in eine aktive bzw. eine inaktive Form unterteilt werden, deren ultrastrukturelle Morphologie der von Fibroblasten bzw. Fibrozyten entspricht. Übergangsformen sind ebenfalls nachweisbar (RAILA 2000). Sowohl das Verhältnis der Stromazellen vom Typ I zum Typ II als auch der Funktionszustand der Stromazellen vom Typ II sind abhängig vom Grad der Endometrose. Eine geringgradige Fibrose besteht demnach aus Stromazellen vom Typ I sowie aus aktiven Stromazellen vom Typ II, mittel- bis hochgradige Fibrosen werden dagegen ausschließlich vom Typ II gebildet (RAILA 2000). Mehrere Autoren können zudem eine Umdifferenzierung der Stromazellen zu Myofibroblasten (s. dazu auch Kap. 2.7.1, S. 29) nachweisen (EVANS et al. 1998, EVANS et al. 2000, RAILA 2000, WALTER 2001a). RAILA (2000) beobachtet diese Zellen mit einem variablen Expressionsmuster von Vimentin, Desmin und Glattmuskulatur- α -Aktin (α -GMA) nur bei fortgeschrittenen Fibrosen. So weisen geringgradige Endometrosen Vimentin und α -GMA exprimierende Zellen (VA-Typ) auf, wohingegen mittel- bis hochgradige Fibrosen aus Vimentin, Aktin und Desmin (VAD-Typ) sowie aus Vimentin und Desmin (VD-Typ) exprimierenden Zellen gebildet werden. Der Nachweis der Myofibroblasten ist für die Pathogenese der Endometrose in zweierlei Hinsicht bedeutungsvoll. Zum einen stellen die kontraktile Zellen möglicherweise einen Kompensationsversuch dar, um den gestörten Sekrettransport fibrotischer Uterindrüsen zu unterstützen, führen dadurch jedoch, über ein „Abschnüren“ betroffener Drüsen, zur Entstehung glandulärer Dilatationen (RAILA 2000). Zum anderen sind sie in der Lage, Mediatoren zu sezernieren, die die Zusammensetzung und die Akkumulation der ECM beeinflussen (EVANS et al. 2000, RAILA 2000, WALTER et al. 2001a). So können EVANS et al. (2000) beispielsweise eine erhöhte Konzentration des Angiotensin-converting Enzyms in fortgeschrittenen Fibrosen nachweisen.

Extrazelluläre Matrix:

Insgesamt existieren nur wenige Untersuchungen bezüglich der Zusammensetzung der ECM im

Rahmen der Endometrose. Eine von Endometrosegrad, vom Aktivitätszustand der Fibrose und vom Vorliegen von Einzeldrüsen und Drüsennestern abhängige Zusammensetzung der ECM aus Kollagenfasern des Typ I und III beobachtet RAILA (2000) mittels polarisationsmikroskopischer Untersuchungen. Danach bestehen geringgradige, aktive, Einzeldrüsen betreffende Fibrosen ausschließlich aus vereinzelt Fasern von Kollagen-III, während die geringgradigen, inaktiven Formen Kollagenfasern vom Typ I aufweisen, die plaqueartig an verschiedenen Lokalisationen abgelagert sind, ohne eine vollständige periglanduläre Lage zu bilden. Drüsennester hingegen zeigen in ihrer Peripherie, je nach Funktionszustand der Fibrose, Kollagen-III- bzw. Kollagen-I-Fasern. Zwischen den eingeschlossenen Drüsen sind jedoch keine oder nur vereinzelte Kollagenfasern vom Typ III nachweisbar. Mit zunehmendem Grad der Endometrose erhöht sich der Anteil der Kollagenfasern vom Typ I, wobei diese geschlossene Faserringe um die betroffenen Drüsen bilden. Im Gegensatz dazu können WALTER et al. (2001a) mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen keine Zunahme der Kollagenfasern vom Typ I und III im Vergleich zum unveränderten Stroma nachweisen. Die Autoren beobachten neben den Basalmembran-komponenten Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (WALTER et al. 2001a) zudem eine vorwiegend aus Hyaluronsäure bestehende saure Grundsubstanz (WALTER et al. 2001b).

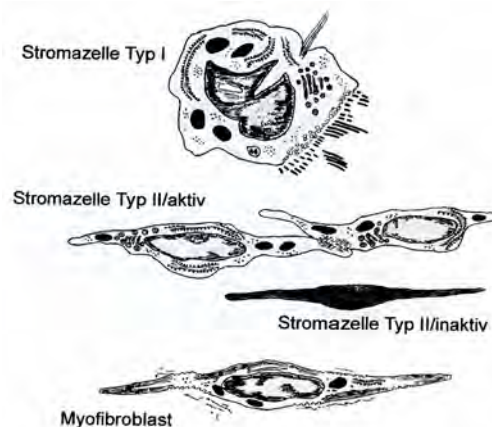


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der stromalen Fehldifferenzierungen im Rahmen der Endometrose (nach RAILA 2000)

Glanduläre Epithelien innerhalb fibrotischer Areale:

Von der periglandulären Fibrose betroffene Drüsen sind häufig durch eine zyklusasynchrone Differenzierung charakterisiert (SCHOON et al. 1997). Im Initialstadium der Endometrose besteht dabei meist eine Hypertrophie der fibrotischen Drüsen, im weiteren Verlauf sind dilatierte Drüsen, Degenerationen und Atrophien der Drüsenepithelien zu beobachten. Letztendlich kann eine Verödung der Uterindrüsen eintreten (RICKETTS 1975, KENNEY 1978, WAELCHLI u. WINDER 1987, FLORES et al. 1995). Die infolge eines Sekretstaus entstandene glanduläre Dilatation kann zudem zu einer Ausbildung glandulärer Zysten führen (GORDON u. SARTIN

1978, KENNEY u. DOIG 1986, Van CAMP 1988, FLORES et al. 1995). SCHOON et al. (1995) unterscheiden zwischen einer zyklussynchronen glandulären Differenzierung, bei der die Drüsen innerhalb der Fibrose den zyklischen Normalbefunden entsprechen, und der häufiger auftretenden zyklusasynchronen Differenzierung, die neben histologischen auch histochemische, immunhistologische und ultrastrukturelle Abweichungen von den für die Stute definierten Normalbefunden (vgl. Tab. 2.1, S. 3) aufweist (BRUNCKHORST et al. 1991, STRANKMEYER 1993, AUPPERLE 1997, RAILA 2000).

BRUNCKHORST et al. (1991) stellen während der Proliferationsphase in den von der Fibrose betroffenen Drüsen hohe Aktivitäten einer sauren Phosphatase sowie der unspezifischen Esterasen fest, physiologischerweise ist zu diesem Zykluszeitpunkt nur die alkalische Phosphatase aktiv.

Mittels der Lektin histochemie beobachten WALTER et al. (2001b) innerhalb fibrotischer Areale ein deutlich verändertes Glukokonjugatmuster, wobei die betroffenen Epithelien häufig ein dem luminalen Epithel entsprechendes Erscheinungsbild aufweisen.

Unterschiedliche Ergebnisse werden hinsichtlich der ER- und PR-Expression in den von der Fibrose betroffenen glandulären Epithelien publiziert. Keine Veränderungen im Vergleich zu umliegenden, unveränderten Drüsen stellen WALTER et al. (2001b) fest. Im Gegensatz dazu beobachten BRUNCKHORST et al. (1991) eine deutlich verminderte bis fehlende Expression. Ein solches zyklusasynchrones, vorwiegend durch ein abgeschwächtes Reaktionsmuster charakterisiertes Erscheinungsbild, können auch AUPPERLE et al. (2000) nachweisen, betonen jedoch das gleichzeitige Auftreten verstärkter und reduzierter Expressionsintensitäten innerhalb einer Biopsie. Zudem zeigen betroffene Uterindrüsen zur Zeit der physiologischen glandulären Proliferation im frühen Interöstrus eine geringere epitheliale Proliferationsrate (Ki-67-Antigen Expression) als unveränderte Drüsen (GERSTENBERG et al. 1999). Diese Ergebnisse weisen auf eine eigene Differenzierungsdynamik betroffener Areale hin, hervorgerufen durch eine Abkopplung von den regulären Steuerungsmechanismen (SCHOON et al. 1995, GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000).

Darüber hinaus zeigen von der Fibrose betroffene Uterindrüsen eine Koexpression der Intermediärfilamente Vimentin und Zytokeratin, wobei drei unterschiedliche Reaktionsmuster (basal, perinukleär, diffus) beobachtet werden (AUPPERLE et al. 2004). Ein derartiges Erscheinungsbild wird bei der Stute nur unter pathologischen Bedingungen nachgewiesen und ist vermutlich Ausdruck einer Fehldifferenzierung, die der reaktiven Stabilisierung der Zelle dient (AUPPERLE 1997, AUPPERLE et al. 2004).

Mittels ultrastruktureller Untersuchungen weist RAILA (2000) neben der zyklusasynchronen eine sogenannte intermediäre Differenzierung nach. Diese ist gekennzeichnet durch das zeitgleiche Auftreten proliferativer und sekretorischer Merkmale innerhalb einer Zelle. Des weiteren

beobachtet die Autorin bereits im Anfangsstadium einer Endometrose dezente Defekte der glandulären Basalmembran, die im weiteren Verlauf zu ausgedehnten Reduplikationen und Diskontinuitäten führen und direkte stromal-epitheliale Kontakte ermöglichen, die möglicherweise zur Entstehung der glandulären Fehldifferenzierung beitragen. Die bei fortgeschrittenen Fibrosen auftretenden glandulären Dysfunktionen lassen sich auf die erheblichen Degenerationserscheinungen innerhalb der Epithelien (u.a. Kondensation des nukleären Chromatins, gehäuftes Auftreten sogenannter apoptotic bodies, Dilatationen der Interzellularräume, Auftreten von Kernfragmenten, ödematisierte Mitochondrien) zurückführen, deren mögliche Ursache in einer hypoxischen Schädigung und zellulären Minderernährung durch die als Diffusionsbarriere fungierende Fibrose zu sehen ist (RAILA 2000). Der Verlust der Zilien und der Mikrovilli stellt ein weiteres charakteristisches Merkmal fibrotischer Drüsen dar (FERREIRA-DIAS et al. 1994), der damit verbundene Funktionsverlust (Transport der Blastozyste, Plazentaausbildung, Abtransport der Uterussekrete) ist möglicherweise eine der Ursachen der hierdurch induzierten Fertilitätsstörungen der Stute. Abb. 2.3 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der durch die Endometrose bedingten epithelialen Alterationen und der physiologischen Funktionsmorphologie des proliferativ und sekretorisch differenzierten Epithels.

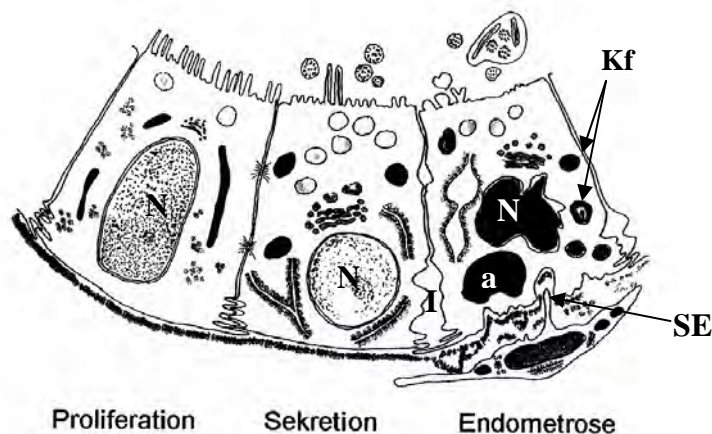


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der epithelialen Alterationen im Rahmen der Endometrose im Vergleich zur physiologischen Funktionsmorphologie während verschiedener Zyklusphasen (modifiziert nach RAILA 2000) (N = Nucleus, Kf = Kernfragmente, a = apoptotic body, SE = stromal-epitheliale Kontakte, I = dilatierete Interzellularräume)

2.6.5.3 Auswirkung der Endometrose auf die uterinen Proteine und Kohlenhydrate

Verschiedene Autoren vermuten, dass die im Rahmen der Endometrose auftretenden glandulären Alterationen eine Dysfunktion der betroffenen endometrialen Drüsen bedingen und zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung des sekretorischen Proteinmusters führen (McDOWELL et al. 1987, KREMER 1993, BADER et al. 1997). Diese inadäquate Histioprophe ist möglicherweise mitverantwortlich für frühembryonale Verluste (McDOWELL et al. 1987) und

stellt somit einen wichtigen ätiopathogenetischen Faktor für die im Rahmen der Endometrose auftretenden Reproduktionsstörungen dar (SCHOON et al. 1995, 1997).

Während mehrere elektrophoretische Untersuchungen der Uterussekrete betroffener Stuten existieren, sind, bis auf eine Ausnahme, keine morphologisch-funktionellen Studien zur Darstellung der uterinen Proteine und Kohlenhydrate im Rahmen der Endometrose bekannt.

McDOWELL et al. (1987) weisen in Uterusspülproben von Kategorie-III-Stuten mit hochgradiger Endometrose nach einer Progesteron-Applikation eine deutlich geringere Uteroferrin-Konzentration nach, im Vergleich mit dem Uterussekret von Stuten der Kategorie-I. Im Gegensatz dazu beobachtet HEIN (2000) mit gelelektrophoretischen Untersuchungen, von aus der Zervix gewonnenen Spülproben, lediglich bei zwei Stuten mit einer gering- bis mittelgradigen Endometrose eine Abweichung in der Zusammensetzung der Uterinmilch. Da diese Stuten übereinstimmend eine ausgeprägte glandulär zystische Dilatation mit Atrophie der Epithelien aufweisen, vermutet die Autorin einen zusätzlichen Zusammenhang zwischen Art und Ausmaß der Endometrose und den nachweisbaren Veränderungen der Uterinmilch. In der bisher einzigen immunhistologischen Untersuchung können STEWART et al. (2000a) bei subfertilen, zyklisch aktiven Stuten innerhalb endometrotischer Drüsennester im Östrus wie im Interöstrus eine deutliche Asynchronizität der Uterokalin-Expression feststellen. Darüber hinaus weisen diese Areale am 20., 38., und 70. Tag der Gravidität ein variables Erscheinungsbild mit teils intensiver, teils fehlender Expression des Proteins auf. Als Ursache vermuten die Autoren eine unphysiologische Akkumulation und/oder eine fehlerhafte Synthese. Histochemische Methoden hingegen ermöglichen die Darstellung einer gesteigerten epithelialen PG-Synthese unklarer Genese nicht nur innerhalb fibrotischer Areale (WALTER et al. 2001b).

2.6.5.4 Die Endometrose während der Trächtigkeit und im Puerperium

MATHIAS und BRACHER (1993) stellen bei Stuten mit ausgeprägter Endometrose eine unphysiologische Plazentaentwicklung in Form einer gestörten Ausbildung der Mikrokotyledonen und einer reduzierten Anzahl von Mikrovilli an den fetalen Epithelien fest. GERSTENBERG et al. (1997) weisen bei solchen Stuten ein signifikant reduziertes Fohlengewicht am 80. und 160. Tag der Gravidität nach und führen dies auf eine verminderte oder aufgehobene Expression des epidermalen Wachstumsfaktors zurück. KERSTEN (2000) wiederum beobachtet eine niedrigere Dichte der Chorionzotten in „geburtsreifen“ fetalen Plazenten von Stuten mit ausgeprägter Endometrose. BRACHER et al. (1997) beschreiben in fortgeschrittenen Stadien der Gravidität eine Verbesserung der histologisch erfassbaren Drüsenfunktion im Vergleich zu vor der Bedeckung entnommenen Endometriumbiopsien. Eine solche Verbesserung kann BELZ (1994) in Endometriumbiopsien vom 3., 6. und 9. Tag post partum nicht erkennen. KERSTEN (2000) bzw. STEIGER (2002) stellen eine Reaktivierung der periglandulären Fibrose im Puerperium fest. Beide Autorinnen beobachten

zudem eine geringfügige Zunahme des Endometrosegrades vom 3. bis 9. Tag post partum und führen dieses Phänomen auf die steigende Anzahl betroffener Drüsen und die vermehrte Ausbildung fibrotischer Nester zurück. Auffällig ist auch das asynchrone Erscheinungsbild der betroffenen Drüsen im Puerperium, die im Gegensatz zu umliegenden Drüsen, ein niedriges, teils atrophisches Epithel ohne intrazytoplasmatische Vakuolen aufweisen (KATILA et al. 1988) und auch am 11. Tag post partum noch ein dilatiertes Erscheinungsbild zeigen (GYGAX et al. 1979). Auch die physiologischerweise auftretenden erythrozytären Abbauprodukte sind innerhalb solcher Drüsen nicht zu beobachten (STEIGER 2002).

2.7 Allgemeine Pathogenese der Fibrose

Charakteristisch für Gewebsfibrosen ist neben einer vermehrten Proliferationsrate der Fibroblasten, deren umfangreiche Synthese von ECM-Komponenten (ATAMAS 2002). PHAN (2002) beschreibt als zusätzliches Merkmal das Auftreten persistierender Myofibroblasten. Fibrosen stellen, unabhängig von der Lokalisation, eine Folge entzündlicher Prozesse dar oder können auf Umwelteinflüsse zurückgeführt werden (ATAMAS 2002). Im folgenden werden prinzipielle „organübergreifende“ Merkmale unterschiedlicher Gewebsfibrosen und mögliche pathogenetische Faktoren dargestellt.

2.7.1 Fibroblasten/Myofibroblasten

Fibroblasten stellen keine homogene Zellpopulation dar, sondern bestehen aus Untergruppen, die in verschiedenen Geweben und innerhalb eines Gewebes auftreten können (FRIES et al. 1994). Diese Unterschiede manifestieren sich in der phänotypischen Differenzierung z.B. der Oberflächenantigene, der Rezeptorexpression, des Zytoskeletts und des Zytokin-Profiles (PHIPPS et al. 1990, AKAMINE et al. 1992). Eine Aktivierung spezifischer Untergruppen im Rahmen der Fibrogenese wird diskutiert (JORDANA et al. 1988, FRIES et al. 1994).

Die bei allen fibrotischen Prozessen nachweisbaren Myofibroblasten differenzieren sich, aktiviert durch Zytokine, vermutlich aus Fibroblasten des Interstitiums/der Adventitia und aus mesenchymalen Zellen, wie beispielsweise den Ito-Zellen der Leber (TSUTSUMI et al. 1987, RAMADORI et al. 1990, PHAN 1996). Neben ultrastrukturellen Charakteristika, wie die Ausbildung eines Fibronexus zur Anheftung der Myofibroblasten an die ECM (SINGER et al. 1985), enthalten die Zellen, zusätzlich zu dem für Fibroblasten typischen Vimentin, kontraktile Elemente wie α -GMA und/oder Desmin (MASUR et al. 1996). Entsprechend der variablen Ausreifungsgrade während der myofibroblastischen Differenzierung treten dabei verschiedene Filamenttypen auf (SKALLI et al. 1989), die zudem Ausdruck funktioneller Unterschiede sind. So sind die mehrheitlich innerhalb fibrotischer Läsionen nachweisbaren Vimentin und α -GMA koexprimierenden Zellen (VA-Typen) überwiegend sekretorisch aktiv, während die v.a. in der Peripherie fibrotischer Veränderungen auftretenden Vimentin, α -GMA und Desmin enthaltenden

Myofibroblasten (VAD-Typen) eine verstärkte Kontraktilität zeigen (HOLSTEIN et al. 1996, MALMSTRÖM et al. 2002). Myofibroblasten tragen in allen Fibrosen zur umfangreichen ECM-Synthese und -Ablagerung bei und sind Quelle zahlreicher Enzyme, Zytokine und Wachstumsfaktoren (ZHANG et al. 1994, 1995, FUKUDA et al. 1998). Sie wirken damit nicht nur stimulierend auf fibrotische Prozesse, sondern halten diese auch aufrecht (PHAN 1996). Während bei der fortschreitenden physiologischen Wundheilung eine vermehrte Apoptose der Myofibroblasten auftritt (DESMOULIERE 1995), wird deren Fehlen als Ursache für die bei Gewebsfibrosen auftretende Persistenz dieser Zellen diskutiert (PHAN 1996, ZHANG u. PHAN 1999).

Tab 2.7: Charakterisierung ausgewählter ECM-Komponenten innerhalb der Fibrose

ECM-Komponente		Charakteristika und Wirkungsmechanismen
Proteoglykane	Versikan Biglykan Hyaluronsäure	früh im fibrotischen Prozess nachweisbar ^{3,18} binden Kollagen und Fibronectin ^{22,15} und gehen der Kollagenablagerung voraus ^{3,20} bilden eine hydrierte, ödematöse Matrix, die die Zellmigration ^{3,17,19} , die Zellproliferation ^{9,20} und parakrine Mechanismen ⁴ begünstigt modulieren die Zelladhäsion ³ minimieren die Zell-Matrix und die Zell-Zell-Kontakte und erhalten dadurch einen undifferenzierten Zustand aufrecht ^{9,20}
	Dekorin	kontrolliert die biologische Aktivität von TGF- β 1 ⁷ schützt Kollagenfibrillen vor enzymatischem Abbau ¹⁶
	Heparansulfat	integraler Teil der Zelloberfläche ²⁴ , bindet Fibronectin ¹³ Anstieg in rekonstruierter Basalmembran kann über Fixierung von Fibronectin ein Initialereignis der Fibrose darstellen ¹³
Glykoproteine	Fibronectin	organisiert nachfolgend abgelagertes Kollagen ⁶ chemotaktisch für Fibroblasten ¹¹ und Ito-Zellen ²³ , vermittelt die Adhäsion der Fibroblasten an die ECM ¹⁴
	fibrilläre Kollagene	verstärkte Ablagerung von Typ I und III Kollagen ^{5,8} , wobei in frühen Stadien der Fibrose vorwiegend Typ III ^{21,2} und in späteren Stadien der Erkrankung relativ mehr Typ I Kollagene ^{2,12} nachweisbar sind auch andere Kollagene werden verstärkt abgelagert ¹
	Laminin Kollagen Typ IV	Bestandteile der Basalmembran ¹⁹ , die im fibrotischen Interstitium nachweisbar sind ^{21,10}

Legende zu Tab. 2.7: ECM = Extrazellulärmatrix

- | | | |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1. AYCOCK u. SEYER 1989 | 9. MEYER et al. 2000 | 17. STOKES et al. 2001 |
| 2. BATEMAN et al. 1981 | 10. RAUTERBERG et al. 1981 | 18. SUNDSTRÖM et al. 2002 |
| 3. BENSADOUN et al. 1996 | 11. RENNARD et al. 1981 | 19. TIMPL 1989 |
| 4. GERDIN u. HÄLLGREN 1997 | 12. ROJKIND et al. 1979 | 20. TOOLE 1991 |
| 5. GRIMAUD et al. 1980 | 13. ROSENKRANS u. PENNEY 1985 | 21. VLEMING et al. 1995 |
| 6. GRINNEL et al. 1981 | 14. RUOSLAHTI et al. 1981 | 22. YAMAGATA et al. 1989 |
| 7. KOLB et al. 2001 | 15. RUOSLAHTI u. YAMAGUCHI 1991 | 23. YANG et al. 2003 |
| 8. KRIEG et al. 1981 | 16. SCHAEFER et al. 2002 | |

2.7.2 Extrazelluläre Matrix

Während eines fibrotischen Prozesses ändert sich sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung der ECM, wobei eine deutliche Heterogenität des Mikromilieus innerhalb eines Organs auftreten kann (MALMSTRÖM et al. 2002). Tab. 2.7. (S. 30) gibt einen Überblick zu den im Rahmen einer Fibrose auftretenden ECM-Komponenten und ihrer Charakteristika.

2.7.3 Pathogenetische Faktoren in der Entstehung einer Fibrose

2.7.3.1 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Die in der Fibroseentstehung beteiligten Regulationsmechanismen sind vielschichtig (ATAMAS 2002). So kann durch Elimination eines einzelnen Faktors bzw. dessen Rezeptors experimentell die Entwicklung einer Fibrose verhindert werden (McGAHA et al. 2001, MOORE et al. 2001, ZHU et al. 2002). Zwischen den diversen Faktoren existieren jedoch zahlreiche additive, synergistische und antagonistische Effekte (ATAMAS 2002).

Eine Darstellung ausgewählter profibrotischer WF und Zytokine mit ihren Wirkungsmechanismen erfolgt in Tab. 2.8.

Tab. 2.8: Wirkungsmechanismen ausgewählter profibrotischer Wachstumsfaktoren/Zytokine

Name	Wirkungsmechanismen
Platelet derived Growth Factor	Stimulation der Fibroblasten-Chemotaxis, Proliferation und ECM-Produktion ^{13,14} Regulation verschiedener MMP ¹³ synergistische Wirkung mit verschiedenen Zytokinen ¹³
Transforming Growth Factor-α	Stimulation zellulärer Proliferation und ECM-Ablagerung bei chronischer Überexpression im Rahmen experimenteller Fibroseninduktion ⁶
Connective Tissue Growth Factor	Aufregulation durch TGF- β 1 ^{7,9} , dessen Effekte er vermittelt ^{8,9} Mitogen für Fibroblasten ^{2,5} , Stimulation der Kollagen- und Fibronectin-Synthese ⁵
Tumor Necrosis Factor-α	Synergistische Wirkung mit PDGF zur Verstärkung der Fibroblasten Proliferation und der Chemotaxis ^{1,13} Verstärkung der Hyaluronsäure-Synthese ¹¹ , Stimulation verschiedener MMP ¹³ , hemmt die Phagozytose von Kollagen durch Fibroblasten ³
Interleukin-4	Stimulation der Fibroblasten Proliferation ¹⁰ , der Chemotaxis und der Kollagen-Produktion ¹² sowie anderer Interleukine ⁴

Legende zu Tab. 2.8: ECM = Extrazellulärmatrix MMP = Matrixmetalloproteinasen

- | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1. BATTEGAY et al. 1995 | 6. HARDIE et al. 2003 | 11. OHKAWA et al. 1999 |
| 2. BRADHAM et al. 1991 | 7. IGARASHI et al. 1993 | 12. POSTLETHWAITE et al. 1992 |
| 3. CHOU et al. 1996 | 8. IHN 2002 | 13. SASAKI et al. 2000 |
| 4. FEGHALI et al. 1992 | 9. LEASK et al. 2002 | 14. YANG et al. 2003 |
| 5. FRAZIER et al. 1996 | 10. MONROE et al. 1988 | |

Der als physiologischer Regulator der Wundheilung (STREULI et al. 1993) betrachtete Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) ist nicht nur in zahlreichen Fibrosen „aufreguliert“

(BRANTON u. KOPP 1999, RAZZAQUE u. TAGUCHI 2003), sondern ist auch in der Lage, wie experimentelle Studien zeigen, Fibrosen zu induzieren (KOPP et al. 1996, KENYON et al. 2003). Er gilt damit als einer der potentesten profibrotischen Wachstumsfaktoren (WF) (ATAMAS 2002, IHN 2002), der eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Gewebsfibrosen einnimmt (VENKATESAN et al. 2002). Der WF kann sowohl durch Entzündungszellen (ATAMAS 2002) als auch durch nahezu alle Parenchymzellen (BRANTON u. KOPP 1999) freigesetzt werden. Neben Entzündungszell-assoziierten Zytokinen wie beispielsweise Interleukin-13 (LEE et al. 2001), kann nach STREULI et al. (1993) und ORTEGA-VELAZQUEZ et al. (2004) auch die im Rahmen einer Gewebsverletzung auftretende Störung der Zell-Basalmembran- bzw. der Zell-ECM-Wechselwirkung zu einer Aufregulation des TGF- β 1-Gens führen. Mittels auto- und parakriner Wirkungsmechanismen (APPLETON et al. 1993, KRATZ u. COMPTON 1997) beeinflusst TGF- β 1 die Zellproliferation, die je nach Zelltyp stimuliert oder inhibiert werden kann (IHN 2002), induziert *in vitro* die Differenzierung der Myofibroblasten (DESMOULIERE u. GABBIANI 1995) und inhibiert möglicherweise deren Apoptose (ZHANG u. PHAN 1999). Die TGF- β 1 vermittelte, zunehmende ECM-Ablagerung erfolgt einerseits durch Stimulation der Synthese verschiedener Matrixkomponenten (Fibronectin, Kollagen, Proteoglykane) (KREISBERG et al. 1994, MANISCALCO u. CAMPBELL 1994, KANZLER et al. 1999, VENKATESAN et al. 2002), andererseits wird die Aktivität Matrix-degradierender Proteasen gehemmt (BRANTON u. KOPP 1999), indem deren Inhibitoren aufreguliert werden (BORDER u. NOBLE 1994, BENYON et al. 1996, BRANTON u. KOPP 1999, KNITTEL et al. 1999). Eine exzessive oder persistierende Produktion des sich selbst induzierenden TGF- β 1 (VAN OBERGHEN-SCHILLING et al. 1988, BASCOM et al. 1989) wird daher als pathogenetischer Faktor bei der Entstehung einer Fibrose diskutiert, möglicherweise als Konsequenz einer „überschießenden Wundheilung“ (BORDER u. NOBLE 1994, BRANTON u. KOPP 1999, MENKE u. ADLER 2002).

2.7.3.2 Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Zusätzlich zu der vermehrten ECM-Synthese spielt in der Pathogenese der Gewebsfibrosen das komplexe, den *Matrix-turnover* regulierende Zusammenspiel der Matrix Metalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen/TIMP) eine wichtige Rolle. Bei den unterschiedlichen Gewebsfibrosen ist eine verstärkte Expression der TIMPs zu beobachten (BENYON et al. 1996, IREDALE et al. 1996, KURODA u. SHINKAI 1997, RAMOS et al. 2001, JOHNSON et al. 2002). Die verschiedenen MMPs zeigen ein variierendes Erscheinungsbild, wobei ein unveränderter (COSGROVE et al. 2002), ein verminderter (MONTANO et al. 1989, PARDO u. SELMAN 1992, RUIZ et al. 2003) und ein erhöhter (COSGROVE et al. 2002, ZUO et al. 2002) Nachweis beobachtet wird. Eine bei verschiedenen Fibrosen auftretende verstärkte Expression erfolgt dabei v.a. bei den Basalmembran-abbauenden MMP-2 und MMP-9 (SELMAN et al. 2000, ZUO et al. 2002.). Letztlich resultieren Imbalancen des dynamischen Gleichgewichtes, die zu einem

verminderten Abbau der ECM (MADTES et al. 2001, JOHNSON et al. 2002, BEDOSSA u. PARADIS 2003, RUIZ et al. 2003), zu einer fortschreitenden Zerstörung der Basalmembran (SELMAN et al. 2000, YANG et al. 2003, RUIZ et al. 2003) und zu einer verstärkten proteolytischen Freisetzung latent in der ECM vorliegender WF führen (WERB 1997, VU u. WERB 2000, YU u. STAMENKOVIC 2000). Letztere (s. Kap. 2.7.3.1, S 31f und Tab. 2.8, S. 31) induzieren wiederum verschiedene MMPs und TIMPs und halten damit einen Circulus vituosus aufrecht (WINKLER u. FOWLKES 2002).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Tiergut

Als Untersuchungsmaterial standen insgesamt 795 Endometriumbiopsien von 547 Stuten (s. Tab. 3.1, S. 35) zur Verfügung. Alle in die Studie einbezogenen Stuten, mit Ausnahme der als Kontrollstuten verwendeten „Zyklusstuten“ (s. Anhang, Tab. 9.3, S. 138), weisen eine Endometrose auf.

Der überwiegende Anteil dieser Biopsien (n=509) stammt aus den Routineeinsendungen an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig während der Jahre 1998 bis 2003. Die Proben wurden mit einem mehr oder weniger umfangreichen klinischen Vorbericht zur histopathologischen Untersuchung eingesandt. Eine nähere Charakterisierung dieser Biopsien erfolgt in dem Kapitel 3.1.1.

Zusätzlich standen im Verlauf des Zyklus entnommene Endometriumbiopsien (n=70) von zehn Stuten (vgl. Kap. 3.1.1) sowie vor der Belegung und postpartal entnommene Endometriumbiopsien (n=16) von acht Stuten (vgl. Kap. 3.1.1) zur Verfügung.

Weiterhin gingen zehn, im Abstand von fünf Tagen entnommene Biopsiepaare von 20 Stuten mit experimentell induzierter bakterieller Endometritis und unterschiedlichen Therapieansätzen in die Untersuchung ein (vgl. Kap. 3.1.1).

Eine zusammenfassende Darstellung des verwendeten Tiergutes und der damit beabsichtigten Untersuchungsziele gibt Tab. 3.1. (S. 35)

3.1.1 Nähere Charakterisierung des Tiergutes

Endometriumbiopsien zur Charakterisierung der unterschiedlicher Endometroseformen:

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Erscheinungsbilder der Endometrose standen aus dem Untersuchungsmaterial des Institutes für Veterinär-Pathologie Biopsien von 509 Stuten verschiedener Rassen, unterschiedlichen Alters- und Reproduktionsstatus mit variierendem endometrialem Funktionszustand und Endometrosegrad (s. Tab. 9.1 und 9.2, Anhang, S.137) zur Verfügung. Unter Berücksichtigung der saisonalen Polyöstrie der Stute und der damit möglicherweise einhergehenden Unterschiede in der Ausprägung der Endometrose, wurden nur solche Biopsien verwendet, die während der Monate Mai bis Juli (n=242, „Sommerstuten“, Tab. 9.1, S. 137) bzw. November bis Februar (n=266, „Winterstuten“, Tab. 9.2, S. 137) entnommen wurden.

Endometriumbiopsien zur Darstellung des endometrialen Zyklus:

Das Erscheinungsbild der Endometrose im Verlauf des endometrialen Zyklus wurde an sieben

Stuten untersucht (s. Anhang, Tab. 9.3, S. 138). An drei Stuten mit histopathologisch unauffälligen Endometrien (vgl. Tab. 9.3, S. 138, grau unterlegt) erfolgte die Dokumentation des zyklusabhängig variierenden Reaktionsmusters der endometrial synthetisierten (vgl. Kap. 3.2.3, S. 37f und 3.2.4, S. 38ff) Proteine und Kohlenhydrate.

Den klinisch-gynäkologisch gesunden Warmblutstuten wurden, beginnend am Tag der Ovulation (Tag 0), an den Zyklustagen 5, 10, 13, 16, 19 und 21 Biopsien entnommen. Parallel dazu erfolgte eine Analyse der Serumhormonkonzentrationen (s. Tab. 4.20, S. 64). Eine Ausnahme stellt die Stute 10 dar, bei der keine Proben am Tag 21 entnommen wurden.

Tab. 3.1: Übersicht über das Tiergut und der damit verfolgten Untersuchungsziele

Charakterisierung des Untersuchungsmaterials	Untersuchungsziel	Anzahl Stuten	Anzahl Biopsien
<p><u>Routineeinsendung</u> an das Institut für Veterinär-Pathologie</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ mit Vorbericht ▪ Mai bis Juli (1999-2000) ▪ Nov. bis Februar (1998-2000) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Charakterisierung unterschiedlicher Endometroseformen ▪ Untersuchung möglicher saisonal bedingter Variationen der Endometrose 	n=509	n=509
<p><u>Definierte Zyklustage</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tag 0 (Ov), 5, 10, 13, 16, 19, 21 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dokumentation möglicher zyklusabhängiger Variationen der Endometrose 	n=7	n=49
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Darstellung glandulärer Sekretionsprodukte im Zyklusverlauf der Stute 	n=3	n=21
<p><u>Vor der Belegung und postpartal</u> entnommene Biopsien</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Erstbiopsie vor der Belegung ▪ Zweitbiopsie am 3., 7., 10. oder 28. Tag post partum 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Untersuchung des möglichen Einflusses der Gravidität auf die Form und den Verlauf der Endometrose 	n=8	n=16
<p><u>Experimentell induzierte bakterielle Endometritis</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Erstbiopsie vor der Infektion ▪ Zweitbiopsie am 5. Tag p.inf. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Untersuchung des möglichen Einflusses der Endometritis auf die Form und den Verlauf der Endometrose 	n=20	n=200

Legende zu Tab. 3.1: Nov.: November Ov: Ovulation p. inf.: post infectionem

Vor der Belegung und postpartal entnommene Endometriumbiopsien:

Zur Dokumentation eines möglichen Einflusses der Gravidität auf die Form und den Verlauf der Endometrose standen Biopsiepaare von acht Hannoveraner-Stuten unterschiedlichen Alters und Reproduktionsstatus (s. Anhang, Tab. 9.4, S. 138) zur Verfügung. Alle Stuten hatten im Jahr der Erstbiopsie nicht abgefohlt und wurden besamt bzw. gedeckt. Die Entnahme der Zweitbiopsien erfolgte nach einem normalen Trächtigkeitsverlauf am 3., 7., 10. oder 28. Tag post partum.

Endometriumbiopsien von Stuten mit experimentell induzierter bakterieller Endometritis:

Mögliche Einflüsse einer bakteriell bedingten Endometritis auf die Form und den Verlauf der Endometrose werden anhand der Biopsiepaare von 20 Stuten untersucht. Die Entnahme der Erstbiopsie bei den klinisch-gynäkologisch untersuchten, zyklussynchronisierten Stuten erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Rosse. Anschließend wurden den Stuten 1×10^9 Keime Streptococcus zooepidemicus intrauterin inokuliert, woraufhin alle Stuten nach 24 Stunden klinische Anzeichen einer Endometritis entwickelten. Die Therapie erfolgte, mit unterschiedlichen Methoden, über einen Zeitraum von vier Tagen. Eine Zweitbiopsie wurde zur Dokumentation des bis dahin erzielten Therapieerfolges am 5. Tag p. inf. entnommen. Alle Stuten wurden im Verlauf von zwei Jahren nach diesem Protokoll mehrmals infiziert und therapiert. Eine detaillierte Darstellung des Versuchsprotokolls erfolgt in Kap. 9.1.1 (s. Anhang, S. 139). Die Versuche wurden unter Leitung von Prof. Dr. R. Mattos an der U.F.R.G.S. Faculdade de Veterinaria, Porto Alegre, Brasilien nach den dort geltenden Rechtsvorschriften und Gesetzen durchgeführt. Anamnestische Daten bezüglich des Alters und des Reproduktionsstatus sind bei diesen Stuten nicht bekannt.

3.2 Methoden

3.2.1 Histologische Präparation

Alle Proben wurden in 4%igem, neutralem, gepuffertem Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert. Die Einbettung erfolgte in Paraplast (Vogel, Gießen) nach dem Standardverfahren im Hypercenter XP (Shandon, Frankfurt). Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Reichert-Jung, Wien, Österreich) wurden von den Paraplastblöcken 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) (ROMEIS 1989) angefärbt.

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Standardmikroskop (Fa. Olympus) unter Verwendung von 10er, 20er und 40er Objektiven.

3.2.2.1 Beurteilung des Endometriums anhand der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Biopsien

Alle H.-E.-gefärbten Präparate wurden einer histomorphologischen Charakterisierung hinsichtlich ihrer endometrialen Differenzierung und der histopathologisch erfassbaren Alterationen (Endometrose, Endometritis, Angiosklerose, Perivaskulitis, Lymphlakunen) unterzogen. Zur detaillierten Charakterisierung der Endometrose erfolgte eine Beurteilung des Grades, des Nachweises von Einzeldrüsen und Drüsennestern, des Aktivitätszustandes der periglandulären Stromazellen sowie des Ausmaßes der degenerativen Veränderungen der involvierten Drüsenepithelien. Tab. 3.2 (S. 37) definiert die dabei zugrundeliegenden histomorphologischen Charakteristika.

Tab. 3.2: Definition der histomorphologischer Charakteristika bei der Beurteilung der Endometrose

Endometrosegrad	Quantifizierung des Endometrosegrades nach KENNEY (1978) siehe auch Tab. 2.6. (S. 23)
Einzeldrüse	maximal zwei Drüsenquerschnitte innerhalb der periglandulären Fibrose (vgl. Abb. 9.2, 9.4 (S. 149) und 9.5/A, S. 151)
Drüsennest	mindestens drei Drüsenquerschnitte innerhalb der periglandulären Fibrose (vgl. Abb. 9.3 (S. 149) und 9.5/B, S. 151)
aktive Endometrose	periglanduläre Stromazellen mit bauchigem Zytoplasma und ovalen, hypochromatischen Zellkernen (vgl. Abb. 9.2, S. 149)
inaktive Endometrose	länglich-spindelige Stromazellen mit schmalen, hyperchromatischen Zellkernen (vgl. Abb. 9.3, S. 149)
destruierende Endometrose	Endometrose mit unterschiedlich stark ausgeprägter Destruktion der Drüsenepithelien innerhalb der fibrotischen Areale; diese Endometroseform kann sowohl aktiv (vgl. Abb. 9.5/A+B, S. 151) als auch inaktiv (vgl. Abb. 9.4, S. 149) auftreten
zystische Dilatation	glandulär zystische Dilatation innerhalb fibrotischer Areale mit ausgeprägter Atrophie der involvierten Drüsenepithelien
irreguläre Drüsendifferenzierung	Polymorphie des Drüsenquerschnittes mit sekretorischer, proliferativer, hypertrophischer, hyperplastischer und/oder atrophischer Differenzierung

Die Einteilung der Gefäßveränderungen erfolgte in Anlehnung an GRÜNINGER (1996), wobei die an mindestens drei Gesichtsfeldern/Biopsie (10er Objektiv) erhobenen Befunde der verschiedenen Gefäßtypen zu einer Gesamtdiagnose zusammengefasst wurden:

unverändert:	Normalstruktur
geringgradig verändert:	disseminierte, geringgradige Veränderungen oder eine Lokalisation mgr. verändert
mittelgradig verändert:	disseminierte, mittelgradige Veränderungen oder eine Lokalisation hochgradig verändert
hochgradig verändert:	mehr als eine Lokalisation hochgradig verändert

3.2.3 Spezielle histochemische Untersuchungen

An den Endometriumbiopsien von drei „Zyklusstuten“ (s. Anhang, Tab. 9.3, grau hinterlegt, S. 138) sowie an ausgewählten Biopsien (vgl. Kap. 3.2.4, S. 38f) mit unterschiedlichen Endometroseformen wurde mittels der PAS-Reaktion nach McManus (ROMEIS 1989) ein Glykogen-Nachweis durchgeführt. Als Kontrolle diente ein zweiter Schnitt der jeweiligen Biopsie, bei welchem das Glykogen vor der PAS-Reaktion zwei Stunden mit α -Amylase (Speichel) verdaut worden war. Die intrazytoplasmatisch im luminalen Epithel und in den Drüsenepithelien auftretenden, in der Kontrolle nicht nachweisbaren, roten Granula wurden als positiv für Glykogen gewertet. Die Anzahl positiver Zellen wurde geschätzt und in Prozent angegeben, die Färbeintensität als

angedeutet, schwach, mäßig oder stark positiv bewertet. Zur Berechnung des semiquantitativen Sekretions-Scores siehe Kap. 3.2.6. (S. 39f)

Weiterhin erfolgte an ausgewählten Biopsien (vgl. Kap. 3.2.4) eine Alcianblau-Färbung 8 GX bei pH 2,5 und bei pH 1,0 (ROMEIS 1989) zum Nachweis saurer Mukopolysaccharide in den Epithelien und in der extrazellulären Matrix der periglandulären Fibrose. Während bei pH 2,5 sich schwach saure sulfatierte Mukosubstanzen, Sialomuzine und die Hyaluronsäure dunkelblau gefärbt darstellen, bleiben stark saure sulfatierte Muzine schwach tingiert oder ungefärbt. Bei pH 1,0 hingegen sind ausschließlich sulfatierte Mukosubstanzen darstellbar (LUPPA 1977). Die Färbeintensität der innerhalb der Fibrose gleichmäßig angefärbten Proteoglykane wird als gering-, mittel- oder hochgradig positiv bewertet, die Verteilung innerhalb der Epithelien wird entsprechend der PAS-Reaktion ausgewertet.

Zum Nachweis von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat A, C in der extrazellulären Matrix der periglandulären Fibrose wurden ausgewählte Schnitte jeweils mit testikulärer (Sigma Biosciences, Deisenhofen) und mit Streptomyces-Hyaluronidase (Calbiochem, Bad Soden/Ts) inkubiert (Kap. 9.2 und 9.3, Anhang S. 140) und anschließend mit Alcianblau 8 GX bei pH 2,5 angefärbt (ROMEIS 1989).

3.2.4 Immunhistologische Methoden

Vorversuche

Zunächst erfolgten zur Etablierung der Methodik Vorversuche für den Nachweis von Uteroglobulin, Uteroferrin, Uterokalin und Calbindin_{D9k} in den luminalen und glandulären Epithelien des Endometriums. Die verwendeten Antikörper und die Vorbehandlungsverfahren wurden an mehreren equinen Endometriumbiopsien aus dem Routinematerial des Instituts für Veterinär-Pathologie getestet und die optimale Antikörperverdünnung austitriert.

Hauptversuche

Alle in dieser Studie durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen erfolgten mittels der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP).

80 repräsentativ von den „Sommerstuten“ und den „Winterstuten“ ausgewählte Biopsien mit unterschiedlichem Grad und Erscheinungsbild der Endometrose wurden mittels monoklonaler Primärantikörper auf die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER, PR), des Proliferationsmarkers Ki-67-Antigen sowie auf das Vorkommen der Filamente Vimentin, Desmin und α -GMA untersucht. Die Komponenten der Extrazellulärmatrix (Laminin und Fibronectin) konnten mit Hilfe polyklonaler Primärantikörper nachgewiesen werden.

An den Endometriumbiopsien von drei „Zyklusstuten“ (s. Anhang, Tab. 9.3, grau hinterlegt, S. 138) mit bekannten Serumhormonkonzentrationen, sowie an 48 repräsentativ aus obiger Gruppe

ausgewählten Stuten mit unterschiedlichem Grad und Erscheinungsbild der Endometrose, erfolgte, neben dem Nachweis von Glykogen und der Proteoglykane (vgl. Kap. 3.2.3, S. 37f), die immunhistologische Untersuchung der endometrialen Proteine (Uteroglobulin, Calbindin_{D9k}, Uteroferrin, Uterokalin). Der Nachweis wurde jeweils mit einem polyklonalen Primärantikörper durchgeführt.

Die verschiedenen Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen werden im Kap. 9.5 (Anhang; S. 142ff) detailliert beschrieben, die verwendeten Primärantikörper und ihre Bezugsquellen sind in Tab. 9.8 (S. 145) aufgeführt.

3.2.5 Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrollen wurden die in Tab. 9.7 (Anhang, S. 142) aufgeführten Gewebe des Pferdes mitgeführt. Als Negativkontrollen dienten jeweils parallel mit dem Kaninchen- Kontrollserum bzw. mit einem monoklonalen Antikörper gegen Hühner-Bursa-Lymphozyten (HIRSCHBERGER 1987) inkubierte Schnitte.

3.2.6 Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollschnitt nicht nachweisbar waren. Vimentin, α -GMA, Desmin, Uteroglobulin, Uteroferrin und Uterokalin waren ausschließlich intrazytoplasmatisch nachweisbar, das Calbindin_{D9k} zeigte zusätzlich eine intranukleäre Anfärbung. Eine rein intranukleäre Expression wiesen hingegen die Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie das Ki-67-Antigen auf. Während das Laminin sowohl intrazytoplasmatisch als auch Basalmembran-assoziiert auftrat, war das Fibronectin nur extrazellulär zu beobachten. Homogen hell-beige Färbungen, v.a. im Bereich von Entnahme- und Bearbeitungsartefakten, sowie Hämosiderin als eisenhaltiges Pigment, das sich auch in der Negativkontrolle als braunes, grobscholliges Material nachweisen ließ, wurden als negativ gewertet. Einen Überblick über die Reaktionsmuster der verwendeten Antikörper gibt Tab. 9.5 (siehe Anhang, S. 141)

Die Erfassung der Hormonrezeptor-Expression erfolgte semiquantitativ anhand eines modifizierten „*Immunreaktiven Scores*“ (IRS) (ÖZGEN 1997), der sich aus nachfolgend aufgeführter Formel ergibt und einen Wert zwischen 0 und 10 einnehmen kann.

$$IRS = 1/100 \sum_{n=2}^4 \{PP_n \times \max [\varphi \times (SI_n - 1), 1]\}$$

mit Laufindex	n	Prozentsatz positiver Zellen	PP
mit Skalierungsfaktor	$\varphi = 5$	Färbeintensität	SI

Tab. 3.3: Zuordnung von Färbeintensität und SI-Wert

Laufindex n	Färbereaktion	Wert
1	keine	0
2	schwach	1
3	mäßig	2
4	stark	3

Die Anzahl der, die endometrialen Proteine exprimierenden Zellen wurde geschätzt und in Prozentzahlen angegeben, die Färbeintensität als angedeutet, schwach, mäßig oder stark positiv bewertet. Die semiquantitative Berechnung des Sekretions-Scores (SSc) erfolgt ebenfalls anhand der Rechenvorschrift von ÖZGEN et al. (1997), wobei die zusätzliche Färbeintensität „angedeutet“ berücksichtigt wurde. Für die Schätzung des Anteiles der, die immunhistologischen Marker exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Gewebsstruktur wurde die in Tab. 9.6 (Anhang, S. 141) dargestellte graduelle Einteilung verwendet.

3.2.7 Statistische Untersuchungen

Die Zusammenhänge innerhalb der histomorphologischen bzw. immunhistologisch erhobenen Befunde wurden mit einer dreifachen Varianzanalyse berechnet. Ergab sich eine Signifikanz ($p < 0,05$), wurden die signifikanten Mittelwertunterschiede der einzelnen Gruppen post hoc mit einem multiplen Vergleichstest identifiziert. Ein Vergleich der pathohistologischen Befunde mit den anamnestischen Daten erfolgte mittels des Statistikprogramms SSPS 10 mit Crosstabulation und dem Chi²-Test (χ^2) nach PEARSON. Für die Untersuchungen eines möglichen Einflusses experimentell erzeugter Endometritiden auf die Form und den Verlauf der Endometrose wurde ein zweistufiger Wiederholungsfaktor verwendet. P-Werte unter 0,05 sind statistisch signifikant, zwischen 0,05 und 0,1 weisen sie auf eventuell bestehende statistische Unterschiede hin und werden in der Ergebnisdarstellung mit dem Begriff „Trend“ bzw. „statistisch auffällig“ gekennzeichnet.

Die statistischen Berechnungen wurden im Herzzentrum Leipzig sowie in der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig durchgeführt.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen werden teilweise in Tabellenform dargestellt. Die wichtigsten Befunde sind in den Tabellen grau hinterlegt.

Die nachfolgend als „Einzeldrüse“ bzw. „Drüsennest“ bezeichneten histomorphologischen Erscheinungsbilder beziehen sich ausschliesslich auf fibrotische Veränderungen (vgl. Tab. 3.2, S. 37).

4.1 Histomorphologische Charakterisierung der Endometrose und statistische Auswertung

Die in Tab 9.1 und Tab. 9.2 (s. Anhang, S. 137) aufgeführten „Sommerstuten“ und „Winterstuten“ werden zunächst anhand H.-E.-gefärbter Präparate untersucht, wobei eine detaillierte Charakterisierung der Endometrose nach den in Tab. 3.2 (S. 37) aufgeführten histomorphologischen Parametern erfolgt.

4.1.1 Histomorphologische Charakterisierung der Endometrose im Untersuchungsgut

Insgesamt weisen 49,5% der Stuten (252/509) eine geringgradige, 42,2% (215/509) eine mittelgradige und 8,3% (42/509) eine hochgradige Endometrose auf.

Die Endometrose zeigt innerhalb einer Endometriumbiopsie ein variables Erscheinungsbild (Abb. 9.1, S. 148). Während bei geringgradigen Endometrosen die aus der periglandulären Fibrose und den betroffenen Drüsenepithelien bestehenden Herde zwischen dem unveränderten endometrialen Gewebe eingestreut liegen, sind mit zunehmendem Endometrosegrad nur noch wenige unveränderte endometriale Strukturen zu beobachten.

Die periglanduläre Fibrose weist unterschiedliche *Aktivitätszustände* auf (s. Tab. 3.2, S. 37), so dass die Endometrose, je nach überwiegend auftretender Differenzierung der Stromazellen, innerhalb eines fibrotischen Areals als *aktiv*, *inaktiv* oder *gemischt* beurteilt werden kann. Im Untersuchungsgut ist insgesamt eine gleichmäßige Verteilung dieser Endometroseformen zu beobachten (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Einteilung der Endometrose nach dem Aktivitätszustand der periglandulären Stromazellen und Auftreten im Untersuchungsgut

Endometroseform	Histomorphologische Charakteristika der periglandulären Stromazellen	Anteil der Biopsien
aktive Fibrose	mindestens 75% mit aktiver Differenzierung	31,5% (161/509)
gemischte Fibrose	zu gleichen Teilen aktiv und inaktiv differenzierte Zellen	31,5% (160/509)
inaktive Fibrose	mindestens 75% mit inaktiver Differenzierung	37% (188/509)

Während die Endometrose bei 32,2% der Stuten (164/509) auf Einzeldrüsen beschränkt ist, sind in 53,9% (274/508) der untersuchten Biopsien Einzeldrüsen und Drüsennester (Abb. 9.1, S. 149) sowie in 13,9% (71/508) der Fälle nahezu ausschließlich Drüsennester zu beobachten. Letztere

können statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$) häufiger bei hochgradigen Endometrosen nachgewiesen werden (Abb. 4.1).

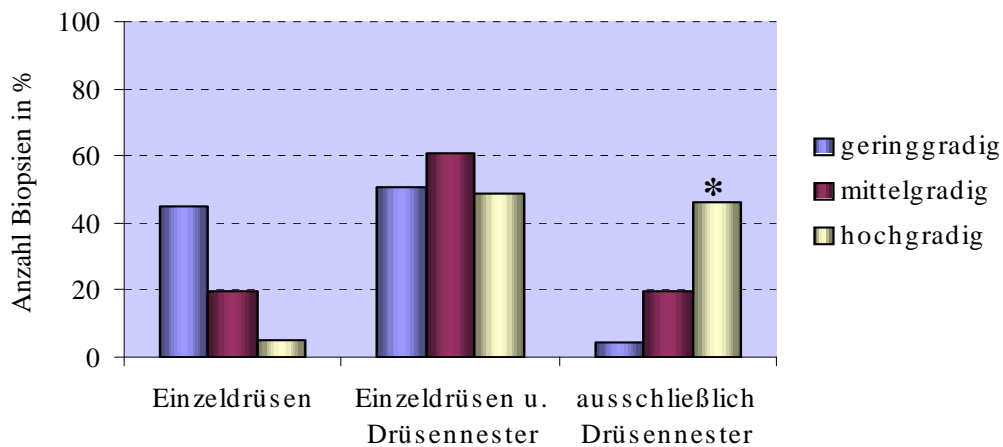


Abb. 4.1: Häufigkeit und Verteilung der Einzeldrüsen bzw. der Drüsennester in Abhängigkeit vom Grad der Endometrose (* statistisch signifikant mit $p < 0,0001$)

Ein ausschließlich destruierendes Erscheinungsbild der Endometrose kann bei 27,6% (126/509) der untersuchten Stuten nachgewiesen werden, wobei 47,5% (54/126) dieser Stuten eine aktive destruierende, 30,1% (38/126) eine gemischte und 27% (34/126) eine inaktive destruierende Endometrose aufweisen. In etwas weniger als der Hälfte der untersuchten Biopsien (47,5%, 242/508) sind destruierende und nicht destruierende fibrotische Herde innerhalb einer Biopsie zu beobachten.

Eine zystische Dilatation der von der Endometrose betroffenen Drüsen ist in 8,6% (44/509) der Biopsien nachzuweisen. Dieses vom Endometriosegrad unabhängige Erscheinungsbild tritt signifikant häufiger ($p < 0,05$) bei inaktiven Fibrosen auf (Abb.4.2).

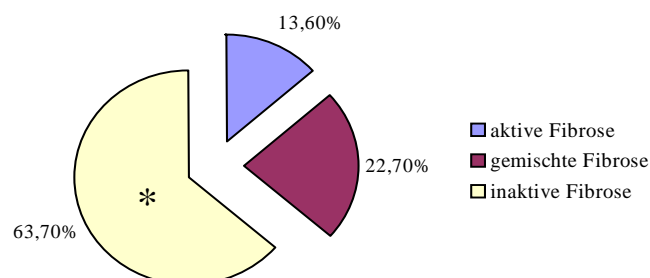


Abb. 4.2: Aktivitätszustand der Endometrose bei zystischer Dilatation der Drüsen (* statistisch signifikant mit $p < 0,05$)

4.1.2 Statistische Auswertung unter Berücksichtigung anamnestischer Daten

Aufgrund der teils unvollständigen vorberichtlichen Angaben können nicht alle 509 Stuten bei der Auswertung berücksichtigt werden.

4.1.2.1 Altersverteilung

Im untersuchten Tiergut tritt ein statistisch gesicherter Zusammenhang ($p \leq 0,0001$) zwischen dem Endometrosegrad und dem Lebensalter der Stute auf (Abb. 4.3).

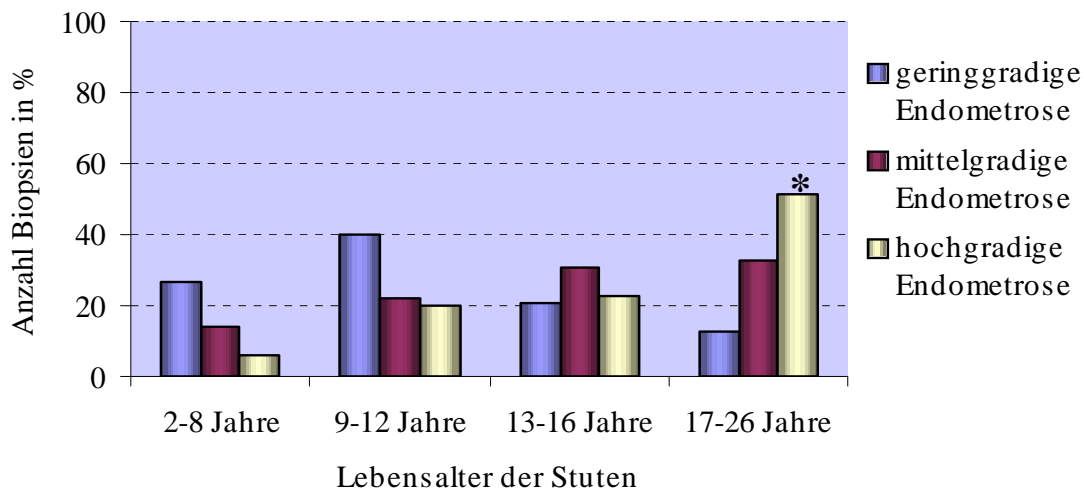


Abb. 4.3: Auftreten der Endometrose in Abhängigkeit vom Lebensalter der Stute (* statistisch signifikant mit $p < 0,0001$)

Drüsenester sind seltener bei jungen Stuten mit Endometrose nachweisbar, ältere Stuten hingegen weisen deutlich weniger von der periglandulären Fibrose betroffene Einzeldrüsen auf ($p < 0,0001$) (Abb. 4.4, S. 44).

4.1.2.2 Reproduktionsstatus

Insgesamt 92,4% (339/367) der untersuchten Stuten sind güt. Es ergibt sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Länge der Gützeit und dem Grad der Endometrose.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Endometrose und der Anzahl bereits erfolgter Abfohlungen ist im untersuchten Tiergut nicht nachweisbar.

4.2 Untersuchungen potenzieller Einflussfaktoren auf den Verlauf der Endometrose

Die Endometriumbiopsien der in verschiedene Gruppen aufgeteilten Stuten (s. Tab. 3.1, S. 35, sowie Anhang, Tab.: 9.1-9.4, S. 137f) werden anhand H.-E.-gefärbter Präparate untersucht. Neben der Charakterisierung der Endometrose (s. Kap. 4.1., S. 41f) erfolgt eine histopathologische Beurteilung weiterer endometrialer Alterationen (vgl. Kap. 2.6., Seite 20ff). Die Zuweisung eines

bestimmten endometrialen Funktionszustandes wird anhand der in Tab. 2.1 (S. 3) und Kap. 2.2.1.2. bzw. 2.2.1.3. (S. 4) aufgeführten histomorphologischen Kriterien durchgeführt.

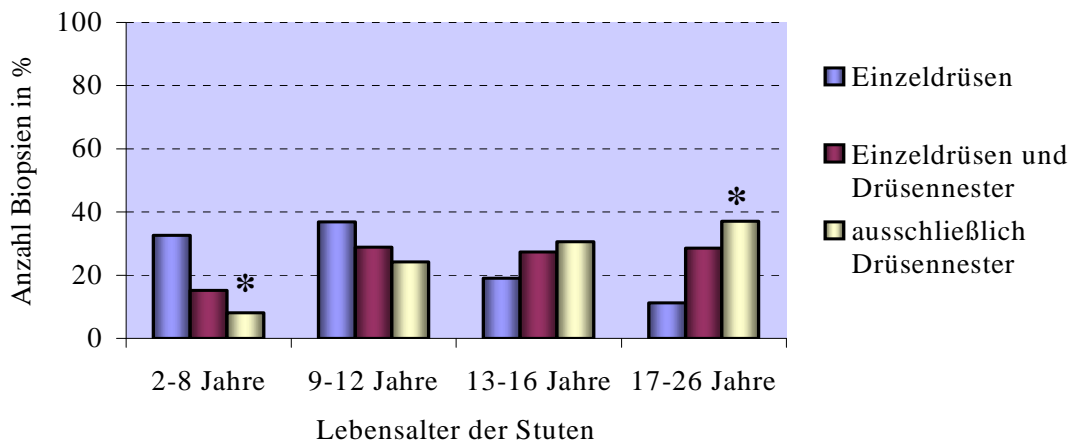


Abb. 4.4: Häufigkeit der Einzeldrüsen bzw. Drüsennester in Abhängigkeit vom Lebensalter der Stuten (* statistisch signifikant mit $p < 0,0001$)

4.2.1 Untersuchungen möglicher saisonal und zyklisch bedingter Einflüsse

Es wird der potenzielle Einfluss der bei der saisonal polyöstrischen Stute auftretenden, jahreszeitlich und zyklisch bedingten Veränderungen (vgl. Kap. 2.2.1, S. 2ff) auf die Endometrose untersucht. Hierfür wird der Aktivitätszustand der periglandulären Fibrose in den Biopsien der in Tab. 9.1-9.3 (S. 137f) aufgeführten Stuten bestimmt. Dabei können weder jahreszeitlich- noch zyklusassoziierte Veränderungen festgestellt werden (s. Tab. 4.2 und Tab. 4.3, S. 45)

Tab. 4.2.: Aktivitätszustand der periglandulären Fibrose in Abhängigkeit von der Jahreszeit

	Anzahl gesamt	aktive Fibrose	gemischte Fibrose	inaktive Fibrose
„Sommerstuten“	n=244	32,4% (79)	28,7% (70)	38,9% (95)
„Winterstuten“	n=265	30,9% (82)	34,0% (90)	35,1% (93)

4.2.2 Untersuchungen zum möglichen Einfluss der Gravidität

Es werden insgesamt acht Stuten untersucht, bei denen jeweils vor der Belegung sowie postpartal eine Endometriumbiopsie entnommen wurde (vgl. Kap. 3.1.1, S. 34ff; Tab. 9.4, S. 138). Während bei sieben Stuten der Endometrosegrad zwischen der Erst- und der Zweitbiopsie keine Änderung bzw. nur sehr geringfügige Schwankungen aufweist, nimmt die Ausprägung der Endometrose bei einer Stute um einen Grad ab. Insgesamt fällt postpartal eine überwiegende Inaktivität (6/8) der periglandulären Fibrose auf. Fünf Stuten weisen zudem postpartal bei gleichbleibendem Endometrosegrad eine deutlich zunehmende Inaktivierung der „fibrotischen“ Stromazellen auf.

Während vor der Belegung sowohl Einzeldrüsen als auch Drüsennester von der Endometrose betroffen sein können, ist postpartal im Untersuchungszeitraum keine Nesterbildung erkennbar. Die Differenzierung des Drüsenepithels innerhalb der fibrotischen Herde ist sowohl in der Erstbiopsie als auch postpartal sehr variabel. Vorwiegend wird eine irreguläre Differenzierung vorgefunden. Destruierende Endometrosen sind in der Erstbiopsie (vier Stuten), jedoch nicht postpartal zu beobachten. Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Befunde.

Tab. 4.3: Aktivitätszustand der periglandulären Fibrose in Abhängigkeit vom endometrialen Zyklus

Stute	Ovulation	Tage post ovulationem					
	Tag 0	Tag 5	Tag 10	Tag 13	Tag 16	Tag 19	Tag 21
1	aktiv	n.b.	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv
2	aktiv	inaktiv	gemischt	gemischt	aktiv	aktiv	aktiv
3	gemischt	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv
4	aktiv	gemischt	aktiv	aktiv	gemischt	aktiv	aktiv
5	inaktiv	inaktiv	gemischt	inaktiv	aktiv	aktiv	n.b.
6	aktiv	n.b.	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv	aktiv
7	aktiv	inaktiv	inaktiv	aktiv	aktiv	aktiv	n.b.

Legende zu Tab. 4.3.: üb.: überwiegend

n.b.: nicht beurteilbar

Tab.4.4: Befunde der vor und nach der Gravidität entnommenen Biopsien hinsichtlich Grad und Aktivität der Fibrose sowie Auftreten von Einzeldrüsen und Drüsennestern

Stute	Endometrosegrad		Auftreten in ED/Ne		Aktivitätszustand d. Fibrose	
	prägravid	postpartal	prägravid	postpartal	prägravid	postpartal
11	mgr.	ggr.	ED/Ne	ED	gemischt	gemischt
12	ggr.-mgr.	ggr.-mgr.	Ne	ED	aktiv	inaktiv
13	ggr.-mgr.	ggr.	ED/Ne	ED	gemischt	gemischt
14	ggr.	ggr.	ED	ED	aktiv	inaktiv
15	ggr.	ggr.	ED	ED	inaktiv	inaktiv
16	ggr.-mgr.	ggr.	ED	ED	inaktiv	inaktiv
17	mgr.	mgr.	Ne	ED	gemischt	inaktiv
18	ggr.-mgr.	ggr.	Ne	ED	inaktiv	inaktiv

Legende zu Tab. 4.4:

ggr.
mgr.

geringgradig
mittelgradig

ED
Ne

Einzeldrüse
Drüsennester

4.2.3 Untersuchungen eines möglichen Einflusses von Endometritiden

Insgesamt kann bei 50,1% (255/509) der untersuchten Biopsien aus dem Routinematerial des Institutes für Veterinär-Pathologie eine Endometritis diagnostiziert werden, wobei 62,4% (159/255) der Stuten eine nichteitrige und 23,5% (60/255) eine eitrige Entzündung aufweisen. Eine

Endometritis eosinophila tritt bei 14,1% (36/255) der Stuten auf. Stuten mit einer hochgradigen Endometrose zeigen dabei, unabhängig von der Qualität der Endometritis, signifikant häufiger ($p=0,034$) eine Entzündung (Tab. 4.5). Zudem kann, im Vergleich zu nicht destruierenden Endometrosen, im Rahmen destruierender Endometrosen signifikant häufiger ($p=0,015$) eine Endometritis nachgewiesen werden (Tab. 4.6).

Tab. 4.5: Häufigkeitsverteilung von Endometritiden bei nicht destruierenden Endometrosen

	Anzahl gesamt	Endometrosegrad		
		geringgradig	mittelgradig	hochgradig
o.b.B.	254	54,6% (137)	47,5% (103)	34,1% (14)
Endometritis	255	45,4% (114)	52,5% (114)	65,9% (27)

Legende zu Tab. 4.5: o.b.B.: ohne besonderen Befund

Tab. 4.6: Häufigkeit des Auftretens von Endometritiden bei destruierenden Endometrosen im Vergleich zu nicht destruierenden Endometrosen

	nicht destruierende Endometrose n=381	destruierende Endometrose n=128
o.b.B.	53,0% (202)	40,6% (52)
Endometritis	47% (179)	59,4% (76)

Legende zu Tab. 4.6: o.b.B.: ohne besonderen Befund

Zur Darstellung des möglichen Einflusses einer Endometritis auf die Endometrose wird von den in Kap. 3.1.1 (S. 34ff) aufgeführten Stuten mit experimentell erzeugter Endometritis jeweils direkt vor sowie fünf Tage nach der Infektion der Endometrosegrad, der Aktivitätszustand der Fibrose und die Endometritis beurteilt. In 73% der Biopsien (73/100) kann 5 Tage p. inf. eine in Grad und Qualität variierende Endometritis nachgewiesen werden, wobei 42,5% (31/73) der Stuten eine nichteitrige und 30,1% (22/73) eine eitrig-eitrig Endometritis aufweisen. Eine Endometritis eosinophila tritt bei 27,4% (20/73) der Stuten auf.

Während sich der Aktivitätszustand der periglandulären Fibrose in den Biopsien nach der Infektion und anschließender Therapie statistisch signifikant ($p < 0,001$) ändert und dabei vorwiegend eine Aktivierung der Fibrose beobachtet werden kann (Abb. 4.5, S. 47), bleibt der Endometrosegrad bei den meisten Stuten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg unverändert. Lediglich zwei Stuten weisen eine Verschlechterung der Endometrose um jeweils einen Grad auf.

Insgesamt kann im untersuchten Tiergut kein Zusammenhang zwischen dem Grad bzw. der Qualität der Endometritis und dem Erscheinungsbild der Endometrose festgestellt werden.

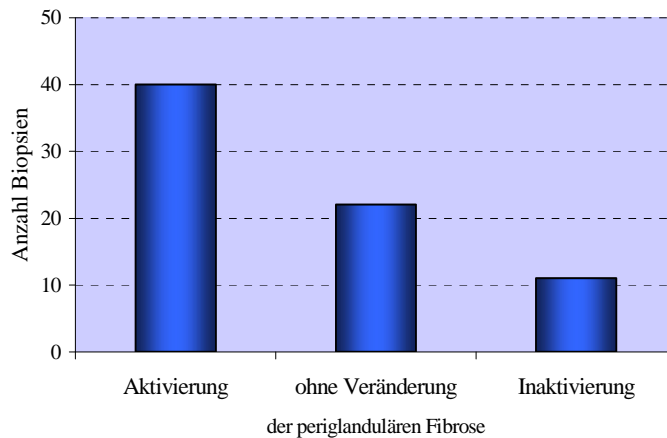


Abb. 4.5: Änderung des Aktivitätszustandes der periglandulären Fibrose nach experimentell erzeugter Endometritis (5 Tage post infectionem)

4.2.4 Die Endometrose und andere Alterationen des Endometriums

Insgesamt 67,8% (345/509) der untersuchten Stuten aus dem Routinematerial des Institutes für Veterinär-Pathologie weisen neben der Endometrose zusätzlich noch eine Angiosklerose auf. Dabei ist festzustellen, dass Stuten mit einer geringgradigen Endometrose signifikant seltener ($p < 0,0001$) eine hochgradige Angiosklerose aufweisen als solche mit höhergradigen Endometrosen (Abb. 4.6).

Im untersuchten Tiergut bestehen keine erkennbaren Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Endometrose und dem Nachweis von Perivaskulitiden und Lymphangiektasien.

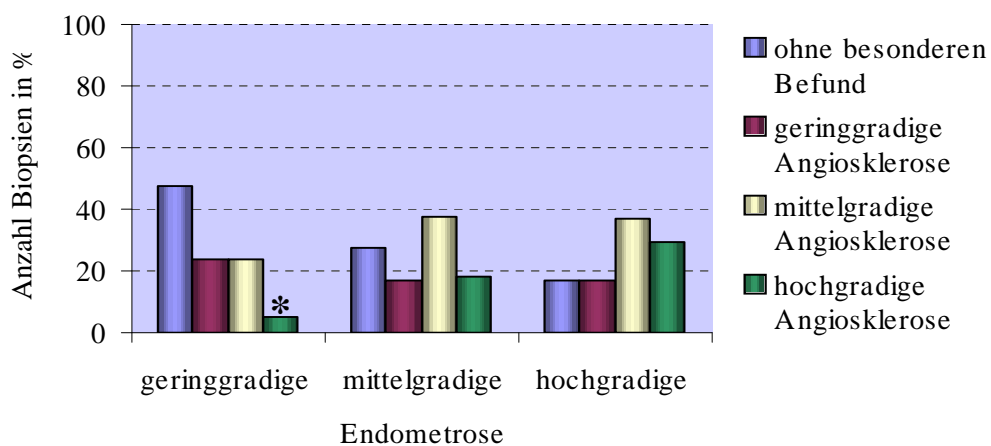


Abb. 4.6: Häufigkeit und Grad der Angiosklerosen in Abhängigkeit vom Endometrosegrad (*statistisch signifikant mit $p < 0,0001$)

4.3 Histomorphologische, histochemische und immunhistologische Untersuchungen der unterschiedlichen Erscheinungsformen der Endometrose

Für die detaillierte Untersuchung der Endometrose standen aus dem Routinematerial des Institutes für Veterinär-Pathologie repräsentativ ausgewählte Endometriumbiopsien von 80 Stuten zur Verfügung. Diese wurden in die Gruppen „aktive Endometrose“, „inaktive Endometrose“, „aktive destruierende Endometrose“ und „inaktive destruierende Endometrose“ mit einer Gruppengröße von je 20 Biopsien unterteilt. In jeder Gruppe sind jeweils zehn Biopsien mit einer geringgradigen und zehn Biopsien mit einer hochgradigen Endometrose vorhanden. Alle Endometriumbiopsien wurden histomorphologisch und immunhistologisch beurteilt, anhand von 12 repräsentativ ausgewählten Biopsien jeder Gruppe erfolgte mit Hilfe der Alcianblau-Färbung und enzymatischer Vorbehandlungen (Kap. 3.2.3, S. 37f) eine Charakterisierung der im Rahmen der Endometrose synthetisierten Proteoglykane.

Aufgrund des innerhalb einer Endometriumbiopsie auftretenden variablen Erscheinungsbildes der Endometrose werden in jedem Schnitt mehrere entsprechend differenzierte fibrotische Herde (Einzeldrüsen und, soweit vorhanden, Drüsennester) untersucht. Zur übersichtlicheren Darstellung, v.a. der histochemischen und immunhistologischen Befunde, werden die dabei ermittelten Werte zusammengefasst und ein Mittelwert für die Gesamtbioptie berechnet.

Periglanduläre Fibrosen, die zu gleichen Teilen aus aktiv und aus inaktiv differenzierten Stromazellen bestehen (gemischte Fibrosen), werden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht berücksichtigt.

4.3.1 Aktive Endometrose

Allgemeine Histologie

In dieser Gruppe kann in 14 Biopsien eine proliferative, in fünf Biopsien eine sekretorische und in einer Biopsie eine irreguläre endometriale glanduläre Differenzierung beobachtet werden. Neben der Endometrose tritt bei neun Stuten eine nichteitrige sowie bei vier Stuten eine eitrig Endometritis auf. Bei sechs Tieren wird zusätzlich eine Perivaskulitis diagnostiziert. Zudem ist bei 15 Stuten eine Angiosklerose nachweisbar. In Tab. 4.7 (S. 49) werden die erhobenen Befunde zusammenfassend dargestellt.

Die **Stromazellen** innerhalb der fibrotischen Herde weisen alle bzw. zum überwiegenden Teil (>75%) eine aktive Differenzierung auf und besitzen damit mittelgroße bis sehr große, länglich-ovale bis unregelmäßig rundoval geformte, hypochromatische Zellkerne und ein bauchiges, blasses Zytoplasma (Abb. 9.2, S. 149). Sie liegen ungeordnet in mindestens zwei (geringgradige Endometrose) bis maximal neun (hochgradige Endometrose) periglandulären Schichten. Eine inaktive Funktionsmorphologie (<25% der Stromazellen eines fibrotischen Herdes) kann häufig bei

den inneren Schichten der periglandulären Stromazellen und bei den innerhalb eines Drüsennestes, parallel zur Achse der Drüsenepithelien ausgerichteten Stromazellen beobachtet werden. Während bei geringgradigen Endometrosen lediglich Einzeldrüsen in den fibrotischen Prozess involviert sind, zeigen sechs Stuten mit hochgradiger Endometrose eine gleichmäßige Verteilung von Einzeldrüsen und Drüsennestern innerhalb der Biopsie. Vier Stuten hingegen weisen im Rahmen einer hochgradigen Endometrose nahezu ausschließlich Drüsennester auf.

Tab.4.7: Histopathologische Untersuchungsbefunde innerhalb der Biopsien mit einer aktiven Endometrose

	glanduläre Funktionsmorphologie				Endometritis			Angiosklerose			Perivaskulitis		
	ProL.	Sek.	Irr.	Ina.	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
+ EM	6	3	1	0	5	2	--	2	3	3	5	--	--
+++ EM	8	2	0	0	5	1	--	4	3	--	1	--	--

Legende zu Tab.4.7:

EM	Endometrose	Ina	Inaktiv	+	geringgradig
ProL.	Proliferation	Irr	Irregulär	++	mittelgradig
Sek.	Sekretion	--	ohne besonderen Befund	+++	hochgradig

In 64% (86/134) der untersuchten fibrotischen Herde zeigen die betroffenen *Drüsenepithelien* ein zyklusasynchrones Erscheinungsbild, welches sich vorwiegend in einer irregulären Differenzierung äußert (95%). Eine Atrophie der Drüsenepithelien ist lediglich in 5% der Fälle zu beobachten.

Histochemische Untersuchung

Bei sechs von 12 untersuchten Biopsien sind geringgradig *Proteoglykane* in der periglandulären ECM nachweisbar. Die nur geringfügigen Unterschiede in der Färbeintensität zwischen den bei pH 1,0 und pH 2,5 durchgeführten Alcianblau-Färbungen sprechen für einen überwiegenden Gehalt an *sulfatierten Mukopolysacchariden*. Diese bestehen zum Teil aus *Chondroitinsulfat A,C*, da die enzymatische Vorbehandlung mit Testes-Hyaluronidase, nicht aber mit Streptomyces-Hyaluronidase, eine geringgradige Abnahme der Färbeintensität bei der nachfolgend durchgeführten Alcianblau-Färbung bedingt.

Immunhistologische Untersuchung

Stromazellen und Extrazellulärmatrix der Endometrose:

Die *Hormonrezeptorexpression* der Stromazellen weist in nahezu allen fibrotischen Herden eine deutlich geringere Expressionsintensität im Vergleich zu den umliegenden, unveränderten Stromazellen des Endometriums auf (Abb. 9.6, S. 151). Dabei ist die ER-Konzentration mittelgradig und die PR-Konzentration gering- bis mittelgradig vermindert (Tab. 4.8, S. 51).

Keine (10/20) bzw. eine nur schwache (9/20) *Ki-67-Antigenexpression* ist in den meisten Stromazellen der periglandulären Fibrose zu beobachten. Ausnahmsweise (1/20) ist eine gering- bis

mittelgradige Expression nachweisbar. Die Proliferationsaktivität entspricht damit, mit geringen Unterschieden, der Ki-67-Antigenexpression des unveränderten Stromas (Tab.4.8, S. 51).

Während mehrheitlich eine hochgradige **Vimentinexpression** (> 50-80%) in den „fibrotischen“ Stromazellen der untersuchten Biopsien nachgewiesen werden kann, zeigen diese bei zehn Stuten eine stark variable (5-60%), intrazytoplasmatisch diffuse **Desminexpression**.

Ein gemeinsames Merkmal aller fibrotischer Herde ist die vorwiegend gering- bis mittelgradige, intrazytoplasmatisch diffuse stromale **Glattmuskulatur- α -Aktin** (α -GMA) Expression.

Bei acht Stuten kann in den aktiv differenzierten Stromazellen der Fibrose eine überwiegend schwache, lichtmikroskopisch intrazellulär erscheinende Expression von **Laminin** nachgewiesen werden.

Fibronektin kann, mit einem stark variablen Reaktionsmuster (5-90%), in der fibrotischen Extrazellulärmatrix der Hälfte (6/12) der untersuchten Biopsien beobachtet werden.

Das in den einzelnen Biopsien auftretende immunhistologische stromale Expressionsmuster der Intermediär- und Mikrofilamente sowie der Glykoproteine ist in Tab. 4.9 (S. 51) zusammengefasst.

Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Areale:

Die epitheliale **ER-Expression** zeigt zwischen den einzelnen fibrotischen Herden innerhalb einer Biopsie ein variables Erscheinungsbild (IRS-ER = 0,1-5,7). Insgesamt tritt jedoch, im Vergleich zum unveränderten umliegenden Epithel, bei etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Biopsien (11/20) eine geringgradige Zunahme der Hormonrezeptor-Konzentration auf (Abb. 9.7, S. 151). Eine dem unveränderten Endometrium entsprechende Hormonrezeptorexpression ist in sechs Biopsien zu beobachten.

Die nicht mit der ER-Expression korrelierende, insgesamt sehr schwache **PR-Konzentration** (IRS-PR = 0,0-1,8) entspricht in vielen Fällen (11/20) der der umliegenden, unveränderten Epithelien bzw. weist eine nur sehr geringe Zunahme (6/20) im Vergleich zu diesen auf.

Eine **Proliferationsaktivität** der Drüsenepithelien innerhalb der fibrotischen Herde ist nicht (12/20) bzw. nur sehr schwach (8/20) nachweisbar und entspricht somit, mit geringfügigen Unterschieden, der Ki-67-Antigenexpression unveränderter Epithelien.

Eine stark variable (5-45%) epitheliale intrazytoplasmatische **Vimentinexpression** ist in 17 Biopsien nachweisbar, wobei vorwiegend ein basales (86%) und selten ein perinukleäres Reaktionsmuster (10%) auftritt. Vereinzelt ist eine diffuse intrazytoplasmatische Verteilung (4%) zu beobachten.

Die mit Hilfe der **Lamininexpression** darstellbare Basallamina der Drüsenepithelien erscheint teils schwach dargestellt, teils verdickt und aufgefasert (Abb. 9.10/A, S. 153). In den meisten Fällen

(16/20) treten zudem multifokal geringgradige Diskontinuitäten auf.

Eine Übersicht über die immunhistologischen Befunde geben die Tab. 4.8 und 4.9.

Tab. 4.8: ER-, PR- und Ki-67-Antigen-Expression innerhalb aktiver Endometrosen im Vergleich zu den unveränderten endometrialen Strukturen

	Stromazellen und ECM der Endometrose					Drüsenepithelien innerhalb der Fibrose				
	ER		PR		Ki-67-Antigen	ER		PR		Ki-67-Antigen
	Biops.	ØIRS	Biops.	ØIRS	Biops.	Biops.	ØIRS	Biops.	ØIRS	Biops.
>	n=0	0,0	n=0	0,0	n=0	n=11	1,2	n=6	0,7	n=0
=	n=0	0,0	n=0	0,0	n=20	n=6	0,0	n=11	0,0	n=20
<	n=20	4,5	n=20	3,2	n=0	n=3	1	n=3	0,4	n=0

Legende zu Tab.4.8:

>	erhöht im Vergleich zum unveränderten Gewebe	Biops.	Anzahl der Biopsien
=	entsprechend dem unveränderten Gewebe	ECM	Extrazellulärmatrix
<	vermindert im Vergleich zum unveränderten Gewebe	ER	Östrogenrezeptor
Ø	mittlerer Wert der Abweichung vom unveränderten Gewebe	PR	Progesteronrezeptor

Insgesamt stehen die beschriebenen Veränderungen innerhalb der aktiv differenzierten fibrotischen Herde in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit dem Endometrosegrad. Einzeldrüsen und Drüsenester zeigen ein weitgehend übereinstimmendes histochemisches und immunhistologisches Reaktionsmuster.

Tab. 4.9: Expressionsmuster der Zytoskelettanteile sowie des Laminins und Fibronektins innerhalb der aktiven Endometrose

SI	Stromazellen und Extrazellulärmatrix					gland. Ep.	BM ¹
	Vimentin n=20	Desmin n=20	α -GMA n=20	Laminin n=20	Fibronektin n=12	Vimentin n=20	Laminin n=20
--	--	n=10	--	n=12	n=6	n=3	n=4
(+)	--	n=3	--	n=6	n=2	n=7	--
+	--	n=2	n=3	n=2	--	n=4	n=12
++	n=2	n=2	n=5	--	n=1	n=5	--
+++	--	n=1	n=6	--	--	n=1	n=4
++++	n=3	n=2	n=6	--	n=2	--	--
+++++	n=15	--	--	--	n=1	--	--
Ø	+++	++	++	++	+	+	+

Legende zu Tab.4.9:

SI	Färbeintensität	(+)	≤ 10% der Zellen positiv
gland. Ep.	glanduläres Epithel	+	10-20% der Zellen positiv
BM	Basalmembran	++	20-40% der Zellen positiv
¹	Grad der Diskontinuität	+++	40-50% der Zellen positiv
--	keine positiven Zellen	++++	50-80% der Zellen positiv
Ø	mittleres Expressionsmuster	+++++	80-100% der Zellen positiv

Zusammenfassung:

Die aktive Fibrose zeigt eine ungeordnete periglanduläre Schichtung der *Stromazellen*, die im Vergleich zum umliegenden Stroma eine verminderte ER- und PR-Expression aufweisen. Die Proliferationsaktivität hingegen ist unverändert. Das Zytoskelett ist durch eine hochgradige Vimentinexpression und eine gering- bis mittelgradige α -GMA-Expression gekennzeichnet. Nur die Hälfte der fibrotischen Herde exprimieren, stark variabel, Desmin. Intrazelluläres Laminin ist teilweise schwach nachweisbar. In der *ECM* ist z.T. eine geringgradige Akkumulation von Proteoglykanen und Fibronectin zu beobachten. Die betroffenen *Uterindrüsen* sind häufig durch eine im Vergleich zum unveränderten Epithel erhöhte Hormonrezeptorexpression sowie durch geringgradige Diskontinuitäten der Basallamina und eine geringgradige Vimentinexpression gekennzeichnet.

4.3.2 Inaktive Endometrose*Allgemeine Histologie*

Bei zehn Stuten wird eine proliferative glanduläre endometriale Differenzierung, bei sieben Stuten eine sekretorische und bei drei Stuten eine irreguläre Funktionsmorphologie des Endometriums festgestellt. Zusätzlich zur Endometrose kann bei sechs Stuten eine nichteitrig sowie bei zwei Stuten eine eitrig Endometritis nachgewiesen werden. Eine Perivaskulitis tritt bei drei Stuten auf, 15 Stuten zeigen eine Angiosklerose. Die Tab. 4.10 gibt einen Überblick über die erhobenen histopathologischen Befunde.

Tab.4.10: Histopathologische Untersuchungsbefunde innerhalb der Biopsien mit einer inaktiven Endometrose

	glanduläre Funktionsmorphologie				Endometritis			Angiosklerose			Perivaskulitis		
	ProL.	Sek.	Irr.	Ina.	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
+ EM	5	3	0	0	3	--	--	2	3	1	1	--	--
+++ EM	5	4	3	0	2	2	1	2	5	2	1	1	--

Legende zu Tab.4.10:

EM	Endometrose	Ina	Inaktiv	+	geringgradig
ProL.	Proliferation	Irr	Irregulär	++	mittelgradig
Sek.	Sekretion	--	ohne besonderen Befund	+++	hochgradig

Innerhalb der Endometrose sind alle bzw. der überwiegende Anteil (> 75%) der *Stromazellen* inaktiv differenziert und besitzen spindelförmige, schmale, hyperchromatische Zellkerne sowie ein langgestrecktes Zytoplasma. Sie sind in mindestens zwei (geringgradige Endometrose) bis maximal neun (hochgradige Endometrose) periglandulären Schichten angeordnet, wobei die Achse der Stromazellen parallel zur Achse der benachbarten Drüsenepithelien ausgerichtet ist und so ein „zwiebelschalenartiges“ Erscheinungsbild bedingt (Abb. 9.3, S. 149). Eine aktive Differenzierung

kann häufig bei einzelnen, nicht parallel angeordneten Stromazellen (< 25%) der äußeren periglandulären Schichten bzw. innerhalb eines Drüsennestes nachgewiesen werden. Während lediglich Einzeldrüsen bei der geringgradigen Endometrose von der Endometrose betroffen sind, ist eine gleichmäßige Beteiligung von Einzeldrüsen und Drüsennestern (7/10) bzw. ein ausschließliches Auftreten von Drüsennestern (3/10) bei hochgradigen Endometrosen zu beobachten.

In 77% (102/133) der untersuchten fibrotischen Herde zeigen die betroffenen **Drüsenepithelien** ein zyklusasynchrones Erscheinungsbild, welches sich einerseits in Form einer vom Zyklusstand abweichenden Differenzierung (39%), andererseits in einer irregulären Differenzierung (58%) äußert. In drei Fällen (3%) ist eine glandulär zystische Dilatation zu beobachten.

Histochemische Untersuchung

Ein geringgradiger Nachweis von **Proteoglykanen** in der periglandulären ECM erfolgt mittels der Alcianblau-Färbung bei vier von 12 untersuchten Biopsien. Das Färbeverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten und enzymatischer Verdauung entspricht den im Kap 4.3.1 (S. 48ff) beschriebenen Charakteristika, so dass auch hier von einem überwiegenden Vorliegen **sulfatierter Mukopolysaccharide**, zum Teil bestehend aus **Chondroitinsulfat A,C**, ausgegangen werden kann.

Immunhistologische Untersuchung

Stromazellen und Extrazellulärmatrix der Endometrose:

Die **Hormonrezeptor-** sowie die **Vimentin-, Desmin** und **α -GMA-Expression** der inaktiv differenzierten Stromazellen entspricht den Befunden der aktiven Endometrose (Kap. 4.3.1., S. 48ff)

Eine **Ki-67-Antigenexpression** kann nicht nachgewiesen werden. Die Proliferationsaktivität der „fibrotischen“ Stromazellen ist damit in einem Teil der untersuchten Biopsien (9/20) im Vergleich zu den umliegenden, unveränderten Stromazellen geringgradig vermindert.

Eine schwache intrazelluläre **Lamininexpression** tritt bei sechs Stuten in den periglandulären Stromazellen auf.

Eine **Fibronektinexpression** ist in der fibrotischen ECM bei etwas weniger als der Hälfte der untersuchten Biopsien (5/12) mit einem stark variablen Erscheinungsbild (20-90%) zu beobachten.

Das bei der inaktiven Endometrose auftretende immunhistologische Expressionsmuster der periglandulären Fibrose wird in den Tab. 4.11 (S. 54) und 4.12 (S. 55) detailliert dargestellt.

Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Areale:

Eine der aktiven Endometrose entsprechende Variabilität der epithelialen **ER-Expression** (IRS-ER = 0,1-5,6) tritt auch bei den einzelnen fibrotischen Herden innerhalb der inaktiven Endometrose auf. Im Gegensatz zu den Befunden bei der aktiven Endometrose ist hier jedoch, neben einer den

unveränderten Epithelien entsprechenden Hormonrezeptor-Konzentration (6/20), eine Abnahme (11/20) der glandulären ER-Konzentration zu beobachten.

Übereinstimmend mit den Befunden bei der aktiven Endometrose ist eine insgesamt sehr schwache, nicht mit der ER-Expression korrelierende epitheliale **PR-Konzentration** (IRS-PR = 0,0-2,5) zu beobachten. Sie entspricht damit in vielen Fällen (12/20) den umliegenden unveränderten Epithelien bzw. weist eine geringfügig verminderte Expression (7/20) auf.

Eine **Ki-67-Antigenexpression** der Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Herde ist in den meisten Biopsien nicht (8/20) bzw. nur schwach nachweisbar und gleicht so, mit geringfügigen Unterschieden, der Proliferationsaktivität der umliegenden unveränderten Epithelien.

In fast allen untersuchten Biopsien (19/20) tritt eine variable epitheliale **Vimentinexpression** auf, deren intrazytoplasmatisches Reaktionsmuster den Befunden der aktiven Endometrose entspricht (vgl. Kap. 4.3.1, S. 48ff)

Die Basallamina der Drüsenepithelien ist innerhalb der fibrotischen Herde teils schwach, teils verdickt und weist in den meisten Fällen (17/20) multifokal eine insgesamt gering- bis mittelgradige Schädigung auf.

Die Tab. 4.11 und Tab. 4.12 (s. S. 55) geben einen Überblick über das immunhistologische Expressionsverhalten der endometrialen Strukturen im Rahmen der inaktiven Endometrose.

Insgesamt stehen die beschriebenen Veränderungen innerhalb der inaktiv differenzierten fibrotischen Herde in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit dem Endometroseggrad. Einzeldrüsen und Drüsennester zeigen ein weitgehend übereinstimmendes histochemisches und immunhistologisches Reaktionsmuster.

Tab. 4.11: ER-, PR- und Ki-67-Antigen-Expression innerhalb inaktiver Endometrosen im Vergleich zu den unveränderten endometrialen Strukturen

	Stromazellen und ECM der Endometrose					Drüsenepithelien innerhalb der Fibrose				
	ER		PR		Ki-67-Antigen	ER		PR		Ki-67-Antigen
	Biops.	ØIRS	Biops.	ØIRS	Biops.	Biops.	ØIRS	Biops.	ØIRS	Biops.
>	n=0	0,0	n=0	0,0	n=0	3	0,7	1	0,4	n=0
=	n=0	0,0	n=0	0,0	11	6	0,0	12	0,0	n=20
<	20	4,0	20	3,2	9	11	1,6	7	0,8	n=0

Legende zu Tab.4.11:

>	erhöht im Vergleich zum unveränderten Gewebe	Biops.	Anzahl der Biopsien
=	entsprechend dem unveränderten Gewebe	ECM	Extrazellulärmatix
<	vermindert im Vergleich zum unveränderten Gewebe	ER	Östrogenrezeptor
Ø	mittlerer IRS der Abweichung vom unveränderten Gewebe	PR	Progesteronrezeptor

Zusammenfassung:

Die inaktive Fibrose zeigt eine zwiebelschalenartige Anordnung der **Stromazellen**, die im Vergleich

zum umliegenden Stroma eine verminderte ER-, PR- und Ki-67-Antigen-Expression aufweisen. Das Zytoskelett ist durch eine hochgradige Vimentin-, eine gering- bis mittelgradige α -GMA- und eine stark variable Desminexpression charakterisiert. Intrazelluläres Laminin ist teilweise schwach nachweisbar. In der *ECM* tritt zum Teil eine geringgradige Akkumulation von Proteoglykanen und eine gering- bis mittelgradige Ablagerung von Fibronectin auf. Die betroffenen *Uterindrüsen* sind häufig durch eine im Vergleich zum unveränderten Epithel verringerte Hormonrezeptorexpression sowie durch eine gering- bis mittelgradige Schädigung der Basallamina und durch eine geringgradige Vimentinexpression gekennzeichnet.

Tab. 4.12: Expressionsmuster der Zytoskelettanteile sowie des Laminins und Fibronectins innerhalb der inaktiven Endometrose

	Stromazellen und Extrazellulärmatrix					gland. Ep.	BM ¹
	Vimentin n=20	Desmin n=20	α -GMA n=20	Laminin n=20	Fibronectin n=12	Vimentin n=20	Laminin n=20
--	--	n=4	--	n=14	n=7	n=1	n=3
(+)	n=1	n=8	n=2	n=6	--	n=11	--
+	--	n=2	n=1	--	--	n=3	n=9
+(+)	n=1	n=3	n=4	--	n=1	n=4	--
++	--	n=2	n=5	--	--	--	n=8
++(+)	n=3	n=1	n=6	--	n=2	n=1	--
+++	n=15	--	n=2	--	n=2	--	--
∅	+++	+(+)	+(+)	(+)	+(+)	+	+(+)

Legende zu Tab.4.12:

SI	Färbeintensität	(+)	≤ 10% der Zellen positiv
gland. Ep.	glanduläres Epithel	+	10-20% der Zellen positiv
BM	Basalmembran	+(+)	20-40% der Zellen positiv
1	Grad der Diskontinuität	++	40-50% der Zellen positiv
--	keine positiven Zellen	++(+)	50-80% der Zellen positiv
∅	mittleres Expressionsmuster	+++	80-100% der Zellen positiv

4.3.3 Aktive destruierende Endometrose

Allgemeine Histologie

In dieser Gruppe kann in fünf Biopsien eine proliferative, in acht Biopsien eine sekretorische und in sieben Biopsien eine irreguläre, teils ungleichmäßige glanduläre endometriale Differenzierung beobachtet werden. Neben der Endometrose tritt bei neun Stuten zusätzlich eine nichteitrige und bei 5 Stuten eine eitrig-Endometritis auf, bei vier Stuten ist eine Perivaskulitis zu beobachten. Zudem ist bei zehn Stuten eine Angiosklerose nachweisbar. In Tab. 4.12 (S. 56) werden die erhobenen Befunde zusammenfassend dargestellt.

Die *Stromazellen* innerhalb der fibrotischen Herde weisen, im Gegensatz zu der aktiven Endometrose, alle eine aktive Differenzierung auf und entsprechen damit den in Kap. 4.3.1 (S. 48f)

beschriebenen morphologischen Charakteristika. Zudem sind sie invasiv, d.h., sie dringen in das Epithel ein und richten sich zum Lumen der Drüsen hin aus. Dieses Verhalten bedingt eine fortschreitende Destruktion der Drüsenepithelien (Abb. 9.5/A+B, S. 151). Die Stromazellen liegen in mindestens zwei (geringgradige Endometrose) bis maximal zehn (hochgradige Endometrose) ungeordneten periglandulären Schichten. Während bei geringgradigen Endometrosen vorwiegend Einzeldrüsen (8/10) in den fibrotischen Prozess involviert sind, zeigen fünf Stuten mit hochgradiger Endometrose eine gleichmäßige Beteiligung von Einzeldrüsen und Drüsennestern innerhalb der Biopsie. Fünf Stuten weisen im Rahmen hochgradiger Endometrosen vorwiegend Drüsennester auf.

Tab.4.13: Histopathologische Untersuchungsbefunde innerhalb der Biopsien mit einer aktiven destruierenden Endometrose

	glanduläre Funktionsmorphologie				Endometritis			Angiosklerose			Perivaskulitis		
	ProL.	Sek.	Irr.	Ina.	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
+ EM	3	4	3	0	5	1	--	3	--	1	2	1	--
+++ EM	2	4	4	0	4	3	1	--	3	3	--	1	--

Legende zu Tab.4.13:

EM	Endometrose	Ina	Inaktiv	+	geringgradig
ProL.	Proliferation	Irr	Irregulär/ungleichmäßig	++	mittelgradig
Sek.	Sekretion	--	ohne besonderen Befund	+++	hochgradig

Die von der Fibrose betroffenen *Drüsenepithelien* zeigen unterschiedlich stark ausgeprägte Degenerationserscheinungen, die in Form einer vakuolären Degeneration bis hin zur vollständigen Destruktion der epithelialen Anteile auftreten kann (Abb. 9.5/A+B, S. 151). Bedingt durch die fokale „Invasion“ einzelner Stromazellen sind bei der „fokalen Destruktion“ lediglich einzelne, diesen Stromazellen benachbart liegende Epithelien eines Drüsenquerschnittes betroffen. Die durch die „Invasion“ zahlreicher periglandulärer Stromazellen bedingte „vollständige Destruktion“ bezieht hingegen alle Epithelien eines Drüsenquerschnittes mit ein und ist in 82% (104/127) der untersuchten fibrotischen Herde dieser Gruppe zu beobachten.

Histochemische Untersuchung

Ein mittel- bis hochgradiger Nachweis von *Proteoglykanen* in der periglandulären ECM (Abb. 9.12, S. 153) erfolgt mittels der Alcianblau-Färbung bei allen untersuchten Biopsien. Dabei können bei hochgradigen Endometrosen deutlich mehr Proteoglykane festgestellt werden als in geringgradigen. Das Färbeverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten und enzymatischer Verdauung entspricht den im Kap 4.3.1 (S. 48ff) beschriebenen Charakteristika, so dass ebenfalls von einem überwiegenden Vorliegen *sulfatierter Mukopolysaccharide*, zum Teil bestehend aus *Chondroitinsulfat A,C*, ausgegangen werden kann.

Immunhistologische Untersuchung

Stromazellen und Extrazellulärmatrrix der Endometrose:

Die **Hormonrezeptor-, Ki-67-Antigen-** und die **Vimentinexpression** der Stromazellen der aktiven destruierenden Endometrose entspricht weitgehend den Befunden der aktiven Endometrose (Kap. 4.3.1, S. 48ff)

Während bei 15 Stuten eine stark variable (5-90%) intrazytoplasmatisch diffuse **Desminexpression** auftritt, kann bei fast allen Stuten eine vorwiegend mittel- bis hochgradige intrazytoplasmatisch diffuse **α -GMA-Expression** (Abb. 9.9, S. 153) beobachtet werden.

Zudem weisen nahezu alle Biopsien (18/20) in den periglandulären Stromazellen eine mehrheitlich gering- bis mittelgradige **Lamininexpression** auf (Abb. 9.10/B, S. 153).

Eine vorwiegend hochgradige extrazelluläre Expression von **Fibronektin** (Abb. 9.11, S. 153) ist in fast allen Biopsien zu beobachten.

Eine Übersicht über die immunhistologischen Befunde der Stromazellen und der ECM der periglandulären Fibrose geben die Tab. 4.14 (S. 58) und 4.15 (S. 58).

Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Areale:

Die epitheliale **ER-Expression** zeigt zwischen den einzelnen fibrotischen Herden innerhalb einer Biopsie eine nur geringe Variabilität (IRS = 0,0-3,1). Insgesamt tritt jedoch, im Vergleich zum umliegenden unveränderten Epithel, bei den meisten Biopsien (16/20) eine mittelgradige Reduktion der Hormonrezeptor-Konzentration auf. Eine dem unveränderten Endometrium entsprechende Hormonrezeptor-Expression ist lediglich in drei Biopsien zu beobachten.

Die insgesamt sehr schwach ausgeprägte epitheliale **PR-Konzentration** (IRS-PR = 0,0-0,8) zeigt entweder ein den umliegenden, unveränderten Epithelien entsprechendes immunhistologisches Expressionsmuster (9/20) oder weist eine geringgradige Reduktion (11/20) der Hormonrezeptor-Konzentration auf.

Eine **Ki-67-Antigenexpression** ist nicht (11/20) bzw. nur schwach (9/20) nachweisbar. Die Proliferationsaktivität der Drüsenepithelien ist damit in einem Teil der untersuchten Biopsien, (8/20) im Vergleich zu den unveränderten Stromazellen, geringgradig vermindert.

In allen fibrotischen Herden ist eine vorwiegend mittel- bis hochgradige epitheliale **Vimentin-expression** zu beobachten. Dabei tritt neben der basalen (70%) auch eine etwas deutlichere perinukleäre (20%) und diffuse (10%) intrazytoplasmatische Verteilung auf (Abb. 9.8, S. 153).

Eine **Lamininexpression** ist entweder nicht nachweisbar oder zeigt ein stark verwaschenes Erscheinungsbild. Die Basalmembran weist zudem, in allen fibrotischen Herden, multifokal eine vorwiegend mittel- bis hochgradige Schädigung (Abb. 9.10/B, S. 153) auf.

Eine Übersicht über das immunhistologische Expressionsverhalten der in die aktive destruierenden Endometrose involvierten Drüsenepithelien geben die Tab. 4.14 und 4.15.

Tab. 4.14: ER-, PR- und Ki-67-Antigen-Expression innerhalb aktiver destruierender Endometrosen im Vergleich zu den unveränderten endometrialen Strukturen

	Stromazellen und ECM der Endometrose					Drüsenepithelien innerhalb der Fibrose				
	ER Biops. ØIRS		PR Biops. ØIRS		Ki-67-Antigen Biops.	ER Biops. ØIRS		PR Biops. ØIRS		Ki-67-Antigen Biops.
>	n=0	0,0	n=0	0,0	n=0	n=1	0,7	n=0	0,0	n=0
=	n=0	0,0	n=0	0,0	n=20	n=3	0,0	n=9	0,0	n=12
<	n=20	4,7	n=20	3,7	n=0	n=16	2,2	n=11	0,7	n=8

Legende zu Tab.4.?:

>	erhöht im Vergleich zum unveränderten Gewebe	Biops.	Anzahl der Biopsien
=	entsprechend dem unveränderten Gewebe	ECM	Extrazellulärmatrrix
<	vermindert im Vergleich zum unveränderten Gewebe	ER	Östrogenrezeptor
Ø	mittlerer Wert der Abweichung vom unveränderten Gewebe	PR	Progesteronrezeptor

Insgesamt zeigen die beschriebenen Veränderungen innerhalb der aktiven destruierenden Herde keinen unmittelbaren Zusammenhang mit dem Endometrosegrad. Einzeldrüsen und Drüsennester weisen ein weitgehend übereinstimmendes histochemisches und immunhistologisches Reaktionsmuster auf.

Tab. 4.15: Expressionsmuster der Zytoskelettanteile sowie des Laminins und Fibronektins innerhalb der aktiven destruierenden Endometrose

SI	Stromazellen und Extrazellulärmatrrix					gland. Ep.	BM ¹
	Vimentin n=20	Desmin n=20	α -GMA n=20	Laminin n=20	Fibronektin n=12	Vimentin n=20	Laminin n=20
--	--	n=5	n=1	n=2	n=1	--	--
(+)	--	n=2	--	n=2	--	--	--
+	--	n=1	--	n=9	--	n=1	n=1
+(+)	n=1	n=8	n=2	n=3	n=2	n=5	--
++	--	n=2	--	n=4	n=1	--	n=8
++(+)	n=4	n=1	n=12	--	n=4	n=7	--
+++	n=15	n=1	n=5	--	n=4	n=7	n=11
Ø	+++	+(+)	++(+)	+	++(+)	++(+)	++(+)

Legende zu Tab.4.15:

SI	Färbeintensität	(+)	≤ 10% der Zellen positiv
gland. Ep.	glanduläres Epithel	+	10-20% der Zellen positiv
BM	Basalmembran	++	20-40% der Zellen positiv
¹	Grad der Diskontinuität	+++	40-50% der Zellen positiv
--	keine positiven Zellen	++(+)	50-80% der Zellen positiv
Ø	mittleres Expressionsmuster	+++	80-100% der Zellen positiv

Zusammenfassung:

Die aktive destruierende Fibrose zeigt eine ungeordnete periglanduläre Schichtung der **Stromazellen**, die zum Teil in das Drüsenepithel eindringen und damit die Destruktion der betroffenen Uterindrüsen bedingen. Im Vergleich zum umliegenden Stroma tritt eine verminderte ER- und PR-Expression auf, die Proliferationsaktivität hingegen ist unverändert. Das Zytoskelett ist durch eine hochgradige Vimentinexpression, eine mittel- bis hochgradige α -GMA- und eine stark variable Desminexpression gekennzeichnet. Intrazelluläres Laminin ist geringgradig in nahezu allen fibrotischen Herden zu beobachten. In der fibrotischen **ECM** ist eine mittel- bis hochgradige Akkumulation von Proteoglykanen und Fibronectin nachweisbar. Die betroffenen **Uterindrüsen** zeigen meist eine im Vergleich zum unveränderten Epithel verringerte Hormonrezeptorexpression sowie eine mittel- bis hochgradige Diskontinuität der Basallamina und eine mittel- bis hochgradige Vimentinexpression.

4.3.4 Inaktive destruierende Endometrose*Allgemeine Histologie*

Während sechs Stuten eine proliferative endometriale Differenzierung aufweisen, zeigen fünf Stuten eine sekretorische, sechs Stuten eine irreguläre und drei Stuten eine inaktive endometriale Funktionsmorphologie. Neben der Endometrose kann in 11 Biopsien eine nichteitrigte sowie in einer Biopsie eine eitrigte Endometritis nachgewiesen werden. Eine Perivaskulitis tritt bei zwei Stuten auf, eine Angiosklerose ist bei 15 Stuten nachweisbar. Einen Überblick über die erhobenen histopathologischen Befunde gibt Tab. 4.16

Tab.4.16: Histopathologische Untersuchungsbefunde innerhalb der Biopsien mit einer inaktiven destruierenden Endometrose

	glanduläre Funktionsmorphologie				Endometritis			Angiosklerose			Perivaskulitis		
	ProL.	Sek.	Irr.	Ina.	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
+ EM	2	2	3	3	6	--	--	4	3	--	1	--	--
+++ EM	4	3	3	0	3	3	--	4	2	2	1	--	--

Legende zu Tab.4.16:

EM	Endometrose	Ina	Inaktiv	+	geringgradig
ProL.	Proliferation	Irr	Irregulär	++	mittelgradig
Sek.	Sekretion	--	ohne besonderen Befund	+++	hochgradig

Innerhalb der Endometrose sind alle bzw. der überwiegende Anteil (> 75%) der **Stromazellen** inaktiv differenziert und entsprechen damit den in Kap. 4.3.2 (S. 52f) beschriebenen morphologischen Charakteristika. Im Gegensatz zu dem „invasiven“ Verhalten der Stromazellen in aktiven destruierenden Endometrosen (vgl. Kap 4.3.3, S. 55f) liegen die Stromazellen dieser Gruppe mit ihrer Achse parallel zu der der Drüsenepithelien (Abb. 9.4, S. 149) und bilden

fibrotische Herde mit mindestens zwei (geringgradige Endometrose) bis maximal 14 (hochgradige Endometrose) Schichten. Während bei der geringgradigen Endometrose ausschließlich Einzeldrüsen von der periglandulären Fibrose betroffen sind, treten bei hochgradigen Endometrosen neben diesem Erscheinungsbild (1/10) sowohl Einzeldrüsen und Drüsennester (6/10) als auch ausschließlich Drüsennester auf (3/10).

Trotz der fehlenden „Invasivität“ der Stromazellen weisen die betroffenen **Drüsenepithelien** dieser Gruppe ebenfalls unterschiedlich stark ausgeprägte Destruktionserscheinungen auf. Der Anteil „fokaler Destruktionen“ (Abb. 9.4, S. 149) ist dabei mit 31% (38/122) der untersuchten fibrotischen Herde nahezu doppelt so hoch wie bei der aktiven destruierenden Endometrose. Konfluierende Läsionen führen letztendlich zu einer „vollständigen Destruktion“ des Drüsenquerschnittes.

Histochemische Untersuchung

Ein geringgradiger Nachweis von **Proteoglykanen** in der ECM der Fibrose erfolgt mittels der Alcianblau-Färbung bei vier von 12 untersuchten Biopsien. Das Färbeverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten und enzymatischer Verdauung entspricht den im Kap 4.3.1 (S. 48f) beschriebenen Charakteristika, so dass auch hier von einem überwiegenden Vorliegen **sulfatierter Mukopolysaccharide**, zum Teil bestehend aus **Chondroitinsulfat**, ausgegangen werden kann.

Immunhistologische Untersuchung

Stromazellen und Extrazellulärmatrix der Endometrose:

Die **Hormonrezeptor-** (Abb. 9.6, S. 151), **Ki-67-Antigen-, Vimentin- und Lamininexpression** der Stromazellen innerhalb inaktiver destruierender Endometrosen sowie das extrazelluläre Expressionsmuster des **Fibronektins** stimmen weitgehend mit den Befunden der inaktiv differenzierten Stromazellen überein (vgl. Kap. 4.3.2, S. 52ff).

Die stark variable (5-100%) intrazytoplasmatisch diffuse **Desminexpression** entspricht, ebenso wie die intrazytoplasmatisch diffuse **α -GMA-Expression**, weitgehend dem Expressionsmuster aktiver destruierender Endometrosen (vgl. Kap. 4.3.3, S. 55ff)

Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Areale:

Ebenso wie bei der aktiven destruierenden Endometrose zeigt sich zwischen den einzelnen fibrotischen Herden eine nur geringe Variabilität der **epithelialen ER-Expression** (IRS = 0,0-3,1). Dabei ist, im Vergleich mit den unveränderten Drüsenepithelien, in den meisten Fällen (11/20) eine nur geringgradige Abnahme der Hormonrezeptor-Konzentration zu beobachten, sieben Biopsien zeigen eine dem unveränderten Endometrium entsprechende ER-Expression.

Die insgesamt sehr schwache epitheliale **PR-Konzentration** (IRS-PR = 0,0-0,9) zeigt ein den umliegenden unveränderten Epithelien entsprechendes Bild (10/20) bzw. weist eine nur geringfügig verminderte (9/20) Hormonrezeptor-Konzentration auf.

Eine epitheliale **Proliferationsaktivität** ist nicht (9/20), nur schwach (9/20) bzw. geringgradig (2/20) nachweisbar und entspricht damit, bis auf geringfügige Unterschiede, dem umliegenden unveränderten Epithel.

Eine variable (8-93%), vorwiegend jedoch mittel- bis hochgradige epitheliale **Vimentinexpression** ist in nahezu allen untersuchten Biopsien zu beobachten. Dabei tritt, ähnlich wie bei der aktiven destruierenden Endometrose, neben einem basalen (61%) auch ein perinukleäres (24%) und ein diffuses (15%) intrazytoplasmatische Reaktionsmuster auf.

Die **Lamininexpression** entspricht weitgehend den Befunden der aktiven destruierenden Endometrose (vgl. Kap. 4.3.3, S. 55ff)

Die Tab. 4.17 und Tab. 4.18 (s. S. 62) geben einen Überblick über das immunhistologische Expressionsmuster der Drüsenepithelien innerhalb der Endometrose.

Insgesamt stehen die beschriebenen Veränderungen innerhalb der inaktiven destruierenden Herde in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit dem Endometrosegrad. Einzeldrüsen und Drüsennester zeigen ein weitgehend übereinstimmendes histochemisches und immunhistologisches Reaktionsmuster.

Tab. 4.17: ER-, PR- und Ki-67-Antigen-Expression innerhalb inaktiver destruierender Endometrosen im Vergleich zu den unveränderten endometrialen Strukturen

	Stromazellen und ECM der Endometrose					Drüsenepithelien innerhalb der Fibrose				
	ER		PR		Ki-67-Antigen	ER		PR		Ki-67-Antigen
	Biops.	ØIRS	Biops.	ØIRS	Biops.	Biops.	ØIRS	Biops.	ØIRS	Biops.
>	n=0	0,0	n=0	0,0	n=0	n=2	1,0	n=1	0,5	n=0
=	n=0	0,0	n=0	0,0	n=11	n=7	0,0	n=10	0,0	n=20
<	n=20	4,8	n=20	4,1	n=9	n=11	1,7	n=9	0,7	n=0

Legende zu Tab.4.17:

>	erhöht im Vergleich zum unveränderten Gewebe	Biops.	Anzahl der Biopsien
=	entsprechend dem unveränderten Gewebe	ECM	Extrazellulärmatrix
<	vermindert im Vergleich zum unveränderten Gewebe	ER	Östrogenrezeptor
Ø	mittlerer IRS der Abweichung vom unveränderten Gewebe	PR	Progesteronrezeptor

Zusammenfassung:

Die inaktive destruierende Fibrose ist durch eine zwiebelschalenartige Anordnung der beteiligten **Stromazellen** und durch die multifokalen Destruktionserscheinungen der betroffenen Drüsen charakterisiert. Im Vergleich zum umliegenden Stroma zeigen die Stromazellen der Fibrose eine verminderte ER-, PR- und Ki-67-Antigen-Expression. Das Zytoskelett ist durch eine hochgradige Vimentinexpression, eine mittelgradige α -GMA- und eine stark variable Desminexpression gekennzeichnet. Eine schwache intrazelluläre Lamininexpression ist selten zu beobachten. In der **ECM** tritt eine geringgradige Akkumulation von Proteoglykanen und eine gering- bis mittelgradige

Ablagerung von Fibronectin auf. Die betroffenen *Uterindrüsen* zeigen meist eine im Vergleich zum unveränderten Epithel verringerte Hormonrezeptorexpression sowie eine mittelgradige Diskontinuität der Basallamina und eine mittel- bis hochgradige Vimentinexpression.

Tab. 4.18: Expressionsmuster der Zytoskelettanteile sowie des Laminins und Fibronectins innerhalb der inaktiven destruierenden Endometrose

SI	Stromazellen und Extrazellulärmatrix					gland. Ep.	BM ¹
	Vimentin n=20	Desmin n=20	α -SMA n=20	Laminin n=20	Fibronectin n=12	Vimentin n=20	Laminin n=20
--	--	n=5	--	n=14	n=5	n=1	--
(+)	--	n=6	n=1	n=4	n=1	n=1	--
+	n=1	n=2	n=4	n=2	n=1	--	n=3
++	n=1	n=2	n=4	--	n=2	n=4	--
+++	n=1	n=1	n=1	--	--	n=4	n=9
++(+)	n=4	n=4	n=8	--	n=1	n=8	--
+++	n=13	--	n=2	--	n=2	n=2	n=8
∅	+++	++(+)	++	(+)	++(+)	+++	++

Legende zu Tab. 4.18:

SI	Färbeintensität	(+)	≤ 10% der Zellen positiv
gland. Ep.	glanduläres Epithel	+	10-20% der Zellen positiv
BM	Basalmembran	++	20-40% der Zellen positiv
1	Grad der Diskontinuität	+++	40-50% der Zellen positiv
--	keine positiven Zellen	+++	50-80% der Zellen positiv
∅	mittleres Expressionsmuster	+++	80-100% der Zellen positiv

4.3.5 Vergleichende, gruppenspezifische Zusammenfassung der histopathologischen Befunde und statistische Auswertung der erhobenen Daten

In allen fibrotischen Herden, Einzeldrüsen wie auch Drüsennestern, kann, unabhängig von Grad der Endometrose, eine *stromale Fehldifferenzierung* nachgewiesen werden. Diese ist bei allen fibrotischen Herden mit einer, im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Stromazellen, statistisch signifikant ($p=0,001$) verminderten ER- und PR-Expression der periglandulären Stromazellen vergesellschaftet. Die Proliferationsaktivität hingegen ist bei inaktiv differenzierten Stromazellen im Vergleich zum unveränderten Stroma geringgradig vermindert, während die aktiv differenzierten Stromazellen ein dem unveränderten Endometrium entsprechendes Expressionsverhalten zeigen. Eine teils stark variable Koexpression der Intermediärfilamente Vimentin und Desmin sowie des Mikrofilaments α -GMA ist in allen Erscheinungsformen der Endometrose zu beobachten, wobei in destruierenden Endometrosen, und dabei v.a. in aktiven destruierenden Endometrosen ($p=0,04$), tendenziell mehr Stromazellen α -GMA exprimieren. Letztere zeigen zudem eine geringfügig stärkere Lamininexpression als die anderen Erscheinungsbilder der Endometrose.

In der *Extrazellulärmatrix* destruierender Endometrosen sind, beeinflusst durch die Aktivität ($p=0,001$) und den Grad der Endometrose ($p=0,004$) signifikant mehr Proteoglykane ($p=0,005$) nachweisbar. Darüber hinaus wird in aktiven destruierenden Endometrosen tendenziell ($p=0,065$) mehr Fibronectin in der ECM exprimiert als in den anderen Erscheinungsformen der Erkrankung.

Tab.4.19: Vergleichende Zusammenfassung der zu den verschiedenen Endometroseformen erhobenen histochemischen und immunhistologischen Befunde

endometriale Strukturen	Parameter	nicht destruierende Endometrose		destruierende Endometrose	
		aktive Endometrose	inaktive Endometrose	aktive Endometrose	inaktive Endometrose
Stromazellen der Fibrose	ER ¹	▼▼**	▼▼**	▼▼**	▼▼**
	PR ¹	▼(▼)**	▼(▼)**	▼▼**	▼(▼)**
	Ki-67-Antigen ¹	=	▼	=	(▼)
	Vimentin	+++	+++	+++	+++
	Desmin	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)
	α-GMA	+(+)	+(+)	++(+)*	++*
	Laminin	(+)	(+)	+	(+)
Extrazellulärmatrix	Fibronectin	+	+(+)	++(+)**	+(+)
	Proteoglykane	+	+	++(+)**	+
Basallamina ²	Laminin	+	+	++(+)	++
Drüsenepithelien	ER ¹	▲	▼	▼▼**	▼▼**
	PR ¹	(▲)	(▼)	▼(▼)*	(▼)*
	Ki-67-Antigen ¹	^	^	▼	^
	Vimentin	+	+	++(+)**	++(+)**

Legende zu Tab. 4.19:

ER	Östrogen-Rezeptor	▼	geringgradig vermindert
PR	Progesteron-Rezeptor	▼(▼)	gering- bis mittelgradig vermindert
¹	im Vergleich zu unverändertem Gewebe	▼▼	mittelgradig vermindert
²	Grad der Diskontinuität	(+)	≤ 10% der Zellen positiv
*	statistisch auffällig	+	10-20% der Zellen positiv
**	statistisch signifikant	+(+)	20-40% der Zellen positiv
=	entsprechend	++	40-50% der Zellen positiv
(▲)	schwach erhöht	++(+)	50-80% der Zellen positiv
▲	geringgradig erhöht	+++	80-100% der Zellen positiv
(▼)	schwach vermindert		

Die *epitheliale Fehldifferenzierung* innerhalb der fibrotischen Areale äußert sich in einem, im Vergleich zu den unveränderten Drüsenepithelien des Endometriums, variierenden Expressionsverhalten der Steroidhormonrezeptoren. Während die glandulären Epithelien innerhalb aktiver Endometrosen neben einer dem unveränderten Epithel entsprechenden Hormonrezeptorexpression vorwiegend eine Zunahme der Hormonrezeptor-Konzentration zeigen, weisen Drüsenepithelien innerhalb inaktiver Fibrosen eher eine Verringerung der Hormonrezeptorkonzentration auf. Dieses Erscheinungsbild trifft v.a. für die ER-Expression, in

geringeren Ausmaß auch auf die insgesamt sehr schwache PR-Expression, zu. Bei destruierenden Endometrosen kann eine statistisch signifikant verminderte ($p=0,001$), durch die Aktivität der Fibrose modulierte ($p=0,001$), ER-Konzentration bzw. eine statistisch auffällige Abnahme ($p=0,0062$) der PR-Konzentration nachgewiesen werden. Die Proliferationsaktivität der Drüsenepithelien ist lediglich bei aktiven destruierten Endometrosen geringfügig vermindert. Darüber hinaus kann, unabhängig vom Aktivitätszustand der periglandulären Fibrose, jedoch signifikant erhöht bei destruierten Endometrosen ($p=0,001$), eine epitheliale Expression des „mesenchymalen“ Intermediärfilamentes Vimentin beobachtet werden. Zudem sind destruierte Endometrosen mit deutlich umfangreicheren Diskontinuitäten der epithelialen Basallamina vergesellschaftet.

Die Tab. 4.19 (S. 63) gibt eine vergleichende Zusammenfassung der zu den verschiedenen Endometroseformen erhobenen histochemischen und immunhistologischen Befunde.

4.4 Endokrinologische Ergebnisse und immunhistologische Steroidhormonrezeptor-Analyse der Zyklusstuten (Kontrollstuten ohne Endometrose)

Die ermittelten Serumhormonwerte der in Tab. 9.3 (s. Anhang, S. 138) aufgeführten Kontrollstuten (grau hinterlegt) entsprechen, mit geringgradigen individuellen Unterschieden, (Tab. 4.20) den für die Stute definierten, zyklusbedingten Variationen.

Die bei der Untersuchung des Zyklusverlauf mittels konventioneller Histologie und Immunhistologie erhobenen Befunde stimmen mit denen von ÖZGEN (1999), HÄFNER (1999) und AUPPERLE et al. (2000) überein (vgl. Kap. 2.2.3.1, S. 7f)

Tab. 4.20: Serumhormonwerte der Kontrollstuten im Verlauf des Zyklus

Zyklustag	Stute 8		Stute 9		Stute 10	
	E (pg/ml)	P (ng/ml)	E (pg/ml)	P (ng/ml)	E (pg/ml)	P (ng/ml)
Ovulation	23,3	0,52	3,1	0,02	0,9	0,11
5	17,3	7,5	4,0	1,6	2,5	3,6
10	16,8	0,67	3,0	2,6	4,6	3,5
13	14,1	0,52	3,6	0,58	10,4	0,24
16	18,1	0,47	7,0	0,05	9,5	0,18
19	29,3	0,26	2,4	0,06	0,9	0,33
21	19,5	0,27	1,2	1,5	--	--

Legende zu Tab. 4.20: E Serumöstrogen-Konzentration -- keine Daten vorhanden
P Serumprogesteron-Konzentration

4.5 Immunhistologische und histochemische Untersuchungen der endometrial synthetisierten Proteine und des Glykogens im Verlauf des Zyklus

Es wurden die im Verlauf des Zyklus entnommenen Endometriumbiopsien der drei Kontrollstuten (s. Anhang, Tab. 9.3, S. 138) verwendet. An allen Biopsien erfolgte ein immunhistologischer Nachweis der Proteine Uteroglobulin, Uteroferrin, Calbindin_{D9k} und Uterokalin. Das Glykogen konnte mittels der PAS-Reaktion mit und ohne enzymatische Vorbehandlung (siehe Kap. 3.2.3, S. 37f) dargestellt werden.

Sowohl die Färbeintensität der endometrialen Proteine und des Glykogens als auch der Prozentsatz und die Lokalisation der positiv reagierenden Zellen zeigen im Zyklusverlauf ein typisches Reaktionsmuster. Die Ergebnisse werden im folgenden, soweit möglich, allgemeingültig beschrieben und lediglich die deutlichen individuellen Unterschiede zwischen den Kontrollstuten herausgestellt. Dabei werden zunächst die zyklusabhängigen Veränderungen in der Expression der jeweiligen Proteine bzw. des Glykogens dargestellt, die sich für jeden untersuchten Zyklustag aus dem Mittelwert des Sekretions-Scores (SSc) apikaler, mittlerer und basaler Uterindrüsen ergibt. Auf die im Zyklusverlauf auftretenden Variationen zwischen den unterschiedlichen Drüsenarealen sowie auf das intrazelluläre/intraluminale Reaktionsmuster wird nachfolgend eingegangen.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Untersuchungsbefunde wird die in Tab. 4.21 dargestellte Einteilung des Zyklus verwendet.

Tab.4.21: Einteilung der untersuchten Zyklustage in die entsprechenden Zyklusphasen

Zyklustag	Zyklusphase	
21	Präöstrus	Proliferationsphase
0	Östrus	
5	früher Interöstrus	Sekretionsphase
10, 13	mittlerer Interöstrus	
16, 19	später Interöstrus	Involutionsphase

4.5.1 Uteroglobulin/Sekretoglobin

Das vereinzelt in den luminalen und deutlich in den glandulären Epithelien zu beobachtende Uteroglobulin kann während des gesamten Zyklus nachgewiesen werden. Dabei treten zwischen den untersuchten Stuten hinsichtlich der erreichten SSc-Werte und dem zeitlichen Auftreten der maximalen Expression zum Teil geringfügige Unterschiede auf.

Zyklusverlauf der Uteroglobulin-Expression:

Allen Stuten gemeinsam ist ein teils gering- (Stute 10), teils gering- bis mittelgradiger (Stute 8, 9) Peak der Uteroglobulinexpression im *mittleren und späten Interöstrus*, der mit der gleichzeitigen Abnahme der Serumprogesteron-Konzentration assoziiert ist. Die dabei auftretenden zeitlichen

Unterschiede zwischen den Stuten entsprechen dem individuellen Verlauf der Serumprogesteronwerte im Zyklus.

Ein zweiter, in seiner Ausprägung bei den einzelnen Stuten deutlich variablerer Anstieg der Uteroglobulin-Expression ist bei der Stute 9 im *Präöstrus* und *Östrus* und bei der Stute 10 im *Östrus* zu beobachten. Die Stute 8 hingegen weist zwischen Östrus und mittlerem Interöstrus eine insgesamt nur sehr geringfügige Veränderung des SSc auf.

In Tab. 4.22 sind die im Verlauf des Zyklus variierenden SSc- und Serumprogesteronwerte der einzelnen Stuten dargestellt.

Tab. 4.22: Zyklusabhängige Veränderung der Uteroglobulin-Expression (SSc) und der Serumprogesteronwerte (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	Stute 8		Stute 9		Stute 10	
		SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)
Ov.	Östrus	1,9	0,52	4,3	0,02	2,9	0,11
5	früher Interöstrus	2	7,5	2,5	1,6	1,6	3,6
10	mittlerer Interöstrus	2,5	0,67	1,3	2,6	1	3,5
13		2	0,52	2,7	0,58	1,4	0,24
16	später Interöstrus	0,5	0,47	2,7	0,05	1,5	0,18
19		0,9	0,26	1,3	0,06	1	0,33
21	Präöstrus	0,9	0,27	3,1	1,5	--	--

Legende zu Tab. 4.22: SSc Sekretions-Score Ov. Ovulation
P Serumprogesteron-Konzentration -- keine Daten vorhanden

Zyklusverlauf des epithelialen Reaktionsmusters:

Das luminale Epithel, die unterschiedlichen Anteile (apikal, mittel, basal) der glandulären Epithelien und das intrazytoplasmatische Expressionsmuster des Proteins zeigen bei allen Stuten ein weitgehend übereinstimmendes, mit dem Zyklusverlauf variierendes Reaktionsmuster. Innerhalb der Drüsenquerschnitte ist ein gleichmäßiges Erscheinungsbild zu beobachten.

Im *Östrus* und *frühen Interöstrus* exprimieren, neben den basalen Uterindrüsen, vorwiegend die in den mittleren Arealen des Stratum spongiosum gelegenen Drüsenepithelien das Protein mit einem deutlichen, diffus intrazytoplasmatischen Reaktionsmuster (Abb. 9.13/B, S. 155). Das luminale Epithel reagiert nur vereinzelt schwach positiv, die apikalen Epithelien weisen eine geringgradige Expressionsintensität auf. Zur Zeit der maximalen Expression im *mittleren* und *späten Interöstrus* ist in den basalen Uterindrüsen, im Vergleich zu den mittleren Drüsen, eine geringfügig stärkere, insgesamt bis mittelgradige Färbeintensität zu beobachten. Die apikalen Drüsenepithelien weisen zu diesem Zeitpunkt eine schwache bis fehlende Expression des Proteins auf. In allen glandulären Epithelien ist eine vorwiegend apikale intrazytoplasmatische Anfärbung nachweisbar (Abb. 9.13/A, S. 155). Erstmalig kann auch im Drüsenlumen positiv reagierendes Material beobachtet werden. Ab

dem *späten Interöstrus* (19. Tag p.ov.) ist das erneut diffus intrazytoplasmatisch auftretende Protein schwach bis geringgradig in allen Drüsenepithelien nachweisbar. Zur Zeit des *Präöstrus* verstärkt sich die Expression in den apikalen Uterindrüsen geringfügig und auch das luminales Epithel und die Drüsenausführungsgänge zeigen eine geringgradig positive Reaktion. Die Tab. 4.23 gibt einen Überblick über das Expressionsmuster des Uteroglobins im Verlauf des Zyklus.

Tab. 4.23: Zyklusabhängiges Expressionsmuster des Uteroglobins im luminalen Epithel, in den glandulären Epithelien und im Drüsenlumen (Kontrollstuten)

Zyklus-tag	Zyklus-phase	luminales Epithel	glanduläres Epithel	Drüsenlumen	intrazelluläres Reaktionsmuster	
Ov.	Östrus	vereinzelt positiv	vorwiegend mittlere Drüsen	--	vorwiegend diffus	
5	früher Int.			--		
10	mittlerer Int.		alle Drüsen-epithelien	positives Material		vorwiegend apikal
13						
16	später Int.					
19						
21	Präöstrus	ggr. positiv			vorwiegend diffus	

Legende zu Tab. 4.23:

Int. Interöstrus
ggr. geringgradig

Ov. Ovulation
-- keine positive Reaktion

4.5.2 Uteroferrin

Das Reaktionsmuster des vorwiegend in den glandulären Epithelien exprimierten Uteroferrins weist hinsichtlich der Färbeintensitäten und bei den im Verlauf des Zyklus auftretenden Variationen eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Kontrollstuten auf.

Zyklusverlauf der Uteroferrin-Expression:

Ein deutlicher Nachweis des Proteins gelingt ausschließlich im *mittleren*, bei der Stute 9 auch im *späten Interöstrus*, wobei eine gering- (Stute 9, 10) bzw. gering- bis mittelgradige (Stute 8) Uteroferrin-Expression beobachtet werden kann. Entsprechend dem Uteroglobin (vgl. Kap. 4.5.1, S. 65f) besteht eine Assoziation der maximalen Expression mit der gleichzeitigen Abnahme der Serumprogesteron-Konzentrationen. In allen anderen untersuchten Zyklusphasen ist das Protein nicht bzw. nur sehr schwach nachweisbar (siehe Tab. 4.24, S. 68).

Zyklusverlauf des epithelialen Reaktionsmusters:

Das luminales Epithel und die unterschiedlichen Anteile der glandulären Epithelien weisen ein mit dem Zyklusverlauf variierendes Erscheinungsbild auf, wobei innerhalb der Drüsenquerschnitte ein gleichmäßiges Expressionsmuster zu beobachten ist.

Das generell diffus intrazytoplasmatisch exprimierte Uteroferrin (Abb. 9.14, S. 155) kann im *Östrus*, *frühen* und *späten Interöstrus* sowie im *Präöstrus* schwach in den apikal gelegenen

Drüsenepithelien sowie vereinzelt im luminalen Epithel und in den Drüsenausführungsgängen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist, korrespondierend mit der stärksten Expression im *mittleren Interöstrus*, eine stark positive Reaktion (maximaler SSc 2,5) v.a. in den mittleren und basal gelegenen Drüsenepithelien zu beobachten und positiv reagierendes Material erstmalig im Drüsenlumen nachweisbar. Die apikalen Drüsen und das luminale Epithel zeigen keine Veränderung ihres Expressionsverhaltens (Tab. 4.25).

Tab. 4.24: Zyklusabhängige Veränderung der Uteroferrin-Expression (SSc) und der Serumprogesteronwerte (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	Stute 8		Stute 9		Stute 10	
		SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)
Ov.	Östrus	0,4	0,52	0,8	0,02	0,2	0,11
5	früher Interöstrus	0,2	7,5	0	1,6	0,3	3,6
10	mittlerer Interöstrus	2,2	0,67	0	2,6	0	3,5
13		0,2	0,52	1,5	0,58	1,7	0,24
16	später Interöstrus	0,7	0,47	1	0,05	0	0,18
19		0	0,26	0,3	0,06	0,2	0,33
21	Präöstrus	0	0,27	0,4	1,5	--	--

Legende zu Tab. 4.24: SSc Sekretions-Score Ov. Ovulation
P Serumprogesteron-Konzentration -- keine Daten vorhanden

Tab. 4.25: Zyklusabhängiges Expressionsmuster des Uteroferrins im luminalen Epithel, in den glandulären Epithelien und im Drüsenlumen (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	luminales Epithel	glanduläres Epithel	Drüsenlumen	intrazelluläres Reaktionsmuster
Ov.	Östrus	vereinzelt positiv	apikale Drüsen	--	diffus
5	früher Int.			--	
10	mittlerer Int.		vorwiegend mittlere und basale Drüsen	positives Material	
13					
16	später Int.				
19					
21	Präöstrus	apikale Drüsen			

Legende zu Tab. 4.25: Int. Interöstrus Ov. Ovulation
ggr. geringgradig -- keine positive Reaktion

4.5.3 Calbindin_{D9k}

Das vereinzelt im luminalen Epithel, vorwiegend jedoch in den glandulären Epithelien nachweisbare Calbindin_{D9k} zeigt zwischen den verschiedenen Stuten eine deutliche Variabilität. Diese betrifft nicht nur die Expressionsintensität sondern auch die Anzahl der positiv reagierenden Zellen.

Zyklusverlauf der Calbindin_{D9k}-Expression:

Während bei der Stute 8 zu allen untersuchten Zykluszeitpunkten weniger als 20% der Drüsenepithelien das Protein exprimieren, kann es im *frühen und mittleren* Interöstrus bei der Stute 9 in 70% bzw. bei der Stute 10 in 80% der Drüsen nachgewiesen werden. Diese insgesamt geringgradige (Stute 9) bzw. schwache (Stute 10) Zunahme der Calbindin_{D9k}-Expression ist mit dem gleichzeitigen Anstieg der Serumprogesteron-Konzentrationen assoziiert (Tab. 4.26).

Eine weitere, insgesamt geringgradige Expressionsintensität des Calbindin_{D9ks} mit ca. 90% positiv reagierenden Drüsenepithelien kann bei der Stute 9, korrespondierend mit einem erneuten Anstieg der Progesteronkonzentration, im *Präöstrus* beobachtet werden (Tab. 4.26).

Zu allen anderen untersuchten Zykluszeitpunkten wird das Calbindin_{D9k} bei den Stuten 9 und 10, entsprechend dem Expressionsmuster der Stute 8, lediglich von einzelnen Drüsenepithelien (10%-30%) exprimiert.

Tab. 4.26: Zyklusabhängige Veränderung der Calbindin_{D9k}-Expression (SSc) und der Serumprogesteronwerte (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	Stute 8		Stute 9		Stute 10	
		SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)
Ov.	Östrus	0,01	0,52	0,3	0,02	0,06	0,11
5	früher Interöstrus	0,01	7,5	1,2	1,6	0,5	3,6
10	mittlerer Interöstrus	0,03	0,67	0,5	2,6	0,5	3,5
13		0,05	0,52	0	0,58	0,4	0,24
16	später Interöstrus	0,02	0,47	0	0,05	0,02	0,18
19		0	0,26	0,5	0,06	0	0,33
21	Präöstrus	0,1	0,27	1,4	1,5	--	--

Legende zu Tab. 4.26: SSc Sekretions-Score Ov. Ovulation
P Serumprogesteron-Konzentration -- keine Daten vorhanden

Zyklusverlauf des epithelialen Reaktionsmusters:

Bei allen Stuten kann zu jedem der untersuchten Zykluszeitpunkte sowohl in der gesamten Biopsie als auch innerhalb eines Drüsenquerschnittes ein „mosaikartiges“ Reaktionsmuster beobachtet werden. Dabei treten einzelne, hochgradig positiv reagierende Epithelien neben schwach positiv oder negativ reagierenden Zellen auf (Abb. 9.15, S. 155).

Im Rahmen der stärksten Expression des Calbindin_{D9k} während des *frühen* und *mittleren* *Interöstrus* weisen alle Anteile der Drüsenepithelien eine deutlich positive, vorwiegend diffuse intrazytoplasmatische Reaktion auf. Das geringgradig positiv reagierende luminale Epithel hingegen weist, wie auch ca. 10% der Drüsenepithelien, eine vorwiegend intranukleäre Anfärbung auf. Im *späten Interöstrus*, *Präöstrus* und *Östrus* zeigt sich mit gleichbleibendem intrazellulärem Reaktionsmuster eine multifokale, jedoch alle Drüsenabschnitte und das luminale Epithel

miteinanderbeziehende Expression des Proteins, wobei unterschiedliche Färbeintensitäten zu beobachten sind. Wenig positiv reagierendes Material im Lumen einzelner Drüsen ist zu jedem untersuchten Zykluszeitpunkt darstellbar (Tab. 4.27).

Tab. 4.27: Zyklusabhängiges Expressionsmuster des Calbindin_{D9k} im luminalen Epithel, in den glandulären Epithelien und im Drüsenlumen (Kontrollstuten)

Zyklus-tag	Zyklus-phase	luminales Epithel	glanduläres Epithel	Drüsenlumen	intrazelluläres Reaktionsmuster
Ov.	Östrus	vereinzelt positiv	alle Anteile der Drüsen-epithelien	positives Material	diffus, ca. 10% intranukleär
5	früher Int.	ggr. positiv			
10	mittlerer Int.				
13					
16	später Int.	vereinzelt positiv			
19					
21	Präöstrus				

Legende zu Tab. 4.27:

Int. Interöstrus
ggr. geringgradig

Ov. Ovulation

4.5.4 Uterokalin

Das Reaktionsmuster des vereinzelt im luminalen Epithel und deutlich in den glandulären Epithelien exprimierten Uterokalins weist hinsichtlich der Färbeintensität eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Kontrollstuten auf. Der Zyklusverlauf der Uterokalin-Expression ist hingegen nur teilweise kongruent.

Zyklusverlauf der Uterokalin-Expression:

Eine kontinuierliche Zunahme der Uterokalinexpression vom Östrus bis hin zu einer gering- (Stute 8) bzw. gering- bis mittelgradigen (Stute 9, 10) Färbeintensität im **frühen** bzw. **mittleren Interöstrus** tritt bei allen Stuten auf. Die dabei zu beobachtenden individuellen Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Expression sind mit den jeweiligen Serumprogesteron-Konzentrationen assoziiert (Tab. 4.28, S. 71).

Während das Protein bei den Stuten 9 und 10 in den darauffolgenden Zyklusphasen nicht oder nur schwach nachweisbar ist, tritt bei der Stute 8 im **späten Interöstrus** zusätzlich eine gering- bis mittelgradige Expression des Uterokalins auf, die weder mit den Serumhormon- noch mit den Hormonrezeptorkonzentrationen zu korrelieren ist (s. Tab. 4.28, S. 71).

Zyklusverlauf des epithelialen Reaktionsmusters:

Das luminale Epithel, ebenso wie die unterschiedlichen Anteile der glandulären Epithelien, weisen ein bei allen Stuten weitgehend kongruentes, mit dem Zyklusverlauf variierendes Expressionsmuster auf. Die Drüsenquerschnitte zeigen ein gleichmäßiges Reaktionsmuster. Die

Tab. 4.29 gibt einen Überblick über die Expression des Uteroglobins in den endometrialen Epithelien.

Tab. 4.28: Zyklusabhängige Veränderung der Uterokalin-Expression (SSc) und der Serumprogesteronwerte (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	Stute 8		Stute 9		Stute 10	
		SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)
Ov.	Östrus	0,9	0,52	1,0	0,02	0,9	0,11
5	früher Interöstrus	2,0	7,5	2,3	1,6	1,9	3,6
10	mittlerer Interöstrus	1,0	0,67	3,0	2,6	2,6	3,5
13		0,0	0,52	3,3	0,58	1,3	0,24
16	später Interöstrus	1,3	0,47	0,9	0,05	0,0	0,18
19		2,4	0,26	0,9	0,06	1,0	0,33
21	Präöstrus	0,9	0,27	0,9	1,5	--	--

Legende zu Tab. 4.28: SSc Sekretions-Score Ov. Ovulation
P Serumprogesteron-Konzentration -- keine Daten vorhanden

Tab. 4.29: Zyklusabhängiges Expressionsmuster des Uterokalins im luminalen Epithel, in den glandulären Epithelien und im Drüsenlumen (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	luminales Epithel	glanduläres Epithel	Drüsenlumen	intrazelluläres Reaktionsmuster	
Ov.	Östrus	vereinzelt positiv	vorwiegend mittlere und basale Drüsen	positives Material	diffus	
5	früher Int.	bei Stute 9 mgr. positiv, sonst vereinzelt	vorwiegend apikal, auch mittlere und basale Drüsen			
10	mittlerer Int.		alle Drüsen- epithelien			
13			--			
16	später Int.	vereinzelt positiv	vorwiegend mittlere und basale Drüsen			--
19			--			
21	Präöstrus		--			

Legende zu Tab. 4.29: Int. Interöstrus mgr. mittelgradig Ov. Ovulation -- keine positive Reaktion

Das generell diffus intrazytoplasmatisch exprimierte Uterokalin (Abb. 9.16, S. 157) kann im **Östrus**, **späten Interöstrus (Tag 19)** und **Präöstrus** mit geringer Färbeintensität vorwiegend in den mittleren und basal gelegenen Drüsenepithelien nachgewiesen werden. Die apikalen Drüsen und das luminale Epithel weisen nur vereinzelt schwach positiv reagierende Zellen auf. Ab dem **frühen Interöstrus** hingegen zeigen die apikalen Drüsenepithelien, im Vergleich zu den mittleren und basalen Uterindrüsen, eine geringfügig stärkere, insgesamt mittelgradige Färbeintensität. Nur das luminale Epithel der Stute 9 weist eine deutlich positive Reaktion auf. Nach der maximalen

Expressionsintensität im *mittleren* bzw. *späten Interöstrus (Tag 16)* ist in allen Drüsenepithelien ein schwaches Reaktionsmuster zu beobachten. Der Nachweis positiv reagierendes Materials im Drüsenlumen ist vom Östrus bis zum mittleren Interöstrus möglich.

4.5.5 Glykogen

Das während des gesamten Zyklus ausschließlich in den glandulären Epithelien auftretende Glykogen zeigt hinsichtlich der Färbintensitäten weitgehende Übereinstimmungen zwischen den Kontrollstuten. Der Zeitpunkt des maximalen Nachweises weist lediglich bei der Stute 8 eine deutliche Abweichung auf.

Zyklusverlauf der Glykogen-Konzentration:

Bei den Stuten 9 und 10 steigt die Glykogenkonzentration vom *Östrus bis zum mittleren Interöstrus* kontinuierlich an, wobei maximal mittel- bis hochgradige (Stute 9) bzw. gering- bis mittelgradige (Stute 10) Konzentrationen nachgewiesen werden können. Entsprechend dem Uterokalin (vgl. Kap. 4.5.4, S. 70) besteht dabei eine Korrelation mit dem gleichzeitigen Anstieg der Serumprogesteron-Konzentrationen.

Die Stute 8 hingegen weist eine maximal mittelgradige Reaktion im *mittleren Interöstrus* (Tag 13 p.ov.) auf, die weder mit den Serumhormonwerten noch mit der Hormonrezeptorexpression korreliert.

In den nachfolgenden Zyklusphasen ist das Glykogen bei allen Stuten in gering- bzw. gering- bis mittelgradigen Konzentrationen nachweisbar.

In Tab. 4.30 sind die im Verlauf des Zyklus variierenden SSc- und Serumprogesteron-Konzentrationen der einzelnen Kontrollstuten dargestellt.

Tab. 4.30: Zyklusabhängige Veränderung der Glykogen-Konzentration (SSc) und der Serumprogesteronwerte (Kontrollstuten)

Zyklus- tag	Zyklus- phase	Stute 8		Stute 9		Stute 10	
		SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)	SSc	P (ng/ml)
Ov.	Östrus	2,6	0,52	3,7	0,02	2,4	0,11
5	früher Interöstrus	2,5	7,5	5,7	1,6	3,3	3,6
10	mittlerer Interöstrus	2,0	0,67	5,2	2,6	2,4	3,5
13		4,9	0,52	1,8	0,58	0,9	0,24
16	später Interöstrus	2,0	0,47	2,1	0,05	0,7	0,18
19		1,5	0,26	2,6	0,06	1,1	0,33
21	Präöstrus	1,2	0,27	1,2	1,5	--	--

Legende zu Tab. 4.30: SSc Sekretions-Score Ov. Ovulation
P Serumprogesteron-Konzentration -- keine Daten vorhanden

Zyklusverlauf des epithelialen Reaktionsmusters:

Innerhalb der Biopsie kann keine zyklusabhängige Variabilität bezüglich der Lokalisation des Glykogens nachgewiesen werden, lediglich das intrazelluläre Reaktionsmuster zeigt nachweisbare Veränderungen. Die Drüsenquerschnitte weisen ein teils „mosaikartiges“ Erscheinungsbild auf.

In **allen Zyklusphasen** zeigen die in den mittleren Arealen des Stratum spongiosum gelegenen Drüsenepithelien die höchste Glykogen-Konzentration, wobei maximal mittel- bis hochgradige Färbeintensitäten nachgewiesen werden können. Die basal gelegenen Uterindrüsen weisen eine geringfügig schwächere und die apikalen Drüsen eine variable Reaktionsintensität auf. Im Drüsenlumen auftretendes positiv reagierendes Material ist hingegen vorwiegend vom Östrus bis zum mittleren Interöstrus zu beobachten. Die in der Regel diffus im Zytoplasma verteilten Glykogengranula (Abb. 9.17/A+B, S. 157) konzentrieren sich nach Abfall der Glykogenkonzentration im mittleren (Stute 9 und 10) bzw. im späten Interöstrus (Stute 8) an der apikalen Zellgrenze (Tab. 4.31).

Tab. 4.31: Zyklusabhängiges Reaktionsmuster des Glykogens im luminalen Epithel, in den glandulären Epithelien und im Drüsenlumen (Kontrollstuten)

Zyklus-tag	Zyklus-phase	luminales Epithel	glanduläres Epithel	Drüsenlumen	intrazelluläres Reaktionsmuster
Ov.	Östrus	--	vorwiegend mittlere Drüsen, aber auch basale und apikale	positives Material	diffus
5	früher Int.				vorwiegend apikal
10	mittlerer Int.			--	
13					
16	später Int.			--	diffus
19					
21	Präöstrus	--			

Legende zu Tab. 4.31:

Int. Interöstrus
Ov. Ovulation

-- keine positive Reaktion

4.5.6 Vergleichende Zusammenfassung der während des Zyklus (Kontrollstuten) erhobenen histopathologischen Befunde

Alle untersuchten endometrialen Proteine und das Glykogen zeigen während des Zyklusverlauf, typische Konzentration, Lokalisation und die intrazelluläre/intraluminale Verteilung betreffende Reaktionsmuster. Letztere weisen z. T. deutliche individuelle Unterschiede auf, so dass im folgenden lediglich die übereinstimmenden Charakteristika zusammengefasst dargestellt werden.

Die stärkste Expression des *Uterokalins* und ein ausgeprägter *Glykogen-Nachweis* können vorwiegend im frühen und mittleren Interöstrus beobachtet werden. Beide Sekretionsprodukte sind dabei hinsichtlich ihres Auftretens eng mit dem gleichzeitigen Anstieg der Progesteronkonzentration im Blutserum assoziiert.

Bei zwei Stuten tritt das *Calbindin_{D9k}* deutlich v.a. während des mittleren Interöstrus auf, wobei eine positive Korrelation zwischen der Expressionsintensität des Proteins und dem im Blutserum ermittelten Progesteron-Peak besteht.

Das *Uteroglobin* zeigt sowohl im Östrus als auch im mittleren und späten Interöstrus eine ansteigende Expressionsintensität. Letztere ist, ebenso wie die ausgeprägteste *Uteroferrin*-Expression im mittleren und späten Interöstrus, mit der gleichzeitigen Abnahme der Serumprogesteron-Konzentrationen assoziiert.

Während im luminalen Epithel die Proteine nur selten und das Glykogen nicht nachgewiesen werden können, zeigen die glandulären Epithelien ein für jedes Protein bzw. für das Glykogen typisches, mit dem Zyklusverlauf variierendes Reaktionsmuster. Dabei tritt beim *Calbindin_{D9k}* zu allen Zykluszeitpunkten und beim Glykogen gelegentlich ein „mosaikartiges“ Erscheinungsbild innerhalb der einzelnen Drüsenquerschnitte auf. Das *Uteroglobin*, das *Uteroferrin* und das *Uterokalin* dagegen zeigen eine gleichmäßige Färbintensität. Der Nachweis positiven Materials im Drüsenlumen ist, mit Ausnahme des *Calbindin_{D9k}*, eng mit den jeweils höchsten Konzentrationen der Sekretionsprodukte assoziiert.

Ein teils apikales intrazytoplasmatisches Reaktionsmuster ist beim *Uteroglobin* während der stärksten Expression und bei Glykogen nach Abfall der Konzentration nachweisbar. *Uteroferrin* und *Uterokalin* hingegen weisen ein generell diffuses intrazelluläres Erscheinungsbild auf, bei *Calbindin_{D9k}* kann in ca. 10% der positiv reagierenden Epithelien eine zusätzliche intranukleäre Anfärbung nachgewiesen werden.

Eine vergleichende Darstellung der zyklusabhängigen Charakteristika im Nachweis der endometrialen Proteine und des Glykogens gibt Tab. 4.32.

Tab. 4.32: Zyklusabhängige Charakteristika im Reaktionsmuster der endometrialen Proteine und des Glykogens (Kontrollstuten)

	Zeitpunkt maximaler Konzentration	positiv reagierendes		intrazelluläres Reaktionsmuster	positives Material im Drüsenlumen
		luminales Epithel	glanduläres Epithel		
Uteroglobin	mittlerer bis später Int.	verstärkt im Präöstrus	vorwiegend mittlere und basale	apikal, diffus	mittlerer Int. bis Präöstrus
Uteroferrin		in allen Zyklusphasen vereinzelt		diffus	
Calbindin	mittlerer Int.		multifokal in allen Anteilen	diffus, intranukleär	in allen Zyklusphasen
Uterokalin	früher bis mittlerer Int.		apikal, mittlere und basale	diffus	Östrus bis mittlerer Int.
Glykogen		vorwiegend mittlere und basale	apikal, diffus		

Legende zu Tab. 4.32: Int. Interöstrus

4.6 Immunhistologische und histochemische Untersuchungen zum Nachweis der endometrialen Proteine und Kohlenhydrate im Rahmen der Endometrose

Zur Dokumentation der möglichen Auswirkungen degenerativer Veränderungen auf die endometrialen Proteine und Kohlenhydrate standen 48 Endometriumbiopsien mit unterschiedlichem Endometrosegrad zur Verfügung. Diese Biopsien wurden repräsentativ aus den in Kap. 4.3 (s. S. 48) beschriebenen Gruppen ausgewählt, wobei jede Gruppe jeweils sechs Biopsien mit einer geringgradigen bzw. hochgradigen Endometrose enthält. In allen Biopsien erfolgte eine immunhistologische Darstellung von Uteroglobulin, Uteroferrin, Calbindin_{D9k}, Uterokalin bzw. der histochemische Nachweis von Glykogen. Zusätzlich wurden die intraepithelial auftretenden Proteoglykane mittels der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und 1,0 dargestellt (vgl. Kap. 3.2.3, S.37f). Aufgrund der Variabilität der Endometrose innerhalb einer Endometriumbiopsie werden pro Schnitt mehrere fibrotische Herde (Einzeldrüsen und, soweit vorhanden, Drüsennester) untersucht. Zur übersichtlicheren Darstellung der Befunde erfolgt eine Zusammenfassung der dabei ermittelten Werte und die Bestimmung eines für die Gesamtbioptie geltenden Mittelwertes.

Reaktionsmuster der Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Areale:

Der Nachweis von Uteroglobulin, Calbindin_{D9k}, Uterokalin und Glykogen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung und wird im folgenden zusammengefasst dargestellt. Das davon abweichende Expressionsmuster des Uteroferrins wird, ebenso wie das der Proteoglykane, einzeln beschrieben.

Uteroglobulin, Calbindin_{D9k}, Uterokalin, Glykogen:

Das Färbeverhalten der Proteine und des Glykogens innerhalb der fibrotischen Areale zeigt zwischen den einzelnen fibrotischen Herden in einer Biopsie ein variables Erscheinungsbild (SSc = 0,0-3,6). Insgesamt tritt, im Vergleich zu den unveränderten umliegenden Drüsenepithelien, bei **24% (46/192)** der untersuchten Biopsien ein **zyklussynchrones** und bei **76% (146/192)** ein **zyklusasynchrones** Erscheinungsbild auf (Abb. 9.20/A+B, S. 159). Letzteres äußert sich vorwiegend (64,6%, 124/192) in einer geringgradigen Konzentrationsabnahme (mittlerer SSc 1,3) der Proteine und des Glykogens (Abb. 9.21/A, S. 159). Seltener (11,4%, 22/192) ist ein insgesamt geringgradige verstärkter Nachweis (mittlerer SSc 1,0) innerhalb der fibrotischen Herde möglich.

Betrachtet man ausschließlich Drüsenepithelien innerhalb **destruierender Endometrosen** (Abb. 9.21/B, S. 159), so weisen diese, im Vergleich zu umliegenden, unveränderten Uterindrüsen vorwiegend eine geringere (mittlerer SSc 1,4) Färbeintensität auf (69,8%, 67/96). Auch ein insgesamt schwaches zyklussynchrones Reaktionsmuster kann beobachtet werden (27,1%, 26/96). Eine im Vergleich zu umliegenden, unveränderten Epithelien geringfügig verstärkte Anfärbung (mittlerer SSc 0,8) kann in sehr wenigen destruierenden fibrotischen Herden beobachtet werden (3,1%, 3/96).

Uteroferrin:

Das Reaktionsmuster des Uteroferrins innerhalb der fibrotischen Areale zeigt ebenfalls zwischen den einzelnen fibrotischen Herden einer Biopsie ein variables Erscheinungsbild (SSc = 0,0-6,3), wobei 18,8% (9/48) der untersuchten Biopsien mit Endometrose innerhalb dieser Areale ein *zyklussynchrones* und 79,2% (38/48) eine *zyklusasynchrone* Färbeintensität aufweisen. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Proteinen und dem Glykogen ist jedoch bei etwas mehr als der Hälfte (56,2%, 27/48) der untersuchten Biopsien innerhalb der fibrotischen Herde eine geringgradig deutlichere (mittlerer SSc 1,0) Uteroferrinexpression im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Drüsenepithelien zu beobachten (Abb. 9.18/A, S. 157). Eine geringgradig (mittlerer SSc 1,4) verminderte Expressionsintensität ist bei 25% (12/48) der Biopsien nachweisbar.

Dieses Erscheinungsbild tritt auch bei *destruierenden Endometrosen* auf (Abb.9.18/B, S. 157).

Einen detaillierten Überblick über die erhobenen Befunde geben die Tab. 4.34 und 4.35

Tab. 4.34: Reaktionsmuster der endometrialen Proteine und des Glykogens innerhalb der fibrotischen Herde im Vergleich zu den unveränderten Uterindrüsen

	Anzahl gesamt	Zyklus- synchron	Zyklus <u>asyn</u> chron/ <u>ver-</u> <u>ring</u> erter SSc im Vergleich zu unveränderten Drüsen		Zyklus <u>asyn</u> chron/ <u>erhöht</u> er SSc im Vergleich zu unveränderten Drüsen	
			Anzahl	SSc	Anzahl	SSc
Uteroglobulin	n=48	n=11	n=28	1,5	n=9	1,3
Uteroferrin	n=48	n=9	n=12	1,4	n=27	1,0
Calbindin_{D9k}	n=48	n=16	n=29	1,1	n=3	0,8
Uterokalin	n=48	n=9	n=35	1,3	n=4	1,0
Glykogen	n=48	n=10	n=32	1,5	n=6	0,9

Legende zu Tab. 4.34: SSc mittlerer SSc der Biopsien

Tab. 4.35: Reaktionsmuster der endometrialen Proteine und des Glykogens innerhalb destruierender fibrotischer Herde im Vergleich zu den unveränderten Drüsen

	Anzahl gesamt	Zyklus- synchron	Zyklus <u>asyn</u> chron/ <u>ver-</u> <u>ring</u> erter SSc im Vergleich zu unveränderten Drüsen		Zyklus <u>asyn</u> chron/ <u>erhöht</u> er SSc im Vergleich zu unveränderten Drüsen	
			Anzahl	SSc	Anzahl	SSc
Uteroglobulin	n=24	n=6	n=16	1,8	n=2	1,0
Uteroferrin	n=24	n=4	n=8	1,2	n=12	1,0
Calbindin_{D9k}	n=24	n=10	n=14	1,1	n=0	n=0
Uterokalin	n=24	n=5	n=19	1,3	n=0	n=0
Glykogen	n=24	n=5	n=18	1,5	n=1	0,5

Legende zu Tab. 4.35: SSc mittlerer SSc der Biopsien

Insgesamt stehen die Veränderungen in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit dem Grad oder der Aktivität der Fibrose. Einzeldrüsen und Drüsennester zeigen ein weitgehend übereinstimmendes Reaktionsmuster.

Proteoglykane:

Ein Nachweis von Proteoglykanen innerhalb einzelner mittlerer und basal gelegener fibrotischer Herde gelingt in neun Biopsien mittels der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 (Abb. 9.22/A+B, S. 159), nicht jedoch bei pH 1,0. Diese *neutralen Mukopolysaccharide* sind in unterschiedlicher Konzentration (SSc 0,1-5,0), v. a. innerhalb inaktiver (2/9) bzw. inaktiver destruierender fibrotischer Herde sowie in zystisch dilatierten Drüsen (Abb. 9.22/B, S. 159) nachweisbar. Ein unmittelbarer Zusammenhang mit dem Grad der Endometrose bzw. mit dem Nachweis von Einzeldrüsen und Drüsennestern besteht nicht.

5 Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- die unterschiedlichen Erscheinungsbilder der Endometrose mittels histomorphologischer, histochemischer und immunhistologischer Methoden zu charakterisieren, sowie mögliche Einflussfaktoren auf den Verlauf der Erkrankung zu untersuchen und pathogenetische Arbeitshypothesen zu entwickeln,
- immunhistologische Nachweisverfahren zur Darstellung endometrial synthetisierter Proteine am equinen Endometrium zu etablieren und ihre, sowie die des Glykogens, zyklusabhängigen Veränderungen zu charakterisieren,
- die im Rahmen der Endometrose auftretenden Alterationen des glandulären Protein- und Kohlenhydratmusters zu untersuchen und die damit einhergehende Beeinflussung des uterinen Mikromilieus sowie deren Bedeutung für Konzeption und Aufrechterhaltung der Gravidität zu diskutieren.

5.2 Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials und der Untersuchungsmethoden

Für die Charakterisierung der unterschiedlichen Erscheinungsbilder der Endometrose und die Untersuchung der potenziellen Einflussfaktoren auf den Verlauf der Erkrankung stand ein umfangreiches Material von insgesamt 544 Stuten bzw. 774 Endometriumbiopsien mit unterschiedlicher Ausprägung der Endometrose zur Verfügung. Die hinsichtlich Alter und Reproduktionsstatus nicht immer vollständigen anamnestischen Angaben der aus den Routineeinsendungen stammenden Biopsien ermöglichten dennoch eine statistische Untersuchung der Zusammenhänge zwischen diesen Parametern und der Ausprägung der Endometrose. Die saisonale Polyöstrie der Stute wurde durch die Beschränkung auf Entnahmezeiträume in der Zuchtsaison (Mai bis Juli) bzw. während des Winteranöstrus (November bis Februar) berücksichtigt. Der Einfluss der Entzündung auf das Erscheinungsbild der Endometrose konnte mittels experimentell induzierter Endometritiden bei 20 Stuten, denen jeweils vor und fünf Tage nach einer bakteriellen Infektion eine Biopsie entnommen wurde, dargestellt werden. Die wiederholten Infektionen und die dadurch bedingte lang angelegte Versuchsdauer von über einem Jahr ermöglichten zudem die Beurteilung des Endometroseverlaufs im Rahmen rezidivierender Entzündungen. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu bewerten, da nach jeder Infektion verschiedene Therapieverfahren durchgeführt wurden. Graviditätsbedingte Einflüsse auf die Form und den Verlauf der Endometrose konnten an Biopsien (n=16) überprüft werden, die jeweils vor der Belegung sowie postpartal entnommen wurden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte die Darstellung möglicher zyklischer Veränderungen der Endometrose

(n=49) und des zyklusabhängigen Reaktionsmusters der uterinen Proteine und des Glykogens (n=21) an Biopsien, die an definierten Zyklustagen entnommen wurden. Die geringe Probenanzahl beider Untersuchungsgruppen ist jedoch als kritisch anzusehen.

Die Endometriumbiopsien wurden sofort nach der Entnahme in 4%igem Formalin fixiert und bieten damit eine optimale Voraussetzung für die Auswertung der immunhistologisch eingesetzten Marker. Die histochemische Auswertung hingegen muss differenzierter betrachtet werden. Neben Polysacchariden wie Glykogen, Stärke und Zellulose weist die PAS-Reaktion in Paraffinmaterial neutrale Mukopolysaccharide sowie Glykoproteine und Glykopeptide nach. Die enzymatische Vorbehandlung mit α -Amylase entfernt jedoch, unabhängig von der Fixierung, ausschließlich Glykogen (PEARSE 1961), so dass diese Methode eine einfache und sichere Nachweismöglichkeit für Glykogen darstellt. Die Spezifität der Alcianblau-Färbung hingegen ist manipulierbar, die Unterscheidung zwischen sulfatierten und nicht sulfatierten sauren Mukosubstanzen ist am zuverlässigsten durch den pH-Wert der Färbelösung möglich (LUPPA 1977). Eine weiterführende Spezifizierung gelingt durch die enzymatische Vorbehandlung, wobei sich die aus dem Hoden isolierte Hyaluronidase in ihrer Wirkungsweise eindeutig von der aus Bakterien gewonnenen unterscheidet (LUPPA 1977). Eine Abhängigkeit des Hyaluronsäure-Nachweises von der Fixationstechnik weisen hingegen LIN et al. (1997) nach, die nur mit saurem, mit 70%igem Ethanol versetztem Formalin die Diffusion freier Hyaluronsäure verhindern können. Die Autoren propagieren daher, bzgl. der Hyaluronsäure, eine Reevaluierung der mit Alcianblau durchgeführten Nachweismethoden.

5.3 Die equine Endometrose

5.3.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Endometrose der Stute bezeichnet eine periglanduläre und/oder stromale endometriale Fibrose einschließlich der glandulären Alterationen innerhalb der fibrotischen Areale (SCHOON et al. 1995). Sie tritt – auch im eigenen Untersuchungsgut – altersassoziiert progredient auf, statistisch signifikant unabhängig von der Anzahl der Abfohlungen (DOIG et al. 1981, RICKETTS u. ALONSO 1991, SCHOON et al. 1995). Ähnlich der Ergebnisse von SCHOON et al. (1997) sind über 90% der in dieser Studie untersuchten Stuten güst, wobei jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der Endometrose und der Länge der Günstzeit nachzuweisen ist. Während SCHOON et al. (1997) bei zwei Drittel der untersuchten Stuten eine geringgradige Endometrose beobachten, tritt im eigenen Patientengut zu nahezu gleichen Teilen eine geringgradige bzw. eine mittelgradige Endometrose auf, selten hingegen sind hochgradige Endometrosen nachzuweisen. Innerhalb einer Biopsie können Einzeldrüsen und/oder Drüsennester von der periglandulären Fibrose betroffen sein. SCHOON et al. (1995) gehen im Hinblick auf den progredienten Verlauf der Erkrankung davon aus, dass die fibrotischen Prozesse zunächst Einzeldrüsen erfassen und sich

später, bei mittel- und hochgradigen Manifestationen unter Bildung von Drüsennestern ausdehnen. Die eigenen Untersuchungen unterstützen diese Hypothese, da Drüsennester signifikant seltener bei jungen Stuten bzw. fibrotische Einzeldrüsen signifikant seltener bei älteren Stuten auftreten. Das histomorphologische Erscheinungsbild der involvierten periglandulären Stromazellen erlaubt die Einteilung der Endometrose in eine aktive und eine inaktive Fibrose (AUPPERLE 1997, RAILA 2000), die - im eigenen Untersuchungsgut unabhängig von deren Grad - einen nicht destruierenden oder destruierenden Charakter aufweisen kann (SCHOON et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit erfolgt nicht nur die systematische immunhistologische Charakterisierung dieser unterschiedlich differenzierten fibrotischen Herde sondern auch die Untersuchung mehrerer in der Literatur als potenzielle ätiologische Faktoren betrachteter Einflüsse.

5.3.2 Einflussfaktoren auf den Verlauf der Endometrose

Die Morphologie der unveränderten endometrialen Stromazellen ändert sich sowohl im Verlauf des Zyklus (RAILA 2000) als auch, bedingt durch die saisonale Polyöstrie der Stute, mit dem Wechsel der Jahreszeiten (BRUNCKHORST et al. 1991, SCHOON et al. 1992). Während GROSS und LEBLANC (1984) sowie WAELCHLI und WINDER (1987) den Endometrosegrad während des Winteranöstrus bestimmen und dabei keine deutlichen Unterschiede zu den Verhältnissen während der Zuchtsaison feststellen können, fehlen Untersuchungen bzgl. der Variationen in der Differenzierung der fibrotischen Herde. Der vorliegende Nachweis aktiv und inaktiv differenzierter fibrotischer Herde zeigt keinen Bezug zu den zyklisch und jahreszeitlich bedingten Veränderungen der unveränderten endometrialen Strukturen. Diese Ergebnisse sprechen für die weitgehende Unabhängigkeit des Aktivitätszustandes der periglandulären Fibrose von den in der Peripherie zirkulierenden Steroidhormonkonzentrationen (vgl. Kap.5.3.3, S. 82f).

Eine deutliche Verbesserung des Endometrosegrades stellen BRACHER et al. (1996) ab dem 180. Trächtigkeitstag fest und führen dieses Phänomen auf die im Verlauf der Trächtigkeit steigende Anzahl der Uterindrüsen zurück. Im Verlauf des Puerperiums (3. bis 9. Tag post partum) hingegen beobachten KERSTEN (2000) und STEIGER (2002) eine zunehmende Ausbildung fibrotischer Nester und damit einhergehend eine geringfügige Zunahme des Endometrosegrades (STEIGER 2002). Im eigenen Untersuchungsgut kann, obwohl teilweise in den vor der Belegung entnommenen Biopsien vorhanden, zu keinem Zeitpunkt postpartal die Ausbildung von Drüsennestern nachgewiesen werden. Der Endometrosegrad stellt sich postpartal (mit einer Ausnahme) bis auf geringfügige Unterschiede unverändert dar, bezogen auf den Zustand vor der Gravidität. Die Befunde entsprechen damit, da die meisten Biopsien sehr früh im Puerperium entnommen wurden (3. Tag p.p.), den Ergebnissen o.g. Autorinnen. Während mittels der hier erhobenen Befunde eine durch die Gravidität bedingte Verbesserung der Endometrose ausgeschlossen werden kann, ist die Beurteilung des weiteren Endometroseverlaufs nicht möglich und sollte in nachfolgenden Arbeiten

abgeklärt werden. Neben der vorwiegend inaktiven Differenzierung der „fibrotischen“ Stromazellen, die auch STEIGER (2002) im Verlauf des Puerperiums beobachtet, tritt auch ein deutliches zyklusasynchrones Erscheinungsbild der betroffenen Uterindrüsen auf. Dieses von verschiedenen Autoren (KATILA 1988, KERSTEN 2000, STEIGER 2002) im Puerperium beobachtete Erscheinungsbild ist ein weiterer Hinweis für die vollständige Abkopplung der fibrotischen Herde von dem unveränderten endometrialen Gewebe.

Eine mit dem Grad der Endometrose assoziierte zunehmende entzündliche Infiltration des Endometriums wird von verschiedenen Autoren beobachtet (KENNEY u. DOIG 1986, FERREIRA-DIAS et al. 1994, FLORES et al. 1995, FERREIRA-DIAS et al. 1999). Während DOIG et al. (1981) eine verringerte Resistenz des fibrotisch geschädigten Endometriums gegenüber einer bakteriellen Exposition als Ursache für dieses Erscheinungsbild ansehen, gehen RICKETTS und ALONSO (1991) sowie FLORES et al. (1995) von einer ursächlichen Beteiligung der Endometritis in der Pathogenese der Endometrose aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen beide Theorien. Neben dem signifikant gehäuften Auftreten von Endometritiden im Rahmen fortgeschrittener Fibrosen kann hier erstmalig nachgewiesen werden, dass, unabhängig vom Grad der Erkrankung, destruierende Endometrosen häufiger mit Endometritiden vergesellschaftet sind. Dies spricht für eine wichtige Rolle funktionell intakter Uterindrüsen im Rahmen der physiologischen Clearance.

In der vorliegenden Arbeit kann zudem eine Aktivierung der periglandulären Fibrose im Rahmen experimentell induzierter Endometritiden festgestellt werden, wobei jedoch auch ein Einfluss der nach der Infektion durchgeführten Therapien anhand des untersuchten Materials nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Die von STIEF (2004) im Endometrium der Stute beobachtete Aktivierung der periglandulären Fibrose im Rahmen von Entzündung und Wundheilung unterstützt jedoch erstere Vermutung. Möglicherweise ist diese Aktivierung auf verschiedene, von Entzündungszellen freigesetzte profibrotische Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z.B. TGF- β 1 (ATAMAS 2002), PDGF (MUNSON et al. 1995), Interleukine (LEE et al. 2001) und TNF- α (OLD 1985) zurückzuführen. An dem fortschreitenden Prozess der Fibrose müssen jedoch weitere, bisher unbekannte Faktoren beteiligt sein, da trotz wiederholter Endometritiden und vorübergehender Aktivierung der Fibrose keine deutliche Verschlechterung des Endometrosegrades nachzuweisen ist. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Perivaskulitiden und der Pathogenese der Endometrose, wie von GRÜNINGER (1996) vermutet, kann im eigenen Untersuchungsgut nicht nachvollzogen werden.

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit können auch GRÜNINGER (1996) und SCHOON et al. (1997) eine enge Assoziation hinsichtlich des Nachweises von Angiosklerosen und einer Endometrose feststellen. Inwieweit Angiosklerosen, wie von o. g. Autoren vermutet, an der Pathogenese der Endometrose beteiligt sind, oder ob lediglich die mit dem steigenden Lebensalter

der Stuten und der damit in der Regel zunehmenden Zahl der Graviditäten fortschreitende Ausprägung beider Erkrankungen für diese Assoziation verantwortlich ist, kann im Rahmen dieser Studie nicht entschieden werden. Ähnlich wie GRÜNINGER et al. (1998), die bei nahezu allen Stuten mit Angiosklerose auch eine Endometrose beobachten, treten im eigenen Material bei ca. zwei Drittel der Stuten auch degenerative Gefäßveränderungen auf, so dass diese wahrscheinlich einen von mehreren ätiopathogenetischen Faktoren der Endometrose darstellen.

5.3.3 Erscheinungsformen der Endometrose

Stromazellen der fibrotischen Herde:

Obwohl sich mehrere Autoren mit der Steroidhormonrezeptor-Expression der Uterindrüsen innerhalb der fibrotischen Herde beschäftigen, fehlen Erkenntnisse bzgl. der dabei auftretenden stromalen Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression. In der vorliegenden Arbeit kann erstmalig festgestellt werden, dass, unabhängig vom Aktivitätszustand dieser Stromazellen, eine, im Vergleich zu den unveränderten Stromazellen, deutlich verminderte Hormonrezeptor-Expression auftritt. Ein ähnliches Erscheinungsbild wird im Stroma endometrialer Polypen (MITTAL et al. 1996) und im Stroma verschiedener, vorwiegend mäßig bis schlecht differenzierter neoplastischer Prozesse des humanen Endometriums beobachtet und dabei mit dem Grad der Malignität der Veränderung assoziiert (MITZE et al. 1988, SABINI et al. 1992, CHU et al. 2003, AMANT et al. 2004). Die vorliegenden Ergebnisse sind somit ein Indiz für die zunehmende „Entdifferenzierung“ der „fibrotischen“ Stromazellen und erklären die bereits histomorphologisch erkennbare Unabhängigkeit der fibrotischen Herde von den peripher zirkulierenden Steroidhormonen (vgl. Kap.5.3.2, S. 80).

Bereits EVANS et al. (1998) und RAILA (2000) beschreiben im Rahmen der Endometrose das Auftreten von Zellen, die den ultrastrukturellen Merkmalen von Myofibroblasten entsprechen. Die in den eigenen Untersuchungen in den fibrotischen Herden festgestellte stromale Koexpression von Vimentin und α -GMA entspricht einem Expressionsmuster, das in der Literatur als charakteristisch für das Vorliegen von Myofibroblasten angesehen wird (SAPPINO et al. 1988, SKALLI et al. 1989). Während in der vorliegenden Arbeit die α -GMA-Expression, unabhängig vom Grad der Endometrose, vorwiegend in destruierenden Endometrosen auftritt, ist die Desmin-Expression der fibrotischen Stromazellen stark variabel. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von RAILA (2000), die vorwiegend in geringgradigen Endometrosen einen VA-Typ (Vimentin und α -GMA) und in hochgradigen Endometrosen einen VAD-Typ (Vimentin, Desmin, α -GMA) nachweisen kann. Möglicherweise sind diese Unterschiede nicht nur auf die in der vorliegenden Arbeit erfolgte zusätzliche Einteilung der Endometrose in destruierend und nicht destruierend, sondern auch auf das deutlich umfangreichere Probenmaterial zurückzuführen. Auch SKALLI et al. (1989) und TRUONG et al. (1990) beobachten eine in Qualität und Quantität stark variierende

Zusammensetzung des Zytoskeletts der Myofibroblasten. Letztere führen dieses Phänomen auf das Vorliegen eines dynamischen Zelltyps zurück, der in seiner Differenzierung zwischen einem myoiden (kontraktilen) und einem fibroblastischen (sekretorischen) Stadium wechselt. Eine dementsprechend vermehrte Desminexpression in inaktiv differenzierten periglandulären Stromazellen kann im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch nicht nachgewiesen werden, möglicherweise bedingt durch die von TRUONG et al. (1990) beschriebene Abhängigkeit des Desminnachweises von dem, in der Immunhistologie verwendeten Antikörper. Die Bedeutung der Myofibroblasten im Rahmen der Endometrose wird in Kap. 5.4 (S. 86ff) diskutiert.

Bisherige Untersuchungen beschreiben das Laminin im Rahmen der Endometrose als Komponente der epithelialen Basalmembran (RAILA 2000) und als Teil der ECM (WALTER et al. 2001a). In der vorliegenden Arbeit kann hingegen, soweit eine Differenzierung mittels lichtmikroskopischer Untersuchung möglich ist, zusätzlich eine intrazytoplasmatische Expression des Laminins in den „fibrotischen“ Stromazellen beobachtet werden. Auch andere Autoren beschreiben einen immunhistologischen Nachweis von intrazellulärem Laminin und führen dieses Phänomen auf eine gesteigerte Produktion zurück (GREENWELL et al. 1991, BALLARDINI et al. 1994, MAAß 2003). Im eigenem Material tritt dieses Erscheinungsbild in allen Endometroseformen auf, besonders ausgeprägt jedoch in aktiven, destruierenden Endometrosen, so dass neben einer gesteigerten Synthese auch eine Phagozytose von Komponenten der epithelialen Basallamina durch die Myofibroblasten denkbar wäre. Letzteres wird unterstützt durch die Befunde von STEIGER (2002) und STIEF (2004), die eine phagozytotische Aktivität endometrialer Stromazellen beobachten. Ob es sich letztlich um phagozytisiertes oder um neu synthetisiertes Laminin handelt, muss in weiterführenden ultrastrukturellen Untersuchungen abgeklärt werden.

Extrazelluläre Matrix der fibrotischen Herde:

Nur wenige Studien beschäftigen sich mit der Zusammensetzung der ECM im Rahmen der Endometrose. Diese legen zudem einen Schwerpunkt auf den Nachweis verschiedener Kollagene (s. Kap. 2.6.5.2, S. 23ff). Lediglich WALTER et al. (2001a,b) beschreiben im Rahmen hochgradiger Endometrosen eine verstärkte Ablagerung von Fibronectin sowie, unabhängig vom Grad der Erkrankung, das Auftreten von hohen Konzentrationen an Hyaluronsäuren. Im eigenen Untersuchungsgut treten Fibronectin und sulfatierte Mukopolysaccharide, jedoch nur wenig Hyaluronsäuren, in allen Erscheinungsformen der Endometrose, insbesondere jedoch bei aktiven, destruierenden Fibrosen auf. Die sich dabei ergebenden qualitativen Differenzen zu den Ergebnissen von WALTER et al. (2001b) dürften am ehesten auf unterschiedliche Methoden der Fixierung und der enzymatischen Verdauung zurückzuführen sein (vgl. Kap. 5.2, S. 78f). Im eigenen Material ist ein vermehrter Gehalt an Chondroitinsulfat A, C zu beobachten, bei dem es sich um Versikan handeln könnte. Dieses Proteoglykan wird u.a. früh bei fibrotischen

Erkrankungen der Lunge nachgewiesen (BENSADOUN et al. 1996, VENKATESAN et al. 2000, 2002). Zudem kann das Vorliegen der im Rahmen verschiedener Gewebsfibrosen beschriebenen Proteoglykane Dekorin, Biglykan und Fibromodulin (DAVIES et al. 1996, VENKATESAN et al. 2000, KOLB et al. 2001, STOKES et al. 2001, MALMSTRÖM et al. 2002), anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Die genaue Zusammensetzung der Proteoglykane innerhalb der periglandulären Fibrose muss daher mit weiterführenden, ggf. immunhistologischen Untersuchungen abgeklärt werden. Die Akkumulation dieser Proteoglykane ist vermutlich auf die bei destruierenden Endometrosen verstärkt auftretenden Myofibroblasten zurückzuführen. Diese aktiv differenzierten „fibrotischen“ Stromazellen entsprechen dann dem sekretorischen Phänotyp des Myofibroblasten (vgl. S. 82f), der auch in anderen Gewebsfibrosen durch eine verstärkte Synthese von Matrixkomponenten zu deren Akkumulation beiträgt (KUHN u. McDONALD 1991, BACHEM et al. 1993, ZHANG et al. 2004). Zur möglichen Regulation der ECM-Synthese und deren funktioneller Bedeutung im Rahmen der Endometrose siehe Kap. 5.4 (S. 86ff).

Drüsenepithelien innerhalb fibrotischer Herde:

Glanduläre Fehldifferenzierungen in Verbindung mit einer Endometrose werden von zahlreichen Autoren beschrieben. Neben morphologisch und enzymhistochemisch erkennbaren Alterationen (BRUNCKHORST et al. 1991, SCHOON et al. 1995) ist ultrastrukturell (RAILA 2000) eine intermediäre Differenzierung der Epithelien (zeitgleiches Auftreten proliferativer und sekretorischer Merkmale innerhalb einer Zelle) nachweisbar. Sich teils widersprechende Ergebnisse treten hingegen bei den von verschiedenen Autoren durchgeführten Hormonrezeptoranalysen auf. So können WALTER et al. (2001b) keine Abweichungen vom unveränderten glandulären Epithel feststellen, wohingegen GERSTENBERG et al. (1999) und AUPPERLE et al. (2000) eine deutliche Zyklusasynchronizität nachweisen. Letztere betonen zudem das heterogene Erscheinungsbild der Hormonrezeptorexpression zwischen den verschiedenen fibrotischen Herden einer Biopsie. Eine systematische Untersuchung der glandulären ER- und PR-Expression im Rahmen der verschiedenen Erscheinungsformen der Endometrose wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. So fällt in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der glandulären Hormonrezeptorexpression und der Differenzierung der periglandulären Fibrose auf. Während innerhalb aktiv differenzierter fibrotischer Herde häufig eine verstärkte Hormonrezeptorexpression auftritt, ist eine eher verringerte glanduläre ER- und PR-Expression in inaktiven Fibrosen nachweisbar. Parakrine Wirkungsmechanismen könnten dieses Phänomen erklären. So kann am unveränderten Endometrium bzw. *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Wirkungen der Steroidhormone durch die stromalen Hormonrezeptoren vermittelt werden (COOKE et al. 1997, KURITA et al. 1998, PIERRO et al. 2001). Zudem stellen Myofibroblasten vom sekretorischen Phänotyp eine Quelle

zahlreicher Mediatoren dar (PHAN 1996, 2002). Da die stromale Hormonrezeptorexpression innerhalb der Fibrose für eine deutliche Fehldifferenzierung der periglandulären Stromazellen spricht (vgl. S. 82), können die an das Epithel abgegebenen parakrinen Signale nicht dem tatsächlichen Zyklusstand entsprechen. Die Zyklusasynchronizität der betroffenen Uterindrüsen wäre damit die Folge der primär stromalen Fehldifferenzierung. Welche Mediatoren dabei eine Rolle spielen, kann im Rahmen dieser Arbeit nur vermutet werden, die wichtigsten im endometrialen Zyklus auftretenden Mediatoren sind u.a. EGF, TGF- α , TGF- β , PDGF und IGF (GIUDICE 1994). Zudem ist TGF- β 1 einer der bekanntesten im Rahmen fibrosierender Erkrankungen auftretenden Wachstumsfaktoren (ATAMAS 2002). Weitere v.a. auch *in vitro* Untersuchungen könnten zu diesen Fragestellungen Aufschluss geben. Die im Rahmen destruierender Endometrosen nachweisbare deutlich verminderte Expression der glandulären Hormonrezeptoren ist hingegen am ehesten auf die ausgeprägten, von RAILA (2000) auch ultrastrukturell festgestellten, epithelialen Degenerationserscheinungen zurückzuführen.

Eine weitere mögliche Ursache glandulärer Dysfunktionen sind Alterationen der epithelialen Basallamina, die, u.a. als Mediator der vom Stroma ausgehenden Signale, eine intakte parakrine Beziehung zwischen Stroma und Epithel sicherstellt. (LIN u. BISSELL 1993, ARNOLD et al. 2001). Schon RAILA (2000) beobachtet elektronenmikroskopisch eine bereits im Anfangsstadium der Endometrose auftretende, sich mit zunehmendem Endometrosegrad verstärkende Alteration der glandulären Basallamina. Ähnliche Befunde sind auch mittels der in dieser Arbeit verwendeten lichtmikroskopischen Methoden nachweisbar. Die dabei teils verdickt, teils aufgefasert und, abhängig vom Grad der Destruktion, diskontinuierlich erscheinende Basallamina ist wahrscheinlich nicht mehr in der Lage, die komplexen, wechselseitigen parakrinen Beziehungen zu steuern. Zudem könnte die ausgeprägte Diskontinuität, neben den von RAILA (2000) beobachteten stromal-epithelialen Kontakten, auch direkte Kontakte epithelialer Zelloberflächenintegrine mit der umgebenden, durch die Fibrose stark veränderten ECM ermöglichen. Solche Kontakte würden ebenfalls das Entstehen einer glandulären Fehldifferenzierung erklären. Zur möglichen Bedeutung der alterierten Basallamina beim Voranschreiten des fibrotischen Prozesses siehe Kap. 5.4 (S. 86ff).

Eine vorwiegend basale, epitheliale Vimentinexpression innerhalb fibrotischer Herde beobachten AUPPERLE et al. (2004) in Abhängigkeit vom Endometrosegrad und vermuten eine erhöhte Proliferationsaktivität der betroffenen Uterindrüsen. Eine solche kann jedoch in den eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Zudem tritt in der vorliegenden Arbeit, unabhängig vom Grad der Erkrankung, eine deutlich erhöhte epitheliale Vimentinexpression im Rahmen destruierender Endometrosen auf. Neben einer gesteigerten Proliferationsaktivität kann nach KLYMKOWSKY et al. (1989) auch der Verlust der Zell-Zell-Kontakte zu einer atypischen Vimentinexpression beitragen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den hier nachgewiesenen Zusammenhang zwischen der Vimentinexpression und der Destruktion der glandulären Epithelien.

5.4 Hypothesen zur Ätiopathogenese der equinen Endometrose

Aus den in Kap. 5.3.2 (S. 80ff) und 5.3.3 (S. 82ff) dargestellten Ergebnissen können unter Einbeziehung der aktuellen Literatur hinsichtlich der Ätiopathogenese der Endometrose die nachfolgenden Hypothesen abgeleitet werden. Die Abb. 5.1 (S. 89) gibt einen schematischen Überblick zu den hier vorgestellten Überlegungen.

Denkbar ist, dass eine epitheliale Alteration, die möglicherweise mit einer Aktivierung der Epithelien und einer partiellen Verdickung der Basallamina einhergeht, das initiale Ereignis in der Entstehung eines fibrotischen Herdes im Rahmen der Endometrose darstellt. Bereits PENNEY und ROSENKRANS (1984) vermuten, dass eine geschädigte Basallamina reparative Prozesse stimuliert, die zunächst in einer nur elektronenmikroskopisch erkennbaren Verdickung resultieren. Die Faktoren, die eine solche Alteration begünstigen könnten, sind vielfältig. So wäre eine periglandulär lokalisierte Endometritis ebenso denkbar wie beispielsweise fokale Hypoxien durch ausgeprägte Angiosklerosen, eine „überschießende Wundheilung“ nach mechanisch bedingter Verletzung des Epithels oder eine Störung des physiologischen *turnovers* der Basalmembran. Nur eine intakte Basallamina supprimiert jedoch die Zellaktivierung und die epitheliale TGF- β 1 Synthese (STREULI et al. 1993), so dass eine Basallaminaalteration möglicherweise zu einer Aktivierung der Zellen und einer fokalen epithelialen Überexpression des profibrotischen Wachstumsfaktors (WF) TGF- β 1 führt. Letzterer wirkt nicht nur stimulierend auf die Migration von Fibroblasten (POSTLETHWAITE et al. 1992), sondern steigert auch deren ECM-Synthese (BORDER u. NOBLE 1994, BRANTON u. KOPP 1999). Diese Wirkungsmechanismen könnten in der „beginnenden Fibrose“ resultieren, die neben einer dezenten Basallaminaalteration durch die fokale periglanduläre Akkumulation von Stromazellen und deren Kollagensynthese charakterisiert ist (RAILA 2000). Eine von der Autorin vermutete stromale Fehldifferenzierung als Auslöser der Endometrose kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

Neben TGF- β 1 existieren zahlreiche von aktivierten/alterierten Epithelien synthetisierte profibrotische WF und Zytokine, wie beispielsweise PDGF, TGF- α , TNF- α , CTGF u.a.. Diese bei verschiedenen Gewebsfibrosen nachgewiesenen Mediatoren können zusammen mit TGF- β 1 die Fibroblastenproliferation, deren Umdifferenzierung zu Myofibroblasten sowie eine gesteigerte ECM-Synthese induzieren (ANTONIADES et al. 1990, KAPANCI et al. 1995, ALLEN et al. 1999, HARDIE et al. 2003). Ein solches Milieu teils synergistisch, teils autoinduzierend wirkender WF und Zytokine könnte möglicherweise, wie auch für anderen Gewebsfibrosen diskutiert (BORDER u. NOBLE 1994, MENKE u. ADLER 2002), in Form einer „überschießenden Wundheilung“ zu der Entstehung der für die Endometrose typischen fibrotischen Herde führen.

Welche äußeren Faktoren jedoch zur Aufrechterhaltung der aktiven Fibrose beitragen, bleibt im wesentlichen unklar. Die Ergebnisse zeigen, dass eine gleichzeitig auftretende Endometritis zu einer vorübergehenden metabolischen Aktivierung involvierter Stromazellen/Myofibroblasten führen

kann. Zyklische und jahreszeitlich bedingte endokrine Variationen sind ohne erkennbaren Einfluss. Auch Trächtigkeiten scheinen nicht an der Pathogenese der Endometrose beteiligt zu sein. Verschiedene innerhalb der einzelnen fibrotischen Herde ablaufende Prozesse könnten nicht nur an der Entstehung sondern auch an der Aufrechterhaltung aktiver Endometrosen beteiligt sein. So induziert der autoinduktive TGF- β 1 (BASCUM et al. 1989) die Transformation der Fibroblasten (PHAN 1996) und bedingt damit wahrscheinlich die zunehmende Differenzierung der Myofibroblasten aus den periglandulären Stromazellen, er verhindert auch deren Apoptose (ZHANG u. PHAN 1999). Letzteres könnte eine Erklärung für die trotz unveränderter Proliferationsaktivität auftretende Akkumulation der Myofibroblasten im Rahmen der Endometrose sein.

Die Persistenz der Myofibroblasten, die in ihrem aktivierten sekretorischen Phänotyp zahlreiche Enzyme und ECM Komponenten freisetzen (ZHANG et al. 1994, PHAN 1996), wird als Anzeichen für die Progressivität einer Fibrose angesehen (PHAN 2002). Die Fähigkeit zur Freisetzung der die Basallamina degradierenden Metalloproteinasen-2 und -9 durch Myofibroblasten (SELMAN et al. 2000, RAMOS et al. 2001) führt dabei möglicherweise zu den in dieser Arbeit beobachteten zunehmenden Basallaminaalterationen. Die im Rahmen der Endometrose auftretende umfangreiche ECM-Ablagerung könnte neben einer verstärkten Synthese durch Myofibroblasten auch auf die für andere Gewebsfibrosen beschriebene (KURODA u. SHINKAI 1997, FUKUDA et al. 1998, SELMAN et al. 2000) Imbalanz in den die Matrixhomoöstase regulierenden MMPs und ihrer Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen) zurückgeführt werden.

Die v.a. im Rahmen aktiver, destruierender Endometrosen zunehmende Akkumulation von Komponenten der ECM trägt wahrscheinlich ebenfalls zur Aufrechterhaltung des fibrotischen Prozesses bei. So organisiert Fibronectin abgelagertes Kollagen (GRINNELL et al. 1981), wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten (RENNARD et al. 1981) und vermittelt deren Adhäsion an die ECM (RUOSLAHTI et al. 1981). Die Proteoglykane stellen, durch Beeinflussung der Wasserbindung des Gewebes, ein profibrotisches, die Zellmigration und Zellproliferation begünstigendes Milieu mit einer lockeren, ödematösen Matrix. Zudem begünstigen sie über die Hemmung der Zell-Matrix Adhäsion einen undifferenzierten Zustand der Zellen und binden an Kollagen, Laminin und Fibronectin (TOOLE 1991, BENSADOUN et al. 1996, STOKES et al. 2001).

Das Erscheinungsbild der aktiven, destruierenden Endometrose stellt vermutlich das Endstadium der beschriebenen Prozesse dar. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete „Einbruch“ der „fibrotischen“ Stromazellen/Myofibroblasten in das Drüsenlumen entspräche dann der letztendlichen Organisation eines fibrotischen Herdes und bedingt wahrscheinlich die bei hochgradigen Endometrosen zu beobachtende Stromafibrose (SCHOON et al. 1995).

Faktoren, die das Entstehen einer inaktiven Endometrose begünstigen, konnten im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Verschiedene Autoren beschreiben einen kontraktilen Phänotyp des Myofibroblasten, der durch die zusätzliche Expression von Desmin gekennzeichnet ist

(HOLSTEIN et al. 1996, MALMSTRÖM et al. 2002). Ein dementsprechend gehäuftes Auftreten des VAD-Typs im Rahmen inaktiver Fibrosen kann in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Das histomorphologische Erscheinungsbild inaktiver Endometrosen spricht jedoch für das Vorliegen einer vermehrten Kontraktilität. So begünstigt die parallel zur Achse der Uterindrüsen verlaufende Anordnung der „fibrotischen“ Stromazellen deren Kontraktilität. Zudem tritt eine glandulär zystische Dilatation, die sich aus diesen kontraktilen Eigenschaften ergeben könnte, gehäuft bei inaktiven Endometrosen auf. Auch das Erscheinungsbild der inaktiven, destruierenden Endometrose lässt sich auf eine übermäßige Kontraktion periglandulär angelagerter Myofibroblasten zurückführen, die in einer mechanischen Überbelastung der betroffenen Epithelien resultiert und die multifokalen Destruktionserscheinungen bedingt. Eine Aktivierung der Fibrose kann vermutlich jederzeit durch das Auftreten einer Endometritis erfolgen (vgl. Kap. 5.3.2, S.80f)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das variable Erscheinungsbild der Endometrose innerhalb einer Biopsie am ehesten auf zeitlich unterschiedliche fibrotische Prozesse zurückzuführen ist. Da die, unabhängig vom Endometrosegrad und von der Anzahl der fibrotischen Schichten auftretende Destruktion des glandulären Epithels vermutlich das Resultat eines fortgeschrittenen Prozesses darstellt, wäre eine Reevaluierung der von KENNEY (1978) (vgl. Kap. 2.6.5.2 und Tab. 2.6, S. 23) eingeführten Einteilung, nach der auch die Anzahl der periglandulären Schichten über den Grad der Endometrose und damit über die Abfohlwahrscheinlichkeit entscheidet, sinnvoll. Nach den vorliegenden Ergebnissen sollte neben dem Grad der Destruktion v.a. auch die Zahl der beobachteten fibrotischen Herde unter Berücksichtigung der Ausbildung von Einzeldrüsen und Drüsennestern in die Beurteilung des Endometrosegrades einfließen.

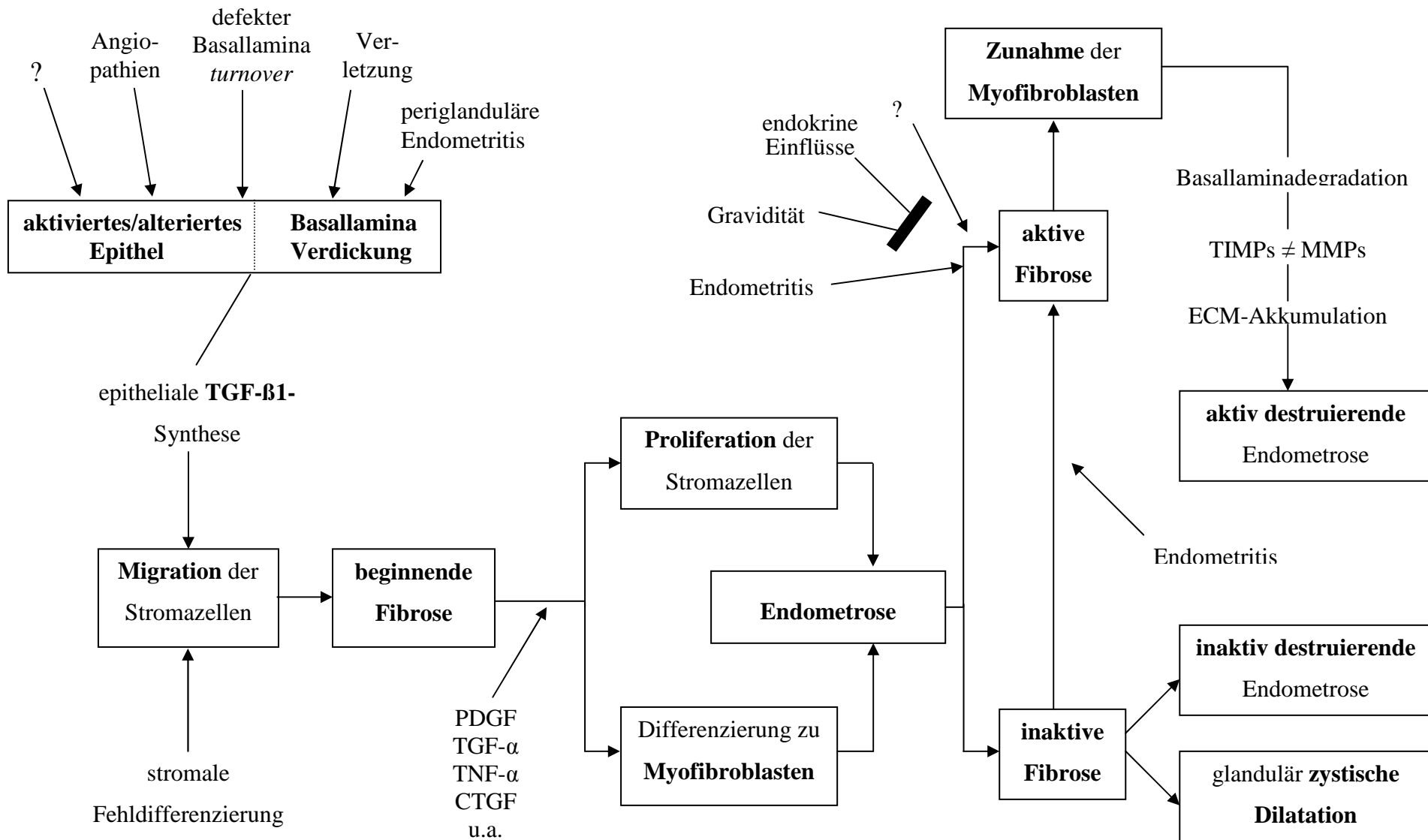


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Hypothesen zur Ätiopathogenese der Endometrose

5.5 Zyklische Veränderungen der endometrial synthetisierten Proteine und des Glykogens

5.5.1 Uteroglobulin (UGL)/Sekretoglobulin

Während MÜLLER-SCHÖTTLE et al. (2003) einen kontinuierlichen Anstieg des equinen UGLs vom ersten bis zum zehnten Tag p.ov. nachweisen, treten in der hier vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stuten auf. Lediglich die Stute 8 zeigt ein der o.a. Studie entsprechendes Expressionsmuster. Die Stuten 9 und 10 hingegen weisen sowohl in der Proliferations- als auch in der Sekretionsphase einen Anstieg des Proteins auf. Ein ähnlich variables Erscheinungsbild beschreiben auch KIKUKAWA et al. (1988) im humanen Endometrium. Möglicherweise sind solche Unterschiede auf individuelle Serumhormonwerte zurückzuführen.

Hinsichtlich der hier festgestellten hohen UGL-Färbintensität im Östrus treten deutliche Unterschiede zu den Literaturangaben auf. So weisen BEIER-HELLWIG et al. (1995) das Protein in den *uterine secretions* der Stute während des Östrus in deutlich geringeren Konzentrationen nach als im Interöstrus. Entsprechende, mittels unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erhobene Ergebnisse liegen auch für Mensch und Kaninchen vor (KIKUKAWA et al. 1988, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 1999, 2000, KRUSCHE et al. 2000). Ob das in der eigenen Arbeit zum Zeitpunkt des Östrus intrazellulär nachgewiesene UGL auch freigesetzt wird, kann anhand der Endometriumbiopsien jedoch nicht beurteilt werden. Für die von BEIER (2000) beschriebene, unter Östrogeneinfluss auftretende, vorwiegend intrazelluläre Akkumulation des Proteins spricht das mit dem Verlauf des Zyklus variierende intrazytoplasmatische Expressionsmuster des UGLs. Während im Östrus ein eher diffuses Reaktionsmuster auftritt, könnte die apikale, intrazytoplasmatische Expression des Proteins während des Interöstrus einer vorübergehenden „Entleerung“ der Drüsenepithelien entsprechen. Gestützt wird diese Hypothese durch das im mittleren Interöstrus vermehrt im Drüsenlumen nachweisbare positive Material. Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz für den Einfluss des Östrogens auf die Synthese des UGL (BEIER-HELLWIG et al. 1995, KRUSCHE et al. 2000).

In vivo und *in vitro* ist eine mehrtägige Verzögerung in der Expression des UGL nach Progesteroneinwirkung zu beobachten. Diese wird auf eine unter Progesteroneinfluss stattfindende zeitintensive epitheliale Differenzierung zurückgeführt (KRUSCHE 1998, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2000). Dementsprechend tritt in der vorliegenden Arbeit der im mittleren und späten Interöstrus nachweisbare Anstieg der UGL-Expression nach dem Abfall der zirkulierenden Progesteronkonzentration auf. Möglicherweise kann jedoch ein bereits ausdifferenziertes Epithel unter erneut ansteigenden Progesteronkonzentrationen rasch mit einer verstärkten Synthese des Proteins reagieren. Damit könnte die im Präöstrus der Stute 9 beobachtete enge Assoziation der erneut ansteigenden UGL- und Progesteronkonzentration erklärt werden.

Die Expression des UGL, v.a. in den glandulären und weniger in den luminalen Epithelien,

entspricht der anderer Spezies (HEGELE-HARTUNG u. BEIER 1986, KRUSCHE et al. 2000, MÜLLER-SCHÖTTLE et al. 2000). Im Gegensatz zu MÜLLER-SCHÖTTLE et al. (2003), die das Protein im equinen Endometrium ab dem 5. Tag p.ov. in allen Uterindrüsen nachweisen können, lässt das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Expressionsmuster auf einen zwischen den unterschiedlichen Uterindrüsen auftretenden, zyklusabhängigen Wechsel der Proteinsynthese schließen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die bereits von GERSTENBERG et al. (1999) vermuteten funktionellen Unterschiede zwischen den oberflächlich und tief gelegenen glandulären Epithelien.

5.5.2 Uteroferrin (UF)

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg des UF-Nachweises im mittleren bzw. mittleren und späten Interöstrus, wie auch der nachfolgende starke Abfall der UF-Expression, stimmt mit den von ZAVY et al. (1979b,1982) bei der Stute erhobenen gelelektrophoretischen Befunden überein.

Die von KNIGHT et al. (1973) und von SCHLOSNAGLE et al. (1974) beobachtete mehrtägige Verzögerung in der progesteronabhängigen Induktion der UF-mRNA kann auch beim Nachweis des Proteins in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Dies erklärt zudem aufgrund der individuellen Hormonprofile die bei den Stuten auftretenden geringfügigen Unterschiede hinsichtlich des Zeitpunktes der maximalen Expression des Proteins. Inwieweit dieses Phänomen, wie auch beim UGL vermutet, auf eine epitheliale Differenzierung zurückzuführen ist (SIMMEN et al. 1988) oder ob zunächst eine zeitintensive Zunahme der Prolaktin-Rezeptoren induziert wird, die in einem positiven *feedback-loop* die Akkumulation von funktionalen Progesteronrezeptoren bedingen (FLISS et al. 1991), kann im Rahmen dieser Studie nicht festgestellt werden. Eine Untersuchung des vorliegenden Materials hinsichtlich der Expression der Prolaktin-Rezeptoren könnte hierüber Aufschluss bringen. Interessanterweise zeigt die Stute 9 im Gegensatz zum UGL keine mit dem Anstieg des Progesterons assoziierte Zunahme der UF-Expression. Möglicherweise ist dies ein Indiz für die unterschiedlichen Regulationsmechanismen beider Proteine.

Entsprechend den Literaturangaben bei der Sau (FAZLEABAS et al. 1985) und bei trächtigen Stuten (WOODING et al. 2000) kann in den eigenen Untersuchungen das UF vorwiegend im glandulären Epithel nachgewiesen werden. Die deutliche Betonung mittlerer und basal gelegener Uterindrüsen in der Sekretionsphase sowie die im gesamten Zyklusverlauf nahezu gleichbleibende Expressionsintensität des Proteins in apikalen Drüsenanteilen unterstützt, ebenso wie beim UGL, die von GILBERT (1992) und von GERSTENBERG et al. (1999) aufgestellte Hypothese der unterschiedlichen Funktionalität epithelialer Zellpopulationen im equinen Endometrium.

5.5.3 Calbindin_{D9k} (CAL)

Während KRISINGER et al. (1995) bei der Sau eine inhibitorische Wirkung des Progesterons auf die CAL-Synthese feststellen, weisen INPANBUTR et al. (1994) und TATSUMI et al. (1999) im bovinen bzw. murinen Zyklusverlauf eine Progesteronabhängigkeit der CAL-Synthese nach. Die während des frühen und mittleren Interöstrus bei den Stuten 9 und 10 auftretende maximale Expression des CAL zeigt, übereinstimmend mit den bovinen/murinen Verhältnissen, eine enge Assoziation mit den im Blutplasma ermittelten Progesteronwerten. Im Gegensatz zum UGL und UF erfolgt dabei jedoch eine deutlich schnellere Reaktion auf die ansteigenden zirkulierenden Progesteronkonzentrationen. Die gleichzeitig mit dem Progesteron ansteigende verstärkte CAL-Expression im Präöstrus der Stute 9 ist ebenfalls ein Hinweis auf die Progesteronkontrolle der equinen CAL-Synthese. Die gleichmäßig niedrige Expressionsintensität des Proteins im gesamten Zyklusverlauf der Stute 8 ist vermutlich auf das enge „Zeitfenster“ beim Nachweis des Proteins zurückzuführen. Denkbar wäre, dass die zwischen den verschiedenen Spezies auftretenden Unterschiede in der CAL-Regulation die unterschiedlichen „Funktionen“ des Proteins im Zyklus verschiedener Spezies repräsentieren

Ein „mosaikartiges“ Reaktionsmuster des CAL innerhalb der Biopsie wie auch innerhalb der Drüsenquerschnitte wird bei verschiedenen Spezies beschrieben (MATHIEU et al. 1989, INPANBUTR et al. 1994, WOODING et al. 2000). Gegen die Vermutung von MATHIEU et al. (1989), die dieses Expressionsmuster im Eileiter der Ratte auf zilierte und nicht zilierte Zellen zurückführen, spricht der in den eigenen Untersuchungen beobachtete gleichmäßige Nachweis des Proteins in allen Drüsenepithelien. Auch kann ELLENBERGER (mündliche Mitteilung, Leipzig, 2004) in fehdifferenzierten equinen Endometrien eine massive CAL-Expression in nahezu allen glandulären Epithelien beobachten. Ein funktioneller Unterschied zwischen den einzelnen Epithelien eines Drüsenquerschnittes ist daher wahrscheinlicher. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten intranukleären Anfärbungen, die auch WOODING et al. (2000) bei trächtigen Stuten mittels immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen beobachten, bleiben hinsichtlich ihrer Bedeutung unklar.

5.5.4 Uterokalin (UKA)

Übereinstimmend mit den Befunden von STEWART et al. (1995) kann bei zwei Stuten (9,10) eine maximale Expression des UKAs im mittleren Interöstrus beobachtet werden. Der bei der Stute 8 auftretende Anstieg der UKA-Konzentration im frühen Interöstrus könnte auf das individuelle Hormonprofil dieser Stute zurückgeführt werden. So beschreiben auch STEWART et al. (1995) und CROSSETT et al. (1996) eine enge Assoziation zwischen der zunehmenden Konzentration des Proteins und den gleichzeitig ansteigenden peripher zirkulierenden Progesteronwerten. Die Autoren betonen dabei jedoch, dass weitere bisher unbekannte Mechanismen in die Induktion/Inhibition des

Proteins involviert sein müssen. Dass Progesteron nicht der alleinige Regulator der UKA-Expression sein kann, zeigen auch die eigenen Untersuchungen. Es bleibt fraglich, ob der bei der Stute 8 beobachtete zweite Anstieg der UKA-Konzentration im späten Interöstrus mit den gleichzeitig stark erhöhten Östrogenwerten assoziiert ist, oder ob, ähnlich wie bei UGL (KLEISSANFRANCISCO et al. 1993) und UF (FLISS et al. 1991), auch hier das Prolaktin eine Rolle spielt. Hinweise auf weitere Kontrollmechanismen liefert zudem die fehlende Reaktion der UKA-Expression auf die im Präöstrus der Stute 9 ansteigende Progesteronkonzentration.

Ebenso wie in den Untersuchungen von CROSSETT et al. (1998) ist in der vorliegenden Arbeit im Verlauf des Zyklus eine von den basalen Uterindrüsen zu den apikalen Drüsenepithelien hin zunehmende Expression des UKA zu beobachten. Der dabei auftretende verstärkte Nachweis im Bereich apikaler Drüsen zur Zeit der maximalen Expression zeigt erneut die funktionellen Unterschiede zwischen den endometrialen Epithelien. Möglicherweise kann die bei der Stute 9 beobachtete verstärkte Färbintensität im luminalen Epithel diesem Aspekt zugeordnet werden. CROSSETT et al. (1998) führen dieses Erscheinungsbild hingegen auf die lumenseitige Akkumulation und Reabsorption des UKA zurück.

5.5.5 Glykogen (GLY)

Die im eigenen Untersuchungsgut nachweisbare deutlich höhere GLY-Konzentration in der Sekretionsphase des Zyklus stimmt sowohl mit den Literaturangaben für die Stute (GILBERT 1992, FERREIRA-DIAS et al. 1999) als auch mit dem Reaktionsmuster anderer Spezies, wie beispielsweise der Sau, dem Menschen und der Katze überein (SCHNURRBUSCH u. ERICES 1979, MILWIDSKY et al. 1980, VERHAGE et al. 1984, KOWALSKI u. CHATTERTON 1997). Die Stimulation der Glukoneogenese durch Progesteron ist unbestritten (SHAPIRO et al. 1980, JAFFE et al. 1985, WOLLENHAUPT et al. 1988). Entsprechend dazu kann in der vorliegenden Studie bei zwei Stuten (9,10) eine vom Östrus bis zum Interöstrus sich verstärkende, eng mit dem Progesteron-Anstieg assoziierte zunehmende GLY-Konzentration nachgewiesen werden. Lediglich die Stute 8 weist ein davon abweichendes Reaktionsmuster auf, das mit den hier durchgeführten Untersuchungsmethoden nicht erklärt werden kann. Der genaue Regulationsmechanismus bleibt allerdings ungeklärt. SU et al. (1996) vermuten, dass eine Veränderung des Katabolismus verschiedener, die Glykogen-Synthetase beeinflussender Enzyme an der Regulation der Glykogenakkumulation im Verlauf des Zyklus beteiligt ist. Das hier dokumentierte Reaktionsmuster der Stute 8 ist möglicherweise die Folge eines Defektes in der Kontrolle bzw. in der Aktivität eines oder mehrerer dieser regulatorischen Enzyme.

Während das GLY beim Schwein auch im luminalen Epithel (SCHNURRBUSCH u. ERICES 1979), beim Menschen in den stromalen Körnchenzellen (SPORNITZ 1992) und bei der Ratte im Stroma nachzuweisen ist (EJSMONT-SZUMANSKA 1968), tritt es bei der Stute, übereinstimmend

mit den Arbeiten von FREEMAN et al. (1990) und GILBERT (1992), ausschließlich im glandulären Epithel auf. GILBERT (1992) beobachtet das GLY in den tiefer gelegenen Uterindrüsen und schlussfolgert eine funktionelle Zweiteilung des Endometriums (luminal, glandulär). Ein Indiz für eine solche Unterteilung des endometrialen Epithels ist die in der vorliegenden Studie festgestellte Betonung mittlerer Uterindrüsen beim Nachweis des GLY. Das zu beobachtende „mosaikartige“ Reaktionsmuster des GLY innerhalb einzelner Drüsenquerschnitte lässt sich auf funktionelle Unterschiede zwischen einzelnen Drüsenepithelien zurückführen und geht konform mit den Befunden von SPORNITZ (1992), nach dem nicht alle Epithelien gleichzeitig auf den Progesteron-Peak reagieren. Der verstärkte Nachweis von GLY-Granula an der apikalen Zellgrenze ist vermutlich, ähnlich wie beim UGL, auf eine vorübergehende „Entleerung“ der Zelle nach dem Peak der GLY-Akkumulation zurückzuführen. Auch SPORNITZ (1992) beobachtet elektronenmikroskopisch mit zunehmender GLY-Konzentration eine Verlagerung der GLY-Granula von basal nach apikal.

5.6 Veränderungen des glandulären Protein- und Kohlenhydratmusters im Rahmen der Endometrose

In der bisher einzigen immunhistologischen Untersuchung des endometrialen Proteinmusters im Rahmen der Endometrose beschreiben STEWART et al. (2000a) eine deutliche Asynchronität der UKA-Expression in von der Endometrose betroffenen Drüsennestern. Die Autoren weisen dabei v.a. ein dem jeweiligen Zyklusstand entgegengesetztes Expressionsmuster nach. In der vorliegenden Arbeit hingegen tritt ein solches „gegenläufiges“ Erscheinungsbild seltener auf. Die glandulären Epithelien innerhalb der fibrotischen Herde zeigen sowohl qualitativ als auch quantitativ eine deutliche Variabilität hinsichtlich des Nachweises der uterinen Proteine und des GLY. So tritt mit Ausnahme des UF, in den meisten endometrotisch veränderten Drüsenepithelien eine schwächere Reaktionsintensität im Vergleich zu den unveränderten Uterindrüsen auf. Dies gilt insbesondere für destruierende Endometrosen. Eine deutlichere Expression innerhalb fibrotischer Areale ist bei nicht destruierenden Endometrosen selten, bei destruierenden Fibrosen fast nie nachzuweisen. Die dabei auftretenden Differenzen zu den Untersuchungen von STEWART et al. (2000a) sind wahrscheinlich am ehesten auf die in der eigenen Studie durchgeführte hinsichtlich der histopathologischen Befunde systematischere Untersuchung eines deutlich umfangreicheren Materials zurückzuführen.

Im Gegensatz zu den anderen Proteinen und dem GLY zeigt das UF ein stärker variierendes immunhistologisches Reaktionsmuster. So ist innerhalb der fibrotischen Herde deutlich häufiger eine intensivere Färbeintensität als in den unveränderten Uterindrüsen zu beobachten. Dieses Erscheinungsbild tritt zudem auch bei ausgeprägten glandulären Degenerationen im Rahmen destruierender Endometrosen auf. Ein ähnliches Erscheinungsbild beobachten auch BRUNCKHORST et al. (1991), die mittels histochemischer Methoden in den von der Fibrose

betroffenen Drüsenepithelien eine erhöhte Aktivität einer sauren Phosphatase, möglicherweise UF, nachweisen können. Ein verstärkter Nachweis einer dem UF eng verwandten sauren Phosphatase ist bei Erkrankungen des hämatopoetischen Gewebes zu beobachten (KETCHAM et al. 1985). Die zugrundeliegende Ätiopathogenese ist dabei ebenso wie in der vorliegenden Arbeit unklar. Ein Zusammenhang mit den enzymatischen Eigenschaften des Uteroferrins wäre jedoch denkbar.

Übereinstimmend mit den lektinhistochemischen Untersuchungen von WALTER et al. (2000b) können auch in der vorliegenden Arbeit die für das luminale Epithel typischen Proteoglykane innerhalb einzelner, tief gelegener fibrotischer Herde nachgewiesen werden. Dieses Phänomen tritt vorwiegend in zystisch dilatierten/inaktiven Endometrosen auf und ist daher möglicherweise auf fehlende inhibitorische Stimuli der periglandulären Stromazellen zurückzuführen (vgl. Kap. 5.3.3, S. 82f).

Interessanterweise sind die in den einzelnen fibrotischen Herden auftretenden Veränderungen des Protein- und Kohlenhydratmusters, die teils den gesamten Drüsenquerschnitt, teils nur einzelne Epithelien betreffen, meist nur geringgradig ausgeprägt. Diese Ergebnisse unterstützen die Befunde von HEIN (2000), die mittels gelektrophoretischer Untersuchungen nur bei zwei Stuten mit gering- bis mittelgradiger Endometrose eine Abweichung in der Zusammensetzung der Uterinmilch feststellen kann. Wahrscheinlich führt erst die Summe zahlreicher fibrotischer Herde im Rahmen hochgradiger Endometrosen zu der mittels Uterusspülproben nachweisbaren Veränderung des sekretorischen Proteinmusters (McDOWELL et al. 1987, BADER et al. 1997).

5.7 Funktionelle Bedeutung der im Rahmen der Endometrose auftretenden Veränderungen des glandulären Protein- und Kohlenhydratmusters

Anhand der erhobenen Befunde lassen sich funktionell unterschiedliche, sich auf den entwickelnden Konzeptus negativ auswirkende Faktoren ableiten (Abb. 5.2, S. 98).

Die Endometrose bedingt, möglicherweise durch

- die fehlende (hormonelle) Kontrolle der fibrotischen Herde und die damit assoziierten nicht zykluskonformen parakrinen Wechselwirkungen (vgl. Kap. 5.3.3, S. 82ff),
- die fehlende bzw. diskontinuierliche Basalmembran, die auf verschiedenen Wegen die zelluläre Differenzierung beeinträchtigen kann (vgl. Kap. 5.3.3, S. 82ff),
- die ausgeprägte Destruktion der glandulären Epithelien

ein abweichendes glanduläres Protein- und Kohlenhydratmuster.

Die Assoziation der maximalen Konzentration von CAL, UKA und GLY im frühen und mittleren Interöstrus mit der Präimplantationsperiode des equinen Konzeptus unterstützt die Vermutung, dass diese Proteine und auch das GLY an der Nährstoffversorgung des Embryos direkt

(WOLLENHAUPT et al. 1984, STEWART et al. 1995, 2000) oder indirekt (JAFFE et al. 1985, INPANBUTR et al. 1994) beteiligt sind. Der im Rahmen der Endometrose nachweisbare verringerte Nachweis beider Proteine und des GLY könnte somit über einen Mangel essentieller Nährstoffe zum embryonalen Fröhrtod beitragen.

Die genaue Rolle des UGL im weiblichen Reproduktionstrakt ist derzeit noch unklar, jedoch sind aufgrund der zahlreichen bekannten Wirkungsmechanismen des Proteins verschiedene im Rahmen einer unzureichenden Expression und Sekretion des Proteins auftretende, einen frühembryonalen Fröhrtod begünstigende Faktoren denkbar. So gilt UGL als ein „natürlicher Immunsuppressor“ (DIERYNCK et al. 1996), der proinflammatorische Mediatoren ebenso supprimiert (DIERYNCK et al. 1995, 1996) wie die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (SCHIFFMANN et al. 1983, VASANTHAKUMAR et al. 1988). Ein Fehlen dieser antiinflammatorischen Eigenschaften könnte ein gehäuftes Auftreten von Endometritiden begünstigen, die nicht nur eine Disposition für frühembryonale Verluste darstellen, sondern auch zu einer vorübergehenden Aktivierung des fibrotischen Prozesses führen. Ein Schlüsselenzym könnte ,auch die durch UGL inhibierte (MUKHERJEE et al. 1999) Phospholipase A2 sein. Eine fehlende, bzw. unzureichende Hemmung dieses proinflammatorischen Enzyms würde nicht nur das Auftreten einer Endometritis begünstigen (LEVIN et al. 1986, SINGH u. KATYAL 2000), sondern auch aufgrund der Beteiligung des Enzyms am Stoffwechsel der Prostaglandine (KIKUKAWA et al. 1988) zu einer Zunahme lokaler Prostaglandinkonzentrationen beitragen. Letzteres könnte, bedingt durch die von Prostaglandin induzierte Luteolyse, in einer übermäßigen Kontraktilität des Uterus resultieren und so einen Fröhrtod begünstigen. Ein Mangel an UGL könnte weiterhin eine Veränderung der durch das Protein vermittelten fetomaternalen Immunmodulation (MUKHERJEE et al. 1982, 1983, MANJUNATH et al. 1984, VASANTHAKUMAR et al. 1988) bedingen und so die Implantation des Konzeptus verhindern. Zudem würde das Voranschreiten des fibrotischen Prozesses durch ein Fehlen der antifibrotischen Wirkungsmechanismen des UGL, das die Migration der Fibroblasten (LESUR et al. 1995) und die Ablagerung von Fibronectin (ZHANG et al. 2000) inhibiert, gefördert werden.

Eine unzureichende Sekretion des UFs könnte aufgrund seiner Wirkung als hämatopoetischer Wachstumsfaktor (BAZER et al. 1991a, LAURENZ et al. 1997) und als Transportprotein für Eisen (BAZER et al. 1975, DUCSAY et al. 1986) die embryonale Entwicklung verzögern und so einen Fröhrtod begünstigen. Des weiteren ist UF in der Lage, eine Lipidperoxidation zu induzieren (VALLET 1995), die durch andere in das Uteruslumen sezernierte Proteine (Transferrin, Retinol-Binding-Protein), möglicherweise aber auch durch die UF-assoziierten Glykoproteine gehemmt werden kann (VALLET et al. 1996). Eine durch die Endometrose bedingte gestörte Synthese dieser Proteine bzw. die im Rahmen des fibrotischen Prozesses auftretende, teils verstärkte Expression des UF resultiert in einer die Peroxidation begünstigenden Imbalanz zwischen UF und seinen

Inhibitoren. Eine solche Reaktion würde zu Zellschäden führen und damit nicht nur einen frühembryonalen Fruchttod begünstigen, sondern auch zur fortschreitenden Destruktion der glandulären Epithelien im Rahmen der Endometrose beitragen.

Eine zusätzliche Veränderung des uterinen Mikromilieus stellen die in den mittleren und basalen Drüsen sezernierten Proteoglykane dar. Letztere und zahlreiche weitere von endometrialen Strukturen sezernierte Proteine und Kohlenhydrate sind bis heute im Detail nicht identifiziert und könnten sich, bedingt durch die im Rahmen der Endometrose auftretende fehlerhafte Zusammensetzung, ebenso an der Entstehung des embryonalen Frühodes beteiligen.

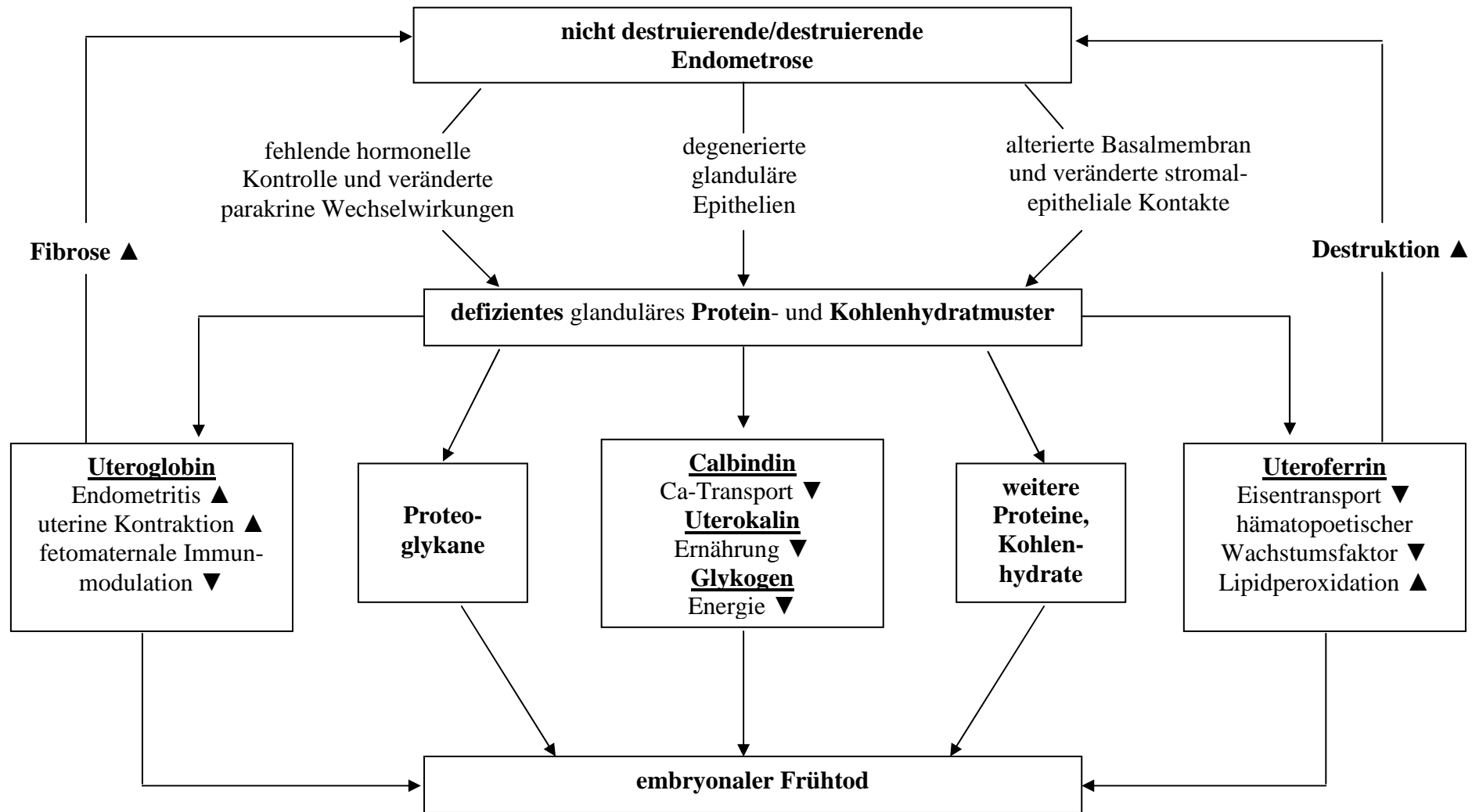


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der im Rahmen der Endometrose hypothetisch auftretenden funktionellen Konsequenzen

6 Zusammenfassung

Christine Hoffmann

Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der equinen Endometrose unter besonderer Berücksichtigung endometrialer Proteine und Kohlenhydrate

Institut für Veterinär-Pathologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Oktober 2005

158 Seiten, 32 Abbildungen, 53 Tabellen, 407 Literaturangaben, 22 Seiten Anhang

Schlüsselworte: equine Endometrose, uterines Sekretionsmuster, Proteine, Glykogen

Ziel der Studie war die histomorphologische und immunhistologische Charakterisierung unterschiedlicher Erscheinungsbilder der Endometrose sowie die Untersuchung potenzieller Einflussfaktoren auf den Verlauf der Erkrankung. Eine Charakterisierung endometrialer Proteine und des Glykogens erfolgte mittels histochemischer und neu etablierter immunhistologischer Methoden bei gesunden, zyklisch aktiven Stuten sowie bei Endometrosepatientinnen. Insgesamt wurden 795 Endometriumbiopsien, die zu verschiedenen Jahreszeiten (n=509), an definierten Zyklustagen (n=70), vor einer Belegung und nach der darauffolgenden Trächtigkeit (n=16) sowie vor und nach experimentell induzierter bakterieller Endometritis (n=200) entnommen wurden, untersucht. Zur Charakterisierung der Endometroseformen wurden neben histomorphologischen Kriterien die Steroidhormonrezeptoren, die Proliferationsaktivität, die Filamente Vimentin, Desmin und Glattmuskulatur- α -Aktin sowie das Laminin berücksichtigt. Stellvertretend für das glanduläre Protein- und Kohlenhydratmuster erfolgte die Darstellung der Proteine Uteroglobulin, Uteroferrin, Calbindin_{D9k} und Uterokalin sowie des Glykogens und der Proteoglykane.

Als Zeichen ihrer Fehldifferenzierung weisen die „fibrotischen“ Stromazellen stets eine im Vergleich zum unveränderten Stroma verminderte ER- und PR-Expression auf. Die glanduläre Hormonrezeptorexpression hingegen variiert in Abhängigkeit von dem Aktivitätszustand der Fibrose. So zeigen glanduläre Epithelien innerhalb aktiver Endometrosen eine geringgradig intensivere Steroidhormonrezeptorexpression als unveränderte Epithelien. Eine schwächere Hormonrezeptorkonzentration tritt hingegen in allen anderen Endometroseformen auf und ist insbesondere ein Kennzeichen destruierender Fibrosen. Diese Befunde zeigen deutlich die Abkopplung der fibrotischen Herde von den uterinen Kontrollmechanismen. Ein Kennzeichen destruierender fibrotischer Herde ist neben der ausgeprägten epithelialen Vimentinexpression, die als Anzeichen fortgeschrittener Alteration interpretiert werden kann, der im Vergleich zur nicht destruierenden Form erhöhte Anteil an α -GMA exprimierenden Myofibroblasten. Der sekretorisch

aktive Phänotyp des Myofibroblasten führt wahrscheinlich im Rahmen aktiver Endometrosen zu der dabei verstärkt nachweisbaren Ablagerung von Komponenten der Extrazellulärmatrix. Zudem lassen sich die umfangreichen Basallaminaalterationen auf von Myofibroblasten sezernierte Enzyme zurückführen. Der inaktive Phänotyp hingegen weist vermutlich kontraktile Eigenschaften auf und bedingt die glandulär zystische Dilatation und die mechanische Destruktion betroffener Uterindrüsen. Eine metabolische Aktivierung der Fibrose kann durch eine Endometritis begünstigt werden, hingegen zeigen weder zyklisch noch jahreszeitlich bedingte endokrine Variationen, noch vorangegangene Graviditäten einen nachweisbaren Einfluss auf den Verlauf der Endometrose. Die verschiedenen Endometroseformen sind daher als unterschiedliche, voneinander unabhängig ablaufende fibrotische Prozesse zu betrachten, die potenziell bis zu einer vollständigen Destruktion der Uterindrüsen mit nachfolgender Entwicklung einer Stromafibrose führen.

Alle untersuchten Proteine und das Glykogen zeigen im Zyklusverlauf ein typisches progesteronabhängiges Reaktionsmuster, das unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt. So erfolgt der Anstieg der Uterokalin- und Glykogenkonzentration gleichzeitig mit dem des Progesterons im frühen und mittleren Interöstrus. Auch das Calbindin_{D9k} zeigt eine enge Assoziation mit dem im mittleren Interöstrus auftretenden Progesteronpeak. Im Gegensatz dazu tritt eine zeitverzögerte, mit dem Abfall der Progesteronwerte korrelierte Expression von Uteroglobulin und Uteroferrin im mittleren und späten Interöstrus auf. Eine Beeinflussung der Uteroglobulin-Expression durch Östrogen ist zudem während des Östrus zu beobachten. Die glandulären Epithelien innerhalb fibrotischer Herde zeigen meist eine Zyklusasynchronität des endometrialen Protein- und Kohlenhydratmusters, die im Vergleich zu unveränderten Uterindrüsen häufig mit einer schwächeren Reaktionsintensität einhergeht. Dies gilt v.a. für destruierende Endometrosen. Eine Ausnahme stellt jedoch das Uteroferrin dar, das auch innerhalb destruierender fibrotischer Herde häufig in einer intensiveren Expression verglichen mit unveränderten Epithelien zu beobachten ist. Einzelne basale Uterindrüsen weisen zudem das für das luminale Epithel typische Färbemuster der Proteoglykane auf. Diese Resultate werden als Hinweis für eine fertilitätsmindernde Beeinflussung des uterinen Mikromilieus im Rahmen der Endometrose interpretiert. Da die beschriebenen Alterationen der uterinen Proteine und Kohlenhydrate meist in geringgradiger Ausprägung auftreten, führt erst die Summe zahlreicher fibrotischer Herde im Rahmen mittel- bis hochgradiger Endometrosen zu der mittels Uterusspülproben nachweisbaren Abweichung des sekretorischen Proteinmusters. Mit den hier vorgestellten neuen Methoden besteht nun die Möglichkeit, anhand einer Endometriumbiopsie eine morphologisch-funktionelle Beurteilung der uterinen Sekretion im Rahmen fertilitätsrelevanter Erkrankungen durchzuführen.

7 Summary

Christine Hoffmann

Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine proteins and carbohydrates.

Institute of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in October 2005

158 pages, 32 figures, 53 tables, 407 references, 22 pages appendices

Keywords: equine endometrosis, uterine secretion pattern, proteins, glycogen

The aim of this study was the histomorphological and immunohistochemical characterisation of the phenotypic variations of endometrosis as well as the determination of potential etiological factors which influence the progress of the disease. Additionally, endometrial proteins and glycogen of mares suffering from endometrosis compared to healthy control mares were examined using histochemical and newly established immunohistochemical methods. In total 795 endometrial biopsies were studied. These biopsies were taken during the breeding and non breeding season (n=509), at defined days during the estrous cycle (n=70), prior to mating and after the following pregnancy (n=16), and before and after experimentally induced bacterial endometritis (n=200). Besides the conventional histopathology, the expression of the steroid hormone receptors, the intensity of proliferation, the filaments vimentin, desmin and smooth-muscle- α -actin as well as laminin were also taken into consideration to characterise the endometrosis. Representative for the glandular protein- and carbohydrate pattern of the endometrium the proteins uteroglobin, uteroferrin, calbindin_{D9k} and uterocalin as well as glycogen and proteoglycans were investigated.

The distinctly reduced estrogen and progesterone-receptor expression of the “fibrotic” stromal cells, as compared to the intact stroma, indicate their dedifferentiation. In contrast, the glandular hormone receptor expression seems to depend on the activity of the fibrosis. A mild increase of the epithelial steroid hormone receptor expression is seen in the active endometrosis as compared to unaltered epithelia. However, all other types of endometrosis show a decrease of expression which is most commonly seen in the destructive endometrosis. These results suggest stromal-epithelial interactions, which seem to be independent of the uterine hormonal control mechanism. Characteristic features of the destructive fibrosis, compared to the non-destructive fibrosis, are the pronounced epithelial vimentin expression, which can be interpreted as a sign of cellular alteration and the significantly higher amount of α -actin containing myofibroblasts. The secretorily active myofibroblast releases several enzymes which may contribute not only to the excessive

extracellular matrix accumulation but also to the progressive alteration of the basal lamina. In contrast, the inactive endometrosis displays contractile abilities of the inactive myofibroblast and causes the cystic glandular dilatation as well as the mechanical destruction of the uterine glands. As shown in this study a simultaneous endometritis can cause a metabolic activation of the “fibrotic” stromal cells. However, cyclical and seasonal endocrine changes as well as pregnancies seem to have no effects on the progress of the disease. It can be determined that the various types of endometrosis represent different stages in the fibrotic process, possibly leading to the destruction of the uterine glands and subsequently to the development of a stromal fibrosis.

During the estrous cycle the examined proteins as well as glycogen reveal a typical, progesterone-dependent reaction pattern, which is subject to different control mechanisms. In the early and mid interestrous there is a simultaneous increase of the uterocalin and glycogen staining intensity associated with the peripheral progesterone concentration. The maximal expression of calbindin_{D9k} also shows a close association to the progesterone-peak in the mid interestrous. In contrast, the delayed secretion of uteroglobin and uteroferrin which is simultaneously associated with the decrease of the progesterone concentration is detectable in mid to late interestrous. Furthermore, the uteroglobin expression depends on the estrogen concentrations during estrous. The glandular epithelia within fibrotic foci mostly reveal a protein- and carbohydrate reaction pattern which is independent from the estrous cycle. In comparison to non-affected glands most of the epithelia within periglandular fibrosis show a decreased staining intensity, especially in cases of destructive endometrosis. However, uteroferrin reveals an altered reaction pattern with high protein expression levels within areas of severe destructive endometrosis. Moreover, few basal epithelial glands, especially cystic glands, display a proteoglycan expression pattern which is otherwise typical for the luminal epithelia. These results indicate that the disturbances of the uterine microenvironment are important factors resulting in a reduced fertility in mares suffering from endometrosis.

Usually the deviations of the glandular protein and carbohydrate reaction pattern are only mild within a single periglandular fibrosis. Therefore only numerous fibrotic foci in correlation with severe endometrosis can lead to variations in the uterine protein secretion that are detectable by uterine flushings. The new methods -established in this study- enable the pathologist to perform an interpretation of the uterine secretion pattern, within the scope of fertility reducing diseases by using a single endometrial biopsy.

8 Literaturverzeichnis

Agarwal MK. Evolving trends in steroid receptor research. *Naturwissenschaften*. 1990; 77:170-5.

Akamine A, Raghu G, Narayanan AS. Human lung fibroblast subpopulations with different C1q binding and functional properties. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992; 6:382-9.

Akerbloom I, Mellon P. Repression of gene expression by steroid and thyroid hormones. In: Parker M, editor. *Nuclear hormone receptors*. New York: Academic Press; 1991.

Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*. 1990; 4:2868-80.

Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 21:693-700.

Amant F, Schurmans K, Steenkiste E, Verbist L, Abeler VM, Tulunay G, et al. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor positivity in uterine adenosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 93:680-5.

Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, et al. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 1990; 86:1055-64.

Aplin JD, Spanswick C, Behzad F. Integrins β_5 , β_3 and α_v in human and mouse endometrium: expression in stromal and glandular cells. *Mol Hum Reprod*. 1996; 2:527-34

Appleton I, Tomlinson A, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissues. Implications for their role in tissue development and repair processes. *Lab Invest*. 1993; 69:405-14.

Arici A, MacDonald PC, Casey ML. Modulation of the levels of transforming growth factor beta messenger ribonucleic acids in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod*. 1996; 54:463-9.

Armstrong EM, More IA, McSeveny D, Chatfield WR. Reappraisal of the ultrastructure of the human endometrial glandular cell. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1973; 80:446-60.

Arnold JT, Kaufman DG, Seppälä M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod*. 2001; 16:836-45.

Ashbury AC, Lyle SK. Infectious causes of infertility. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. Equine reproduction. Philadelphia, New York: Verlag Lea und Febiger; 1993. p. 381-91.

Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sciences*. 2002; 72:631-43.

Aumüller G, Seitz J, Heyns W, Kirchner C. Ultrastructural localization of uteroglobin immunoreactivity in rabbit lung and endometrium, and rat ventral prostate. *Histochemistry*. 1985; 83:413-7.

Aupperle H. Immunhistologische Untersuchungen am Endometrium der Stute [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1997.

Aupperle H, Schoon HA, Özgen S, Klug E, Bartmann CP. Immunhistological methods for the characterization of physiological and pathological endometrial function. *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:551.

Aupperle H, Özgen S, Schoon H-A, Schoon D, Hoppen HO, Tannapfel A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine vet J*. 2000; 32:228-32.

Aupperle H, Schoon D, Schoon HA. Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium. *Res Vet Sci*. 2004; 76:249-55.

Aurich C, Klug E. Endokrinologie des Sexualzyklus beim Pferd. *Prakt Tierarzt*. 1993; 74:889-95.

Aycock RS, Seyer JM. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect Tissue Res*. 1989; 23:19-31.

Bachem MG, Sell KM, Melchior R, Kropf J, Eller T, Gressner AM. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Arch B. Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1993; 63:123-30.

Bader H, Kremer H, Vogt C, Schoon HA, Beier-Hellwig K. Investigations on the protein pattern of equine uterine secretions as a functional parameter of the endometrium. *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:544.

Ball BA. Embryonic loss in mares – incidence, possible causes and diagnostic considerations. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1988; 4:67-72.

Ballardini G, Groff P, Badialli de Gorgio L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito-cell heterogeneity: desmin-negative ito-cells in normal rat liver. *Hepatology*. 1994; 19:440-6.

Bascom CC, Wolfhohl JR, Coffey RJ, Madisen L, Webb NR, Purchio AR, et al. Complex regulation of transforming growth factor β 1, β 2 and β 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors β 1 and β 2. *Mol Cell Biol*. 1989; 9:5508-15.

Bateman E, Turner-Warwick M, Adelman-Grill BC. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax*. 1981; 36:645-53.

Battegay EJ, Raines EW, Colbert T, Ross R. TNF- α stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *J Immunol*. 1995; 154:6040-7.

Bazer FW, Chen TT, Knight JW, Schlosnagle D, Baldwin NJ, Roberts RM. Presence of a progesterone-induced uterine specific, acid phosphatase in allantoic fluid of gilts. *J Anim Sci*. 1975; 41:1112-9.

Bazer FW, Worthington-White D, Fliss MFV, Gross S. Uteroferrin: a progesterone-induced hematopoietic growth factor of uterine origin. *Exp Hematol*. 1991a; 19:910-5.

Bazer FW, Thatcher WW, Matinat-Botte F, Terqui M, Lacroix MC, Bernard S, et al. Composition of uterine flushings from large white and prolific chinese meishan gilts. *Reprod Fertil Dev*. 1991b; 3:51-60.

Beato M, Candau R, Chavez S, Möws C, Truss M. Interaction of steroid hormone receptors with transcription factors involved in chromatin remodelling. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 1996; 56:47-59.

Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*. 2003; 200:504-15.

Beier HM. Das Proteinmilieu in Serum, Uterus und Blastocysten des Kaninchens vor der Nidation. In: Beermann W, Hrsg. *Biochemie der Morphogenese*. Konstanz: Dtsch. Forschungsgemeinschaft; 1966. S. 1-10.

Beier HM, Petry G, Kühnel W. Endometrial secretion and early mammalian development. In: Gibian H, Plotz EJ, editors. *Mammalian reproduction*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1970. p. 264-85.

Beier HM, Mootz U, Kühnel W. Asynchrone Eitransplantation während der verzögerten Uterussektion beim Kaninchen. *Proceedings of the 7th Int Congr Anim Reprod*; 1972; *Artif Insem Munich* 3: p. 1891-6.

Beier HM. Oviductal and uterine fluids. *J Reprod Fertil.* 1974; 37:221-37.

Beier HM. Control of implantation by interference with uteroglobin synthesis, release and utilization. In: Ludwig H, Tauber PF, editors. *Human Fertilization. Int. Workshop Essen.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1978. p. 191-203.

Beier HM. Uteroglobin and other endometrial proteins: biochemistry and biological significance in beginning pregnancy. In: proteins and steroids in early pregnancy. Beier HM, Karlson P, editors. Berlin: Springer Verlag; 1982. p. 39-71.

Beier HM. The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family.* New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 9-24.

Beier-Hellwig K, Sterzik K, Bonn B, Beier HM. Contribution to the physiology and pathology of endometrial receptivity: the determination of protein patterns in human uterine secretions. *Hum Reprod.* 1989; 4:115-20.

Beier-Hellwig K, Sterzik K, Bonn B, Hilmes U, Bygdeman M, Gemzell-Danielsson K, et al. Hormone regulation and hormone antagonist effects on protein patterns of human endometrial secretion during receptivity. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 30:143-56.

Beier-Hellwig K, Kremer H, Bonn B, Linder D, Bader H, Beier HM. Partial sequencing and identification of three proteins from equine uterine secretion regulated by progesterone. *Reprod Dom Anim.* 1995; 30:295-8.

Belz JP. Klinische, mikrobiologische, histologische und hormonanalytische Untersuchungen im Puerperium der Stute im Hinblick auf die Fertilität in den folgenden Rossen [Dissertation vet. med.]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 1994.

Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, Roberts CR. Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154:1819-28.

Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJP. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology.* 1996; 110:821-31.

Bergmann RV, Kenney RM. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. Boston: Proceedings of the 21st Annu Conv Am Assoc Equine Pract. 1975; p. 355-61.

Bergman MD, Schachter BS, Karelus K, Combatsiaris EP, Garcia T, Nelson JF. Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology*. 1992; 130:1923-30.

Bigsby RM, Aixin L, Everett L. Stromal-epithelial interactions regulating cell proliferation in the uterus. In: *Local systems in reproduction*. New York: Raven Press; 1993. p. 171-88.

Bigsby RM. Control of growth and differentiation of the endometrium: the role of tissue interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 955:110-7.

Blanchard TL, Garcia MC, Kintner LD, Kenney RM. Investigation of the representiveness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis. *Theriogenology*. 1987; 28:445-50.

Blüthgen U. Untersuchungen zu Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von eosinophilen Granulozyten im Endometrium der Stute unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommen von Sproßpilzen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2002.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994; 331:1286-92.

Bracher V, Mathias S, Allen WR. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine vet J*. 1996; 28:180-8.

Bracher V, Gerstenberg C, Allen WR. Der Einfluß von Endometrose (degenerative Endometriumserkrankungen) auf Fruchtbarkeit, Plazentation und fötale Entwicklung beim Pferd. *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:465-73.

Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*. 1991; 114:1285-94.

Bradshaw MZ, Tsai SY, Leng X, Dobson ABW, Conneely OM, O'Malley BW, et al. Studies on the mechanism of functional cooperativity between progesterone and estrogen receptors. *J Biol Chem*. 1991; 266:16684-90.

Brandt GW. The significance and interpretation of uterine biopsy in the mare. *Proceedings of the Annu Meet Am Assoc Equine Pract*. 1970; 16:279-94.

Branton MH, Kopp JB. TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect*. 1999; 1:1349-65.

Brunkhorst D, Schoon HA. Stellenwert der histologischen Untersuchung von Uterusbiopsien bei der Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute. In: Dtsch. Veterinärmed. Ges., Hrsg. 11. Tagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten. Wiesbaden: DVG; 1990. p. 181-9.

Brunkhorst D, Schoon HA, Bader H, Sieme H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität*. 1991; 7:44-51.

Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, Taylor JA, Kurita T, Cunha GR, et al. Tissue compartment-specific estrogen receptor- α participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology*. 1999; 140:484-91.

Büchi S, Waelchli RO, Corboz L, Gygax AP, Wälti RJ. Die postkoitale uterine Keimbefestigung und Endometritis bei der Stute. *Tierärztl Prax*. 1991; 19:381-5.

Buhi WC, Ducsay CA, Bazer FW, Roberts RM. Iron transfer between the purple phosphatase uteroferrin and transferrin and its possible role in iron metabolism of the fetal pig. *J Biol Chem*. 1982; 257:1712-23.

Busch LC, Würschmidt J. Glycogen bodies in ciliated cells of the rabbit endometrium. *Z mikrosk.-anat Forsch*. 1986; 100:301-7.

Campbell S, Larsen J, Seif MW, Allen TD, Knox F, Jones CJP et al. Mosaic characteristics of human endometrial epithelium *in vitro*: analysis of secretory markers and cell surface ultrastructure. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6:41-9.

Carson DD, Dutt A, Tang JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Dev Biol*. 1987; 120:228-35.

Casslen B, Sandberg T, Gustavsson B, Willen R, Nilbert M. Transforming growth factor beta 1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biol Reprod*. 1998; 58:1343-50.

Causey RC. Pathogenesis of equine endometritis due to *Streptococcus zooepidemicus* [PhD Thesis]. Louisiana: State University; 1995.

Causey RC, Ginn PS, Katz BP, Hall BJ, Anderson KJ, LeBlanc MM. Mucus production by endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance. *J Reprod Fert*. 2000; 56 Suppl:333-9.

- Chegini N, Rossi MJ, Masterson BJ. Platelet-derived-growth-factor (PDGF), Epidermal growth factor (EGF) and EGF and PDGF β -receptors in human endometrial tissue: localization and in vitro action. *Endocrinology*. 1992; 130:2373-85.
- Chegini N, Zhao Y, Williams RS, Flanders KC. Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1), TGF beta 2, TGF beta 3 and TGF beta type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I] TGF beta 1-binding sites. *Endocrinology*. 1994; 135:439-49.
- Chilton BS, Mani SK, Bullock DW. Servomechanism of prolactin and progesterone in regulating uterine gene expression. *Mol Endocrinol*. 1988; 2:1169-75.
- Chilton BS, Daniel JC. Differences in the rabbit uterine response to progesterone as influenced by growth hormone or prolactin. *J Reprod Fertil*. 1987; 79:581-7.
- Chou DHI, Lee W, McCulloch CAG. TNF- α inactivation of collagen receptors. *J Immunol*. 1996; 156:4354-62.
- Chu MC, Mor G, Lim C, Zhneg W, Parkash V, Schwartz PE. Low-grade endometrial stromal sarcoma: hormonal aspects. *Gynecol Oncol*. 2003; 90:170-6.
- Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, et al. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:6535-40.
- Cosgrove GP, Schwarz MI, Geraci MW, Brown KK, Worthen GS. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002; 121:25S-26S.
- Crosset B, Allen WR, Stewart F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem J*. 1996; 320:137-43.
- Crosset B, Suire S, Herrler A, Allen WR, Stewart F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biol Reprod*. 1998; 59:483-90.
- Daniel JC, Juneja SC. Amplification of uteroglobin secretion by alternating prolactin-progesterone administration. *J Endocr*. 1989; 122:R5-R6.
- Davies M, Kastner S, Thomas GJ. Proteoglycans: their possible role in renal fibrosis. *Kidney Int*. 1996; 49 Suppl:55-60.

Delorme AC, Danan JL, Acker MG, Ripoche MA, Mathieu H. In rat uterus 17 β -estradiol stimulates a calcium-binding protein similar to the duodenal vitamin D-dependent calcium-binding protein. *Endocrinology*. 1983; 113:1340-7.

Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Arici A. Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta*. 2002; 23:672-84.

Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int*. 1995; 19:471-6.

Desmouliere A, Gabbiani G. Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Exp Nephrol*. 1995; 3:134-9.

Dierynck I, Bernard A, Roels H, De Ley M. Potent inhibition of both human interferon- γ production and biologic activity by the clara cell protein CC16. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995; 12:205-10.

Dierynck I, Bernard A, Roels H, De Ley M. The human Clara cell protein: a biochemical and biological characterisation of a natural immunosuppressor. *Mult Scler*. 1996; 1:385-7.

Döcke F. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena, Stuttgart: Verlag Fischer; 1994. p 426-41.

Doig PA, McNight JD, Miller RB. The use of the endometrial biopsy in the infertile mare. *Can Vet J*. 1981; 22:72-6.

Ducsay CA, Buhi WC, Bazer FW; Roberts RM. Role of uteroferrin in iron transport and macromolecular uptake by allantoinic epithelium of the porcine conceptus. *Biol Reprod*. 1982; 26:729-43.

Ducsay CA, Buhi WC, Bazer FW, Roberts RM. Role of uteroferrin in placental iron transport in swine: relationship between uteroferrin levels and iron deposition in the conceptus during gestation. *J Anim Sci*. 1986; 62:706-16.

Ellenberger C. Funktionelle Pathologie des equinen Ovars und daraus resultierende endometriale Differenzierungsstörungen – Histomorphologische und immunhistologische Untersuchungen - [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.

Ejsmont-Szumanska G. Mucopolysaccharides and glycogen in rat endometrium and vaginal mucosa during the oestrous cycle. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* 1968; 6: 113-32.

- Endo M, Mori T, Yamasaki M, Yosizawa Z. Histochemical localization of estrogen induced sulfated glycoprotein in rabbit uterus. *Histochemistry*. 1976; 46:287-96.
- Evans RM. The steroid and thyreoid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988; 240:889-95.
- Evans TJ, Miller MA, Ganjam VK, Niswender KD, Eilersieck MR, Krause WJ, et al. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *Am J Vet Res*. 1998; 59:1209-14.
- Evans TJ, Ganjam VK, Miller MA, Niswender KD, Krause WJ, Youngquist RS. Relationship between the degree of endometrial periglandular fibrosis and the presence of angiotensin-converting enzyme in the equine endometrium. *J Reprod Fertil*. 2000; 56 Suppl:393-8.
- Eyden B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol*. 2001; 25:39-50.
- Facchiano A, Cordella-Miele E, Miele L, Mukherjee AB. Inhibition of pancreatic phospholipase A2 activity by uteroglobin and antiinflammin peptides: possible mechanism of action. *Life Sci*. 1990; 48:453-64.
- Farrow J, Melby J, Wiese L, Lohnas J, Welch R, Pilon AL. Binding of rhCC10 to fibronectin and its effects on cellular adhesion. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family*. New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 338-42.
- Fazleabas AT, Bazer FW, Hansen PJ, Geisert RD, Roberts RM. Differential patterns of secretory protein localization within pig uterine endometrium. *Endocrinology*. 1985; 116:240-5.
- Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Human recombinant Interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 63:182-7.
- Ferreira-Dias G, Nequin LG, King SS. Morphological characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II and III, using light and scanning electron microscopy. *Am J Vet Res*. 1994; 55:1060-5.
- Ferreira-Dias G, Nequin LG, King SS. Morphologic comparisons among equine endometrium categories I, II, and III, using light and transmission electron microscopy. *Am J Vet Res*. 1999; 60:49-55.
- Fliiss AE, Michael FJ, Chen CL, Hofig A, Bazer FW, Chou JY, et al. Regulation of the uteroferrin gene promoter in endometrial cells: interactions among estrogen, progesterone, and prolactin. *Endocrinology*. 1991; 129:697-704.

Flores JM, Rodriguez A, Sanchez J, Gomez-Cuetara C, Ramiro F. Endometriosis in mares: Incidence of histopathological alterations. *Reprod Domest Anim.* 1995; 30:61-5.

Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol.* 1996; 107:404-11.

Freeman KP, Roszel JF, Slusher SH, Payne M. Mycotic infections of the equine uterus. *Equine Pract.* 1986; 8:34-42.

Freeman KP, Roszel JF, Slusher SH, Castro M. Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. *Theriogenology.* 1990; 33:799-808.

Friedl P, Zanker KS, Brocker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech.* 1998; 43:369-78.

Friess KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994; 72:283-92.

Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 1998; 78:687-98.

Fullmer CS, Wasserman RH. The amino acid sequence of bovine intestinal calcium-binding protein. *J Biol Chem.* 1981; 256:5669-74.

Fullmer CS, Wasserman RH. Vitamin D-induced intestinal calcium-binding protein from the chick: tentative amino acid sequence. In: Norman AW, Schaefer K, Grigolet HG, Herrath DR, editors. *Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical update.* Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag; 1985. p. 323-42.

Fullmer CS, Edelstein S, Wasserman RH. Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins. *J Biol Chem.* 1985; 260:6816-9.

Gerdin B, Hällgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med.* 1997; 242:49-55.

Gerstenberg C, Stewart F, Allen WR. The influence of endometriosis on epidermal growth factor (EGF) gene expression in the endometrial glands of the mare. *Pferdeheilkunde.* 1997; 13:531.

- Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J Reprod Fertil.* 1999; 116:167-75.
- Gianelli G, Quaranta V, Antonaci S. Tissue remodelling in liver diseases. *Histol Histopathol.* 2003; 18:1267-74.
- Gilbert RO. Cyclical changes in equine endometrial histology. *Proceedings of the 12th Int Conf Anim Reprod; The Hague; 1992.* p. 1867-9.
- Ginther OJ, editor. *Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects.* 2nd ed. Wisconsin: Verlag Equiservices; 1992.
- Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffmann AR. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76:1115-22.
- Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their possible relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril.* 1994; 61:1-17.
- Gold LI, Saxena B, Mittal KR, Marmor M, Goswami S, Nactigal L, et al. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res.* 1994; 54:2347-58.
- Gordon LR, Sartin EM. Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. *J Equine Med Surg.* 1978; 2:328-36.
- Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. *Lab Invest.* 1991; 65:644-53.
- Grimaud JA, Druguet M, Peyrol S, Chevalier O, Herbage D, El Badrawy N. Collagen immunotyping in human liver: light and electron microscope study. *J Histochem Cytochem.* 1980; 28:1145-56.
- Grinnell F, Billingham RE, Burgess L. Distribution of fibronectin during wound healing. *J Invest Dermatol.* 1981; 76:181-9.
- Gross TL, LeBlanc MM. Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. *J Am Vet Assoc.* 1984; 184:1379-82.

Grosser O. Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen. Wien: Verlag Braumüller; 1909.

Grüniger BU. Zur Pathogenese von Angiopathien im Endometrium der Stute – Morphologisch-funktionelle Untersuchungen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1996.

Grüniger B, Schoon HA, Schoon D, Menger S, Klug E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *J Comp Pathol.* 1998; 119:293-309.

Gygax AP, Ganjam VK, Kenney RM. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *J Reprod Fertil.* 1979; 27 Suppl:571-8.

Häfner I. Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute – Lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen [Dissertation med vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1999.

Häfner I, Schoon HA, Schoon D, Aupperle H. Glanduläre Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute – Lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen. *Pferdeheilkunde.* 2001; 17:103-10.

Hafez ESE. Transport and survival of spermatozoa in the human female reproductive tract. In: Ludwig H, Tauber PF, editors. *Human Fertilization. Int Workshop Essen.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1978. p. 119-27.

Haining REB, Cameron IT, van Papendorp C, Davenport AP, Prentice A, Thomas EJ, et al. Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immunocytochemical localization in normal and endometriotic tissues. *Hum Reprod.* 1991; 6:1200-5.

Ham J, Parker MG. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1989; 1:503-11.

Hammond J, Wodzicki K. Anatomical and histological changes during the estrous cycle in the mare. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1941; 130:1-23.

Hansard LJ, Healy-Gardner BE, Drapkin AT, Bentley RC, McLachlan JA, Walmer DK. Human endometrial transforming growth factor- α : a transmembrane, surface epithelial protein that transiently disappears during the midsecretory phase of the menstrual cycle. *J Soc Gynecol Investig.* 1997; 4:160-6.

Hardie WD, Le Cras TD, Jiang K, Tichelaar JW, Azhar M, Korfhagen TR. Conditional expression of transforming growth factor- α in adult mouse lung causes pulmonray fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 286:L741-L749.

Harris GS, Schuler LA, Shapiro SS. Characterization of human endometrial glycogen synthase. *Fert Steril.* 1994; 62:514-20.

Hegele-Hartung C, Beier HM. Distribution of uteroglobin in the rabbit endometrium after treatment with an anti-progesterone (ZK 98.734): an immunocytochemical study. *Hum Reprod.* 1986; 1:497-505.

Heilkenbrinker T, Kossin C, Scherbarth R, Frerking H. Zur Überprüfung geeigneter anamnestischer und klinischer Parameter für eine Abfohlprognose unter Praxisbedingungen. *Dtsch tierärztl Wochenschr.* 1997; 104:313-6.

Hein K. Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus [Dissertation vet. med.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule; 2000.

Heweston A, Chilton BS. Novel elements in the uteroglobin promoter are a functional target for prolactin signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 136:1-6.

Hinrichs K, Kenney RM. Differences in protein content of uterine fluid related to duration of progesterone treatment in ovariectomised mares used as embryo recipients. *Equine Vet J.* 1989; 8 Suppl:49-55.

Hirschberger J. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten des Huhnes [Dissertation med. vet.]. Gießen: Justis-Liebig Univ. Gießen; 1987.

Hofmann GE, Scott RT Jr., Bergh PA, Deligdisch L. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua and placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73:882-7.

Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff S. Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogenous phenotype. *Arch Histol Cytol.* 1996; 59:109-125.

Horbelt DV, Parmley TH, Roberts DK, Walker NJ. Stromal-epithelial communications in hyperplastic human endometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170:1061-72.

Horowitz GM, Scott RT Jr., Drews MR, Navot D, Hofmann GE. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha in human endometrium, decidua and trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 76:786-92.

Hughes KL. Streptococcus epidemicus and infertility in horses. *Aust Vet J.* 1975; 51:281-2.

- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*. 1993; 4:637-45.
- Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- β and CTGF. *Curr Opin Rheumatol*. 2002; 14:681-5.
- Imai T, Kurachi H, Adachi K, Adachi H, Yoshimoto Y, Homma H, et al. Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium. *Biol Reprod*. 1995; 52:928-38.
- Inpanbutr N, Miller EK, Petroff BK, Iacopino AM. CaBP_{9K} levels during the luteal and follicular phases of the estrous cycle in the bovine uterus. *Biol Reprod*. 1994; 50:561-71.
- Iredale JP, Benyon RC, Arthur AJO, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 1996; 24:176-84.
- Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 1991; 129:2385-92.
- Irwin JC, de las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC. Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion. *Regul Pept*. 1993; 48:165-77.
- Irwin JC, de las Fuentes L, Giudice LC. Growth factors and decidualization in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 734:7-18.
- Iwai M, Kanzaki H, Fujimoto M, Kojima K, Hatayama H, Inoue T, et al. Regulation of sex steroid receptor gene expression by progesterone and testosterone in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80:450-4.
- Jaffe RC, Stevens DM, Verhage HG. The effects of estrogen and progesterone of glycogen and the enzymes involved in its metabolism in the cat uterus. *Steroids*. 1985; 45:453-62.
- Jantzen K, Fritton HP, Igo-Kemenes T, Espel E, Janich S, Cato ACB, et al. Partial overlapping of binding sequences for steroid hormone receptors and DNaseI hypersensitive sites in the rabbit uteroglobin gene region. *Nucl Acid Res*. 1987; 15:4535-52.
- Jensen EV. Molecular mechanisms of steroid hormone action in the uterus. In: Jensen EV, Cardsen M, Miller R, editors. *Uterine function: molecular and cellular aspects*. New York: Verlag Plenum Publ; 1990. p 317-59.

Johnson TS, Haylor JL, Thomas GL, Fisher M, El Nahas AM. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol.* 2002; 10:182-95.

Jordana M, Schulman J, McSharry C, Irving LB, Newhouse MT, Jordana G, et al. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137:579-84.

Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, et al. TGF- β 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol.* 1999; 276:G1059-68.

Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152:2163-9.

Karlson P, Hrsg. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 13. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1988.

Katila T, Koskinen E, Oijala M, Parviainen P. Evaluation of the post-partum mare in relation to foal heat breeding. 2. Uterine swabbing and biopsies. *Zentralbl Veterinärmed A.* 1988; 35:331-9.

Kenney RM. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. *J Reprod Fert.* 1975; 23 Suppl:347-48.

Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc.* 1978; 172:241-62.

Kenney RM. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: J. P. Hughes, editor. Workshop on equine endometritis. Newmarket, U.K. 1992, *Equine Vet J.* 1993; 25:186.

Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: Morrow, DA editor. Current therapy in theriogenology. W.B. Saunders Comp.; 1986. p. 723-729.

Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, Last JA. TGF- β 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax.* 2003; 58:772-7.

Kersten F. Klinische, histologische und zytologische Untersuchungen im Puerperium der Stute sowie ein Beitrag zur Kyematopathologie unter besonderer Berücksichtigung der Placenta fetalis [Dissertation vet. med.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.

Ketcham CM, Baumbach GA, Bazer FW, Roberts RM. The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with Hairy Cell Leukemia. *J Biol Chem.* 1985; 260:5768-76.

Kikukawa T, Cowan BD, Tejada RI, Mukherjee AB. Partial characterization of a uteroglobin-like protein in the human uterus and its temporal relationship to prostaglandin levels in this organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67:315-21.

Kleis-SanFrancisco S, Heweston A, Chilton BS. Prolactin augments progesterone-dependent uteroglobin gene expression by modulating promoter-binding proteins. *Mol Endocrinol.* 1993; 7:214-23.

Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, et al. Uteroglobin/Clara cell 10 kDa family of proteins: nomenclature committee report. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family.* New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 348-54.

Klymkowsky MW, Bachant JB, Domingo A. Functions of intermediate filaments. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1989; 14:309-31.

Knight JW, Bazer FW, Wallace HD. Hormonal regulation of porcine uterine protein secretion. *J Anim Sci.* 1973; 36:546-53.

Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *J Hepatol.* 1999; 30:48-60.

Knudson O, Velle W. Ovarian oestrogen levels in the non-pregnant mare: relationship to histological appearance of the uterus and to clinical status. *J Reprod Fertil.* 1961; 2:130-7.

Kohorn EI, Tchao R. Conversion of proliferative endometrium to secretory endometrium by progesterone in organ culture. *J Endocr.* 1969; 45:401-5.

Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J. Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF- β -mediated fibrotic responses in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280:L1327-34.

Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Böttinger EP, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF- β 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest.* 1996; 74:991-1002.

Kowalski WB, Chatterton RT. Enzymatic determination of endometrial tissue glycogen in the presence of reducing groups. *Anal Biochem.* 1997; 252:207-10.

- Kratz G, Compton CC. Tissue expression of transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- α during wound healing in human skin explants. *Wound Repair Regen.* 1997; 5:222-8.
- Kreisberg JJ, Garoni JA, Radnik R, Ayo SH. High glucose and TGF- β 1 stimulate fibronectin gene expression through a cAMP response element. *Kidney Int.* 1994; 46:1019-24.
- Kremer H. Proteinmuster des equinen Uterussekretes – Untersuchungen im Rahmen eines Embryotransferprogramms [Dissertation vet. med.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1993.
- Krieg T, Luderschmidt C, Weber L, Müller PK, Braun-Falco O. Scleroderma fibroblasts: some aspects of in vitro assessment of collagen synthesis. *Arch Dermatol Res.* 1981; 270:263-72.
- Kriesten H. Zur prognostischen Bedeutung von Angiopathien im Rahmen der Kategorisierung von Endometriumbiopsien bei der Stute [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule; 1995.
- Krisinger J, Jeung EB, Simmen RCM, Leung PCK. Porcine calbindin-D_{9k} gene: expression in endometrium, myometrium, and placenta in the absence of a functional estrogen response element in intron A. *Biol Reprod.* 1995; 52:115-23.
- Krusche CA. Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zur Differenzierung des Endometriumepithels: Eine Studie mit Progesteron-Antagonisten [Dissertation rer. nat.]. Aachen: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fak., RWTH Aachen; 1998.
- Krusche CA, Herrler A, Beier HM. Uteroglobin in situ hybridization: novel monitoring of epithelial differentiation in the rabbit endometrium. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family.* New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 316-20.
- Kuhn C, McDonald JA. The roles of myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1991; 138:1257-65.
- Kundu GC, Zhang Z, Mantile-Selvaggi G, Mandal A, Yuan CJ, Mukherjee AB. Uteroglobin binding proteins: regulation of cellular motility and invasion in normal and cancer cells. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family.* New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 234-48.
- Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of type I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res.* 1997; 289:567-72.

Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, Cunha GR. Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell desoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*. 1998; 139:4708-13.

Landers JP, Spelsberg TC. New concepts in steroid hormone action: transcription, protooncogenes and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1992; 2:19-63.

Laurenz JC, Hadjisavas M, Chovanic GW, Bazer FW. Myelosuppression in the pig (*Sus scrofa*): uteroferrin reduces the myelosuppressive effects of 5-Fluorouracil in young pigs. *Comp Biochem Physiol*. 1997; 116A:369-77.

Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2002; 4:136-42.

Leidenberger FA. Endometriose. In: Leidenberger FA, Hrsg. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris: Springer Verlag; 1992.

Leidl W, Kaspar B, Kähn W. Endometriumzysten bei Stuten. Teil 2. Klinische Untersuchungen: Vorkommen und Bedeutung. *Tierärztl Prax*. 1987; 15:281-9.

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliensky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β 1. *J Exp Med*. 2001;6: 809-21.

Lessey BA, Arnold JT. Paracrine signaling in the endometrium: integrins and the establishment of uterine receptivity. *J Reprod Immunol*. 1998; 39:105-16.

Lesur O, Bernard A, Aرسالane K, Lauwerys R, Begin R, Cantin A, et al. Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A₂-mediated inhibition of fibroblast migration *in vitro*. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152:290-7.

Levin SW, Butler JD, Schumacher UK, Wightman PD, Mukherjee AB. Uteroglobin inhibits phospholipase A₂ activity. *Life Sci*. 1986;38: 1813-9.

Ley WB. Treating endometriosis in mares. *Vet Med*. 1994; 8:778-88.

L'Horsset F, Blin C, Brehier A, Thomasset M, Perret C. Estrogen-induced calbindin-D9k gene expression in the rat uterus during the estrous cycle: late antagonistic effect of progesterone. *Endocrinology*. 1993; 132:489-95.

Liebich, HG. Funktionelle Histologie. 2. Aufl. Stuttgart: Verlag Schattauer; 1993. p. 267-9.

Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J*. 1993; 7:737-43.

Lin W, Shuster S, Maibach HI, Stern R. Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45:1157-63.

Linnoila I, Szabo E, DeMayo F, Witschi HP, Sabourin C, Malkinson A. The role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: from a marker to tumor suppression. In: Mukherjee AB, Chilton BS editors. The uteroglobin/clara cell protein family. New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 249-67.

Lohi J, Leivo I, Owaribe K, Burgeson RE, Franssila K, Virtanen I. Neoexpression of the epithelial adhesion complex antigens in thyroid tumours is associated with proliferation and squamous differentiation markers. *J Pathol*. 1998; 184:191-6.

Ludwig S. Angiopathien im Genitalbereich von Zuchtstuten – Relevanz mittels Endometriumbiopsien diagnostizierbarer Alterationen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.

Luppa H. Grundlagen der Histochemie, Teil I. Berlin: Akademie Verlag; 1977.

Lurie M, Elmalach I, Weill S. The pattern of epithelial mucin secretion in normal, hyperplastic, and adenocarcinomatous endometrium. *Gynecol Oncol*. 1988; 30:274-84.

Maaß S. Hepatopathien beim angeborenen portosystemischen Shunt des Hundes – Histopathologische und immunhistologische Untersuchungen vor und nach partieller Ligatur des Shuntgefäßes [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.

Madtes DK, Elston AL, Kaback LA, Clark JG. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24:599-607.

Malmström J, Larsen K, Hansson L, Löfdahl CG, Nørregard-Jensen O, Marko-Varga G, et al. Proteoglycan and proteome profiling of central human pulmonary fibrosis tissue utilizing miniaturized sample preparation: a feasibility study. *Proteomics*. 2002; 2:394-404.

Maniscalco WM, Campbell MH. Transforming growth factor- β induces a chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan in alveolar type II cells. *Am J Physiol*. 1994; 266:L672-80.

- Manjunath R, Chung SI, Mukherjee AB. Crosslinking of uteroglobin by transglutaminase. *Biochem Biophys Res Comm.* 1984; 121:400-7.
- Manjunath R, Levin SW, Kumaroo KK, Butler JD, Donlon JA, Horne M, et al. Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation by uteroglobin. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36:741-6.
- Marshburn PB, Arici AM, Casey ML. Expression of transforming growth factor-beta 1 messenger ribonucleic acid and the modulation of desoxyribonucleic acid synthesis by transforming growth factor -beta 1 in human endometrial cells. *Am J Obst Gynecol.* 1994; 170:1152-8.
- Masur SK, Dewal HS, Dinh HH, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblast differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996; 93:4219-23.
- Mathias S, Bracher V. Effects of CDE on placentation and fetal growth. *Equine vet J.* 1993; 25:184.
- Mathieu CL, Mills SE, Burnett SH, Cloney DL, Bruns DE, Bruns ME. The presence and estrogen control of immunoreactive calbindin-D_{9k} in the fallopian tube of the rat. *Endocrinology.* 1989; 125:2745-50.
- McDowell KJ, Sharp DC, Fazleabas A, Roberts RM, Bazer FW. Partial characterization of the equine uteroferrin-like protein. *J Reprod Fertil.* 1982; 32:329-34.
- McDowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. *J Reprod Fertil.* 1987; 35 Suppl:335-42.
- McGaha T, Saito S, Phelps RG, Gordon R, Noben-Trauth N, Paul WE, et al. Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4R α and transforming growth factor- β genes. *J Invest Dermatol.* 2001; 116:136-43.
- Mellor SJ, Thomas EJ. Interactions between oestradiol and epidermal growth factor in endometrial stromal proliferation and differentiation. *J Reprod Fertil.* 1995; 104:157-64.
- Menke A, Adler G. TGF β -induced fibrogenesis of the pancreas. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002; 31:41-6.
- Meyer LJ, Russell SB, Russell JD, Trupin JS, Egbert BM, Shuster S, et al. Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:953-59.
- Michel G. Vergleichende Embryologie der Haustiere: ein Lehrbuch auf funktioneller Grundlage. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1995.

Michel FJ, Fliss MFV, Bazer FW, Simmen RCM. Characterization and developmental expression of binding sites for the transplacental iron transport protein, uteroferrin, in fetal hematopoietic tissues. *Biol Neonates*. 1992; 61:82-91.

Miele L, Cordella-Miele E, Mantile G, Peri A, Mukherjee AB. Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins. *J Endocrinol Invest*. 1994; 17:679-92.

Mildwidsky A, Palti Z, Gutman A. Glycogen metabolism of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980; 51:765-70.

Mittal K, Schwartz L, Goswami S, Demopoulos R. Estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol*. 1996; 15:345-8.

Mitze M, Jonat W, Braendle W, Kipke T, Stenger T, Stenger HE. Vergleich immunhistologischer und biochemischer Östrogenrezeptorbestimmungen an normalen, hyperplastischen und neoplastischen Endometrien. *Tumor Diagnostik & Therapie*. 1988; 9:1-6.

Monroe JG, Haldar S, Prystowky MB, Lammie P. Lymphokine regulation of inflammatory processes: interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation. *Clin Immunol Immunopathol*. 1988; 49:292-8.

Montano M, Ramos C, Gonzalez G, Vadillo F, Pardo A, Selman M. Lung collagenase inhibitors and spontaneous and latent collagenase activity in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Chest*. 1989; 96:1115-9.

Moore BB, Paine R, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol*. 2001; 167:4368-77.

Morize I, Surcouf E, Vaney MC, Epelboin Y, Buehner M, Fridlansky F, et al. Refinement of the C222 crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 Å resolution. *J Mol Biol*. 1987; 194:725-39.

Mornon JP, Fridlansky F, Bally R, Milgrom E. X-ray crystallographic analysis of a progesterone-binding protein. The C2221 crystal form of oxidized uteroglobin at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*. 1980; 137:415-29.

Moulton BC. Transforming growth factor- β stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology*. 1994; 134:1055-60.

Müller H, Beato M. RNA synthesis in rabbit endometrial nuclei. *Eur J Biochem*. 1980; 112:235-41.

- Müller-Schöttle F, Classen-Linke I, Alfer J, Krusche C, Beier-Hellwig K, Beier HM. Expression of uteroglobin in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5:1155-61.
- Müller-Schöttle F, Classen-Linke I, Beier-Hellwig K, Sterzik K, Beier HM. Uteroglobin expression and release in the human endometrium. In: Mukherjee AB, Chilton BS editors. *The uteroglobin/clara cell protein family*. New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 332-5.
- Müller-Schöttle F, Bogusz A, Grötzinger J, Herrler A, Krusche C, Beier-Hellwig K, et al. Full-length complementary DNA and the derived amino acid sequence of horse uteroglobin. *Biol Reprod*. 2002; 66:1723-28.
- Müller-Schöttle F, Bogusz A, Herrler A, Bollwein H, Beier-Hellwig K, Beier HM. Cloning of horse uteroglobin and its expression pattern in the endometrium. *Proceedings zur 36. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung; Wien 2003*; p. 83.
- Mukherjee AB, Ulane RE, Agrawal AK. Role of uteroglobin and transglutaminase in masking the antigenicity of implanting rabbit embryos. *Am J Reprod Immunol*. 1982; 2:135-41.
- Mukherjee D, Agrawal AK, Manjunath R, Mukherjee AB. *Science*. 1983; 219:989-91.
- Mukherjee AB, Cordella-Miele E, Kikukawa T, Miele L. Modulation of cellular response to antigens by uteroglobin and transglutaminase. *Adv Exp Med Biol*. 1988; 231:135-52.
- Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, Yuan CJ, Mandal AK, Chattopadhyay S, et al. Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55:771-87.
- Munson L, Upadhyaya NB, Van Meter S. Platelet derived growth factor promotes endometrial epithelial cell proliferation. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173:1820-5.
- Murray FA, Bazer FW, Wallace HD, Warnick AC. Quantitative and qualitative variation in the secretion of protein by the porcine uterus during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 1972; 7:314-20.
- Murray MK, Malathy PV, Bazer FW, Roberts RM. Structural relationship, biosynthesis, and immunocytochemical localization of uteroferrin-associated basic glycoproteins. *J Biol Chem*. 1989; 264:4143-50.
- Nikitenko L, Morgan G, Kolesnikov SI, Wooding FBP. Immunocytochemical and in situ hybridization studies of the distribution of Calbindin D_{9k} in the bovine placenta throughout pregnancy. *J Histochem Cytochem*. 1998; 46:679-88.

Noble NA, Harper JR, Border WA. In vivo interactions of TGF-beta and extracellular matrix. *Prog Growth Factor Res.* 1992; 4:369-82.

Özgen S, Rasch K, Kropp G, Schoon HA, Aupperle H, Sieme H, et al. Aetiopathogenesis and therapy of equine hydromucometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde.* 1997; 13:533-34.

Özgen S. Die Hydromukometra bei der Stute. Untersuchungen zur Ätiopathogenese, diagnostischen Differenzierung und therapeutischen Beeinflussbarkeit [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztl. Hochsch.; 1999.

Ohkawa T, Ueki N, Taguchi T, Shindo Y, Adachi M, Amuro Y, et al. Stimulation of hyaluronan synthesis by tumor necrosis factor- α is mediated by the p50/p65 NF- κ B complex in MRC-5 myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1448:416-24.

Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 1985;230: 630.

Ortega-Velazquez R, Gonzalez-Rubio M, Ruiz-Torres M, Diez-Marques ML, Iglesias MC, Rodriguez-Puyol M, et al. Collagen I upregulates extracellular matrix gene expression and secretion of TGF- β 1 by cultured human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286:C1335-43.

Pardo A, Selman M. Decreased collagenase production by fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix.* 1992; 1 Suppl:417-8.

Parker MG. Structure and function of nuclear hormone receptors. *Semin Cancer Biol.* 1990; 1:81-7.

Pattabiraman N, Matthews JH, Ward KB, Mantile-Selvaggi G, Miele L, Mukherjee AB. Crystal structure analysis of recombinant human uteroglobin and molecular modeling of ligand binding. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family.* New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 113-27.

Pearse AGE, editor. *Histochemistry. Theoretical and applied.* 2nd ed. London: J&A Churchill LTD; 1961.

Penney DP, Rosenkrans WA. Cell-cell matrix interaction in induced lung injury. I. The effects of X-irradiation on basal laminar proteoglycans. *Radiat Res.* 1984; 99:410-9.

Peri A, Bonacocorsi L, Muratori M, Luconi M, Baldi E, Granchi S, et al. Uteroglobin reverts the transformed phenotype in the endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A by disrupting the metabolic pathways generating platelet-activating factor. *Int J Cancer.* 2000; 88:525-34.

Phan SH. Role of the myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Kidney Int.* 1996; 49 Suppl:S46-8.

- Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002; 122:286S-9S.
- Phipps RP, Penney DP, Keng P, Silvera M, Harkins S, Derdak S. Immune functions of subpopulations of lung fibroblasts. *Immunol Res*. 1990; 9:275-86.
- Pierro E, Minici F, Alesiani O, Miceli F, Proto C, Screpanti I, et al. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium. *Biol Reprod*. 2001; 64:831-8.
- Piva R, Bianchini E, Kumar VL, Chambon P, Del Senno L. Estrogen induced increase of estrogen receptor RNA in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 1988; 155:943-9.
- Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest*. 1992; 90:1479-85.
- Pugh DG, Bowen JM, Kloppe LH, Simpson RB. Fungal endometritis in the mare. *Comp Contin Educ*. 1986; 8:173-81.
- Pycock JF, Paccamonti D, Jonker H, Newcombe J, Van der Weijden G, Taverne M. Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometritis? *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:431-6.
- Raila G, Schoon HA, Schoon D, Özgen S, Aupperle H, Klug E, et al. The equine endometrial cycle: a morphometrical ultrastructural, enzyme- and immunohistological investigation. *J Anim Sci*. 1997; 75:231.
- Raila G. Zur Pathogenese der Endometrose der Stute. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.
- Ramadori G, Veit T, Schwögler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, et al. Expression of the gene of the α -smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1990; 59:349-57.
- Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24:591-8.
- Randall GW, Daniel JC, Chilton BS. Prolactin enhances uteroglobin gene expression by uteri of immature rabbits. *J Reprod Fertil*. 1991; 91:249-57.
- Rauterberg J, Voss B, Pott G, Gerlach U. Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. *Klin Wochenschr*. 1981; 59:767-79.

Razzaque MS, Taguchi T. Pulmonary fibrosis: cellular and molecular events. *Pathol Int* 2003; 53: 133-45.

Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: mechanism for recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. *Proc Natl Acad Sci*. 1981; 78:7147-51.

Ricketts SW. The barren mare: diagnosis, prognosis, prophylaxis and treatment for genital abnormality. Part 2. *In Pract*. 1975; 11:156-64.

Ricketts SW. The barren mare: diagnosis, prognosis, prophylaxis and treatment for genital abnormality. Part 2. *In Pract*. 1989; 11:156-64.

Ricketts SW, Alonso S. Assesment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Vet J*. 1991; 23:185-8.

Ricketts SW, Barrelet A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK throughbred mares over a 25 years period. *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:525-30.

Roberts RM, Bazer FW. Uteroferrin: a protein in search of a function. *BioEssays*. 1984; 1:8-11.

Roberts RM, Bazer FW. The functions of uterine secretions. *J Reprod Fertil*. 1988; 82:875-92.

Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor-betas. In: Sporn MB, Roberts AB, editors. *Peptide growth factors and their receptors*. Berlin: Springer Verlag; 1990. p. 419-72.

Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*. 1979; 76:710-9.

Romeis B. *Mikroskopische Technik*. Böck P, Hrsg. 17. Aufl. München: Verlag Urban und Schwarzenberg; 1989.

Rosenkrans WA, Penney DP. Cell-cell matrix interactions in induced lung injury II. X-irradiation mediated changes in specific basal laminar glycosaminoglycans. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*. 1985; 11:1629-37.

Rossdale PD, Ricketts SW, editors. *Equine stud farm medicine*. 2nd ed. Eastborne: Verlag Baillere Tindall; 1980.

Rüsse I, Sinowatz F, Hrsg. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1991. S. 93-110.

Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, et al. Unbalanced collagenase/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Biol Physiol*. 2003; 285:L1026-36.

Runge A. Zur Repräsentanz histologischer Untersuchungsbefunde an Uterusbiopsien bei der Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1995.

Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG. Fibronectin: current concepts of its structure and functions. *Coll Res*. 1981; 1:95-128.

Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991; 64:867-9.

Sabini G, Chumas JC, Mann WJ. Steroid hormone receptors in endometrial stromal sarcomas. A biochemical and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol*. 1992; 97:381-6.

Samuel CA, Allen WR, Steven DH. Studies on the equine placenta. 3. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. *J Reprod Fertil*. 1977; 51:433-7.

Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schürch W, Gabbiani G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer*. 1988; 41:707-12.

Sasaki M, Kashima M, Ito T, Watanabe A, Izumiyama N, Sano M, et al. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1 β and TNF- α . *Mediators Inflamm*. 2000; 9:155-60.

Saunders PTK, Renegar RH, Raub TJ, Baumbach GA, Atkinson PH, Bazer FW, et al. The carbohydrate structure of porcine uteroferrin and the role of the high mannose chains in promoting uptake by the reticuloendothelial cells of the fetal liver. *J Biol Chem*. 1985; 260:3658-65.

Sbracia M, Zupi E, Alo P, Manna C, Marconi D, Scarpellini F, et al. Differential expression of IGF-I and IGF-II in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis and in women without endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 37:326-9.

Schaefer L, Macakova, Raslik I, Micegova M, Gröne HJ, Schönherr E, et al. Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am J Pathol*. 2002; 160:1181-91.

Schiffman E, Geetha V, Pencev D, Warabi H, Mato J, Hirata F, et al. Adherence and regulation of leukotaxis. *Agents Actions*. 1983; 12 Suppl:106-20.

Schlosnagle DC, Bazer FW, Tsibris JCM, Roberts RM. An iron-containing phosphatase induced by progesterone in the uterine fluids of pigs. *J Biol Chem*. 1974; 249:7574-9.

Schnurrbusch U, Erices J. Ergebnisse histochemischer und biochemischer Untersuchungen am Uterus von Jungsaugen während des Östruszyklus. *Arch exper Vet med*. 1979; 6:909-32.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde*. 1992; 8:355-62

Schoon HA, Schoon D, Ohnesorge B, Klug E. Zur Diagnose, Pathogenese und Bedeutung endometrialer Zysten bei der Stute. *Pferdeheilkunde*. 1993; 9:215-21.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Klinische Pathologie, Diagnostik und Terminologie endometrial bedingter Fertilitätsstörungen beim Pferd. In: *Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft, Hrsg. 13. Tagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten*. Wiesbaden: DVG; 1994a. S. 1-16.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Angiopathien im Endometrium der Stute: Diagnose und prognostische Bedeutung. In: *Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft, Hrsg. 13. Tagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten*. Wiesbaden: DVG; 1994b. S. 17-28.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Zur Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: *Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft, Hrsg. Bericht des 21. Kongresses der DVG*. Bad Nauheim: DVG; 1995. S. 273-82.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:453-64.

Schoon HA, Schoon D, Wiegandt I, Bartmann CP, Aupperle H. "Endometrial maldifferentiation" – a clinically significant diagnosis in equine reproduction? *Pferdeheilkunde*. 1999; 15:555-9.

Schoon HA, Wiegandt I, Schoon D, Aupperle H, Bartmann CP. Functional disturbances of the equine endometrium. *J Reprod Fertil*. 2000; 56 Suppl:381-91.

Schoon HA, Schoon D. The category I mare (Kenney and Doig 1986): expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? *Pferdeheilkunde*. 2003; 19:698-701.

Secchi J, Lecaque D, Tournemine C, Philibert D. Early glycogenesis in the uterine glandular cells of the rabbit induced by progestins: a quantitative investigation. *Cell Tissue Res*. 1987; 248:359-64.

Selman M, Ruiz V, Carrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279:L562-74.

Shapiro SS, Dyer SD, Colas AE. Progesterone-induced glycogen accumulation in human endometrium during organ culture. *Am J Obstet Gynecol*. 1980; 136:419-25.

Shen XZ, Tsai MJ, Bullock DW, Woo SLC. Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. *Endocrinology*. 1983; 112:871-6.

Silver M, Steven DH, Comline RS. Placental exchange and morphology in ruminants and the mare. In: Comline RS, Cross KW, Dawes GS, Mathanielz PW, editors. *Foetal and neonatal Physiology*. Cambridge: University Press; 1973. p. 245-71.

Simmen RCM, Baumbach GA, Roberts RM. Molecular cloning and temporal expression during pregnancy of the messenger ribonucleic acid encoding uteroferrin, a progesterone induced uterine secretory protein. *Mol Endocrinol*. 1988; 2:253-62.

Singer II, Kazazis DM, Kawka DW. Localization of the fibronexus at the surface of granulation tissue myofibroblasts using double-label immunogold electron microscopy on ultrathin frozen sections. *Eur J Cell Biol*. 1985; 38:94-101.

Singh G, Katyal SL. Clara cell proteins. In: Mukherjee AB, Chilton BS editors. *The uteroglobin/clara cell protein family*. New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 43-58.

Skalli O, Schürch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest*. 1989; 60:275-85.

Slowey MJ, Verhage HG, Fazleabas AT. Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig*. 1994; 1:277-84.

Spelsberg TC, Rories C, Rejman JJ, Goldenberger A, Fink K, Lau CK, et al. Steroid action on gene expression: possible roles of regulatory genes and nuclear acceptor sites. *Biol Reprod*. 1989; 40:54-69.

Spornitz UM. The functional morphology of the human endometrium and decidua. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1992; 124:1-99.

- Staneva L. Histochemical and ultracytochemical studies on complex carbohydrates in the cyclic rat endometrium. *Acta Histochem.* 1990; 38 Suppl:213-7.
- Steiger K. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur puerperalen endometrialen Involution der Stute unter besonderer Berücksichtigung peripartaler Störungen [Dissertation vet. med.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2002.
- Steven DH. Placentation in the mare. *J Reprod Fertil.* 1982; 27 Suppl:41-55.
- Stewart F, Charleston B, Crosset B, Barker PJ, Allen WR. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. *J Reprod Fertil.* 1995; 195:65-70.
- Stewart F, Gerstenberg C, Suire S, Allen WR. Immunolocalization of a novel protein (P19) in the endometrium of fertile and subfertile mares. *J Reprod Fertil.* 2000a; 56 Suppl:593-99.
- Stewart F, Kennedy MW, Suire S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. *Cell Mol Life Sci.* 2000b; 57:1373-8.
- Stief B. Heilungsvorgänge am Uterus der Stute nach minimalinvasiven chirurgischen Eingriffen. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2004.
- Stokes MB, Hudkins KL, Zahaira V, Taneda S, Alpers CE. Up-regulation of extracellular matrix proteoglycans and collagen type I in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2001; 59:532-42.
- Strankmeyer O. Morphometrische Untersuchungen am Endometrium zyklischer und ovariektomierter, hormonbehandelter Stuten [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztl. Hochschule; 1993.
- Streuli CH, Schmidhauser C, Kobrin M, Bissell MJ, Derynck R. Extracellular matrix regulates expression of the THG- β 1 gene. *J Cell Biol.* 1993; 120:253-60.
- Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubiz APN, Roskelley C, et al. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol.* 1995; 129:591-603.
- Su X, Schuler L, Shapiro S. Cloning and characterization of a glycogen synthase cDNA from human endometrium. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1996; 59:459-65.
- Suire S, Stewart F, Beauchamp J, Kennedy MW. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem J.* 2001; 356:369-76.

Sundström G, Löfvenberg E, Hassan I, Engström-Laurent A. Localisation and distribution of hyaluronan in normal bone marrow matrix: a novel method to evaluate fibrosis? *Eur J Haematol.* 2002; 68:194-202.

Swaneck GE, Fishman J. Effects of estrogens on MCF-7 cells: positive or negative regulation by the nature of the ligand-receptor complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 174:276-81.

Taketani Y, Ishihara S, Miyauchi A, Mizuno M. Roles of epidermal growth factor (EGF) in the growth and differentiation of human endometrium. *Hum Cell.* 1989; 2:260-4.

Tang XM, Zhao Y, Rossi MJ, Abu-Rustum RS, Ksander GA, Chegini N. Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms and TGF beta type II receptor messenger ribonucleic acid and protein and the effect of TGF betas on endometrial stromal cell growth and protein degradation in vitro. *Endocrinology.* 1994; 135:450-9.

Tatsumi K, Higuchi T, Fujiwara H, Nakayama T, Itoh K, Mori T, et al. Expression of calcium binding protein D-9k messenger RNA in the mouse uterine endometrium during implantation. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5:153-61.

Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* 1989; 180:487-502.

Toole BP. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: Hay ED, editor. *Cell biology of extracellular matrix.* 2nd ed. New York: Plenum Press; 1991. p. 305-41.

Truong LD, Rangdaeng S, Cagle P, Ro JY, Hawkins H, Font RL. The diagnostic utility of desmin. *Am J Clin Pathol.* 1990; 93:305-14.

Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63:451-86.

Tsutsumi M, Takada A, Takase S. Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells. *Hepatology.* 1987; 7:277-84.

Vallet JL. Uteroferrin induces lipid peroxidation in endometrial and conceptus microsomal membranes and is inhibited by apotransferrin, retinol-binding protein, and the uteroferrin-associated proteins. *Biol Reprod.* 1995; 53:1436-45.

Vallet JL, Christenson RK, McGuire WJ. Association between uteroferrin, retinol-binding protein, and transferrin within the uterine and conceptus compartments during pregnancy in swine. *Biol Reprod.* 1996; 55:1172-8.

- Vallet JL, Christenson RK, Trout WE, Klemcke HG. Conceptus, progesterone and breed effects on uterine protein secretion in swine. *J Anim Sci.* 1998; 76:2657-70.
- VanCamp SD. Endometrial biopsy of the mare. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988; 4:229-45.
- Vanniekerc CH, Allen WR. Early embryonic development in the horse. *J Reprod Fertil.* 1975; 23 Suppl:495-8.
- Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB. Transforming-growth factor- β 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem.* 1988; 263:7741-6.
- Vasanthakumar G, Manjunath R, Mukherjee AB, Warabi H, Schiffman E. Inhibition of phagocyte chemotaxis by uteroglobin, an inhibitor of blastocyst rejection. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37:389-94.
- Venkatesan N, Ebihara T, Roughley PJ, Ludwig MS. Alterations in large and small proteoglycans in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:2066-73.
- Venkatesan N, Roughley PJ, Ludwig MS. Proteoglycan expression in bleomycin lung fibroblasts: role of transforming growth factor- β 1 and interferon- γ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283:L806-14.
- Verhage HG, Murray MK, Boomsma RA, Rehfeldt PA, Jaffe RC. The postovulatory cat oviduct and uterus: correlation of morphological features with progesterone receptor levels. *Anat Rec.* 1984; 208:521-31.
- Vleming LJ, Baelde JJ, Westendorf RGJ, Daha MR, van Es LA, Bruijn JA. Progression of chronic renal disease in humans is associated with the deposition of basement membrane components and decorin in the interstitial extracellular matrix. *Clin Nephrol.* 1995; 44:211-9.
- Vogel HJ, Humke E. Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich zu dem anderer Säugetiere und des Menschen. *Anat Histol Embryol.* 1973; 2:271-9.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14:2123-33.
- Waelchli RO, Winder NC. Die Biopsie der Uterusschleimhaut bei der Stute zur Ergänzung der Zuchttauglichkeitsuntersuchung. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1987; 129:399-415.

Walter I, Bavdek S. Lectin binding pattern of porcine oviduct mucosa and endometrium during the estrous cycle. *J Anat.* 1997; 190:299-307.

Walter I, Handler J, Reifinger M, Aurich C. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *J Reprod Fertil.* 2001a; 121:581-6.

Walter I, Klein M, Handler J, Aurich JE, Reifinger M, Aurich C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *Am J Vet Res.* 2001b; 62:840-5.

Walter I, Helmreich M, Handler J, Aurich C. Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. *Vet Rec.* 2003; 153:708-10.

Walters JRF. Calbindin-D_{9k} stimulates the calcium pump in rat enterocyte basolateral membranes. *Am J Physiol.* 1989; 256:G124-8.

Wasserman RH, Corradino RA, Taylor AN. Vitamin D-dependent calcium-binding protein. *J Biol Chem.* 1968; 243:3978-86.

Wasserman RH, Fullmer CS. Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Ann Rev Physiol.* 1983; 45:375-90.

Wasserman RH, Chandler JS, Meyer SA, Smith CA, Brindak ME, Fullmer CS, et al. Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane. *J Nutr.* 1992; 122:662-71.

Wathes DE, Mann GE, Payne JH, Riley PR, Stevenson KR, Lamming GE. Regulation of oxytocin, estradiol and progesterone-receptor concentrations in different uterine regions by estradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *J Endocrinol.* 1996; 151:375-93.

Watson H, Franks S, Bonney RC. Characterization of epidermal growth factor receptor in human endometrial cells in culture. *J Reprod Fertil.* 1994; 101:415-20.

Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997; 91:439-42.

Winkler MK, Fowlkes JL. Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283:L1-11.

Wollenhaupt K, Spitschak K, Lampe B. Biochemische Untersuchung des Endometriums zyklischer und frühgravidier Jungsaunen. *Arch exper Vet med.* 1984; 38:640.

Wollenhaupt K, Lampe B, Spitschak K, Schneider F, Hühn U. Der Einfluß einer einmaligen Progesteronverabreichung an frühtragende Sauen auf die Glykogenkonzentration des Endometriums. *Arch exper Vet med.* 1988; 42:92-5.

Wooding FBP, Morgan G, Jones GV, Care AD. Calcium transport and the localisation of calbindin-D_{9k} in the ruminant placenta during the second half of pregnancy. *Cell Tissue Res.* 1996; 285:477-89.

Wooding FBP, Morgan G, Fowden AL, Allen WR. Separate sites and mechanisms for placental transport of calcium, iron and glucose in the equine placenta. *Placenta.* 2000; 21:635-45.

Wrede S. Zur Pathogenese der Graviditätssklerose an endometrialen Gefäßen der Stute [Dissertation vet. med.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1999.

Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem.* 1989; 264:8012-8.

Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network. *Ann Rev Genet.* 1985; 19:209-52.

Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Miller J, Ferrer K, et al. Stromal PRs mediate induction of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 expression in human endometrial epithelium: a paracrine mechanism for inactivation of E2. *Mol Endocrinol.* 2001; 15:2093-105.

Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology.* 2003; 124:147-59.

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14:163-76.

Zavy MT, Bazer FW, Sharp DC, Wilcox CJ. Uterine luminal proteins in the cycling mare. *Biol Reprod.* 1979a; 20:689-98.

Zavy MT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, Sharp DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fert.* 1979b; 27 Suppl:403-11.

Zavy MT, Sharp DC, Bazer FW, Fazlebas A, Sessions F, Roberts RM. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1982; 64:199-207.

Zhang H, Phan SH. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 21:658-65.

Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1994; 145:114-25.

Zhang K, Flanders KC, Phan SH. Cellular localization of transforming growth factor- β expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1995; 147:352-61.

Zhang Z, Kundu GC, Zheng F, Yuan CJ, Lee E, Westphal H, et al. Insight into the physiological function(s) of uteroglobin by gene-knockout and antisense-transgenic approaches. In: Mukherjee AB, Chilton BS, editors. *The uteroglobin/clara cell protein family*. New York: The New York Academy of Science; 2000. p. 210-233.

Zhang C, Meng X, Zhu Z, Yang X, Deng A. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci*. 2004; 75:367-79.

Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA. Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79:1723-34.

Zhu Z, Ma B, Zheng T, Homer RJ, Lee CG, Charo IF, et al. IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol*. 2002; 168:2953-62.

Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:6292-7.

9 Anhang

9.1 Charakterisierung des Tiergutes

Tab. 9.1: Charakterisierung der Stuten (Alter und Reproduktionsstatus), bei denen die Biopsien in den Monaten Mai bis Juli entnommen wurden („Sommerstuten“)

Alters- gruppe (J.)	Anz. ges.	Anzahl der Abfohlungen						Güstzeit (J.)				
		Maiden stuten	1-2	3-5	6-9	>10	o. A.	≤1	2	3-4	> 5	o. A.
3-8	n=45	16	15	4	0	0	10	15	13	8	0	9
9-12	n=72	6	23	20	4	0	19	17	16	12	5	22
13-16	n=52	5	10	14	7	1	15	16	9	8	7	12
17- ≥ 20	n=51	5	11	8	2	4	21	18	7	9	1	16
o. A.	n=24	0	2	2	0	0	20	8	4	0	1	11

Legende zu Tab. 9.1: o.A. ohne Angabe Anz. Anzahl
J. Jahre ges. gesamt

Tab. 9.2: Charakterisierung der Stuten (Alter und Reproduktionsstatus), bei denen die Biopsien in den Monaten November bis Februar entnommen wurden („Winterstuten“)

Alters- gruppe (J.)	Anz. ges.	Anzahl der Abfohlungen						Güstzeit (J.)				
		Maiden stuten	1-2	3-5	6-9	>10	o. A.	≤1	2	3-4	> 5	o. A.
3-8	n=45	18	10	5	0	0	12	15	7	9	0	14
9-12	n=69	6	29	15	5	0	14	20	20	12	1	16
13-16	n=64	7	15	19	7	0	16	23	9	16	4	12
17- ≥ 20	n=61	1	16	9	14	11	10	17	15	12	4	13
o. A.	n=26	0	4	1	1	0	20	3	5	2	0	16

Legende zu Tab. 9.2: o.A. ohne Angabe Anz. Anzahl
J. Jahre ges. gesamt

Tab. 9.3: Charakterisierung der Stuten, bei denen die Biopsien an definierten Zyklustagen entnommen wurden (Kontrollstuten grau hinterlegt)

Nr.	Alter (in Jahren)	Reproduktionsstatus	Endometrosegrad
1	7	1 Fohlen	geringgradig
2	unbekannt	unbekannt	geringgradig
3	unbekannt	unbekannt	geringgradi
4	5	2 Fohlen	geringgradig
5	unbekannt	unbekannt	gering-mittelgradig
6	unbekannt	unbekannt	geringgradig
7	16	7 Fohlen	geringgradig
8	7	Maidenstute	keine Endometrose
9	11	unbekannt	keine Endometrose
10	7	2 Fohlen	keine Endometrose

Tab. 9.4: Charakterisierung der Stuten, bei denen die Biopsien vor der Belegung und postpartal entnommen wurden (Daten beziehen sich auf den Zeitpunkt vor der Belegung)

Nr.	Alter (in Jahren)	Anzahl der Abf.	letzte Abf. vor J.	güst seit J.	Entnahmezeitpunkt der Zweitbiopsie (Tage post partum)	Endometrosegrad
11	10	5	1	--	8	gering-mittelgradig
12	12	Maidenstute		--	10	gering-mittelgradig
13	12	5	1	--	21	gering-mittelgradig
14	12	6	1	--	3	geringgradig
15	14	1	10	--	3	mittelgradig
16	14	2	1	--	3	mittelgradig
17	14	8	1	--	3	geringgradig
18	14	unbekannt	3	2	3	gering-mittelgradig

Legende zu Tab. 9.4: J. Jahren Abf.: Abfohlung, --: nicht güst

9.1.1 Versuchsprotokoll zu der experimentellen bakteriellen Infektion von 20 Stuten einschliesslich der unterschiedlichen Therapieansätze

Um die Keimfreiheit des Uterus vor der experimentellen bakteriellen Infektion zu gewährleisten wurden die Stuten mit Penicillin behandelt. Sieben Tage später erfolgte eine Zyklussynchronisation mit Hilfe von Prostaglandinen. Zum Zeitpunkt der Rosse wurde zunächst eine Endometriumbiopsie entnommen (Erstbiopsie) und nachfolgend 1×10^9 Keime *Streptococcus zooepidemicus* intrauterin infundiert. Alle Stuten wiesen 24 Stunden post inoculationem klinische Anzeichen einer Endometritis auf. Die Therapie der induzierten Endometritis erfolgte über einen Zeitraum von vier Tagen. Die Stuten wurden dabei täglich klinisch-gynäkologisch sowie bakteriologisch und zytologisch untersucht. Für die Behandlung standen folgende fünf Therapiemodelle zur Verfügung:

- eingefrorene vitale Leukozyten
- eingefrorene lysierte Leukozyten
- Interleukin 8 in 4ml Medium
- Medium als Kontrolle
- frisch separierte Leukozyten

Am fünften Tag post infectionem erfolgte die Entnahme einer Endometriumbiopsie zur Dokumentation des Therapierfolges. Um die Keimfreiheit des Uterus vor dem nächsten Versuchsdurchgang sicherzustellen wurden die Stuten neun Tage nach der Infektion erneut mit Penicillin behandelt und sieben Tage darauf erfolgte wiederum eine Zyklussynchronisation durch Applikation von Prostaglandinen. Alle Therapiekonzepte wurden im Verlauf von zwei Jahren bei jeder Stute eingesetzt. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs gibt Abb. 9.1.

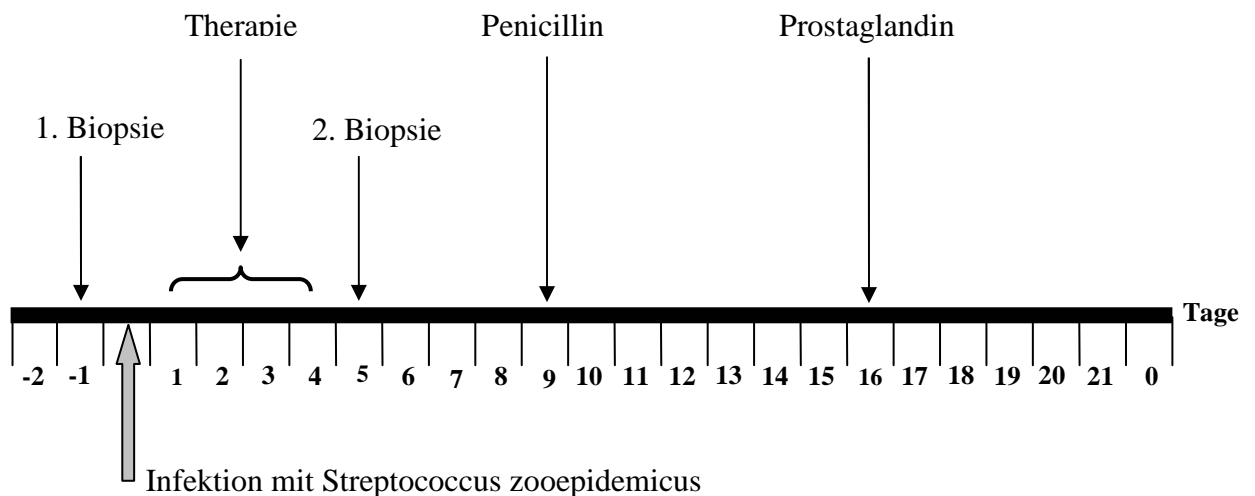


Abb. 9.1: Versuchsprotokoll für die Behandlung von Stuten nach experimenteller Infektion

9.2 Verdauung mit testikulärer Hyaluronidase zum Nachweis von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat A, C

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte
2. Behandeln der Schnitte mit folgender Lösung: 0,05% Hoden-Hyaluronidase in 0,1M Azetatpuffer pH 6,0, 2 Stunden bei 37 ° C
3. Kontrollschnitte werden nur mit dem Puffer unter gleichen Bedingungen behandelt
4. Durchführung der Alcianblau-Färbung 8GX bei pH 2,5

9.3 Verdauung mit Streptomyces Hyaluronidase zum Nachweis von Hyaluronsäure

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte
2. Behandeln der Schnitte mit folgender Lösung: 1500 TRU/10ml Streptomyces-Hyaluronidase in Azetatpuffer von pH 5,0 unter Zusatz von 0,1 M NaCl, 24 Stunden bei 37 ° C
3. Kontrollschnitte werden nur mit dem Puffer unter gleichen Bedingungen behandelt
4. Durchführung der Alcianblau-Färbung 8GX bei pH 2,5

9.4 Für die Immunhistologie verwendete Primärantikörper und Positivkontrollen

Tab. 9.5: Übersicht über die verwendeten immunhistologischen Marker und ihre Reaktionsmuster

Primärantikörper		untersuchte Zellen bzw. Gewebe	Reaktionsmuster
ER, PR	Steroidhormonrezeptoren	Glanduläre Epithelien, Stromazellen	intranukleär
Ki-67-Antigen	Proliferationsaktivität	Glanduläre Epithelien, Stromazellen	intranukleär
Vimentin	Intermediärfilament mesenchymaler Zellen	Glanduläre Epithelien, Stromazellen	intrazytoplasmatisch
Desmin	Intermediärfilament quergestreifter und glatter Muskulatur	Stromazellen	intrazytoplasmatisch
Glattmuskulatur-α-Aktin	Mikrofilament der Muskelzellen	Stromazellen	intrazytoplasmatisch
Laminin	Basallamina-komponente	Glanduläre Basallamina, periglanduläre Fibrose	extra- und intrazellulär
Fibronectin	Komponente der Extrazellulärmatrix	Periglanduläre Fibrose	extrazellulär
Uteroglobulin	endometriales Protein	Luminale und glanduläre Epithelien	intrazytoplasmatisch, Drüsenlumina
Uteroferrin	endometriales Protein	Luminale und glanduläre Epithelien	intrazytoplasmatisch, Drüsenlumina
Calbindin_{D9k}	endometriales Protein	Luminale und glanduläre Epithelien	intrazytoplasmatisch
Uterokalin	endometriales Protein	Luminale und glanduläre Epithelien	intrazytoplasmatisch, Drüsenlumina

Legende zu Tab. 9.5: ER: Östrogenrezeptor PR: Progesteronrezeptor

Tab. 9.6: Graduelle Einteilung des Anteils immunhistologischer Marker exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Gewebsstruktur

(+)	vereinzelt positive Zellen, maximal 5-10% der Gesamtzellzahl
+	einzelne positive Zellen, maximal 20% der Gesamtzellzahl
+(+)	mehrere positive Zellen, maximal 40% der Gesamtzellzahl
++	viele positive Zellen, maximal 60% der Gesamtzellzahl
++(+)	sehr viele positive Zellen, maximal 80% der Gesamtzellzahl
+++	(fast) alle Zellen positiv, 80-100% der Gesamtzellzahl

Legende zu Tab. 9.6:

(+)	schwach	++	mittelgradig
+	geringgradig	++(+)	mittel- bis hochgradig
+(+)	gering- bis mittelgradig	+++	hochgradig

Tab. 9.7: Als Positivkontrollen mitgeführte Gewebe des Pferdes für die immunhistologisch eingesetzten Marker

Antigen	Positivkontrolle
Ki-67-Antigen	Lymphknoten
Hormonrezeptoren (ER, PR)	Uterus
Vimentin, Desmin, Glattmuskulatur- α -Aktin, Laminin	vaskuläre Endothel- und Muskelzellen im zu untersuchenden Schnitt
Fibronektin	equine Leber
Uteroglobulin, Uteroferrin, Calbindin _{D9k} , Uterokalin	Uterus

9.5 Verfahrensschritte der immunhistologischen Untersuchungen

9.5.1 Vorbehandlung

Aufziehen von 3-4 μm dicken Schnitten auf Super-Frost Plus Objektträger (Fa. Menzel-Gläser). 30 min trocknen bei Raumtemperatur vor einem Ventilator, anschließend Lagerung über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C

Entparaffinierung und Rehydrierung

10 min Roti[®]-Histol (Carl Roth KG, Karlsruhe)

2 x je 3 min Isopropanol

3 min 96% Alkohol

Inaktivierung der endogenen Peroxidase

30 min in Methanol mit frisch zugesetztem 3% H₂O₂ bei Raumtemperatur (Perhydrol 30% H₂O₂ p.a., 7210, E. Merck, Darmstadt)

Waschen in TBS

9.5.2 Besondere Verfahren

Vor dem Aufbringen der Objektträger auf die Coverplates wurde zunächst zum Nachweis der ER, PR sowie Ki-67 Antigen und Uterokalin eine Zitrat-Behandlung durchgeführt, während die Objektträger zum Nachweis von Laminin und Uteroferrin, mit Protease vorbehandelt wurden.

Zitrat-Behandlung

1. 10 mM Zitratpuffer pH 6,0 auf 96°C vorwärmen
2. 30 min Kochen der Schnitte in 96°C heißem Zitratpuffer
3. 30 min bei Zimmertemperatur abkühlen lassen
4. Spülen in TBS

Protease-Behandlung

1. 5 min Spülen der Schnitte in PBS bei 37°C
2. 5 min Inkubieren der Schnitte in 0,05% Protease in PBS bei 37°C (bakterielle Protease Typ XXIV, P8038, Sigma Chemie, Deisenhofen)
3. 3 x 5 min Spülen der Schnitte in eiskaltem TBS

9.5.3 Antigennachweis mittels monoklonaler AK nach der PAP-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates[®] (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Einbringen von je 100 µl des in 1% BSA (Bovines Serum Albumin, 3895 Boehringer, Mannheim) in TBS verdünnten Primärantikörpers (bzw. des Kontrollserums) in die Coverplates[®]
3. Inkubation über Nacht bei 4°C
4. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate[®]
5. Einbringen von je 100 µl Ratte anti-Maus IgG 1:100 in 1% BSA in TBS je Coverplate[®]
6. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
7. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate[®]
8. Einbringen von je 100 µl Maus-PAP 1:500 in 1% BSA in TBS je Coverplate[®]
9. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
10. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate[®] und weiter mit **Abschnitt 9.5.5**

9.5.4 Antigennachweis mittels polyklonaler AK nach der PAP-Methode

1. Wechseln der Schnitte aus der Küvette in Coverplates[®] (721100013 Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main)
2. Blocken der unspezifischen Bindungen mit 1:1 Schweineserum in TBS
3. 10 min bei Raumtemperatur
4. Einbringen von je 100 µl des in 20% Schweineserum in TBS verdünnten Primärantikörpers in die Coverplates[®]
5. Inkubation über Nacht bei 4°C
6. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate[®]

7. Einbringen von je 100 µl Schwein anti-Kaninchen IgG 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate[®]
8. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
9. Spülen durch Einbringen von 2 ml TBS je Coverplate[®]
10. Einbringen von je 100 µl Kaninchen-PAP 1:100 in 20% Schweineserum in TBS je Coverplate[®]
11. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
12. Spülen durch Einbringen von je 2 ml TBS je Coverplate[®]
13. weiter mit *Abschnitt 9.5.5*

9.5.5 Standard zur Nachbehandlung

1. Wechseln der Schnitte aus den Coverplates[®] in eine Küvette
2. 10 min Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Fluka, Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01% H₂O₂ (30%) 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) bei Raumtemperatur
3. 3 x 5 min Waschen in TBS bei Raumtemperatur
4. 5 min Waschen in Aqua dest. bei Raumtemperatur
5. 10 sec Gegenfärbung mit PAPANICOLAOUs Lösung und 5 min Bläuen in Leitungswasser
6. Je 3 min Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe
7. 5 min Roti[®]-Histol
8. 5 min Roti[®]-Histol
9. 10 min Xylol
10. Eindecken der Objektträger

9.5.6 Verwendete Antikörper und Seren

Die in der Studie verwendeten Primärantikörper, ihre Bezugsquellen sowie die verwendeten Verdünnungen sind Tab. 9.7 zu entnehmen

Tab.9.8: Verwendete Primärantikörper ihre Bezugsquellen und Verdünnungen

Antikörper	mab/pab.	Verd.	Bezugsquelle
Maus anti-Human Östrogenrezeptor Clone 6F11	mab.	1:20	NCL-ER-6F11 Medac GmbH, Wedel
Maus anti-Human Progesteronrezeptor Clone PR4-12	mab.	1:10	GR18 Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Ts
Maus anti-Human Ki-67 Clone MM1	mab.	1:10	NCL-Ki-&7-MM1 Medac GmbH, Wedel
Maus anti-Schwein Vimentin Clone V9. (1).	mab.	1:400	M 0725 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Human Desmin Clone D33	mab.	1:400	M 0760 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Maus anti-Human α -Aktin Clone 1A4	mab.	1:100	M 0851 Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Kaninchen anti-Laminin	pab.	1:100	L-9393 Sigma Bioscience, Deisenhofen
Kaninchen anti Fibronektin	pab.	1:5	031502702 Quartett Immundiagnostika und Biotechnologie GmbH, Berlin
Kaninchen anti Uteroferrin	pab.	1:25	Prof. Dr. Bazer Texas A&M University, Texas/USA
Kaninchen anti Uteroglobulin	pab.	1:600	Dr. Klug Justus v. Liebig Universität, Gießen
Kaninchen anti Uterokalin	pab.	1:150	Prof. Dr. Allen Equine Fertility Unit, Cambridge/England
Kaninchen anti Calbindin _{D9K}	pab.	1:500	CB9, Swant Bellinzona/Schweiz

Legende zu Tab.9.8: mab: monoklonal pab: polyklonal Verd.: Verdünnung

Schweineserum

Das von Schlachtschweinen stammende Serum wurde sterilfiltriert, zur Konservierung mit 0,05% Merthiolat versetzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Sekundäre Antikörper

Als Sekundärantikörper für **monoklonale** Primärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 1% BSA in TBS verdünntes Ratte anti-Maus IgG (H&L, Code-Nr.: 415005100, Dianova GmbH) eingesetzt

Als Sekundärantikörper für **polyklonale** Primärantikörper nach der PAP-Methode wurde 1:100 in 20% Schweineserum in TBS verdünntes Schweine anti-Kaninchen IgG (DAKO ZO196) verwendet.

Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Komplex

Als PAP-Komplex für die **monoklonalen** Primärantikörper diente eine 1:500 in 1% BSA in TBS verdünnte Maus-PAP (Code Nr. 223005025, Dianova Diagnostika GmbH, Hamburg).

Als PAP-Komplex für die **polyklonalen** Primärantikörper wurde eine 1:100 in 20% Schweineserum in TBS verdünnte Kaninchen-PAP (DAKO ZO113) eingesetzt.

Kontrollseren

Als Kontrollserum (Negativkontrolle) für die **monoklonalen** Antikörper aus der Maus wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenantigen von Hühner-Bursa-Lymphozyten (T1; HIRSCHBERGER 1987) verwendet.

Als Negativkontrolle für die **polyklonalen** Antikörper aus dem Kaninchen wurden die Schnitte jeweils parallel mit normalen Kaninchenserum (DAKO X0902) inkubiert.

9.5.7 Lösungen und Puffer

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung:

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, 48552)

610 ml Aqua dest.

390 ml HCl 1 N (Merck, 109970)

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8% NaCl (Merck, 106400) in Aqua dest.

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,2, 300 mOsm)

Stammlösung:

42 g NaCl krist. (Merck, 106400)

9,26 g Na₂HPO₄ x 2H₂O p.a. (Merck, 106580)

2,15 g K₂HPO₄ (Merck, 105104)

Aqua bidest. ad 100 ml

Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in Aqua bidest.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)*Stammlösung A:*

0,1 M Zitronensäure (Merck, 100247)

(21,01 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ in 1000 ml Aqua dest.)

Stammlösung B:

0,1 M Natriumcitrat (Merck, 106448)

(29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ in 1000 ml Aqua dest.)

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol (Merck, 104716)

Aqua dest. ad 1000 ml

Zugabe von 500 ml 0,1 M HCl

Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

100 mg DAB (Fluka 32750) in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer)

Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 μ l H_2O_2 (30%) (Merck, 107210) zugeben

PAPANICOLAOUs Lösung

PAPANICOLAOUs Lösung (Merck, 109254) und Aqua dest. im Verhältnis 1:20 mischen und filtrieren

Merthiolat Gebrauchslösung

10 g Ethylenmercurithiosalicylsäure Na-Salz (Merthiolat) (Sigma, T 5125)

100 ml 0,8% NaCl (Merck, 106400)

9.6 Bilddokumentation

Histopathologische und immunhistologische Befunde der Endometrose

Abb. 9.1: Übersichtsaufnahme eines Endometriums mit einer mittelgradigen Endometrose, (17-jährige Stute). Deutlich erkennbar sind die in den mittleren und basalen Anteilen des Stratum spongiosum gelegenen von der periglandulären Fibrose betroffenen Einzeldrüsen (**Pfeile**) und Drüsennester (**Pfeilspitzen**). Deren unterschiedliche Größe und Lokalisation bedingen das variable Erscheinungsbild der Endometrose innerhalb einer Biopsie.

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung, 12,5x

Abb. 9.2: Aktive Endometrose, (14-jährige Stute). Einzeldrüse (**ED**) mit zahlreichen, ungeordnet in mehreren Schichten gelegenen „fibrotischen“ Stromazellen. Diese weisen mittelgroße bis sehr große länglich-ovale hypochromatische Zellkerne auf (**SZ**).

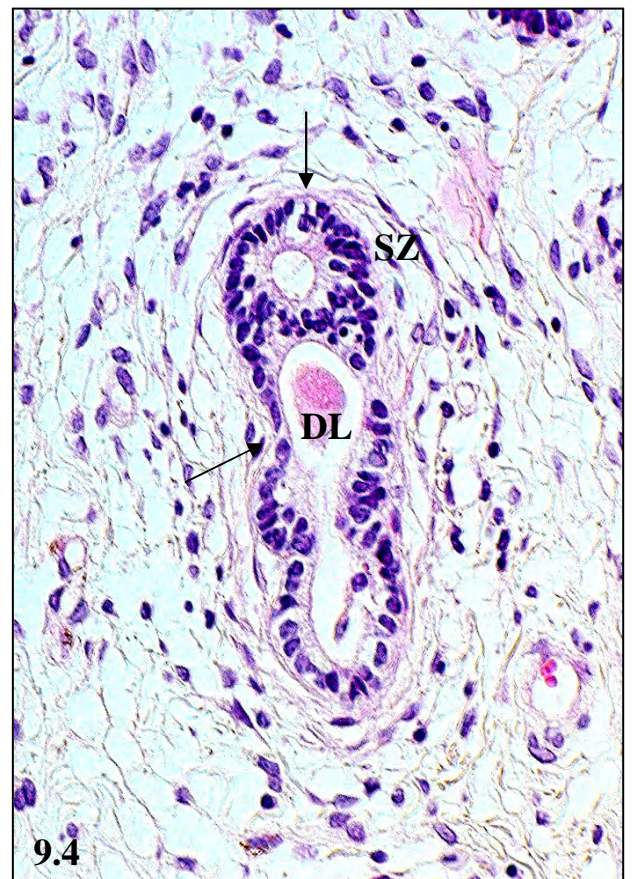
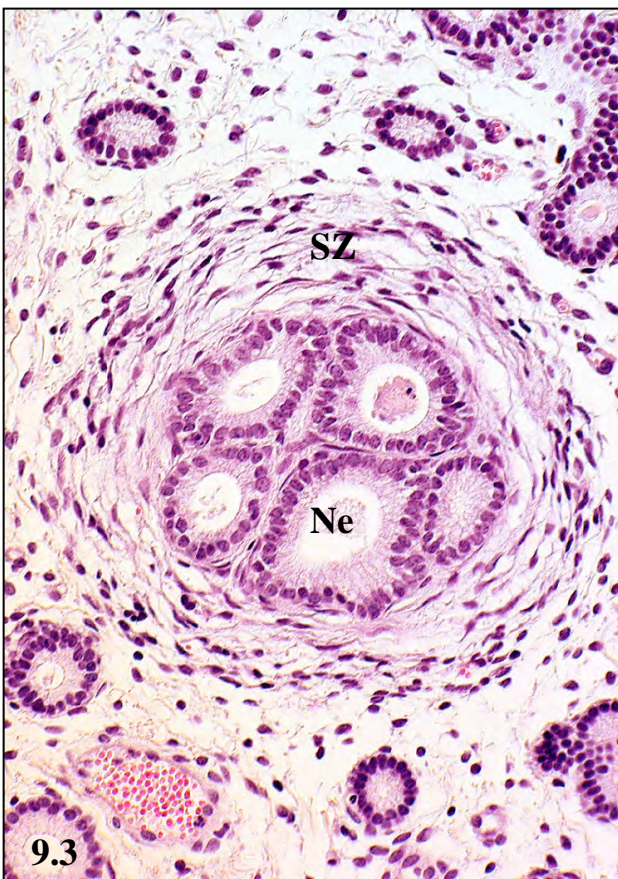
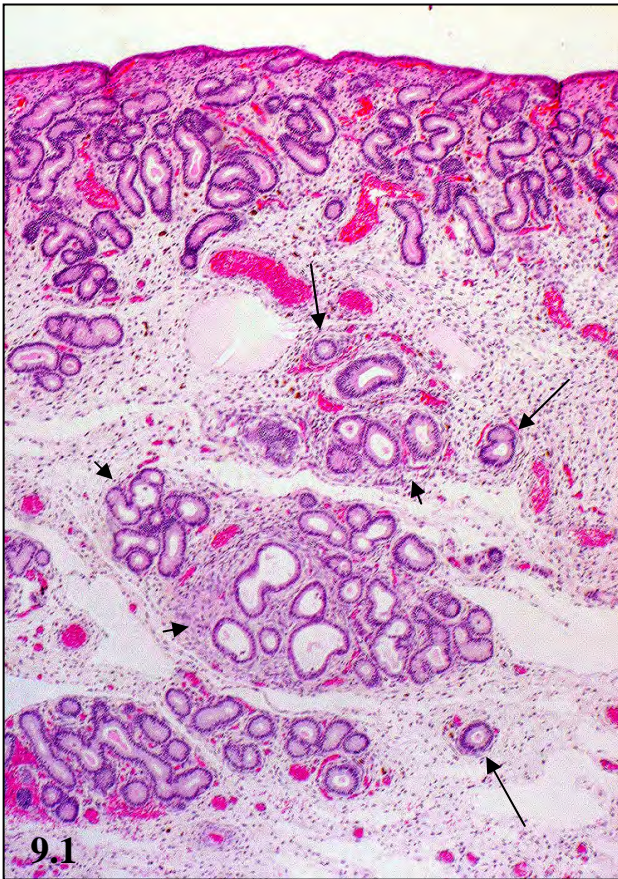
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.3: Inaktive Endometrose, (11-jährige Stute). Kleines Drüsennest (**Ne**) mit deutlich erkennbarer „zwiebelschalenartiger“ Anordnung der „fibrotischen“ Stromazellen. Diese besitzen spindelförmige, schmale hyperchromatische Zellkerne sowie ein langgestrecktes Zytoplasma (**SZ**).

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.4: Inaktive destruierende Endometrose, (11-jährige Stute). Einzeldrüse mit inaktiv differenzierten, parallel zur Achse der Drüsenepithelien hin ausgerichteten „fibrotischen“ Stromazellen (**SZ**), multifokalen Destruktionserscheinungen einzelner Epithelien (**Pfeile**) und einem Sekretstau im Drüsenlumen (**DL**).

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x



Histopathologische und immunhistologische Befunde der Endometrose

Abb. 9.5: Aktive destruierende Endometrose

A: (16-jährige Stute). Einzeldrüse (**ED**) mit aktiv differenzierten, ungeordneten, teils in das benachbart liegende Drüsenepithel eindringenden „fibrotischen“ Stromazellen (**Pfeile**). Deutlich erkennbar sind die umfangreichen epithelialen Degenerationen, die eine vollständige Destruktion der gewebsspezifischen Strukturen bedingen (**Pfeilspitzen**). Daneben sind unveränderte Drüsenepithelien zu sehen (**uD**).

H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

B: (11-jährige Stute). Drüsennest (**Ne**) mit zahlreichen aktiv differenzierten, ungeordneten, teils in das Drüsenlumen einbrechenden „fibrotischen“ Stromazellen (**Pfeile**). Die involvierten Drüsenepithelien weisen unterschiedliche Stadien der Degeneration auf (**Pfeilspitzen**). Neben dem Drüsennest sind unveränderte Drüsenepithelien erkennbar (**uD**).

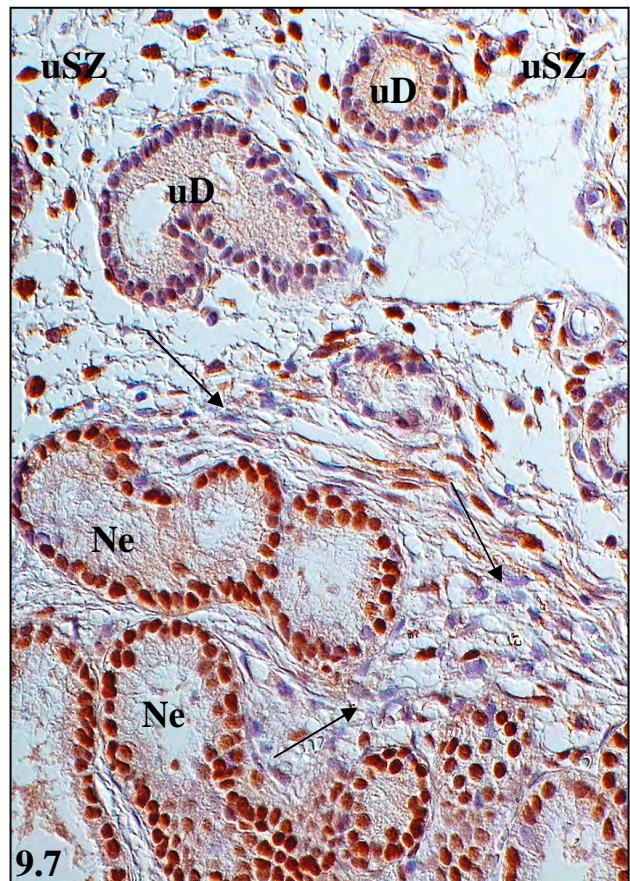
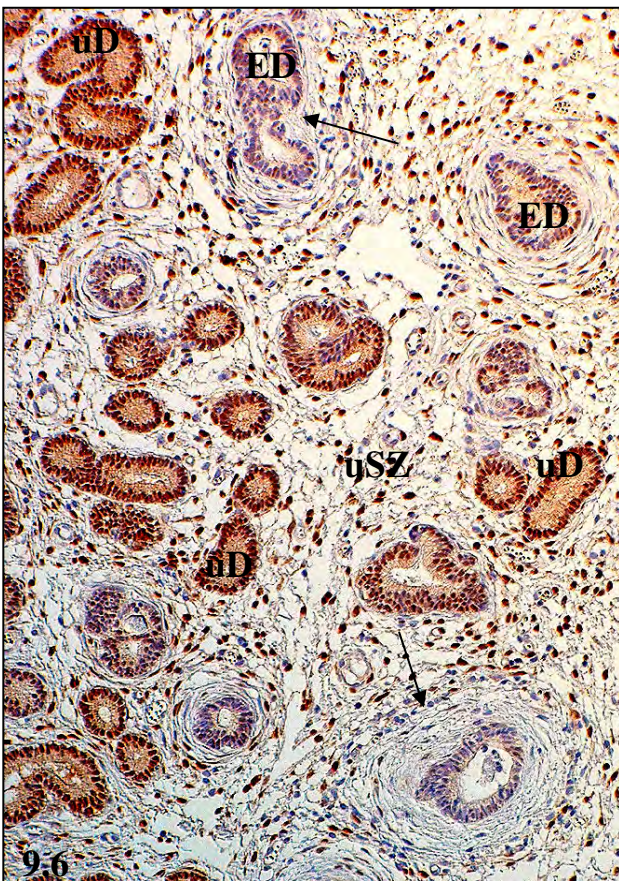
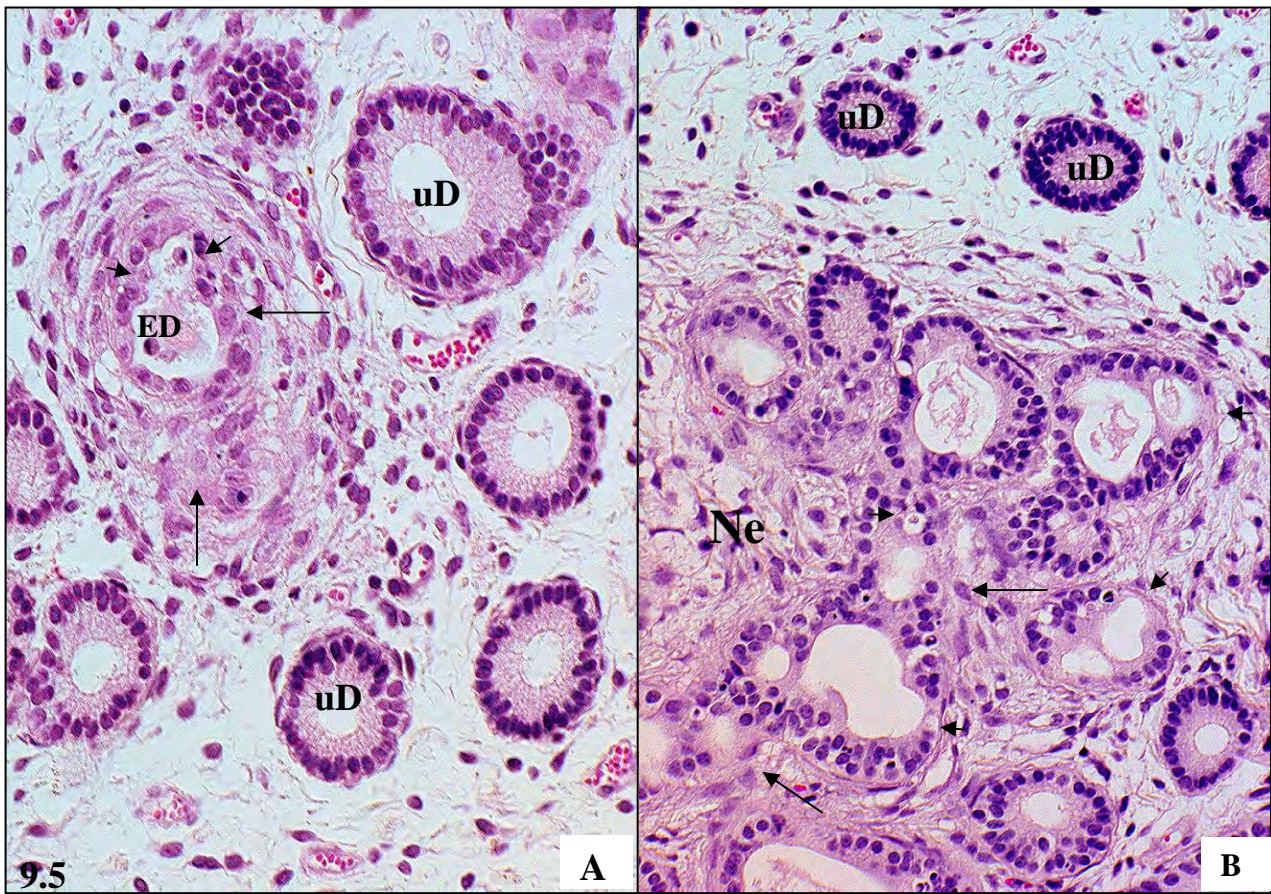
H.-E.-Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.6: Stromale und epitheliale Östrogenrezeptor(ER)-Expression innerhalb einer inaktiven destruierenden Endometrose, (20-jährige Stute). Auffällig ist die von den umliegenden, unveränderten endometrialen Strukturen (Stromazellen (**uSZ**), Drüsenepithelien (**uD**)) abweichende, stark verminderte bzw. nicht nachweisbare ER-Expression der inaktiv differenzierten „fibrotischen“ Stromazellen (**Pfeile**) und der involvierten glandulären Epithelien (**ED**).

Immunhistologie, Östrogenrezeptoren, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 31,25x

Abb. 9.7: Stromale und epitheliale (ER)-Expression innerhalb einer aktiven Endometrose, (6-jährige Stute). Neben der im Vergleich zu den umliegenden, unveränderten Stromazellen (**uSZ**) geringgradig verminderten Expressionsintensität der aktiv differenzierten „fibrotischen“ Stromazellen (**Pfeile**) fällt zudem die geringgradig erhöhte epitheliale ER-Konzentration innerhalb des fibrotischen Nestes (**Ne**) im Vergleich zu den danebenliegenden, unveränderten Epithelien (**uD**) auf.

Immunhistologie, Östrogenrezeptoren, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x



Immunhistologische und histochemische Befunde der Endometrose

Abb. 9.8: Epitheliale Vimentinexpression innerhalb eines Drüsennestes mit aktiver destruierender Endometrose, (11-jährige Stute). Hochgradige, vorwiegend basale Vimentinexpression (**Pfeile**) in den unterschiedlich stark geschädigten Drüsenepithelien (**Ne**). Die daneben liegenden unveränderten Drüsenepithelien (**uD**) reagieren negativ, zudem weisen nicht alle „fibrotischen“ Stromazellen eine Vimentinexpression auf (**Pfeilspitzen**).

Immunhistologie, Vimentin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 31,25x

Abb. 9.9: Glattmuskulatur- α -Aktin-Expression (α -GMA) der „fibrotischen“ Stromazellen einer aktiven destruierenden Endometrose, (14-jährige Stute). Hochgradige, in allen „fibrotischen“ Stromazellen nachweisbare diffus intrazytoplasmatische α -GMA-Expression (**SZ**). Die innerhalb des fibrotischen Herdes gelegenen Drüsenepithelien (**Ne**) weisen nur geringe Destruktionserscheinungen auf.

Immunhistologie, α -GMA, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.10: Lamininexpression innerhalb verschiedener fibrotischer Herde

A: (18-jährige Stute). Einzeldrüse (**ED**) mit einer *aktiven Endometrose* und einer teils verdickten (**Pfeil**), teils aufgefaserten (**Pfeilspitze**) vorwiegend jedoch kontinuierlichen Basallamina. Eine reguläre, kontinuierliche Lamininexpression weisen die unveränderten Drüsenepithelien (**uD**) auf.

Immunhistologie, Laminin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

B: (17-jährige Stute). Teil eines Drüsennestes (**Ne**) mit einer *aktiven destruierenden Endometrose* und einer stark variierenden, diskontinuierlichen Struktur der epithelialen Basallamina (**Pfeile**). Zudem kann eine diffus intrazytoplasmatische Lamininexpression in den „fibrotischen“ Stromazellen (**Pfeilspitzen**) beobachtet werden.

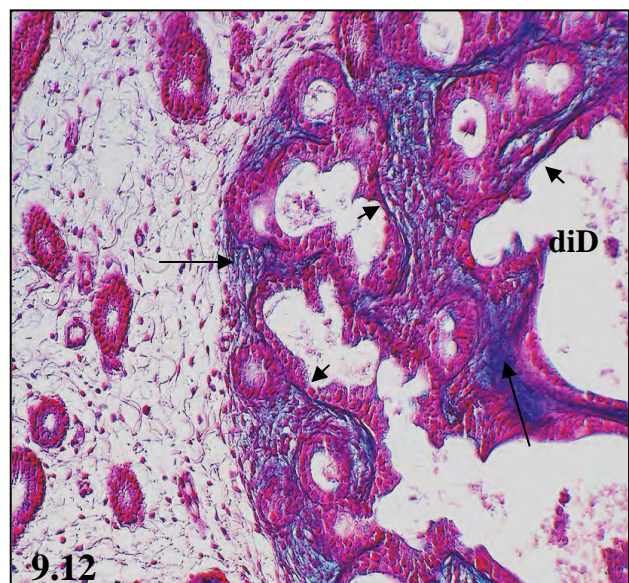
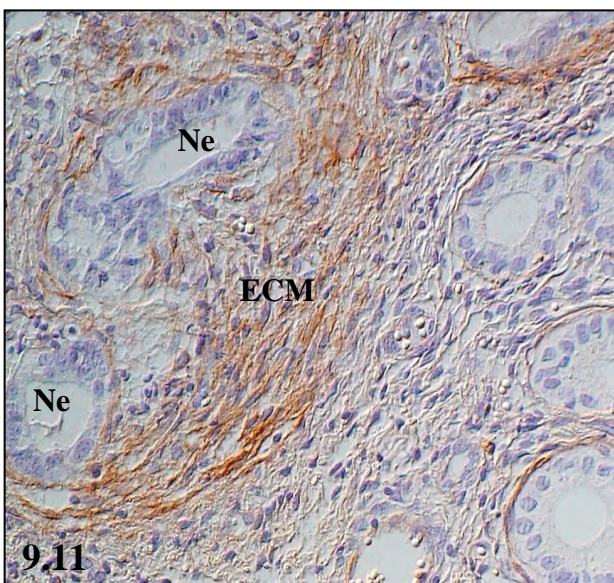
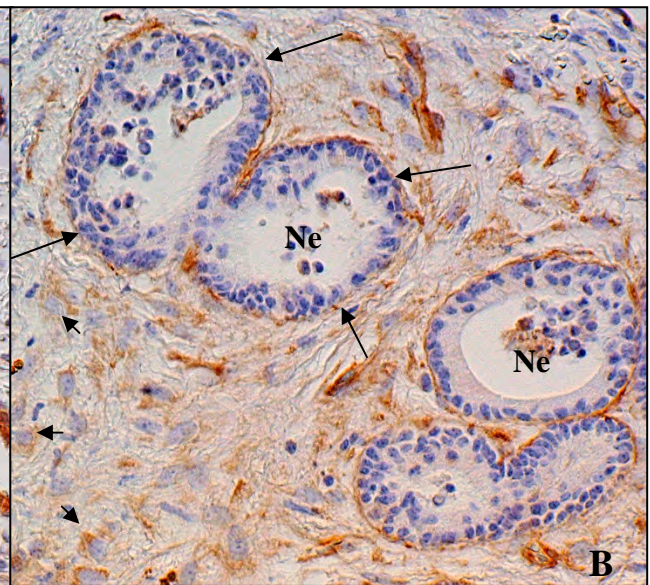
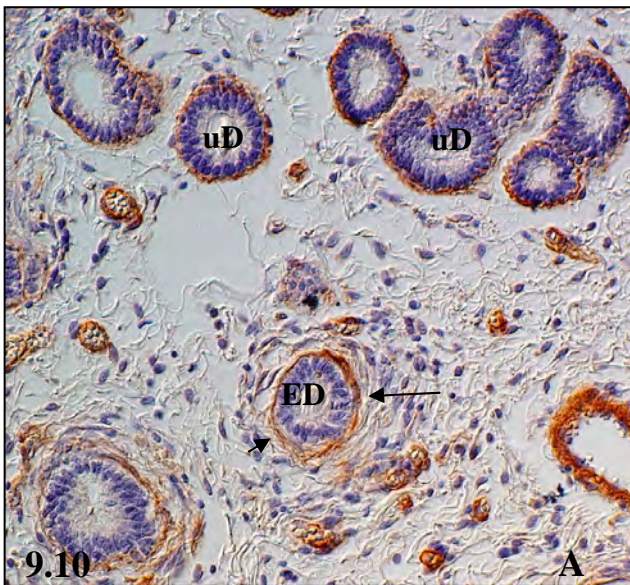
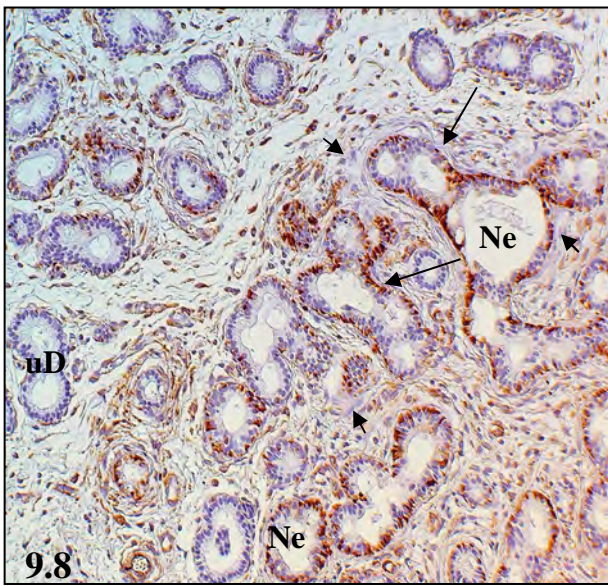
Immunhistologie, Laminin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.11: Fibronektinexpression in der Extrazellulärmatrix einer aktiven destruierenden Endometrose, (14-jährige Stute). Teil eines Drüsennestes mit hochgradiger „faserartig“ erscheinender Expression von Fibronektin in der fibrotischen ECM (**ECM**) und unterschiedlich stark destruierten Drüsenepithelien (**Ne**).

Immunhistologie, Fibronektin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.12: Nachweis von Proteoglykanen in der Extrazellulärmatrix einer aktiven destruierenden Endometrose, (16-jährige Stute). Teil eines großen Drüsennestes mit einer deutlichen Ablagerung von Proteoglykanen innerhalb der fibrotischen ECM (**Pfeile**). Die Drüsenepithelien erscheinen teils dilatiert (**diD**), teils weisen sie deutliche Destruktionserscheinungen auf (**Pfeilspitzen**).

Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 31,25x



Immunhistologische Befunde der endometrialen Proteine im unveränderten Endometrium (Zyklusverlauf)

Abb. 9.13: Uteroglobineexpression im unveränderten Endometrium (Zyklusverlauf)

A: Stute 8, 10. Tag p.ov.: vorwiegend apikales intrazytoplasmatisches (**Pfeile**), innerhalb des Drüsenquerschnittes (**DE**) gleichmäßiges Expressionsmuster des Uteroglobins (im mittleren Bereich des Stratum spongiosum gelegene Drüsenepithelien).

Immunhistologie, Uteroglobin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

B: Stute 9, Ovulation (Tag 0): diffuses intrazytoplasmatisches, innerhalb des Drüsenquerschnittes (**DE**) gleichmäßiges Expressionsmuster des Uteroglobins (im mittleren Bereich des Stratum spongiosum gelegene Drüsenepithelien).

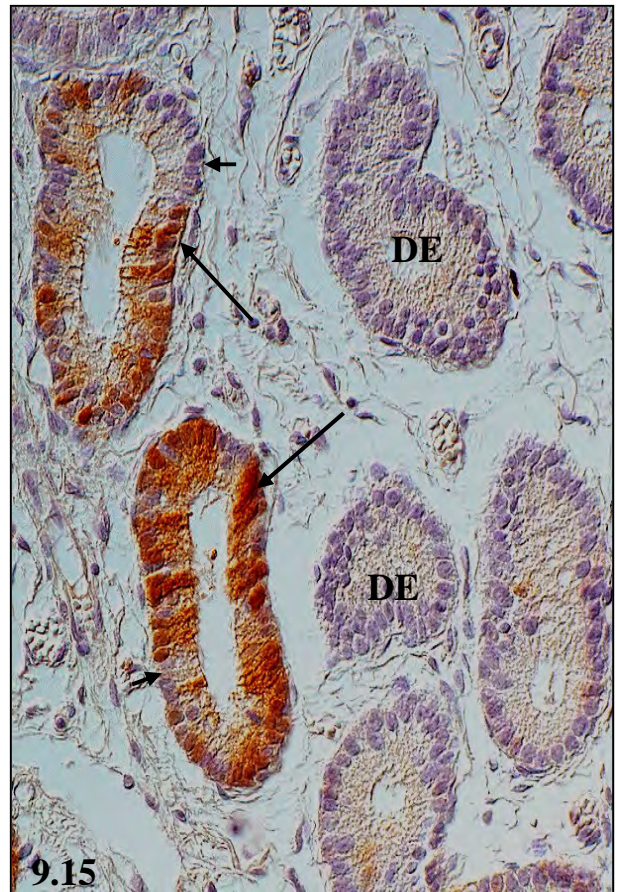
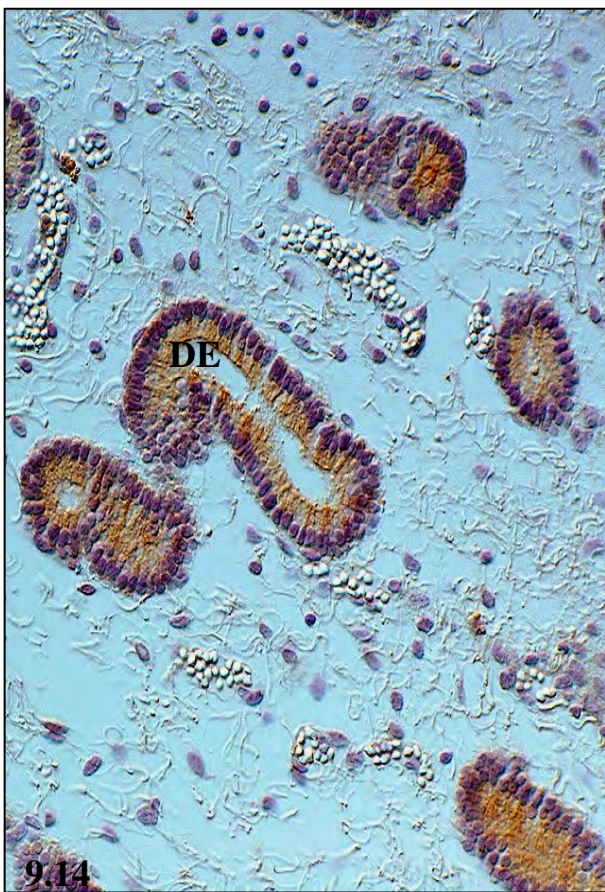
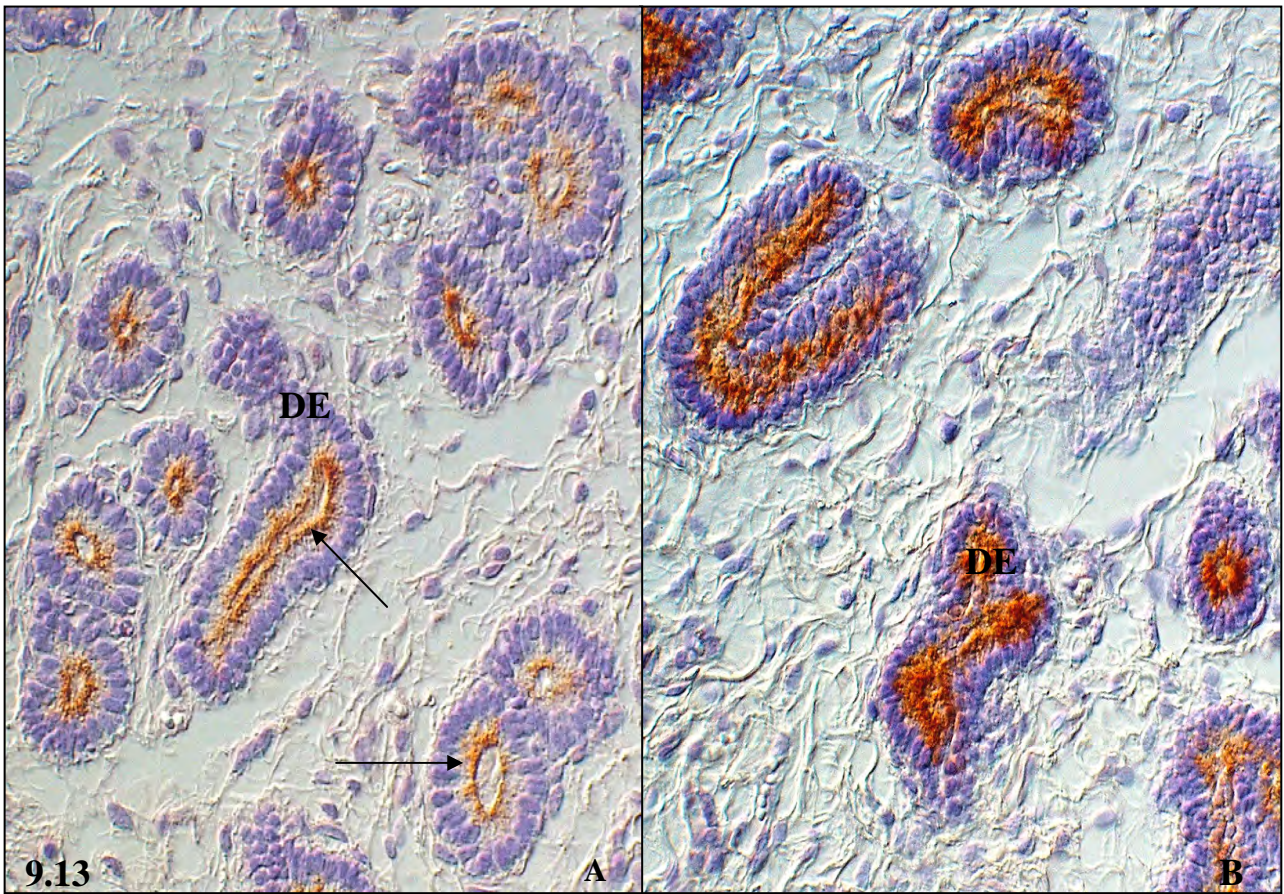
Immunhistologie, Uteroglobin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.14: Uteroferrineexpression im unveränderten Endometrium, Stute 9, 13. Tag p.ov.: diffus intrazytoplasmatisches, innerhalb des Drüsenquerschnittes (**DE**) gleichmäßig exprimiertes Uteroferrin (Drüsenepithelien aus dem mittleren Bereich des Stratum spongiosum).

Immunhistologie, Uteroferrin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.15: Calbindin_{D9k}-Expression im unveränderten Endometrium, Stute 9, 5. Tag p.ov.: deutlich erkennbares „mosaikartiges“ Reaktionsmuster. Innerhalb eines Drüsenquerschnittes fallen einzelne Epithelien mit einer hochgradigen Expression (**Pfeile**) des Proteins neben Epithelien mit schwacher oder fehlender Anfärbung (**Pfeilspitzen**) auf. Daran angrenzend können vollständig negativ reagierende Drüsenquerschnitte (**DE**) beobachtet werden.

Immunhistologie, Calbindin_{D9k}, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x



Immunhistologische und histochemische Befunde der endometrialen Proteine und Kohlenhydrate im unveränderten Endometrium (Zyklusverlauf) und innerhalb der fibrotischen Herde.

Abb. 9.16.: Uterokalin-Expression im unveränderten Endometrium, Stute 9, 10. Tag p.ov.: diffus intrazytoplasmatisches, innerhalb des Drüsenquerschnittes (**DE**) gleichmäßiges Expressionsmuster des Uterokalins, (im mittleren Bereich des Stratum spongiosum gelegene Drüsenepithelien).

Immunhistologie, Uterokalin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.17: Nachweis von Glykogen im Verlauf des Zyklus (Stute 10, Ovulation (Tag 0))

A: PAS-Reaktion ohne vorherige α -Amylase-Verdauung: diffuse intrazytoplasmatische Verteilung der Glykogengranula sowie Nachweis positiven Materials in den Lumina der Uterindrüsen (**DE**)

PAS-Reaktion, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

B: PAS-Reaktion mit vorheriger α -Amylase-Verdauung: PAS-positives Material ist weder intraepithelial noch intraluminal nachweisbar (**DE**), die Lokalisation entspricht der von Abb. A

α -Amylase-Verdauung mit anschließender PAS-Reaktion, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

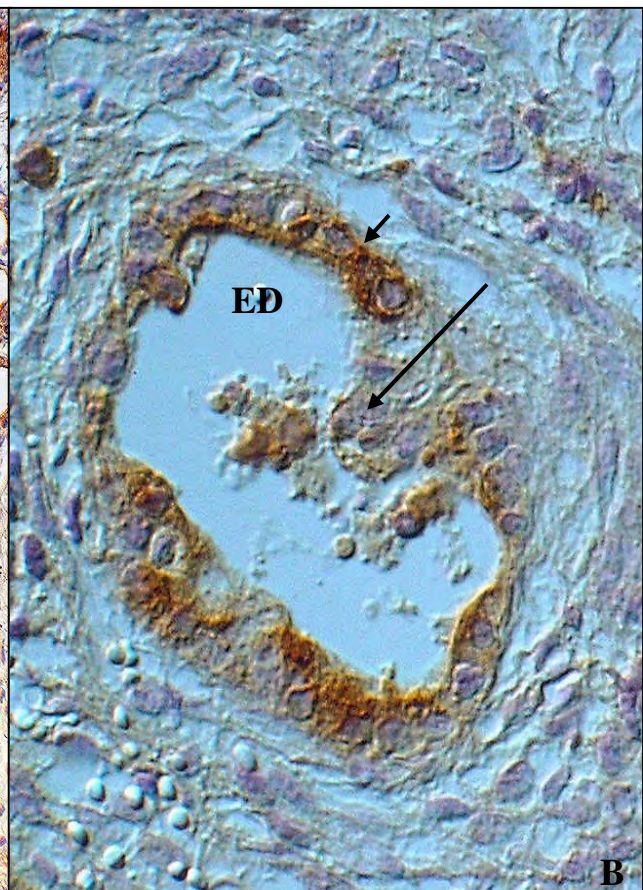
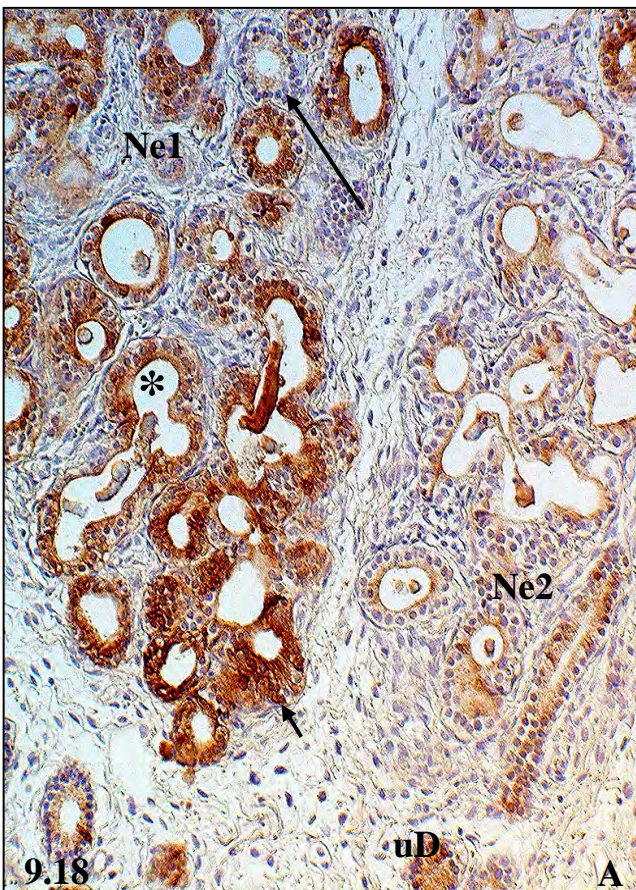
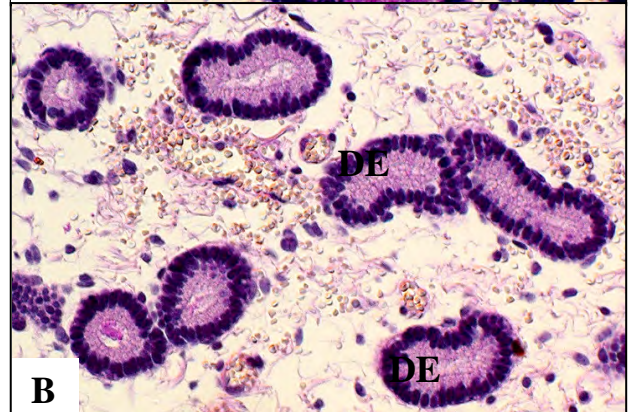
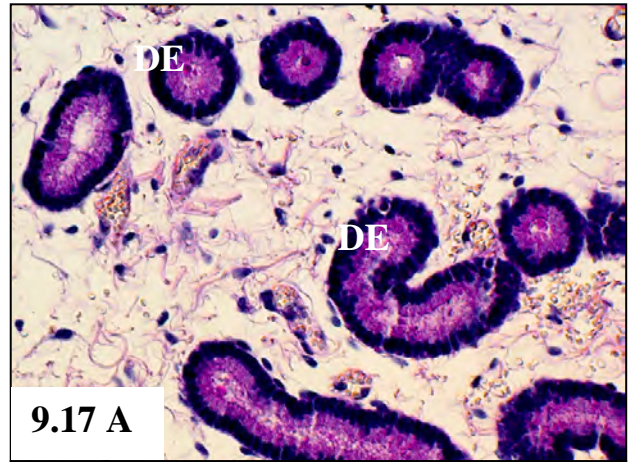
Abb. 9.18: Expression des Uteroferrins im Rahmen der Endometrose.

A: (11-jährige Stute), Drüsenester (**Ne1** und **Ne2**) mit *hochgradiger, teils destruierender Endometrose* und variablem Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Drüsenepithelien. Diese zeigen ein ungleichmäßiges Reaktionsmuster zum Teil mit einer deutlichen Überexpression (**Pfeilspitze**) des Proteins sowie einer nahezu zyklussynchron (**Pfeil**) erscheinenden Farbeintensität. In einem Teil der Drüsenlumina ist ein deutlicher Sekretstau (*) positiv reagierenden Materials zu beobachten. Zudem fällt in einem Drüsenest (**Ne2**) ein vorwiegend apikales Reaktionsmuster des Proteins auf. An die Drüsenester angrenzende unveränderte Drüsenepithelien (**uD**) weisen eine gleichmäßige, diffus intrazytoplasmatische Expression auf

Immunhistologie, Uteroferrin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 31,25x

B: (22-jährige Stute), Einzeldrüse (**ED**) mit einer *hochgradigen destruierenden Endometrose* und Einbruch einer „fibrotischen“ Stromazelle (**Pfeil**) in das Drüsenlumen. Auffällig ist die deutliche, gleichmäßige diffus intrazytoplasmatische Expression des Uteroferrins (**Pfeilspitze**) in den hochgradig degenerativ geschädigten Drüsenepithelien.

Immunhistologie, Uteroferrin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x



Immunhistologische Befunde der endometrialen Proteine im Rahmen der Endometrose

Abb. 9.20.: Zyklusasynchrones Expressionsmuster von Uteroglobulin und Calbindin_{D9k} in der gleichen Lokalisation, dargestellt mit Hilfe von Serienschnitten (17-jährige Stute).

A: Kein Nachweis von Uteroglobulin in den von der periglandulären Fibrose betroffenen glandulären Epithelien (**ED**). In den unveränderten Drüsenepithelien (**uD**) gleichmäßig vorwiegend apikal exprimiertes Uteroglobulin.

Immunhistologie, Uteroglobulin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

B: Drüsenepithelien (**ED**) innerhalb des fibrotischen Herdes zeigen eine multifokale, teils intranukleäre (**Pfeil**), teils diffuse (**Pfeilspitze**) intrazytoplasmatische Calbindin_{D9k}-Expression. Die daran angrenzenden unveränderten Drüsenepithelien (**uD**) exprimieren kein Calbindin_{D9k}.

Immunhistologie, Calbindin_{D9k}, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Abb. 9.21: Im Vergleich zu den unveränderten Drüsenepithelien, schwächere intraepitheliale Expressionsintensität innerhalb destruierender und nicht destruierender Endometrosen.

A: (11-jährige Stute), glanduläre Epithelien (**ED**) innerhalb einer *nicht destruierenden Endometrose* weisen eine ungleichmäßige, im Vergleich zum umliegenden Epithel verminderte (**Pfeilspitze**) oder fehlende (**Pfeil**) Expression des Uteroglobulins auf. Unveränderte Drüsenepithelien (**uD**) zeigen ein gleichmäßiges, diffuses Reaktionsmuster.

Immunhistologie, Uteroglobulin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

B: (16-jährige Stute), *destruierende Endometrose* mit schwacher Expression des Uterokalins in den betroffenen glandulären Epithelien (**ED**). Die daran angrenzenden unveränderten Uterindrüsen (**uD**) zeigen eine gleichmäßige, deutlich stärkere Färbeintensität.

Immunhistologie, Uterokalin, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

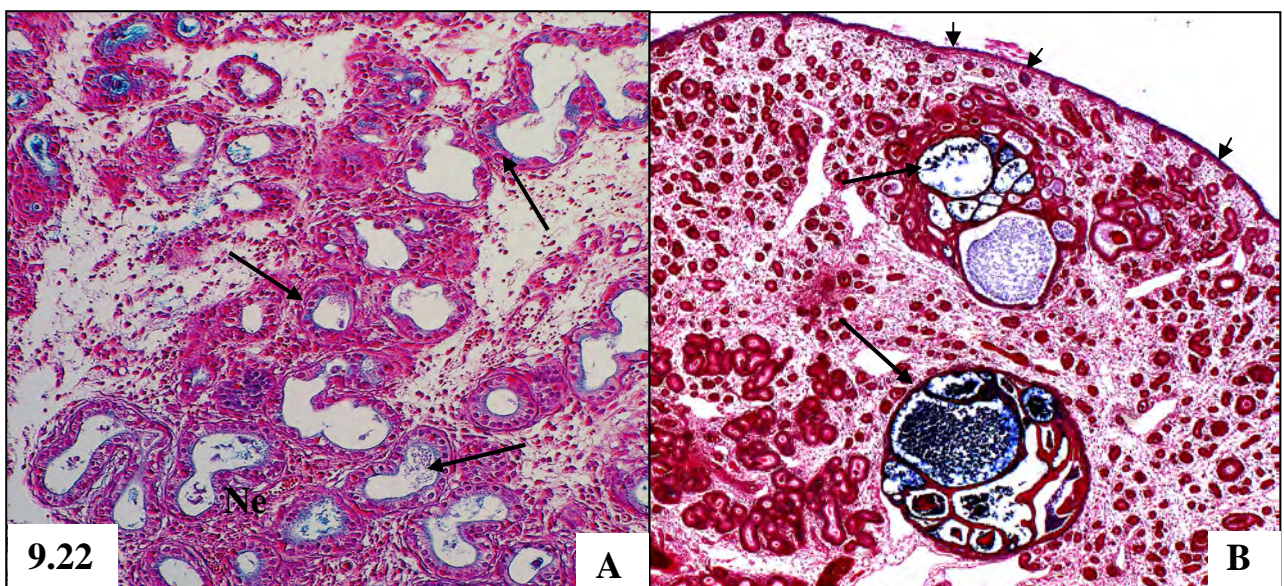
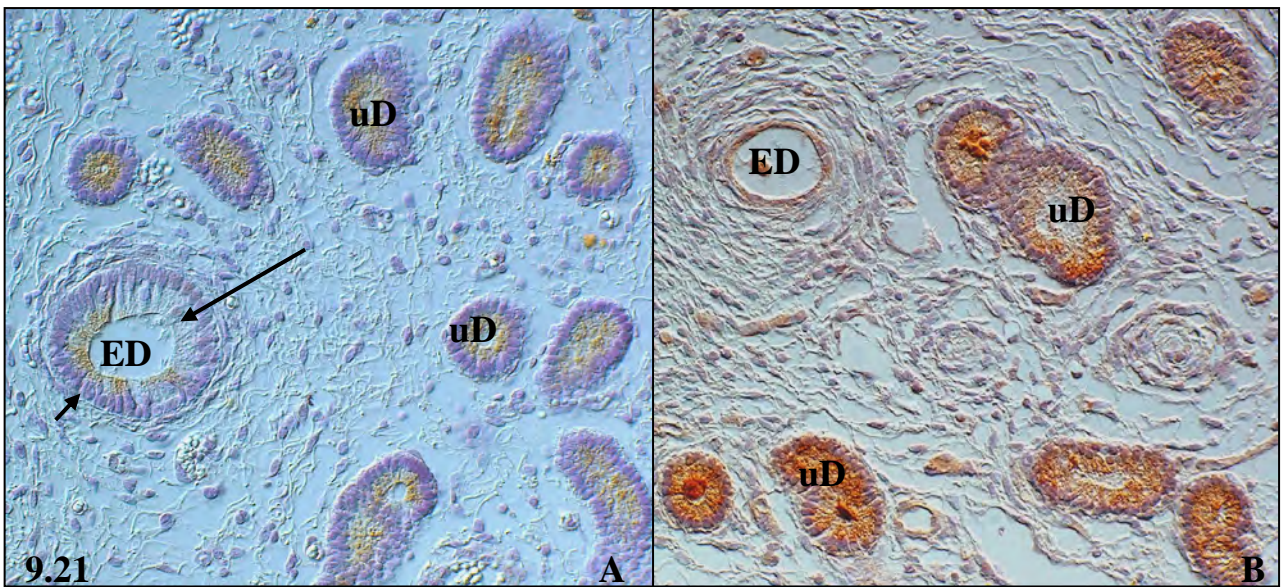
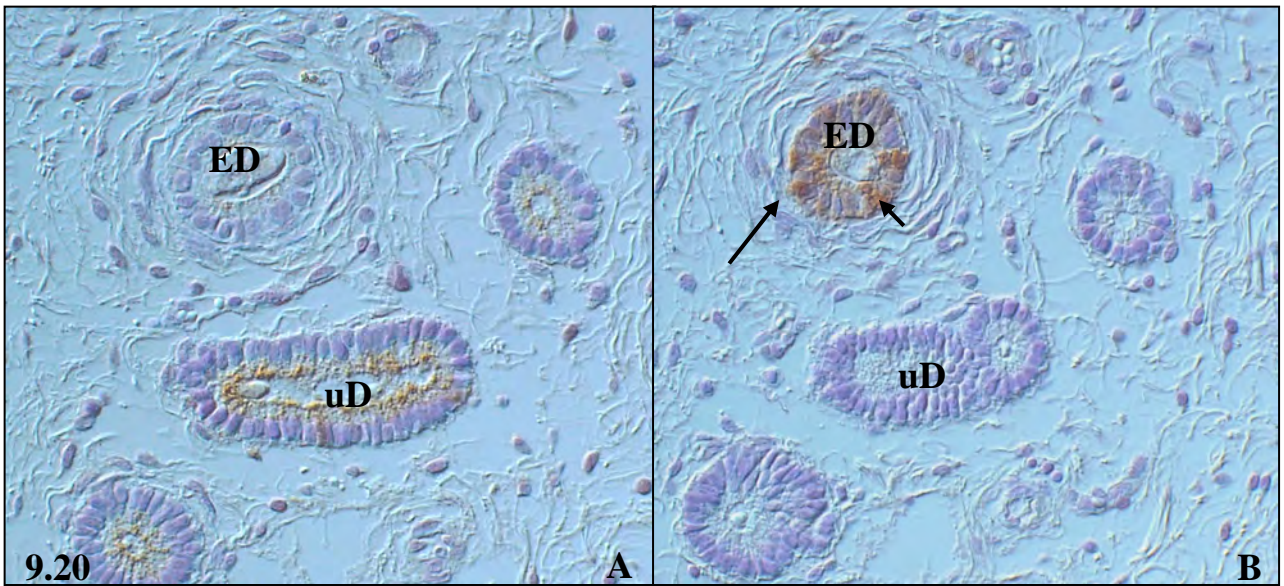
Abb. 9.22: Nachweis neutraler Mukopolysaccharide in den von der Endometrose betroffenen glandulären Epithelien

A: (22-jährige Stute). Übersichtsaufnahme einer *aktiven destruierenden Endometrose* mit konfluierenden fibrotischen Nestern (**Ne**). Deutlich erkennbar ist der multifokale, ungleichmäßig in den einzelnen Drüsenquerschnitten auftretende intraepitheliale und intraluminale Nachweis der Proteoglykane (**Pfeile**)

Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, Nomarski-Interferenzkontrast, Gerätevergrößerung 31,25x

B: (13-jährige Stute), Übersichtsaufnahme einer *inaktiven Endometrose mit hochgradiger glandulär zystischer Dilatation innerhalb der fibrotischen Herde*, intraluminal und intraepithelial sind massenhaft Alcianblau-positive Proteoglykane erkennbar (**Pfeile**). Diese entsprechen in ihrem Färbeverhalten dem luminalen Epithel (**Pfeilspitzen**).

Alcianblau-Färbung bei pH 2,5, Gerätevergrößerung, 12,5x



Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. H.-A. Schoon** für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für seine hervorragende Betreuung und die stets freundliche fachliche und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei **Frau Dr. D. Schoon** möchte ich mich ebenfalls für die jederzeit freundliche und sachkundige fachliche Hilfe bei den schriftlichen Ausfertigungen dieser Arbeit bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei **Frau Dr. H. Aupperle** für die Betreuung von Teilen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Elli** bedanken. Sie hat in allen Phasen der Bearbeitung und Auswertung des Materials sowie bei der Entstehung dieser Arbeit mit konstruktiver Kritik, freundschaftlicher Hilfe und wissenschaftlichen Sachverstand zu deren Entstehung beitragen. Ihre Sorge um mein seelisches Wohl während der mit dem Entstehen einer Doktorarbeit einhergehenden Höhen und Tiefen werde ich nicht vergessen und sind ein Grundstein dieser Arbeit.

Bei **Herrn Dr. K.-F. Schüppel** bedanke ich mich für die Geduld, das Vertrauen und die stete Unterstützung. Unvergessen bleibt für mich, seine Diskussionsfreudigkeit und Begeisterungsfähigkeit hinsichtlich Fragen der Pathologie, die mich geprägt und meinen weiteren Weg geebnet haben.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Pathologie möchte ich mich bedanken.

Die Arbeit wäre niemals in einem solchen Umfang zustande gekommen hätten mich nicht **Frau Herzog, Frau Schleinitz und Frau Pleitz** im Labor unterstützt. Dies betrifft insbesondere die hervorragenden Histoschnitte von Frau Herzog.

Creutzi und **Gesine** standen mir nicht nur hinsichtlich organisatorischer Fragen zur Seite, sondern hatten stets ein offenes Ohr und eine starke Schulter, wann immer es nötig war.

Bei **Ralf, Lars und Bernd** bedanke ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung meines im Studium angeeigneten Wissens.

Ein großes Dankeschön gehört **Wippi**, ohne ihre tatkräftige Unterstützung in Fragen der Immunhistologie wäre diese Arbeit niemals in dieser Form zustande gekommen. Für ihr stets (auch heute noch) offenes Ohr für die Sorgen und Nöte ihres Schützlings kann ich mich nicht genug bedanken.

Mein großer Dank gilt allen Kollegen der Veterinär-Pathologie insbesondere **Matthias, Michi, Anne B., Ines, Katja, Steffi, Sarah, Simone, Anne R. und Tobi**. Sie haben mich stets unterstützt und da geholfen wo es ihnen möglich war.

Für die konstruktiven fachlichen Debatten, die jahrelange unverbrüchliche Freundschaft, das Korrekturlesen und so vieles mehr bedanke ich mich bei **Birgit**. Ohne dich hätte ich es sicher nicht geschafft!

Meinen „Dolmetschern“ **Leila, Anne** und **Dan** die unverdrossen und mit stets guter Laune zur Entstehung meiner Paper beigetragen haben an dieser Stelle ein ganz großes Danke! Ich weiß nicht wie ich das ohne euch geschafft hätte.

Ein ganz großes Dankeschön richte ich an alle INNTler/Riemser. Insbesondere **Anja G., Anja O., Cindy, Jule, Kerstin, Markus G., Martin E.,** und **Martin G.** Sei es das Korrekturlesen, die Formatierungen, das Mut machen, das Arbeitabnehmen oder das Freistellen von der Arbeit, unterstützt habt ihr mich immer.

Allen meinen Freunden, allen voran **Katja**, die die Jahre der Vernachlässigung ohne Murren dafür mit viel Verständnis hingenommen haben ein großes Dankeschön.

Bei **Andi** bedanke ich mich für seine Liebe, sein Verständnis und seine stete Unterstützung während der letzten 5 Jahre. Ohne ihn wäre ich nicht nur am Hunger zugrundegegangen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich immer bei all meinen Zielen unterstützt, mich aufgebaut und mir geholfen hat und die mir dabei stets Liebe und Verständnis entgegengebracht.