

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Apoptose in der uterotubalen Verbindung und im
Eileiteristhmus der Hündin im Zyklusverlauf**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Carola Urhausen
aus Hilden

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.- Prof. Dr. A.-R. Günzel-Apel
Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken
Klinik für Kleintiere

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. A.-R. Günzel-Apel
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. B. Meinecke

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2009

Meinen Eltern

*Das Tier hat ein fühlendes Herz wie du,
das Tier hat Freude und Schmerz wie du,
das Tier hat einen Hang zum Streben wie du,
das Tier hat ein Recht zu leben wie du.*

Peter Rosegger (1843-1918)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Literaturübersicht	11
2.1	Sexualzyklus der Hündin	11
2.2	Endokrinologie des caninen Sexualzyklus	13
2.3	Makroskopische Anatomie des Eileiters	15
2.4	Mikroskopische Anatomie des Eileiters	16
2.5	Mikroskopische Veränderungen des caninen Eileiters im Zyklusverlauf	19
2.6	Apoptose und Nekrose als Formen des Zelltodes	21
2.7	Ablauf der Apoptose	24
2.8	Caspasen	27
2.9	Vorkommen von Apoptose im Ovidukt verschiedener Säugetiere	29
2.10	Vorkommen von Apoptose im Uterus verschiedener Säugetiere	32
2.11	Nachweis von Apoptose in Geweben	34
2.11.1	TUNEL-Methode	34
2.11.2	Caspase	35
2.11.3	Histologie	35
3	Material und Methode	36
3.1	Untersuchungsmaterial	36
3.2	Zyklusdiagnostik	37
3.3	Organgewinnung, Präparation und Fixierung	38
3.4	Anfertigung der Gewebeschnitte	38
3.5	TUNEL-Methode	39
3.6	Caspase-3-Nachweis	42
3.7	Hämalaun-Eosin-Färbung	46
3.8	Auswertung	46
3.9	Statistische Analyse	47

4 Ergebnisse	48
4.1 Nachweis apoptotischer Zellen in der Lamina epithelialis und der Lamina propria der uterotubalen Verbindung	48
4.2 Nachweis apoptotischer Zellen in der Lamina epithelialis und der Lamina propria des Eileiteristhmus	53
4.3 Nachweis apoptotischer Zellen in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus im Vergleich	56
4.4 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina epithelialis der uterotubalen Verbindung im Zyklusverlauf	57
4.5 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina propria der uterotubalen Verbindung im Zyklusverlauf	59
4.6 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina epithelialis des Eileiteristhmus im Zyklusverlauf	60
4.7 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina propria des Eileiteristhmus im Zyklusverlauf	62
5 Diskussion	64
5.1 Bewertung der Apoptose-Nachweisverfahren	64
5.2 Apoptoserate in den verschiedenen Zyklusphasen	66
5.3 Apoptoserate in der Lamina epithelialis und Lamina propria	68
5.4 Apoptoserate in den verschiedenen Eileiterlokalisationen	69
5.5 Vorkommen von Apoptose im periovulatorischem Zeitraum	71
6 Zusammenfassung	73
7 Summary	75
8 Literaturverzeichnis	77
9 Anhang	102
10 Abbildungsverzeichnis	107
11 Tabellenverzeichnis	115

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidasemethode
Abb	Abbildung
AIF	Apoptose Induzierender Faktor
Apaf	apoptotic protease activating factor
Aqua dest.	Aqua destillata
az	apoptotische Zellen
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bax	Bcl-2 associated X Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein-2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator gamma
ca	circa
CAD	Caspase activated DNase
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
Caspase	cytosolic-aspartat-specific-cystein-protease
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DISC	death-inducing-signaling-complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FADD	Fas-Associated Death Domain
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fas-Ligand
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
g	gramm
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H.E.	Hämalaun-Eosin
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
kDa	Kilodalton

LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
min.	Minute
Min	Minimum
ml	Milliliter
Max	Maximum
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
pg	picogramm
post ov.	post ovulationem
ng	Nanogramm
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	Terminale desoxytransferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling
sek.	Sekunde
Smac	Second mitochondria activator of caspases
UTV	uterotubale Verbindung

1 Einleitung

Dem Eileiter kommt im Reproduktionsgeschehen eine zentrale Rolle zu. Seit langem ist bekannt, dass die Befruchtung bei der Hündin, wie auch bei vielen anderen Spezies, in der Eileiterampulle stattfindet. Um das Zusammentreffen von Eizellen und Spermien am Ort der Befruchtung zu gewährleisten, übernimmt der Eileiter wichtige Aufgaben. Hierzu gehört in erster Linie die Aufnahme der Oozyten durch das Infundibulum und deren Weitertransport in Richtung Uterus. Zeitgleich müssen die Spermien in entgegengesetzter Richtung zu den befruchtungsfähigen Eizellen gelangen. Durch die Bereitstellung von Sekretionsprodukten ist der Eileiter wesentlich an der Aufrechterhaltung der Vitalität und Befruchtungsfähigkeit von Eizellen und Spermien beteiligt und schafft außerdem adäquate Bedingungen für die frühe Embryonalentwicklung nach der Befruchtung.

Der Sexualzyklus der Hündin weist, im Vergleich zu anderen Tierarten, endokrine und funktionelle Besonderheiten auf (JÖCHLE u. ANDERSEN 1977). Mit durchschnittlich 7 Monaten besitzt der Hund die längste Zyklusdauer unter den Haussäugetieren (GÜNZEL-APEL et al. 1990). Desweiteren werden die Eizellen der Hündin als unreife Oozyten aus den Ovarfollikeln freigesetzt (HOLST u. PHEMISTER 1971), die erst nach 2-3 Tagen auf ihrem Weg vom kranialen zum kaudalen Eileiterdrittel die zweite meiotische Reifeteilung abschließen und so zu befruchtungsfähigen Oozyten II. Ordnung heranreifen (TSUTSUI 1989). Untersuchungen von DOAK et al. (1967) und ENGLAND et al. (1989) zeigten, dass Hundespermien bis zu 11 Tage im weiblichen Genitale überleben können und eine Bedeckung frühestens 9 Tage vor bis spätestens 8 Tage nach der Ovulation zur Befruchtung führen kann (ENGLAND et al. 1989). Voraussetzung hierfür ist, dass die Spermien unter Erhaltung ihrer Vitalität und Befruchtungsfähigkeit in den Reproduktionsorganen der Hündin so lange gespeichert werden, bis die Oozyten zur Befruchtungsfähigkeit herangereift sind. Während bei Rind, Schwein, Pferd, Schaf und Ziege die Speicherung von Spermien in erster Linie im kaudalen Eileiteristhmus nachgewiesen wurde (HUNTER et al. 1980; HUNTER 1981; HUNTER u. WILMUT 1984; HUNTER et al. 1991; LEFEBRE et al. 1995; TÖPFER-PETERSEN u.

WABERSKI 2001; PETRUNKINA et al. 2001; COX et al. 2002; SCOTT et al. 2002), wird bei der Hündin auch den Uterindrüsen und der uterotubalen Verbindung die Funktion eines Spermienreservoirs zugeordnet (DOAK et al. 1967; RIJSSELAERE et al. 2004; ENGLAND et al. 2006; KARRE 2008). Doch wurde auch bei dieser Spezies der kaudale Eileiter als funktionelles Spermienreservoir identifiziert (SIMON 2002; PETRUNKINA et al. 2003).

Bereits 1973 untersuchten VERHAGE et al. die durch Östrogen und Progesteron verursachten histomorphologischen Veränderungen am Eileiterepithel der Hündin, wobei sich ihre Studien auf die Eileiterampulle beschränkten. STEINHAEUER et al. (2004) stellten zu definierten Zeitpunkten des caninen Zyklus Veränderungen über die gesamte Länge des Eileiters dar. Zusätzlich wurden mittels K-67-Antigen proliferierende Zellen immunhistochemisch detektiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Zelldifferenzierung und zyklische Veränderungen am Epithel der UTV und des Isthmus deutlich seltener auftreten als in anderen Eileiterabschnitten.

Über das Vorkommen von Apoptose im caninen Eileiter als Zeichen der Zelldegeneration ist bis heute wenig bekannt. STEINHAEUER et al. (2004) fanden in H.E. gefärbten Präparaten lediglich in der Lutealphase sporadisch vorkommende apoptotische Zellen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Gewinnung detaillierter Erkenntnisse über das Vorkommen von Apoptose im zyklischen Eileiterepithel der Hündin mittels der TUNEL-Methode und dem Nachweis aktivierter Caspase-3. Hierbei wurde in erster Linie untersucht, ob und in welchen Zellschichten apoptotische Veränderungen zu beobachten sind und welchen Einfluss der Ovarzyklus auf das quantitative Auftreten von Apoptose besitzt.

2 Literaturübersicht

2.1 Sexualzyklus der Hündin

Die Geschlechtsreife tritt bei der Hündin im Alter von 6 bis 24 Monaten ein (JÖCHLE 1976; CONCANNON 1984; FELDMAN u. NELSON 1996). Aufgrund der im Vergleich zu anderen Tierarten langen Zyklusdauer von 6 bis 12 Monaten wird die Hündin als monöstrisch bezeichnet (ANDERSEN u. SIMPSON 1973; CONCANNON et al. 1989; JÖCHLE u. ANDERSEN 1977). Nach SHILLE et al. (1989) und CONCANNON (1993) kann die Läufigkeit zu jeder Jahreszeit auftreten, während TEDOR und REIF (1978) eine erhöhte Reproduktionsaktivität im Herbst und Frühjahr beobachteten. Das Läufigkeitsintervall ist individuell relativ konstant, kann jedoch sowohl zwischen als auch innerhalb der verschiedenen Hunderassen erheblich schwanken (PARADIS 1991).

HEAPE (1900) unternahm erstmalig eine Unterteilung des Zyklus in verschiedene Phasen, deren Terminologie bis heute Bestand hat. Demnach werden die Zyklusphasen der Hündin in den Proöstrus, Östrus, Metöstrus und den Anöstrus unterteilt, denen nach Aufklärung der ovarialen und endometrialen Prozesse in entsprechender Reihenfolge die Follikelphase, die Ovulation und Gelbkörperanbildung, die Lutealphase und Endometriumsreparation sowie die Sexualruhe zugeordnet wurden. (ANDERSEN u. SIMPSON 1973; JÖCHLE u. ANDERSEN 1977).

Der Proöstrus beginnt mit dem ersten sichtbaren Austreten von dunkelrotem, blutigem Läufigkeitssekret aus der Vulva und endet mit der ersten Duldung des Rüden, die den Beginn der Paarungsbereitschaft (Östrus) anzeigt (GÜNZEL-APEL 1994). Dieser erste Abschnitt der Läufigkeit weist eine durchschnittliche Dauer von neun Tagen auf, ist jedoch individuellen Schwankungen von 3 bis 17 Tagen unterworfen (SHILLE et al. 1974; WILDT et al. 1979; CONCANNON 1984; FRESHMAN 1991). Die frühe Follikelphase ist vaginalzytologisch durch

Parabasalzellen, tiefe und hohe Intermediärzellen, Erythrozyten und nur wenige Superfizialzellen und Schollen gekennzeichnet. Dieses Zellbild verändert sich im weiteren Verlauf der Follikelreifung, so dass in der fortgeschrittenen bis späten Follikelphase überwiegend Superfizialzellen und Schollen vorliegen (GÜNZEL u. KOIVISTO 1984; GÜNZEL-APEL 1994).

Die durchschnittliche Dauer des sich anschließenden Östrus (= Phase der Paarungsbereitschaft) beträgt ebenfalls neun Tage mit einer individuellen Schwankungsbreite von 3 bis 21 Tagen (SHILLE et al. 1974; HOLST u. PHEMISTER 1974; CONCANNON 1984; FRESHMAN 1991). Die Menge des während der Paarungsbereitschaft hellroten Läufigkeitssekrets nimmt im Vergleich zum Proöstrus ab (ARBEITER et al. 1991). An den Ovarien setzt zu Beginn des Östrus die präovulatorische Luteinisierung der Follikel ein. Im vaginalzytologischen Präparat werden in Ovulationsnähe ausschließlich Superfizialzellen und Schollen nachgewiesen. Nach JÖCHLE und ANDERSEN (1977) erfolgt die Ovulation bei der Mehrzahl der Hündinnen am 2. bis 3. Tag des Östrus. Der Ovulation folgt noch während der Läufigkeit die Anbildung der Gelbkörper. Ca. 7 Tage post ovulationem beginnt der Metöstrus, welcher äußerlich durch das Abklingen der Deckbereitschaft (FRESHMAN 1991) und zytologisch an einem charakteristischen „Zellumschwung“ im vaginalzytologischen Präparat durch das Auftreten von tiefen Epithelzellen (Intermediärzellen) sowie neutrophilen Granulozyten zu erkennen ist (HOLST u. PHEMISTER 1974; GÜNZEL-APEL u. KOIVISTO 1984).

In dem insgesamt 4,5 Monate dauernden Metöstrus setzt sich die Lutealphase fort. Ihr folgt die Phase der Endometriumsreparation.

Die Lutealphase wird entsprechend der endokrinologischen Aktivität der Gelbkörper in drei Abschnitte unterteilt: Gelbkörperanbildung, Gelbkörperblüte und Gelbkörperregression (ANDERSEN u. SIMPSON 1973; JÖCHLE u. ANDERSEN 1977). Die Lutealphase ist bei der graviden Hündin mit der Geburt abgeschlossen, bei der nicht graviden Hündin endet sie individuell unterschiedlich nach 54 bis 70 Tagen (CONCANNON et al. 1989; HOPPEN 1990).

Der zweite Abschnitt des Metöstrus, die Phase der endometrialen Reparatur, dauert etwa 70 bis 80 Tage (ANDERSEN u. SIMPSON 1973; JÖCHLE u. ANDERSEN 1977). Erst danach ist das Endometrium wieder histomorphologisch intakt.

Der Übergang vom Metöstrus in den Anöstrus ist anhand äußerlicher Anzeichen nicht zu erkennen. Der Anöstrus als Phase der ovariellen und endometrialen „Ruhe“ stellt bezüglich seiner Dauer von 1 bis 6 Monaten eine äußerst variable Zyklusphase dar (CONCANNON 1984). An den Ovarien laufen unterschwellige Follikelan- und -rückbildungswellen ab, die schließlich mit der Entstehung von großen Tertiärfollikeln in den Proöstrus münden. Das vaginalzytologische Präparat wird während dieser Zyklusphase von tiefen Epithelzellen (Basal- und Parabasalzellen) dominiert; Intermediär- und Superficialzellen fehlen vollständig (GÜNZEL u. KOIVISTO 1984).

2.2 Endokrinologie des caninen Sexualzyklus

Die Steuerung der Gonadenfunktion erfolgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) wird pulsatil aus dem Hypothalamus freigesetzt und gelangt über den Blutweg durch die Kapillaren des portalen Systems an der Eminentia mediana des Hypophysenstils in den Hypophysenvorderlappen. Dort bewirkt es die Freisetzung der im Hypophysenvorderlappen gebildeten Gonadotropine FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierungshormon) (HOPPEN 1990; CONCANNON 1993).

Die Gonadotropine führen an den Ovarien zur Bildung und Freisetzung der sogenannten untergeordneten Sexualhormone (ZEREBIN 1987).

Die pulsatile Freisetzung von FSH und LH verursacht bereits im Anöstrus Follikelanbildungswellen und -rückbildungswellen mit schwankenden Östrogenkonzentrationen zwischen 8 bis 15 pg/ml im peripheren Blut (CONCANNON 1986; FELDMAN u. NELSON 1996).

Im späten Anöstrus steigt die Konzentration von FSH allmählich an und induziert eine Follikelreifungswelle an den Ovarien. (OLSON et al 1982; CONCANNON 1993).

Durch eine zunehmende Frequenz der pulsatilen LH-Ausschüttung erfolgt der Übergang vom Anöstrus zum Proöstrus (CONCANNON 1993; VERSTEGEN et al. 1999). Die Follikelreifung wird durch eine gesteigerte FSH-Sekretion stimuliert und es kommt zur Bildung Graafscher Follikel (CONCANNON et al. 1977; KOOISTRA et al. 1999)

Während der Follikelphase nimmt die Konzentration des in den wachsenden Follikeln sezernierten Östradiols im peripheren Blut stetig zu. Nach CONCANNON (1984) sind im frühen Proöstrus Östradiolwerte von 10 bis 30 pg/ml festzustellen, und erreichen 1 bis 3 Tage vor dem LH-Peak Konzentrationen von 50 bis 100 pg/ml. Übersteigt der Plasmaöstradiolspiegel einen gewissen Schwellenwert für mindestens 36 Stunden, kommt es durch einen positiven Feedback-Mechanismus zu einer massiven Ausschüttung von Luteinisierungshormon (LH), die in den präovulatorischen LH-Peak mündet (CONCANNON et al. 1975; HOPPEN 1990; CONCANNON 1986). Bei der Mehrzahl der Hündinnen setzt zu diesem Zeitpunkt die Deckbereitschaft ein.

Nach CONCANNON et al. (1977) stellt der LH-Peak das zentrale endokrinologische Ereignis des Sexualzyklus dar. Er führt zum letzten Wachstumsschub der Follikel und löst durch Umwandlung der östrogensezernierenden Granulosazellen in progesteronsezernierende Luteinzellen eine präovulatorische Luteinisierung der ausgereiften Follikel aus. Durchschnittlich 48 Stunden nach dem LH-Peak findet die Ovulation statt (CONCANNON et al. 1977; 1989; BAAR 1995).

Aufgrund der präovulatorischen Follikelluteinisierung kommt es bereits vor der Ovulation zu einem initialen Anstieg der Progesteronkonzentration im peripheren Blut (CONCANNON et al. 1977; OLSON et al. 1982; GÜNZEL-APEL et al. 1990). Zum Zeitpunkt der Ovulation werden Progesteronwerte zwischen 3 und 8 ng/ml Plasma gemessen (CONCANNON et al. 1975, 1977, 1989; DIETERICH 1994).

Im Oestrus steigt die Progesteronkonzentration sehr schnell weiter an und erreicht 15 bis 30 Tage nach dem LH-Peak Höchstwerte von 15 bis 90 ng/ml (CONCANNON, 1993). Einhergehend mit der Gelbkörperregression sinkt sie kontinuierlich wieder auf basale Werte ($< 0,5$ ng/ml) ab (CONCANNON 1984). Hinsichtlich dieser Entwicklungen in der Progesteronkonzentration bestehen zwischen graviden und

nicht graviden Hündinnen keine wesentlichen Unterschiede (CONCANNON et al. 1975; HOPPEN 1990; FRESHMAN 1991; FELDMAN u. NELSON 1996).

2.3 Makroskopische Anatomie des Eileiters

Der Eileiter (Ovidukt, Tuba uterina, Salpinx) ist ein häutig-muskulöser Schlauch, der von kranial nach kaudal in die Abschnitte Infundibulum, Ampulle und Isthmus unterteilt wird. Er beginnt mit dem Infundibulum ohne kontinuierliche Verbindung unmittelbar am Eierstock und mündet an der uterotubalen Verbindung in die Gebärmutter. Der Eileiter verläuft in seiner gesamten Länge in einer Serosafalte (Mesosalpinx), die beim Hund einen vergleichsweise hohen Anteil Fettgewebe aufweist und zusammen mit dem Eierstockgekröse die Eierstocktasche (Bursa ovarica) bildet (EVANS 1993).

Das trichterförmig erweiterte Infundibulum trägt an seinem Rand unregelmäßige Fimbrien (Fimbriae tubae), die z.T. mit dem Ovar verwachsen sind (Fimbriae ovaricae). In der Tiefe des Infundibulums liegt die Bauchhöhlenöffnung des Eileiters, das Ostium abdominale tubae, welches in kaudaler Richtung in die relativ weite Eileiterampulle (Ampulla tubae uterinae) führt. Das kaudale Drittel des Eileiters, der engere Isthmus tubae uterinae, mündet unter zahlreichen Windungen schließlich mit dem Ostium uterinum tubae in das Gebärmutterhorn (KOCH u. BERG 1985; SCHUMMER u. VOLLMERHAUS 1995).

2.4 Mikroskopische Anatomie des Eileiters

Mikroskopisch sind von innen nach außen unterschiedliche Eileiterschichten zu differenzieren, deren Ausprägung in den verschiedenen Abschnitten des Eileiters variiert.

Die innen (lumenwärts) liegende Tunica mucosa besteht aus der Lamina epithelialis und der Lamina propria und bildet zur Oberflächenvergrößerung zahlreiche Längsfalten (Plicae tubariae), die in Abhängigkeit vom jeweiligen Eileitersegment unterschiedlich weit in das Eileiterlumen hineinragen. Charakteristisch für die Eileiterampulle sind sehr hohe, mit zahlreichen Sekundär- und Tertiärfalten ausgekleidete Schleimhautfalten. Uteruswärts nimmt die Höhe und der Verzweigungsgrad der Schleimhautfalten kontinuierlich ab, bis sie schließlich im Bereich der uterotubalen Verbindung fast vollständig verstreichen (SMOLLICH 1992; LIEBICH 2003).

Die Lamina epithelialis besteht aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel, das sich vorwiegend aus den zilientragenden Zellen (Flimmerzellen) und den sekretorischen Drüsenzellen zusammensetzt (HUNTER 1988; LIEBICH 2003). Beide Zelltypen sind in hohem Maße zyklischen Veränderungen unterworfen (LIEBICH 2003).

Als charakteristisches Merkmal besitzen die Flimmerzellen an der apikalen Zellmembran lange, ins Lumen ragende, bewegliche Kinozilien. Durch rhythmische Bewegung der Kinozilien unterstützen die Flimmerzellen aktiv den uteruswärts gerichteten Flüssigkeitsstrom und somit den Transport der Oozyten in Richtung Uteruslumen (LIEBICH 2003).

Das Vorkommen und der Anteil zilientragender Zellen im Eileiterepithel wird kontrovers diskutiert und zeigt starke Variationen in Abhängigkeit von der Tierart. Beim Hund ist dieser Zelltyp vorwiegend in der Eileiterampulle und nur vereinzelt im Eileiteristhmus zu finden (NILSSON u. REINIUS 1969; MYERS et al. 1984). Dies entspricht den Beobachtungen am humanen Eileiter, bei dem nach PALTER et al.

(2001) die Anzahl zilientragender Zellen von der Ampulla in Richtung Isthmus abnimmt (LYONS et al. 2002). Beim Rind hingegen kommen zilientragende Zellen in allen Abschnitten des Eileiters zu gleichen Teilen vor (LOMBARD 1950). Je nach Tierart und der damit verbundenen Länge des Zyklus variieren auch die zyklischen Veränderungen, denen die Flimmerzellen unterworfen sind. VERHAGE et al. (1990) und ABE et al. (1993) beschreiben eine zyklische Regeneration der zilientragenden Zellen bei Tierarten, die wie die Hündin eine lange Lutealphase besitzen. Dagegen sind beim Menschen und bei Tierarten mit einer kurzen Zyklusdauer nur geringe Zilienverluste zu beobachten (VERHAGE et al 1979).

Die Hauptaufgabe der Drüsenzellen ist die Abgabe von Sekretionsprodukten, die im Eileiter optimale Bedingungen für die Spermienmigration, den Transport der Oozyten, die Befruchtung und die frühe Embryonalentwicklung schaffen (NILSSON u. REINIUS 1969; HUNTER 1988, 1994; ABE et al. 1995).

Die Morphologie der Drüsenzellen variiert tierartspezifisch im Zyklusverlauf. Im Östrus ist sowohl die Zellhöhe als auch die sekretorische Leistung am stärksten ausgeprägt. Die sekretorischen Zellen besitzen zu diesem Zeitpunkt auffällige, in das Lumen ragende Zellkuppen, sogenannte Protrusionen, die Sekretgranula enthalten (LEISER 1990). Durch die Abgabe von Sekretionsmaterial nach der Ovulation verringert sich die Epithelhöhe (ODOR u. AUGUSTINE 1995). Beim Hund wird ein vollständig ablaufender Zyklus einer Differenzierung der Drüsenzellen in der Follikelphase und der Dedifferenzierung in der Lutealphase beschrieben (VERHAGE et al. 1979; ODOR et al. 1980; VERHAGE et al. 1990).

Neben den zilientragenden Zellen und den sekretorischen Zellen werden im Eileiterepithel Stiftchenzellen (peg cells; intercalary cells) und Basalzellen beschrieben.

Bei den Stiftchenzellen handelt es sich um schmale, stäbchenförmige Zellen mit einem pyknotischen Zellkern und dichtem Zytoplasma (LIEBICH 2003), die nach McDANIEL et al. (1968) keine Kinozilien tragen. Während SCHAFFER (1908) die Stiftchenzellen als eine eigenständige Zellform beschrieb, vermutete HÖRMANN

(1909), dass es sich um inaktive Drüsenzellen im Zustand nach der Sekretabgabe handele. Nach VERHAGE et al. (1973a) stellt dieser Zelltyp eine Übergangsform zwischen sekretorischen und ziliotragenden Zellen dar. Heute werden die Stiftchenzellen als inaktive, kollabierte Epithelzellen angesehen, die im Rahmen einer Zellerneuerung aus dem Epithel abgestoßen werden (LEISER 1990; HEES 2000).

Bei den Basalzellen handelt es sich um kleine, runde Zellen, die eng mit der Basalmembran verbunden sind (LIEBICH 2003). Verschiedene Autoren schreiben den Basalzellen eine Funktion als Reservezellen für das Eileiterwachstum zu (PAUERSTEIN u. WOODRUFF 1967; LEISER 1990; LIEBICH 2003). Es liegt jedoch nahe, dass es sich um eingewanderte Leukozyten, meist Lymphozyten, handelt (NOVAK u. SAMPSON 1928; LOMBARD 1950; ABUGHRIEN et al. 2000).

Die drüsenlose Lamina propria bildet die bindegewebige Grundlage der Schleimhautfalten des Eileiters. Sie besteht aus einem zellreichen, feinfaserigen Bindegewebe, das sich kontinuierlich in das Bindegewebe der Tunica muscularis fortsetzt (SMOLLICH 1992; LIEBICH 2003). Bei der Hündin bildet die Lamina propria tiefe Ausbuchtungen, die nach McENTEE (1990) vor allem in der Eileiterampulle und dem Infundibulum zu finden sind.

Die Muskelschicht ist in den verschiedenen Wandabschnitten des Eileiters unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Infundibulum und der Ampulla sind die glatten Muskelschichten auffallend dünn, so dass eine deutliche Schichtung nicht immer zu erkennen ist (SMOLLICH 1992; LIEBICH 2003). Dagegen nimmt im Eileiteristhmus die Wandstärke beachtlich zu (HUNTER 1988; SMOLLICH 1992; LIEBICH 2003). Hier dominiert ein spiraliger Verlauf der Muskelzellen. Diese ausgeprägte zirkuläre Muskelschicht geht in das Stratum circulare der Uteruswand über (LIEBICH 2003).

Die außen liegende Tunica serosa besteht aus mesothelialen Anteilen des Peritoneums und überzieht als einschichtiges Plattenepithel den Eileiter. Unterlagert

von der gefäßreichen, bindegewebigen Tela subserosa ist sie am stärksten an der uterotubalen Verbindung ausgebildet (HEES 2000; LIEBICH 2003).

2.5 Mikroskopische Veränderungen des caninen Eileiters im Zyklusverlauf

Es liegen nur vereinzelte und z.T. wenig detaillierte Studien über die histomorphologischen Veränderungen am Eileiter der Hündin unter dem Einfluss der ovariellen Sexualsteroiden vor.

VERHAGE et al. (1973b) untersuchten die Epithelauskleidung der Eileiterampulle 2 Monate alter, und somit präpubertären Beaglehündinnen, nach Östrogengabe lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch. Auch SAWYER et al. (1984) beschränkten sich auf den Bereich der Eileiterampulle von präpubertären, mit Östrogen und Progesteron behandelten Beagles. In einer Studie an der Eileiterampulle geschlechtsreifer, zyklischer Hündinnen erfolgte die Erhebung des Zyklusstandes lediglich anhand äußerlicher Merkmale (VERHAGE et al. 1973a). STEINHAEUER et al. (2004) führten erstmals eine Studie der histomorphologischen Veränderungen des Oberflächenepithels des gesamten caninen Eileiters in definierten Stadien des Ovar- und Endometriumszyklus durch.

Aufgrund der im Vergleich zu anderen Tierarten langen Zyklusdauer der Hündin von durchschnittlich 7 Monaten sind die zyklischen Veränderungen am Eileiterepithel sehr prägnant. Im Anöstrus, in dem sich die Ovarsteroiden auf basalem Niveau befinden, besteht der Eileiter aus einem einheitlich angefärbten, kubischen und undifferenzierten Epithel (VERHAGE et al. 1973a, SAWYER et al. 1984; STEINHAEUER et al. 2004). In dieser Phase treten nur vereinzelt ziliotragende Zellen auf, während sekretorische Zellen vollständig fehlen (STEINHAEUER et al. 2004). Unter dem Einfluss der von den Eierstocksfollikeln vermehrt gebildeten Östrogene (Proöstrus) wird das Oberflächenepithel hochprismatisch und stärker differenziert. Basophile sekretorische Zellen mit apikalen Protrusionen grenzen sich deutlich von den mikroskopisch helleren, ziliotragenden Zellen ab. Der Anteil der

zilientragenden Zellen ist signifikant höher und die Zellhöhe signifikant größer als im Anöstrus. (STEINHAEUER et al. 2004).

Ein deutlicher Abfall der Östrogen- und ein langsamer Anstieg der Progesteronkonzentrationen (früher bis mittlerer Östrus) führen zur vollständigen Differenzierung der zilientragenden und sekretorischen Zellen. In der Eileiterampulle sind zu diesem Zeitpunkt 56-68 % zilientragende Zellen zu beobachten (VERHAGE et al. 1973 a,b; SAWYER et al. 1984). Aus ihren Untersuchungen an geschlechtsreifen Hündinnen und an mit Östrogen behandelten, präpubertären Hündinnen schlussfolgerten VERHAGE et al. (1973a,b), dass Östrogene für die Zelldifferenzierung im Eileiter der Hündin verantwortlich sind. Dagegen scheint Progesteron durch Überlagerung des Östrogeneffekts die Dedifferenzierung der Eileiterepithelzellen zu induzieren. SAWYER et al. (1984) und STEINHAEUER et al. (2004) bestätigten diese Ergebnisse. So sind während der Lutealphase unter dem Einfluss von Progesteron im identischen Eileiterquerschnitt gleichzeitig differenzierte und in Regression befindliche, dedifferenzierte Bereiche zu beobachten (VERHAGE et al. 1973a; SAWYER et al. 1984; STEINHAEUER et al. 2004). Nach VERHAGE et al. (1973a) sind die sekretorischen Zellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Dedifferenzierung unterworfen, während die zilientragende Zellen noch keine Anzeichen der Regression in Form einer Abnahme des Zellvolumens und der Zellhöhe aufweisen. STEINHAEUER et al. (2004) stellten neben der Dedifferenzierung auch eine Zilienabstoßung, Desquamation und das Vorkommen von Zelldetritus im Oviduktumen fest. Während der Endometriumsreparation und des gesamten Anöstrus hält der Prozess der Dedifferenzierung an. So sinkt der Anteil der zilientragenden Zellen während der Endometriumsreparation auf 16 % und in der Mitte des Anöstrus auf 4 % ab (VERHAGE et al. 1973 a).

STEINHAEUER et al. (2004) wiesen auf eine deutlich geringere Ausprägung der histomorphologischen Veränderungen im kaudalen Eileiteristhmus und der uterotubalen Verbindung im Vergleich zu den übrigen Oviduktabschnitten hin. Das Zellbild wird dominiert von überwiegend hypertrophen Zellen mit ausgeprägten Nuclei, die selten Anzeichen einer Differenzierung wie Kinozilien oder Sekretion aufweisen. Auch die Zellhöhe variiert nur geringfügig. Aufgrund der histomorphologischen Besonderheiten des kaudalen Eileiters vermuteten

STEINHAUER et al. (2004), dass diesem Eileitersegment besondere Bedeutung im Sinne eines funktionellen Spermienreservoirs zukommen könnte.

2.6 Apoptose und Nekrose als Formen des Zelltodes

Zellen in lebenden Organismen durchlaufen verschiedene biologische Prozesse, zu denen neben Zellteilung, -wachstum und -differenzierung auch der Zelltod gehört. Der Begriff Apoptose setzt sich aus den griechischen Worten „apo“ (von ab, von weg) und „ptosis“ (herabfallen, sinken) zusammen und beschreibt, frei übersetzt, das Fallen der Blätter im Herbst. KERR et al. (1972) prägten den Begriff „Apoptose“ und lieferten erstmals eine morphologische Definition für eine bestimmte Form des Zelltodes. Da die einzelnen molekularbiologischen Schritte nach einem stringenten Muster ablaufen und genetisch determiniert sind, wird der Vorgang der Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet.

Die Apoptose ist für die Differenzierung und Homöostase höher entwickelter Organismen von zentraler Bedeutung. So führt sie bei menschlichen Embryonen zur Einschmelzung der Schwimmhäute zwischen den Fingern und bei Hühnerembryonen an den Gliedmaßenknospen (HURLE et al. 1995; 1996). Ebenso stellt sie einen wichtigen Vorgang bei Alterungsprozessen, verschiedenen viralen Infektionen und Tumorerkrankungen sowie bei der physiologischen Atrophie von Organen dar (KERR et al. 1972; OLANO et al. 1996)

Man unterscheidet prinzipiell zwei Formen des Zelltodes: die Nekrose als pathologischer und die Apoptose als physiologischer Zelltod.

Die Nekrose ist ein wenig regulierter Prozess, bei dem akute unphysiologische Bedingungen oder physikalische Einwirkungen wie Hypoxie, Hyperthermie sowie virale Infektionen oder Toxine die Zellen zerstören. Nekrose läuft ohne Energieverbrauch ab und führt zu einer starken Inflammation des umliegenden Gewebes (MAJNO u. JORIS 1995; KROEMER et al. 1998), die als eines der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zur Apoptose gewertet wird.

Morphologisch ist die Nekrose gekennzeichnet durch das Anschwellen von Zelle und Zellkern, mangelnde Integrität von Zellstrukturen und dem Verlust der Membranintegrität (KERR et al. 1994; KROEMER et al. 1998). Eine Störung der Ionenkanäle führt zur Verschiebung des osmotischen Gradienten und in Folge dessen zu einem Wassereinstrom in die Zelle, wodurch die Zelle anschwillt und rupturiert (SAMALI et al. 1996).

Die Zerstörung der Zellmembran bewirkt die Freisetzung von intrazellulären Komponenten in die Umgebung. Dadurch werden Immunzellen angelockt, die wiederum durch Zytokinproduktion einen entzündlichen Prozess bewirken und damit zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes führen (KROEMER et al. 1998).

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, streng regulierter, energieverbrauchender Prozess, der einzelne Zellen betrifft. Apoptotische Zellen runden sich zunächst ab und lösen sich aus dem Zellverband (WILCOCK u. HICKMAN 1988). Im Folgenden kommt es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen an der betroffenen Zelle: Zellschrumpfung, Pyknose und Fragmentierung des Zellkerns sowie Abschnürung von Vesikeln, sog. apoptotischen Körperchen (KERR et al. 1994). Da die Zellreste der zugrundegehenden Zelle während des apoptotischen Prozesses in ihren Vesikeln als apoptotische Körperchen kontinuierlich von einer intakten Zellmembran umgeben sind, kommt es nicht zu einer Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen in das umgebende Gewebe (WYLLIE et al. 1980, WYLLIE 1981). Die apoptotischen Körperchen werden durch Zellen des Immunsystems phagozytiert, so dass eine Entzündungsreaktion unterbleibt (KERR et al. 1994; VOLL et al. 1997).

Die wichtigsten Unterschiede im Verlauf von Apoptose und Nekrose sind in Tab.1 dargestellt.

Apoptose	Nekrose
Induziert durch physiologische Signale	Induziert durch unphysiologische Verhältnisse
Tod einzelner Zellen	Tod von Zellgruppen
Keine entzündliche Reaktion	Deutliche entzündliche Reaktion
Phagozytose durch benachbarte Zellen und Makrophagen	Phagozytose durch Makrophagen
Streng regulierter Prozess	Verlust der Regulation der Homöostase
Aktiver, energieabhängiger (ATP) Prozess	Passiver, energieunabhängiger Prozess
Geordnete DNA-Fragmentierung	Zufällige Spaltung der DNA
Prälytische DNA-Fragmentierung (vor Zelllysis)	Postlytische DNA-Fragmentierung (nach Zelllysis)
"blebbing" der Zellmembran ohne Verlust der Integrität	Verlust der Zellmembranintegrität
Zellschrumpfung	Schwellung der Zelle
Bildung membrangebundener Vesikel = apoptotische Körperchen	Komplette Lyse der Zelle
Zellorganellen bleiben intakt	Desintegration (Schwellung) der Organellen

Tab.1 Unterschiedliche Prozesse der Apoptose und Nekrose

2.7 Ablauf der Apoptose

Apoptose ist ein streng regulierter Prozess, der durch bestimmte Proteasen, sog. Caspasen, vermittelt wird. Durch gegenseitige Aktivierung der Caspasen wird das proapoptotische Signal verstärkt. In der Folge kommt es durch Spaltung verschiedener Enzyme und Strukturproteine zu den charakteristischen morphologischen Zellveränderungen (SARASTE u. PULKKI 2000).

Prinzipiell kann die Apoptose über zwei unterschiedliche Wege induziert werden. Der extrinsische Weg ist rezeptorvermittelt und wird durch extrazelluläre Liganden, wie Tumornekrosefaktor oder FasL ausgelöst. Beim intrinsischen Weg rufen bestimmte intrazelluläre Signale spezifische mitochondriale Veränderungen hervor und aktivieren auf diese Weise die Caspasen. Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einer Überschneidung der beiden Wege (SARASTE u. PULKKI 2000; CORY u. ADAMS 2002), die im Folgenden sowie in Abbildung 1 dargestellt werden.

Bei dem rezeptorvermittelten Weg wird die Apoptose durch die Interaktion bestimmter Liganden mit Rezeptoren an der Zielzelle ausgelöst. Diese Rezeptoren gehören zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie (SMITH et al. 1994; ASHKENAZI u. DIXIT 1998). Die am intensivsten untersuchten apoptosevermittelnden Todesrezeptoren sind der TNF-1-Rezeptor und der Fas-Rezeptor (ASHKENAZI u. DIXIT 1998). Exemplarisch wird hier die Aktivierung des Fas-Rezeptors durch den Fas-Ligand beschrieben. Die Bindung des Liganden an den transmembranösen Rezeptor führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Bindung des Fas-associated death domain Proteins (FADD). FADD verfügt über eine sog. Todes-Effektor-Domäne (death effector domain, DED), die wiederum mit der DED der Prodomäne von Procaspase-8 interagiert. Der Komplex aus Fas, FADD und Procaspase-8 wird death-inducing-signaling-complex (DISC) genannt (CHANG u. YANG 2000). Durch seine trimere Struktur enthält der DISC mehrere Procaspase-8 Moleküle, die sich aufgrund ihrer räumlichen Nähe gegenseitig aktivieren. Dadurch entsteht die aktivierte Caspase-8. Diese verlässt den

Komplex und leitet so das proapoptotische Signal weiter (MUZIO et al. 1996; ASHKENAZI u. DIXIT 1998). Der DISC führt schließlich durch die Aktivierung von Caspase-8 zur Auslösung der Caspase-Kaskade und zur Auslösung des apoptotischen Programms in der Zelle.

Beim intrinsischen Weg der Apoptose spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Durch Freisetzung mitochondrialer Moleküle, wie z.B. Cytochrom C, kommt es zu einer indirekten Aktivierung von Caspasen. Im Wesentlichen werden die Integrität der Mitochondrien und die Freisetzung Apoptose-assoziiierter Moleküle durch die Bcl-2-Familie kontrolliert.

Es gibt pro-apoptotische und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 (B-cell lymphoma)-Familie. Die proapoptotischen Proteine wie Bax, Bad, Bid und Bim sind vorwiegend im Zytosol von intakten Zellen lokalisiert. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine liegen dagegen als integrale Membranproteine von Mitochondrienmembran, äußerer Kernmembran und Endoplasmatischem Retikulum vor (ADAMS u. CORY 1998; GROSS et al. 1999; STRASSER et al. 2000; CHANG u. YANG 2000). Eines der wichtigsten proapoptotischen Moleküle der Mitochondrien ist das Cytochrom C (GREEN u. REED 1998). Cytochrom C ist ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette zur Erzeugung von ATP. In der intakten Zelle ist es im intermembranösen Spalt zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, wird jedoch in apoptotischen Zellen in das Zytosol abgegeben (LUO et al. 1998; CHANG u. YANG 2000). Die Abgabe des Cytochrom C in das Zytosol wird ebenfalls von Proteinen der Bcl-2 Familie reguliert (ADAMS u. CORY 1998; GREEN u. REED 1998). Die proapoptotischen Proteine wie Bax und Bid fördern die Cytochrom C-Abgabe, während sie durch die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine verhindert wird (KLUCK et al. 1997; JÜRGENSMEIER et al.1998; LUO et al. 1998). Der genaue Mechanismus, der zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen Molekülen in das Zytosol führt, ist noch nicht vollständig geklärt (CHANG u. YANG 2000). Eine Hypothese ist, dass proapoptotische Proteine eine Öffnung mitochondrialer Kanäle, der sog. Permeability-Transition-Poren (PT-Poren) bewirken, die wiederum aus Proteinen bestehen und beide Mitochondrienmembranen durchziehen. Durch die Porenöffnung entsteht ein Ionenstrom zwischen Zytoplasma

und der mitochondrialen Matrix, der zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Infolge des osmotischen Wassereinstroms kommt es zum Anschwellen der mitochondrialen Organellen und schließlich zu einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom C freigesetzt wird (ZORATTI u. SZABO 1995; ZAMZAMI et al. 1996; MARZO et al. 1998; KROEMER et al. 1998; CHANG u. YANG 2000). Nach Freisetzung in das Zytosol bindet Cytochrom C an das Adaptorprotein des intrinsischen Weges, Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor). Apaf-1 wiederum bindet an Procaspase-9-Moleküle und bildet so einen funktionellen Komplex, das sog. Apoptosom. Die dadurch geschaffene unmittelbare räumliche Nähe der Procaspase-9-Moleküle führt zu deren Spaltung und somit zur Autoaktivierung (LI et al. 1997; SRINIVASULA et al. 1998; ZOU et al. 1999). Es entsteht aktivierte Caspase-9, die schließlich zur proteolytischen Aktivierung von Caspase-3 führt (LI et al. 1997).

Neben Cytochrom C existieren in den Mitochondrien weitere apoptose-regulierende Proteine, wie AIF (Apoptosis-Inducing Factor) und der Caspase-Coaktivator Smac/DIABLO. In intakten Zellen befindet sich AIF in den Mitochondrien. Während der Apoptose transloziert es jedoch in den Zellkern und verursacht dort die Kondensation des Chromatins und eine DNA-Fragmentation (SUSIN et al. 1999). Smac/DIABLO fördert indirekt die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3, indem sie an sog. IAP's binden. IAP's (Inhibitor of Apoptosis Proteins) sind Proteine, die durch Bindung an Caspasen deren enzymatischen Effekt inhibieren. Ihre inhibierende Wirkung wird durch Bindung von Smac/DIABLO an die IAP's außer Kraft gesetzt (DEVERAUX et al. 1998; 1999; VERHAGEN et al. 2000; DU et al. 2000).

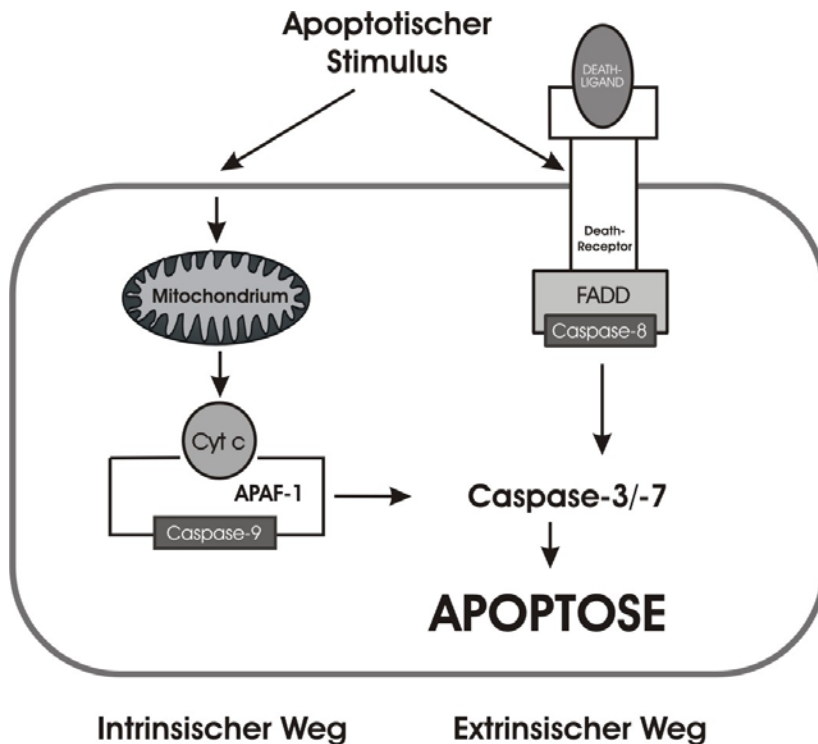


Abb.1

Vereinfachte schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Weges der klassischen Apoptose (nach ROY u. NICHOLSON 2000). APAF-1 = Apoptosis activating protease-1. Cyt c = Cytochrom c. FADD = Fas-associated death domain.

2.8 Caspasen

Die Proteolyse von Zellbestandteilen durch Caspasen ist ein zentrales Ereignis während der Apoptose. Caspasen sind Proteasen mit zentral gelegenem Cysteinmolekül, die ihre Substrate aufgrund eines Aspartat-Rests spalten. Wird Aspartat durch eine andere Aminosäure ersetzt, kann das Substrat nicht gespalten werden. Aus dieser Besonderheit leitet sich auch die Bezeichnung Caspase ab: cytosolic-aspartat-specific-cystein-protease (KLICHE et al. 1999).

Sowohl der mitochondriale als auch der Rezeptor-vermittelte Weg der Apoptose mündet in der Aktivierung von Caspasen. Diese sind letztlich die Exekutoren der Apoptose und werden in einer sogenannten Caspase-Kaskade sukzessive aktiviert (KIDD 1998). Bei Säugern einschließlich des Menschen sind bisher 14 Caspasen bekannt, die in drei Gruppen unterteilt werden. Die Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8,

9 und 10), die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) und die inflammatorischen Caspasen (Caspase 1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14) (NICHOLSON u. THORNBERRY 1997; CHANG u. YANG 2000). Die Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Enzymvorläufer, sog. Procaspasen, vor. Diese bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne sowie einer großen (ca. 20 kDa; p20) und einer kleinen (ca. 10 kDa, p10) Untereinheit, die auch im aktiven Enzym vorliegen. Die Prodomäne der inflammatorischen Caspasen und der Initiatorcaspasen ist mit über 100 Aminosäuren deutlich länger als die nur 30 Aminosäuren beinhaltende Prodomäne der Effektorcaspasen (CHANG u. YANG 2000).

Die Prodomänen der Initiatorcaspasen verfügen über spezifische Bindungsdomänen, die für die Aktivierung der Procaspasen verantwortlich sind. Caspase-8 und Caspase-10 enthalten Todes-Effektor-Domänen (death effector domain, DED) und die Caspasen 1, 2, 4, 5 und 9 verfügen über eine sog. CARD (caspase recruitment domain) (CHANG u. YANG 2000). Proapoptotische Signale führen zur Interaktion dieser Bereiche mit homologen Domänen von Adaptermolekülen wie FADD oder APAF-1 (CHANG u. YANG 2000; DENAULT u. SALVESEN 2002) und zur Entstehung komplexer Strukturen (z.B. DISC, Apoptosom), die letztlich zu einer Autoaktivierung der Procaspase-Moleküle führen. Die aktiven Caspasen bestehen aus einem Heterotetramer aus zwei identischen 10 kDa und zwei identischen 20 kDa Untereinheiten und besitzen zwei aktive Zentren an den entgegengesetzten Enden des Moleküls.

Ihre Substrate sind die Effektorcaspasen, die durch proteolytische Spaltung am Aspartat aktiviert werden (EARNSHAW et al. 1999) und anschließend das Zelltodprogramm irreversibel weiterführen. Durch Proteolyse von Enzymen und Strukturproteinen sind die Effektorcaspasen für zahlreiche zelluläre Effekte verantwortlich, die während der Apoptose an der sterbenden Zelle zu beobachten sind. Die Spaltung und Inaktivierung des Kerngerüstproteins Lamin durch die Caspase-6 führt zum Zusammenbruch der Kernmembran, wodurch die Degradierung weiterer Kernsubstrate und somit die Kernfragmentierung ermöglicht wird (OBERHAMMER et al. 1994; RAO et al. 1996; THORNBERRY u. LAZEBNIK 1998).

Die Caspase-3 spaltet das DNA-Reparaturenzym PARP (Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase) und verhindert so die energieverbrauchende Reparatur von DNA-Strangbrüchen (TAKAHASHI et al. 1996; STRASSNER et al. 2000).

Die Caspase-3 ist zudem entscheidend an der Fragmentierung des Zellkerns beteiligt, indem sie eine cytoplasmatische DNase (CAD, Caspase activated DNase) aus ihrem Komplex mit einem Inhibitorprotein (ICAD) durch Proteolyse des Inhibitorproteins freisetzt. (TANG u. KIDD 1998). CAD wird anschließend zur Spaltung der DNA in den Zellkern importiert (TANG u. KIDD 1998; ENARI et al. 1998). Durch die proteolytische Aktivität der Effektorcaspasen kommt es außerdem zu einer Exposition von Phosphatidylserin und anderen Zelloberflächenmarkern, wodurch die betroffene Zelle von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden kann (FADOK et al. 1992; FADOK et al. 2001; HENSON et al. 2001).

2.9 Vorkommen von Apoptose im Ovidukt verschiedener Säugetiere

Nicht-apoptotische Veränderungen am Eileiterepithel wie Zellatrophie, Abnahme der Zellhöhe, Verschwinden der sekretorischen Granula bei Drüsenzellen und Zelltod wurden mittels konventioneller histomorphologischer Methoden bereits bei vielen Haussäugetieren beschrieben (BAREITHER u. VERHAGE 1981; VERHAGE et al. 1990; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1990; ABE 1994; STEINHAUER et al. 2004; STEFFL et al. 2008).

Es gibt jedoch nur eine begrenzte Anzahl von Studien, die sich mit dem Vorkommen apoptotischer Vorgänge am Säugetiereileiter beschäftigen. Viele dieser Erhebungen erfassen lediglich morphologische Veränderungen der Zellstruktur, wie das Auftreten von apoptotischen Körperchen in H.E. gefärbten zytologischen Präparaten.

BAREITHER und VERHAGE (1981) untersuchten lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch histomorphologische Veränderungen der felines Eileiterampulle. Unter dem Einfluss exogener Östrogene wurde eine deutliche Hypertrophie des Epithels sowie eine Differenzierung in zilientragende und sekretorische Zellen beobachtet. Eine Progesteronapplikation resultierte in einer rapiden Zellatrophie, Dedifferenzierung der Eileiterepithelzellen sowie im Auftreten

apoptotischer Zellen. Untersuchungen an Eileiterepithelien von Hündinnen erbrachten entweder keinen Hinweis auf Apoptose (SAWYER et al. 1984) oder den Nachweis sporadisch vorkommender apoptotischer Zellen, wie sie auch STEINHAEUER et al. (2004) während der fortgeschrittenen Lutealphase unter dem Einfluss hoher Progesteronkonzentrationen beobachteten.

RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. (1990) untersuchten die Ultrastruktur der uterotubalen Verbindung von östrischen, nicht-belegten und inseminierten Schweinen. Sie fanden apoptotische Epithelzellen in der uterotubalen Verbindung aller drei Gruppen, die höchste Anzahl in der Gruppe der inseminierten Tiere.

Beim Rind untersuchten BERGQVIST et al. 2005 das Vorkommen des Fas-Liganden in der Ampulla, dem Isthmus und der uterotubalen Verbindung während des Östrus und der Lutealphase. Der Fas-Ligand stellt einen der wichtigsten Induktoren der ligandenvermittelten Apoptose im Immunsystem dar. Der durch Fas und Fas-Ligand vermittelte Zelltod reguliert u.a. die Gewebeentwicklung und –homöostase. Der Transmembran-Rezeptor Fas induziert durch Bindung an den Fas Liganden Apoptose an der Fas-tragenden Zelle (SUDA u. NAGATA 1994). Der Apoptosenachweis erfolgte mittels der TUNEL-Methode. Insgesamt wurden weniger TUNEL-positive Zellen als Fas- oder FasL-positive Zellen identifiziert. Fas-positive Zellen wurden in allen untersuchten Zyklusstadien gleichmäßig in der gesamten Länge des Eileiterepithels festgestellt, während FasL-positive Zellen überwiegend in der uterotubalen Verbindung und der Ampulla während des Östrus dargestellt werden. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose, Fas und FasL. Auch zwischen dem Auftreten von Apoptose und dem Zyklusstand wurde kein Zusammenhang deutlich, wobei eine unpräzise Bestimmung der Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Probenentnahme berücksichtigt werden muss. Die Diskrepanz zwischen dem Auftreten von Apoptose und dem Nachweis von Fas-FasL könnte nach BERGQVIST et al. (2005) darin begründet sein, dass mit der TUNEL-Methode späte Stadien der Apoptose detektiert werden, während die Expression von Fas und FasL in früheren Stadien stattfindet.

Am Eileiterepithel von Pavianen beobachteten VERHAGE et al. (1990) in der Ampulle und im Isthmus frühe und späte Stadien der Apoptose sowohl in der späten Lutealphase als auch bei Tieren, die mit Progesteron behandelt wurden.

Am humanen Oviduktepithel untersuchten BRITON-JONES et al. 2006 das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 mRNA-Expression in der Follikelphase, der periovulatorischen Phase und der Lutealphase. Einer der beiden Hauptwege der Apoptose ist der mitochondriale Pfad, welcher von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Genen der Bcl-2 Familie reguliert wird (LAFFON et al. 2001). Bax ist das proapoptotische und Bcl-2 das antiapoptotische Gen. Ob eine Zelle vor Apoptose geschützt ist oder durch Apoptose zugrunde geht, kann durch das Verhältnis von Bax und Bcl-2 determiniert werden (WALL et al. 1999). BRITON-JONES et al. (2006) führten ihre Untersuchungen an Organen durch, die zu definierten Zeitpunkten des Zyklus entnommen wurden. In der Follikelphase und zum Zeitpunkt der Ovulation wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression von Bax und Bcl-2 gefunden. Während der Lutealphase war jedoch eine signifikant höhere Expression von Bax zu beobachten. Die Expression von Bcl-2 zeigte zu allen drei Untersuchungszeitpunkten keine Differenz. Der signifikante Anstieg des Bax-Bcl-2-Verhältnis in der Lutealphase zugunsten des Bax führte zu der Schlussfolgerung, dass die Eileiterepithelzellen während der Follikelphase und zum Ovulationszeitpunkt vor Apoptose geschützt sind, während es in der Lutealphase zur Aktivierung der Apoptose kommt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse aller Studien, die sich mit dem Vorkommen von Apoptose im Eileiterepithel befassen, auf eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose und der Progesteronkonzentration im Blutserum hin. In den Untersuchungen von BERGQVIST et al. (2005) konnte das Vorkommen von Apoptose nicht eindeutig mit einer erhöhten Progesteronkonzentration in Zusammenhang gebracht werden, da die Autoren auf Hormonverläufe, im speziellen Progesteron, verzichteten.

2.10 Vorkommen von Apoptose im Uterus verschiedener Säugetiere

Zum Vorkommen von Apoptose im Uterus liegen Studien bei verschiedenen Tierarten und in unterschiedlichen Zyklusphasen vor. VAN CRUCHTEN et al. (2002) bestimmten bei 58 Hündinnen den apoptotischen Index im Oberflächenepithel, im Stroma, in den Uteruskrypten und Uterindrüsen in der frühen und späten Follikelphase, der frühen und späten Lutealphase sowie im Anöstrus durch Auszählung positiv-gefärbter Zellen pro 500 Zellen pro Kategorie mit der TUNEL-Methode und dem Nachweis aktivierter Caspase-3.

Im Oberflächenepithel und im Stroma wurden mit beiden Methoden in allen untersuchten Zyklusphasen nur wenige apoptotische Zellen nachgewiesen. Bei Anwendung des Caspase-3-Nachweises wurde jedoch ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen im Oberflächenepithel und im Stroma im Anöstrus und während der späten Lutealphase deutlich. Desweiteren war mit beiden Nachweismethoden ein Anstieg der Apoptoserate in den Uteruskrypten und den tiefen Uterindrüsen in der späten Lutealphase und im Anöstrus zu verzeichnen. In den Krypten stieg die Apoptoserate nur in den nach dem Caspase-3-Verfahren präparierten Gewebeschnitten an, während in den Uterindrüsen mit beiden Nachweismethoden eine signifikante Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen ersichtlich war. Die Ergebnisse zeigten das Vorkommen von Apoptose in allen untersuchten Zyklusphasen und Lokalisationen, jedoch das Fehlen einer signifikanten Korrelation zwischen der Apoptoserate in einer bestimmten Zellgruppe und der Serumprogesteronkonzentration. Beim Vergleich beider Nachweismethoden erwies sich der Nachweis der aktivierten Caspase-3 als das sensitivere Verfahren.

Ebenfalls beim Hund wiesen CHU et al. (2006) mit der TUNEL-Methode apoptotische Zellen während der gesamten Lutealphase, jedoch nicht im Anöstrus nach. Während die Apoptoserate in den basalen Drüsenepithelzellen hoch war, wurden deutlich weniger TUNEL-positive Zellen in den oberflächlichen Drüsenepithelzellen und im Stroma ermittelt. Der höchste Anteil apoptotischer Zellen wurde während der frühen Lutealphase unter maximalen Serumprogesteronkonzentrationen in den basalen Drüsenepithelzellen des Endometriums detektiert. Eine Degeneration der

Oberflächenepithelzellen wurde hingegen in erster Linie in der späten Lutealphase unter deutlich sinkenden Progesteronkonzentrationen und im Anöstrus unter basalen Progesteronwerten gefunden. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass die degenerativen Veränderungen der Oberflächenepithelzellen in ursächlichem Zusammenhang mit fallenden Progesteronwerten in der späten Lutealphase stehen. Die Autoren vermuteten, dass bei Hündinnen mit kurzem Zyklusintervall keine vollständige Regeneration des Epithels erzielt wird, woraus eine Infertilität resultieren kann.

SATO et al. (1997) untersuchten das Vorkommen von Apoptose im Uterusepithel und -stroma von Ratten im Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Anöstrus mit der TUNEL-Methode. Gleichzeitig werteten sie die mitotische Aktivität im Uterusepithel elektronenmikroskopisch aus. Die Zellhöhe des luminalen Uterusepithels nahm vom Anöstrus zum Proöstrus zu und im Metöstrus und Anöstrus wieder ab.

Die im Metöstrus und Anöstrus vorhandene basale Mitoserate im uterinen Oberflächenepithel nahm im Verlauf des Proöstrus zu, um im Östrus ein Maximum zu erreichen. In den Uterindrüsenzellen stieg die Mitoserate vom Östrus über den Metöstrus und Anöstrus bis zum Proöstrus graduell an.

Mit der TUNEL-Methode wurde das Vorkommen apoptotischer Zellen im Oberflächenepithel, im Drüsenepithel und im Stroma des Uterus untersucht. Der Anteil apoptotischer Zellen im Oberflächenepithel erreichte im Metöstrus ein Maximum, dagegen war in den Drüsenepithelzellen das deutlichste Vorkommen von Apoptose während des Östrus zu beobachten. Im Stroma wurde während des gesamten Zyklusverlaufes eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen detektiert, die sich zwischen den einzelnen Zyklusphasen nicht signifikant unterschied. Die hohe proliferative Aktivität des uterinen Oberflächenepithels im Proöstrus und Östrus führten die Autoren auf die hohen Serumöstrogenkonzentrationen zurück, während die steigende Anzahl apoptotischer Zellen im Oberflächenepithel vom Östrus zum Metöstrus mit der stetigen Abnahme des Östrogengehaltes in diesen Zyklusphasen

assoziiert wurde. Somit ist die Apoptose in den Gewebeschichten des zyklischen Uterus als physiologisch einzustufen.

Bei normozyklischen Weißbüschelaffen fanden NARKAR et al. (2006) einen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen im Drüsenepithel des Endometriums von der frühen Follikel- sowie der frühen Lutealphase zur mittleren Lutealphase. Nach Ovariectomie und Gabe von Östrogenen und Progesteron konnte gezeigt werden, dass die alleinige Östrogenapplikation im Vergleich zu den normozyklischen, intakten Tieren zwar eine endometriale Proliferation, jedoch einen Abfall der Apoptoserate bewirkte. Durch alleinige Gabe von Progesteron konnte in den endometrialen Zellen keine Apoptose induziert werden. Dagegen war bei ovariectomierten Tieren, die zunächst mit Östrogen und nachfolgend mit Progesteron behandelt wurden, ein signifikanter, vergleichbar mit den Verhältnissen in der mittleren Lutealphase bei den intakten Tieren, Anstieg der Apoptoserate in den Drüsenepithelien des Endometriums zu beobachten.

2.11 Nachweis von Apoptose in Geweben

2.11.1 TUNEL-Methode

Die TUNEL-Methode eignet sich für den qualitativen und quantitativen Nachweis der Apoptose. Sie weist jedoch nicht spezifisch Apoptose nach, da auch beim Zelltod durch Nekrose positive Reaktionen in der TUNEL-Färbung auftreten können (STADELMANN und LASSMANN 2000).

Schon in frühen Phasen der Apoptose kommt es zu einer Fragmentierung der DNA durch zelleigene Endonukleasen. Hierbei wird die DNA durch endogene DNAsen an spezifischen Stellen gespalten. Es entstehen charakteristische DNA-Bruchstücke mit 3'-OH-Enden (WYLLIE et al. 1980). Eine Möglichkeit des Nachweises dieser Bruchstücke ist die TUNEL-Methode. TUNEL ist die Abkürzung für Terminale Deoxyribosyl-Transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labeling. Diese Methode basiert auf der spezifischen Bindung des Enzyms TdT an die 3'-OH-Enden der DNA-Bruchstücke. Durch TdT werden Biotin-markierte Desoxyuridintriphosphate (Biotin-

dUTP) an die DNA-Bruchstückenden gekoppelt. Durch die PAP-Methode wird das Biotin schließlich sichtbar gemacht (GAVRIELI et al. 1992). Im Lichtmikroskop erscheinen die TUNEL positiven Zellen braun.

2.11.2 Caspase

Die immunhistochemische Darstellung basiert auf dem Nachweis von Caspasen, die an allen bekannten Apoptosewegen beteiligt sind. Die Caspase-3 ist eine der am häufigsten vorkommenden Caspasen. Alle durch Caspasen vermittelten Wege der Apoptose münden in die Aktivierung von Caspase-3 (BLOMGREN et al. 2003). Mittels eines spezifischen Antikörpers von Kaninchen werden die zytoplasmaständigen Enzyme markiert und nach der bereits erwähnten PAP-Methode die Primärantikörper sichtbar gemacht. Die immunpositiven Zellen für aktivierte Caspase-3 sind braun gefärbt. Der immunhistochemische Nachweis der aktivierten Caspase-3 mittels spezifischer Antikörper stellt eine gute Ergänzungsmöglichkeit zur TUNEL-Methode in der Detektion apoptotischer Zellen dar, da der Nachweis aktivierter Caspase-3 charakteristisch für apoptotische Zellen ist. Somit sind falsch positive Zellen durch den Nachweis nekrotischer Zellen ausgeschlossen.

2.11.3 Histologie

Im Verlauf der Apoptose kommt es unter anderem zur Bildung von Membranbläschen, in denen das endoplasmatische Retikulum mit der Zellplasmamembran verschmilzt. Dadurch wird die Zelle in mehrere membrangebundene Vesikel unterteilt, die als sog. apoptotische Körperchen abgeschnürt werden (WYLLIE et al. 1980; KERR et al. 1994). Diese können lichtmikroskopisch im H.E. gefärbten Präparat dargestellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Insgesamt stand Organmaterial von 41 Hündinnen zur Verfügung, die sich zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie in unterschiedlichen Phasen des Zyklus befanden. Mittels zweier unterschiedlicher Nachweisverfahren (TUNEL, Nachweis aktivierter Caspase-3) sowie der Routinediagnostik (H.E.-Färbung) wurden der Eileiteristhmus und die uterotubale Verbindung auf das Vorkommen von Apoptose untersucht.

Das Organmaterial wurde im Rahmen von drei vorangegangenen Studien gewonnen. Dabei handelte es sich um die Eileiter von 20 Hündinnen aus der Studie „Immunhistochemische Untersuchung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Urogenitaltrakt der Hündin“ (PAULSMEIER 1998), 9 Hündinnen aus der Studie „Histomorphologische und immunhistochemische (K-67) Untersuchungen am Oberflächenepithel des Ovidukts im Zyklusverlauf der Hündin“ (STEINHAUER 2002; Tierversuchsvorhaben 42502-99/180) und 12 Hündinnen aus der Studie „Spermienverteilung und -vitalität im Genitale der Hündin zum Befruchtungszeitraum“ (KARRE 2008; Tierversuchsvorhaben 42502/05-10.05).

Diese insgesamt 12 Hündinnen wurden am Tag der Ovulation mit jeweils einer Besamungsdosis von 1 Milliarde vorwärtsbeweglicher Spermien mittels eines Osiris-Katheters (IMV Technologies, L'Aigle, Frankreich) künstlich besamt.

Damit stand Organmaterial aus folgenden Zyklusphasen zur Verfügung:

Anöstrus	6 Hündinnen
Frühe Follikelphase	6 Hündinnen
Späte Follikelphase	5 Hündinnen
2 Tage post ovulationem	6 Hündinnen
4 Tage post ovulationem	6 Hündinnen
Gelbkörperblüte	6 Hündinnen
Endometriumreparation	6 Hündinnen

3.3. Zyklusdiagnostik

Bei den 41 Hündinnen wurde zu Beginn der jeweiligen vorausgegangenen Studie (s. 3.1) eine eingehende allgemeine und gynäkologische Untersuchung (Vaginoskopie, Vaginalzytologie, mikrobiologische Untersuchung eines Vaginaltupfers, Sonographie von Ovarien und Uterus, Untersuchung von Progesteron im peripheren Blut) durchgeführt. Diese Eingangsuntersuchung diente der Ermittlung des Zyklusstandes und dem Ausschluss hormoneller und anderer Erkrankungen.

Im weiteren Verlauf wurden die Hündinnen bis zur Läufigkeit alle 3 Wochen und während der Läufigkeit im Abstand von 1-2 Tage gynäkologisch untersucht. Diese Verlaufskontrollen dienten der Bestimmung definierter Zeitpunkte im Zyklusverlauf, um die Ovariohysterektomie gezielt durchführen zu können. Die Progesteronbestimmung im peripheren Blutserum erfolgte im Endokrinologischen Labor der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover mittels eines kompetitiven Immunoassays (Immulite®, Siemens Diagnostics, Bad Nauheim). Zur visuellen Darstellung des Follikelwachstums und zur exakten Bestimmung des Ovulationszeitpunktes (HAYER et al. 1991; GÜNZEL-APEL u. DIETERICH 2001) wurden die vaginoskopischen und vaginalzytologischen Befunde durch

ultrasonographische Untersuchungen der Ovarien ergänzt, die in dem ca. viertägigen präovulatorischen Zeitraum bis zur Ovulation alle 12 Stunden durchgeführt wurden.

3.4 Organgewinnung, Präparation und Fixierung

Die Ovariohysterektomie erfolgte in allen Studien unter Allgemeinanästhesie entsprechend den üblichen Operationsverfahren. Unmittelbar nach der Organentnahme wurden die Eileiter in der Bursa ovarica aufgesucht, freipräpariert und mittels einer 22G Vasofix-Braunüle (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) und aufgesetzter Spritze mit 4%igem neutral gepuffertem Formol nach LILLIE (1951) gespült und anschließend in Probenbehältnisse mit gleichem Fixationsmittel verbracht.

Beide Ovidukte wurden vermessen und beginnend an der uterotubalen Verbindung bis zum Infundibulum mit Mikrotomklingen in identisch lange Segmente geteilt. Nach 48-stündiger Formolfixierung wurden die so gewonnenen Organabschnitte entwässert und mit Hilfe eines Gewebeeinbettungsautomaten (Hypercenter II, Fa. Shandon, Frankfurt) in Paraplast Plus (Fa. Shandon, Frankfurt) eingebettet.

3.5 Anfertigung der Gewebeschnitte

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms Leica Reichert-Jung 2030 BIOCUT (Rankin Biomedical Corporation, Holly, USA) wurden von jedem Organblock jeweils 6 Paraffinschnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt. Die Schnitte wurden in einem 41 Grad warmen Wasserbad mit destilliertem Wasser gestreckt und für die immunohistochemischen Untersuchungen auf 2,5 x 7,5 cm großen Superfrost®Plus Objektträgern (Menzel, Braunschweig) falten- und luftblasenfrei aufgezogen. Für die Routineuntersuchung (Hämalaun-Eosin-Färbung) wurden die Schnitte auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger (Engelbrecht, Egermünde)

aufgezogen. Nach zehnminütiger Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für weitere 60 Minuten im Wärmeschrank 5042 (Hereaus, Hanau) bei 60°C getrocknet.

3.6. TUNEL-Methode

Der Nachweis TUNEL-positiver Zellen erfolgte mittels ApopTag®Plus (Firma Chemicon® International, Ltd., Hampshire, United Kingdom). Die TUNEL-Methode (terminale *desoxytransferase-mediated* dUTP *nick-end-labeling*) wurde eingesetzt, um die Fragmentierung von DNA nachzuweisen. Dadurch konnten Zellen identifiziert werden, die apoptotischen Vorgängen unterlagen.

Protokoll der TUNEL-Methode

1. Aufziehen der Paraffinschnitte auf Superfrost® plus Objektträger, anschließend Trocknen im Wärmeschrank bei 57°C mindestens 30 Min.
2. Entparaffinierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe:
Roti-Clear®: (2 x 5 Min.)
Isopropanol: 5 Min
Ethanol 96%: 5 Min.
Ethanol 70%: 5 Min.
Ethanol 50%: 5 Min.
3. Spülen der Schnitte in PBS (siehe Anhang) für 5 Min. unter ständigem Rühren
4. Abtrocknen der Objektträger und Umranden des Präparates mit einem Fettstift. Andauen der Schnitte mit Proteinase K-Lösung (20 µg/ml) für 10 Min. in einer feuchten Kammer

5. Viermaliges Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser für jeweils 2 Min. unter ständigem Rühren
6. Hemmung der endogenen Peroxidase mittels 56 ml PBS + 4 ml frisch zugesetztem 30 % H₂O₂ für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter langsamem Rühren
7. Zweimaliges Spülen der Schnitte in PBS (siehe Anhang) für je 5 Min. unter ständigem Rühren
8. Auftragen von 75 µl Equilibrationspuffer pro Schnitt für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
9. Dekantieren des Überschusses an Equilibrationspuffers und vorsichtiges Abtrocknen des Objektträgers. Auftragen von 54 µl *working strength* TdT *solution* pro Schnitt und mit Deckgläschen abdecken. Inkubation bei 37°C für 60 Min.
10. Entfernen der Deckgläschen und verbringen der Schnitte für 30 Min. in vorgewärmten *stop/wash*-Puffer bei 37°C unter ständiger Bewegung
11. Dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS (siehe Anhang) für je 5 Min. unter ständigem Rühren
12. Abtrocknen der Objektträger und Auftragen von 55 µl Anti-Digoxigenin-Peroxidase pro Schnitt. Abdeckung mit Deckgläschen und Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
13. Viermaliges Spülen der Schnitte in PBS für je 2 Min. unter ständigem Rühren

14. Inkubation der Schnitte mit in 200 ml PBS aufgelöstem 0,1 g 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, siehe Anhang) unter Zusatz von 200 µl 30% H₂O₂ für 5 Min. unter langsamem Rühren bei Raumtemperatur
15. Dreimaliges Spülen der Schnitte PBS für je 5 Min.; danach kurzes Eintauchen in Aqua dest.
16. Gegenfärbung der Schnitte in Hämalaun nach Mayer (siehe Anhang) für 15 Sek.
17. Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 5 Min.
18. Dehydrieren der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe:
Ethanol: 50%: 3 Min.
Ethanol: 70%: 3 Min.
Ethanol: 96%: 3 Min.
Isopropanol: 5 Min
Essigsäure-butylester (EBE): 2 x 5 Min.
19. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Promounter RCM 2000, Medite Medizintechnik, Burgdorf)

Kontrollen

Als Positivkontrollen wurden Schnitte von Mammagewebe einer Ratte eingesetzt. Folgeschnitte der zu untersuchenden Gewebeschnitte wurden mit PBS anstelle der *working strength* Tdt *solution* inkubiert (Negativkontrolle).

3.7. Caspase-3-Nachweis

Zum Nachweis aktivierter Caspase-3 fand die ABC-Methode (siehe Anhang) für formalinfixierte Paraffinmaterialien Anwendung. Dazu wurde ein Gewebeschnitt mit einem unkonjugierten Kaninchen-Primärantikörper beschichtet, welcher spezifisch an aktivierte Caspase-3 bindet. Anschließend wurde der Biotin gekoppelte Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin aufgetragen. In einem dritten Inkubationsschritt wurden die Präparate mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin beschichtet, welches sich an die biotinylierten Sekundärantikörper anlagert. Das Enzym Peroxidase ist ein Katalysator, der die Umwandlung des zugegebenen Chromogens DAB (siehe Anhang) in ein braunes Farbprodukt beschleunigt. Dieses Farbmolekül präzipitiert an der Reaktionsstelle und markiert somit das gesuchte Antigen. Immunpositive Zellen für Caspase-3 erscheinen im mikroskopischen Bild braun.

Primärer Antikörper

Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler vom Kaninchen stammender Antikörper verwendet, der gegen die p17 Untereinheit der aktivierten Caspase-3 des Menschen gerichtet ist und mit der aktivierten Caspase-3 von Mäusen kreuzreagiert (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Sekundärer Antikörper

Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Sekundärantikörper handelt es sich um einen biotinylierten Ziegenantikörper, der gegen Kaninchen-IgG (Vector, Burlingame, CA, USA) gerichtet ist.

Blockserum

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe wurde standardmäßig Ziegennormalserum eingesetzt. Das Serum wurde von gesunden Tieren der Klinik für kleine Klautiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover gewonnen.

Protokoll des Nachweises von aktivierter Caspase-3

1. Aufziehen der Paraffinschnitte auf Superfrost[®] plus Objektträger, anschließend Trocknen im Wärmeschrank bei 57°C für mindestens 30 Min.
2. Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte:
Roticlear[®] 1(Roth, Karlsruhe): 5 Min.
Roticlear[®] 2: 5 Min.
Roticlear[®] 3: 5 Min.
Isopropanol: 5 Min.
Ethanol 96%: 2,5 Min.
Ethanol 70%: 2,5 Min.
Ethanol 50%: 2,5 Min.
3. 3 x 5 Min. Spülen in PBS-Puffer (s. Anhang) unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer (IKA-Werke, Staufen)
4. Hemmung der endogenen Peroxidase für 30 Min. in Methanol mit 0,5%igem H₂O₂
5. 3 x 5 Min. Spülen in PBS-Puffer unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer
6. Demaskierung der Antigene 20 Min. in Citratpuffer (Quartett, Berlin, s. Anhang) in der Mikrowelle (Bauknecht, Schondorf)
7. 3 x 5 Min. Spülen in PBS-Puffer unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer

8. Verbringen der Schnitte in Shandon-Coverplates™ (Thermo Electron, Dreieich) und überführen in Shandon Sequenza®-Slide Racks (Thermo Electron, Dreieich)
9. Überschichten mit 1:5 verdünntem, inaktiviertem Ziegennormalserum in PBS; Inkubation 20 Min. bei Raumtemperatur
10. Überschichten mit 1:200 verdünntem anti Caspase-3 Antiserum (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in PBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA, Serva, Heidelberg); Inkubation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank
11. 3 x 5 Min. Spülen der Schnitte in PBS
12. Überschichten mit 1:200 verdünntem, biotinyliertem Ziege anti Kaninchen Antikörper (GAR-b Goat-anti-Rabbit) (Vector, Burlingame, CA, USA) in PBS (am Vortag angesetzt); Inkubation 30 Min. bei Raumtemperatur
13. 3 x 5 Min. Spülen der Schnitte in PBS-Puffer
14. Überschichten mit ABC-Reagenz (Vector PK 6100, Burlingame, CA, USA, s. Anhang); Inkubation 30 Min. bei Raumtemperatur
15. 3 x 5 Min. Spülen der Schnitte in PBS-Puffer
16. Überführen der Objektträger aus den Coverplates zurück in Küvetten
17. Enzymhistochemische Reaktion:
Inkubation der Schnitte mit in 200 ml PBS aufgelöstem 0,1 g 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) unter Zusatz von 200 µl 30% H₂O₂ für 5 Min. bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren auf einem Magnetfeld
18. 5 Min. Spülen in PBS-Puffer unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer

19. 10 Min. Spülen unter fließendem Leitungswasser
20. Gegenfärbung 20 Sek. in Hämalan nach Mayer (Roth, Karlsruhe)
21. 15 Min. Bläuen der Gewebeschnitte in fließendem Leitungswasser
22. Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:
Ethanol 50%: 2,5 Min.
Ethanol 70%: 2,5 Min.
Ethanol 96%: 2,5 Min.
Isopropanol: 5 Min.
Essigsäure-butylester (EBE): 2 x 5 Minuten
23. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Promounter RCM 2000, Medite Medizintechnik, Burgdorf)

Kontrollen der Spezifität der Antikörper

Die Spezifität der immunhistologischen Reaktionen wurde anhand folgender Kontrollen überprüft:

Als Positivkontrolle wurden Schnitte vom Milzgewebe eines Hundes eingesetzt.

Folgeschnitte der zu untersuchenden Gewebeschnitte wurden als Negativkontrolle mit 1:3000 in PBS mit 1% BSA verdünntem Kaninchenserum anstelle des Primärantikörpers (Kaninchen anti Caspase-3) inkubiert.

3.8 Hämalaun-Eosin (H.E.) Färbung

Die H.E. Färbung der vorbereiteten Paraffinschnitte erfolgte automatisiert in einem Färbecenter Leica ST 4040 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch) nach einem standardisierten Laborprotokoll (s. Anhang).

Anschließend wurden die Objektträger maschinell mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Promounter RCM 2000, Medite Medizintechnik, Burgdorf) mit Deckgläsern versehen.

3.9. Auswertung

Die Auswertung der Präparate von Eileiteristhmus und uterotubaler Verbindung erfolgte mit einem Binokular-Lichtmikroskop (MBL 2000, Krüss, Hamburg) in 16er und 40er Vergrößerung. Eine mäanderförmige Durchmusterung der Präparate in 16-facher Vergrößerung zu Beginn der Auswertung diente dazu, einen Überblick über die Qualität der jeweiligen Schnitte zu bekommen. Dabei wurde insbesondere auf das komplette Vorliegen des Organs, eine intakte Schleimhaut und Muskulatur sowie das faltenfreie Aufziehen des Gewebeschnittes auf den Objektträger ohne Fältelung von Schleimhaut und Muskulatur geachtet. Zur Auswertung wurden nur histologische und immunhistochemische Präparate herangezogen die zu mindestens 75% intaktes Gewebe aufwiesen.

Anschließend wurden die H.E. Präparate in 40facher Vergrößerung eingehend auf das Vorliegen apoptotischer Zellveränderungen (apoptotische Körperchen) untersucht. Hierzu wurden pro Präparat jeweils zwei Lokalisation (Lamina epithelialis, Lamina propria) untersucht und in jeder Lokalisation jeweils 500 Zellen ausgezählt und begutachtet. Die Caspase- und TUNEL- Präparate wurden auf das Vorkommen positiver Zellen untersucht. Hierzu wurden pro Schnitt (jeweils UTV und Eileiteristhmus) und Lokalisation (Lamina epithelialis, Lamina propria) ebenfalls 500 Zellen in 40facher Vergrößerung ausgewertet.

Bei allen drei angewandten Methoden (H.E., Caspase und TUNEL) wurde somit die Anzahl apoptotischer Zellen in 500 untersuchten Zellen pro Organabschnitt und Lokalisation bestimmt. Um bei jedem Präparat einen ausreichenden Gesamtüberblick über das Vorkommen apoptotischer Zellen zu gewinnen, wurde jeder Schnitt in vier Bereiche (oben, unten, links, rechts) unterteilt und in jedem Bereich 125 Zellen ausgewertet.

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Aufarbeitung der bei der Untersuchung der Gruppen erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Programms SAS (Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute Inc., 2002-2003). Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Daten durch den Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD), Minimum und Maximum beschrieben (PROC MEANS). Sowohl unabhängig von der Zyklusphase als auch innerhalb der einzelnen Zyklusphasen wurden zum Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen zwischen der L. epithelialis und der L. propria ein Student's t-test für verbundene Stichproben (PROC MEANS) herangezogen. Die Auswertung erfolgte differenziert nach Organlokalisierung und verwendetem Nachweisverfahren. Für die Ermittlung eines Unterschiedes in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen den einzelnen Zyklusphasen wurde zunächst eine 1-faktorielle Varianzanalyse mit der Prozedur GLM durchgeführt. Zum Vergleich des Auftretens apoptotischer Zellen zwischen den einzelnen Zyklusphasen wurde ein t-test für unverbundene Stichproben (PROC GLM) verwendet. Ergebnisse in den einzelnen Verfahren wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $< 0,05$ als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

Zum Apoptose-Nachweis wurden die TUNEL-Methode (Nachweis von DNA-Fragmenten) und der Nachweis aktivierter Caspase-3 angewendet. Zusätzlich wurden Hämalaun Eosin (H.E.) gefärbte Präparate auf das Vorkommen apoptotischer Körperchen hin ausgewertet.

4.1. Nachweis apoptotischer Zellen in der Lamina epithelialis und der Lamina propria der uterotubalen Verbindung

Unabhängig vom Zyklusstand wurden in der Lamina epithelialis der uterotubalen Verbindung (UTV) im Mittel **über alle Zyklusphasen** mit jeder der drei angewendeten Methoden signifikant mehr apoptotische Zellen (aZ) gefunden als in der Lamina propria ($p < 0,05$) (Abbildung 2).

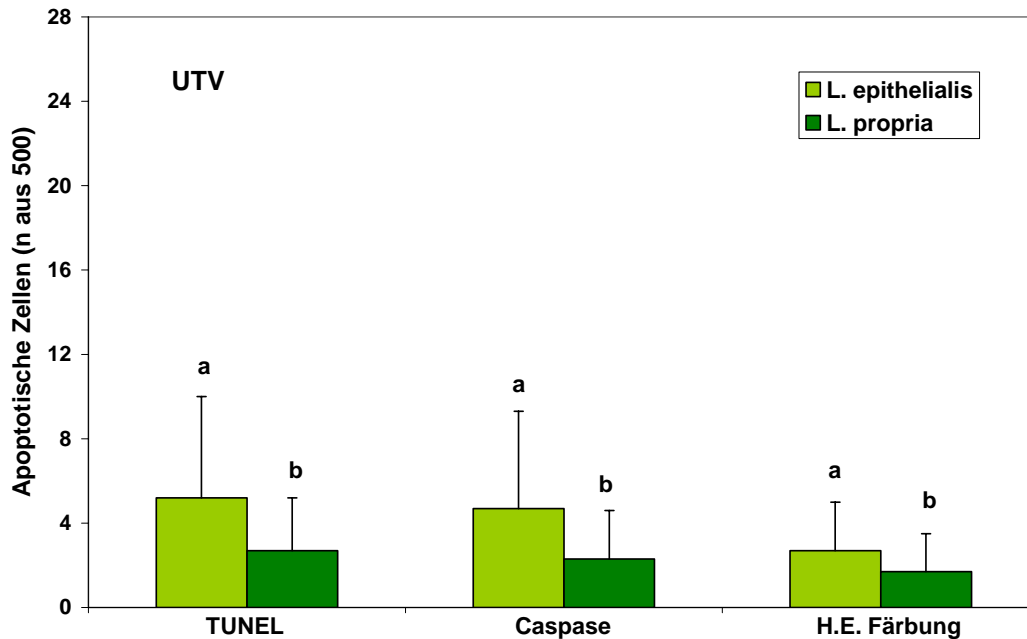


Abb.2 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria der uterotubalen Verbindung im Mittel ($\pm SD$) über **alle Zyklusphasen**. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

Der Mittelwert (MW) TUNEL-positiver Zellen betrug in der L. epithelialis 5,2 pro 500 ausgezählte Zellen, in der L. propria 2,7 pro 500 ausgezählte Zellen (Tabelle 2 Anhang).

Die mittlere Anzahl Caspase-positiver Zellen in der L. epithelialis betrug 4,7 pro 500 Zellen, in der L. propria 2,3 pro 500 ausgezählte Zellen (Tabelle 2 Anhang).

Auch in den H.E. gefärbten Präparaten wurden mehr apoptotische Zellen in der L. epithelialis gefunden als in der L. propria ($p < 0,05$). Der Mittelwert der Zellen mit apoptotischen Körperchen betrug in der L. epithelialis 2,7, in der L. propria 1,7 Zellen pro 500 gezählte Zellen ($p < 0,05$) (Tabelle 2 Anhang).

Für die verschiedenen Zyklusphasen ergab sich beim Vergleich der Anzahl apoptotischer Zellen in der L. epithelialis und der L. propria der UTV ein unterschiedliches Bild.

2 Tage post ov. wurden mit dem Nachweis aktivierter Caspase-3 signifikant ($p < 0,05$) mehr apoptotische Zellen in der L. epithelialis (MW=2,5) der uterotubalen Verbindung gefunden als in der L. propria (MW=0,7) ($p < 0,05$) (Abbildung 3).

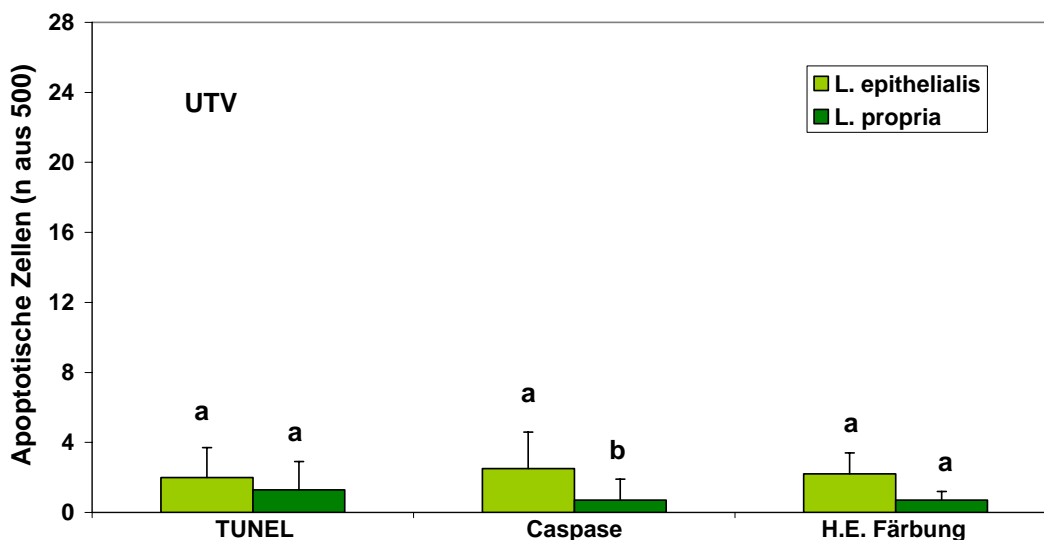


Abb.3 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der Lamina epithelialis und der Lamina propria der uterotubalen Verbindung **2 Tage post ov.** Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

Die TUNEL-Methode und der Nachweis apoptotischer Körperchen im H.E. gefärbten Präparat erbrachten dagegen keine Unterschiede zwischen den beiden Zellschichten (Abbildung 3).

4 Tage post ov. wurden in der L. epithelialis der uterotubalen Verbindung mit allen drei Nachweismethoden signifikant mehr apoptotische Zellen gefunden als in der Lamina propria ($p < 0,05$) (Abbildung 4).

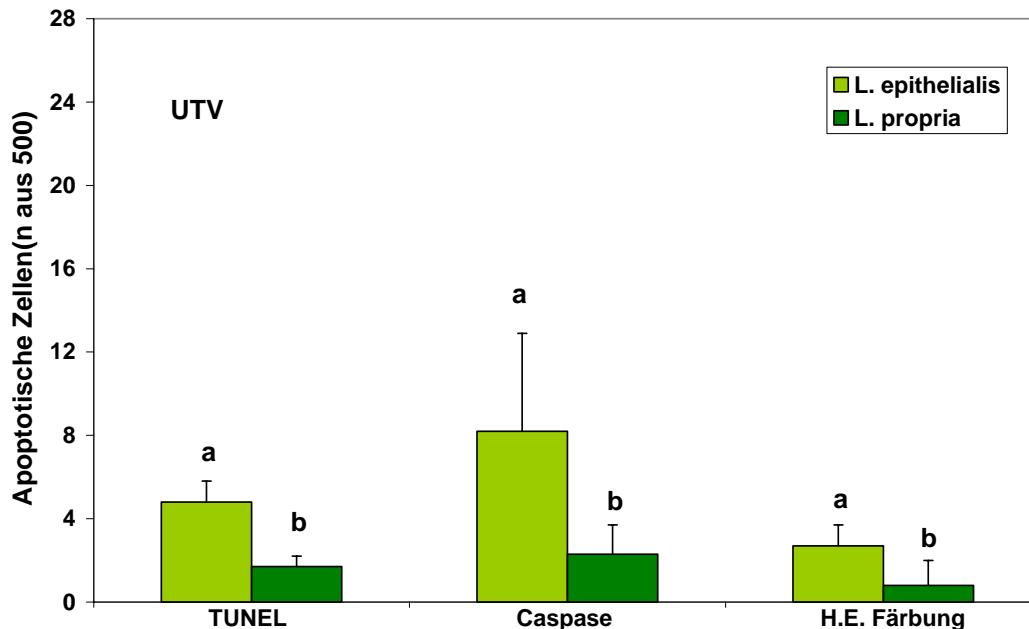


Abb.4 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L.epithelialis und der L.propria der uterotubalen Verbindung **4 Tage post ov.** Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschnitten ($p < 0,05$).

Mit der TUNEL-Methode wurden in der L.epithelialis im Mittel 4,8, in der L. propria dagegen nur 1,7 positive Zellen pro 500 ausgezählte Zellen nachgewiesen.

Die mittlere Anzahl Caspase-positiver Zellen betrug in der L. epithelialis 8,2 pro 500 ausgezählte Zellen. Mit einem Mittelwert von 2,3 war die Anzahl Caspase-positiver Zellen in der L. propria dagegen deutlich geringer.

Zellen mit apoptotischen Körperchen im H.E. gefärbten Präparat kamen in der L. epithelialis mit durchschnittlich 2,7 pro 500 Zellen im Mittel deutlich mehr vor als in der L. propria (MW=0,8) (s. Tabelle 12 Anhang).

Auch in der **Gelbkörperphase** wurden mit der TUNEL-Methode signifikant mehr apoptotische Zellen in der L. epithelialis (MW=13,3) als in der L. propria (MW=3,8)

nachgewiesen. Dasselbe ergab sich für den Nachweis aktivierter Caspase-3 mit durchschnittlich 11,2 positiven Zellen pro 500 ausgezählte Zellen in der L. epithelialis und 3,3 in der L. propria (s. Tabelle 14 Anhang). Die Quantifizierung der apoptotischen Körperchen im H.E. gefärbten Präparat erbrachte keinen Unterschied zwischen den beiden Zellschichten ($p > 0,05$) (Abbildung 5).

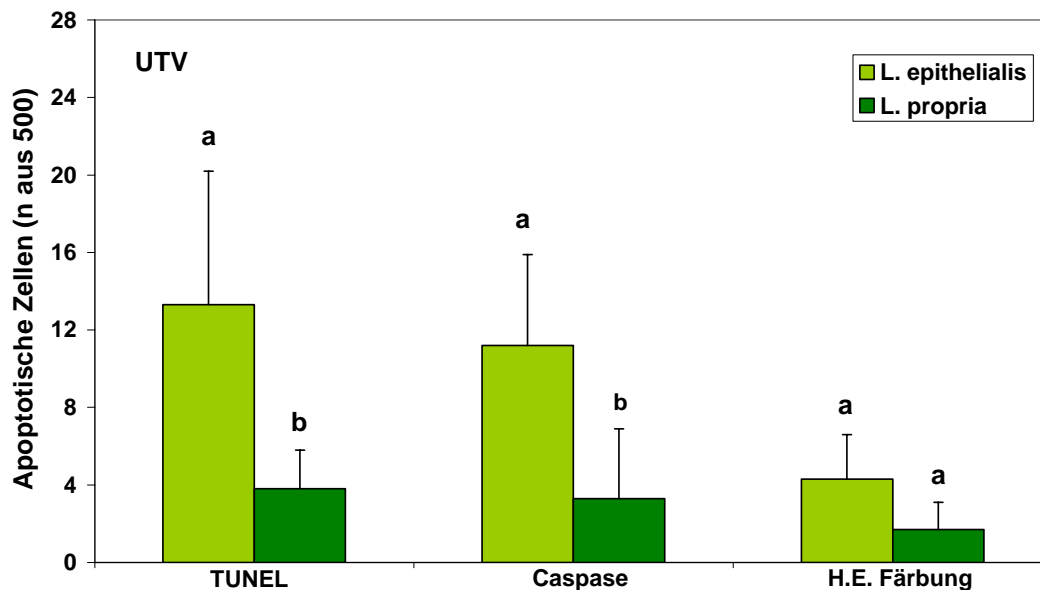


Abb.5 Anzahl ($\bar{x} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L.epithelialis und der L.propria der uterotubalen Verbindung in der **Gelbkörperphase**. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

Im **Anöstrus**, der **frühen und späten Follikelphase** und in der **Endometriumsreparation** war bei Anwendung aller drei Nachweismethoden kein Unterschied ($p > 0,05$) in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen der L. epithelialis und der L. propria ersichtlich (Tab.4,6,8,10,16; Abb.14,16,19,21 Anhang).

4.2. Nachweis apoptotischer Zellen in der Lamina epithelialis und der Lamina propria des Eileiteristhmus

Unabhängig vom Zyklusstand wurden auch im Eileiteristhmus **über alle Zyklusphasen** in der L. epithelialis mit jeder der drei angewendeten Nachweismethoden (TUNEL, Caspase-3, H.E.) signifikant mehr apoptotische Zellen gefunden als in der L. propria ($p < 0,05$) (Abbildung 6).

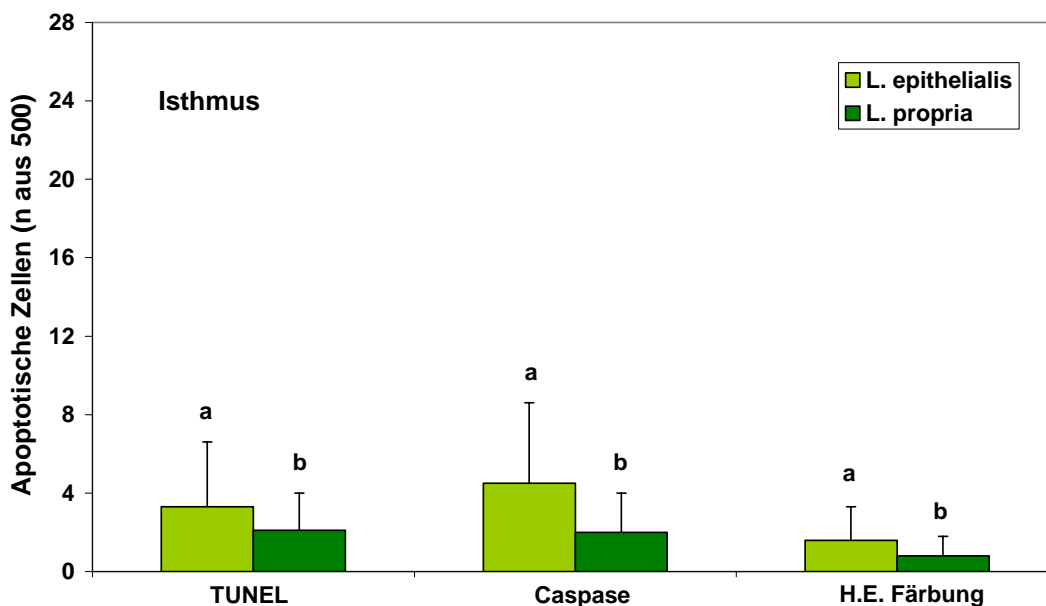


Abb.6 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L.epithelialis und der L.propria des Eileiteristhmus im Mittel über **alle Zyklusphasen**. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

Bei Anwendung der TUNEL-Methode wurden in der L. epithelialis im Mittel 3,3 apoptotische Zellen pro 500 ausgezählte Zellen nachgewiesen. In der L. propria lagen weniger apoptotische Zellen (MW=2,1) vor (Tabelle 3 Anhang).

Die mittlere Anzahl Caspase-positiver Zellen in der L. epithelialis war mit 4,5 pro 500 ausgezählte Zellen signifikant höher als in der L. propria (MW=2,0) ($p < 0,05$) (Tabelle 3 Anhang).

In den H.E. gefärbten Präparaten waren in der L. epithialis im Mittel 1,6, in der L. propria nur 0,8 Zellen mit apoptotischen Körperchen pro 500 gezählte Zellen nachweisbar ($p < 0,05$) (Tabelle 3 Anhang).

Beim Vergleich der Zyklusphasen wurden **2 Tage post ov.** mit dem Nachweis aktivierter Caspase-3 mehr apoptotische Zellen in der L. epithialis (MW= 4,3) des Eileiteristhmus gefunden als in der L. propria (MW= 0,8) (Tabelle 11 Anhang).

Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,05$).

Dagegen war mit der TUNEL-Methode und dem Nachweis apoptotischer Körperchen im H.E. gefärbten Präparat kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellschichten zu beobachten (Abbildung7).

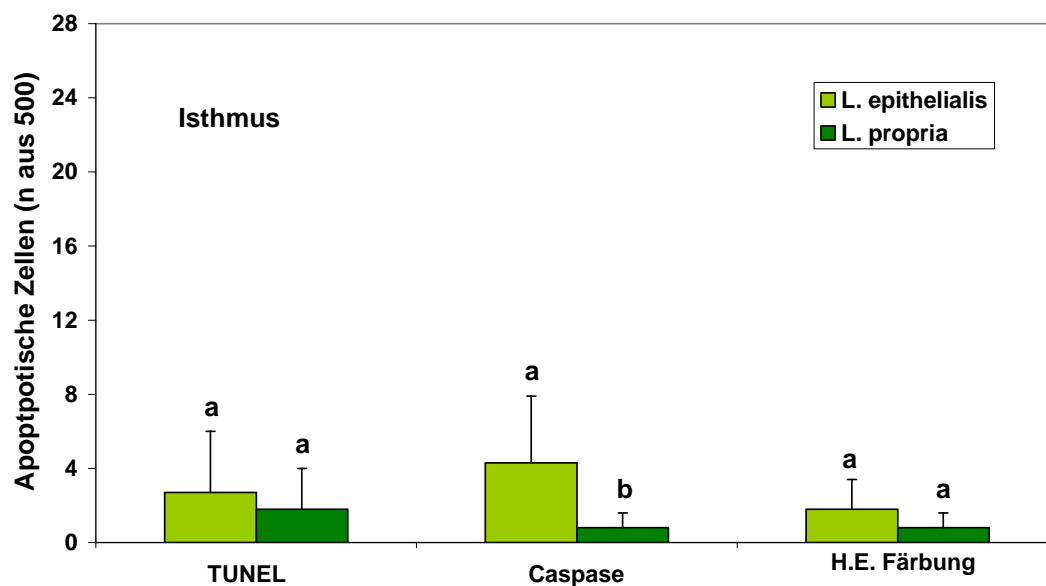


Abb.7 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L.epithialis und der L.propria des Eileiteristhmus **2 Tage post ov.**

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

In der **Gelbkörperphase** wurden mit der TUNEL-Methode signifikant mehr apoptotische Zellen in der L. epithialis (MW=9,3) als in der L. propria (MW=3,5) nachgewiesen. Dasselbe ergab sich für den Nachweis aktivierter Caspase-3 mit

durchschnittlich 10,7 positiven Zellen pro 500 ausgezählte Zellen in der L. epithialis und 3,8 in der L. propria (s. Tabelle 14 Anhang). Die Quantifizierung der apoptotischen Körperchen im H.E. gefärbten Präparat erbrachte keinen Unterschied zwischen den beiden Zellschichten ($p > 0,05$) (Abbildung 5).

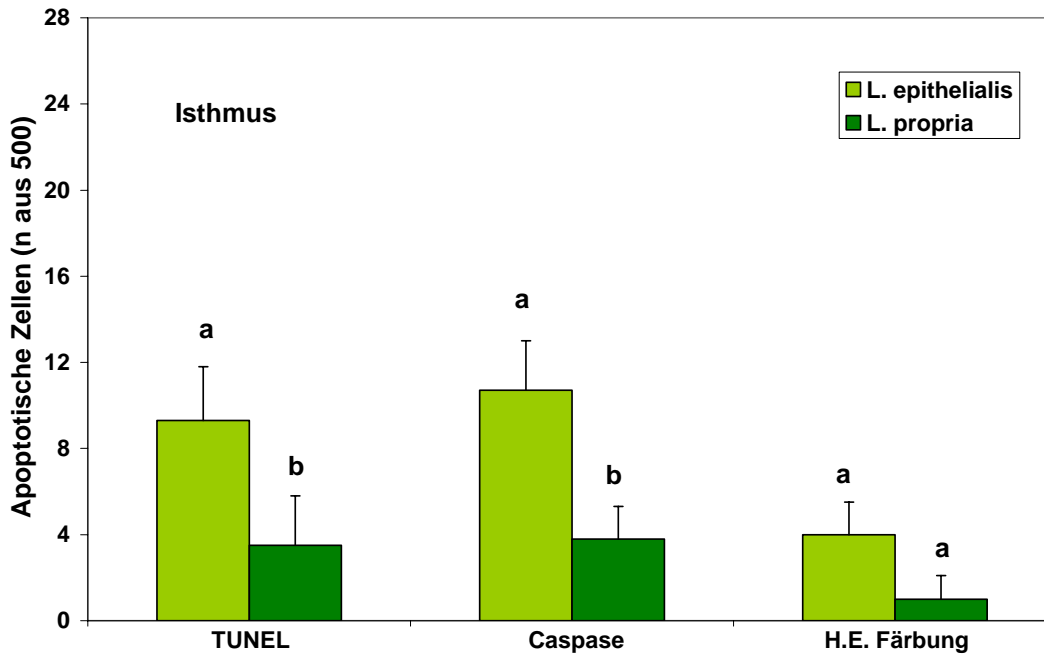


Abb.8 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L.epithialis und der L.propria im Eileiteristhmus in der **Gelbkörperphase**. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

Im **Anöstrus**, in der **frühen** und **späten Follikelphase**, **4 Tage post ovulationem** und in der **Endometriumsreparation** wurden bei keiner der drei Nachweismethoden Unterschiede ($p > 0,05$) in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen der L. epithialis und der L. propria festgestellt (Abb.15,17,18,20,22 Anhang).

4.3. Nachweis apoptotischer Zellen in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus im Vergleich

Insgesamt wurde sowohl in der UTV als auch im Eileiteristhmus nur eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen gefunden. Das **Maximum** apoptotischer Zellen in der **UTV** lag bei 33 (TUNEL) und 26 (Caspase-3) pro 500 ausgewertete Zellen in der Gelbkörperphase (Tabelle 24 Anhang). Das **Maximum** apoptotischer Zellen im **Eileiteristhmus** betrug 19 (TUNEL) und 20 (Caspase-3) pro 500 ausgewertete Zellen und war ebenfalls in der Gelbkörperphase zu beobachten (Tabelle 24 Anhang).

Über alle Zyklusphasen und beide Zellschichten (L. epithelialis und L. propria) wurden in der uterotubalen Verbindung bei Anwendung der TUNEL-Methode im Mittel mehr apoptotische Zellen (TUNEL MW=7,9) ermittelt als im Eileiteristhmus (TUNEL MW=5,4) ($p < 0,05$). Der Nachweis aktivierter Caspase-3 und der Nachweis apoptotischer Körperchen erbrachte keinen Unterschied ($p > 0,05$) in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus ($p > 0,05$) (Abbildung 9; Tabelle 18 Anhang).

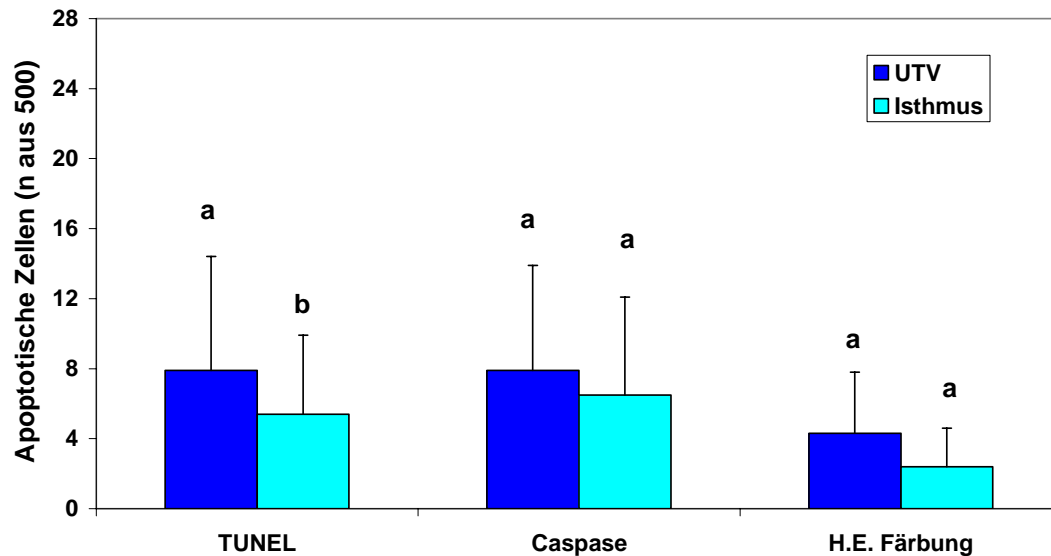


Abb.9 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus in **allen Zyklusphasen** (L.epithelialis und L.propria).
Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gewebeschichten ($p < 0,05$).

Zum Vergleich des Vorkommens apoptotischer Zellen in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus in den einzelnen Zyklusphasen siehe Anhang (Abb.23-29; Tab. 19-25).

4.4. Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina epithelialis der uterotubalen Verbindung im Zyklusverlauf

Aufgrund der objektiveren Auswertbarkeit und der höheren Sensitivität der TUNEL-Methode und des Caspase-3-Verfahrens im Vergleich zur H.E. Färbung konzentriert sich der folgende Abschnitt selektiv auf die mit Hilfe dieser beiden Verfahren erhobenen Befunde.

Die Anzahl detektierter apoptotischer Zellen weist lediglich im Anöstrus einen Unterschied zwischen den Nachweisverfahren auf. Hier wurden mittels der TUNEL-Methode signifikant mehr apoptotische Zellen gefunden als durch den Nachweis der aktivierten Caspase-3 ($p < 0,05$).

In allen anderen Zyklusphasen unterscheiden sich die beiden Nachweismethoden bezüglich der Anzahl positiver Zellen in der L. epithelialis der uterotubalen Verbindung nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$) (Abbildung 10).

Mit Hilfe der TUNEL-Methode wurde im Zyklusverlauf eine relativ konstante Anzahl apoptotischer Zellen in der L. epithelialis der uterotubalen Verbindung ermittelt. Lediglich in der Gelbkörperphase war ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ($p < 0,05$) (Abbildung 10).

Ein ähnliches Bild ergab sich über den Nachweis aktivierter Caspase-3, doch war hier aufgrund der sehr geringen Anzahl apoptotischer Zellen im Anöstrus ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) 4 Tage post ov. (MW=8,2) zu verzeichnen. Im Vergleich zu den anderen Zyklusphasen waren lediglich tendenzielle Unterschiede erkennbar. Wiederum wurden in der Gelbkörperblüte die höchste Anzahl apoptotischer Zellen ermittelt (MW=11,2). Außer am Tag 4 post ov. war sie signifikant höher als in den übrigen Zyklusphasen ($p < 0,05$) (Abbildung 10).

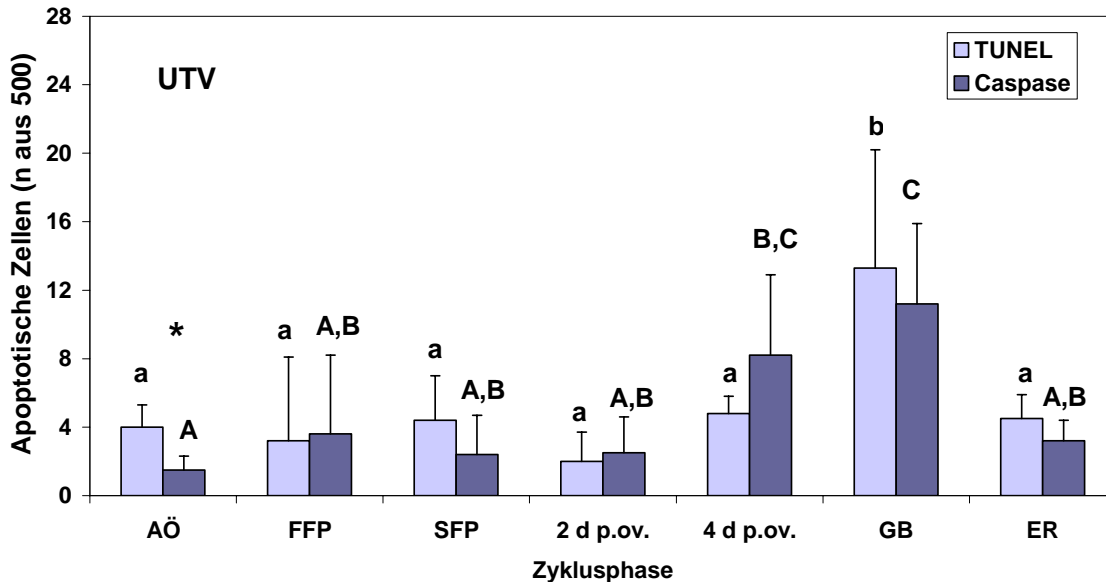


Abb.10 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung der TUNEL-Methode und beim Nachweis aktivierter Caspase-3 in der L.epithelialis der uterotubalen Verbindung in den einzelnen Zyklusphasen.

Unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zyklusphasen für die TUNEL-Methode ($p < 0,05$). Unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zyklusphasen für den Nachweis aktivierter Caspase-3 ($p < 0,05$)

*= kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den Nachweismethoden ($p < 0,05$)

4.5 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina propria der uterotubalen Verbindung im Zyklusverlauf

In der L.propria der UTV wurde mit beiden Nachweisverfahren im Zyklusverlauf lediglich tendenzielle Schwankungen in der Anzahl apoptotischer Zellen sichtbar. (Abbildung 11). Desweiteren bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den mit der TUNEL-Methode und dem Nachweis aktivierter Caspase-3 erzielten Ergebnissen.

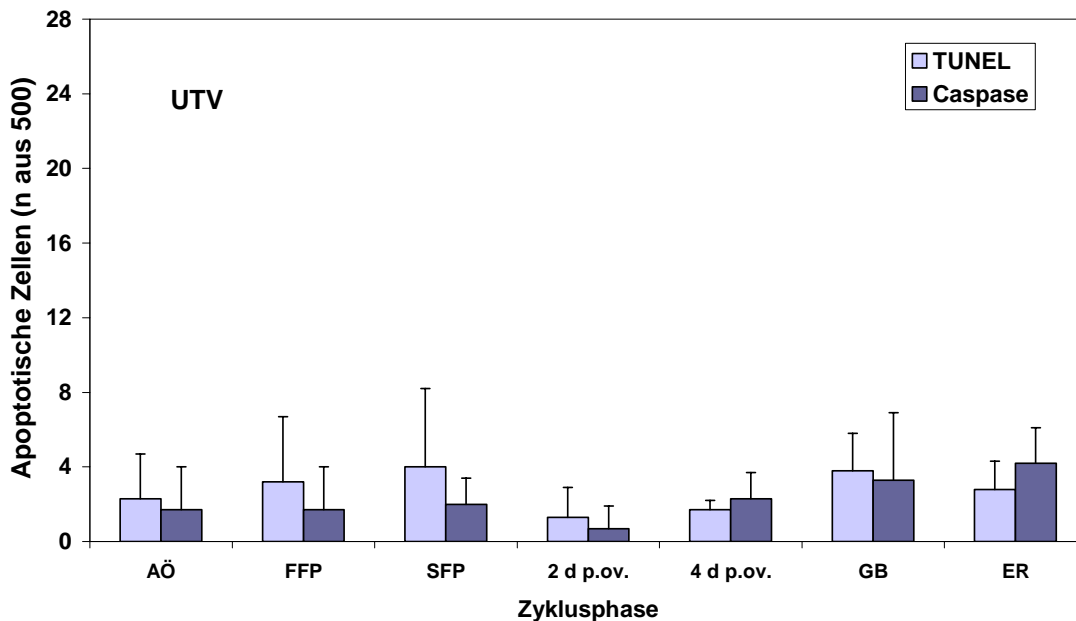


Abb.11 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung der TUNEL-Methode und beim Nachweis aktivierter Caspase-3 in der Lamina propria der uterotubalen Verbindung im Zyklusverlauf. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Nachweisverfahren und Zyklusphasen.

4.6 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina epithelialis des Eileiteristhmus im Zyklusverlauf

Bezüglich der beiden Untersuchungsmethoden war in der L. epithelialis des Eileiteristhmus lediglich 4 Tage post ov. ein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen feststellbar ($p < 0,05$). Zu diesem Zeitpunkt wurden mittels aktivierter Caspase-3 signifikant mehr apoptotische Zellen als bei Anwendung der TUNEL-Methode ermittelt. In allen anderen Zyklusphasen ergaben sich zwischen den beiden Nachweismethoden keine Unterschiede. (Abbildung 12).

Mit der TUNEL-Methode wurden ausschließlich in der Gelbkörperphase signifikant mehr apoptotische Zellen in der L. epithelialis des Eileiteristhmus ermittelt als in allen anderen Zyklusphasen ($p < 0,05$) (Abbildung 12).

Dagegen war mit Hilfe der aktivierten Caspase-3 bereits 4 Tage post ovulationem ein deutlicher Anstieg der mittleren Anzahl apoptotischer Zellen zu erkennen ($MW=8,0$), der sich in Relation zu den Zyklusphasen Anöstrus, frühe Follikelphase und Endometriumsreparation signifikant unterschied ($p < 0,05$) (Abbildung 12). Das hohe Niveau blieb über Tag 4 post ov. hinaus in der Lutealphase bestehen ($MW=10,7$). In der frühen Follikelphase war die Anzahl Caspase-positiver Zellen besonders gering ($MW=0,3$) und unterschied sich auch von den Werten der späten Follikelphase signifikant ($p < 0,05$) (Abbildung 12).

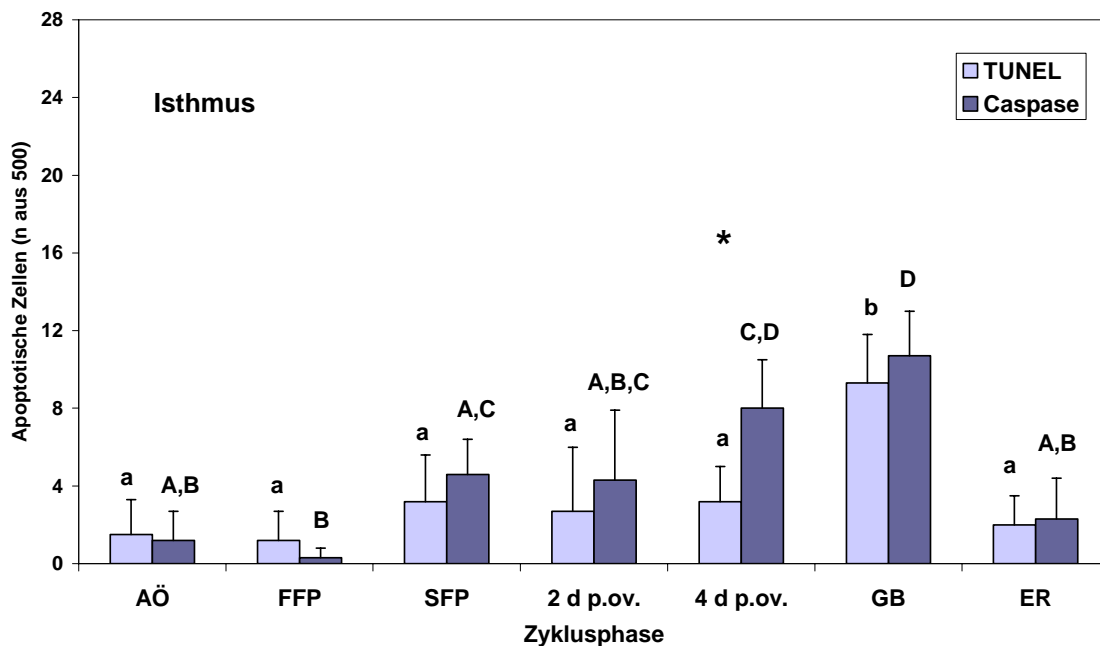


Abb.12 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung der TUNEL-Methode und dem Nachweis aktivierter Caspase-3 in der L.epithelialis des Eileiteristhmus in allen Zyklusphasen. Unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zyklusphasen für die TUNEL-Methode ($p < 0,05$). Unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zyklusphasen für den Nachweis aktivierter Caspase-3 ($p < 0,05$)
 *= kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den Nachweismethoden ($p < 0,05$)

4.7 Vergleich der mit Hilfe der TUNEL-Methode und des Nachweises aktivierter Caspase-3 erhobenen Befunde in der Lamina propria des Eileiteristhmus im Zyklusverlauf

Wie in der L. epithelialis des Eileiteristhmus zeigte sich in Abhängigkeit vom Untersuchungsverfahren 4 Tage post ov. ein signifikanter Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen ($p < 0,05$). So wurden mittels aktivierter Caspase-3 signifikant mehr apoptotische Zellen detektiert (MW=4,8) als mit der TUNEL-Methode (MW=1,7) ($p < 0,05$).

In allen anderen Zyklusphasen erbrachten beide Methoden ähnliche Ergebnisse (Abbildung 13).

Im Gegensatz zur L. propria der UTV wies die L. propria des Eileiteristhmus zyklische Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen auf, die allerdings nur beim Nachweis aktivierter Caspase-3 deutlich sichtbar wurden. 4 Tage post ov. traten signifikant mehr positive Zellen auf als in den Zyklusphasen Anöstrus, frühe und späte Follikelphase, 2 Tage post ov. und Endometriumsreparation ($p < 0,05$). Die ebenfalls erhöhten Werte in der Gelbkörperblüte unterschieden sich signifikant von den Werten der Zyklusphasen Anöstrus, frühe Follikelphase und 2 Tage post ov. ($p < 0,05$) (Abbildung 13).

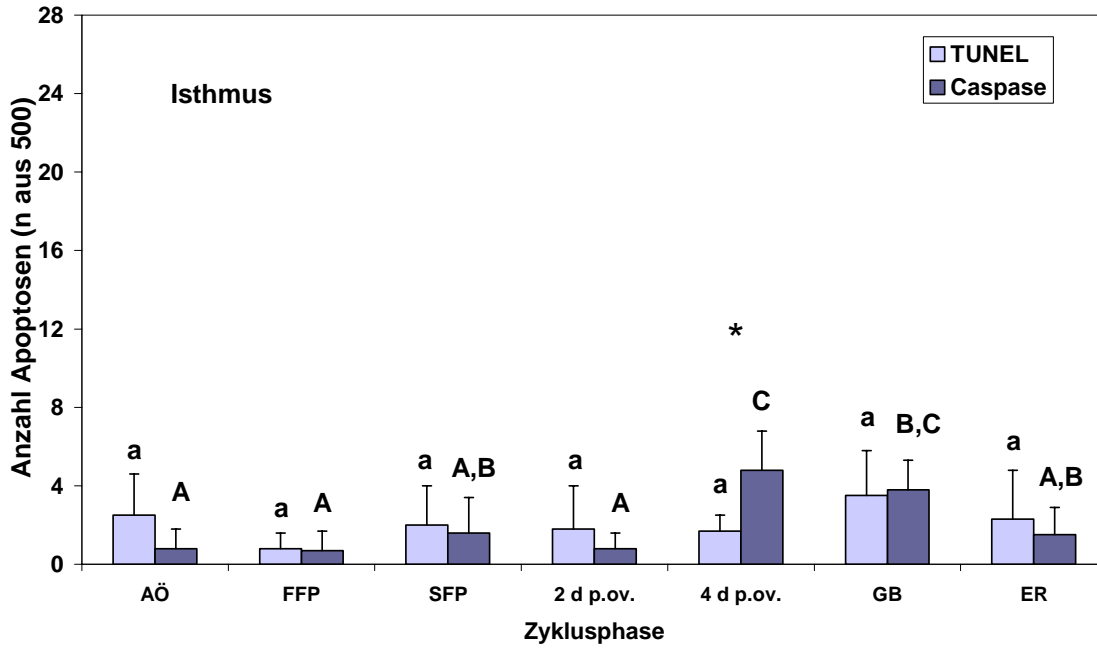


Abb.13 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung der TUNEL-Methode und dem Nachweis aktivierter Caspase-3 in der L.propia des Eileiteristhmus in allen Zyklusphasen. Unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zyklusphasen für die TUNEL-Methode ($p < 0,05$). Unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Zyklusphasen für den Nachweis aktivierter Caspase-3 ($p < 0,05$).
 *= kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den Nachweismethoden ($p < 0,05$)

5 Diskussion

Während apoptotische Veränderungen im Uterus der Hündin bereits eingehend untersucht wurden, liegen bisher noch keine detaillierten qualitativen oder quantitativen Studien über das Vorkommen der Apoptose im caninen Ovidukt vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Apoptose in der Lamina epithelialis und Lamina propria der uterotubalen Verbindung und des Eileiteristhmus des Hundes mittels der TUNEL-Methode, dem Nachweis aktivierter Caspase-3 und der H.E. Färbung nachzuweisen. Neben der Evaluation der verschiedenen Nachweisverfahren lag der Schwerpunkt der Arbeit auf dem Vergleich der Apoptoserate in den beiden Lokalisationen und Zellschichten des Eileiters und der Ermittlung zyklusabhängiger Veränderungen.

Für die Studie standen Eileiter von insgesamt 41 Hündinnen zur Verfügung, die sich zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie in unterschiedlichen Stadien des Zyklus befanden. Es wurden jeweils sechs Eileiter aus den Zyklusphasen Anöstrus, frühe Follikelphase, Gelbkörperblüte und Endometriumreparation sowie fünf Eileiter aus der späten Follikelphase untersucht. Zusätzlich wurden je sechs Eileiter von Hündinnen in die Studie einbezogen, bei denen nach vaginaler Besamung am Tag der Ovulation mit einer Milliarde vorwärtsbeweglicher Spermien, 2 Tage post ov. und 4 Tage post ov. eine Ovariohysterektomie vorgenommen worden war.

5.1 Bewertung der Apoptose-Nachweisverfahren

In der vorliegenden Studie wurden über alle Zyklusphasen in beiden untersuchten Lokalisationen, der UTV und dem Eileiteristhmus, insgesamt nur eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen gefunden.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Verfahren weisen charakteristische morphologische Veränderungen der Zelle während der Apoptose nach. Im Verlauf

des Zelltods durch Apoptose kommt es zum Verlust von Zellverbindungen, zur Zellschrumpfung, zur Chromatinkondensation und Fragmentierung des Zellkerns. Durch Bildung von Membranbläschen, in denen das endoplasmatische Retikulum mit der Zellplasmamembran verschmilzt, wird die Zelle in mehrere membrangebundene Vesikel unterteilt, die als sog. apoptotische Körperchen abgeschnürt werden (KERR et al.1994). Während der Fragmentierung des Zellkerns kommt es auf molekularer Ebene durch DNA-spaltende Enzyme zu einer typischen internukleosomalen Fragmentierung der DNA in aus Basenpaaren bestehende Segmente.

Mit der TUNEL-Methode wird die während des apoptotischen Prozesses auftretende Fragmentierung der DNA nachgewiesen. Die immunhistochemische Darstellung mittels Caspase-3 basiert auf der Apoptose-bedingten Aktivierung des Enzyms, die wiederum eine Endonukleasenaktivierung bewirkt. Endonukleasen sind für das charakteristische morphologische Erscheinungsbild apoptotischer Zellen verantwortlich. Als histologisches Nachweisverfahren wurde im H.E. gefärbten Präparat Apoptose anhand des Auftretens apoptotischer Körperchen ermittelt.

Zwar kann der lichtmikroskopische Nachweis bei einem erfahrenen Untersucher zu zufriedenstellenden Ergebnissen führen, doch ist aufgrund des fortschreitenden Abbaus der apoptotischen Körperchen in den späteren Stadien der Apoptose (KERR et al. 1994) die Aussagekraft dieses Verfahrens begrenzt. Dies erklärt auch, warum in fast allen H.E. gefärbten Präparaten über alle Zyklusphasen und Zellschichten weniger apoptotische Zellen ermittelt wurden als mit der TUNEL- und der Caspase-3-Methode.

Bezüglich des Vorkommens von Apoptose in der L. propria der uterotubalen Verbindung wurde kein Unterschied zwischen der TUNEL-Methode und dem Caspase-3- Nachweis festgestellt.

Während mit der TUNEL-Methode nur im Anöstrus in der L. epithelialis der uterotubalen Verbindung eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Zellen als mit dem Caspase-3-Verfahren detektiert wurde, erbrachte der Nachweis aktivierter Caspase-3 in beiden Zellschichten des Eileiteristhmus 4 Tage post ov. eine signifikant höhere Apoptoserate.

Letzteres könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Aktivierung der Caspase-3 im Ablauf der Apoptose ein früheres Ereignis als die DNA-Fragmentation darstellt (WYLLIE et al. 1980) und es sich somit um ein sensitiveres Verfahren handelt. Zusätzlich muss bei der Beurteilung der Nachweisverfahren eine geringere Spezifität der TUNEL-Methode berücksichtigt werden, da auch der Nekrose-bedingte Zelltod zu positiven Reaktionen führt (STADELMANN und LASSMANN 2000).

Da die mit beiden Verfahren ermittelte Apoptoserate während des Anöstrus in allen Lokalisationen und in beiden Zellschichten auffallend niedrig war, ist die mit der TUNEL-Methode nachgewiesene signifikant höhere Apoptoserate in der L. epithelialis der uterotubalen Verbindung kritisch zu bewerten. So ist zur Untersuchung apoptotischer Prozesse in Geweben der Caspase-3-Nachweis als das zuverlässigere Verfahren vorzuziehen (VAN CRUCHTEN 2003). Die Ergebnisse dieser Studie deuten jedoch darauf hin, dass entsprechend den Empfehlungen von SCHAPER et al. (1999) ein Nachweis apoptotischer Zellen durch Kombination zweier etablierter Nachweisverfahren ratsam ist.

5.2 Apoptoserate in den verschiedenen Zyklusphasen

Eine wichtige Intention dieser Arbeit bestand darin, das Vorkommen von Apoptose in definierten Phasen des caninen Zyklus zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen und dem Konzentrationsprofil der ovarialen Hormone Östradiol-17 β und Progesteron im peripheren Blutserum zu ermitteln. Neben den gynäkologischen und sonographischen Befunden trugen die endokrinologischen Befunde maßgeblich zur Zyklusdiagnostik bei.

Im **Anöstrus** werden basale Östrogenkonzentrationen von 8-15 pg/ml gemessen (CONCANNON 1986b; FELDMAN u. NELSON 1999). Während der **frühen Follikelphase** werden in den wachsenden Follikeln stetig steigende Mengen an Östradiol produziert und sezerniert, so dass im peripheren Blut Östradiolkonzentrationen von 10-30 pg/ml festgestellt werden. Die

Progesteronkonzentration befindet sich in diesen beiden Zyklusphasen auf basalem Niveau (< 1,0 ng/ml). In der **späten Follikelphase** werden mit 50 bis 100 pg/ml die höchsten Östrogenkonzentrationen im gesamten Zyklus erreicht (CONCANNON et al. 1975; CONCANNON et al. 1989). Bedingt durch eine präovulatorische Follikelluteinisierung findet bereits in dieser Zyklusphase ein initialer Progesteronanstieg im peripheren Blut auf 2 bis 4 ng/ml statt (CONCANNON et al. 1977; OLSON et al. 1982; GÜNZEL-APEL et al. 1990). Zum Zeitpunkt der Ovulation werden Progesteronwerte zwischen 3 und 8 ng/ml gemessen (CONCANNON et al. 1975; DIETERICH 1994). Im Rahmen der Gelbkörperanbildung ist eine deutliche Steigerung der Progesteronsynthese und -sekretion zu verzeichnen, die anhand durchschnittlicher Progesteronkonzentrationen von 21,3 ng/ml am **Tag 2 post ov.** und 29,5 ng/ml am **Tag 4 post ov.** zum Ausdruck kamen (KARRE 2008). Während der Phase höchster Gelbkörperaktivität (**Gelbkörperblüte**) kann die Progesteronkonzentration Höchstwerte von bis zu 90 ng/ml Blutserum erreichen (CONCANNON 1993). Die ca. 2-monatige Zeitspanne der **Endometriumsreparation** setzt mit Abschluss der Gelbkörperregression ein und ist demzufolge von basalen Progesteronkonzentrationen gekennzeichnet. Auch die Östradiol-17 β -Konzentration befindet sich auf basalem Niveau.

In den verschiedenen Zyklusphasen wurden deutliche Unterschiede bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen gefunden. STEINHAEUER et al. (2004) belegten, dass das Eileiterepithel im Verlauf des Zyklus und in Abhängigkeit von den im Blut zirkulierenden Ovarsteroiden histomorphologischen Veränderungen unterworfen ist. In der vorliegenden Studie konnten die quantitativen Unterschiede bezüglich des Vorkommens apoptotischer Zellen ebenfalls mit den Blutserumkonzentrationen von Östrogen und Progesteron und somit mit den unterschiedlichen Zyklusphasen in Zusammenhang gebracht werden. So wurde eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen in den Zyklusphasen beobachtet, die unter dem Einfluss steigender (4 Tage post ov.) und maximaler Progesteronkonzentrationen (Gelbkörperblüte) stehen. In der Gelbkörperblüte war die Anzahl apoptotischer Zellen am höchsten, während in den Zyklusphasen mit basalen Progesteron- und hohen Östrogenkonzentrationen (frühe Follikelphase) sowie in den Zyklusphasen mit

basalen Progesteron- und Östrogenkonzentrationen (Anöstrus, Endometriumsreparation) deutlich weniger apoptotische Zellen ermittelt wurden.

Diese Befunde decken sich weitgehend mit den Angaben zum Vorkommen apoptotischer Prozesse im Eileiter anderer Säugerspezies in der Literatur (Katze, BAREITHER und VERHAGE 1981; Schwein, RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1990; Pavian, VERHAGE et al. 1990; Mensch, BRITON-JONES et al. 2006).

Auch im Endometrium normozyklischer Weißbüschelaffen und Hunde wurde unter hohen Progesteronkonzentrationen eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen nachgewiesen (CHU et al. 2002, 2006; NARKAR et al. 2006). Nach Ovariectomie und anschließender Östrogen- bzw. Progesteronapplikation wurde gezeigt, dass die alleinige Gabe weder von Östrogen noch von Progesteron Apoptose auszulösen vermochte. Dies war nur durch aufeinanderfolgende Applikation von Östrogen und Progesteron möglich und zeigte sich anhand eines signifikanten Anstiegs von Apoptose in den endometrialen Zellen, welcher mit den Ergebnissen in der Gelbkörperphase der intakten Tiere vergleichbar war. Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch anhand der in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse am Eileiter der Hündin wider.

5.3 Apoptoserate in der Lamina epithelialis und Lamina propria

Unabhängig vom Zyklusstand wurden in der L. epithelialis beider Lokalisationen eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Zellen ermittelt als in der L. propria.

Bei Betrachtung der einzelnen Zyklusphasen wurden in den beiden Gewebeschichten signifikante Unterschiede in der UTV 2 und 4 Tage post ov. und während der Gelbkörperblüte beobachtet. Im Eileiteristhmus war dies

2 Tage post ov. und in der Gelbkörperblüte der Fall. Das unterschiedliche Auftreten von Apoptose in der L. epithelialis und L. propria lässt sich mit der Histomorphologie und der Funktion der Zellschichten des Ovidukts erklären. Die L. propria besteht aus einem zellreichen und faserigen Bindegewebe. Sie ist drüsenlos und übernimmt die Funktion eines bindegewebigen Grundgerüsts der Schleimhautfalten des Eileiters.

Die L. epithelialis setzt sich aus zilientragenden und sekretorischen Zellen zusammen (SMOLLICH 1992; LIEBICH 2003), die in höchstem Maße zyklischen Veränderungen unterworfen sind (STEINHAEUER et al. 2004). Hauptaufgabe der zilientragenden Zellen besteht in dem Transport von Eizellen und Sekreten.

Insbesondere bei Primaten und Tierarten mit einer langen Lutealphase, zu welchen auch der Hund gehört, werden sowohl die zilientragenden Zellen als auch die sekretorischen Zellen zyklisch regeneriert (VERHAGE et al. 1990).

Nachdem die sekretorische Aktivität und Zellhöhe der Drüsenzellen unter hohen Östrogenkonzentrationen das Maximum erreichen, verringert sich nach der Ovulation die Zellhöhe durch Sekretionsabgabe (ODOR u. AUGUSTINE 1995). Den Drüsenzellen obliegt die Schaffung adäquater Bedingungen für die Spermienmigration, den Oozytentransport, die Fertilisation und die frühe Embryonalentwicklung (NILSSON u. REINIUS 1969; HUNTER 1994; ABE et al. 1995). Beide Zelltypen durchlaufen beim Hund wie bei Primaten einen kompletten Zellzyklus von der Differenzierung unter Östrogeneinfluss in der Follikelphase bis zur Dedifferenzierung in der Lutealphase (Mensch, VERHAGE et al. 1979; Pavian, VERHAGE et al. 1990, Hund, VERHAGE et al. 1973a,b; STEINHAEUER et al. 2004). Die in der vorliegenden Studie beobachtete geringe Apoptoserate in der L. propria ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass dieses zellreiche und faserige Bindegewebe kaum zyklischen Veränderungen unterworfen ist.

5.4 Apoptoserate in verschiedenen Eileiterlokalisationen

Neben der Aufnahme der Oozyten durch das Infundibulum, der Aufrechterhaltung der Lebens- und Befruchtungsfähigkeit von Eizellen und Spermien durch Bereitstellung von Sekretionsprodukten sowie dem Transport der Eizellen und Spermien, laufen im Eileiter wesentliche Schritte der SpermienSpeicherung ab. Bei verschiedenen Haussäugetieren (Schaf, HUNTER et al. 1980; Rind, HUNTER u. WILMUT 1984; Schwein, HUNTER 1981; HUNTER et al. 1987; PETRUNKINA et al. 2001) bildet der kaudale Teil des Oviduktisthmus ein funktionelles

Spermienreservoir. Er ermöglicht eine Selektion intakter, befruchtungsfähiger Spermien durch Bindung an das Eileiterepithel, reguliert die Kapazität und beugt einer Polyspermie vor, indem nur wenige Spermien aus dem Reservoir zum Ort der Befruchtung, der Eileiterampulle, gelangen (SUAREZ 1998; TÖPFER-PETERSEN et al. 2003). Bei der Hündin wiesen DOAK et al. (1967) den Uterindrüsen die Funktion eines Spermienreservoirs zu. Nach RIJSSELAERE et al. (2004) und KARRE (2008) werden auch in der UTV Spermien gespeichert. Die Ergebnisse zahlreicher in-vitro Studien zur Spermien-Epithelzell-Interaktion lassen auch beim Hund eine Beteiligung des Eileiters an der Speicherung von Spermien vermuten.

So zeigten PACEY et al. (2000), dass homologe Spermien in gleicher Weise an Epithelzellen des Isthmus und der Ampulle des caninen Eileiters binden. Während gebundene Spermien in der Lage waren, ihre Motilität über den Beobachtungszeitraum von 48 h aufrechtzuerhalten, waren ungebundene Spermien bereits nach 6 Stunden unbeweglich. Zudem zeigten Spermien die an das Eileiterepithel östrischer Hündinnen banden eine stärkere flagellare Aktivität, im Vergleich zu Spermien, die mit dem Eileiterepithel aus der Lutealphase oder dem Anöstrus interagierten. PETRUNKINA et al. (2003) stellten ebenfalls einen motilitäts- und vitalitätserhaltenden Effekt durch die Bindung an das Eileiterepithel fest und sprachen aufgrunddessen dem Eileiter auch beim Hund die Aufgabe eines Spermienreservoirs zu.

Die von Steinhauer et al. (2004) beschriebenen histomorphologischen Prozesse der östrogenabhängigen Hypertrophie und Zelldifferenzierung und der progesteronvermittelten Dedifferenzierung oder Regression des Eileiterepithels wiesen in der UTV und im Isthmus eine deutlich geringere Ausprägung auf, als in der Ampulle und im Infundibulum.

Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, dass der UTV und dem Oviduktisthmus eine spezielle funktionelle Eigenschaft im Sinne eines Spermienreservoirs zukommen könnte, wie es von RIJSSELAERE et al. (2004) und KARRE (2008) für die UTV bestätigt wurde.

Beim Vergleich der beiden Eileiterabschnitte über alle Zyklusphasen wurden mit der TUNEL-Methode signifikant mehr apoptotische Zellen in der UTV als im Isthmus nachgewiesen. Dies könnte jedoch in der geringeren Spezifität der Methode begründet sein. Dafür spricht auch, dass mittels des Nachweises aktivierter Caspase-3 sowie des Nachweises apoptotischer Körperchen im H.E. gefärbten Präparat kein Unterschied bezüglich des Vorkommens von Apoptose zwischen der UTV und dem Eileiteristhmus festgestellt wurde.

Die in der vorliegenden Studie in der UTV und im Oviduktisthmus ermittelte insgesamt geringe Apoptoserate könnte die Hypothese von STEINHAUER et al. (2004) bezüglich der Bedeutung der UTV und auch des Eileiteristhmus als funktionelles Spermienreservoir stützen.

5.5 Vorkommen von Apoptose im periovulatorischem Zeitraum

Die 2 Tage und 4 Tage post ov. gewonnenen Eileiterpräparate stammten von je sechs Hündinnen, die am Tag der Ovulation mit einer Milliarde vorwärtsbeweglicher Spermien besamt worden waren. Eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen betraf den Zeitpunkt 4 Tage post ov. mit einer mittleren Progesteronkonzentration von 29,5 ng/ml. Dagegen lag die Anzahl apoptotischer Zellen 2 Tage post ov. trotz einer bereits hohen mittleren Progesteronkonzentration von 21,3 ng/ml noch auf dem Niveau der späten Follikelphase, in welcher aufgrund der präovulatorischen Follikelluteinisierung nur 2 bis 4 ng/ml Progesteron gemessen werden. Die Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen koinzidierte somit mit der Initialphase der Befruchtungsfähigkeit der Oozyten, in welcher die Bindung der Spermien an das Eileiterepithel aufgehoben wird, damit die für die Befruchtung erforderlichen Prozesse der Spermienkapazitation ablaufen können. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Induktion der Apoptose im Ovidukt der Hündin nicht allein von einer erhöhten Progesteronkonzentration, sondern auch vom Stadium der postovulatorischen Oozytenreifung abhängig ist. Dieser Zusammenhang stützt auch die Bedeutung der beiden kaudalen Eileiterabschnitte als funktionelles Spermienreservoir. Ein alleiniger Einfluss der im

Eileiter zu beiden Zeitpunkten anwesenden Spermien auf die Apoptoserate ist fraglich, obwohl eine nicht besamte Kontrollgruppe fehlt. Näher liegender ist der bereits diskutierte Zusammenhang zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen und dem Einfluss der steigenden Progesteronkonzentrationen, der auch bei den nicht besamten Tieren während der Gelbkörperblüte zu verzeichnen war. Ob ein Einfluss von Spermien auf das Vorkommen von Apoptose im Eileiter besteht muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

6 Zusammenfassung

Carola Urhausen:

Apoptose in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus der Hündin im Zyklusverlauf

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, detaillierte Erkenntnisse über das Vorkommen von Apoptose in der Lamina (L.) epithelialis und der L. propria der uterotubalen Verbindung (UTV) und des Eileiteristhmus der zyklischen Hündin zu gewinnen. Die während des apoptotischen Prozesses auftretende Fragmentierung der DNA wurde mit Hilfe der TUNEL-Methode nachgewiesen. Die immunhistochemische Darstellung apoptotischer Zellen erfolgte durch den Nachweis aktivierter Caspase-3. Zusätzlich wurden H.E. gefärbte Präparate auf das Vorkommen apoptotischer Körperchen untersucht. Im Hinblick auf funktionelle Besonderheiten der beiden Eileitersegmente wurden in beiden Zellschichten zyklus- bzw. hormonassoziierte Veränderungen in beiden Lokalisationen analysiert und miteinander verglichen. Die UTV und der Eileiteristhmus von 41 geschlechtsgesunden Hündinnen aus den Zyklusphasen Anöstrus (n=6), frühe Follikelphase (n=6), späte Follikelphase (n=5), Gelbkörperanbildung - 2 Tage post ovulationem (ov.) (n=6), 4 Tage post ov. (n=6) -, aktive Gelbkörperphase (n=6) und Endometriumreparation (n=6), wurden lichtmikroskopisch untersucht. Die am Tag 2 und 4 post ov. ovariohysterektomierten Hündinnen waren in eine Studie zum Spermientransport involviert.

Insgesamt waren über alle Zyklusphasen in beiden Organlokalisationen nur wenige apoptotische Zellen nachweisbar. Die quantitativen Unterschiede im Vorkommen apoptotischer Zellen in den einzelnen Zyklusphasen konnten eindeutig mit den Blutserumkonzentrationen von Östradiol-17 β und Progesteron in Verbindung gebracht werden. Eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen wurde in den Zyklusphasen beobachtet, die unter dem Einfluss steigender (4 Tage post ov.) und hoher Progesteronkonzentrationen (aktive Gelbkörperphase) stehen. Hingegen wurden bei basalen Progesteron- und hohen Östrogenkonzentrationen (frühe Follikelphase) sowie in den Zyklusphasen mit basalen Progesteron- und

Östrogenkonzentrationen (Anöstrus, Endometriumreparation) deutlich weniger apoptotische Zellen beobachtet.

Unabhängig vom Zyklusstand wurden in der L. epithelialis der UTV und des Eileiteristhmus eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt als in der L. propria beider Lokalisationen ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen, dass apoptotische Prozesse im Eileiter der Hündin vorkommen und diese in Abhängigkeit von den im Blut zirkulierenden Ovarhormonen quantitative Unterschiede aufweisen. Die Koinzidenz der Zunahme apoptotischer Zellen mit dem Erreichen der Befruchtungsfähigkeit der Oozyten 4 Tage post ov. spricht zudem für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Stadium der postovulatorischen Oozytenreifung und der Apoptoserate im kaudalen Ovidukt. Ob die insgesamt niedrige Apoptoserate in beiden Eileitersegmenten eine spezifische Bedeutung für die der Befruchtung vorausgehende Spermien-speicherung, d.h. die Bildung eines funktionellen Spermienreservoirs, besitzt, bedarf der Klärung durch weiterführende Studien.

7 Summary

Carola Urhausen:

Apoptosis in the uterotubal junction and the oviductal isthmus during the estrous cycle of the bitch

The aim of the present study was to gain detailed information about the existence of apoptosis in the Lamina (L.) epithelialis and L. propria of the uterotubal junction (UTJ) and the isthmus of the oviduct in the cycling bitch. DNA fragmentation during apoptosis was detected by TUNEL method. Apoptotic cells were detected immunohistochemically by activated Caspase-3. Furthermore, H.E. staining was used to identify apoptotic bodies in the cells. With regard to functional characteristics of the two oviduct segments, both cell layers were analysed and compared regarding cyclic and hormone-associated changes respectively, in both localisations.

The UTJ and oviductal isthmus of 41 genitally healthy bitches were examined by lightmicroscopy during anestrus (n=6), early follicular phase (n=6), late follicular phase (n=5), early luteal development - 2 days after ovulation (post ov.) (n=6), 4 days post ov. (n=6) - active luteal phase (n=6) and endometrial reparation (n=6). The bitches ovariohysterectomized 2 and 4 days post ov. had been involved in a study on sperm transport. .

On the whole only few apoptotic cells were detected in both localizations during the entire oestrous cycle. Differences in the number of apoptotic cells between different stages of the cycle were associated with blood serum concentrations of estradiol-17 β and progesterone. A significant increase in the number of apoptotic cells was observed in those stages of oestrous cycle, which were under the influence of increasing (4 days post ov.) and high progesterone levels. However, few apoptotic cells were detected during stages with low progesterone and high estradiol concentrations (early follicular phase) as well as in stages with both low progesterone and estradiol concentration (anestrous, endometrial reparation).

Regardless of the stage of the oestrous cycle a significantly higher number of apoptotic cells was determined in the L. epithelialis of the UTJ and the oviductal isthmus compared to the L. propria of both localisations ($p < 0,05$).

The results of the present study demonstrate that apoptosis occurs in the canine oviduct and its amount changes depending on blood concentrations of ovarian hormones. The coincidence of the increase in the number of apoptotic cells and the achievement of fertilizing ability of the oocytes 4 days after ovulation may indicate a causal relation between the postovulatory maturation state of oocytes and the rate of apoptosis in the caudal part of the oviduct. However, further studies are needed to investigate if the rate of apoptosis in the UTJ and oviductal isthmus has a specific relevance in the process of fertilization regarding sperm storage in the sense of a functional sperm reservoir.

8 Literaturverzeichnis

ABE, H., M. ONODERA u. S. SUGAWARA (1993):

Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelial cells at the follicular and luteal phases of the oestrus cycle.

J. Anat. 183, 415-421

ABE, H. (1994):

Regional variations in the ultrastructural features of secretory cells in the rat oviductal epithelium.

Anat. Rec. 240, 77-85

ABE, H., Y. SENDAI, T. SATOH u. H. HOSHI (1995).

Bovine oviduct-specific glycoprotein is a potent factor for the maintenance of the viability and motility of bovine spermatozoa in vitro.

Mol. Reprod. Dev. 42, 226-232

ABUGHRIEN, B.M., M.A. DORE, T.A. McGEADY u. E. FITZPATRICK (2000):

Intraepithelial leucocytes in the bovine uterine tube.

Cells Tissues Organs 166, 20-30

ADAMS, J.M. u. S. CORY (1998):

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.

Science 281, 1322-1326

ANDERSEN, A.C. u. M.E. SIMPSON (1973):

The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle).

Verlag Geron-X Inc., Los Altos, California

ARBEITER, K., M. DOBRETSBERGER, E. MÜLLER u. A. HOLZMANN (1991):
Indirect detection of ovulation and fertilization in the dog by progesterone level testing
of plasma progesterone levels.

Zentralbl. Veterinarmed. A 38, 696-701

ASHKENAZI, A. u. V.M. DIXIT (1998):

Death receptors: signaling and modulation.

Science 281, 1305-1308

BAREITHER, M.L. u. H.G. VERHAGE (1981):

Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone.

Am. J. Anat. 162, 107-118

BAAR, C. (1995):

Untersuchung indirekter Verfahren der Läufigkeitsdiagnostik bezüglich ihrer
Aussagekraft für die Ovulationsterminierung beim Hund.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BERGQVIST, A.S., M. YOKOO, P. HELDIN, J. FRENDIN, E. SATO u. H.
RODRIGUEZ-MARTINEZ (2005):

Hyaluronan and its binding proteins in the epithelium and intraluminal fluid of the
bovine oviduct.

Zygote 13, 207-218

BLOMGREN, K., C. ZHU, U. HALLIN u. H. HAGBERG (2003):

Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing
brain.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 304, 551-559

BRITON-JONES, C., I.H. LOK, A.L. PO, C.K. CHEUNG, T.T. CHIU u. C. HAINES (2006):

Changes in the ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expression and their cellular localization throughout the ovulatory cycle in the human oviduct.

J. Assist. Reprod. Genet. 23, 149-156

CHANG, H.Y. u. X.YANG (2000):

Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 821-846

CHU, P., P.J. WRIGHT u. C.S. LEE (2002):

Apoptosis of endometrial cells in the bitch.

Reprod. Fertil. Dev. 14, 297-305

CHU, P., C.S. LEE u. P.J. WRIGHT (2006):

Degeneration and apoptosis of endometrial cells in the bitch.

Theriogenology 66, 1545-1549

CONCANNON, P.W. (1984):

Endocrinology of canine estrous cycle, pregnancy and parturition.

Proc. Ann. Meeting Soc. Theriogenology, Denver, Colorado 1984, S.1-24

CONCANNON, P. W. (1986a):

Canine pregnancy and parturition.

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 16, 453-475

CONCANNON, P.W. (1986b):

Canine physiology of reproduction:

in: BURKE, T.J. (Hrsg.): Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment.

Verlag Lea and Febiger, Philadelphia, S. 23-77

CONCANNON, P.W. (1993):

Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, 3-27

CONCANNON, P., W. HANSEL u. K. McENTEE (1977):

Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinisation in the bitch.

Biol. Reprod. 17, 604-613

CONCANNON, P. W., W. HANSEL u. W. J. VISEK (1975):

The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone.

Biol. Reprod. 13, 112-121

CONCANNON, P. W., J. P. MCCANN u. M. TEMPLE (1989):

Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 39, 3-25

CORY, S. u. J.M. ADAMS (2002):

The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.

Nat. Rev. Cancer 2, 647-656

COX, J. F., A. ZAVALA, F. SARAVIA, C. RIVAS, P. GALLARDO u. V. ALFARO (2002):

Differences in sperm migration through cervical mucus in vitro relates to sperm colonization of the oviduct and fertilizing ability in goats.

Theriogenology 58, 9-18

DENAULT, J.B. u. G.S. SALVESEN (2002):

Caspases: keys in the ignition of cell death.

Chem. Rev. 102, 4489-4500

DEVERAUX, Q.L., N. ROY, H.R. STENNICKE, T. VAN ARSDALE, Q. ZHOU, S.M. SRINIVASULA, E.S. ALNEMRI, G.S. SALVESEN u. J.C. REED (1998):

IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.

EMBO J. 17, 2215-2223

DEVERAUX, Q.L., H.R. STENNICKE, G.S. SALVESEN u. J.C. REED (1999):

Endogenous inhibitors of caspases.

J. Clin. Immunol. 19, 388-398

DIETERICH, J. (1994):

Anwendung der Sonographie zum direkten Ovulationsnachweis und zur Erhebung zyklischer Ovarbefunde bei der Hündin.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

DOAK, R.L., A. HALL u. H.E. DALE (1967):

Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch.

J. Reprod. Fertil. 13, 51-58

DU, C., M. FANG, Y. LI u. X. WANG (2000):

Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.

Cell 102, 33-42

EARNSHAW, W.C., L.M. MARTINS u. S.H. KAUFMANN (1999):

Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.

Ann. Rev. Biochem. 68, 383-424

ENARI, M., H. SAKAHIRA, H. YOKOYAMA, K. OKAWA, A. IWAMATSU u. S. NAGATA (1998):

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.

Nature 391, 43-50

ENGLAND, G.C.W., W.E. ALLEN u. S.A. BLYTHE (1989):

Variability of the time of calculated luteinising hormone release in 218 canine pregnancies.

Vet. Rec. 125, 624-625

ENGLAND, G. C. W., C. M. BURGESS, S. L. FREEMAN, S. C. SMITH u. A. A. PACEY (2006):

Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch.

Theriogenology 66, 1410-1418

EVANS, H.E. (1993):

Female genital organs.

in: H.E. EVANS u. G.C. CHRISTENSEN (Hrsg.): Miller`s anatomy of the dog.

3. Aufl., Verlag W.B. Saunders, Philadelphia, S. 531-546

FADOK, V.A., D.R. VOELKER, P.A. CAMPELL, J.J. COHEN, D.L. BRATTON u. P.M. HENSON (1992):

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.

J. Immunol. 148, 2207-2216

FADOK, V.A., A. DE CATHELINEAU, D.L. DALEKE, P.M. HENSON u. D.L. BEATTON (2001):

Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts.

J. Biol. Chem. 276, 1071-1077

FELDMAN, E.C. u. R.W. NELSON (1996):
Canine female reproduction: Ovarian cycle and vaginal cytology.
in: E.C. FELDMAN und R.W. NELSON (Hrsg.):
Canine and feline endocrinology and reproduction:
Verlag W.B. Saunders, Philadelphia, S. 526-546

FRESHMAN, J.L. (1991):
Clinical approach to infertility in the cycling bitch.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 3, 427-435

GAVRIELI Y., Y. SHERMAN u. S.A. BEN-SASSON (1992):
Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA
fragmentation.
J. Cell Biol. 119, 493-501

GREEN, D.R. u. J.C. REED (1998):
Mitochondria and apoptosis.
Science 281, 1309-1312

GROSS, A., J.M. McDONNELL u. S.J. KORSMEYER (1999):
Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis.
Genes Dev. 13, 1899-1911

GÜNZEL-APEL, A.-R. (1994):
Die Zuchthündin
in: A.-R. Günzel-Apel (Hrsg.): Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund.
Verlag Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, S. 49-73

GÜNZEL-APEL, A.-R., u. J. DIETERICH (2001):

Follikelreifung, Ovulation, Gelbkörperanbildung im Rahmen der Läufigkeits- und Fertilitätsüberwachung.

in: POULSEN-NAUTRUP, C. u. R. TOBIAS (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. Unveränderte 3. Aufl.

Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, S. 248-257

GÜNZEL, A. R., u. P. KOIVISTO (1984):

Aktuelles zum Sexualzyklus der Hündin - diagnostische Möglichkeiten durch vaginalzytologische Untersuchungen mittels Testsimplets®.

Prakt. Tierarzt 65, 161-172

GÜNZEL-APEL, A.-R., H. SIEME u. H.-O. HOPPEN (1990):

Untersuchungen mit einem „schnellen“ Progesterontest zur Bestimmung des Bedeckungs- und Besamungszeitpunktes beim Hund.

Kleintierpraxis 35, 301-308

HAYER, M. (1991):

Untersuchungen zur sonographischen Darstellbarkeit der Follikelreifung, Ovulation und Gelbkörperanbildung beim Hund.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

HEAPE, W. (1900):

The „sexual season“ of mammals and the relation of the „pro-estrus“ to menstruation.

Quart. J. Microsc. Sci. 44, Part 1, 1-70

zit. nach JÖCHLE, W. (1976)

HEES, H.S. (2000):

Weiblicher Geschlechtsapparat.

in: HEES, H.S., SINOWATZ, F. (Hrsg.): Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 3. Aufl., Deutscher Ärzteverlag, Köln, S. 303-321

HENSON, P.M., D.L. BRATTON u. V.A. FADOK (2001):
Apoptotic cell removal.
Curr. Biol. 11, 795-805

HÖRMANN, E. (1909)
Über das Bindegewebe der weiblichen Geschlechtsorgane.
Arch. Gynaek. 86, 404-433

HOLST, P. A. u. R. D. PHEMISTER (1971):
The prenatal development of the dog: preimplantation events.
Biol. Reprod. 5, 194-206

HOLST, P. A. u. R. D. PHEMISTER (1974):
Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance.
Am. J. Vet. Res. 35, 401-406

HOPPEN, H.-O. (1990):
Endokrinologie des Sexualzyklus der Hündin.
Kleintierpraxis 35, 565-568

HUNTER, R.H.F. (1981):
Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to time of ovulation.
J. Reprod. Fertil. 63, 109-117

HUNTER, R.H.F. (1988):
The Fallopian tubes. Their role in fertility and infertility.
Verlag Springer, Berlin, Heidelberg

HUNTER, R.H.F. (1994):
Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins.
Mol. Reprod. Dev. 39, 176-181

HUNTER, R. H., R. NICHOL u. S. M. CRABTREE (1980):

Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct.

Reprod. Nutr. Dev. 20, 1869-1875

HUNTER, R. H. F., und I. WILMUT (1984):

Sperm transport in the cow - peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct.

Reprod. Nutr. Dev. 24, 597-608

HUNTER, R.H.F., B.FLECHON u. J.E. FLECHON (1987):

Pre- and periovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study.

Tissue and Cell 19, 423-436

HUNTER, R.H.F., B. FLECHON u. J.E. FLECHON (1991):

Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscopy study.

Tissue and Cell 23, 641-656

HURLE, J.M., M.A. ROS, V. CLIMENT u. V. GARCIA-MARTINEZ (1996):

Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo.

Micro. Res. Tech. 34, 236-246.

HURLE, J.M., M.A. ROS, V. GARCIA-MARTINEZ, D. MACIAS u. Y. GANAN (1995):

Cell death in the embryonic developing limb.

Scan. Micro. 9, 519-534.

JÖCHLE, W. (1976):

Neuere Erkenntnisse über die Fortpflanzungsbiologie von Hund und Katze:
Konsequenz für die Östruskontrolle, Konzeptionsverhütung, Abortauslösung und
Therapie.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 83, 564-586

JÖCHLE, W., u. A. C. ANDERSEN (1977):

The estrous cycle in the dog: a review.

Theriogenology 7, 113-140

JÜRGENSMEIER, J.M., Z. XIE, Q. DEVERAUX, L. ELLERBY, D.BREDESEN u. J.C.
REED (1998):

Bax directly induces release of cytochrom c from isolated mitochondria.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4997-5002

KARRE, I. (2008):

Spermienverteilung und –vitalität im Genitale der Hündin im Zeitraum der
postovulatorischen Oozytenreifung.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

KERR, J.F.R., A.H. WYLLIE u. A.R. CURRIE (1972):

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue
kinetics.

Br. J. Cancer 26, 239-257

KERR, J.F.R., C.M. WINTERFORD u. B.V. HARMON (1994):

Morphological criteria for identifying apoptosis.

in. J.E. CELIS (Hrsg.): Cell Biology: A laboratory Handbook.

2. Aufl., Verlag Academic Press, San Diego, S. 319-329

KIDD, V.J. (1998):

Proteolytic activities that mediate apoptosis.

Ann. Rev. Physiol. 60, 533-573

KLICHE, K.O., J.H. CLEMENT u. K. HÖFFKEN (1999):

Apoptose: Mechanismen, Regulation und therapeutische Modulation als klinische Perspektive.

Onkologie 5, 891-897

KLUCK, R.M., E. BOSSY-WETZEL, D.R. GREEN u. D.D. NEWMAYER (1997):

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.

Science 275, 1132-1136

KOCH, T. u. R. BERG (1985):

Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina)

in: BERG, R. (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinäranatomie, Band 2, Eingeweidelehre.

Verlag Gustav Fischer, Jena, S. 312-349

KOOISTRA, H.S., A.C. OKKENS, M.M. BEVERS, C. POPP-SNIJDERS, B. VAN HAFTEN, S.J. DIELEMAN u. J. SCHOEMAKER (1999):

Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches.

Biol. Reprod. 60, 65-71

KROEMER, G., B. DALLAPORTA u. M. RESCHE-RIGON (1998):

The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.

Ann. Rev. Physiol. 60, 619-642.

LAFFON, B., E. PASARO, u. J. MENDEZ (2001):

Effects of styrene-7,8-oxide over p35, p21, bcl-2, and bax expression in human lymphocyte cultures.

Mutagenesis 16, 127-132

LEFEBRE, R., P.J. CHENOWETH, M. DROST, C.T. LeCLEAR, M. MacCUBBIN, J.T. DUTTON u. S.S. SUAREZ (1995):

Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle.

Biol. Reprod. 53, 1066-1074

LEISER, R. (1990): Weibliche Geschlechtsorgane.

in: MOSIMANN, W., KOHLER, K. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Verlag Parey, Berlin, Hamburg S. 232-248

LI, P., D. NIJHAWAN, I. BUDIHARDJO, S.M. SRINIVASULA, M. AHMAD, E.S. ALNEMRI u. X. WANG (1997):

Cytochrom c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.

Cell 91, 479-489

LIEBICH, H.-G. (2003):

Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina).

in: H.-G. LIEBICH (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere.

3. Aufl., Verlag Schattauer, Stuttgart, New York, S. 284-302

LILLIE, R.D. (1951):

Histopathologic technic and practical histochemistry.

The Blakiston Company, New York

LOMBARD, L. (1950):

The morphology of the oviduct of virgin Heifers in relation to the estrous cycle.

J. Morphology 86, 1-15.

LUO, X., I. BUDIHARDJO, H. ZOU, C. SLAUGHTER u. X. WANG (1998):

Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.

Cell 94, 481-490

LYONS, R.A., O. DJAHANBAKHCH, T. MAHMOOD, E. SARIDOGAN, S. SATTARA, M.T. SHEAFF, A.A. NAFTALIN u. R. CHENOY (2002):

Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site.

Hum. Reprod. 17, 584-588.

MAJNO, G. u. I. JORIS (1995):

Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.

Am. J. Pathol. 146, 3-15.

MARZO, I. C. BRENNER u. G. KROEMER (1998):

The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes.

Biomed. Pharmacother. 52, 248-251

McDANIEL, J.W., H.SCALZI u. D.L. BLACK (1968):

Influence of ovarian hormones on histology and histochemistry of the bovine oviduct.

J. Dairy Sci. 51, 754-761

McENTEE, K. (1990):

Reproductive pathology of domestic mammals.

Academic Press, San Diego, New York

MUZIO, M., A.M. CHINNAIYAN, F.C. KISCHKEL, K. O'ROURKE, A. SHEVCHENKO, J. NI, C. SCAFFIDI, J.D. BRETZ, M. ZHANG, R. GENTZ, M. MANN, P.H. KRAMMER, M.E. PETER u. V.M. DIXIT (1996):

FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex.

Cell 85, 817-827

MYERS, R.K., J.E. COOK u. J.E. MOSIER (1984):

Comparative aging changes in canine uterine tubes (oviducts): Electron microscopy.
Am. J. Vet. Res. 10, 2008-2014

NARKAR M., S. KHOLKUTE u. T. NANDEDKAR (2006):

Hormonal regulation of apoptosis in the endometrium of common marmosets
(*Callithrix jacchus*).

Theriogenology 66, 1194-1209

NICHOLSON, D.W. u. N.A. THORNBERRY (1997):

Caspases: killer proteases.

Trends Biochem. Sci. 22, 299-306

NILSSON, O. u. S. REINIUS (1969):

Electron microscopic structure of the oviduct.

in: E.S.E. HAFEZ u. R.J. BLANDAU (Hrsg.): The mammalian oviduct. Comparative
biology and methodology.

The University of Chicago Press, Chicago, London, S. 57-83

NOVAK, E. u. R. SAMPSON (1928):

Diskussion des Beitrags von E. Novak und H.S. Everett: Cyclical and other variations
in the tubal epithelium.

Am. J. Obstet. Gynecol. 16, 499

OBERHAMMER, F.A., K. HOCHEGGER, G. FRÖSCHL, R. TIEFENBACHER u. M.
PAVELKA (1994):

Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin
A+B, without enhanced activation of cdc2 Kinase.

J. Cell. Biol. 126, 827-837

ODOR, D.L., P. GADDUM-ROSSE, R.E. RUMERY u. R.J. BLANDAU (1980):
Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after
estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*.

Anat. Rec. 198, 35-97

ODOR, D.L. u. J.R. AUGUSTINE (1995):

Morphological study of changes in the baboon oviductal epithelium during the
menstrual cycle.

Microsc. Res. Tech. 32, 13-28

OLANO, J.P., D. WOLF, M. KEHERLY u. B.B. GELMAN (1996):

Quantifying apoptosis in banked human brains using flow cytometry.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55, 1164-72

OLSON, A.C., R.A. BOWEN, M.D. BEHRENDT, J.D. OLSON u. T.M. NETT (1982):

Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus,
proestrus and estrus.

Biol. Reprod. 27, 1196-1206

PACEY, A.A., S.L. FREEMAN u. G.C. ENGLAND (2000):

Contact of dog spermatozoa with homologous uterine tube epithelium prolongs
flagellar activity in relation to the stage of the estrous cycle.

Theriogenology 54, 109-118

PALTER, S.F., N. MULAYIM, L. SENTURK u. A. ARICI (2001):

Interleukin-8 in the human fallopian tube.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 2660-2667

PARADIS, M. (1991):

Saisonalität und Variabilität des interestrusintervalls bei der Hündin.

Theriogenology 36, 41-50

PAUERSTEIN, C.J. u. J.D. WOODRUFF (1967):
The role of the „indifferent“ cell of the tubal epithelium.
Am. J. Obstet. Gynec. 98, 121-125

PAUERSTEIN, C.J. u. J.D. WOODRUFF (1967):
The role of the „indifferent“ cell of the tubal epithelium.
Am. J. Obstet. Gynec. 98, 121-125

PAULSMEIER, K. (1998):
Immunhistochemische Untersuchung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im
Urogenitaltrakt der Hündin.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

PETRUNKINA A.M., K. SIMON, A.R. GÜNZEL-APEL, E. TÖPFER-PETERSEN
(2003):
Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous
oviductal epithelial cells.
Reprod. Dom. Anim. 38, 455-463

PETRUNKINA, A. M., R. GEHLHAAR, W. DROMMER, D. WABERSKI u. E.
TÖPFERPETERSEN (2001):
Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro.
Reproduction 121, 889-896

RAO, L., D. PEREZ u. E. WHITE (1996):
Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis.
J. Cell. Biol. 135, 1441-1455

RIJSSELAERE, T., A. V. SOOM, S. V. CRUCHTEN, M. CORYN, K. GÖRTZ, D. MAES u. A. DeKRUIF (2004):

Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation.

Reproduction 128, 801-811

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., L. NICANDER, S. VIRING, S. EINARSSON, u. K. LARSSON (1990):

Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs.

Anat. Histol. Embryol. 19, 16-36

ROY, S. u. D.W. NICHOLSON (2000):

Cross-talk in cell death signalling.

J. Exp. Med. 192, 21-25

SAMALI, A., A.M. GORMAN u. T.G. COTTER (1996):

Apoptosis – the story so far.

Experientia 52, 933-941

SARASTE, A. u. K. PULKKI (2000):

Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.

Cardiovasc. Res. 45, 528-537

SATO T., Y. FUKAZAWA, H. KOJIMA, E. MASATO, T. IGUCHI u. Y. OHTA (1997):

Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.

Anat. Rec. 248, 76-83

SAWYER, H.R., P.N. OLSON u. T.A. GORELL (1984):

Effects of progesterone on the oviductal epithelium in estrogen-primed prepubertal beagles: light and electron microscopic observations.

Am. J. Anat. 169, 75-87

SCHAFFER, J. (1908):

Über Bau und Funktion des Eileiterepithels beim Menschen und bei Säugetieren.

Monatsschr. Geburtsh. Gynaek. 28, 526-542

SCHAPER, J., S. LORENZ-MEYER u. S. SUZUKI (1999):

The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy.

Herz 24, 219-224

SCHUMMER, A. u. B. VOLLMERHAUS (1995):

Harn und Geschlechtsapparat

In: NICKEL, R., A. SCHUMMER u. E. SEIFERLE (1995)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, 7. unveränderte Auflage, Band II Eingeweide

Blackwell Wissenschafts-Verlag, S. 300-420

SCOTT, M. A., D. D. VARNER, I. K. M. LIU u. A. C. ENDERS (2002):

Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy.

Theriogenology 58, 639-642

SHILLE, V.M., G.H. STABENFELDT u. A.C. ANDERSEN (1974):

The estrous cycle of the bitch.

Canine practice 1, 29-36

SHILLE, V.M., M.J. THATCHER, M.L. LLOYD, D.D. MILLER, D.F. SEYFERT u. J.D. SHERROD (1989):

Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 39, 103-113

SIMON, K. (2002):

In vitro Untersuchungen zur Kapazitation caniner Spermien und deren Regulation durch das Ovidukt.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SMITH, C.A., T. FARRAH u. R.G. GOODWIN (1994):

The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death.

Cell 76, 959-962

SMOLLICH, A. (1992):

Weibliches Geschlechtssystem.

in: A. SMOLLICH u. G. MICHEL (Hrsg.): Mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.

Verlag Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, S. 281-273

SRINIVASULA, S.M., M. AHMAD, T. FERNANDES-ALNEMRI u. E.S. ALNEMRI (1998):

Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization.

Mol. Cell 1, 949-957

STADELMANN, C. u. H. LASSMANN (2000):

Detection of apoptosis in tissue sections.

Cell Tissue Res 301, 19-31

STEFFL, M., M. SCHWEIGER, T.SUGIYAMA u. W.M. AMSELGRUBER (2008):#

Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct.

Ann. Anat. 190, 46-52

STEINHAUER, N. (2002):

Histomorphologische und immunhistochemische (K-67) Untersuchungen am Oberflächenepithel des Ovidukts im Zyklusverlauf der Hündin.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

STEINHAUER N., A. BOOS u. A.R. GÜNZEL-APEL (2004):

Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch.

Reprod. Dom. Anim. 39, 110-119

STRASSER, A., L. O'CONNOR u. V.M. DIXIT (2000):

Apoptosis Signaling.

Ann. Rev. Biochem. 69, 217-245

SUAREZ, S.S. (1998):

The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation.

Biol. Reprod. 58, 1105-1107

SUDA, T. u. S. NAGATA (1994):

Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis.

J. Exp. Med. 179, 873-879

SUSIN, S.A., H.K. LORENZO, N. ZAMZAMI, I. MARZO, B.E. SNOW, G.M. BROTHERS, J. MANGION, E. JACOTOT, P. COSTANTINI, M. LOEFFLER, N. LAROCLETTE, D.R. GOODLETT, R. AEBERSOLD, D.P. SIDEROVSKI, J.M. PENNINGER u. G. KROEMER (1999):

Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.

Nature 397, 441-446

TAKAHASHI, A., E.S. ALNEMRI, Y.A. LAZEBNIK, T. FERNANDES-ALNEMRI, G. LITWACK, R.D. MOIR, R.D. GOLDMANN, G.G. POIRIER, S.H. KAUFMANN u. W.C. EARNSHAW (1996):

Cleavage of lamin A by Mch2a but not CPP32: Multiple interleukin 1b-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 8395-8400

TANG, D. u. V.J. KIDD (1998):

Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis.

J. Biol. Chem. 273, 28549-28552

TEDOR, J.B. u. J.D. REIF (1978):

Natal patterns among registered dogs in the United States.

J. Am. Vet. Assoc. 172, 1179-1185

THORNBERRY, N.A. u. Y. LAZEBNIK (1998):

Caspases: enemies within.

Science 281, 1312-1316

TÖPFER-PETERSEN, E. u. D. WABERSKI (2001):

Spermienreifung und Befruchtung

In: BUSCH, W u. A. HOLZMANN (Hrsg.):

Veterinärmedizinische Andrologie

Verlag Schattauer, Stuttgart, New York, S. 67-80

TÖPFER-PETERSEN, E., A. PETRUNKINA, M. EHKLASI-HUNDRIESER u. D. WABERSKI (2003):

Funktion des weiblichen Spermienreservoirs beim Säugetier.

Reproduktionsmedizin 19, 173-180

VAN CRUCHTEN S., W. VAN DEN BROEK, L. DUCHATEAU u. P. SIMOENS (2003):

Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle.

Theriogenology 60, 1595-1608

VERHAGE, H.G., J.H. ABEL jr., W.J. TIETZ jr. u. M.D. BARRAU (1973a):

Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch.

Biol. Reprod. 9, 460-474

VERHAGE, H.G., J.H. ABEL jr., W.J. TIETZ jr. u. M.D. BARRAU (1973b):

Estrogen-induced differentiation of the oviductal epithelium in prepubertal dogs.

Biol. Reprod. 9, 475-488

VERHAGE, H.G., M.L. BAREITHER, R.C. JAFFE u. M. AKBAR (1979):

Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women.

Am. J. Anat. 156, 505-521

VERHAGE, H.G., P.A. MAVROGIANIS, M.L. BOICE, W. LI u. A.T. FAZLEABAS (1990):

Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins.

Am. J. Anat. 187, 81-90

VERHAGEN, A.M., P.G. EKERT, M. PAKUSCH, J. SILKE, L.M. CONNOLLY, G.E. REID, R.L. MORITZ, R.J. SIMPSON u. D.L. VAUX (2000):

Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.

Cell 102, 43-53

VERSTEGEN, J., K. ONCLIN, L.SILVA u. P. CONCANNON (1999):

Termination of obligate anestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH.

J. Reprod. Fertil. 111, 35-40

VOLL, R.E., M. HERRMANN, E.A. ROTH, C. STACH, J.R. KALDEN u. I. GIRKONTAITE (1997):

Immunosuppressive effects of apoptotic cells.

Nature 390, 350-351

WALL, N.R., R.M. MOHAMMAD u. A.M. AL-KATIB (1999):

Bax-Bcl-2 ratio modulation by bryostatin 1 and novel antitubulin agents is important for susceptibility to drug induced apoptosis in human early Pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line.

Reh. Leuk. Res. 23, 881-888

WILCOCK, C. u. J.A. HICKMAN (1988):

Characterisation of a Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter in alkylating agent-sensitive L1210 murine leukemia cells.

Biochim. Biophys. Acta 946, 359-369

WILDT, D.E., W.B. PANKO, P.K. CHAKRABORTY u. S.W.J. SEAGER (1979):

Relationship of serum estrone, estradiol 17- β and progesterone to LH, sexual behaviour and time of ovulation in the bitch.

Biol. Reprod. 20, 648-658

WYLLIE, A.H. (1981):

Chromatin changes in apoptosis.

Histochem. J. 13, 681-692

WYLLIE, A.H., J.F. KERR u. A.R. CURRIE (1980):

Cell death: The significance of apoptosis.

Int. Rev. Cytol. 68, 251-306

ZAMZAMI, N., S.A. SUSIN, P. MARCHETTI, T. HIRSCH, I. GOMEZ-MONTERREY,
M. CASTEDO u. M. KROEMER (1996):

Mitochondrial control of nuclear apoptosis.

J Exp Med. 183, 1533-1544.

ZEROBIN, K. (1987):

Physiologie der Fortpflanzung.

in: SCHEUNERT, A. und TRAUTMANN, A. (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-
Physiologie.

Verlag Parey, Berlin und Hamburg, S. 478-521

ZORATTI, N. u. I. SZABO (1995):

The mitochondrial permeability transition.

Biochim. Biophys. Acta 1241, 139-176.

ZOU, H., Y. LI, X. LIU u. X. WANG (1999):

An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that
activates procaspase-9.

J Biol Chem 274, 11549-11556.

Anhang A

1. Lösungen und Puffer

Citratpuffer (pH 6)

2,1 g Citronensäuremonohydrat ad 1000 ml Aqua dest.,
pH-Wert mit 1 N NaOH auf 6,0 einstellen

Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung (PBS)

5000 ml Aqua dest.
40 g Natriumchlorid (Fluka, Buchs, Schweiz)
7,8 g Natriumhydrogenphosphat wasserfrei (Fluka, Buchs, Schweiz) mit ca.
50 ml 1 N NaOH auf pH 7,2 einstellen

Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz (ABC-Reagenz)

15 µl Reagenz A in
1000 µl PBS lösen
15 µl Reagenz B hinzufügen, mischen
Lösung 30 Min. vor Gebrauch ansetzen
Inkubation 30 Min. bei Raumtemperatur

Diaminobenzidin-Tetrahydrochloruiddihydrat (DAB)

Stammlösung:

100 mg 3,3'-DAB (Fluka, Buchs, Schweiz) in
50 ml PBS-Puffer unter Lichtausschluss lösen;
Lösung 20 Min. lang rühren und bei -2°C einfrieren

Gebrauchslösung:

50 ml DAB-Stammlösung in
150 ml PBS (pH 7,2) lösen; durch zwei Filterpapiere filtrieren; Zugabe von
2 ml 3%iger H₂O₂-Lösung
Endkonzentration 0,05% DAB

Hämalaun-Eosin (H.E.) Färbung

Entparaffinisieren der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe beginnend mit Xylol (3x je) 5 Min., Isopropanol 5 Min., dann 96%iges, 70%iges und 50%iges

Ethanol je 2-3 Min., dann Aqua dest.,

15 Min. in Hämalaun nach P. Mayer,

10 Min. Bläuen in Leitungswasser,

in Aqua dest. Spülen,

1 Min. in 1%igem Eosin nach Zugabe von 1 Tropfen Eisessig pro Küvette

in Aqua dest. spülen

Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe beginnend mit 70%igem, dann 96% 2-3 min., Isopropanol 5 Min., Xylol (3x je) 5 Min.

Eindecken in Roti-Histokitt (Eindeckmittel Rotihisto-Kitt, Fa. Roth C. GmbH)

Lösungen für die HE-Färbung

Hämalaun nach P. Mayer:

1g Hämatoxylin in 1000 ml A. dest lösen,

0,2 g Natriumjodat,

50 g chemisch reines Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat-12-sulfat) dazugeben und erwärmen;

nach dem Erkalten: 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure dazugeben, kalt lösen; filtrieren;

Eosin:

0,1 % in Aqua dest. lösen;

Nach dem Erkalten filtrieren;

Zum Färben auf 100 ml 1% iges Eosin 2 Tropfen Eisessig geben

2. Bezugsquellen für Reagenzien und Antikörper

Cell Signaling, Danvers, USA

Caspase 3-Antikörper, polyklonal Kaninchen-anti-aktivierte Caspase 3, 9661

Chemicon[®] International, Ltd., Hampshire, United Kingdom

ApopTag[®] Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101

Fluka Chemika, Buchs, Schweiz

Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat, DAB, 32750

Quartett Immunodiagnostica und Biotechnologie GmbH, Berlin

Citratpuffer-Konzentrat, pH 6.0, 400300692

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Citronensäure-Monohydrat, 3958.1

Chloralhydrat

Essigsäure-n-butylester, 4600.4

Hämalaunlösung nach Mayer, T865.1

Hämatoxylin, 3816.2

Natriumjodat p.a.

Roti[®]-Histokitt, 6638.1

Roticlear[®], A538.3

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (ehemals Sigma, Fluka, Riedel de Haën)

Bovines Serumalbumin (BSA), A-3059

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Dihydrat purum (DAB) p.a., 32750

Kaninchenserum, R4505

Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, über Biologo, Kronshagen

Biotiniliertes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin, GAR-b IgG (H+L) BA 1000

ABC-Reagenz, PK 6100

Merck KGaA, Darmstadt

Wasserstoffperoxid 30% H₂O₂ (Perhydrol®), 107209

3. Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg

Binokular Mikroskop, MBL 2000

Bauknecht Hausgeräte G

Mikrowelle, MWS 2924

IKA_Werke GmbH & Co.KG, Staufen

Magnetrührer, Typ REO

Menzel-Gläser, Glasaufbereitungswerke, GmbH & Co KG, Braunschweig

Superfrost®Plus Objektträger, 041300

Thermo Electron GmbH, Dreieich (ehemals Shandon)

Shandon Coverplates™, 72110013

Shandon Sequenza®-Slide racks, 7331017

Paraplast Plus®

Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch

Färbegerät Leica, ST 4040

Medite Medizintechnik, Burgdorf

Objektträger-Eindeckautomat Promounter, RCM 2000

W. Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig

Deckgläser (24 x 50 mm)

Engelbrecht, Edermünde

Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Warmwasserbad für paraffinierte Gewebeschnitte

Heraeus GmbH, Hanau

Wärmeschrank 5042

Microm International GmbH, Walldorf

Rotationsmikrotom

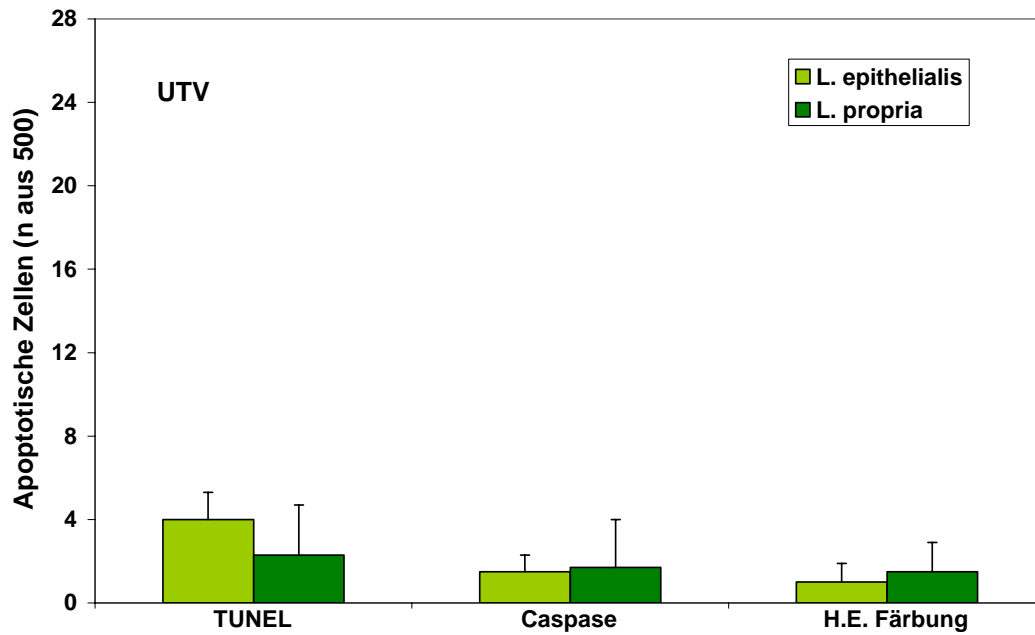
Anhang B Abbildungen

Abb.14 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria der uterotubalen Verbindung im **Anöstrus** ($p > 0,05$).

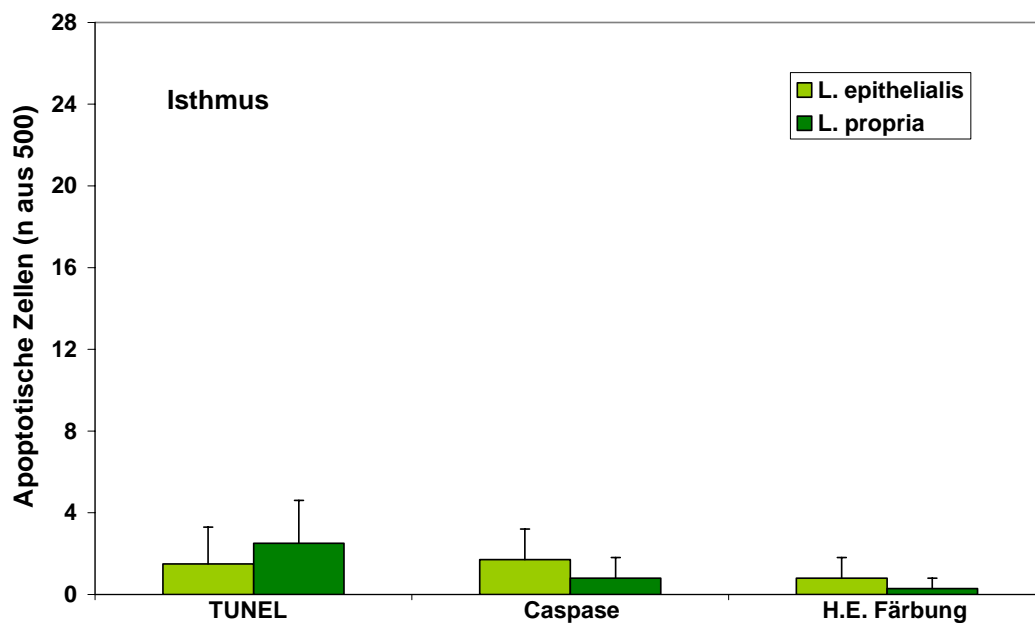


Abb.15 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und der L. propria des Eileiteristhmus im **Anöstrus** ($p > 0,05$).

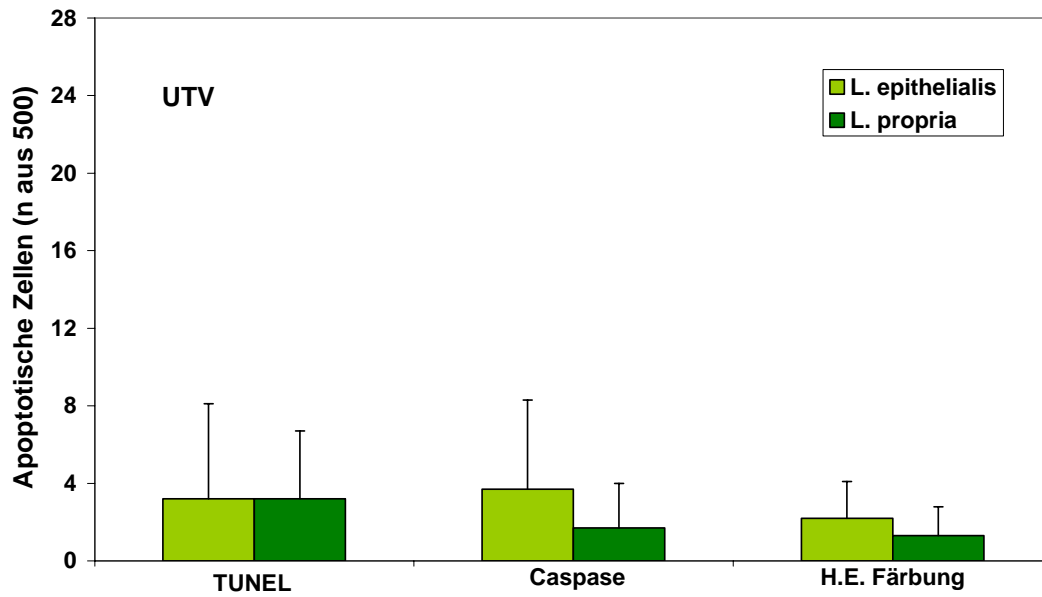


Abb.16 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und L. propria der uterotubalen Verbindung in der **frühen Follikelphase** ($p > 0,05$)

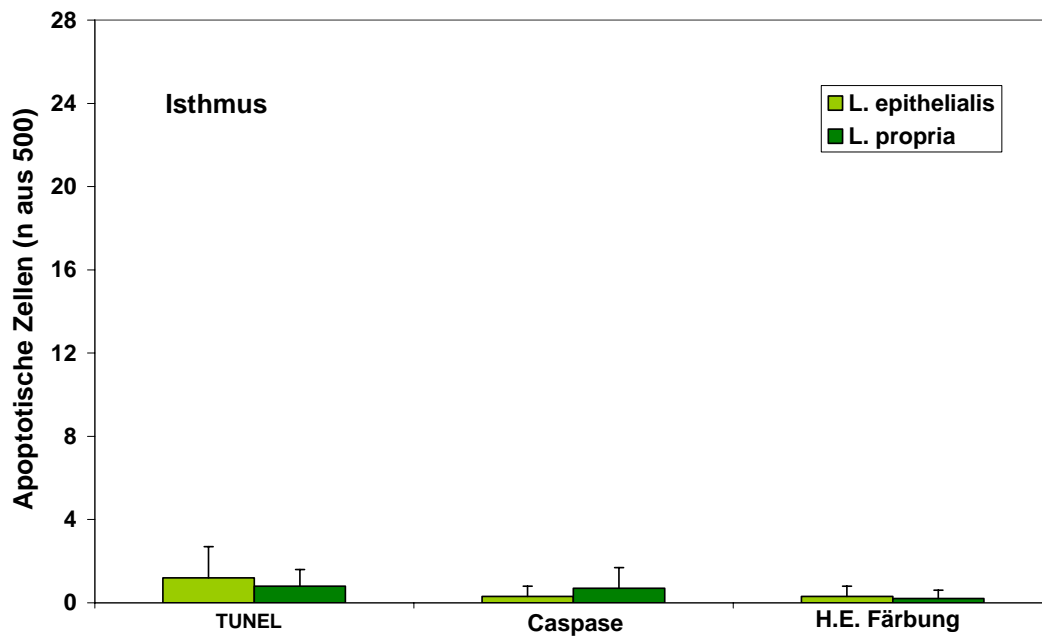


Abb.17 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und L. propria des Eileiteristhmus in der **frühen Follikelphase** ($p > 0,05$)

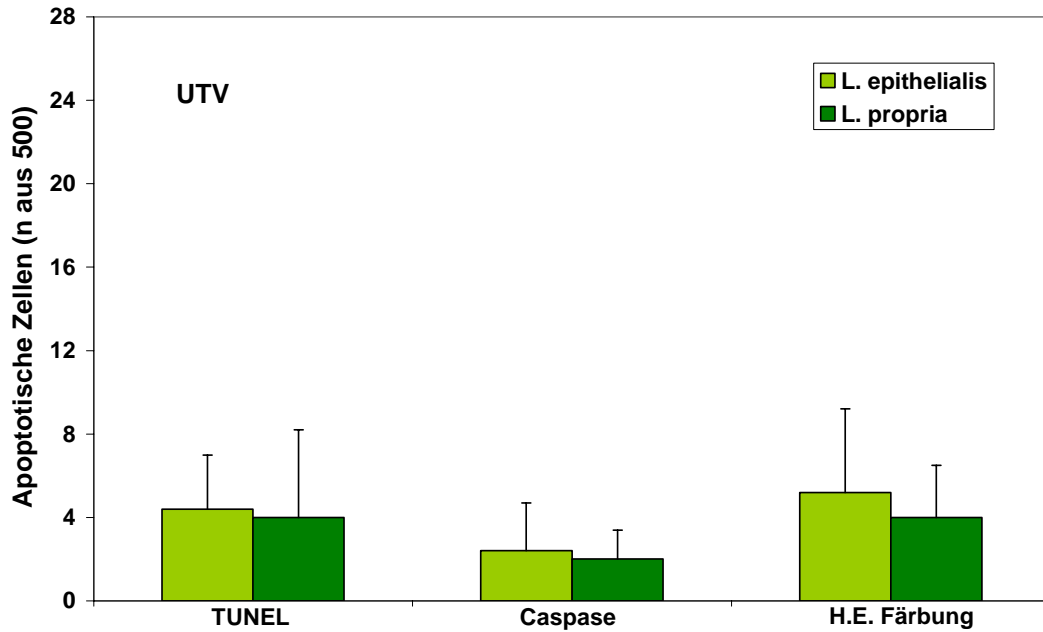


Abb.18 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria deUTV in der **späten Follikelphase** ($p > 0,05$)

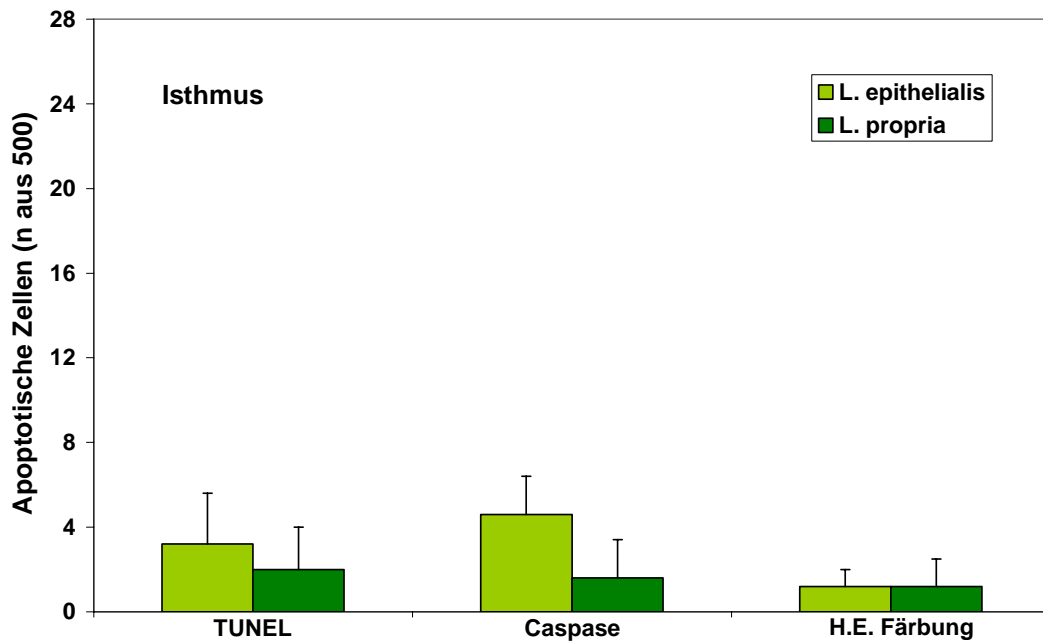


Abb.19 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria des Eileiteristhmus in der **späten Follikelphase** ($p > 0,05$)

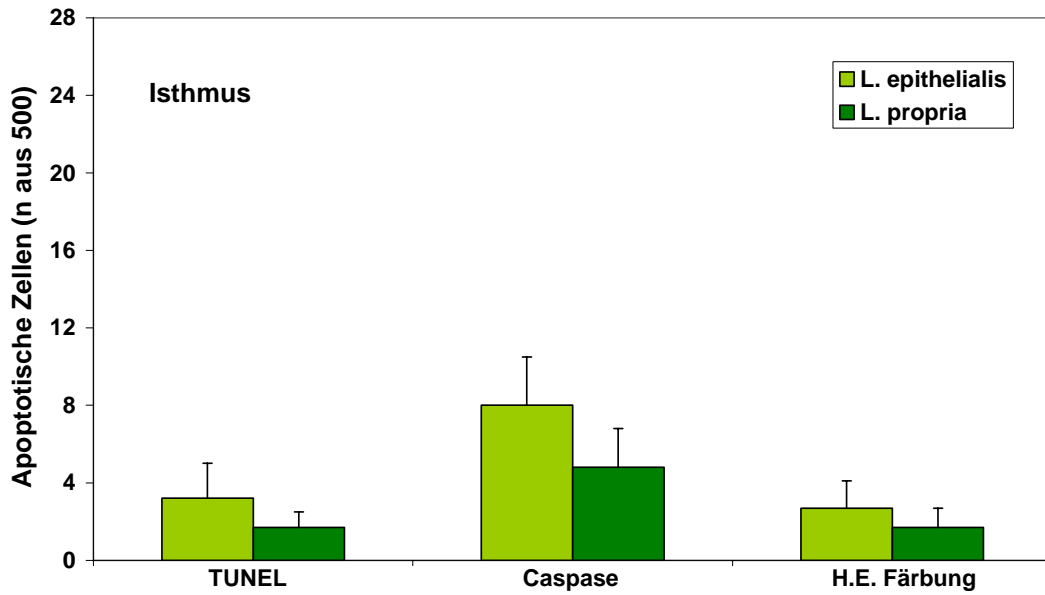


Abb.20 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria im Eileiteristhmus **4 Tage post ov.** ($p > 0,05$)

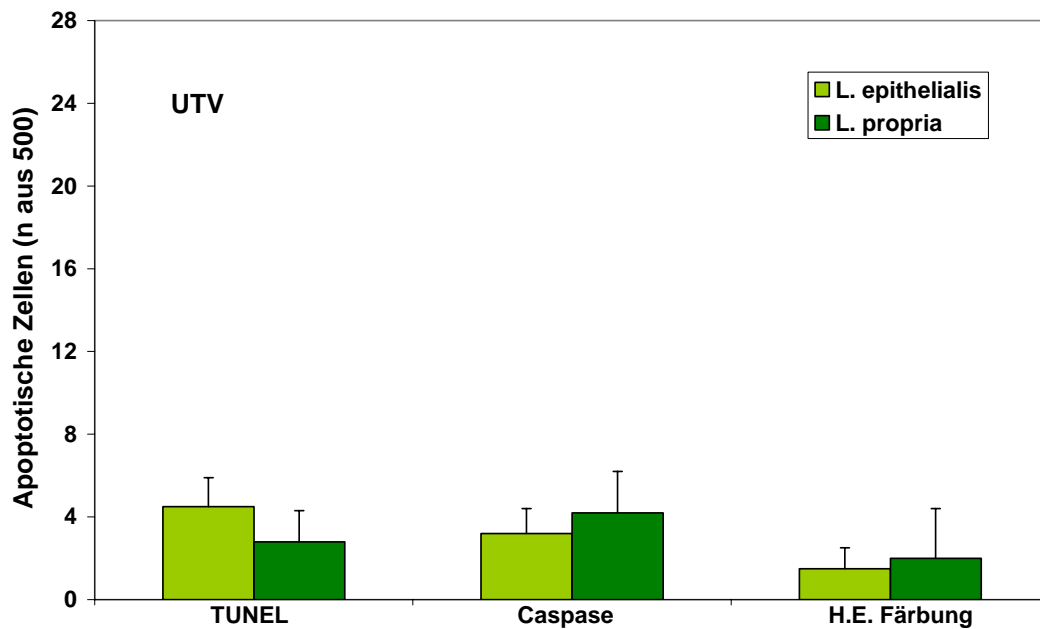


Abb.21 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria der uterotubalen Verbindung in der **Endometriumsreparation** ($p > 0,05$)

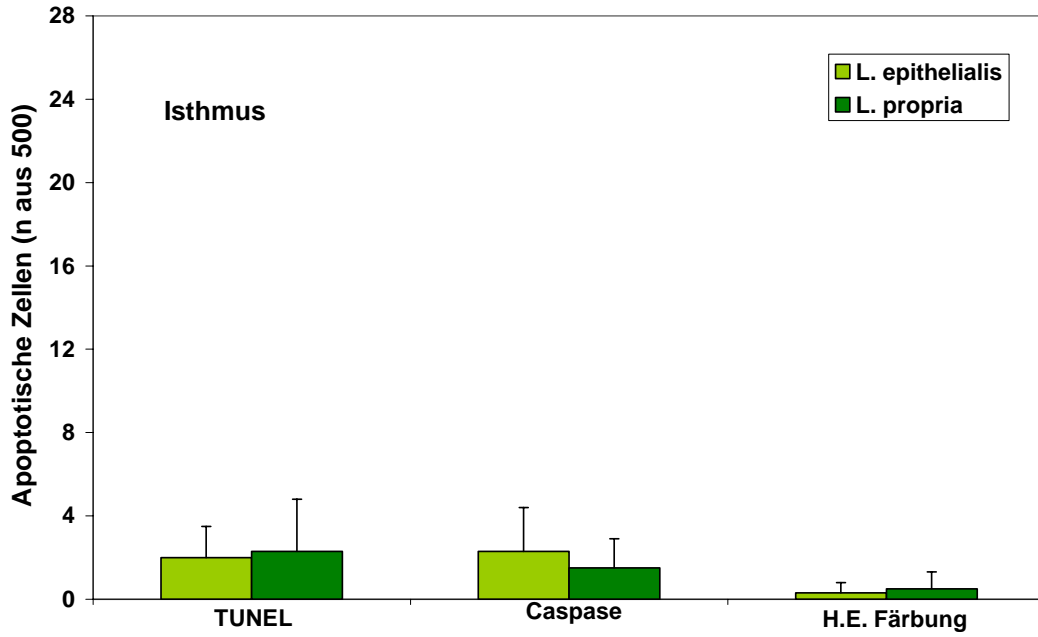


Abb.22 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der L. epithelialis und der L. propria des Eileiteristhmus in der **Endometriumsreparation** ($p > 0,05$)

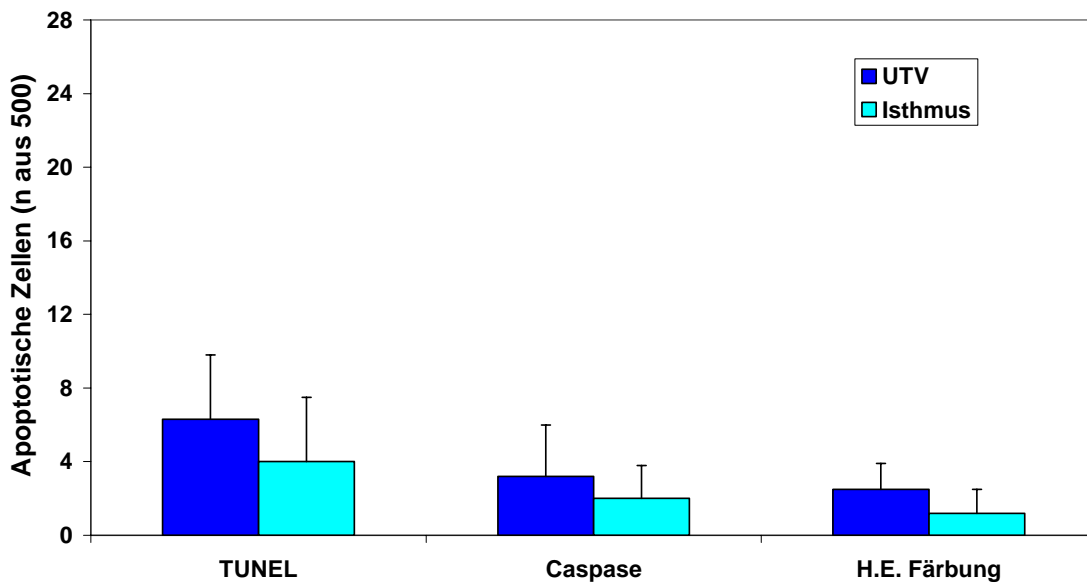


Abb.23 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus im **Anöstrus** (L. epithelialis und L. propria) ($p > 0,05$)

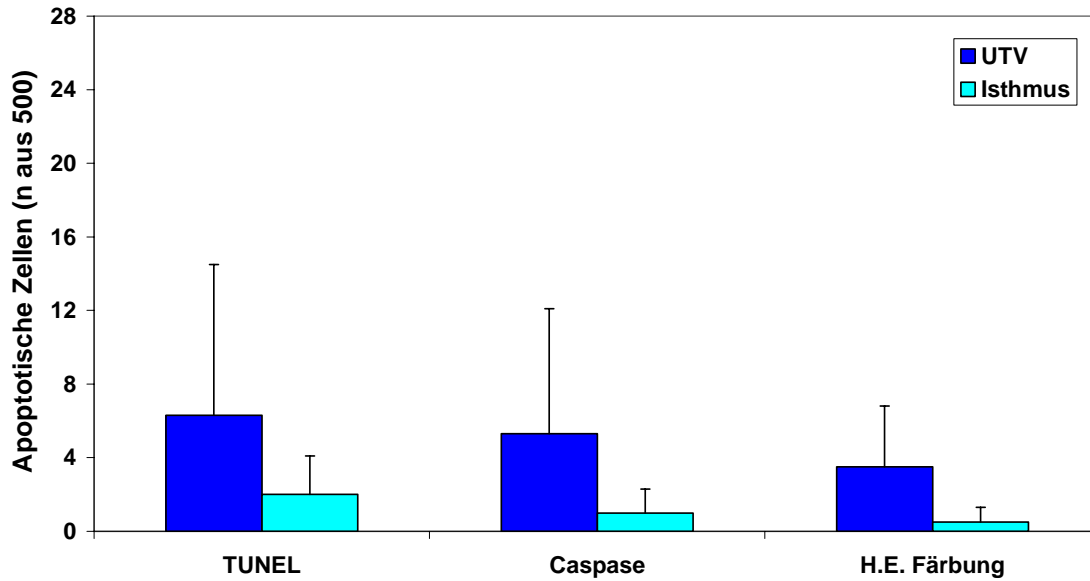


Abb.24 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotische Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus in der **frühen Follikelphase** (L. epithialis und L. propria) ($p > 0,05$).

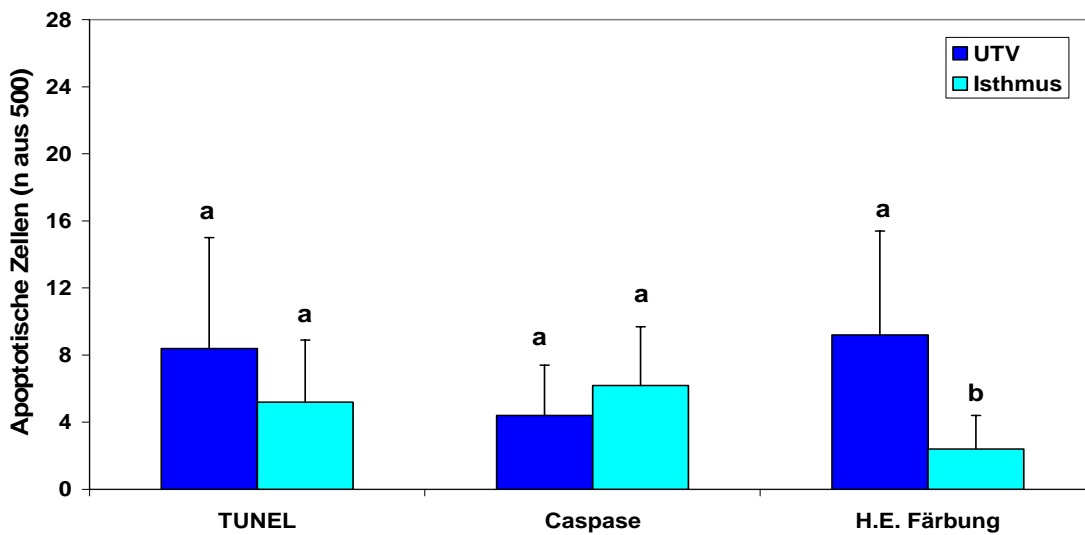


Abb.25 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus in der **späten Follikelphase** (L. epithialis und L. propria). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Organlokalisationen ($p < 0,05$).

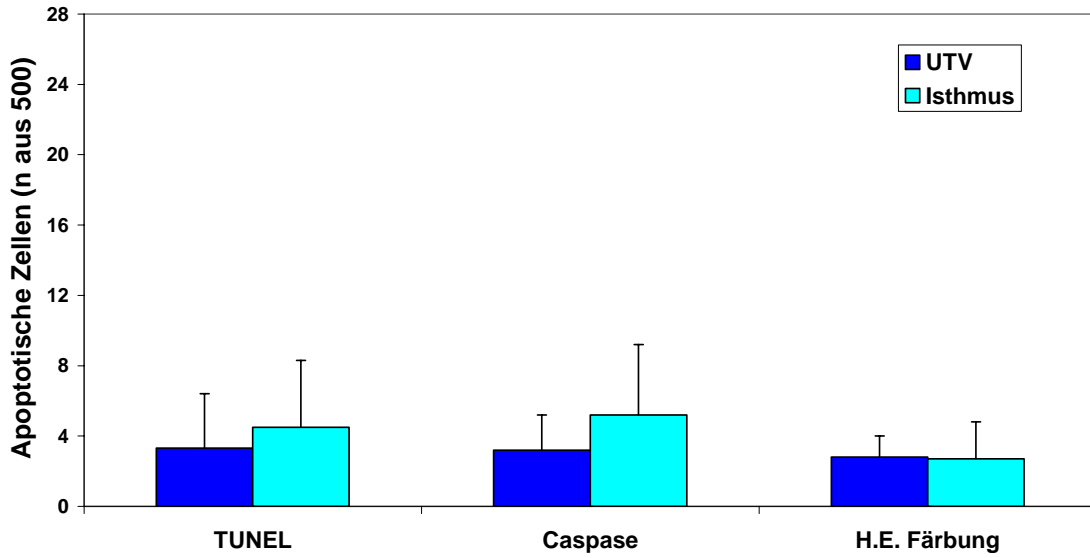


Abb.26 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus **2 Tage post ov.** (L. epithialis und L. propria) ($p > 0,05$)

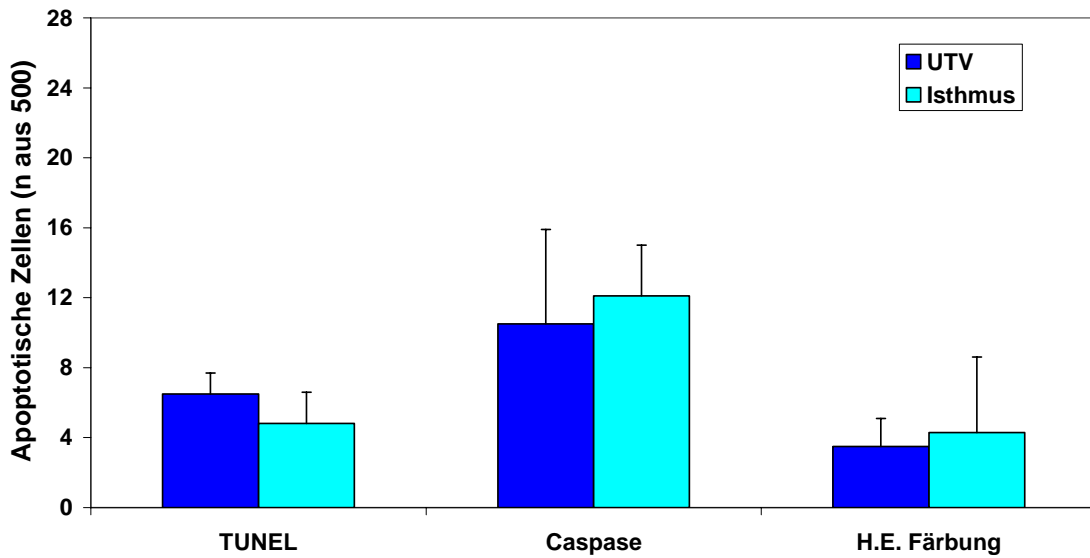


Abb.27 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus **4 Tage post ov.** (L. epithialis und L. propria) ($p > 0,05$)

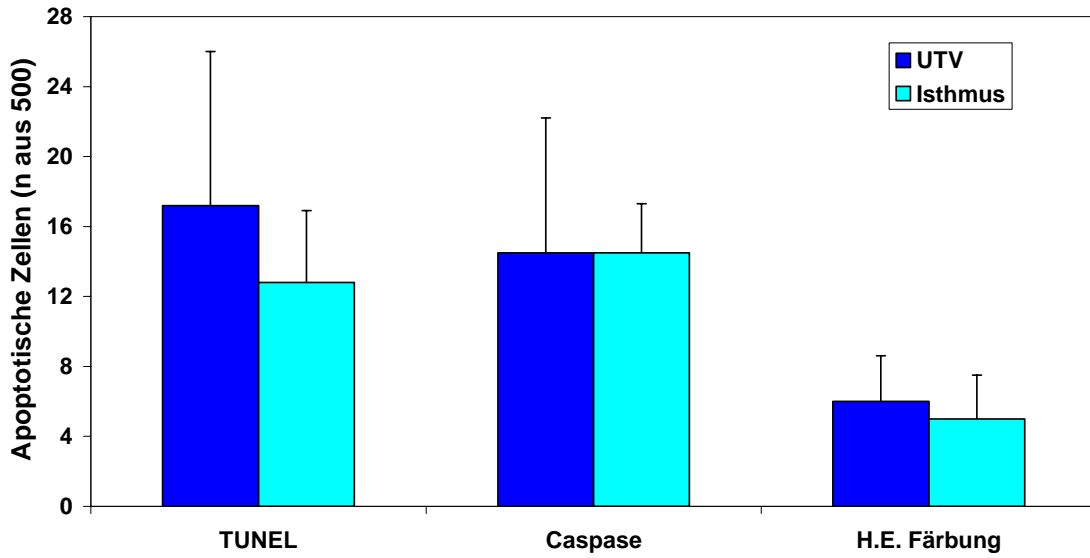


Abb.28 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus in der **Gelbkörperphase** (L. epithelialis und L. propria) ($p > 0,05$)

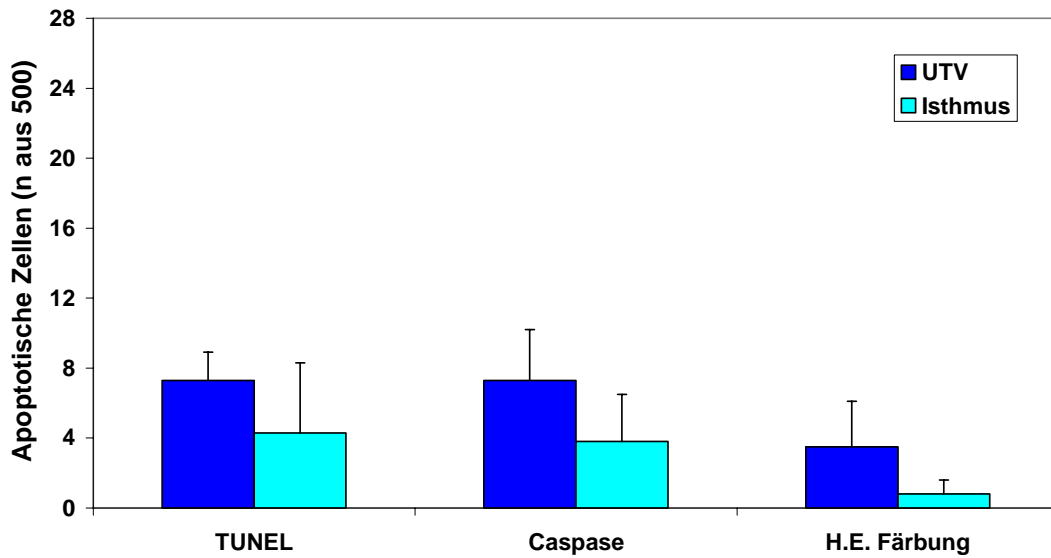


Abb.39 Anzahl ($\bar{X} \pm SD$) apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und dem Eileiteristhmus in der **Endometriumsreparation** (L. epithelialis und L. propria) ($p > 0,05$)

Anhang C Tabellen

Tab.2

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV in allen Zyklusphasen

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	5,2	4,8	0	26	2,7	2,5	0	7
Caspase	4,7	4,6	0	18	2,3	2,3	0	8
H.E. Färbung	2,7	2,3	0	12	1,7	1,8	0	8

Tab.3

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria des Isthmus in allen Zyklusphasen

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	3,3	3,3	0	12	2,1	1,9	0	7
Caspase	4,5	4,1	0	14	2	2	0	6
H.E. Färbung	1,6	1,7	0	7	0,8	1	0	3

Tab.4

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV im Anöstrus

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	4	1,3	2	5	2,3	2,4	0	6
Caspase	1,5	0,8	0	2	1,7	2,3	0	5
H.E. Färbung	1	0,9	0	2	1,5	1,4	0	3

Tab.5

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria des Isthmus im Anöstrus

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	1,5	1,8	0	4	2,5	2,1	0	6
Caspase	1,7	1,5	0	4	0,8	1	0	2
H.E. Färbung	0,8	1	0	2	0,3	0,5	0	1

Tab.6

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV in der frühen Follikelphase

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	3,2	4,9	0	13	3,2	3,5	0	10
Caspase	3,7	4,6	1	13	1,7	2,3	0	6
H.E. Färbung	2,2	1,9	1	6	1,3	1,5	0	4

Tab.7

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria des Isthmus in der frühen Follikelphase

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	1,2	1,5	0	4	0,8	0,8	0	2
Caspase	0,3	0,5	0	1	0,7	1	0	2
H.E. Färbung	0,3	0,5	0	1	0,2	0,4	0	1

Tab.8

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV in der späten Follikelphase

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	4,4	2,6	2	8	4	4,2	0	11
Caspase	2,4	2,3	0	5	2	1,4	0	3
H.E. Färbung	5,2	4	2	12	4	2,5	2	8

Tab.9

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria des Isthmus in der späten Follikelphase

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	3,2	2,4	1	7	2	2	0	4
Caspase	4,6	1,8	3	7	1,6	1,8	0	4
H.E. Färbung	1,2	0,8	0	2	1,2	1,3	0	3

Tab.10

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV 2 Tage post ov.

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	2	1,7	0	4	1,3	1,6	0	4
Caspase	2,5	2,1	0	6	0,7	1,2	0	3
H.E. Färbung	2,2	1,2	1	4	0,7	0,5	0	1

Tab.11

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria des Isthmus 2 Tage post ov.

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	2,7	3,3	0	9	1,8	2,2	0	6
Caspase	4,3	3,6	1	10	0,8	0,8	0	2
H.E. Färbung	1,8	1,6	0	4	0,8	0,8	0	2

Tab.12

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV 4 Tage post ov.

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	4,8	1	4	6	1,7	0,5	1	2
Caspase	8,2	4,7	1	13	2,3	1,4	0	4
H.E. Färbung	2,7	1	1	4	0,8	1,2	0	3

Tab.13

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L.epithelialis und L.propria des Isthmus 4 Tage post ov.

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	3,2	1,8	0	5	1,7	0,8	0	2
Caspase	8	2,5	5	12	4,8	2	3	7
H.E. Färbung	2,7	1,4	1	4	1,7	1	0	3

Tab.14

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV in der Gelbkörperphase

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	13,3	6,9	6	26	3,8	2	1	7
Caspase	11,2	4,7	7	18	3,3	3,6	0	8
H.E. Färbung	4,3	2,3	2	7	1,7	1,4	0	3

Tab.15

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der Isthmus in der Gelbkörperphase

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	9,3	2,5	6	12	3,5	2,3	1	7
Caspase	10,7	2,3	8	14	3,8	1,5	2	6
H.E. Färbung	4	1,5	3	7	1	1,1	0	3

Tab.16

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria der UTV in der Endometriumsreparation

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	4,5	1,4	2	6	2,8	1,5	0	4
Caspase	3,2	1,2	2	5	4,2	2	2	7
H.E. Färbung	1,5	1	0	3	2	2,4	0	6

Tab.17

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweisverfahren in der L. epithelialis und L. propria des Isthmus in der Endometriumsreparation

	L. epithelialis				L. propria			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	2	1,5	1	5	2,3	2,5	0	7
Caspase	2,3	2,1	0	6	1,5	1,4	0	3
H.E. Färbung	0,3	0,5	0	1	0,5	0,8	0	2

Tab.18

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) in allen Zyklusphasen

	UTV				Eileiteristhmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	7,9	6,5	0,0	33,0	5,4	4,5	0,0	19,0
Caspase	7,0	6,0	0,0	26,0	6,5	5,6	0,0	20,0
H.E. Färbung	4,3	3,5	1,0	20,0	2,4	2,2	0,0	10,0

Tab. 19

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L epithelialis und L. propria) im Anöstrus

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	6,3	3,5	2,0	11,0	4,0	3,5	0,0	9,0
Caspase	3,2	2,8	0,0	7,0	2,0	1,8	0,0	5,0
H.E. Färbung	2,5	1,4	1,0	4,0	1,2	1,3	0,0	3,0

Tab. 20

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) in der frühen Follikelphase

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	6,3	8,2	2,00	23,0	2,0	2,1	0,0	6,0
Caspase	5,3	6,8	1,00	19,0	1,0	1,3	0,0	3,0
H.E. Färbung	3,5	3,3	1,00	10,0	0,5	0,8	0,0	2,0

Tab. 21

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) in der späten Follikelphase

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	8,4	6,6	2,0	19,0	5,2	3,7	1,0	11,0
Caspase	4,4	3,0	0,0	8,0	6,2	3,5	3,0	10,0
H.E. Färbung	9,2	6,2	4,0	20,0	2,4	2,0	0,0	3,0

Tab. 22

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) 2 Tage post ov.

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	3,3	3,0	0,0	8,0	4,5	3,8	0,0	11,0
Caspase	3,2	2,0	1,0	6,0	5,2	3,9	1,0	11,0
H.E. Färbung	2,8	1,2	1,0	4,0	2,7	2,1	0,0	6,0

Tab. 23

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) 4 Tage post ov.

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	6,5	1,2	5,0	8,0	4,8	1,8	2,0	7,0
Caspase	10,5	5,4	3,0	16,0	12,8	2,9	9,0	16,0
H.E. Färbung	3,5	1,6	1,0	6,0	4,8	1,2	3,0	6,0

Tab. 24

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) in der Gelbkörperphase

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	17,2	8,8	7,0	33,0	12,8	4,1	7,0	19,0
Caspase	14,5	7,7	7,0	26,0	14,5	2,9	12,0	20,0
H.E. Färbung	6,0	2,6	2,0	9,0	5,0	2,5	3,0	10,0

Tab. 25

Anzahl apoptotischer Zellen bei Anwendung verschiedener Nachweismethoden in der uterotubalen Verbindung und im Eileiteristhmus (L. epithelialis und L. propria) in der Endometriumsreparation

	UTV				Isthmus			
	MW	SD	Min	Max	MW	SD	Min	Max
TUNEL	7,3	1,6	5,0	9,0	4,3	4,0	1,0	12,0
Caspase	7,3	2,9	5,0	12,0	3,8	2,7	2,0	9,0
H.E. Färbung	3,5	2,6	1,0	7,0	0,8	0,8	0,0	2,0

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Anne-Rose Günzel-Apel danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und ihre wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung. Neben ihrer Erfahrung waren ihre herzliche und motivierende Art sowie ihre unerschütterliche Geduld für das Gelingen dieser Arbeit unersetzlich. Ich danke Ihnen für das mir entgegengebrachte Vertrauen und Ihre stetige Förderung!

Prof. Dr. Andreas Beinecke aus dem Institut für Pathologie danke ich für die umfassende, immer hilfsbereite Betreuung und die fachliche Beratung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die wertvollen Ratschläge zur Auswertung der Präparate.

Ein herzliches Dankeschön gilt Petra Grünig aus dem Institut für Pathologie für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Präparate, ebenso Bettina Bunck für die hilfsbereite und geduldige Unterweisung und Unterstützung am Mikrotom.

Herrn Dr. Martin Beyerbach aus dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung danke ich für die großzügige und kompetente Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Meinen Kolleginnen und Freundinnen Christine Masal und Karola Wolf gebührt an dieser Stelle ein ganz besonderer Dank. Eure Selbstlosigkeit und unermüdliche Energie, mit der ihr mir besonders in der letzten Phase der Doktorarbeit in so vielen Bereichen den Rücken freigehalten habt, war mir eine große Hilfe. Ihr seid das beste Team, das man sich wünschen kann!

Ein ganz großes und herzliches Dankeschön an Heiko Henning und Susanne Schmid für ihre Hilfe bei der Statistik. Ohne euch wäre ich oft verzweifelt. Jutta Klewitz danke ich herzlich für ihre Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit und den großzügig verteilten Feenstaub.

Heiko, vielen Dank für die vielen fachlichen und lustigen nicht fachlichen Diskussionen in unserem Büro und deine moralische Unterstützung, besonders in der letzten Phase unserer Doktorarbeiten. Geteiltes Leid, ist halbes Leid.

Rabenhorst forever!

Ein großes Dankeschön auch an **alle** Mitarbeiter der Reproduktionsmedizinischen Einheit. Mit eurer Herzlichkeit und Kollegialität sorgt ihr alle dafür, dass man sich in der Repro echt wohlfühlt. Einen besonderen Dank an Heiko, Antje, Susanne, Alex, Anja, Erika Schröder, Christine, Karo, Franzi, Jutta, Florian, Marta, Marion, Margret Schäfer und Erika Münch für die vielen lustigen Momente in der Repro.

Meike Schmelting, Franzi Eschricht, Verena von Babo, Nina Eberle, Kristin Jensen, Steffen Hoyer, Tanja Gerlach, Sandra Kraus, Line Bender und Susanne Arrenberg danke ich für krisensichere Freundschaft und immer gewährte Solidarität.

Jan-Morten, ich danke dir für deine stetige moralische Unterstützung und Motivation, die entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, und dafür, dass du immer für mich da bist.

Meiner Oma Lydia danke ich für ihre Fürsorge und den stärkenden Zuspruch, auch in schwierigen Phasen der Doktorarbeit.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern, Hartmut und Doris Urhausen, die mich mein ganzes Leben sowohl seelisch und moralisch als auch finanziell in einzigartiger Weise unterstützt haben und mich immer ermutigt haben, auch mal gegen den Strom zu schwimmen. Ohne eure Liebe und euren Rückhalt wäre vieles nicht möglich gewesen. Ich liebe euch sehr.

Hoschi, danke, dass du 12 Jahre stets an meiner Seite warst.