

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

**Morphologisch-funktionelle Charakterisierung equiner endometrialer Epithel-
und Stromazellen in Monokultur unter Einbeziehung immunzytologischer und
transmissionselektronenmikroskopischer Methoden**

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

eingereicht von
Denny Böttcher
aus Neustrelitz

Leipzig, 2011

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon

Institut für Veterinär-Pathologie

Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Terttu Katila

Department of Production Animal Medicine

Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki

Tag der Verteidigung: 04.10.2011

Das Alte sagt: So wie ich bin, bin ich seit je.
Das Neue sagt: Bist du nicht gut, dann geh.

Bertolt Brecht, Leben des Galilei

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Zytoskelett	2
2.1.1 Allgemeine Betrachtungen	2
2.1.2 Intermediärfilamente	2
2.1.2.1 Allgemeine Struktur und Funktionen	2
2.1.2.2 Zytokeratine	4
2.1.2.3 Vimentin	5
2.1.2.4 Desmin	6
2.1.3 Mikrofilamente	6
2.2 Orthologie des equinen Endometriums	7
2.2.1 Allgemeine Betrachtungen	7
2.2.2 Die Zyklusphasen der Stute	7
2.2.3 Morphologisch-funktionelle Charakterisierung des zyklisch aktiven Endometriums	8
2.2.3.1 Konventionelle Lichtmikroskopie	8
2.2.3.2 Immunhistologie	8
2.2.3.3 Histochemie	10
2.2.3.4 Elektronenmikroskopie	10
2.2.4 Morphologisch-funktionelle Charakterisierung des Endometriums während der physiologischen Inaktivität	11
2.2.4.1 Konventionelle Lichtmikroskopie	11
2.2.4.2 Immunhistologie	11
2.2.4.3 Histochemie	11
2.2.4.4 Elektronenmikroskopie	12
2.3 Pathologie des equinen Endometriums	12
2.3.1 Allgemeine Betrachtungen	12
2.3.2 Endometrose	12
2.3.2.1 Allgemeine Betrachtungen	12
2.3.2.2 Veränderungen der Epithelzellen	13

2.3.2.3	Veränderungen der Stromazellen.....	15
2.3.2.4	Pathogenetische Faktoren	16
2.4	Endometrium <i>in vitro</i>.....	17
2.4.1	Allgemeine Betrachtungen	17
2.4.2	Material	18
2.4.3	Isolierung.....	19
2.4.4	Separation.....	20
2.4.5	Vitalität	21
2.4.6	Kultivierung	22
2.4.6.1	Wachstumsoberfläche.....	22
2.4.6.2	Medien	23
2.4.6.3	Gasphase und Temperatur	24
2.4.7	Charakterisierung kultivierter Endometriumzellen	24
2.4.7.1	Morphologie.....	25
2.4.7.2	Immunzytologie	26
2.4.8	Differenzierung und Entdifferenzierung.....	27
2.5	Fazit aus der Literatur bezogen auf die initiale Fragestellung dieser Arbeit.....	27
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	Tiergut, Material und Probenherkunft.....	29
3.2	Materialentnahme	29
3.2.1	Material für die Zellkultur	29
3.2.2	Material für die Histologie.....	30
3.3	Isolierung	30
3.3.1	Waschung und mechanische Zerkleinerung	30
3.3.2	Enzymatische Verdauung	30
3.4	Separation	32
3.4.1	Filtration	32
3.4.2	Dichtegradientenzentrifugation.....	32
3.4.3	Differenzialadhärenz	33
3.5	Zellzählung und Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen	33
3.6	Kultivierung.....	34
3.6.1	Brutschrank	34
3.6.2	Nährmedium (einschließlich Mediumwechsel)	34

3.6.3	Wachstumsgefäße	35
3.7	Lichtmikroskopie	35
3.7.1	Endometrium <i>in situ</i>	35
3.7.2	Zellpellets	35
3.7.3	Kultivierte Zellen auf Membraneinsätzen	36
3.8	Immunhistologie, Immunzytologie	36
3.8.1	Anfertigung der immunhistologischen/immunzytologischen Präparate	36
3.8.2	Auswertung der immunhistologischen/immunzytologischen Untersuchungen.....	37
3.9	Transmissionselektronenmikroskopie	38
3.9.1	Fixierung und Einbettung	38
3.9.2	Semidünnschnitte.....	39
3.9.3	Ultradünnschnitte	39
3.9.4	Auswertung	39
3.9.5	Fotografie	39
4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	Material	40
4.1.1	Zyklusstand	40
4.1.2	Histopathologische Beurteilung der Endometriumproben	40
4.2	Zellausbeute.....	41
4.2.1	Stromazellen	42
4.2.2	Epithelzellen.....	42
4.3	Kultivierung.....	42
4.3.1	Kulturreinheit	42
4.3.2	Kulturdauer.....	43
4.4	Lichtmikroskopie	43
4.4.1	Endometrium <i>in situ</i>	43
4.4.1.1	Konventionelle Histopathologie	43
4.4.1.2	Alzianblau-Färbung	43
4.4.1.3	PAS-Reaktion.....	45
4.4.2	Zellpellets	45
4.4.2.1	Zytomorphologie.....	46
4.4.2.2	Alzianblau-Färbung	48

4.4.2.3	PAS-Reaktion.....	48
4.4.3	Kultivierte Zellen auf Membraneinsätzen	49
4.4.3.1	Zytomorphologie.....	49
4.4.3.2	Alzianblau-Färbung	52
4.4.3.3	PAS-Reaktion.....	53
4.4.4	Zusammenfassung der histochemischen/zytochemischen Befunde.....	54
4.5	Immunhistologie, Immunzytologie.....	54
4.5.1	Endometrium <i>in situ</i>	54
4.5.1.1	Zytokeratin 8.....	54
4.5.1.2	Zytokeratin 18.....	55
4.5.1.3	Zytokeratin 19.....	56
4.5.1.4	Vimentin	58
4.5.1.5	Desmin	59
4.5.1.6	α -Glattmuskel-Aktin	60
4.5.2	Zellpellets	61
4.5.2.1	Zytokeratin 8.....	61
4.5.2.2	Zytokeratin 18.....	61
4.5.2.3	Zytokeratin 19.....	61
4.5.2.4	Vimentin	62
4.5.2.5	Desmin	63
4.5.2.6	α -Glattmuskel-Aktin	63
4.5.3	Kultivierte Zellen auf Membraneinsätzen	64
4.5.3.1	Zytokeratin 8.....	64
4.5.3.2	Zytokeratin 18.....	65
4.5.3.3	Zytokeratin 19.....	66
4.5.3.4	Vimentin	67
4.5.3.5	Desmin	68
4.5.3.6	α -Glattmuskel-Aktin	69
4.5.4	Zusammenfassung der immunhistologischen/immunzytologischen Befunde.....	70
4.6	Transmissionselektronenmikroskopie	72
4.6.1	Epithelzellen.....	72
4.6.2	Stromazellen	74

5	DISKUSSION	75
5.1	Ziel der Arbeit.....	75
5.2	Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials	75
5.3	Histochemische und immunhistologische Untersuchungen des Endometriums <i>in situ</i>	77
5.4	Charakterisierung der Zellen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung.....	80
5.4.1	Morphologie	80
5.4.2	Zytochemie, Immunzytologie.....	80
5.5	Morphologie und Differenzierung der kultivierten Endometriumzellen.....	83
5.5.1	Morphologie	83
5.5.1.1	Epithelzellen.....	83
5.5.1.2	Stromazellen	86
5.5.2	Zytochemie.....	86
5.5.2.1	Alzianblau-Färbung	86
5.5.2.2	PAS-Reaktion.....	87
5.5.3	Immunzytologie	87
5.5.3.1	Zytokeratine.....	87
5.5.3.2	Vimentin	89
5.5.3.3	Desmin, α -Glattmuskel-Aktin.....	90
5.6	Abhängigkeit der Kulturergebnisse von der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellgewinnung	92
5.7	Fazit	93
5.8	Weiterführende Untersuchungen im Zellkulturmodell	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	SUMMARY	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	100
9	ANHANG	115
9.1	Reagenzien für die Zellkultur.....	115
9.2	Reagenzien für die (Immun-)Zytologie und die Immunhistologie ...	117
10	DANKSAGUNG	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -GMA	α -Glattmuskel-Aktin
ABAM	Antibiotikum/Antimykotikum
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AM	Antimykotikum
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Syn. <i>Dulbecco's minimum essential medium</i>)
EEZ	endometriale Epithelzellen
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ESZ	endometriale Stromazellen
EZM	Extrazellulärmatrix
f.	folgende [Seite]
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
ff.	folgende [Seiten]
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
H.-E.	Hämalaun-Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
ITS	Insulin, Transferrin, Selen
K18	(Zyto-)Keratin 18
K19	(Zyto-)Keratin 19
K8	(Zyto-)Keratin 8
Kap.	Kapitel
l	Liter
MACS	<i>magnetic cell separation</i> (magnetische Zellseparation)
mEEZ	mutmaßliche endometriale Epithelzellen
mESZ	mutmaßliche endometriale Stromazellen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter

mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mol	Mol [Einheit der Stoffmenge]
n	Probenanzahl
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PAS	<i>periodic acid Schiff reaction</i> (Periodsäure-Schiff-Reaktion) nach McManus
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S.	Seite
sog.	sogenannte(r/s)
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i> (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	<i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.	und
u. a.	unter anderem
üw.	überwiegend
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 EINLEITUNG

Die Kultivierung von Zellen zum Zwecke der Etablierung von *In-vitro*-Modellen für biologische oder medizinische Fragestellungen bietet die Möglichkeit experimenteller Studien unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen, unabhängig von individuellen Variationen. Zudem können durch die Verwendung von Zellkulturmodellen häufig die Anzahl und das Ausmaß von Tierversuchen reduziert werden.

Sowohl vom Menschen als auch von zahlreichen Tierarten existieren Beschreibungen morphologischer und funktioneller Charakteristika kultivierter endometrialer Epithel- und Stromazellen.

Für die Spezies Pferd sind bezüglich dieser beiden Zellpopulationen, vor allem hinsichtlich der Stromazellen, nur wenige Beschreibungen der Isolierung, Separation und Kultivierung sowie der Eigenschaften der gezüchteten Zellen vorhanden. Insbesondere permeable, Wachstumsfaktor-freie Substrate fanden dabei bisher kaum Berücksichtigung. Bei Verwendung derartiger Kulturoberflächen wird eine Beeinflussung des Zellwachstums *in vitro* durch im Substrat enthaltene, nicht exakt definierte Wachstumsfaktoren vermieden. Gleichzeitig sind, im Gegensatz zur Kultivierung auf impermeablen Substraten, keine nachteiligen Auswirkungen auf die Polarisierung der kultivierten Zellen zu erwarten.

Ziel dieser Arbeit ist daher eine eingehende morphologische und funktionelle Charakterisierung von auf permeablen Membraneinsätzen gezüchteten equinen endometrialen Epithel- und Stromazellen in Primärkultur.

Dabei wird die Differenzierung der Zellen *in vitro* anhand des immunzytologischen Nachweises gewebspezifischer Zytokeratin-Subtypen sowie von Vimentin, Desmin und α -Glattmuskel-Aktin untersucht und mit den immunhistologischen Befunden der zur Zellgewinnung herangezogenen Endometrien verglichen. Zudem erfolgt die Überprüfung der *In-vitro*-Produktion von *in situ* nachweisbaren zellulären Sekretionsprodukten mittels Alzianblau-Färbung (Proteoglykane) und PAS-Reaktion (Polysaccharide, Glykoproteine).

Anhand dieser Charakterisierung soll zum einen eine Bewertung der im Zellkulturmodell erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Verhältnisse *in situ* bzw. *in vivo* ermöglicht werden; zum anderen kann die Beschreibung grundlegender Eigenschaften der Zellen *in vitro* als Basis für weiterführende Untersuchungen dienen, um die Auswirkungen spezifischer auf das Kultursystem einwirkender Milieufaktoren interpretieren zu können.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Zytoskelett

2.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Eukaryotische Zellen besitzen ein Zytoskelett, das aus drei Hauptnetzwerken besteht: den Mikrofilamenten (6-8 nm Durchmesser), den Intermediärfilamenten (8-10 nm Durchmesser) und den Mikrotubuli (25 nm Durchmesser) (LIEBICH 2009). Diese drei Bestandteile sind jedoch nicht voneinander unabhängig, sondern bilden mit Hilfe von Verbindungsproteinen ein integratives Netzwerk funktionell gekoppelter Systeme (FUCHS u. KARAKESISOGLOU 2001). Da die Mikrotubuli nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen sind, wird im Folgenden lediglich auf die Struktur und Funktion der Intermediär- und Mikrofilamente näher eingegangen.

2.1.2 Intermediärfilamente

2.1.2.1 Allgemeine Struktur und Funktionen

Alle Intermediärfilamente weisen eine gleichartige Grundstruktur auf: sie bestehen aus Protein-Untereinheiten, die neben einer konservierten zentralen „Stab“-Domäne (α -Helix) amino- und karboxyterminale „End“-Domänen (nicht-helikale) variabler Größe und chemischer Zusammensetzung enthalten. Diese sind für die unterschiedlichen Funktionen der Intermediärfilamente verantwortlich. Die monomeren Protein-Untereinheiten bilden zunächst Dimere (α -Doppelhelix). Diese können aus gleichartigen (Homopolymere) oder verschiedenartigen (Heteropolymere) Untereinheiten bestehen. Im weiteren Verlauf entstehen Tetramere, die sich in Längsrichtung sowie seitlich zusammenlagern und dadurch Protofilamente und Protofibrillen bilden, welche sich schließlich zu einem Intermediärfilament verbinden (STEINERT u. ROOP 1988, SKALLI et al. 1992, FUCHS u. WEBER 1994, FUCHS u. CLEVELAND 1998, OMARY et al. 2004).

Bislang sind etwa 70 verschiedene Intermediärfilament-bildende Proteine bekannt, von denen mehr als 50 den Keratinen zuzuordnen sind. Auf der Basis homologer Gensequenzen können die Proteine in sechs verschiedene Typen/Klassen eingeteilt werden (STEINERT u. ROOP 1988, FUCHS u. WEBER 1994, HERRMANN u. AEBI 2000, COULOMBE u. WONG 2004, SZEVERENYI et al. 2008, OMARY 2009); eine Übersicht bietet Tab. 2.1 (S. 3).

Die Proteine der Klassen I und II sind obligate Heteropolymer-Bildner, d. h. die Dimerie besteht aus je einem Typ-I- und einem Typ-II-Zytokeratin (HATZFELD u. FRANKE 1985, HERRMANN u. AEBI 2000). Dabei bestehen keine molekülstrukturellen Inkompatibilitäten zwischen den verschiedenen Zytokeratinen der beiden Klas-

sen, da aufgereinigte Zytokeratin-Polypeptide mit beliebigen Polypeptiden der jeweils anderen Zytokeratin-Klasse *in vitro* zu Komplexen reagieren können, selbst bei Kombinationen von aus verschiedenen Säugetier-Spezies isolierten Zytokeratinen (HATZFELD u. FRANKE 1985). Klasse-III- und Klasse-IV-Proteine können *in vitro* und *in vivo* sowohl Homo- als auch Heteropolymere (z. B. Vimentin – Desmin, siehe Kap. 2.1.2.4, S. 6) bilden (HERRMANN u. AEBI 2000).

Tab. 2.1: Einteilung und Vorkommen der Intermediärfilamente

Typ	Proteinbezeichnung	Vorkommen <i>in vivo</i> bzw. <i>in situ</i>
I	saure Keratine	Epithelzellen (einschließlich verhornter Zellen)
II	basische Keratine	Epithelzellen (einschließlich verhornter Zellen)
III	Vimentin	mesenchymale Zellen
	Desmin	Muskelzellen
	GFAP	Gliazellen
	Peripherin	Nervenzellen
	Syncoilin	Muskelzellen
IV	Neurofilamente	Nervenzellen
	α -Internexin	Nervenzellen
	Nestin	Nervenzellen
	Synemine	Muskulatur
V	Lamine	Zellkern
VI	Phakinin	Linse
	Filensin	Linse

Die verschiedenen Intermediärfilamente sind sich morphologisch (ultrastrukturell) ähnlich, können jedoch immunologisch unterschieden werden (FRANKE et al. 1978). Dabei stellen die Enddomänen der Monomere die immunogenen Strukturen dar, die mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können (MARCEAU et al. 2007). Demzufolge lässt der immunologische Nachweis der Protein-Untereinheiten nicht zwangsläufig auf intakte und damit funktionsfähige Intermediärfilamente schließen (SCHUTTE et al. 2004).

Mit Ausnahme von Vimentin-Filamenten (siehe Kap. 2.1.2.3, S. 5 f.) exprimieren Zellen in Primärkulturen in der Regel hauptsächlich die gewebetypischen Intermediärfilamente ihrer Ursprungsgewebe (VIRTANEN et al. 1981). Da sie zudem auch spezifisch in bestimmten Stadien der Zelldifferenzierung nachweisbar sind, kommt ihnen nicht nur eine Rolle für die mechanische Integrität der Zelle zu, sondern auch für spezialisierte Funktionen der jeweiligen Zelltypen (FUCHS u. WEBER 1994).

Zur Wahrnehmung dieser Aufgaben können Gestalt und mechanisches Verhalten der Intermediärfilamente erheblich modifiziert werden, u. a. als Antwort auf veränderte zelluläre Bedingungen, wie beispielsweise während des Zellzyklus oder durch extrazelluläre Signale und Einflüsse (HERRMANN u. AEBI 2000) sowie im Zuge der Apoptose (CAULÍN et al. 1997, BYUN et al. 2001, CHEN et al. 2003, SCHUTTE et al. 2004). Zur Modifikation der Filamente können Polypeptide zwischen einem intrazytoplasmatischen Pool und den Intermediärfilamenten ausgetauscht werden, d. h. es existiert ein sogenanntes „Steady-State-Äquilibrium“ (Fließgleichgewicht) zwischen den hochpolymeren Intermediärfilamenten und den niedrigpolymeren Untereinheiten. Dies gilt sowohl für Zytokeratine (KLYMKOWSKY et al. 1983, MILLER et al. 1993) als auch Vimentin (SOELLNER et al. 1985, NGAI et al. 1990, VIKSTROM et al. 1992) und Desmin (IP u. FELLOWS 1990).

2.1.2.2 Zytokeratine

Die Bezeichnung Keratine stellt einen Oberbegriff für Zytokeratine (Keratine von Epithelien einschließlich des Haarfollikel epithels) und Haarkeratine (Keratine, die ausschließlich in den Haaren selbst vorkommen) dar (SCHWEIZER et al. 2006, MOLL et al. 2008). Die aktuelle Nomenklatur der Säugetier-Keratine (SCHWEIZER et al. 2006) orientiert sich an der Nomenklatur von MOLL et al. (1982) und ordnet den sauren Keratinen (Klasse I) u. a. die Keratine K9 bis K28 und den basischen Keratinen (Klasse II) u. a. die Keratine K1 bis K8 zu. Dabei schlagen SCHWEIZER et al. (2006) vor, dass Keratine nicht-humaner Säugetierspezies, die ortholog zu den menschlichen Keratinen sind, den gleichen Namen erhalten sollen.

Die Expression der Zytokeratin-Subtypen ist spezifisch für den jeweiligen Zelltyp und dessen Differenzierungszustand (MOLL et al. 2008). Daher ermöglicht diese typische Zytokeratin-Expression häufig eine Identifizierung des Ursprungsgewebes epithelialer Zellen, selbst nach maligner Zelltransformation (CHU u. WEISS 2002). In einzelnen epithelialen Geweben können teilweise über 10 verschiedene Zytokeratine exprimiert werden (MOLL et al. 1982). Nach Ansicht von HUTTON et al. (1998) liegt die Diversität der Zytokeratine in verschiedenen spezifischen Funktionen begründet.

Die Zytokeratin-Filamente umgeben in Form eines Netzwerkes den Zellkern, durchziehen das Zytoplasma und sind an den Desmosomen der Zellmembran verankert. Daher spielen die Zytokeratine nicht nur für die Einzelzelle, sondern über ihre Verankerung an den Zell-Zell-Kontakten auch für den gesamten epithelialen Zellverband eine wichtige Rolle bezüglich der mechanischen Stabilität (MOLL et al. 2008). In mehrschichtigen Epithelien sind die Keratinfilamente in der Regel zu Tonofilamenten gebündelt. Die geringer mechanisch beanspruchten einfachen Epithelien weisen hingegen eine wenig gebündelte, sondern vielmehr locker im Zytoplasma verteilte Anordnung der entsprechenden Filamente auf (MOLL et al. 2008). Zytokeratine besitzen viskoelastische Eigenschaften, die für die Elastizität von Zellen verantwort-

lich sind und sie so vor einer Schädigung durch Deformation schützen (MA et al. 2001). Bei mehrschichtigen Epithelien tritt mechanischer Stress überwiegend in Form von Druck-, Zug- und Scherkräften auf, während er in einfachen Epithelien (da sie nicht an der Körperoberfläche liegen) überwiegend aus osmotischem Stress resultiert, da dieser mit Zellschwellung und -schrumpfung einhergeht (OWENS u. LANE 2003).

Neben diesen mechanischen Funktionen kommt den Zytokeratinen auch eine Rolle für die Epithelpolarität zu, da sie selbst zum Teil eine polarisierte Verteilung innerhalb der Zelle aufweisen und Funktionen beim Transport spezifischer apikaler Proteine zum apikalen Zellpol übernehmen (AMEEN et al. 2001, ORIOLO et al. 2007).

Zudem sind Zytokeratine auch an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt (MOLL et al. 2008).

Zahlreiche Zytokeratine zeigen das Phänomen der funktionellen Redundanz, d. h. ihre jeweiligen Funktionen können auch von anderen Zytokeratinen wahrgenommen werden (COULOMBE u. OMARY 2002). Dieses Prinzip gilt jedoch nicht uneingeschränkt. So konnten HUTTON et al. (1998) zeigen, dass verschiedene Zytokeratine einer Klasse sich gegenseitig funktionell nicht immer vollwertig ersetzen können, obwohl eine Paarbildung stattfindet.

Die Zytokeratine K8 und K18 sind die primären Keratine humaner einfacher Epithelien und bilden in diesen ein Expressionspaar. In einfachen Epithelien des Menschen sind meist zusätzlich zu K8/18 die sekundären Keratine K7 und K19 nachweisbar (OWENS u. LANE 2003, MOLL et al. 2008). Dabei kann K19 ein Expressionspaar mit K7 oder K8 bilden (MOLL et al. 2008). Strukturell nimmt K19 gegenüber den anderen Zytokeratinen eine Sonderstellung ein, da das Molekül keine karboxyterminale Enddomäne besitzt (BADER et al. 1986).

2.1.2.3 Vimentin

Die aus Vimentin bestehenden Intermediärfilamente spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellform und der Zytoplasmaintegrität (GOLDMAN et al. 1996) sowie der Positionen von Zellkern und Mitosespindel (AUBIN et al. 1980, ZIEVE et al. 1980, LAURILA et al. 1981, LAZARIDES 1982). Aufgrund ihrer viskoelastischen Eigenschaften verhindern die Intermediärfilamente vom Vimentin-Typ eine zu starke Zelldeformation, da sie umso fester werden, je größer die Krafteinwirkung ist (JANMEY et al. 1991).

Darüber hinaus kommt diesen Filamenten beim Wachstum in Kultur, zumindest in mesenchymalen Zellen, eine Funktion für die Zelladhäsion mit dem Substrat (GOLDMAN et al. 1996) und die Zellausbreitung (GOLDMAN u. FOLLETT 1970) zu. Vimentin ist, unabhängig vom jeweiligen Ursprungsgewebe und der Herkunftsspezies, in zahlreichen proliferierenden Zellen *in vitro* nachweisbar (FRANKE et al. 1979, VIRTANEN et al. 1981). Als Ursache wird von einigen Autoren eine Adaptation der

Zellen an die Kulturbedingungen angenommen (OSBORN et al. 1980), während andere die Involvierung von Vimentin in die Vorgänge während der Mitose für das Vorhandensein der entsprechenden Intermediärfilamente in kultivierten (d. h. sehr teilungsaktiven) Zellen verantwortlich machen (AUBIN et al. 1980). So exprimieren insbesondere epitheliale Zellen *in vitro* zwar häufig, aber nicht zwangsläufig Vimentin (FRANKE et al. 1979, SCHMID et al. 1983). Daher gehen SCHMID et al. (1983) davon aus, dass Vimentin für das Wachstum von Zellen in Kultur nicht zwingend erforderlich ist. Dennoch können ZIEVE et al. (1980) nicht nur in kultivierten Zellen mesenchymalen, sondern auch epithelialen Ursprungs mit Eintritt in die Mitose einen Vimentin-„Käfig“ nachweisen, der die Mitosespindel umgibt, dadurch die strukturelle Kontinuität des Zytoplasmas aufrecht erhält, und im Zuge der Zytokinese auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt wird, wo er an der Wiederherstellung der Interphase-Organisation beteiligt ist.

2.1.2.4 Desmin

Aus Desmin bestehende Intermediärfilamente kommen in Zellen der glatten und der quergestreiften Muskulatur vor (LAZARIDES u. BALZER 1978). Während Desmin in der quergestreiften Muskulatur im Bereich des Außenrandes der Z-Scheibe exprimiert wird (CAMPBELL et al. 1979, GRANGER u. LAZARIDES 1979, PAULIN u. LI 2004), bildet es in glatten Muskelzellen ein Netzwerk aus Filamenten, die an den *dense bodies* des Zytoplasmas und der Plasmamembran angeheftet sind (UEHARA et al. 1971, COOKE 1976). Desmin und Vimentin bilden in Muskelzellen Heterodimere (GRANGER u. LAZARIDES 1979, LAZARIDES 1982).

Die Intermediärfilamente vom Desmin-Typ dienen der Aufrechterhaltung der strukturellen und mechanischen Integrität des kontraktiven Apparates sowie der Übertragung der Kontraktionskräfte an die Zelloberfläche und sind an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (PAULIN u. LI 2004).

2.1.3 Mikrofilamente

Die Monomere des Proteins Aktin werden als G-Aktin (globuläres Aktin) bezeichnet, die Polymere hingegen als F-Aktin (filamentöses Aktin) (EGELMAN 1985). Die Mikrofilamente bestehen aus zwei helikal gewundenen F-Aktinen (HOLMES et al. 1990, ALBERTS et al. 2008). Wie Intermediärfilamente (siehe Kap. 2.1.2.1, S. 2 ff.) befinden sich auch Mikrofilamente in einem Zustand des Fließgleichgewichtes, wobei Monomere zwischen einem intrazytoplasmatischen Pool und den Filamenten ausgetauscht werden können (ALBERTS et al. 2008). Jedes Aktin-Molekül hat zentral ein Nukleotid gebunden, wobei es sich im Falle der Monomere um Adenosintriphosphat, bei den Polymeren hingegen um das energieärmere Adenosindiphosphat handelt (HOLMES et al. 1990, ALBERTS et al. 2008).

Die mechanischen Eigenschaften der Mikrofilamente hängen entscheidend von den mit ihnen assoziierten Bindungsproteinen ab. So entstehen bei Quervernetzung mit α -Aktinin kontraktile Filamentbündel, welche auch als Stressfasern bezeichnet werden, und zwischen deren Filamente sich Myosin II schieben kann. Die kontraktile Eigenschaften dieses Systems resultieren aus einer Aktin-Myosin-Interaktion (ALBERTS et al. 2008).

In Säugetieren existieren sechs verschiedene Aktin-Isoformen, von denen zwei ubiquitär vorkommen (β_{cyto} -Aktin, γ_{cyto} -Aktin), die vier übrigen demgegenüber spezifisch für Skelett- ($\alpha_{skeletal}$ -Aktin), Herz- ($\alpha_{cardiac}$ -Aktin) bzw. glatte (α_{smooth} -Aktin, γ_{smooth} -Aktin) Muskulatur sind (PERRIN u. ERVASTI 2010). Die α_{smooth} -Aktin-Isoform wird dabei im Folgenden als α -Glattmuskel-Aktin (α -GMA) bezeichnet.

In der quergestreiften Muskulatur wird Aktin innerhalb der Z-Scheibe exprimiert (GRANGER u. LAZARIDES 1978, 1979). Die Mikrofilamente sind in Zellen der glatten Muskulatur, im Gegensatz zu Desmin (siehe Kap. 2.1.2.4, S. 6), zwar an den *dense bodies* der Plasmamembran, nicht jedoch des Zytoplasmas angeheftet (COOKE 1976).

2.2 Orthologie des equinen Endometriums

2.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Wand der Gebärmutter (Uterus) der Stute gliedert sich anatomisch in Endometrium (Schleimhaut), Myometrium (Muskelschicht) und Perimetrium.

Die innere Schicht stellt dabei das Endometrium dar, welches sich aus dem luminalen Epithel und der darunter liegenden Lamina propria zusammensetzt. Letztere kann wiederum in das unmittelbar subepithelial gelegene zell-dichte Stratum compactum und das darauffolgende zellärmere Stratum spongiosum unterteilt werden. Die Lamina propria ist unter anderem durch das Vorhandensein von Stromazellen und tubulär verzweigten Uterindrüsen gekennzeichnet (KENNEY 1978, LIEBICH 2009).

2.2.2 Die Zyklusphasen der Stute

Die Stute gehört zu den saisonal polyöstrischen Tieren. Die Zyklussaison beginnt im Frühjahr und dauert bis zum frühen Herbst an. Im Spätherbst und im Winter hingegen durchlaufen Ovarien und Endometrium eine mehr oder weniger ausgeprägte Phase der physiologischen Inaktivität (sog. Winteranöstrus) (ARTHUR 1958, KENNEY u. DOIG 1986, ADAMS u. BOSU 1988, RÜSSE u. SINOWATZ 1991, SCHOON et al. 1992). Der durchschnittlich 22 Tage dauernde Zyklus (AURICH u. KLUG 1993) kann nach BRUNCKHORST et al. (1991) und SCHOON et al. (1992), basierend auf typischen morphologischen Veränderungen der endometrialen Epithel- und Stromazellen, in mehrere Abschnitte unterteilt werden: eine 8- bis 9-tägige Pro-

liferationsphase, zusammengesetzt aus Präöstrus (3 Tage), Östrus (2–3 Tage) und Postöstrus (3 Tage), gefolgt von einer 9 Tage andauernden Sekretionsphase und einer etwa 4-tägigen Involutionsphase (zusammen dem Interöstrus entsprechend).

2.2.3 Morphologisch-funktionelle Charakterisierung des zyklisch aktiven Endometriums

2.2.3.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

Der regulär ablaufende Zyklus der Stute ist durch typische hormonabhängige, morphologisch erfassbare und funktionsassoziierte Umbauvorgänge im Bereich des luminalen Epithels, der Uterindrüsen und des endometrialen Stromas gekennzeichnet. Die während der verschiedenen Zyklusphasen auftretenden histomorphologischen Charakteristika sind in Tab. 2.2 (S. 9) zusammengefasst.

2.2.3.2 Immunhistologie

Eine eindeutige Unterscheidung der endometrialen Epithel- und Stromazellen ist durch den immunhistologischen Nachweis von Zytokeratin möglich, welches nach AUPPERLE et al. (2004) zyklusunabhängig stets in den Epithelzellen, jedoch zu keinem Zeitpunkt in den Stromazellen nachgewiesen werden kann. Bei diesen Untersuchungen konnte jedoch aufgrund des verwendeten Antikörpers keine Unterscheidung der Zytokeratin-Subtypen vorgenommen werden. In eigenen Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010) war mittels Subtyp-spezifischer Antikörper in zahlreichen Epithelzellen Zytokeratin 19 nachweisbar, wohingegen die Zytokeratine 8 und 18 wenig bis gar nicht exprimiert werden. Demgegenüber dokumentieren mehrere Arbeiten den Nachweis der Zytokeratine 8, 18 und 19 in endometrialen Epithelzellen des Menschen (MOLL et al. 1983, BÁRTEK et al. 1986, OLSON et al. 2002, MO et al. 2006) und der Maus (MAGIN et al. 1998, TAMAI et al. 2000).

Den Angaben von AUPPERLE et al. (2004) zufolge exprimieren nahezu alle Stromazellen Vimentin, während dies in Epithelzellen des gesunden Endometriums nicht auftritt. In eigenen Studien konnte jedoch in Einzelfällen eine positive Reaktion für Vimentin im histomorphologisch unveränderten luminalen Epithel beobachtet werden (BÖTTCHER et al. 2010). Im menschlichen Uterus kommt es während der Proliferationsphase zu einer physiologischen epithelialen Koexpression von Vimentin und Zytokeratin (NISOLLE et al. 1995).

Desmin kommt im zyklisch aktiven Endometrium weder in den Epithel-, noch in den Stromazellen vor (RAILA 2000, AUPPERLE et al. 2004). In den glatten Muskelzellen der uterinen Gefäße werden Desmin und Vimentin koexprimiert (AUPPERLE et al. 2004).

Tab. 2.2: Auswahl wichtiger histomorphologisch erfassbarer Charakteristika des zyklisch aktiven Endometriums der Stute

		Proliferationsphase			Sekretionsphase	Involutionsphase
		Präöstrus	Östrus	Postöstrus	früher/mittlerer Interöstrus	später Interöstrus
Oberflächenepithel		iso- bis hochprismatisch	hochprismatisch	hochprismatisch	anfangs hoch-, später isoprismatisch	überwiegend flach bis isoprismatisch
Drüsen	Epithelzellen	iso- bis hochprismatisch; kleine rundliche chromatinreiche Zellkerne	hochprismatisch; ovale bis rundovale hyperchromatische Zellkerne	ähnliche Befunde wie im Östrus, jedoch mit intensiverer Ausprägung, Drüsenextension erreicht ihren Höhepunkt	iso- bis hochprismatisch; basal liegende rundliche, mäßig chromatinhaltige Zellkerne; apikal Sekretvakuolen und Sekretfäden	iso- bis hochprismatisch; basal liegende kleine rundliche hyperchromatische Zellkerne
	Drüsenmorphologie	beginnende Streckung; überwiegend enge Lumina ohne Sekret	gestreckt; erhöhte Drüsensenzahl und Drüsendurchmesser, geringere Drüsendichte; z. T. sekretgefüllte Lumina		zunehmende „Schlängelung“; hohe Drüsendichte; weite, sekretgefüllte Lumina	beginnende Abnahme der „Schlängelung“; geringerer Drüsendurchmesser; nur geringgradig dilatierte Lumina
Stroma	Stromazellen	kleine spindelförmige bis große Zellkerne	undifferenzierte bis große Zellkerne		maximale Größe des Zellkerns	ovale, hypochromatische Zellkerne
	Ödem	ungleichmäßig	ausgeprägt	Rückgang	abnehmend bis fehlend	

Literatur: KNUDSON u. VELLE (1961), BRANDT (1970), VOGEL u. HUMKE (1973), GORDON u. SARTIN (1978), KENNEY (1978), ROSSDALE u. RICKETTS (1980), KENNEY u. DOIG (1986), VAN CAMP (1988), RICKETTS (1989), BRUNCKHORST et al. (1991), SCHOON et al. (1992), STRANKMEYER (1993), HÄFNER (1999), RAILA (2000)

In der Regel kann α -GMA in unveränderten endometrialen Epithel- und Stromazellen nicht nachgewiesen werden (RAILA 2000). Allerdings beobachten WALTER et al. (2001) neben positiv reagierenden glatten Muskelzellen der Blutgefäße und des Myometriums in einzelnen Fällen eine zyklusunabhängige α -GMA-Expression in den Stromazellen des Stratum compactum.

2.2.3.3 Histochemie

Der intrazelluläre histochemische Nachweis von Proteoglykanen mittels Alzianblau-Färbung (pH 2,5) gelingt im gesunden equinen Endometrium ausschließlich in den Zellen des luminalen Epithels (FREEMAN et al. 1990, HOFFMANN 2006).

Sowohl FREEMAN et al. (1990) als auch HOFFMANN (2006) nutzen die PAS-Reaktion nach McManus an Endometriumbiopsaten der Stute zum Nachweis von Glykogen. Während FREEMAN et al. (1990) auch im Bereich des luminalen Epithels eine intensive Reaktion nachweisen, tritt Glykogen den Angaben von HOFFMANN (2006) zufolge intrazellulär ausschließlich in den glandulären Epithelien auf, wobei seine Konzentration zyklusabhängige Schwankungen zeigt (höchste Konzentrationen im frühen und mittleren Interöstrus); zudem beobachtet die Autorin vom Östrus bis zum mittleren Interöstrus in den Drüsenlumina PAS-positives Material. Nach MULISCH u. WELSCH (2010) ist zum Nachweis von Glykogen mittels PAS-Reaktion eine Fixierung in wasserhaltigen Substanzen (wie z. B. Formalin) nicht geeignet, da Glykogen teilweise wasserlöslich ist. Ein allgemeiner Nachweis von Polysacchariden und Glykoproteinen ist demgegenüber auch an Formalin-fixiertem Material möglich.

2.2.3.4 Elektronenmikroskopie

Im zyklisch aktiven Endometrium der Stute kann zwischen zilientragenden und nicht-zilientragenden Epithelzellen unterschieden werden (SAMUEL et al. 1979, KEENAN et al. 1991, TUNON et al. 1995, RAILA 2000). Die meisten zilientragenden Zellen (30–40 % der Drüsenepithelzellen) finden sich im mittleren Interöstrus, im Östrus hingegen sind sie nicht vorhanden (RAILA 2000). In den zilierten Epithelzellen ist keine sekretorische Aktivität feststellbar; diese ist demgegenüber in den nicht-zilierten Zellen der interöstrischen Phase zu erkennen: so sind zahlreiche ödematisierte Mitochondrien, ein deutlich ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum, ein aktiver Golgi-Apparat sowie viele Sekretionsvakuolen (TUNON et al. 1995, RAILA 2000) vorhanden. Übereinstimmend können SAMUEL et al. (1979), KEENAN et al. (1991), TUNON et al. (1995) und RAILA (2000) in den glandulären Epithelzellen weder glattes endoplasmatisches Retikulum noch Glykogengranula nachweisen. Die Anzahl der Lysosomen ist im späten Interöstrus am größten. Benachbarte Epithelzellen sind lateral durch *tight junctions*, Desmosomen und Interdigitationen verbunden

(TUNON et al. 1995, RAILA 2000). Die Epithelzellen sind durch eine kontinuierliche Basalmembran vom umgebenden Stroma abgegrenzt (RAILA 2000).

Die Stromazellen zeigen nur während des Interöstrus Merkmale einer erhöhten metabolischen Aktivität in Form maximaler Zytoplasmamenge und Mitochondrienzahl sowie des im Zyklusverlauf größten Zellkerndurchmessers. Weiterhin sind nur in dieser Zyklusphase Zytoplasmafortsätze, ein raues endoplasmatisches Retikulum und ein aktiver Golgi-Apparat vorhanden (RAILA 2000).

2.2.4 Morphologisch-funktionelle Charakterisierung des Endometriums während der physiologischen Inaktivität

2.2.4.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

Beim Pferd ist die Zyklusphase der physiologischen Inaktivität (Winteranöstrus), die in der Zeit von November bis Februar bestehen kann (RÜSSE u. SINOWATZ 1991), durch eine physiologischerweise auftretende Atrophie des Endometriums gekennzeichnet (KENNEY u. DOIG 1986, BRUNCKHORST et al. 1991). So besitzt das lumenale Epithel eine einreihige, flache bis isoprismatische Morphologie mit kleinen, basophilen Zellkernen. Die Dichte der Uterindrüsen ist im Vergleich zum zyklisch aktiven Endometrium reduziert. Die Drüsenschläuche stellen sich englumig und gestreckt dar; sie weisen ein flaches bis isoprismatisches Epithel mit kleinen, basophilen, hyperchromatischen Zellkernen auf. Das dicht angeordnete endometriale Stroma zeigt keine Ödematisierung. Die spindelförmigen Stromazellen besitzen hyperchromatische Zellkerne und geringe Mengen blass-eosinophilen Zytoplasmas (GORDON u. SARTIN 1978, KENNEY 1978, GROSS u. LEBLANC 1984, BRUNCKHORST et al. 1991, SCHOON et al. 1992, AUPPERLE et al. 2003).

2.2.4.2 Immunhistologie

Es existieren kaum detaillierte Angaben über immunhistologische Untersuchungen der Intermediär- und Mikrofilamente des Stutenendometriums während des Winteranöstrus. Im Gegensatz zum Expressionsverhalten im zyklisch aktiven Endometrium (siehe Kap. 2.2.3.2, S. 8 ff.) können AUPPERLE et al. (2003) in dieser Zyklusphase im überwiegenden Teil der Stromazellen eine Desmin-Expression beobachten. Während die Epithelien stets Zytokeratin exprimieren, tritt eine Vimentin-Expression in dieser Zellpopulation nicht auf (AUPPERLE et al. 2004).

2.2.4.3 Histochemie

Im Gegensatz zu ihren Ergebnissen bei der histochemischen Untersuchung von Biopaten zyklisch aktiver Endometrien (siehe Kap. 2.2.3.3, S. 10) können FREEMAN et al. (1990) während des Winteranöstrus in den Zellen des luminalen Epithels keine

Proteoglykane und in den glandulären Epithelzellen nur sehr wenig Glykogen nachweisen.

2.2.4.4 Elektronenmikroskopie

Nach den Untersuchungen von AUPPERLE et al. (2003) finden sich im luminalen Epithel neben zahlreichen zilienlosen, kurze Mikrovilli tragenden Zellen mit einigen Sekretionsvakuolen auch wenige zilierte Zellen. Beiden Zelltypen gemeinsam sind kleine, ovale Mitochondrien, ein schwach ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum und das Vorhandensein einzelner kleiner Vesikel des Golgi-Apparates sowie zahlreicher Polyribosomen. Im Epithel der Uterindrüsen können die Autoren zilienlose Zellen mit wenigen, sehr kurzen Mikrovilli nachweisen. Das Zytoplasma dieser Zellen enthält einzelne filamentöse Mitochondrien, ein wenig ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum, einen inaktiven Golgi-Apparat sowie einzelne Sekretionsvakuolen und sekundäre Lysosomen.

Die spindelförmigen Stromazellen weisen kurze Zytoplasmaausläufer, wenige ovale Mitochondrien, einige Ribosomen und einzelne Lysosomen auf. Gelegentlich sind inkorporierte Zilien erkennbar (AUPPERLE et al. 2003).

2.3 Pathologie des equinen Endometriums

2.3.1 Allgemeine Betrachtungen

Häufige pathologische Veränderungen des Endometriums stellen entzündliche Alterationen (Endometritiden) sowie degenerative Prozesse im Bereich der Uterindrüsen bzw. des sie umgebenden Stromas (Endometrose, siehe Kap. 2.3.2, S. 12 ff.) dar (KENNEY 1978, SCHOON et al. 1992, 1997b). Weiterhin können endometriale Fehldifferenzierungen (SCHOON et al. 1997b, 1999, 2000, HÄFNER 1999, HÄFNER et al. 2001, ELLENBERGER et al. 2002, ELLENBERGER 2003), Zysten (SCHOON et al. 1993, 1997b) sowie Angiopathien entzündlicher und nicht-entzündlicher (degenerativer) Natur (SCHOON et al. 1994, 1997a, 1997b, GRÜNINGER 1996, GRÜNINGER et al. 1998) auftreten. Neoplasien werden im Uterus der Stute nur selten beobachtet (BADER 2006, HURTGEM 2011).

2.3.2 Endometrose

2.3.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Endometrose stellt eine der wichtigsten Ursachen endometrial bedingter Fruchtbarkeitsstörungen des Pferdes dar (KENNEY u. DOIG 1986). SCHOON et al. (1995) definieren die Erkrankung morphologisch als periglanduläre und/oder stromale endometriale Fibrose einschließlich glandulärer Alterationen innerhalb fibrotischer Area-

le. Die periglanduläre Fibrose kann sowohl Einzeldrüsen als auch sogenannte Drüsennester betreffen (KENNEY 1978, SCHOON et al. 1995). Subepitheliale (FLORES et al. 1995) und stromale Fibrosen (SCHOON et al. 1995) können im Rahmen einer fortgeschrittenen Endometrose auftreten.

Eine semiquantitative Graduierung der Endometrose kann nach KENNEY (1978) anhand der Anzahl periglandulärer Bindegewebsschichten sowie der Anzahl fibrotischer Herde pro definierter Fläche erfolgen. HOFFMANN (2006) unterscheidet zudem verschiedene Qualitäten der Endometrose: aktive, inaktive und gemischte Formen (je nach der Morphologie der beteiligten Stromazellen) einerseits sowie destruierende und nicht destruierende Formen (je nach Auflösung der organspezifischen Strukturen sowie Degenerationserscheinungen der involvierten Epithelzellen) andererseits.

Im Zuge des progredienten, altersassoziierten Krankheitsverlaufes (RICKETTS u. ALONSO 1991b, SCHOON et al. 1995) kommt es zu einer irreversiblen Schädigung des Endometriums, die nicht durch klinische Untersuchungen, sondern nur durch die histopathologische Auswertung eines Endometriumbiopsates diagnostizierbar ist (SCHOON et al. 1992). Die Ätiopathogenese der Endometrose ist bislang nur unzureichend geklärt. Insbesondere konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der Anzahl der Trächtigkeiten (RICKETTS u. ALONSO 1991b, SCHOON et al. 1997b), jahreszeitlicher oder zyklischer hormoneller Einflüsse (HOFFMANN 2006) nachgewiesen werden. Bislang existieren keine erfolgreichen Therapieansätze. Zwar berichtet ROBERTS (1992) von guten Ergebnissen nach Kürettage mit Kerosin, zahlreiche andere Autoren (FRAZER et al. 1988, VAN CAMP 1988, BRACHER 1992, LEY 1994, SCHOON et al. 1995, 1997b) können jedoch keine Verbesserung der Fruchtbarkeit oder Reduktion fibrotischer Veränderungen nach chemischer oder mechanischer Kürettage beobachten.

2.3.2.2 Veränderungen der Epithelzellen

Die Endometrose geht häufig mit einer zyklusasynchronen Differenzierung der involvierten Drüsenepithelzellen einher (SCHOON et al. 1997b). Dabei weichen die von der Endometrose betroffenen Epithelzellen hinsichtlich ihrer Histomorphologie, ihrer Ultrastruktur und ihren histochemischen und immunhistologischen Charakteristika von den für die Stute definierten zyklischen Normalbefunden ab (vgl. Tab. 2.2, S. 9) (BRUNCKHORST et al. 1991, STRANKMEYER 1993, AUPPERLE 1997, RAILA 2000, HOFFMANN 2006, LEHMANN 2010). Abb. 2.1 (S. 14) zeigt eine schematische Darstellung der Funktionsmorphologie proliferativ und sekretorisch differenzierter glandulärer Epithelzellen im Vergleich zu den im Rahmen einer Endometrose auftretenden epithelialen Alterationen.

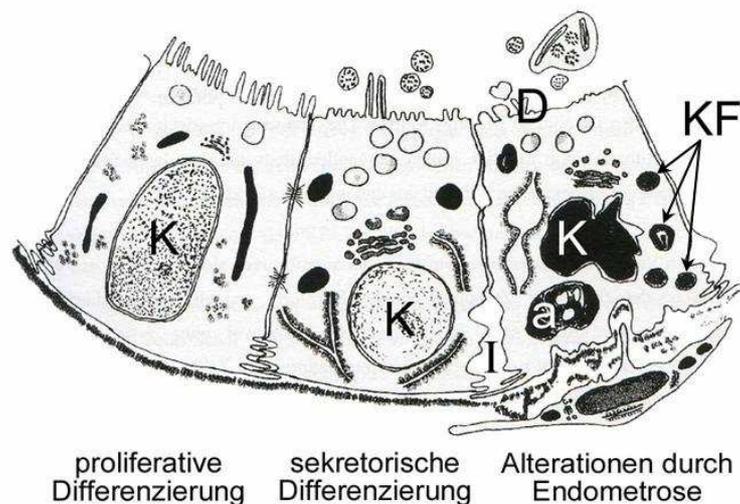


Abb. 2.1: Funktionsmorphologie der Drüsenepithelzellen während verschiedener Phasen des zyklisch aktiven Endometriums sowie zelluläre Alterationen bei Vorliegen einer Endometrose (modifiziert nach RAILA (2000))
(K = Zellkern, KF = Kernfragmente, a = *apoptotic body*, I = Interzellularraum (dilatiert), D = Degenerationserscheinungen der Zilien und Mikrovilli)

In den von der Fibrose betroffenen Epithelzellen kann häufig eine im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Drüsen abweichende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie von Proliferationsmarkern (Ki-67-Antigen) festgestellt werden (BRUNCKHORST et al. 1991, GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000). Insgesamt ist daher von einer eigenen Differenzierungsdynamik betroffener Areale auszugehen, bedingt durch eine Abkopplung von den regulären Steuerungsmechanismen (SCHOON et al. 1995, GERSTENBERG et al. 1999, AUPPERLE et al. 2000, HOFFMANN 2006).

Auch im Bereich des epithelialen Zytoskeletts kommt es in den fibrotischen Drüsen zu Abweichungen gegenüber den unveränderten glandulären Epithelien. So beobachten AUPPERLE (1997) bzw. AUPPERLE et al. (2004) in den betroffenen Epithelzellen eine Koexpression von Zytokeratin und Vimentin, wobei die Häufigkeit dieser Koexpression mit dem Grad der Endometrose steigt. Die Synthese von Vimentin wird dabei als Ausdruck einer intensiven Proliferation oder einer reaktiven Stabilisierung der Zelle angesehen. Weiterhin sind drei verschiedene Vimentin-Expressionsmuster nachweisbar: basale, perinukleäre und diffuse Expression. Das basale Muster tritt am häufigsten auf und wird von den Autoren als Ausdruck eines zerstörten Vimentin-Netzwerkes angesehen, während das perinukleäre Muster wahrscheinlich das ausgereifte Vimentin-Skelett darstellt. Auch HOFFMANN et al. (2009) weisen innerhalb fibrotischer Herde eine epitheliale Expression von Vimentin nach, die insbesondere bei Vorliegen einer destruierenden Endometrose ausgeprägt ist, was die Autoren als

möglicherweise durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten bedingt interpretieren. Eine Abhängigkeit vom Aktivitätszustand besteht nach HOFFMANN et al. (2009) nicht. Ultrastrukturell finden sich in den von der Fibrose betroffenen Epithelzellen atypische Aggregationen von Intermediärfilamenten, Degenerationserscheinungen (u. a. Chromatinkondensation, Kernfragmentation, Ödematisierung der Mitochondrien und Verbreiterung des Interzellularspaltes) und eine erhöhte Apoptoserate (RAILA 2000). Des Weiteren kommt es zu Degenerationserscheinungen von Zilien und Mikrovilli bis hin zu einem Verlust dieser Oberflächenstrukturen (FERREIRA-DIAS et al. 1994, RAILA 2000).

2.3.2.3 Veränderungen der Stromazellen

Die für das unveränderte zyklisch aktive Endometrium typische Differenzierungsdynamik der Stromazellen (siehe Tab. 2.2, S. 9) kann innerhalb fibrotischer Areale nicht nachvollzogen werden; vielmehr sind hier unterschiedlich fehldifferenzierte Stromazellen vorhanden (siehe Abb. 2.2, S. 16). So unterscheidet RAILA (2000) Stromazellen der Typen I und II sowie Myofibroblasten. Stromazellen des Typs I sind große, zytoplasmareiche, polymorphe Zellen mit hypochromatischen Zellkernen und einem ausgebildeten Syntheseapparat mit Produktion kollagener Fasern. Dieser Stromazellentyp tritt periglandulär im Zuge „beginnender Fibrosen“ auf. Fortgeschrittene Fibrosen sind durch Stromazellen vom Typ II gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um längliche Zellen mit schmalen Zytoplasmaausläufern und einem zentral gelegenen, länglich-ovalen Zellkern, die zudem durch perinukleär auftretende Intermediärfilamente sowie subplasmalemmal liegende, senkrecht zur Zellmembran verlaufende Mikrofilamente charakterisiert sind. Die Stromazellen vom Typ II können in einer aktiven und in einer inaktiven Form vorkommen, deren Ultrastruktur der von Fibroblasten bzw. Fibrozyten entspricht. Daneben treten in fortgeschrittenen Fibrosen Myofibroblasten in Erscheinung, die eine ähnliche Morphologie wie die Typ-II-Stromazellen besitzen. Im Unterschied zu diesen kommen die Mikrofilamente der Myofibroblasten jedoch in deutlich höherer Anzahl vor und sind parallel zur Zellmembran ausgerichtet. Zudem finden sich in unregelmäßigen Abständen *dense bodies*.

Neben RAILA (2000) können auch EVANS et al. (1998, 2000), WALTER et al. (2001) und HOFFMANN et al. (2009) im Rahmen der Endometrose ein Auftreten von Myofibroblasten nachweisen. Deren immunhistologische Reaktion für Vimentin, Desmin und α -GMA nutzt RAILA (2000) für eine Einteilung der Endometrose in drei verschiedene Expressionstypen: den dominierenden VA-Typ, bei dem die Myofibroblasten Vimentin und α -GMA exprimieren, sowie die nur im Rahmen mittel- und hochgradiger Fibrosen zusätzlich auftretenden VD- und VAD-Typen, bei denen in den Myofibroblasten Vimentin und Desmin bzw. Vimentin, α -GMA und Desmin nachgewiesen werden kann. Auch andere Autoren beschreiben bei Vorliegen einer Endometrose

die stromale Expression von α -GMA (WALTER et al. 2001, HOFFMANN et al. 2009) und Desmin (WALTER et al. 2001, AUPPERLE et al. 2004, HOFFMANN et al. 2009).

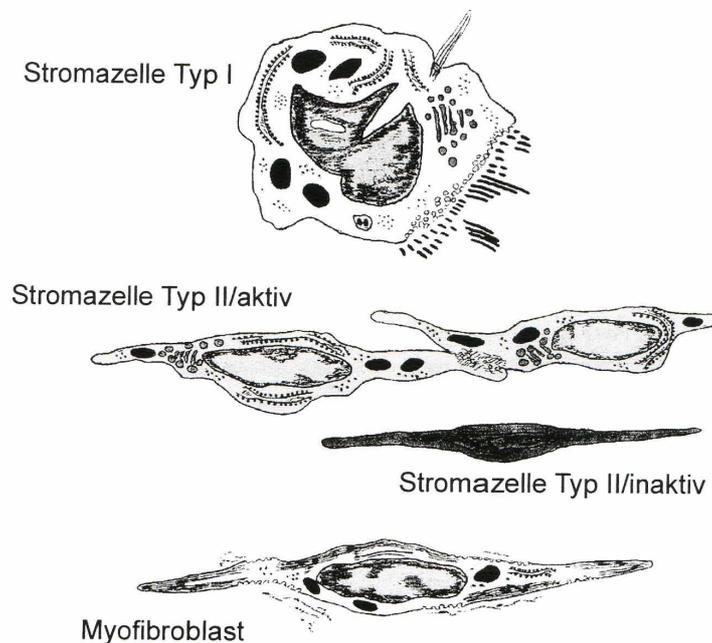


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Funktionsmorphologie fehdifferenzierter Stromazellen im Rahmen der Endometrose (nach RAILA (2000))

2.3.2.4 Pathogenetische Faktoren

In der Literatur werden verschiedene an der Entstehung einer Endometrose beteiligte Faktoren diskutiert. So könnten möglicherweise Veränderungen der glandulären Basallamina initiale Ereignisse in der Krankheitsentstehung darstellen (HOFFMANN et al. 2009, KIESOW et al. 2011). RAILA (2000) hingegen sieht als primären Ausgangspunkt der Endometrose Fehldifferenzierungen der Stromazellen an, möglicherweise bedingt durch Östrogen-Progesteron-Dysbalancen, da diese Steroidhormone die zyklischen endometrialen Differenzierungsvorgänge beeinflussen (DALLENBACH-HELLWEG 1987). Weiterhin wird von einigen Autoren eine Beteiligung verschiedener Wachstumsfaktoren an der Entstehung einer Endometrose vermutet (WALTER et al. 2005, GANJAM u. EVANS 2006). Demgegenüber können KIESOW et al. (2011) keinen eindeutigen pathogenetischen Einfluss von Wachstumsfaktoren der TGF-Familie nachweisen, schließen jedoch eine Beteiligung anderer profibrotisch wirkender Wachstumsfaktoren am Krankheitsverlauf nicht aus.

Häufig zeigen von einer Endometrose betroffene Stuten auch entzündliche Alterationen des Endometriums (KENNEY u. DOIG 1986, FERREIRA-DIAS et al. 1994, FLORES et al. 1995, SCHOON et al. 1997b, HOFFMANN et al. 2009). Dabei wird

die Endometritis von einigen Autoren in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Entstehung der Endometrose gesehen (RICKETTS u. ALONSO 1991a, FLORES et al. 1995), während DOIG et al. (1981) die Entzündung als Folge einer herabgesetzten Resistenz der degenerativ vorgeschädigten Gebärmutter Schleimhaut betrachten. SCHOON et al. (1995) gehen davon aus, dass Endometritis und Endometrose voneinander unabhängige Prozesse darstellen.

Eine Schlüsselrolle in den Pathogenesemechanismen der equinen Endometrose wird lokalen hypoxischen Zuständen zugesprochen. So kommt es durch die periglanduläre Bindegewebszubildung zu einer Erhöhung der Diffusionsbarriere und somit zu einer Minderversorgung der Drüsenepithelzellen mit Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonen und Wachstumsfaktoren (RAILA 2000). Gegenüber dieser sekundär auftretenden Hypoxie ist jedoch auch ein primärer kausalpathogenetischer Zusammenhang zwischen einer Sauerstoffminderversorgung des Endometriums und der Entstehung einer Endometrose in Betracht zu ziehen (GRÜNINGER 1996, SCHOON et al. 1997b), da eine Assoziation zwischen dem Auftreten von degenerativen Blutgefäßveränderungen (Angiosen) und der Endometrose besteht (SCHOON et al. 1997b, GRÜNINGER et al. 1998, HOFFMANN 2006).

Bezüglich der individuellen Prädisposition für die Entwicklung einer Endometrose in einem jüngeren Lebensalter und mit höherem Schweregrad der Erkrankung scheinen genetische Faktoren eine Rolle zu spielen (ODDSDOTTIR et al. 2008).

2.4 Endometrium *in vitro*

2.4.1 Allgemeine Betrachtungen

Aufgrund des endometrialen Zyklus (siehe Kap. 2.2.3, S. 8 ff.) unterliegen die Milieubedingungen in der Gebärmutter Schleimhaut ständigen Veränderungen. Daher kann für bestimmte Fragestellungen neben Untersuchungen am lebenden Tier (*in vivo*) oder an fixierten Gewebeproben (*in situ*) die Durchführung von Versuchen an außerhalb des Organismus kultivierten Zellen (*in vitro*) sinnvoll sein. Sie ermöglichen eine von individuellen Schwankungen losgelöste Betrachtung von zellulären Reaktionen auf exakt definierbare äußere Stimuli sowie von Interaktionen verschiedener Zellarten (FINDLAY et al. 1990). Zudem kann durch die Verwendung von Zellkulturmodellen häufig die Anzahl und/oder das Ausmaß von Tierversuchen reduziert und dadurch ein entscheidender Beitrag zum Tierschutz geleistet werden.

Bei zahlreichen Spezies existieren Protokolle zur Isolierung und Primärkultur endometrialer Epithel- und Stromazellen. Eine Auswahl ist in Tab. 2.3 (S. 18) dargestellt. Diese beinhaltet bezüglich der Tierart Pferd auch eigene Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010, THEUSS et al. 2010).

Tab. 2.3: Auswahl endometrialer Zellkulturmodelle verschiedener Spezies

Spezies	Autoren
Pferd	BRADY et al. (1992, 1993), WATSON et al. (1992), DAY et al. (1998), BUSCHATZ (2007), BÖTTCHER et al. (2010), THEUSS et al. (2010)
Mensch	KIRK et al. (1978), SATYASWAROOP et al. (1979), OSTEEN et al. (1989), VIGANÒ et al. (1993), BENTIN-LEY et al. (1994), CLASSEN-LINKE et al. (1997), FLEMING (1999), MYLONAS et al. (2003b)
Maus	WEWER et al. (1986), UCHIMA et al. (1991)
Ratte	BITTON-CASIMIRI et al. (1977), PIVA et al. (1996)
Meerschweinchen	CHAMINADAS et al. (1986), ORDENER et al. (1993)
Kaninchen	GERSCHENSON et al. (1979), WANG et al. (2010)
Schwein	ZHANG et al. (1991), DAY et al. (1998)
Rind	FORTIER et al. (1988), YAMAUCHI et al. (2003)
Schaf	CHERNY u. FINDLAY (1990), SHELDRIK et al. (1993)

2.4.2 Material

Bei der *In-vitro*-Kultur eukaryoter Zellen ist zwischen drei Hauptmethoden zu unterscheiden: Organkultur (Kultivierung ganzer Organe oder größerer Organteile), Explantatkultur (Kultivierung kleinerer Gewebestückchen, aus denen Zellen in die Ebene der Wachstumsoberfläche auswachsen) und Zellkultur (Kultivierung einer Zellsuspension mechanisch und/oder enzymatisch dissoziierten Gewebes) (FRESHNEY 2010).

Bei der Organkultur findet keine wesentliche Zellproliferation statt, da die Zellen nur am Rand des Gewebestückes auswachsen können. Daher werden für jeden Versuch größere Mengen frischen Gewebes benötigt (FRESHNEY 2010). Aus ethischen Gründen, aber auch unter Berücksichtigung des praktisch-organisatorischen Arbeitsaufwandes, erscheint daher eine Organkultur des Pferdeuterus wenig vertretbar. Daher wird diese Methode der *In-vitro*-Kultur in den nachfolgenden Ausführungen nicht eingehender betrachtet.

Die Explantatkultur ist eine vergleichsweise einfache Methode, da sie keine Dissoziation des Gewebes erfordert (TRENT et al. 1980, SHARMA et al. 2002, FRESHNEY 2010). Die am Rand des Explantates auswachsenden Zellen bilden einen Hof um das Gewebestück herum. Sie unterliegen dabei jedoch einer Migrations- und Anheftungsselektion. Weitere Nachteile sind die nicht genau definierbare Menge der eingesäten Zellen sowie die im Vergleich zur Kultur von dissoziierten Zellen längere

Kulturdauer (FRESHNEY 2010). In die nachfolgenden Betrachtungen werden Explantatkulturen deshalb nicht näher einbezogen.

Für Zellkulturen des Endometriums eignen sich als Ausgangsmaterial neben Geschabseln der Gebärmutter Schleimhaut (VARMA et al. 1982) vor allem transzervikal entnommene Endometriumbiopsate (WATSON et al. 1992, BRADY et al. 1993, BENTIN-LEY et al. 1995, BUSCHATZ 2007) sowie operativ oder postmortal gewonnene vollständige Uteri (CHERNY u. FINDLAY 1990, TIEMANN et al. 1994, ARSLAN et al. 1995, CLASSEN-LINKE et al. 1997). Gegenstand der folgenden Ausführungen sind aus Biopsaten oder aus ganzen Uteri gewonnene endometriale Zellen.

2.4.3 Isolierung

Die Isolierung von Zellen aus einem Gewebeverband kann mittels mechanischer (Zerschneiden) oder enzymatischer (Verdauung) Verfahren erfolgen, wobei häufig eine Kombination beider Methoden zum Einsatz kommt. Beide Isolierungstechniken gehen mit einer Schädigung eines Teils der Zellen einher, die sich nachteilig auf die Ausbeute lebender Zellen auswirkt (FRESHNEY 2010).

Für die enzymatische Dissoziation endometrialen Gewebes können verschiedene Enzyme (auch in Kombination) Verwendung finden, wie z. B.:

- Dispase/Pankreatin (DAVIS u. BLAIR 1993, ARSLAN et al. 1995)
- DNase (CASSLEN u. HARPER 1991, ZHANG et al. 1991, BRADY et al. 1992, 1993)
- Hyaluronidase (VARMA et al. 1982)
- Kollagenase (SATYASWAROOP et al. 1979, ZHANG et al. 1991, BRADY et al. 1992, 1993, WATSON et al. 1992, CLASSEN-LINKE et al. 1997, ARNOLD et al. 2001, BUSCHATZ 2007)
- Trypsin (VARMA et al. 1982, ZHANG et al. 1991, LÜ et al. 2009).

Jedes Enzym weist bestimmte Vor- und Nachteile seines Einsatzes auf. So führt eine Trypsin-Behandlung beispielsweise zu einer schnellen Dissoziation des Gewebes (FRESHNEY 2010). Bei einigen Zellarten kommt es durch dieses Enzym jedoch zu einer nicht unerheblichen Zellschädigung (FRESHNEY 1972). Auch ist Trypsin nicht für den Verdau kollagenreichen Gewebes geeignet. Für die Gewinnung von prä-existenten Zellverbänden (z. B. aus Drüsen) ist Trypsin nicht nutzbar, da das Gewebe zu Einzelzellen dissoziiert (FRESHNEY 2010).

Zur Unterstützung des Zerfalls epithelialer Zellverbände zu Einzelzellen kann bei der enzymatischen Behandlung ein kalzium- und magnesiumfreies Medium verwendet werden, da hierdurch die Integrität der zellverbindenden *tight junctions* herabgesetzt wird (FINDLAY et al. 1990).

2.4.4 Separation

Basierend auf ihren spezifischen Eigenschaften kann eine Trennung der verschiedenen aus einem Gewebe isolierten Zellarten erfolgen, um eine definierte Kultur der gewünschten Zellpopulationen zu schaffen. Durch das somit im Verlauf der späteren Kultivierung der Zellen (siehe Kap. 2.4.6, S. 22 ff.) ermöglichte räumlich getrennte Wachstum verschiedener Zellarten wird das „Überwuchern“ einer langsamer proliferierenden durch eine teilungsaktivere Zellpopulation verhindert (FRESHNEY 2010). So kann bereits eine geringe Kreuzkontamination bei der Einsaat endometrialer Zellen in die Kulturgefäße zu einer „Überwucherung“ der epithelialen durch die Stromazellen Zellen führen (MATTHEWS et al. 1992, BUSCHATZ 2007).

Im Anschluss an die enzymatische Dissoziation endometrialen Gewebes liegen die Stromazellen als Einzelzellen vor (WATSON et al. 1992, BUSCHATZ 2007). Bei den Epithelzellen kann dies, je nach dem verwendeten Enzym, ebenso der Fall sein (siehe Kap. 2.4.3, S. 19). Jedoch resultiert eine Einsaat von Drüsenclustern in die Kulturgefäße in einer höheren Überlebensrate der Zellen (MATTHEWS et al. 1992, CLASSEN-LINKE et al. 1997, MYLONAS et al. 2003b) (siehe Kap. 2.4.5, S. 21 f.). Zudem ermöglichen die erheblichen Größen- und Gewichtsunterschiede zwischen den kleineren/leichteren Stromazellen und den größeren/schwereren Drüsenclustern eine Zellseparierung mittels Filtration (CLASSEN-LINKE et al. 1997, ARNOLD et al. 2001, MYLONAS et al. 2003b, BUSCHATZ 2007, LÜ et al. 2009) und/oder Sedimentation (CASSLEN u. HARPER 1991, WATSON et al. 1992, MYLONAS et al. 2003b, BUSCHATZ 2007). Eine weitere Möglichkeit der Auftrennung mit Hilfe der physikalischen Eigenschaften der Zellen stellt die diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation (isopyknische Sedimentation) dar. Bei diesem Verfahren kommt es, je nach dem spezifischen Gewicht der Zellen/Zellverbände, zu einer Akkumulation der jeweiligen Zellpopulation an der Grenzfläche zweier Lösungen unterschiedlicher Dichte (FERNANDEZ-SHAW et al. 1992, MYLONAS et al. 2003b, BUSCHATZ 2007, FRESHNEY 2010).

Das unterschiedliche Anheftungsverhalten verschiedener Zellarten an ein Substrat wird bei der Separationsmethode der Differenzialadhärenz genutzt (FRESHNEY 2010). Obwohl die endometrialen Stromazellen kleiner und leichter sind als die Epithelzellverbände, heften sie sich schneller (innerhalb von 15 bis 30 min) auf Plastikoberflächen an, so dass die epithelialen Zellen mit dem Überstand abgesaugt werden können (YAMAUCHI et al. 2003).

Mit Hilfe dieser einzeln oder kombiniert angewendeten Verfahren werden bei der Separation endometrialer Epithel- und Stromazellen Reinheitsgrade von 51 bis 99 % (Epithelzellen) (FERNANDEZ-SHAW et al. 1992, WATSON et al. 1992, CLASSEN-LINKE et al. 1997, BUSCHATZ 2007) bzw. 90 bis 98 % (Stromazellen) (FERNANDEZ-SHAW et al. 1992, WATSON et al. 1992, BHARGAVA PERIWAL et al. 1995, BUSCHATZ 2007) erreicht.

Grundsätzlich können auch immunologische Verfahren bei der Separation verschiedener Zellarten zur Anwendung kommen. So ist es möglich, kontaminierende Fibroblasten mit Hilfe einer Komplementreaktion aus einer Epithelzellkultur zu entfernen (SINGER et al. 1989). Bei der magnetischen Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS®) wird die abzusondernde Zellart mit für sie spezifischen Antikörpern markiert, die an superparamagnetische Mikropartikel gebunden sind. Beim anschließenden Passieren eines Magnetfeldes werden die markierten Zellen von den übrigen, nicht-markierten Zellen getrennt (MILTENYI et al. 1990). Allerdings haben beide Verfahren bisher keine Anwendung bei der Separation equiner endometrialer Zellen gefunden. Die für die Methode der magnetischen Zellseparation kommerziell erhältlichen Anti-human-Fibroblasten-Antikörper besitzen zudem nur eine sehr geringe Kreuzreaktivität mit equinen Fibroblasten (SHIBESHI et al. 2008).

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) werden die zu gewinnenden Zellarten aufgrund ihrer Kennzeichnung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern von einem Laserstrahl detektiert und mit Hilfe eines elektrischen Feldes in die entsprechenden Zielgefäße abgelenkt (BONNER et al. 1972). Auch dieses Verfahren ist bisher nicht bei equinen Endometriumzellen zum Einsatz gekommen.

Als Kontaminanten in Kulturen endometrialer Epithel- und Stromazellen treten MATTHEWS et al. (1992) zufolge vereinzelt Faktor-VIII-positive Zellen (Gefäßendothelien) auf. Demgegenüber kann BUSCHATZ (2007) nach der Separation von epithelialen und stromalen Zellen des Pferdeendometriums keine positiv für den Endothelzellmarker CD 31 reagierenden Zellen nachweisen.

2.4.5 Vitalität

Im Zuge ihrer Isolierung und Separation unterliegen die Zellen, wie auch im Verlauf der späteren Kultivierung, einem ausgeprägten Selektionsdruck. Dadurch kommt es zu einem Absterben zahlreicher Zellen (FRESHNEY 2010). Um eine definierte Anzahl vitaler Zellen in die Kulturgefäße einzusäen, ist folglich eine Unterscheidung lebender und toter Zellen nötig. Lichtmikroskopisch ist dies anhand rein morphologischer Kriterien jedoch nicht möglich, so dass Vitalitätstests eingesetzt werden müssen. Hierfür werden neben Farbstoffaufnahme-, Chromfreisetzungs- und Stoffwechselfests am häufigsten Farbstoffausschlusstests genutzt. Diese beruhen auf der Farbstoff-Undurchlässigkeit der Membranen vitaler Zellen (FRESHNEY 2010). Meist wird als Farbstoff Trypanblau verwendet, da dieses Verfahren einfach, schnell und preisgünstig ist. Die Auszählung kann manuell in Hämocytometern (z. B. Neubauer-Zählkammer) oder maschinell in elektronischen Zellzählern erfolgen (LINDL 2000). Die manuelle Zählung ist bei Vorliegen einer Einzelzellsuspension unproblematisch. Liegen bei der Zellzählung hingegen größere Zellverbände (beispielsweise Drüsenschläuche) vor, wird eine korrekte Erfassung der Zellzahl

aufgrund der dreidimensionalen Überlagerung erschwert (BUSCHATZ 2007). Vorteil der Einsaat größerer endometrialer Epithelzellverbände ist ihre im Vergleich zu Einzelzellen deutlich höhere Vitalität. So geben FORTIER et al. (1988) und TAKAHASHI et al. (2001) Anteile von über 95 % bzw. 90 % vitaler Zellen an. VIGANÒ et al. (1993) stellen hingegen nach der enzymatischen Zerkleinerung der Drüsenschläuche in Einzelzellen bis hin zu maximal aus 20 Zellen bestehenden Verbänden eine Vitalitätsrate von 60 % fest.

Für die Lebensfähigkeit der Zellen spielt die Zeitdauer zwischen der Entnahme des Gewebes bzw. dem Tod des Individuums und dem Beginn der Isolierung eine entscheidende Rolle. BUSCHATZ (2007) erreicht bei unmittelbar nach der Entnahme bzw. innerhalb von einer Stunde weiterverarbeiteten Endometriumbiopsaten respektive ganzer Uteri von Pferden einen Anteil vitaler Epithelzellen von bis zu 64 %. Beträgt die Zeitspanne bis zum Beginn der Isolierung 15 Stunden, sinkt der Anteil lebensfähiger epithelialer Zellen der Autorin zufolge auf 30 % ab. Bezüglich der entsprechenden Vitalitätsraten der Stromazellen gibt BUSCHATZ (2007) Werte von maximal 93 % (Zeitspanne von höchstens einer Stunde) bzw. minimal 50 % (Beginn der Weiterverarbeitung nach 15 Stunden) an. Andere Autoren berichten von 72 bis 95 % vitalen humanen Stromazellen bei unmittelbarem Beginn der Zellisolierung (BHARGAVA PERIWAL et al. 1995, BLÄUER et al. 2005).

Versuche zur Kultivierung endometrialer Zellen euthanasierter Pferde führen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während BUSCHATZ (2007) keine lebenden Zellen gewinnen kann, gelingt die Anzüchtung in eigenen Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010, THEUSS et al. 2010).

2.4.6 Kultivierung

Den Milieubedingungen kommt eine erhebliche Bedeutung für die Beeinflussung der Zellkultur zu, insbesondere hinsichtlich der Differenzierung der gezüchteten Zellen (siehe Kap. 2.4.8, S. 27). Die wichtigsten Kulturbedingungen sind die Wachstumsoberfläche, das Nährmedium, die Gasphase und die Inkubationstemperatur (FRESHNEY 2010).

2.4.6.1 Wachstumsoberfläche

Bei Kulturen endometrialer Zellen kommen verschiedene Wachstumsoberflächen (Substrate) zum Einsatz. Seit den Anfängen der Zellkultivierung werden Zellen auf Glasoberflächen angezüchtet. Dieses Material kommt bei der Kultur nicht-pflanzlicher Zellen heute nur noch in geringem Umfang zur Anwendung (LINDL 2000, FRESHNEY 2010). Häufig werden dagegen kompakte Plastikoberflächen (z. B. Polystyrol, Polypropylen) in Form von Kulturflaschen oder Vielfachschalen (sog. Multiwellplatten) verwendet (WATSON et al. 1992, LINDL 2000, MYLONAS et al. 2003b,

BUSCHATZ 2007). Sie bieten die Vorteile einer guten optischen Durchlässigkeit und einer ebenen Beschaffenheit, welche ein gleichmäßiges Bewachsen ermöglicht (FRESHNEY 2010). Zur Förderung der Zelldifferenzierung kann die Kultivierung auf konditionierten/beschichteten Oberflächen erfolgen. Als Substrate können hierbei u. a. Kollagen, Laminin, Fibronectin oder kommerziell erhältliche Substanzmischungen (z. B. Matrigel™) dienen (MUNSON et al. 1990, CASSLEN u. HARPER 1991, HOPFER et al. 1994, XIAO u. GOFF 1998, YAMAUCHI et al. 2003, BUSCHATZ 2007). Bei Matrigel™ handelt es sich um ein aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom der Maus extrahiertes Basalmembranpräparat (ANON. 2008). Seine Hauptbestandteile sind Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane und Entaktin/Nidogen (KLEINMAN et al. 1982, 1986). Zudem sind natürlicherweise in dem oben genannten Tumor vorkommende Wachstumsfaktoren, wie z. B. TGF- β , EGF, IGF und *fibroblast growth factor* enthalten (MCGUIRE u. SEEDS 1989, VUKICEVIC et al. 1992).

Weiterhin können Membraneinsätze für Multiwellplatten zur Anwendung kommen. Die Membranen werden unbeschichtet oder beschichtet verwendet (MUNSON et al. 1990, BUSCHATZ 2007). Im Gegensatz zu kompakten Materialien sind in den Membranen Poren vorhanden, die einen zweiseitigen Kontakt mit dem Kulturmedium ermöglichen (LINDL 2000). Dies stellt einen entscheidenden Faktor für die Zelldifferenzierung *in vitro* dar, da die Nährstoff- und Wachstumsfaktorzufuhr und somit auch die Ausbildung der entsprechenden Transportkanäle bzw. Rezeptoren im basolateralen Zellkompartiment erfolgen können. Somit ist eine Polarisierung der kultivierten Zellen eher möglich als bei Anzüchtung auf nicht-permeablen Oberflächen, bei denen nur ein einseitiger Kontakt mit dem Medium besteht (BALCAROVA-STÄNDER et al. 1984, SIMONS u. FULLER 1985).

2.4.6.2 Medien

Zellkulturmedien enthalten neben Wasser in der Regel Aminosäuren, Salze, Vitamine, Glukose, weitere organische Supplemente und anorganische (Natriumhydrogenkarbonat, NaHCO₃) oder organische (HEPES) Puffer (FRESHNEY 2010). Kommerziell sind zahlreiche verschiedene standardisierte Medien erhältlich, die allein oder gemischt sowie mit oder ohne Zusatz von Blutserum und weiteren Additiven zum Einsatz kommen können. Für die Kultur endometrialer Zellen werden als kommerzielle Basismedien meist RPMI 1640 (XIAO u. GOFF 1998, GROOTHUIS et al. 2002, BUSCHATZ 2007) sowie Mischungen aus DMEM und Ham's F-12 (CASSLEN u. HARPER 1991, YAMAUCHI et al. 2003) verwendet.

Häufig wird diesen Basismedien neben Antibiotika und Antimykotika auch Blutserum als unspezifischer Wachstumsförderer zugesetzt (LINDL 2000, FRESHNEY 2010). Serum unterliegt individuellen Schwankungen und enthält sehr viele verschiedene Einzelsubstanzen (u. a. Hormone, Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren, Wachs-

tumsfaktoren, Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente, Albumin), von denen einige nicht eindeutig definiert (z. B. Wachstumsfaktoren), andere wiederum sogar unerwünscht (Toxine, Pyrogene, Bakterien, Pilze, Viren) sind (LINDL 2000, SCHMITZ 2007, FRESHNEY 2010).

Um qualitative und quantitative Schwankungen der Zusammensetzung des Kulturmediums zu vermeiden, kann eine serumfreie Kultivierung erfolgen, wie sie auch im Falle endometrialer Zellen von CASSLEN u. HARPER (1991) sowie MAHFOUDI et al. (1991, 1992) beschrieben wird. Je nach Art der serumfrei kultivierten Zellen kann der Zusatz definierter Wachstumsfaktoren erforderlich sein, um beispielsweise eine Wachstums- oder Adhäsionsförderung, eine Suppression des Wachstums unerwünschter Zellen oder eine Differenzierungsinduktion zu erreichen (FRESHNEY 2010).

Der pH-Wert des Mediums sollte in der Regel 7,4 betragen (FRESHNEY 2010). Ein Austausch des „verbrauchten“ durch „frisches“ Kulturmedium erfolgt abhängig von Zellart, Zelldichte, Wachstumsgeschwindigkeit und Pufferkapazität des Mediums (FRESHNEY 2010). Bei equinen endometrialen Epithel- und Stromazellen wird im Abstand von ein bis sieben Tagen (WATSON et al. 1992, BRADY et al. 1993, BUSCHATZ 2007) ein derartiger Mediumwechsel durchgeführt.

2.4.6.3 Gasphase und Temperatur

Neben Sauerstoff ist Kohlenstoffdioxid (CO₂) ein wichtiger Bestandteil der Gasphase des Kulturmilieus. In der Regel wird bei konventionellen Säugetier-Zellkulturen Raumluft verwendet, der 5 % CO₂ zugesetzt werden. Während Sauerstoff am Energiestoffwechsel der Zellen teilhat, dient CO₂ der Pufferung des Kulturmediums (FRESHNEY 2010). Um dessen Verdunstung zu verhindern, ist zudem eine relative Luftfeuchtigkeit von 80 bis 100 % zu gewährleisten (LINDL 2000).

Säugetierzellen wachsen *in vitro* meist bei Temperaturen von ca. 37 °C (FRESHNEY 2010). Von Ausnahmen abgesehen (WATSON et al. 1992), werden gewöhnlich auch endometriale Zellen verschiedener Spezies bei dieser Temperatur inkubiert (BITTON-CASIMIRI et al. 1977, CHERNY u. FINDLAY 1990, BLÄUER et al. 2005, BUSCHATZ 2007).

2.4.7 Charakterisierung kultivierter Endometriumzellen

Eine eindeutige Identifizierung und eingehende Charakterisierung kultivierter Zellen ist die Voraussetzung für die Interpretation der Ergebnisse der an den Zellen *in vitro* durchgeführten Untersuchungen. Wichtige Charakterisierungskriterien sind die Zellmorphologie und der Nachweis bestimmter zellulärer Antigene (FRESHNEY 2010).

2.4.7.1 Morphologie

Sofern die Wachstumsoberfläche es durch ihre spezifischen optischen Eigenschaften ermöglicht, kann während der Kultivierung eine morphologische Charakterisierung mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie erfolgen. Dabei zeigen auf Plastikoberflächen gezüchtete endometriale Epithelzellen verschiedener Spezies eine polygonale Form, wobei die Zellen dicht nebeneinander liegen und aus Kolonien auswachsen (SATYASWAROOP et al. 1979, RICKETTS et al. 1983, MAHFOUDI et al. 1991, ZHANG et al. 1991, WATSON et al. 1992, XIAO u. GOFF 1998, BUSCHATZ 2007). Diese Zellen zeigen ZHANG u. DAVIS (2000) zufolge zwar Überlappungen, aber keine interzellulären Verbindungen oder sonstige Anzeichen einer Polarisierung.

In Querschnitten fixierter Membraneinsätze können die auf diesen Membranen kultivierten Zellen mittels konventioneller Lichtmikroskopie untersucht werden. Dabei treten endometriale Epithelzellen des Pferdes sowohl einschichtig als auch mehrschichtig oder kuppenförmig angeordnet auf (BRADY et al. 1993, BUSCHATZ 2007). BUSCHATZ (2007) beobachtet bei einem Teil der auf Matrigel™ gewachsenen Epithelzellen lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Korrelate einer Polarisierung, BRADY et al. (1993) gelingt dies zumindest elektronenmikroskopisch. Ultrastrukturelle Charakteristika einer polarisierten Differenzierung treten auch bei auf Matrigel™ gezüchteten endometrialen Epithelzellen anderer Spezies auf (GLASSER et al. 1988, NEGAMI u. TOMINAGA 1989, MUNSON et al. 1990, CLASSEN-LINKE et al. 1997, ZHANG u. DAVIS 2000). Unabhängig vom polarisierten Phänotyp kann BUSCHATZ (2007) in den auf Matrigel™ kultivierten Epithelzellen des Pferdeendometriums mittels Elektronenmikroskopie raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien und Ribosomen, jedoch keine Glykogengranula nachweisen. Endometriale Epithelzellen anderer Spezies zeigen *in vitro* eine ähnliche Ausstattung mit Zellorganellen (GLASSER et al. 1988, NEGAMI u. TOMINAGA 1989).

Auf Plastikoberflächen kultivierte endometriale Stromazellen des Pferdes und weiterer Spezies zeigen im Phasenkontrastmikroskop eine spindel- bis sternförmige Gestalt, die von mehreren Autoren als „fibroblastenähnlich“ bezeichnet wird (HOLINKA u. GURPIDE 1987, CHERNY u. FINDLAY 1990, ZHANG et al. 1991, WATSON et al. 1992). Dabei können die Zellen nicht nur als Monolayer, sondern auch übereinander wachsend auftreten (RICKETTS et al. 1983, BUSCHATZ 2007).

Auch im Zuge der Kultivierung auf Matrigel™ wird ein Übereinanderwachsen der Stromazellen beschrieben (CHERNY u. FINDLAY 1990). Im Querschnitt stellen sich equine endometriale Stromazellen, die auf Matrigel™-beschichteten Membraneinsätzen gewachsen sind, BUSCHATZ (2007) zufolge entweder als längliche Zellen mit teils sehr langen Ausläufern oder als eher kompakte ovale Zellen dar. Darüber hinaus kann diese Autorin im Zytoplasma kurze Fragmente des rauhen endoplasmatischen Retikulums, einen Golgi-Apparat und Mitochondrien, jedoch keine Sekretvakuolen nachweisen. Die Zellen besitzen eine überwiegend glatte Oberfläche und

einen variablen Gehalt an Zytoplasma. Endometriale Stromazellen anderer Spezies zeigen eine ähnliche Ultrastruktur (KIRK et al. 1978, RICKETTS et al. 1983, ZHANG et al. 1991). Dabei dient KIRK et al. (1978) das Fehlen von Mikrovilli sowie von Desmosomen bei kultivierten Stromazellen als Unterscheidungsmerkmal zu den epithelialen Zellen.

2.4.7.2 Immunzytologie

Da eine eindeutige Unterscheidung zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen anhand morphologischer Kriterien mitunter schwierig ist (KIRK et al. 1978), kann eine Zellcharakterisierung anhand des Nachweises zellulärer Antigene mit Hilfe immunzytologischer Verfahren vorgenommen werden. Zahlreiche Autoren verwenden speziesunabhängig die ausschließlich bei epithelialen Zellen auftretende Expression von Zytokeratinen als Unterscheidungsmerkmal endometrialer Zellen *in vitro* und somit zur Kontrolle der Reinheit der isolierten und separierten Zellfraktionen (ARSLAN et al. 1995, MOREAU et al. 1995, CLASSEN-LINKE et al. 1997, DAY et al. 1998, BUSCHATZ 2007, WANG et al. 2010). Dabei kommen zum Teil auch Antikörper zum Einsatz, mit denen bestimmte Subtypen der Zytokeratine spezifisch markiert werden können (MATTHEWS et al. 1992, MYLONAS et al. 2000, 2003a, 2003b). Eine Untersuchung der Zytokeratin-Subtypen ist für die Spezies Pferd bisher nur im Rahmen eigener Vorarbeiten erfolgt (BÖTTCHER et al. 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass kultivierte endometriale Epithelzellen der Stute überwiegend Zytokeratin 19 exprimieren, während die Zytokeratine 8 und 18 nur in geringem Maße nachweisbar sind.

Vimentin kann, im Gegensatz zu den Zytokeratinen, sowohl in kultivierten endometrialen Stroma- als auch Epithelzellen verschiedener Spezies exprimiert werden (MUNSON et al. 1988, ZHANG et al. 1991, MATTHEWS et al. 1992, CLASSEN-LINKE et al. 1997, MYLONAS et al. 2000, GALABOVA-KOVACS et al. 2004, BUSCHATZ 2007) und eignet sich daher nicht zur Differenzierung dieser beiden Zellpopulationen *in vitro*.

Desmin und α -GMA werden in kultivierten humanen und equinen endometrialen Stromazellen nachgewiesen (MERVIEL et al. 1995, BUSCHATZ 2007). Diesbezüglich stellt BUSCHATZ (2007) fest, dass der Anteil immunzytologisch positiv reagierender Zellen mit zunehmender Kulturdauer ansteigt. Die Anzahl Desmin-exprimierender Zellen nimmt dabei gegenüber α -GMA zeitlich verzögert zu. In kultivierten uterinen Drüsenepithelzellen des Menschen sind diese beiden Antigene immunzytologisch nicht nachweisbar (MERVIEL et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte in eigenen Vorarbeiten bei einem Teil der epithelialen Zellen des Pferdeendometriums *in vitro*, abhängig von den jeweiligen Kulturbedingungen, eine positive Reaktion für α -GMA festgestellt werden, während Desmin in keinem Fall exprimiert wurde (BÖTTCHER et al. 2010).

2.4.8 Differenzierung und Entdifferenzierung

Differenzierung bezeichnet einen Prozess, der zur Ausbildung phänotypischer Eigenschaften funktionell voll entwickelter Zellen führt. Der differenzierte Zustand von Zellen kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* reversibel sein. Die Zelldifferenzierung wird *in vivo* durch ein komplexes System verschiedenster Faktoren reguliert, die Geometrie, Wachstum und Funktion des Gewebes bestimmen. Die Gesamtheit der *in vivo* relevanten Differenzierungsfaktoren ist unter den künstlichen Bedingungen der Zellkultur in der Regel nicht vorhanden. Daher ist unter *In-vitro*-Bedingungen meist eine gewisse Entdifferenzierung zu verzeichnen, d. h. ein Verlust spezifischer phänotypischer Merkmale, die mit der reifen Zelle assoziiert sind (FRESHNEY 2010). Hinsichtlich der Kultivierung endometrialer Zellen zeigen insbesondere die Epithelzellen bei Abwesenheit von Stromazellen oder einer Extrazellulärmatrix eine Tendenz zur Entdifferenzierung (FINDLAY et al. 1990).

Das Fortschreiten der Differenzierung von Zellen geht in der Regel mit einer Reduktion oder dem Erlöschen der Proliferationsaktivität einher. Demzufolge schließen sich Zellproliferation und die Expression von Differenzierungsmarkern häufig gegenseitig aus (FRESHNEY 2010). Durch Schaffung des geeigneten Kulturmilieus (siehe Kap. 2.4.6, S. 22 ff.) kann nach FRESHNEY (2010) jedoch der Versuch der Induktion bzw. Erhaltung einer größtmöglichen Zelldifferenzierung unternommen werden, wobei vier Haupteinflussfaktoren der *In-vitro*-Differenzierung zu unterscheiden sind:

- lösliche Faktoren (Nährstoffe, Hormone, Kalziumionen, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid)
- Polarität und Gestalt (Nährstoffzufuhr, Signalübertragung)
- Zell-Zell-Wechselwirkungen (Zelldichte, Kokultur, gewebetypische Kultur)
- Zell-Matrix-Wechselwirkungen (Ladung, Konfiguration, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix).

Ein wesentliches Kriterium der Differenzierung epithelialer Zellen ist ihre Polarisierung (FRESHNEY u. FRESHNEY 2002). Des Weiteren können verschiedene zelluläre Strukturen oder Sekretionsprodukte als Differenzierungsmarker genutzt werden. In endometrialen Zellen sind dies neben ultrastrukturellen Charakteristika (CLASSEN-LINKE et al. 1997) u. a. die Zytokeratine der Drüsenepithelzellen (MOLL et al. 1983), deren Inhibin-Produktion (MYLONAS et al. 2003b) oder das Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Epithel- (CLASSEN-LINKE et al. 1997) und Stromazellen (KLEMMT et al. 2006).

2.5 Fazit aus der Literatur bezogen auf die initiale Fragestellung dieser Arbeit

Für die Spezies Pferd existieren nur wenige Zellkulturmodelle des Endometriums. Als Wachstumsoberflächen kommen dabei zumeist entweder impermeable Plastikober-

flächen oder kommerziell erhältliche Substratmischungen zum Einsatz. Während letztere häufig Wachstumsfaktoren enthalten, die die Zellproliferation und die Zelleigenschaften *in vitro* beeinflussen können und die in ihrer Gesamtheit nicht exakt definiert sind, haben impermeable Substrate einen nachteiligen Einfluss auf die Zelldifferenzierung, da sie die Ausbildung eines polarisierten Phänotyps erschweren. Diese Nachteile könnten durch die Kultivierung equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen auf permeablen, Wachstumsfaktor-freien Oberflächen vermieden werden.

Voraussetzung für den Einsatz derartiger Wachstumsoberflächen zum Studium endometrialer Erkrankungen im Zellkulturmodell ist eine eingehende Bestimmung der grundlegenden Eigenschaften der kultivierten Zellen, um in Folgeuntersuchungen mögliche Einflüsse von auf das Kultursystem einwirkenden Milieufaktoren bewerten zu können. Zudem ist hinsichtlich einer Übertragbarkeit der im Zellkultursystem erhaltenen Ergebnisse auf die Verhältnisse im lebenden Organismus ein Vergleich der Zelleigenschaften *in vitro* mit denen *in situ* unabdingbar. Als Kennzeichen einer zellulären Differenzierung können neben der Zellmorphologie unter anderem spezifische Zytoskelettbestandteile sowie zelluläre Sekretionsprodukte betrachtet werden.

Die Frage nach möglichen Einflüssen des Zyklusstandes der zur Zellgewinnung herangezogenen Stuten auf die Eigenschaften der kultivierten Zellen bleibt in der Literatur bisher unbeantwortet.

3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiergut, Material und Probenherkunft

Die 20 für diese Arbeit verwendeten Endometriumproben stammten zum einen von lebenden sowie zum anderen von toten Stuten, welche aus nicht mit der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang stehenden Gründen euthanasiert worden waren. Die Spenderstuten waren zwischen 3 und 20 Jahre alt und zeigten keine klinisch erfassbaren Anzeichen einer Genitalerkrankung.

Die transzervikale Entnahme von Endometriumproben bei den lebenden Stuten wurde gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes (Organentnahmen bei lebenden Tieren zum Zwecke der Transplantation oder des Anlegens von Kulturen oder der Untersuchung isolierter Organe, Gewebe oder Zellen ohne vorherige Eingriffe oder Behandlungen) bei der zuständigen Behörde (Landesdirektion Leipzig) unter der Nummer N 05/10 angezeigt (14.01.2010).

Nach Beobachtung des Rosseverhaltens wurden die Stuten vor der Entnahme der Gewebeproben zur Bestimmung des Zyklusstandes klinisch-gynäkologisch untersucht*, einschließlich einer rektalen manuellen und sonografischen sowie einer vaginoskopischen Untersuchung. Aus Gewebematerial von 4 Stuten wurden jeweils zu 2 verschiedenen Zeitpunkten (im Abstand von mindestens 9 Tagen) Zellisolierungen durchgeführt.

Die Ovarien der euthanasierten Stuten wurden sagittal halbiert und für 24–48 Stunden in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Nach anschließender vollständiger Lamellierung der Ovarien erfolgte anhand der An- und Rückbildung von Follikeln, Corpora lutea und Corpora albicantia eine retrospektive Bestimmung des ovariellen Zyklusstandes (ARTHUR 1958, VAN NIEKERK et al. 1973, 1975, KENNEY et al. 1979).

Eine detaillierte Charakterisierung der Tiere liefert Tab. 4.1 (S. 41).

3.2 Materialentnahme

3.2.1 Material für die Zellkultur

Die mittels einer Biopsiezange nach Kevorkian transzervikal entnommenen Endometriumbioptate* (Größe: ca. 1,0 x 0,5 x 0,5 cm; Masse: ca. 100 mg) wurden direkt nach der Entnahme in ca. 8 °C kalte *Hank's balanced salt solution* (HBSS) (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.) unter Zusatz von 2 % Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.) verbracht und zur weiteren Aufarbeitung ins Labor transportiert.

* Die klinisch-gynäkologische Untersuchung sowie die Materialentnahme erfolgte durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig.

Die Uteri der euthanasierten Stuten wurden 1 bis 2 Stunden nach dem Tod der Tiere kaudal der Zervix abgesetzt, zunächst mit Leitungswasser (Grobreinigung) und danach mit steriler HBSS abgespült. Die Öffnung der Gebärmutter erfolgte durch einen etwa 7 cm langen Schnitt im Bereich des Corpus uteri mit einer sterilen Skalpellklinge. Anschließend wurde mit einer sterilen Schere eine Endometriumprobe von ebenfalls etwa 1,0 x 0,5 x 0,5 cm Größe entnommen und, wie für die Proben lebender Stuten beschrieben, ins Labor verbracht.

3.2.2 Material für die Histologie

Den lebenden Stuten wurde ein zweites Biopat entnommen und in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Analog dazu erfolgte die Entnahme und Fixierung repräsentativer Proben des Endometriums im Bereich des Corpus uteri der euthanasierten Stuten. Daran schloss sich jeweils eine konventionelle histologische Aufarbeitung an (siehe Kap. 3.7.1, S. 35).

3.3 Isolierung

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen durch Nutzung einer Sicherheitswerkbank (Antares 48, Klasse II; Fa. Anthos Mikrosysteme, Köln) sowie steriler Arbeitsmaterialien und Reagenzien statt.

Die Bezeichnung „warm“ wird im Folgenden für eine Temperatur von 37 °C verwendet. Zur Erwärmung von Flüssigkeiten diente ein Wasserbad (W 12; Fa. Medingen, Dresden).

Abb. 3.1 (S. 31) zeigt eine schematische Übersicht der durchgeführten Isolierungs- und Separationsschritte.

3.3.1 Waschung und mechanische Zerkleinerung

Zur Entfernung von anhaftenden freien Erythrozyten, Zelldetritus und Schleim erfolgte zunächst eine Spülung der Proben in warmer HBSS. Daran schloss sich in einer Petrischale unter Zusatz einiger Tropfen warmer HBSS eine Zerkleinerung der Gewebestücke mittels Skalpell in Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge an. Diese wurden nochmals in HBSS geschwenkt.

3.3.2 Enzymatische Verdauung

Nach Absaugen der Spüllösung wurden die zerkleinerten Endometriumproben in die Verdauungslösung (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.) überführt und 3 bis 4 Stunden im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB16; Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde die Lösung kontinuierlich durch einen Laborschüttler (PS 3D;

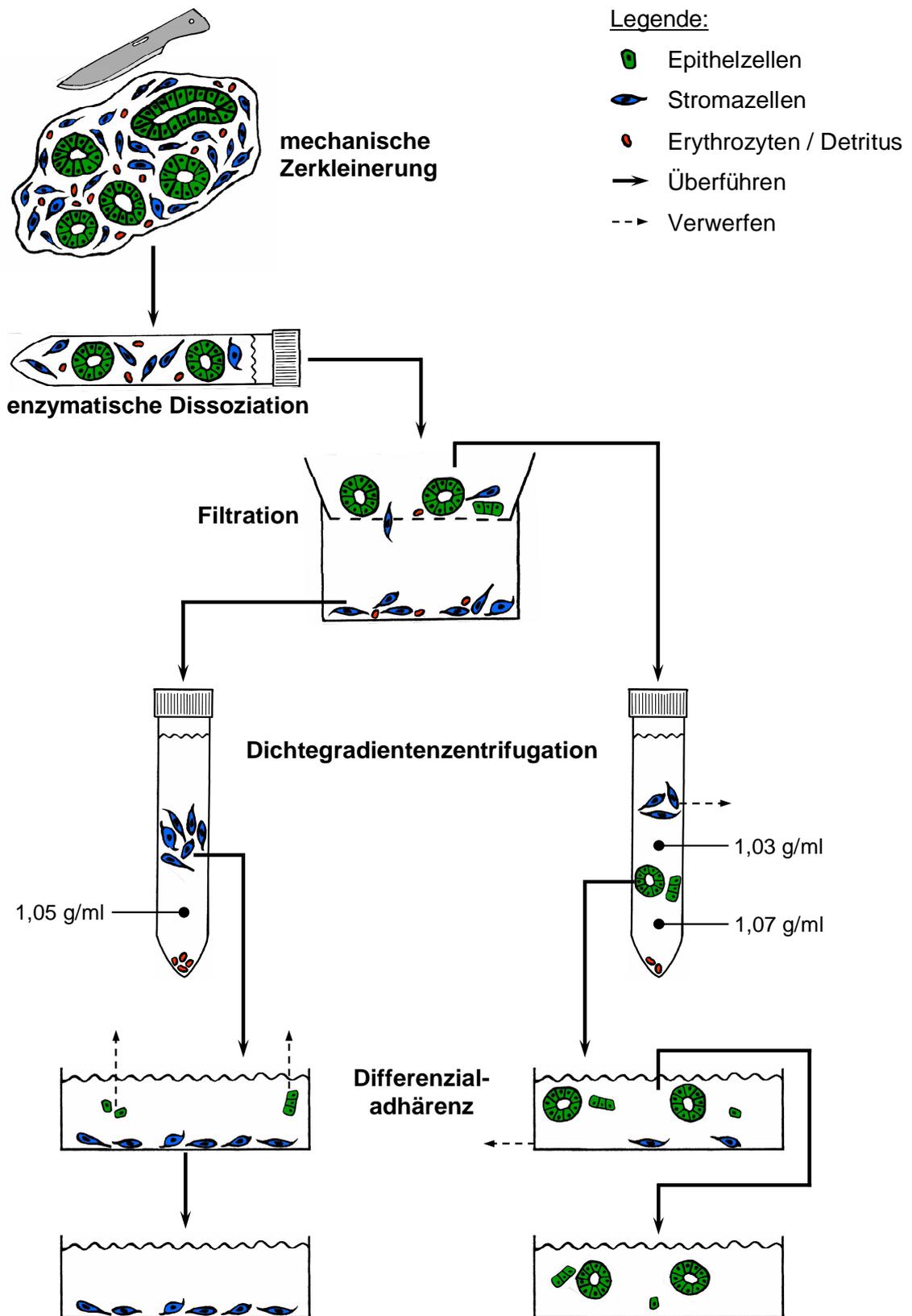


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Isolations- und Separationsschritte (modifiziert nach BUSCHATZ (2007))

Fa. Grant Instruments, Cambridge, GB) geschwenkt. Zur Beschleunigung der Gewebedissoziation erfolgte alle 30–60 min ein Aspirieren der Verdauungslösung mit einer Transferpipette (100 – 1000 μl ; Fa. Brand, Wertheim) als mechanische Unterstützung der enzymatischen Zersetzung des Gewebes. Der Dissoziationsvorgang wurde als abgeschlossen angesehen, wenn sich die Verdauungslösung als trübe, beigefarbene bis hellbraune, leicht visköse Flüssigkeit darstellte, in der sich nur noch einzelne dünne Gewebefäden befanden. Zur Kontrolle des Erfolges des Isolierungsprozesses diente ein inverses Mikroskop (CK-2; Fa. Olympus, Hamburg), mit dessen Hilfe in etwa 20 μl der Zellsuspension das Vorhandensein einzeln liegender, runder Zellen (Stromazellen) sowie zusammenhängender Drüsenverbände (Epithelzellen) überprüft wurde.

3.4 Separation

Alle Zentrifugationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Hilfe der Megafuge 3.0 R (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) für 20 min bei 15 °C und einer Drehzahl von 1400 min^{-1} durchgeführt.

3.4.1 Filtration

An die enzymatische Verdauung schloss sich nach Zusatz von ca. 5 ml warmem RPMI 1640 (Fa. PAA Laboratories, Cölbe) (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.) zu der Verdauungslösung ein Abtrennen möglicherweise verbliebener größerer Gewebestücke (Gefäße etc.) an, indem die Zellsuspension durch einlagige Mullgaze gefiltert wurde. Hierauf folgte eine grobe Trennung der in diesem Filtrat einzeln vorliegenden Stromazellen von den in Zellverbänden vorliegenden epithelialen Zellen der Uterindrüsen. Diese Separierung fand mit Hilfe eines Polyamid-Siebgebewes mit einer Maschenweite von 30 μm (Fa. VWR International, Darmstadt) statt. Dem Filtrieren der Zellsuspension schloss sich eine Spülung mit etwa 5 ml warmem RPMI 1640 an. Neben Blutzellen und Zelldetritus passieren überwiegend Stromazellen die Maschen des Siebes (= ESZ-Suspension). Die Epithelzellverbände verbleiben hingegen auf der Sieboberfläche; sie wurden mit warmem RPMI 1640 von dieser abgespült (= EEZ-Suspension).

3.4.2 Dichtegradientenzentrifugation

Da Kreuzkontaminationen mit dem jeweils anderen Zelltyp nicht auszuschließen sind, erfolgte zur Erhöhung der Reinheit der im Zuge der Filtration gewonnenen Zellfraktionen eine Feinseparation der Zellpopulationen mit Hilfe eines diskontinuierlichen Easycoll[®]-Dichtegradienten (Fa. Biochrom, Berlin) (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.). Zu dessen Herstellung wurde die Lösung höherer Dichte mit der geringeren Dichte

langsam und unter Vermeidung von Verwirbelungen überschichtet. Bei der ESZ-Suspension kam eine Easycoll[®]-Lösung der Dichte 1,05 g/ml zur Anwendung, während für die EEZ-Suspension zwei verschieden dichte Easycoll[®]-Lösungen übereinander geschichtet wurden (1,03 g/ml über 1,07 g/ml). Zum Schluss fand die Überschichtung der jeweiligen Easycoll[®]-Lösungen mit den entsprechenden Zellsuspensionen (geringste Gesamtdichte) statt.

Nach der sich anschließenden Zentrifugation erfolgte das Absaugen der an den entsprechenden Gradientengrenzen akkumulierten Zellen mittels einer Pasteurpipette (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und einer akkubetriebenen Pipettierhilfe (Pipetus[®]; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt). Die auf diese Weise gewonnenen und in warmes Nährmedium (siehe Kap. 3.6.2, S. 34) verbrachten Zellen unterliefen eine erneute Zentrifugation zur Reinigung der Zellen von noch in der Lösung verbliebener Kollagenase sowie Easycoll[®], indem die Überstände nach dieser Zentrifugation verworfen wurden.

3.4.3 Differenzialadhärenz

Die unterschiedlichen Anheftungszeiten von ESZ und EEZ an die Wachstumsoberfläche (BUSCHATZ 2007) dienten der weiteren Erhöhung der Reinheit der zu kultivierenden Zellpopulationen. Dazu erfolgte eine Aussaat der nach der letzten Zentrifugation jeweils in warmem Nährmedium resuspendierten Zellniederschläge mit anschließender 30-minütiger Inkubation im Brutschrank. Während dieser Zeit heften sich die meisten ESZ, im Gegensatz zu den EEZ, an der Wachstumsoberfläche an.

Daher fand die Aussaat der Stromazellen unmittelbar in die endgültigen Kulturgefäße statt. Nicht angeheftete Zellen wurden zusammen mit dem Mediumüberstand nach Ablauf der Inkubationszeit mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Vakuum-Saugvorrichtung (Vacuboy; Fa. Integra Biosciences, Fernwald) abgesaugt.

Bei den Epithelzellen hingegen erfolgte zunächst eine Aussaat in eine Petrischale (Innendurchmesser 36,2 mm) (Nunclon[™]; Fa. Nunc, Roskilde, DK), an deren Boden sich möglicherweise vorhandene Stromazellen anheften. Einer 30-minütigen Inkubation schloss sich die Absaugung (Pasteurpipette mit Pipettierhilfe) der noch nicht angehefteten EEZ zusammen mit dem Mediumüberstand an. Daraufhin fand die Aussaat der Zellen in die endgültigen Kulturgefäße statt.

3.5 Zellzählung und Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen

Die Ermittlung der Anzahl suspendierter Zellen sowie ihrer Lebensfähigkeit erfolgte mit Hilfe einer Lebend-/Tot-Färbung mit anschließender Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Fein-Optik, Bad Blankenburg). Dazu wurden gleiche Mengen an Zellsuspension und Trypanblau (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.) gemischt, in die Zählkammer eingebracht und die Anzahl lebender Zellen

ermittelt. Diese stellen sich farblos dar, während sich der blaue Farbstoff im Zytoplasma toter Zellen anreichert.

3.6 Kultivierung

3.6.1 Brutschrank

Die Kultivierung der beiden Zellpopulationen fand in einem Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB16; Fa. Heraeus Instruments, Hanau) in wasserdampfgesättigter Umgebung bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens statt.

Die Einsaatdichte betrug 10.000 Zellen pro cm² Wachstumsoberfläche.

3.6.2 Nährmedium (einschließlich Mediumwechsel)

Im Verlauf der Versuche kamen zwei verschiedene serumhaltige Nährmedien zum Einsatz, die sich hinsichtlich der zugesetzten Serummenge sowie verschiedener Additive unterschieden (siehe Tab. 3.1).

In der Regel wurde alle 48 Stunden ein Mediumwechsel nach vorheriger Kontrolle des Wachstumsfortschrittes (inverses Mikroskop, CK-2; Fa. Olympus, Hamburg) durchgeführt. Eine Ausnahme stellten die kultivierten EEZ dar, indem der erste Mediumwechsel nach der Aussaat erst nach 96 Stunden Kulturdauer stattfand.

Tab. 3.1: Verwendete Nährmedien

Nährmedium	“MFBS+A”	“MFBS”
Zellpopulation	ESZ ab ca. 60 % Konfluenz; EEZ	ESZ bis ca. 60 % Konfluenz
Basismedium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium ¹ (DMEM) und Ham's F-12 ¹ (1:1) 1 % Antibiotikum/Antimykotikum ¹ 0,275 % Antimykotikum ¹	
Serumzusatz	2,5 % FKS ¹	10 % FKS ¹
weitere Additive	1 % HEPES-Puffer ¹ 1 % ITS ¹ 0,5 µg/ml Hydrokortison ² 8 ng/ml EGF ³	–

¹ Fa. PAA Laboratories, Cölbe (siehe Kap. 9.1 (S. 115 ff.))

² Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.)

³ Fa. Biochrom, Berlin (siehe Kap. 9.1, S. 115 ff.)

3.6.3 Wachstumsgefäße

Als Kulturgefäße wurden hängende Millicell[®]-PET-Membraneinsätze (1,0 µm Porengröße, transparent, 12 mm Innendurchmesser) (Fa. Millipore, Bedford, USA) in 12-Well-Zellkulturplatten (Multiwell[™] TC Plate; Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) verwendet.

3.7 Lichtmikroskopie

Für alle lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Standardmikroskop (BH-2; Fa. Olympus, Hamburg) unter Verwendung von 10er, 20er und 40er Objektiven genutzt.

3.7.1 Endometrium *in situ*

Die Einbettung der Gewebeproben in Paraplast (Fa. Vogel, Gießen) fand in einem automatisierten Verfahren mittels eines Hypercenters (Fa. Shandon, Frankfurt) statt. Mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Wien, A) erfolgte die Anfertigung 3–4 µm dicker Schnitte, die auf Objektträger aufgezogen wurden.

Anschließend durchliefen die Präparate neben einer routinemäßigen Hämalaun-Eosin (H.-E.)-Färbung histochemische Verfahren in Form einer Färbung mit Alcianblau 8GS (pH 2,5) (im Folgenden vereinfachend als „Alcianblau-Färbung“ bezeichnet) sowie einer PAS-Reaktion nach McManus (MULISCH u. WELSCH 2010). Die mittels H.-E. gefärbten Präparate wurden einer routinemäßigen histopathologischen Untersuchung unterzogen, wobei insbesondere eine Beurteilung der Funktionsmorphologie der Uterindrüsen und des Vorliegens von Veränderungen im Sinne einer Endometrose sowie von entzündlichen Alterationen erfolgte. Im Falle der Alcianblau-Färbung wurde die Anzahl der pro Gewebeschnitt in 10 repräsentativen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung positiv reagierenden Zellen (hell- bis dunkelblaues intrazytoplasmatisches Material nachweisbar) ermittelt und, bezogen auf die Gesamtzellpopulation, in Prozent angegeben. Eine analoge Verfahrensweise fand für die PAS-Reaktion statt, wobei hier als positives Reaktionsprodukt magentafarbene bis hell-violette intrazytoplasmatische Granula gewertet wurden.

3.7.2 Zellpellets

Die nach der Einsaat der Zellen in die Wachstumsgefäße verbliebene Zellsuspension wurde mit 4%igem neutral gepuffertem Formalin versetzt. Nach 24-48 Stunden schloss sich die Herstellung eines Agarose-Zell-Pellets (im Folgenden vereinfachend als „Zellpellet“ bezeichnet) an.

Vorbereitend erfolgte nach der Zentrifugation (BB VV; Fa. Jouan, Saint-Nazaire, F) der Zellsuspension (20 min bei einer Drehzahl von 5000 min⁻¹) und Dekantierung des

Überstandes die Resuspension des Zell-Niederschlages in 100 µl PBS (siehe Kap. 9.2, S. 117 f.). Von einer aufgekochten und leicht abgekühlten Lösung aus 5 mg Agarose (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) in 500 µl PBS wurden 300 µl in ein zuvor auf -20 °C gekühltes Reaktionsgefäß (0,6 ml Fassungsvermögen) (Fa. Biozym Scientific, Hesisch Oldendorf) gefüllt und mit der PBS-Zell-Suspension blasenfrei vermischt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte eine Kühlung der befüllten Eppendorfggefäße für 10 min bei -20 °C. Das ausgeleitete Pellet wurde dann mit Hilfe einer Nadel aus dem Eppendorfggefäß gelöst, für mindestens 24 Stunden in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert und anschließend analog zu den Gewebeproben (siehe Kap. 3.7.1, S. 35) für die Lichtmikroskopie aufbereitet.

3.7.3 Kultivierte Zellen auf Membraneinsätzen

Die auf Millicell[®]-Membraneinsätzen kultivierten Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz für 24-48 Stunden in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Daran schloss sich eine Entwässerung mittels einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen an: Ethanol 70%ig für 30 min, Ethanol 80%ig für 30 min, 2-mal Ethanol 96%ig für je 30 min, 2-mal Isopropanol für je 30 min. Nach Abpräparieren der Membran von dem Kunststoffzylinder des Membraneinsatzes mit Hilfe eines Skalpell und Teilen der Membran wurden die so erhaltenen Hälften mit konventionellen Stecknadeln auf einer Korkscheibe befestigt, um ein Aufrollen der Membran zu verhindern. Nach Überführung der Korkscheiben mit den Millicell[®]-Membranen für 10 min in Essigsäurebutylester sowie anschließend für 10 min in flüssiges Paraffin (60 °C) wurden die Membranen von den Korkscheiben gelöst und senkrecht in einen Paraplast-Block eingebettet.

Anschließend erfolgte analog zu den Endometriumpuben *in situ* (siehe Kap. 3.7.1, S. 35) nach Anfertigung 3-4 µm dicker Schnitte und Aufziehen dieser auf Objektträger eine H.-E.- und eine Alzianblau-Färbung (pH 2,5) sowie eine PAS-Reaktion nach McManus.

3.8 Immunhistologie, Immunzytologie

3.8.1 Anfertigung der immunhistologischen/immunzytologischen Präparate

Die auf SuperFrost[®]-Plus-Objektträger aufgezogenen Schnitte der Membraneinsätze, der Zellpellets und der Endometriumbiopsate/Uterusproben wurden durch eine 10-minütige Xylol-Behandlung (Fa. Geyer, Hamburg) entparaffiniert und anschließend 2 x 3 min in Isopropanol sowie 3 min in 96%igem Ethanol rehydriert. Potenziell vorhandene endogene Peroxidasen wurden durch Verbringen in Methanol mit 0,5 % Wasserstoffperoxid (Fa. Merck, Darmstadt) inaktiviert. Vor dem Einbringen der Objektträger in die Coverplates[®] (Fa. Life Science, Frankfurt/Main) erfolgte zunächst

zum Nachweis der Zytokeratine 8, 18 und 19 eine Zitrat-Behandlung. Hierzu wurden die aufgezogenen Schnitte für 30 min in 96 °C heiße m Zitrat-Puffer (siehe Kap. 9.2, S. 117 f.) gekocht und nach Abkühlung bei Raumtemperatur mit *tris buffered saline* (TBS) (siehe Kap. 9.2, S. 117 f.) gespült.

Auf die in den Coverplates[®] befindlichen Objektträger wurden je 100 µl des in TBS mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) (Fa. Boehringer, Mannheim) verdünnten monoklonalen Primärantikörpers (siehe Tab. 3.2, S. 38) aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Negativkontrolle kam ausschließlich eine 1%ige BSA-Lösung in TBS zur Anwendung. Anschließend erfolgte eine Spülung durch Einbringen von je 2 ml TBS in die Coverplates[®].

Daran schloss sich eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl des Sekundärantikörpers Ratte-anti-Maus-IgG (Fa. Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS mit 1 % BSA an. Nach einem weiteren Spülschritt für alle Objektträger wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur mit 100 µl des 1:500 verdünnten Maus-Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Antikörpers (Fa. Dianova, Hamburg) in TBS mit 1 % BSA inkubiert. Eine Ausnahme bei der Sekundärantikörper-Behandlung bildeten die Schnitte für den Desmin-Nachweis: Sie wurden für 30 min mit EnVision+[®] (Fa. Dako, Hamburg) bei Raumtemperatur überschichtet.

Dem anschließenden Spülen aller Objektträger folgte ihre Entfernung aus den Coverplates[®] und eine Inkubation der Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren (Magnetrührer) mit 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Lösung (Fa. Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm) (siehe Kap. 9.2, S. 117 f.).

Einer 3-maligen Spülung mit TBS sowie einer Spülung mit destilliertem Wasser schloss sich die Gegenfärbung mit 1:20 in destilliertem Wasser verdünnter Papanicolaou-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) für 10 s an. Danach erfolgte eine erneute Spülung der Schnitte in destilliertem Wasser und die Bläuung in Leitungswasser für 5-10 min. Nach einer automatisierten Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließender Xylol-Behandlung (2 x 10 min) wurden die Schnitte eingedeckt.

Als Positivkontrollen wurden die in Tab. 3.2 (S. 38) aufgeführten Gewebe des Pferdes mitgeführt.

3.8.2 Auswertung der immunhistologischen/immunzytologischen Untersuchungen

Als positiv wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune, feingranuläre Reaktionsprodukte gewertet, die in den Negativkontrollen nicht nachweisbar waren. Alle nachgewiesenen Antigene sind ausschließlich intrazytoplasmatisch lokalisiert. Die Anzahl positiv reagierender Zellen und ihre Färbeintensität wurden semiquantitativ ermittelt und in Prozentzahlen angegeben. Dazu erfolgte pro Gewebeschnitt bzw. Membraneinsatz in 10 repräsentativen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung

eine Bestimmung der Anzahl positiv reagierender Zellen und der Intensität ihrer Farbreaktion im Verhältnis zur Gesamtzellpopulation.

Homogene hellbraune extrazelluläre Anfärbungen, im Falle der Endometriumpuben insbesondere im Bereich von Plasmainsudationen (Ödematisierung) und entnahmebedingten Quetschartefakten (bei einigen der untersuchten Biopate auftretend), wurden als „negativ“ bewertet. Gleiches gilt für das Blutabbauprodukt Hämosiderin (eisenhaltiges Pigment), welches als grobscholliges hellbraunes Material auch innerhalb der Negativkontrolle nachweisbar ist und so von einer positiven immunhistologischen Reaktion eindeutig abgegrenzt werden kann.

Tab. 3.2: Verwendete Primärantikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Spezifikation	Klon	Verdünnung	Positivkontrolle	Bezugsquelle
Vimentin	Maus-anti-Schwein	V9	1 : 400	vaskuläre Endothel- und Muskelzellen	M 0725; Dako GmbH, Hamburg
Desmin	Maus-anti-Mensch	D33	1 : 400	vaskuläre Muskelzellen	M 0760; Dako GmbH, Hamburg
α-GMA	Maus-anti-Mensch	1A4	1 : 100	vaskuläre Muskelzellen	M 0851; Dako GmbH, Hamburg
Zytokeratin 8	Maus-anti-Mensch	TS1	1 : 50	Darm	NCL-CK8-TS1; Novocastra, Newcastle upon Tyne, GB
Zytokeratin 18	Maus-anti-Mensch	DC-10	1 : 25	Endometrium	NCL-CK18; Novocastra, Newcastle upon Tyne, GB
Zytokeratin 19	Maus-anti-Mensch	b170	1 : 25	Dermis	NCL-CK19; Novocastra, Newcastle upon Tyne, GB

3.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Ausgewählte Zellkulturen (je 3 Epithelzell- und Stromazellkulturen) wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht.

3.9.1 Fixierung und Einbettung

Die Fixierung der Membraneinsätze erfolgte in 4 °C kaltem 3%igem Glutaraldehyd (Fa. Plano, Wetzlar) für mindestens 24 Stunden. Daran schloss sich eine mehrmalige

(3- bis 4-mal wechseln, insgesamt mindestens 2 Stunden) Spülung in Cacodylatpuffer (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) (0,1 mol/l) sowie eine Nachfixierung in 1%igem cacodylatgepuffertem Osmiumtetroxid (Fa. Chempur, Karlsruhe) bei 4 °C für 2 Stunden an. Darauf folgte erneut ein 2-maliges Spülen in Cacodylatpuffer mit nachfolgender Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (25 %, 50 %, 75 %, 80 %, 95 %, absoluter Alkohol) sowie in Propylenoxid. Die Proben wurden routinemäßig in Glycidether 100 (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) eingebettet.

3.9.2 Semidünnschnitte

Nach dem Antrimmen der Blöckchen wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut UCT; Fa. Leica, Bensheim) 0,3–0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und mit 1%iger Toluidinblau-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) angefärbt. Anhand dieser Schnitte wurden mittels des Standardmikroskops repräsentative Lokalisationen zur Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop ausgewählt.

3.9.3 Ultradünnschnitte

Die Herstellung 50 bis 70 nm dicker Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Diamantmesser (Elementsix; Fa. Drukker, Cuijk, NL). Die Ultradünnschnitte wurden auf mit Formvar[®] (Fa. Serva, Heidelberg) befilmte Kupfernetze (Fa. Tesla, Brno, CZ) aufgezogen. Anschließend fand eine Doppelkontrastierung mit 2,5%igem Uranylazetat für 7 min sowie nach Spülung mit destilliertem Wasser und Trocknung auf Filterpapier mit 2%igem Bleizitrat für 10 min statt.

3.9.4 Auswertung

Für die Auswertung der Ultradünnschnitte stand ein Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) mit 80 kV und 3.000- bis 250.000facher Gerätevergrößerung zur Verfügung.

3.9.5 Fotografie

Als Aufnahmemedium dienten Electron Microscope Filme (Fa. Kodak, Rochester, NY, USA). Diese wurden 4 min bei 20 °C in Entwickellösung (Kodak D19 Plano W; Fa. Plannet, Wetzlar) entwickelt, 15 min bei 20 °C fixiert, für 20 min in Leitungswasser gewässert und anschließend getrocknet (RC-Trockner 30; Fa. Kindermann, Ochsenfurt). Die Aufnahmen wurden durch Scannen (Epson Perfection V700 Photo; Seiko Epson Corporation, Tokio, J) der Negative in digitaler Form verfügbar gemacht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Material

Die insgesamt 20 Endometriumproben wurden in 14 Fällen durch transzervikale Biopsie lebender Stuten gewonnen. Für die übrigen 6 Kulturansätze standen vollständige Uteri euthanasierter Stuten zur Verfügung.

Eine detaillierte Charakterisierung der Spenderstuten ist der Tab. 4.1 (S. 41) zu entnehmen.

4.1.1 Zyklusstand

Die lebenden Stuten befanden sich in der Phase des Winteranöstrus ($n = 5$) bzw. wiesen klinische Anzeichen des Östrus auf ($n = 5$). Die übrigen 4 Proben wurden interöstrischen Tieren entnommen. Die Ovarien der 6 toten Stuten zeigten in 3 Fällen zum Interöstrus und in einem Fall zum Östrus passende Funktionskörper. Bei einer weiteren Stute konnte anhand der ovariellen Morphologie keine eindeutige Zuordnung zu einer Zyklusphase erfolgen, da keine Gelbkörper, sondern nur mehrerermaßen groß Follikel und Corpora albicantia nachweisbar waren, so dass unter Berücksichtigung der jahreszeitlichen Verhältnisse bei der Probenentnahme bereits von einem Übergang in die Phase der physiologischen Inaktivität auszugehen ist (Übergangszyklus). Bei einer der Stuten lag zum Zeitpunkt des Todes eine Gravidität vor (Fetus mit 11,5 cm Scheitel-Steiß-Länge und einer Körpermasse von 37 g).

4.1.2 Histopathologische Beurteilung der Endometriumproben

Bei der histopathologischen Untersuchung der H.-E.-gefärbten Endometriumproben zeigen 15 der zur Zellgewinnung herangezogenen Uteri endometrotische Veränderungen (graduell zwischen dezent und gering- bis mittelgradig variierend). Bei 3 dieser Stuten liegen zudem entzündliche Alterationen des Endometriums vor (graduell von dezent bis mittelgradig variierend). Insgesamt 5 Spenderstuten weisen weder entzündliche noch endometrotische Veränderungen auf. In 17 Proben besitzen die Uterindrüsen eine sekretorische ($n = 9$), proliferative ($n = 3$) oder inaktive ($n = 5$) Funktionsmorphologie, wobei bei einer der Stuten mit sekretorischer endometrialer Differenzierung eine Gravidität vorliegt. Eines der 3 übrigen Endometrien befindet sich in einem Übergangsstadium zwischen Sekretion und Proliferation, während die Uterindrüsen in 2 Fällen eine irreguläre Differenzierung zeigen, passend zu der Phase des Übergangs zur physiologischen Inaktivität (Übergangszyklus zum Winteranöstrus).

Tab. 4.1: Charakterisierung der Spenderstuten

Kultur- Nummer	Alter in Jahren	Art des Proben- materials	Zyklusstand	endometriale Funktions- morphologie	Endo- metritis	Endo- metrose
1	5	Bioptat	Anöstrus	inaktiv	-	+
2	12	Bioptat	Anöstrus	inaktiv	-	+
3	8	Bioptat	Anöstrus	inaktiv	-	+
4	8	Bioptat	Anöstrus	inaktiv	-	+
5	8	Bioptat	Anöstrus	inaktiv	-	+
6	3	Uterus	Interöstrus	sekretorisch	-	-
7	10	Bioptat	Östrus	proliferativ	-	+(+)
8	18	Uterus	Interöstrus	sekretorisch	+	+(+)
9	4	Uterus	Östrus	proliferativ	-	+
10	3	Uterus	Gravidität	sekretorisch	-	-
11	11	Bioptat	Interöstrus	sekretorisch	-	(+)
12	10	Bioptat	Interöstrus	sekretorisch	-	+(+)
13	7	Bioptat	Östrus	sekretorisch, Übergang zu proliferativ	-	-
14	15	Bioptat	Interöstrus	sekretorisch	-	-
15	11	Bioptat	Östrus	sekretorisch	-	-
16	11	Bioptat	Östrus	sekretorisch	-	+(+)
17	15	Bioptat	Östrus	proliferativ	-	+
18	20	Bioptat	Interöstrus	sekretorisch	-	+(+)
19	15	Uterus	Interöstrus	irregulär sekretorisch	(+)	+
20	14	Uterus	Übergang zum Anöstrus	irregulär proliferativ	++	+

Legende: - keine; (+) dezent; + geringgradig; +(+) gering- bis mittelgradig; ++ mittelgradig; ++(+) mittel- bis hochgradig; +++ hochgradig

4.2 Zellausbeute

Zur exakten sprachlichen Unterscheidung zwischen den Zellpopulationen, die im Zuge der Zellseparation voneinander getrennt und darauf basierend als Epithel- bzw. Stromazellen in die Kulturgefäße eingesät wurden, und den Zellen, die aufgrund ihrer spezifischen immunzytologischen Eigenschaften tatsächlich als Epithel- respektive

Stromazellen identifiziert wurden, werden erstere im Folgenden als mEEZ (mutmaßliche endometriale Epithelzellen) bzw. mESZ (mutmaßliche endometriale Stromazellen) bezeichnet.

4.2.1 Stromazellen

Bei der Isolierung und Separation der endometrialen Zellen können aus den transzervikal entnommenen Biopaten zwischen 1,08 Millionen und 5,21 Millionen vitale mESZ gewonnen werden. Bei der Zellisolierung aus den etwa gleich großen Endometriumpuben der euthanasierten Stuten liegt die Ausbeute lebender mESZ zwischen 1,61 Millionen und 4,91 Millionen Zellen.

4.2.2 Epithelzellen

Eine exakte Bestimmung der Zellzahl kann in der Epithelzellfraktion bei Verwendung des hier eingesetzten Isolierungs- und Separationsverfahrens nicht erfolgen, da die Epithelzellen nach der enzymatischen Dissoziation überwiegend als Zellverbände und kaum als Einzelzellen in der Suspension vorliegen. Die Drüsenschläuche bestehen nach der Aufreinigung aus etwa 50 bis 250 Zellen. Die Anzahl der Epithelzellverbände variiert je nach Drüsendichte und Ödematisierung des zur Zellgewinnung herangezogenen Gewebes.

4.3 Kultivierung

4.3.1 Kulturreinheit

Bei der im Rahmen des Mediumwechsels stattfindenden Kontrolle des Wachstumsfortschrittes zeigen die 20 mEEZ-Kulturen (bestehend aus polygonalen Zellen, die überwiegend als Verbände auftreten) stets nur eine geringe Kontamination mit einzeln liegenden, spindelförmigen Zellen (d. h. mESZ), die einen Anteil von etwa 10 % aller Zellen im Kulturgefäß nicht übersteigen.

Die mESZ-Kulturen 6 bis 20 weisen ebenfalls stets weniger als 10 % Kontamination mit mEEZ auf, wobei sich diese als einzeln oder in Gruppen von bis zu 30 Zellen liegende polygonale Zellen darstellen. Im Gegensatz dazu kann bei den aus inaktiven Endometrien in der Phase des Winteranöstrus (Kulturen 1 bis 5) gewonnenen mESZ nur in einem Fall (Kultur 2) eine vergleichbare Reinheit der Zellpopulation erzielt werden. In den 4 übrigen mESZ-Kulturen ist hingegen eine starke Kontamination mit polygonalen Zellen zu beobachten, welche bei Erreichen der Konfluenz etwa die Hälfte aller Zellen auf den jeweiligen Wachstumsoberflächen ausmachen. Diese Kulturen werden aufgrund des unzureichenden Separationserfolges daher von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (siehe Tab. 4.2, S. 46).

4.3.2 Kulturdauer

Die Zeitdauer bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens beträgt bei den mEEZ 4 bis 16 Tage und bei den mESZ 7 bis 18 Tage.

Unter Berücksichtigung der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellisolierung kann bei den mEEZ im Falle einer proliferativen Differenzierung nach 4 bis 12 Tagen, bei sekretorischer Differenzierung nach 6 bis 16 Tagen und bei inaktiven Uterindrüsen nach 5 bis 12 Tagen eine Konfluenz beobachtet werden. Diese tritt auf Seiten der mESZ nach 7 bis 8 Tagen (proliferativ), 7 bis 18 Tagen (sekretorisch) bzw. 13 Tagen (inaktiv, betrachtet wird nur Kultur 2) ein.

Die aus dem graviden Uterus isolierten mEEZ benötigen 16 Tage, die mESZ 18 Tage bis zur Konfluenz.

Sowohl mEEZ als auch mESZ der Kultur-Nummer 13 (endometriale Differenzierung im Übergang von Sekretions- zu Proliferationsphase) bilden an Tag 16 der Kultivierung einen konfluenten Zellrasen aus.

Aus dem zum Zeitpunkt der Zellisolierung irregulär sekretorisch differenzierten Endometrium gewonnene mEEZ (Kultur 19) zeigen nach 8 Tagen in Kultur eine Konfluenz. Diese kann auf Seiten der mEEZ bei irregulär proliferativer Differenzierung (Kultur 20) nach 14 Tagen beobachtet werden. Die zugehörigen mESZ dieser beiden Kulturen sind sowohl bei irregulär sekretorischer als auch irregulär proliferativer endometrialer Funktionsmorphologie des Ursprungsgewebes nach 12 Tagen konfluent.

4.4 Lichtmikroskopie

4.4.1 Endometrium *in situ*

4.4.1.1 Konventionelle Histopathologie

Eine Zusammenfassung der histopathologischen Befunde hinsichtlich der endometrialen Funktionsmorphologie sowie in Bezug auf Veränderungen im Sinne einer Endometritis oder einer Endometrose findet sich in Tab. 4.1 (S. 41).

4.4.1.2 Alzianblau-Färbung

Sowohl im zyklisch aktiven, als auch im physiologisch inaktiven, nicht endometrotisch veränderten Endometrium sind Proteoglykane ausschließlich im luminalen Epithel und in den Zellen der Drüsenausführungsgänge nachweisbar (n = 19). Dabei weisen 70–90 % beider Zellpopulationen blaue intrazytoplasmatische Reaktionsprodukte auf, welche meist wabig, teils auch feingranulär strukturiert sind, und sich hauptsächlich in den apikalen Zellabschnitten befinden. Im luminalen Epithel können im Vergleich zu den Zellen der Ausführungsgänge in der Regel größere Mengen und eine intensivere Färbung des Reaktionsproduktes beobachtet werden. Die Alzianblau-negativen

Zellen liegen disseminiert zwischen den positiv reagierenden Zellen und weisen an ihrer freien Zelloberfläche zumeist deutlich erkennbare Zilien auf (Abb. 4.1).

Im graviden Uterus ($n = 1$) stellen sich alle luminalen, duktalem und glandulären Epithelzellen Alzianblau-negativ dar.

In 12 der von einer Endometrose betroffenen Proben ($n = 15$) können in den alterierten Drüsenepithelien Proteoglykane nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Dabei variiert der Anteil positiv reagierender Zellen in den einzelnen Proben stark (10–70 %). Die Beschaffenheit des Reaktionsproduktes ist bezüglich seiner Menge und Farbintensität eher mit der der Drüsenausführungsgänge als der des luminalen Epithels vergleichbar. Sehr häufig kann lediglich eine Anfärbung des apikalen Zellsaumes beobachtet werden. Zudem findet sich des Öfteren Alzianblau-positives Material im Lumen endometrotischer Drüsen. Im periglandulären Gewebe fibrotischer Uterindrüsen tritt häufig eine Deposition von Proteoglykanen im Bereich der Extrazellulärmatrix auf.

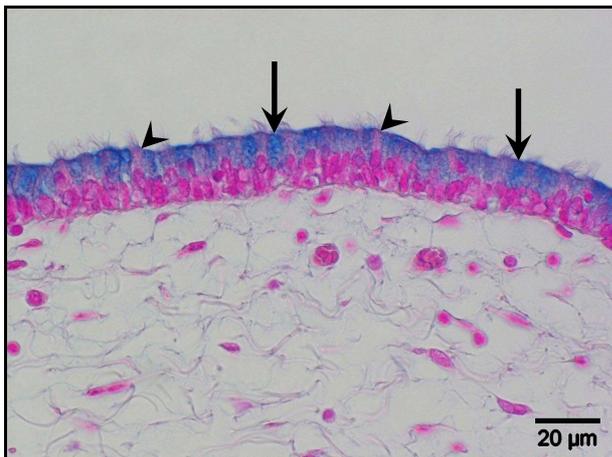


Abb. 4.1: Endometrium *in situ*.

Nachweis von Proteoglykanen in den Zellen des luminalen Epithels. Zahlreiche positiv reagierende Zellen (Pfeile), dazwischen disseminiertes Auftreten negativ reagierender, ziliierter Zellen (Pfeilspitzen).

Alzianblau-Färbung (pH 2,5)

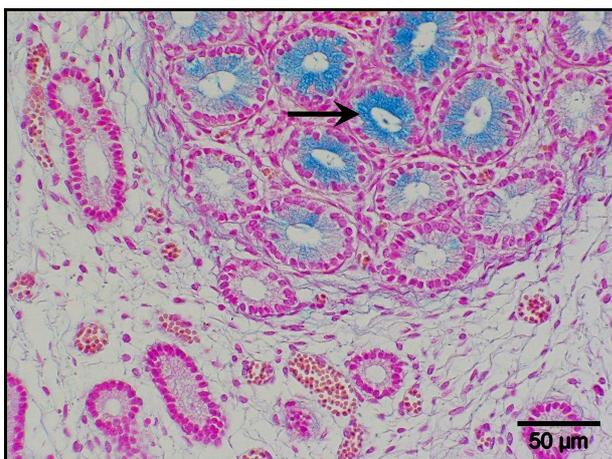


Abb. 4.2: Endometrium *in situ*.

Nachweis von Proteoglykanen in glandulären Epithelien endometrotischer Herde. Teil eines Drüsennestes mit zahlreichen positiv reagierenden Epithelzellen (Pfeil). In den Zellen der umgebenden Uterindrüsen sind keine Proteoglykane nachweisbar.

Alzianblau-Färbung (pH 2,5)

4.4.1.3 PAS-Reaktion

Im zyklisch aktiven und im physiologisch inaktiven, nicht degenerativ alterierten Endometrium sind diffus im Zytoplasma aller Zellen des luminalen Epithels und der Drüsenausführungsgänge Polysaccharide/Glykoproteine nachweisbar, wobei sich das Reaktionsprodukt wabig oder feingranulär darstellt (n = 19).

Sowohl in den unveränderten als auch in den endometrotischen Drüsenepithelien ist während des Winteranöstrus (n = 5) in der Hälfte aller Zellen und im zyklisch aktiven Endometrium (n = 14) in 90 % der Zellen PAS-positives Material erkennbar, welches überwiegend diffus wabig oder feingranulär erscheint, selten jedoch auch membranös aggregiert auftritt (Abb. 4.3). Apikale membranöse Aggregate finden sich innerhalb endometrotischer Herde tendenziell häufiger als in den unveränderten Drüsenepithelzellen. Die Farbintensität der intrazytoplasmatischen Präzipitate erscheint im Bereich der Uterindrüsen insgesamt geringer als im Oberflächenepithel und den Ausführungsgängen. In zahlreichen DrüsenSchläuchen und Ausführungsgängen tritt intraluminal schollig oder feingranulär strukturiertes PAS-positives Material auf.

Die endometrialen Drüsen im graviden Uterus (n = 1) zeigen mittels der PAS-Reaktion das gleiche Verhalten wie die Drüsenepithelien des zyklisch aktiven Endometriums. Demgegenüber sind in den luminalen und duktalem Epithelzellen keine Polysaccharide/Glykoproteine nachweisbar.

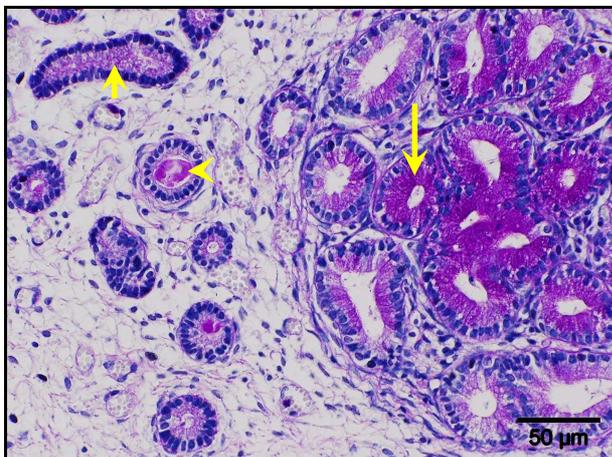


Abb. 4.3: Endometrium *in situ*.

Nachweis von Polysacchariden/Glykoproteinen in glandulären Epithelien endometrotischer Herde. Teil eines Drüsennestes mit zahlreichen intensiv positiv reagierenden Epithelzellen (langer Pfeil). In den umgebenden Drüsen schwächere Reaktion (kurzer Pfeil). Einige Drüsenlumina enthalten positives Material (Pfeilspitzen).

PAS-Reaktion

4.4.2 Zellpellets

Die Verfügbarkeit von Zellpellets zur zytologischen Untersuchung der isolierten und separierten Zellpopulationen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung ist abhängig von der Anzahl der jeweils isolierten Zellen. Dabei sollte nach der Einsaat in die Wachstumsgefäße noch eine Zahl von etwa 1 Million nicht zur Kultivierung benötigter Zellen vorhanden sein, welche einer Fixierung mit anschließender Aufarbeitung in Form ei-

nes Zellpellets unterzogen werden können. Wird diese Zahl unterschritten, ist die Zelldichte in den Pellets so gering, dass in den entsprechenden Schnittpräparaten zu wenige Zellen für eine ausreichend repräsentative Beurteilung zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit lediglich 3 Pellets der mEEZ und 14 der mESZ untersucht (siehe Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Übersicht über das ausgewertete Probenmaterial der Zellpellets und der Membraneinsätze

Kultur- Num- mer	Zellpellets		kultivierte Zellen auf Membran- einsätzen		Kultur- Num- mer	Zellpellets		kultivierte Zellen auf Membran- einsätzen	
	mEEZ	mESZ	mEEZ	mESZ		mEEZ	mESZ	mEEZ	mESZ
1	✓	–	✓	–	11	–	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	12	–	✓	✓	✓
3	–	–	✓	–	13	–	✓	✓	✓
4	–	–	✓	–	14	–	✓	✓	✓
5	–	–	✓	–	15	–	✓	✓	✓
6	–	–	✓	✓	16	–	–	✓	✓
7	–	✓	✓	✓	17	–	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	18	–	✓	✓	✓
9	–	✓	✓	✓	19	–	✓	✓	✓
10	–	✓	✓	✓	20	–	✓	✓	✓

Legende: ✓ Probe wurde ausgewertet

– Probe war nicht vorhanden oder wurde nicht ausgewertet

4.4.2.1 Zytomorphologie

Sowohl in den Zellpellets der mEEZ als auch der mESZ treten zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen auf. Eine Übersicht über deren zytologische Charakteristika bietet Tab. 4.3 (S. 47).

Hauptunterscheidungsmerkmal beider Zelltypen ist ihr Auftreten in Zellverbänden (Typ 1) bzw. als disseminiert oder in kleinen Gruppen liegende Einzelzellen (Typ 2) (Abb. 4.4, S. 47). Dabei weisen die Verbände des Zelltyps 1 häufig eine Morphologie auf, die vergleichbar ist mit der von Uterindrüsenanschnitten *in situ*. Abhängig von der jeweiligen im Zuge der Isolierung und Separation gewonnenen Zellfraktion, dominiert einer der beiden Zelltypen in den jeweiligen Proben: in den mEEZ-Pellets kommen überwiegend Typ-1-Zellen vor, während die mESZ-Pellets fast ausschließlich Zellen des Typs 2 enthalten.

Seitens der mEEZ-Pellets (n = 3) entfallen in den einzelnen Proben 60 %, 90 % bzw. 95 % auf den Zelltyp 1 und dementsprechend 40 %, 10 % bzw. 5 % auf den Zelltyp 2. In den Pellets der mESZ (n = 14) stellen sich die Anteile der Zellfraktionen deutlich einheitlicher dar: meist treten 95 % Zellen des Typs 2 gegenüber 5 % Typ-1-Zellen auf (n = 10), in einigen Fällen sind in der Schnittebene keine in Verbänden liegende Zellen (Typ 1) nachweisbar (n = 4).

Tab. 4.3: Zytomorphologie der pelletierten mEEZ und mESZ

	Zelltyp 1	Zelltyp 2
Auftreten in Zellverbänden	ja	nein
Zellform	hochprismatisch bis längsoval	rund-oval
Zellkern		
Anzahl	1	1
Lokalisation	variabel	häufig exzentrisch
Form	rundoval bis längsoval	rund, rundoval oder polygonal
Chromatingehalt	üw.* hyperchromatisch	üw. hyperchromatisch
Nukleoli	nicht erkennbar	nicht erkennbar
Mitosefiguren	keine	keine
Zytoplasma		
Menge	gering bis mäßig	gering bis mäßig
Färbung	eosinophil	eosinophil
Struktur	homogen	homogen
Zellgrenzen	undeutlich	deutlich

Legende: * überwiegend

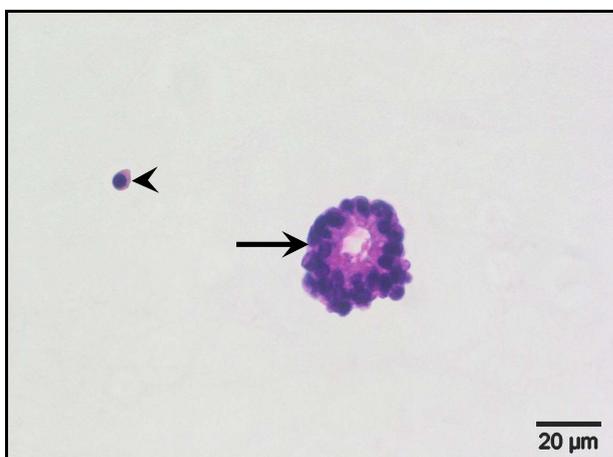


Abb. 4.4: Zellpellet, mEEZ.

Morphologisch unterschiedliche Zelltypen.

Typ 1: Auftreten in Zellverbänden, deren Gestalt Anschnitten von Uterindrüsen *in situ* ähnelt (Pfeil).

Typ 2: disseminiert liegende Einzelzellen (Pfeilspitze).

Hämalaun-Eosin-Färbung

4.4.2.2 Alzianblau-Färbung

Sowohl in den Pellets der mEEZ ($n = 3$) als auch der mESZ ($n = 14$) finden sich keine Alzianblau-positiven Zellen.

4.4.2.3 PAS-Reaktion

Insgesamt können im Zytoplasma der pelletierten mEEZ ($n = 3$) nur selten Polysaccharide/Glykoproteine nachgewiesen werden. So finden sich in den Pellets der während des Winteranöstrus isolierten mEEZ ($n = 2$) keine positiv reagierenden Typ-1-Zellen, während in dem Pellet der aus dem zyklisch aktiven Endometrium gewonnenen mEEZ ($n = 1$) 20 % der Zellen vom Typ 1 diffus oder (multi-)fokal feingranuläres bis plaqueförmiges PAS-positives Material aufweisen (Abb. 4.5). Zudem finden sich in den zentralen Hohlräumen mehrerer Verbände aus Typ-1-Zellen schollige Strukturen, die PAS-positiv reagieren. Lediglich in einem Pellet (Zellisolierung während der physiologischen Inaktivität im Winteranöstrus) treten Zellen des Typs 2 auf, deren Zytoplasma sich in der PAS-Reaktion diffus homogen angefärbt darstellt; sie machen etwa die Hälfte aller Zellen dieses Typs aus.

In allen mESZ-Pellets ($n = 14$) sind insgesamt nur sehr vereinzelt Zellen erkennbar, die diffus intrazytoplasmatisch PAS-positiv homogene oder feingranuläre Strukturen enthalten. In den Pellets, die neben den Typ-2-Zellen auch solche vom Typ 1 aufweisen ($n = 9$), zeigen etwa die Hälfte dieser in Verbänden liegenden Zellen eine positive Reaktion. Die Einzelzellen (Typ 2) reagieren nur ausnahmsweise positiv (weniger als 5 % der Zellen) (Abb. 4.6, S. 49).



Abb. 4.5: Zellpellet, mEEZ.

Nachweis von Polysacchariden/Glykoproteinen. Im Zytoplasma einiger Zellen treten fokal PAS-positive Strukturen auf (Pfeil). Positives Material findet sich darüber hinaus in den durch die Zellverbände (Zelltyp 1) gebildeten Hohlräumen (Pfeilspitze).

PAS-Reaktion

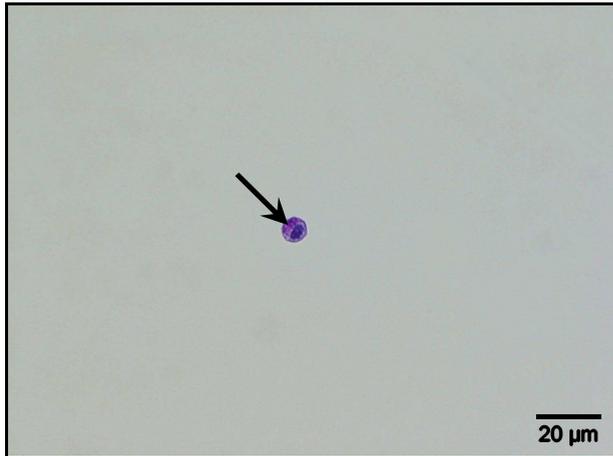


Abb. 4.6: Zellpellet, mESZ.

Nachweis von Polysacchariden/Glykoproteinen. PAS-positives Material fokal im Zytoplasma einer Zelle des Typs 2 (Pfeil).

PAS-Reaktion

4.4.3 Kultivierte Zellen auf Membraneinsätzen

4.4.3.1 Zytomorphologie

Auf den Membraneinsätzen wachsen die Zellen entweder ein- oder mehrschichtig („M“). In den einschichtigen Bereichen können drei (mEEZ) bzw. zwei (mESZ) morphologisch verschiedene Zelltypen unterschieden werden, die jedoch nicht in allen Proben gleichermaßen nachweisbar sind. Eine Übersicht über die zytologischen Charakteristika der verschiedenen Zelltypen findet sich für die mEEZ in Tab. 4.4 (S. 50) und für die mESZ in Tab. 4.5 (S. 51). Der Zelltyp 1 der mEEZ-Monolayer ist dabei anhand morphologischer Kriterien praktisch nicht vom Zelltyp 1 der einschichtig wachsenden mESZ zu unterscheiden. Gleiches gilt analog für die mEEZ-/mESZ-Zelltypen 2 bzw. M. Auch sind die Monolayer-Typ-1-Zellen beider Fraktionen denen in den mehrschichtigen Arealen morphologisch sehr ähnlich.

In allen untersuchten Proben der mEEZ-Membraneinsätze ($n = 20$) können die Zelltypen 1 und 2 (Abb. 4.7, S. 51) nachgewiesen werden. Demgegenüber sind nur in 8 Fällen mehrschichtige Areale (Abb. 4.8, S. 52) und in 6 Proben iso- bis hochprismatische Zellen (Typ 3) (Abb. 4.9, S. 52) zu beobachten. Tendenziell bedecken mehrschichtig wachsende Zellen den geringsten Anteil der jeweiligen Wachstumsoberfläche (5–15 %), während 5–30 % der Membranoberfläche in der Schnittebene von Typ-3-Zellen bewachsen sind. Der überwiegende Flächenanteil des zur Verfügung stehenden Substrates wird von den Zelltypen 1 und 2 bedeckt, die entweder in etwa gleich große Abschnitte in Anspruch nehmen ($n = 8$), oder von denen der Typ 1 ($n = 5$) bzw. der Typ 2 ($n = 7$) überwiegt, so dass insgesamt keiner dieser beiden Zelltypen gegenüber dem anderen deutlich dominiert.

Tab. 4.4: Zytomorphologie der auf Membraneinsätzen kultivierten mEEZ

	einschichtig			mehrschichtig
	Zelltyp 1	Zelltyp 2	Zelltyp 3	Zelltyp M
Zellform	rundoval bis polygonal	spindelförmig	iso- bis hochprismatisch	rundoval bis polygonal
Zellkern				
Anzahl	1	1	1	1
Form	rundoval bis längsoval	längsoval	rund bis rundoval	rundoval oder polygonal
Chromatingehalt	üw.* hypochromatisch	hyperchromatisch	üw. hypochromatisch	üw. hypochromatisch
Nukleoli	1–2 (meist 1)	meist nicht erkennbar, selten 1 sichtbar	1–2 (meist 1)	1–2 (meist 1)
Mitosefiguren	vereinzelt	keine	vereinzelt	vereinzelt
Zytoplasma				
Menge	üw. gering bis mäßig, selten reichlich	gering	gering bis mäßig	variabel (gering, mäßig, reichlich)
Färbung	eosinophil	(dunkel-) eosinophil	eosinophil	eosinophil
Struktur	wabig, z. T.** vakuolisiert, oder homogen bis feingranulär	homogen bis feingranulär	üw. wabig, z. T. vakuolisiert, selten homogen bis feingranulär	üw. wabig, z. T. vakuolisiert, selten homogen bis feingranulär
Zellgrenzen	undeutlich	undeutlich	undeutlich	undeutlich

Legende: * überwiegend; ** zum Teil

Auf nahezu allen untersuchten Membraneinsätzen mit mESZ ist sowohl der Zelltyp 1 als auch 2 (Abb. 4.10, S. 52) zu beobachten (n = 15). Dabei finden sich in der Schnittebene in 3 Fällen auf dem größten Teil der Membranoberfläche Typ-2-Zellen, während in den übrigen Proben beide Typen zu etwa gleich großen Anteilen auftreten. Gelegentlich kommen zudem von mehreren Zelllagen bedeckte Bereiche (5–30 % der Wachstumsoberfläche) vor (n = 6). Nur ausnahmsweise sind in der Schnittebene des Membraneinsatzes ausschließlich Zellen des Typs 2 nachweisbar (n = 1).

Tab. 4.5: Zytomorphologie der auf Membraneinsätzen kultivierten mESZ

	einschichtig		mehrschichtig
	Zelltyp 1	Zelltyp 2	Zelltyp M
Zellform	rundoval bis polygonal	spindelförmig	rundoval bis polygonal
Zellkern			
Anzahl	1	1	1
Form	rundoval bis längsoval	längsoval	rundoval oder polygonal
Chromatingehalt	üw.* hypo-chromatisch	hyperchromatisch	üw. hypochromatisch
Nukleoli	1–3 (meist 1)	meist nicht erkennbar, selten 1 sichtbar	1–2 (meist 1)
Mitosefiguren	vereinzelt	keine	vereinzelt
Zytoplasma			
Menge	gering bis mäßig	gering	variabel (gering, mäßig)
Färbung	eosinophil	(dunkel-) eosinophil	eosinophil
Struktur	homogen bis feingranulär oder wabig	homogen bis feingranulär	homogen bis feingranulär oder wabig
Zellgrenzen	undeutlich	undeutlich	undeutlich

Legende: * überwiegend

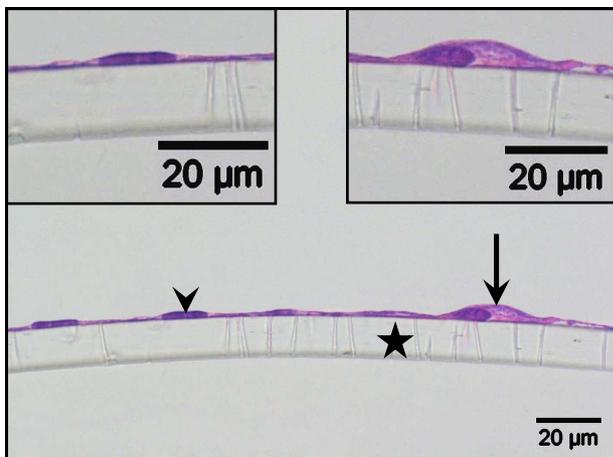


Abb. 4.7: Membraneinsatz, mEEZ. Morphologisch unterschiedliche Zelltypen auf Millicell®-Membran (Stern). Typ 1: rundovale bis polygonale Zellen (Pfeil und siehe rechtes Inset). Typ 2: spindelförmige Zellen (Pfeilspitze und siehe linkes Inset). Hämalaun-Eosin-Färbung

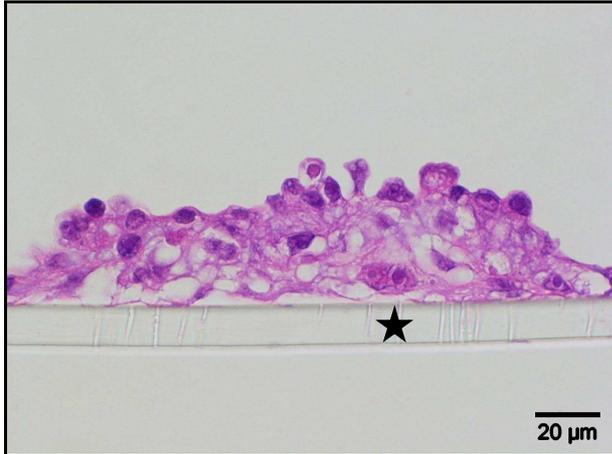


Abb. 4.8: Membraneinsatz, mEEZ.
Morphologisch unterschiedliche Zell-
typen auf Millicell[®]-Membran (Stern).
Typ M: mehrschichtig wachsende
Zellen.
Hämalaun-Eosin-Färbung

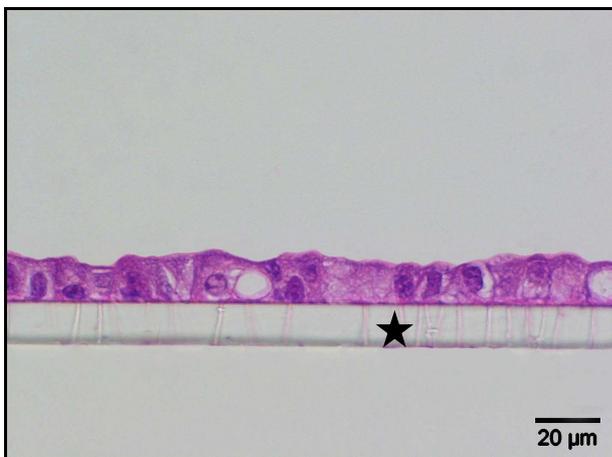


Abb. 4.9: Membraneinsatz, mEEZ.
Morphologisch unterschiedliche Zell-
typen auf Millicell[®]-Membran (Stern).
Typ 3: iso- bis hochprismatische Zellen.
Hämalaun-Eosin-Färbung

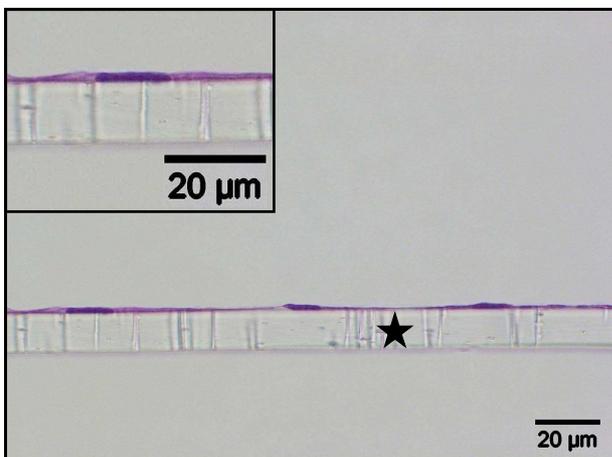


Abb. 4.10: Membraneinsatz, mESZ.
Morphologisch unterschiedliche Zell-
typen auf Millicell[®]-Membran (Stern).
Typ 2: spindelförmige Zellen.
Hämalaun-Eosin-Färbung

4.4.3.2 Alzianblau-Färbung

In den kultivierten mEEZ (n = 20) und mESZ (n = 16) sind keine Proteoglykane nachweisbar.

4.4.3.3 PAS-Reaktion

Bei den während der physiologischen Inaktivität isolierten Zellen weisen sowohl im Falle der mEEZ ($n = 5$) als auch der mESZ ($n = 1$), unabhängig von den morphologisch unterschiedlichen Zelltypen, 5 % der kultivierten Zellen ein wabiges oder feingranuläres Reaktionsprodukt in ihrem Zytoplasma auf.

Die aus den zyklisch aktiven Endometrien gewonnenen Zellen reagieren dagegen deutlich häufiger PAS-positiv: 60–100 % der mEEZ in den einzelnen Proben ($n = 15$) und 10–60 % der mESZ ($n = 15$) weisen entsprechende Präzipitate auf, die sich wabig, feingranulär oder homogen und mit deutlich variabler Farbintensität darstellen. Während alle Zelltypen der mESZ hinsichtlich des Anteils positiver Zellen etwa gleichermaßen reagieren (Abb. 4.11), scheinen seitens der mEEZ die Monolayer-Typ-3-Zellen (Abb. 4.12) tendenziell etwas häufiger (90–100 %) PAS-positives Material zu enthalten als die mehrschichtig wachsenden Zellen (80–100 %) oder die beiden übrigen Zelltypen innerhalb der Monolayer (jeweils 60–100 %).

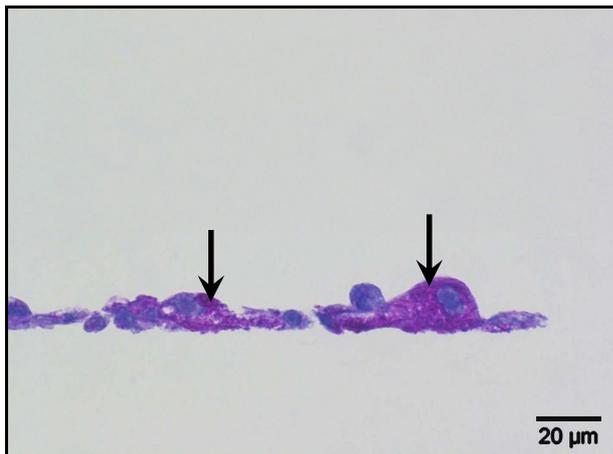


Abb. 4.11: Membraneinsatz, mESZ. Nachweis von Polysacchariden/Glykoproteinen. PAS-positives Material (Pfeile) im Zytoplasma von Zellen des Typs 2. PAS-Reaktion

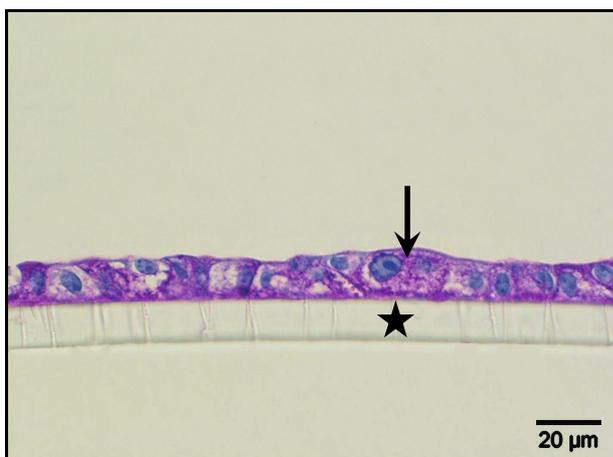


Abb. 4.12: Membraneinsatz, mEEZ. Nachweis von Polysacchariden/Glykoproteinen. PAS-positives Material (Pfeil) im Zytoplasma von Zellen des Typs 3. Stern: Millicell[®]-Membran. PAS-Reaktion

4.4.4 Zusammenfassung der histochemischen/zytochemischen Befunde

Die Zellen des luminalen Epithels und der Drüsenausführungsgänge stellen sich sowohl im physiologisch inaktiven als auch im zyklisch aktiven Endometrium *in situ* überwiegend Alzianblau-positiv dar. Auch innerhalb der Endometrose reagieren die involvierten Epithelzellen häufig positiv. Demgegenüber fällt der Nachweis von Proteoglykanen in den nicht-alterierten Drüsenepithelien sowie in allen kultivierten Zellen im Untersuchungsgut negativ aus.

Die luminalen und duktales sowie nahezu alle glandulären Epithelien des zyklisch aktiven Endometriums reagieren *in situ* stets PAS-positiv. Auch in der überwiegenden Zahl der aus diesen Spenderendometrien isolierten und kultivierten mEEZ kann das entsprechende Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist das Reaktionsprodukt im physiologisch inaktiven Endometrium zwar in allen Oberflächen- und Ausführungsgangepithelien, jedoch nur in der Hälfte der Drüsenepithelzellen nachweisbar. Nur sehr wenige der aus diesen Endometrien isolierten mEEZ reagieren *in vitro* PAS-positiv. Während sich in den Stromazellen *in situ* in keinem Fall Polysaccharide/Glykoproteine nachweisen lassen, gelingt der Nachweis dieser Stoffe in bis zu 60 % der kultivierten mESZ.

4.5 Immunhistologie, Immunzytologie

4.5.1 Endometrium *in situ*

Die folgenden Ausführungen zur Expression der Intermediärfilamente sowie von α -GMA beschränken sich auf die Epithel- und Stromazellen des Endometriums.

4.5.1.1 Zytokeratin 8

In den Epithelzellen des physiologisch inaktiven Endometriums ist Zytokeratin 8 (K8) nicht nachweisbar (n = 5).

Im zyklisch aktiven Endometrium (n = 14) treten in gut der Hälfte der Proben K8-positiv Epithelzellen auf (n = 8), wobei der Nachweis des Antigens ausschließlich in den Drüsenepithelien gelingt. Das Reaktionsprodukt ist diffus innerhalb des Zytoplasmas verteilt und besitzt eine feinwabige Struktur. Die Reaktionsintensität liegt nahezu ausschließlich im schwachen Bereich, nur vereinzelt kann eine mäßig intensive Expression beobachtet werden (Abb. 4.13, S. 55). Tendenziell weisen die oberflächlichen Uterindrüsenabschnitte eine etwas häufigere und geringfügig stärkere Reaktion für K8 auf als die mittleren und in der Tiefe gelegenen Drüsenregionen. Im Untersuchungsgut reagieren in den einzelnen Proben bis zu 40 % der oberflächlichen und bis zu 20 % der mittleren und tiefen Drüsen positiv. Zwischen der Funktionsmorphologie des zyklisch aktiven Endometriums und der Häufigkeit oder der

Intensität der Expression von Zytokeratin 8 ist im Untersuchungsgut kein offensichtlicher Zusammenhang zu erkennen.

Im Falle des graviden Uterus ($n = 1$) ist im Bereich der Drüsenepithelien und der Ausführungsgänge ein ähnliches Expressionsverhalten zu beobachten. Demgegenüber zeigen im luminalen Epithel jedoch 10 % der Zellen eine schwache und weitere 5 % eine mäßige Expression von K8. Dabei ist das Reaktionsprodukt in apikalen Zytoplasmaprotrusionen lokalisiert (Abb. 4.14).

In den von einer Endometrose betroffenen Proben ($n = 15$) treten in der Regel hinsichtlich der K8-Expression keine wesentlichen Unterschiede zwischen den involvierten Uterindrüsen und den umgebenden unveränderten Drüsen auf ($n = 11$). In einigen Fällen reagieren die alterierten glandulären Strukturen geringfügig häufiger und intensiver ($n = 4$).

Endometriale Stromazellen reagieren stets negativ für Zytokeratin 8 ($n = 20$).

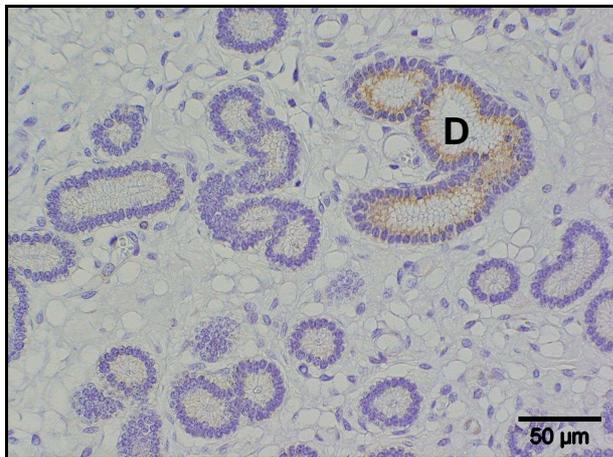


Abb. 4.13: Endometrium *in situ*. Zytokeratin-8-Expression mit mäßiger Intensität in den Zellen einer Uterindrüse (D). In den umliegenden Drüsen ist K8 nicht nachweisbar. Immunhistologie Zytokeratin 8

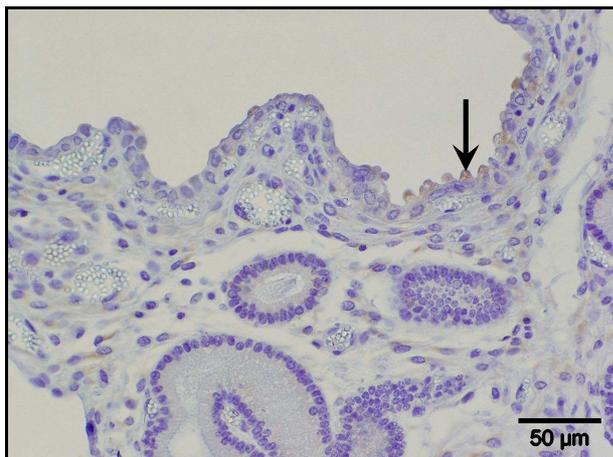


Abb. 4.14: Endometrium *in situ*. Schwache bis mäßige Zytokeratin-8-Expression in apikalen Zytoplasmaprotrusionen (Pfeil) luminaler Epithelzellen während der Gravidität. Die umliegenden Drüsen zeigen keine Reaktion für K8. Immunhistologie Zytokeratin 8

4.5.1.2 Zytokeratin 18

Unter den endometrialen Epithelzellen kann Zytokeratin 18 (K18) in den meisten Fällen und mit der vergleichsweise intensivsten Reaktion (überwiegend schwach, gele-

gentlich mäßig) im Bereich der Uterindrüsen nachgewiesen werden ($n = 18$), wobei in den einzelnen Proben bis zu 80 % der Drüsenepithelzellen das Protein enthalten (Abb. 4.15). In geringerem Maße reagieren in etwa der Hälfte der Proben die Drüsenausführungsgänge positiv ($n = 11$). Das Oberflächenepithel zeigt die tendenziell schwächste Reaktion für das Antigen ($n = 8$). Zwischen den Zellen der oberflächlichen, mittleren und tiefen Abschnitte der Uterindrüsen sind bezüglich der Häufigkeit und der Intensität der K18-Expression keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Während im Zytoplasma der glandulären Epithelzellen und der Ausführungsgänge eine diffuse, gelegentlich apikal akzentuierte Verteilung des feinwabrig erscheinenden Reaktionsproduktes vorliegt, tritt in den Zellen des luminalen Epithels gelegentlich auch eine basale Lokalisation der Präzipitate auf. Lediglich im Oberflächenepithel des graviden Uterus ($n = 1$) ist eine Expression von K18 in apikalen Zytoplasmaprotrusionen zu beobachten. Im Untersuchungsgut ist kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Funktionsmorphologie des physiologisch inaktiven sowie des zyklisch aktiven Endometriums und der Häufigkeit oder der Intensität der Expression von Zytokeratin 18 zu erkennen.

In zahlreichen Drüsenepithelzellen endometrotischer Herde ist K18 nachweisbar ($n = 13$). Die Verteilung des Reaktionsproduktes innerhalb der Zelle gleicht dabei der in den umgebenden unveränderten Drüsen. Gegenüber diesen tritt das Protein in endometrotischen Uterindrüsen jedoch tendenziell häufiger und intensiver auf.

Die Stromazellen des Pferdeendometriums exprimieren kein Zytokeratin 18 ($n = 20$).

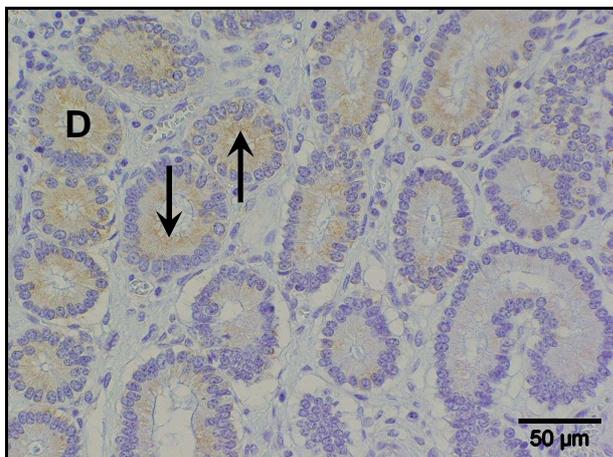


Abb. 4.15: Endometrium *in situ*. Schwache Zytokeratin-18-Expression in mehreren Uterindrüsen (D). Zum Teil kann eine apikale Akzentuierung (Pfeile) des diffus im Zytoplasma lokalisierten Reaktionsproduktes beobachtet werden.

Immunhistologie Zytokeratin 18

4.5.1.3 Zytokeratin 19

Die verschiedenen Epithelzellfraktionen des equinen Endometriums weisen eine sehr variable Expression von Zytokeratin 19 (K19) auf: der Anteil positiv reagierender Zellen schwankt in den einzelnen Proben ($n = 20$) sowohl im Bereich des luminalen Epithels als auch der Ausführungsgänge und der Uterindrüsen jeweils zwischen 10 % und 100 %. Die Reaktionsintensität liegt überwiegend im schwachen bis mäßigen

Bereich, daneben können jedoch auch stark positiv reagierende Zellen beobachtet werden (Abb. 4.16). Verglichen mit den oberflächlichen und mittleren Drüsenregionen weisen die in der Tiefe gelegenen Uterindrüsenabschnitte zwar keine deutlich häufigere, jedoch eine tendenziell intensivere K19-Expression auf. Die Epithelien des physiologisch inaktiven Endometriums ($n = 5$) zeigen eine tendenziell häufigere und intensivere Expression von K19 (Abb. 4.17) als die der zyklisch aktiven Endometrien ($n = 14$) bzw. die des graviden Uterus ($n = 1$). Zwischen den verschiedenen Funktionsmorphologien der aktiven Uterindrüsen sind keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Reaktion für Zytokeratin 19 erkennbar. Die in der Regel feinwabrig strukturierten Präzipitate treten meist diffus innerhalb des Zytoplasmas auf und zeigen z. T. eine membranöse Akzentuierung. Selten können in den Zellen auch fokal intensivere Reaktionen bis hin zu plaqueförmigen Aggregaten des Reaktionsproduktes beobachtet werden.

Innerhalb der Endometrose ($n = 15$) ist K19 tendenziell häufiger und mit größerer Reaktionsintensität nachweisbar als in den unveränderten Uterindrüsen (einschließlich der tiefen Drüsenabschnitte) (Abb. 4.18, S. 58). Gegenüber diesen liegen auch häufiger plaqueförmig aggregierte Präzipitate vor.

In den endometrialen Stromazellen ist Zytokeratin 19 nicht nachweisbar ($n=20$).

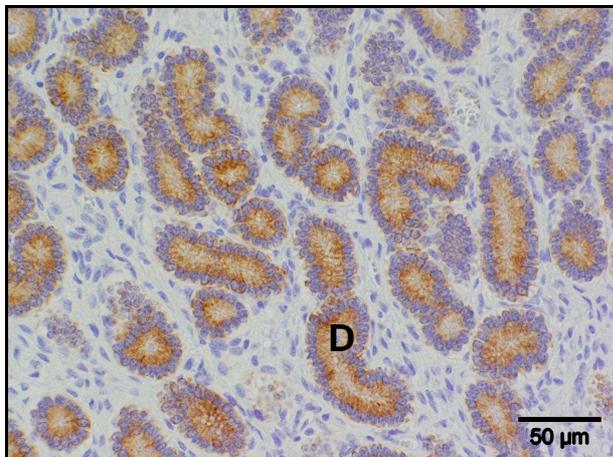


Abb. 4.16: Endometrium *in situ*. Schwache bis mäßige Expression von Zytokeratin 19 in den Uterindrüsen (D) während der Sekretionsphase. Immunhistologie Zytokeratin 19

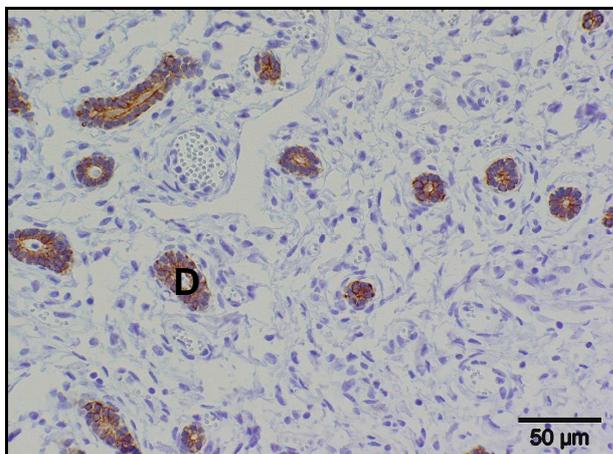


Abb. 4.17: Endometrium *in situ*. Starke Zytokeratin-19-Expression in den Uterindrüsen (D) während der physiologischen Inaktivität. Immunhistologie Zytokeratin 19

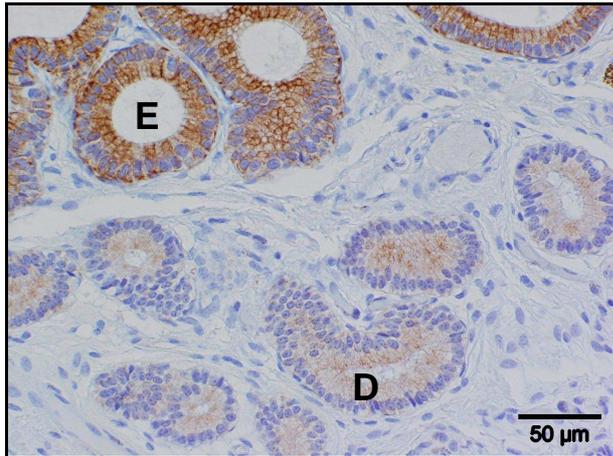


Abb. 4.18: Endometrium *in situ*.
Expression von Zytokeratin 19 in den Drüsenepithelzellen endometrotischer Herde (E) (mäßige bis starke Intensität) sowie in den umgebenden unveränderten Uterindrüsen (D) (schwache Intensität).
Immunhistologie Zytokeratin 19

4.5.1.4 Vimentin

In nicht degenerativ alterierten Uterindrüsen kann keine Expression von Vimentin festgestellt werden ($n = 20$). Dies trifft mehrheitlich auch auf die Zellen des luminalen Epithels und der Drüsenausführungsgänge zu ($n = 15$). In seltenen Fällen ist in diesen Epithelzellsubpopulationen jedoch eine Reaktion für Vimentin zu beobachten (Abb. 4.19, S. 59): während in einem Teil der physiologisch inaktiven ($n = 2$) und zyklisch aktiven ($n = 1$, proliferative Differenzierung) Endometrien 5 % der Oberflächenepithelzellen und/oder 5 % der Ausführunggangzellen positiv reagieren, weisen im graviden Uterus ($n = 1$) 40 % und in einem weiteren physiologisch inaktiven Endometrium ($n = 1$) 50 % der Zellen des luminalen Epithels und der Ausführungsgänge homogen strukturierte Präzipitate auf. Diese besitzen überwiegend eine mäßige Farbintensität und sind innerhalb des Zytoplasmas meist basal, selten auch perinukleär lokalisiert oder liegen diffus verteilt vor.

Ein ähnliches, jedoch tendenziell intensiveres Reaktionsverhalten können auch die Epithelzellen endometrotischer Uterindrüsen zeigen: in den einzelnen Proben exprimieren 5–60 % der involvierten Epithelzellen Vimentin ($n = 14$).

Im Untersuchungsgut exprimieren in 14 Proben jeweils mindestens 95 % der Stromazellen Vimentin, in den übrigen Proben kann das Protein jeweils in mindestens der Hälfte der stromalen Zellen nachgewiesen werden ($n = 6$). Die Reaktionsintensität ist deutlich variabel und liegt insgesamt überwiegend im mäßigen Bereich; daneben können jedoch auch schwache und starke Intensitäten beobachtet werden. Die Präzipitate treten diffus intrazytoplasmatisch und homogen auf. Zyklusabhängige Unterschiede in der stromalen Vimentin-Expression sind nicht festzustellen.

In die Endometrose ($n = 15$) involvierte Stromazellen weisen bezüglich ihrer Expression von Vimentin keine deutlichen Unterschiede zum Stroma nicht-alterierter Bereiche auf.

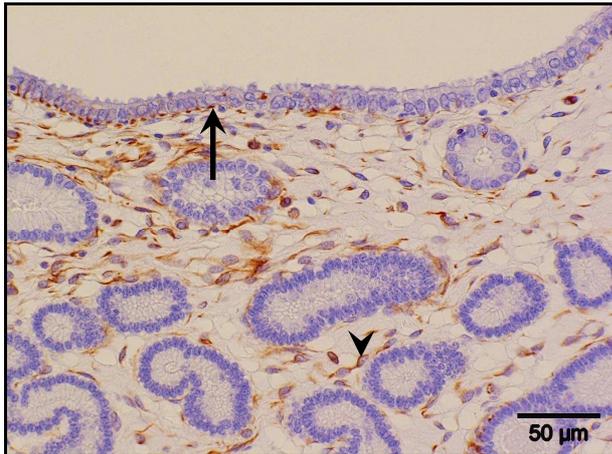


Abb. 4.19: Endometrium *in situ*.
Mäßige Expression von Vimentin in basalen Zytoplasmaregionen (Pfeil) von Zellen des luminalen Epithels sowie in den Stromazellen (Pfeilspitze).
Immunhistologie Vimentin

4.5.1.5 Desmin

Eine Expression von Desmin kann in den endometrialen Epithelzellen nicht beobachtet werden ($n = 20$).

Im nicht degenerativ alterierten, proliferativ oder sekretorisch differenzierten Endometrium ist auch in den Stromazellen keine Reaktion für Desmin festzustellen ($n = 15$). Im Gegensatz dazu können im physiologisch inaktiven Endometrium ($n = 5$) Desmin-exprimierende Stromazellen vorkommen, deren Anteil in den einzelnen Proben 10–40 % beträgt ($n = 3$) (Abb. 4.20). Die Reaktionsintensität ist variabel (schwach, mäßig, stark).

In den fibrotisch alterierten Endometriem ($n = 15$) treten in den meisten Proben Desmin-positive Stromazellen innerhalb eines Teils der betroffenen Areale auf ($n = 13$). Dabei zeigt der Anteil positiv reagierender Zellen innerhalb der endometriotischen Bereiche der einzelnen Proben erhebliche Schwankungen: in 5–90 % der Stromazellen sind Präzipitate zu finden. Diese weisen überwiegend schwache bis mäßige und nur selten starke Farbintensitäten auf. Das Reaktionsprodukt ist stets diffus intrazytoplasmatisch lokalisiert und erscheint homogen bis feingranulär.

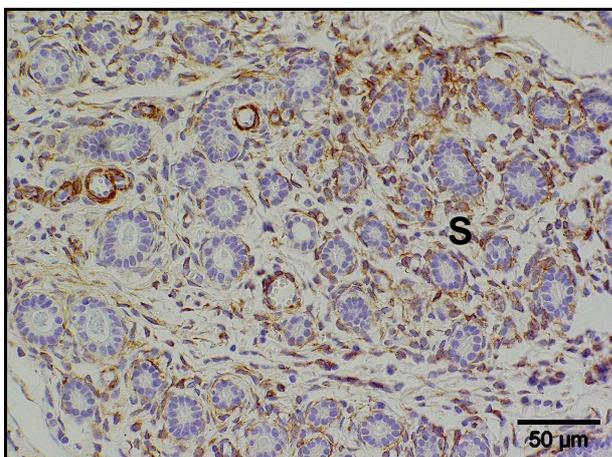


Abb. 4.20: Endometrium *in situ*.
Desmin-Expression mit variabler Intensität in den Stromazellen (S) während der physiologischen Inaktivität.
Immunhistologie Desmin

4.5.1.6 α -Glattmuskel-Aktin

Die verschiedenen Epithelzellsubpopulationen des Pferdeendometriums exprimieren in keinem Fall α -Glattmuskel-Aktin (α -GMA) ($n = 20$).

Die Stromazellen in nicht degenerativ veränderten Bereichen des Stratum spongiosum reagieren ebenfalls negativ für α -GMA ($n = 20$). Gleiches gilt auch für die Stromazellen des Stratum compactum inaktiver Endometrien ($n = 5$). Im Gegensatz dazu kann in der Mehrzahl der sekretorisch oder proliferativ differenzierten Endometrien innerhalb des Stratum compactum ein variabler Anteil positiv reagierender Stromazellen beobachtet werden ($n = 9$) (Abb. 4.21). In der Regel überschreitet dieser in den einzelnen Proben 50 % nicht ($n = 7$), gelegentlich finden sich die Präzipitate in 80–90 % der Zellen ($n = 2$). Die Reaktionsintensität liegt überwiegend im mäßigen Bereich, daneben finden sich jedoch auch schwach oder stark exprimierende Zellen. Das Reaktionsprodukt besitzt eine homogene bis feingranuläre Struktur und tritt diffus innerhalb des Zytoplasmas auf. Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Expressionshäufigkeit/-intensität und der Funktionsmorphologie der betroffenen Endometrien besteht nicht.

Ein Teil der in endometriotische Prozesse involvierten Stromazellen zeigt eine Expression von α -GMA, wobei sich in den einzelnen Proben 20–90 % der entsprechenden Zellen positiv darstellen ($n = 14$) (Abb. 4.22, S. 61). Dabei dominiert eine mäßige bis starke Reaktionsintensität. Auch in diesen Zellen sind die diffus intrazytoplasmatisch lokalisierten Präzipitate homogen bis feingranulär strukturiert. Im Untersuchungsgut können lediglich in einer Probe innerhalb der endometriotischen Herde keine α -GMA-positiven Stromazellen nachgewiesen werden.

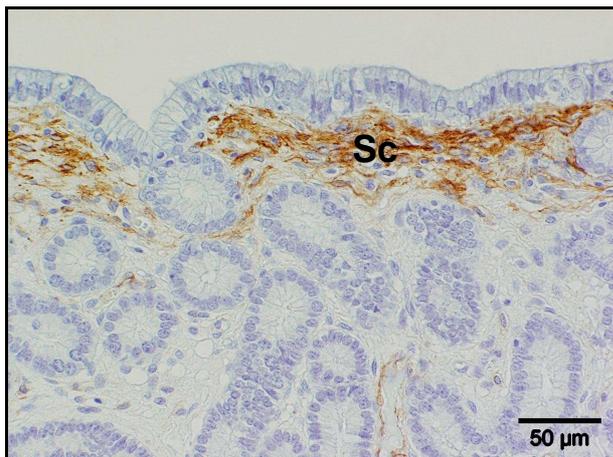


Abb. 4.21: Endometrium *in situ*.

Mäßige bis starke Expression von α -GMA in den Stromazellen des Stratum compactum (Sc).

Immunhistologie α -Glattmuskel-Aktin

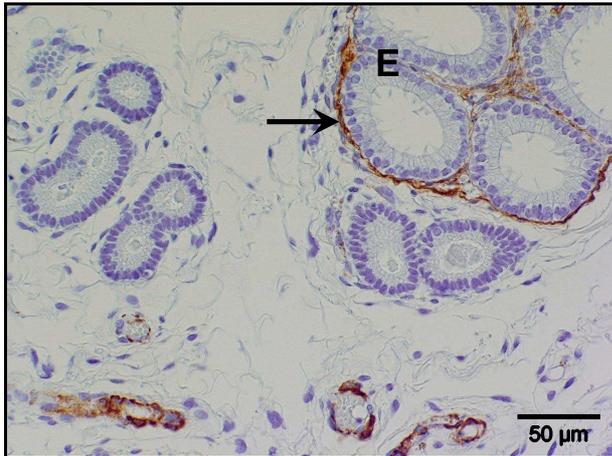


Abb. 4.22: Endometrium *in situ*.
Mäßige bis starke α -GMA-Expression
(Pfeil) in den Stromazellen endometrio-
tischer Herde (E).
Immunhistologie α -Glattmuskel-Aktin

4.5.2 Zellpellets

4.5.2.1 Zytokeratin 8

Sowohl in den Pellets der mEEZ (n = 3) als auch der mESZ (n = 14) sind keine positiv reagierenden Zellen nachweisbar.

4.5.2.2 Zytokeratin 18

In keiner der Proben der pelletierten mEEZ (n = 3) und mESZ (n = 14) sind K18 enthaltende Zellen nachweisbar.

4.5.2.3 Zytokeratin 19

In den mEEZ-Pellets zeigen 100 % (n = 2) bzw. 70 % (n = 1) der Typ-1-Zellen eine diffuse intrazytoplasmatische, überwiegend mäßige bis starke Expression von K19 (Abb. 4.23, S. 62); demgegenüber stellen sich mit vergleichbarem Reaktionsmuster 30–50 % der Zellen vom Typ 2 positiv dar (n = 3).

Die in den Pellets der mESZ enthaltenen Zellen des Typs 1 (n = 10) stellen sich in den einzelnen Proben zu 60–100 % K19-positiv dar. Im Gegensatz dazu exprimieren in der Regel deutlich weniger als 5 % der Typ-2-Zellen das Protein (n = 13). Nur ausnahmsweise finden sich in 10 % der Zellen dieses Typs Präzipitate (n = 1). Das Expressionsmuster der positiv reagierenden Zellen entspricht dem der pelletierten mEEZ.

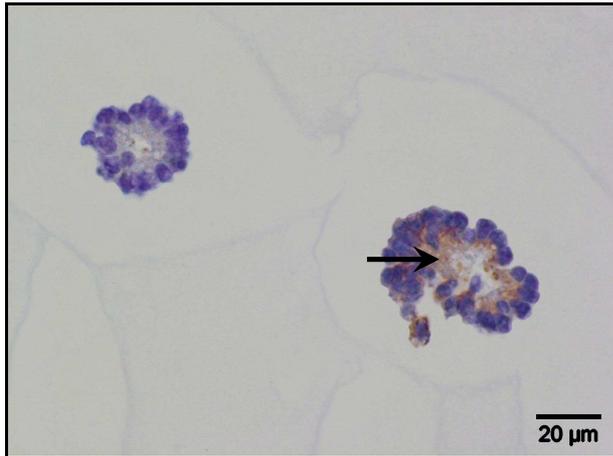


Abb. 4.23: Zellpellet, mEEZ.
Mäßige bis starke Zytokeratin-19-
Expression (Pfeil) in Zellen des Typs 1.
In einem weiteren Zellverband (links)
sind keine positiv reagierenden Zellen
nachweisbar.
Immunzytologie Zytokeratin 19

4.5.2.4 Vimentin

In insgesamt jeweils 5 % der pelletierten mEEZ verläuft der Nachweis von Vimentin mit positivem Ergebnis ($n = 3$). Meist reagieren Zellen des Typs 2 für Vimentin, vereinzelt ist das Reaktionsprodukt jedoch auch in Typ-1-Zellen zu finden. Die homogenen Präzipitate können sowohl diffus innerhalb des Zytoplasmas auftreten als auch (multi-)fokal aggregiert; sie zeigen überwiegend mäßige, daneben auch schwache Farbintensitäten.

Mit vergleichbarer Verteilung innerhalb der Zelle, jedoch tendenziell größerer Intensität ist das Reaktionsprodukt in den mESZ-Pellets ausschließlich im Zelltyp 2 nachweisbar, wobei in der Regel lediglich 15–40 % der Zellen positiv reagieren ($n = 13$) (Abb. 4.24). Nur ausnahmsweise kommen die Präzipitate in 60 % der Zellen vor ($n = 1$). Zwischen den Anteilen Vimentin-positiver Stromazellen *in situ* und positiver mESZ im Zellpellet besteht kein offensichtlicher Zusammenhang.

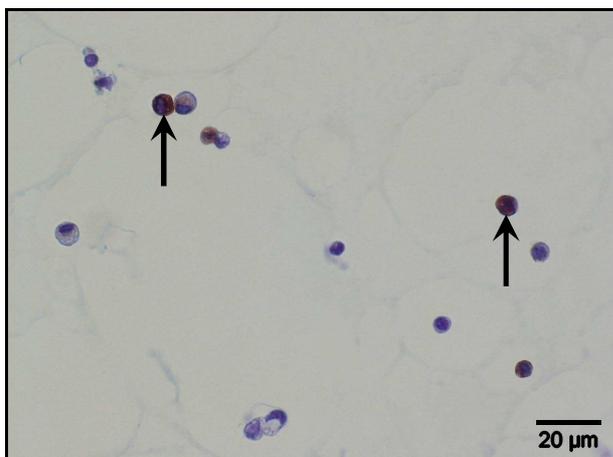


Abb. 4.24: Zellpellet, mESZ.
Starke Expression von Vimentin in
Zellen des Typs 2 (Pfeile).
Immunzytologie Vimentin

4.5.2.5 Desmin

Unmittelbar vor Beginn der Kultivierung ist Desmin in den mEEZ nicht nachweisbar (n = 3).

Die Zellen des Typs 1 in den mESZ-Pellets reagieren stets negativ für Desmin (n = 10). In wenigen Pellets sind auch keine Desmin-positiven Typ-2-Zellen nachweisbar (n = 4). Im Gegensatz dazu finden sich in den meisten Proben wenige positiv für Desmin reagierende Zellen dieses Typs (n = 10): ihr Anteil übersteigt in der Regel nicht 5 % (n = 9); nur ausnahmsweise sind in einem Pellet in 10 % der Zellen Präzipitate nachweisbar (n = 1). Diese mESZ wurden aus einem physiologisch inaktiven Endometrium gewonnen, dessen Anteil Desmin-exprimierender Stromazellen *in situ* 40 % beträgt. In den positiven mESZ tritt das intrazytoplasmatische Reaktionsprodukt überwiegend diffus mit homogener bis feingranulärer Struktur auf (Abb. 4.25), daneben können vereinzelt jedoch auch fokale plaqueförmige Aggregate beobachtet werden. Die Reaktionsintensität liegt überwiegend im mäßigen Bereich.

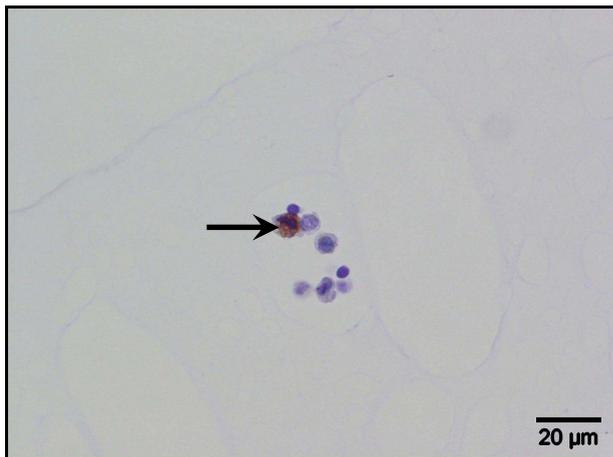


Abb. 4.25: Zellpellet, mESZ.

Mäßige bis starke Desmin-Expression in einer Zelle des Typs 2 (Pfeil).
Immunzytologie Desmin

4.5.2.6 α -Glattmuskel-Aktin

Positiv reagierende mEEZ sind nur unter den Zellen des Typs 2 zu finden (n = 3), bei denen sie einen Anteil von etwa 5 % ausmachen. Die Präzipitate sind diffus im Zytoplasma verteilt, homogen bis feingranulär strukturiert und überwiegend mäßig intensiv gefärbt.

Ein ähnliches Bild ist in den mESZ-Pellets zu beobachten (Abb. 4.26, S. 64). Hier tritt das Reaktionsprodukt meist in 5 % der Typ-2-Zellen auf (n = 9). Daneben können jedoch auch 10 % (n = 2) oder 15 % (n = 1) der entsprechenden Zellen positiv reagieren. In 2 der Pellets ist α -GMA in keiner der Zellen nachweisbar.

Ein Zusammenhang zwischen den Anteilen α -GMA-exprimierender Stromazellen *in situ* und positiv reagierender mESZ im Zellpellet ist im Untersuchungsgut nicht nachweisbar.

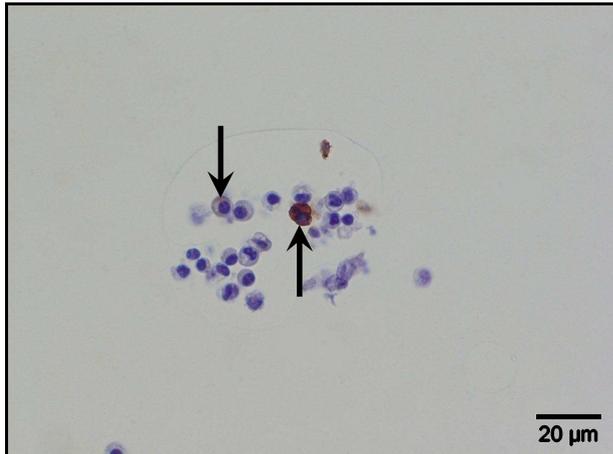


Abb. 4.26: Zellpellet, mESZ.
Expression von α -GMA (variable Intensität) in Zellen des Typs 2 (Pfeile).
Immunzytologie α -Glattmuskel-Aktin

4.5.3 Kultivierte Zellen auf Membraneinsätzen

4.5.3.1 Zytokeratin 8

Unter den kultivierten mEEZ ($n = 20$) sind auf rund der Hälfte der Membranen ($n = 11$) keine Zellen nachweisbar, die positiv für K8 reagieren. Unter diesen Membranen sind auch jene, deren Zellbesatz aus physiologisch inaktiven Endometrien stammt ($n = 5$). In den übrigen Proben ($n = 9$) können Zellen mit einer meist schwachen, gelegentlich auch mäßigen Expression von K8 beobachtet werden. Das feinwabig (Zelltypen 1, 3, M) bzw. homogen (Zelltyp 2) strukturierte Reaktionsprodukt ist überwiegend fokal und selten diffus im Zytoplasma lokalisiert. Die Zelltypen 1, 3 und M zeigen hierbei ein ähnliches Expressionsverhalten: in den einzelnen Proben reagieren in der Regel bis zu 40 % der mehrschichtig wachsenden Zellen ($n = 6$) und bis zu 50 % der Zellen der Typen 1 ($n = 9$) bzw. 3 ($n = 5$) positiv (Abb. 4.27, S. 65). Lediglich in Ausnahmefällen (Kultur-Nummer 19) treten seitens der Zelltypen 1 und M bis zu 80 % positive Zellen des jeweiligen Typs auf. In der gleichen Probe finden sich mit 80 % auch ungewöhnlich viele K8-exprimierende Zellen vom Typ 2, welcher in den übrigen Fällen lediglich bis zu 20 % positiv reagierende Zellen aufweist ($n = 19$). Diese Probe ist auch in sofern bemerkenswert, als in dem entsprechenden Endometrium *in situ* zum Zeitpunkt der Zellisolierung lediglich in 5 % der Epithelzellen der in der Tiefe gelegenen Uterindrüsenabschnitte eine K8-Expression nachweisbar ist. Insgesamt wird im Untersuchungsgut kein Zusammenhang zwischen der Funktionsmorphologie der zyklisch aktiven Spenderendometrien und der Häufigkeit oder der Intensität der Expression von Zytokeratin 8 *in vitro* offensichtlich.

Die mESZ reagieren fast ausschließlich negativ für K8 ($n = 15$). Nur ausnahmsweise ($n = 1$) sind positive Zellen nachweisbar. Diese machen einen Anteil von 5 % der Typ-1-Zellen aus und zeigen diffus intrazytoplasmatisch feinwabige Präzipitate von schwacher bis mäßiger Reaktionsintensität.

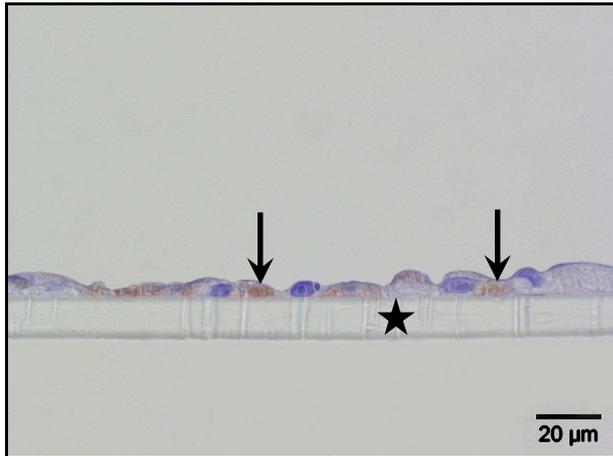


Abb. 4.27: Membraneinsatz, mEEZ. Schwache bis mäßige fokale Expression (Pfeile) von Zytokeratin 8 in Zellen des Typs 1. Stern: Millicell[®]-Membran. Immunzytologie Zytokeratin 8

4.5.3.2 Zytokeratin 18

Auf den meisten mit mEEZ inkubierten Membranen kann eine K18-Expression beobachtet werden (n = 16). Der Anteil positiv reagierender Zellen in den einzelnen Proben schwankt dabei erheblich (5–90 %), wobei kein Zusammenhang zur endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellisolierung offensichtlich ist. Hinsichtlich des Anteils positiv reagierender Zellen sind zwischen den verschiedenen auf den Membranen nachweisbaren Zelltypen keine wesentlichen Unterschiede festzustellen, lediglich die Typ-3-Zellen exprimieren tendenziell gegenüber den anderen Typen geringfügig häufiger K18. Die Reaktionsintensität ist sehr variabel, liegt jedoch überwiegend im schwachen und mäßigen Bereich. Auch sie hängt offenbar weder von der Funktionsmorphologie der Spenderendometrien noch der Wachstumsform der kultivierten Zellen ab. Das Reaktionsprodukt liegt in den Zelltypen 1, 3 und M meist diffus innerhalb des Zytoplasmas vor und besitzt eine feinwabige Struktur (Abb. 4.28). Gelegentlich treten die Präzipitate fokal intrazytoplasmatisch auf, wobei sie überwiegend feinwabig und nur selten plaqueförmig aggregiert erscheinen. Typ-2-Zellen zeigen eine diffus homogene intrazytoplasmatische Expression.

Der Intermediärfilament-Bestandteil K18 ist in den mESZ nicht nachweisbar (n = 16).

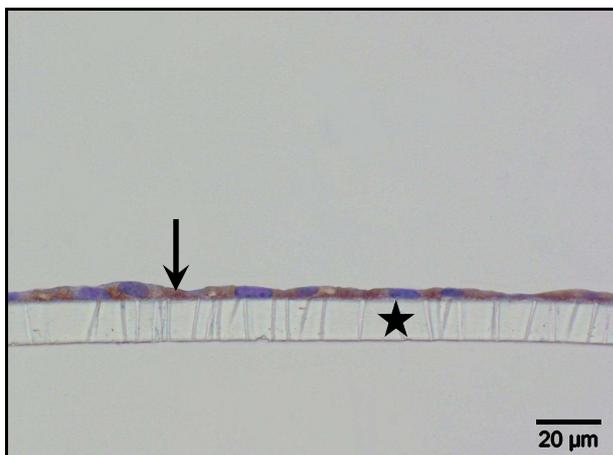


Abb. 4.28: Membraneinsatz, mEEZ. Diffuse mäßige bis starke Expression (Pfeil) von Zytokeratin 18 in Zellen des Typs 1. Stern: Millicell[®]-Membran. Immunzytologie Zytokeratin 18

4.5.3.3 Zytokeratin 19

Alle mEEZ exprimieren K19 ($n = 20$) (Abb. 4.29 und 4.30). Die Präzipitate liegen in den Zellen der Typen 1, 3 und M in der Regel diffus innerhalb des Zytoplasmas vor und besitzen eine homogene bis feinwabige Struktur. Gelegentlich finden sich zudem plaqueförmige Aggregate des Reaktionsproduktes. Dieses tritt im Zytoplasma der Zellen des Typs 2 ausschließlich in diffus homogener Form auf. In den einzelnen Proben dominiert eine mäßige oder starke Reaktionsintensität. Tendenziell ist diese insgesamt in den Zellen des Typs 3 am geringsten und in denen des Typs 2 am höchsten. Ein Zusammenhang zwischen der Intensität der K19-Expression und der Funktionsmorphologie der jeweiligen Spenderendometrien wird nicht offensichtlich. Auf weniger als der Hälfte der mit mESZ inkubierten Membranen sind K19-positive Zellen nachweisbar ($n = 6$) (Abb. 4.31, S. 67). Diese machen zudem jeweils nur einen Anteil von rund 5 % der in der Schnittebene liegenden Zellen aus, wobei etwa gleichermaßen Typ-1- und mehrschichtige Zellen betroffen sind. In diesen treten die Präzipitate diffus intrazytoplasmatisch auf und sind homogen bis feinwabig strukturiert. Demgegenüber liegen K19-Reaktionsprodukte nur vereinzelt in Zellen des Typs 2 vor (diffus intrazytoplasmatisch, homogen).

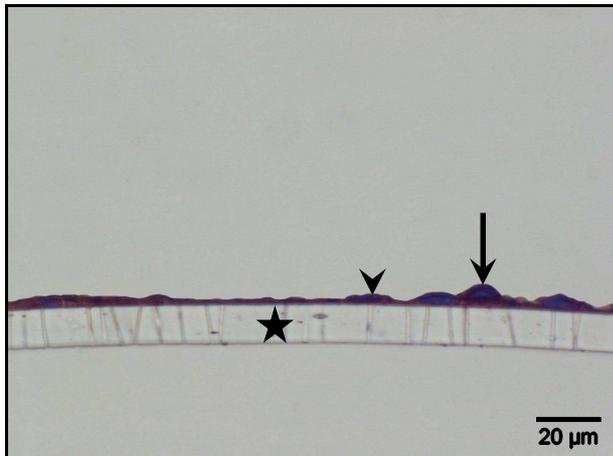


Abb. 4.29: Membraneinsatz, mEEZ. Diffuse starke Zytokeratin-19-Expression in Zellen der Typen 1 (Pfeil) und 2 (Pfeilspitze). Stern: Millicell[®]-Membran. Immunzytologie Zytokeratin 19

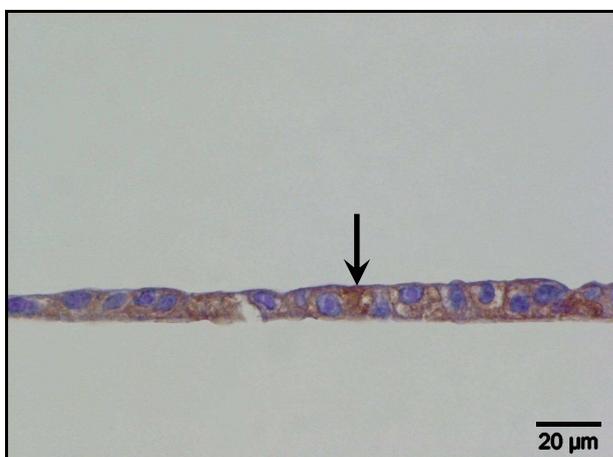


Abb. 4.30: Membraneinsatz, mEEZ. Mäßige bis starke, überwiegend diffuse Expression (Pfeil) von Zytokeratin 19 in Zellen des Typs 3. Immunzytologie Zytokeratin 19

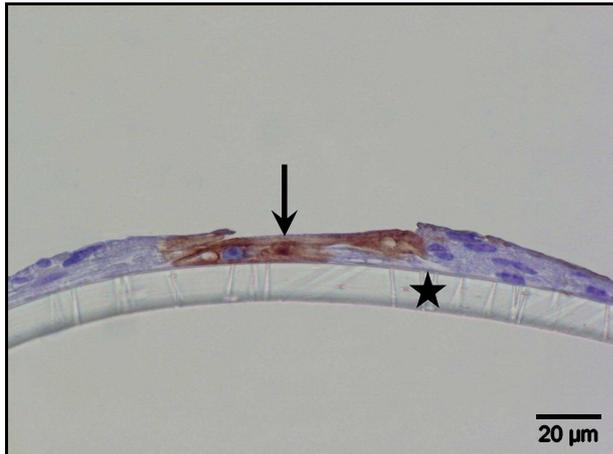


Abb. 4.31: Membraneinsatz, mESZ. Diffuse mäßige bis starke Expression (Pfeil) von Zytokeratin 19 in Zellen des Typs M. Stern: Millicell®-Membran. Immunzytologie Zytokeratin 19

4.5.3.4 Vimentin

Auf allen Membranen, auf denen mEEZ kultiviert wurden, sind Vimentin-positive Zellen nachweisbar ($n = 20$). Hierbei exprimieren die aus physiologisch inaktiven Endometrien isolierten mEEZ *in vitro* Vimentin tendenziell häufiger, jedoch nicht offensichtlich stärker ($n = 5$). So weisen in den einzelnen Proben insgesamt 30–70 % der Zellen Präzipitate auf. Demgegenüber liegt der Anteil positiv reagierender mEEZ im Falle der Zellgewinnung aus sekretorisch oder proliferativ differenzierten Endometrien in den meisten Fällen bei höchstens 10 % ($n = 11$). Auf 4 der Membranen tritt in bis zu 30 % der Zellen das Reaktionsprodukt auf. Dieses ist überwiegend fokal, gelegentlich auch diffus, im Zytoplasma lokalisiert und besitzt meist eine homogene bis feinwabige Struktur, erscheint z. T. jedoch auch plaqueförmig aggregiert. In den Zellen der Typen 1 und 3 betrifft die fokale Expression häufig jene Zellabschnitte, die der Wachstumsoberfläche zugewandt sind (Abb. 4.32, S. 68). Insgesamt dominiert in den kultivierten mEEZ eine mäßige oder starke Vimentin-Expressionsintensität. Zwischen den einzelnen auf den Membranen wachsenden Zelltypen sind hinsichtlich der Häufigkeit und der Intensität der Reaktion keine wesentlichen Unterschiede festzustellen.

Die kultivierten mESZ reagieren in den einzelnen Proben zu 60–100 % positiv für Vimentin ($n = 16$) (Abb. 4.33, S. 68). Die endometriale Funktionsmorphologie oder die Anteile Vimentin-positiver Stromazellen *in situ* und positiver mESZ im Zellpellet stehen in keinem offensichtlich erkennbaren Zusammenhang zueinander. Zwischen den verschiedenen mESZ-Typen können hinsichtlich ihrer Vimentin-Expression *in vitro* keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Das intrazytoplasmatische Reaktionsprodukt liegt in der Regel diffus, selten auch fokal, mit homogener bis feinwabiger Struktur vor. Die Intensität der Reaktion ist variabel, tendenziell jedoch meist schwach oder mäßig und nur gelegentlich stark.

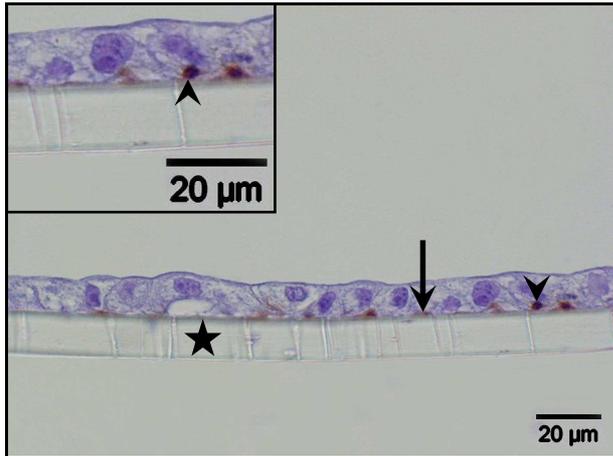


Abb. 4.32: Membraneinsatz, mEEZ. Vimentin-Expression in Zellen des Typs 3. Das Reaktionsprodukt tritt fokal in den der Wachstumsoberfläche zugewandten Zellregionen auf (Pfeil, schwache Intensität) und erscheint zum Teil plaqueförmig (Pfeilspitzen, mäßige bis starke Intensität).

Stern: Millicell[®]-Membran.
Immunzytologie Vimentin

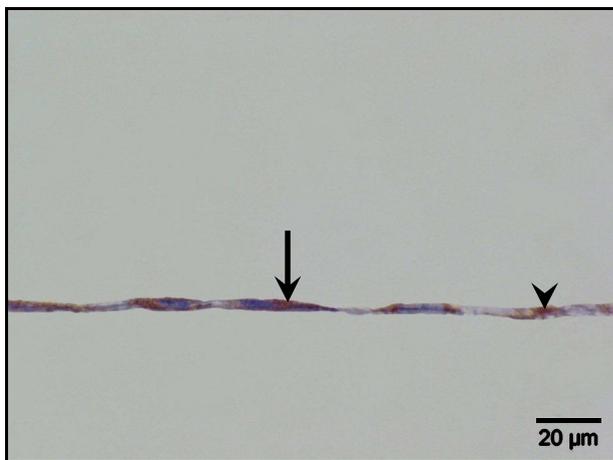


Abb. 4.33: Membraneinsatz, mESZ. Mäßige bis starke diffuse (Pfeil) oder fokale (Pfeilspitze) Vimentin-Expression in Zellen des Typs 1.

Immunzytologie Vimentin

4.5.3.5 Desmin

Der Nachweis von Desmin verläuft in den kultivierten mEEZ stets mit negativem Ergebnis (n = 20).

Auf nahezu allen Membraneinsätzen kann eine Expression von Desmin in mindestens der Hälfte aller mESZ festgestellt werden (n = 14). Lediglich auf 2 Membranen reagieren weniger als 30 % der Zellen positiv. Insgesamt treten hinsichtlich der Expressionshäufigkeit keine deutlichen Unterschiede zwischen den morphologisch verschiedenen Zelltypen auf. Die intrazytoplasmatischen Präzipitate stellen sich überwiegend homogen bis feingranulär strukturiert dar und sind meist diffus verteilt, gelegentlich jedoch auch auf (multi-)fokale Areale innerhalb der Zelle beschränkt. Sehr selten können fokale plaqueförmige Aggregate beobachtet werden. Im Zelltyp 1 und den mehrschichtigen Zellen dominiert eine schwache oder mäßige Reaktionsintensität (Abb. 4.34, S. 69). Die Zellen des Typs 2 reagieren im Vergleich dazu tendenziell etwas intensiver (Abb. 4.35, S. 69). Insgesamt ist bezüglich der Expression von Desmin in kultivierten mESZ keine Abhängigkeit von der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellisolierung zu erkennen.

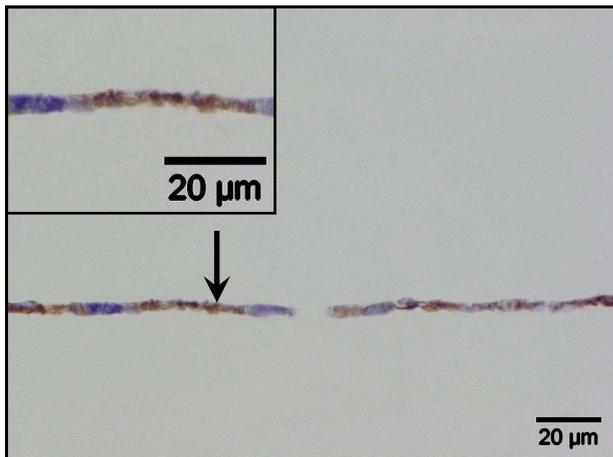


Abb. 4.34: Membraneinsatz, mESZ. Schwache bis mäßige diffuse Desmin-Expression (Pfeil und siehe Inset) in Zellen des Typs 1.
Immunzytologie Desmin

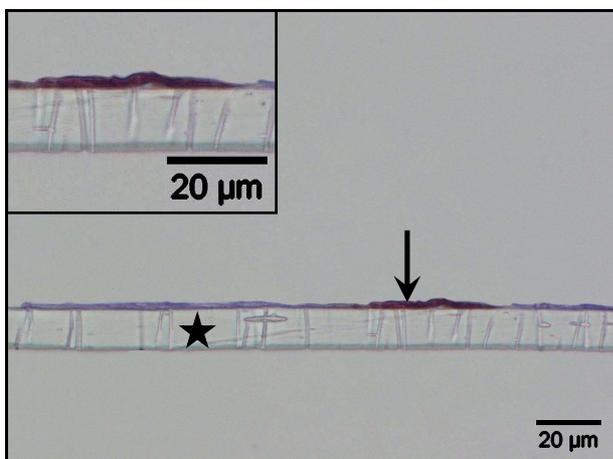


Abb. 4.35: Membraneinsatz, mESZ. Diffuse starke Expression (Pfeil und siehe Inset) von Desmin in Zellen des Typs 2.
Stern: Millicell®-Membran.
Immunzytologie Desmin

4.5.3.6 α -Glattmuskel-Aktin

Auf der Mehrheit der mEEZ-Membranen können positiv für α -GMA reagierende Zellen nachgewiesen werden ($n = 16$). Ihr Anteil in den einzelnen Proben überschreitet zumeist 20 % nicht ($n = 10$), beträgt in einigen Fällen jedoch 30–70 % ($n = 6$). Dabei sind sowohl hinsichtlich der Häufigkeit als auch der Intensität der Expression zwischen den verschiedenen Zelltypen keine wesentlichen Unterschiede zu beobachten. Die Präzipitate weisen überwiegend eine schwache bis mäßige Farbintensität auf. Sie sind homogen bis feingranulär strukturiert und können sowohl diffus als auch (multi-)fokal im Zytoplasma lokalisiert sein (Abb. 4.36 und 4.37, S. 70).

Die kultivierten mESZ exprimieren mehrheitlich α -GMA ($n = 16$). Dabei stellen sich auf 5 Membranen alle Zellen positiv dar, in den übrigen Fällen weisen stets mehr als 60 % der Zellen Präzipitate auf ($n = 11$). Deren Struktur entspricht der des Reaktionsproduktes in den mEEZ, es ist jedoch ausschließlich eine diffuse intrazytoplasmatische Verteilung zu beobachten. In den Zellen der Typen 1 und M dominiert eine mäßige Reaktionsintensität; oft sind daneben auch stark α -GMA-exprimierende Zellen zu finden, während eine schwache Reaktion seltener auftritt. Die Typ-2-Zellen zeigen häufig ein ähnliches Verhalten, gelegentlich scheinen sie jedoch geringfügig

intensiver zu reagieren (Abb. 4.38). Bezüglich der Reaktionshäufigkeit bestehen zwischen den verschiedenen mESZ-Typen keine offensichtlichen Unterschiede.

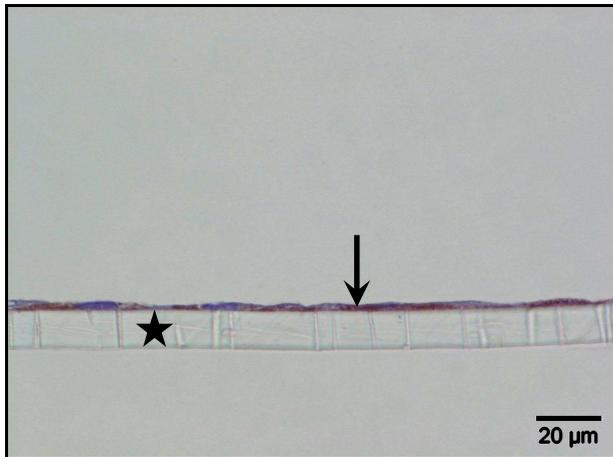


Abb. 4.36: Membraneinsatz, mEEZ. Diffuse Expression (Pfeil) von α -GMA (variable Intensität) in Zellen des Typs 2. Stern: Millicell[®]-Membran. Immunzytologie α -Glattmuskel-Aktin

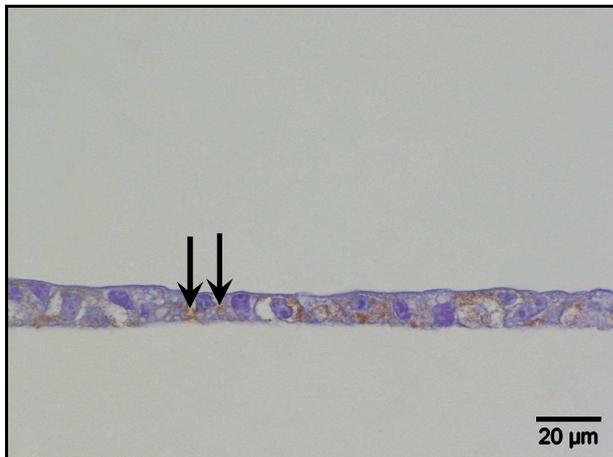


Abb. 4.37: Membraneinsatz, mEEZ. Schwache bis mäßige multifokale Expression (Pfeile) von α -GMA in Zellen des Typs 3. Immunzytologie α -Glattmuskel-Aktin

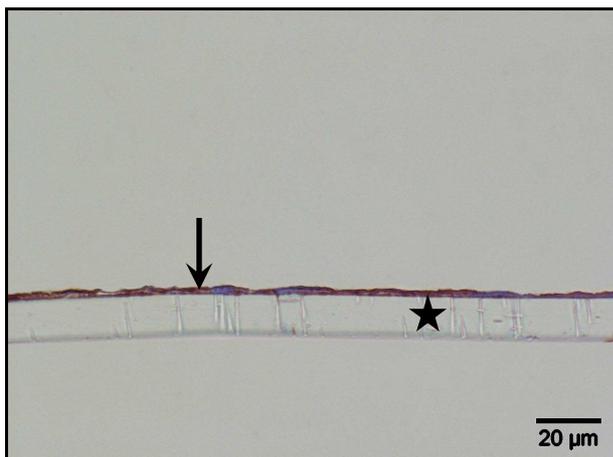


Abb. 4.38: Membraneinsatz, mESZ. Diffuse mäßige bis starke α -GMA-Expression (Pfeil) in Zellen des Typs 2. Stern: Millicell[®]-Membran. Immunzytologie α -Glattmuskel-Aktin

4.5.4 Zusammenfassung der immunhistologischen/immunzytologischen Befunde

Verglichen mit der Expression von Zytokeratin 8 in den endometrialen Drüsenepithelien *in situ* kann insgesamt *in vitro* ein tendenziell etwas höherer Anteil positiv re-

agierender mEEZ beobachtet werden, der jedoch in der Regel 50 % der Zellen der verschiedenen auf den Membranen wachsenden Zelltypen nicht übersteigt. Die Reaktionsintensitäten *in situ* und *in vitro* unterscheiden sich dagegen nicht deutlich. Ähnlich wie die stets negativ reagierenden endometrialen Stromazellen *in situ* zeigen die mESZ *in vitro* praktisch keine Reaktion für K8.

Bezüglich der Expression von Zytokeratin 18 kann sowohl in den endometrialen Epithelien *in situ* als auch in den mEEZ *in vitro* eine deutliche Variabilität hinsichtlich des Anteils positiv reagierender Zellen und ihrer Reaktionsintensität festgestellt werden. Deutliche Tendenzen sind nicht erkennbar. Sowohl von den Stromazellen des Pferdeendometriums *in situ* als auch von den mESZ *in vitro* wird K18 nicht exprimiert.

Während in den Uterindrüsen *in situ* in zahlreichen Zellen kein Zytokeratin 19 nachgewiesen werden kann, reagieren *in vitro* alle mEEZ positiv, wobei insgesamt tendenziell auch die Reaktionsintensität höher erscheint. Kultivierte mESZ zeigen nur vereinzelt eine Reaktion für K19. Somit ähnelt diesbezüglich ihr Verhalten den endometrialen Stromazellen *in situ*, in welchen K19 nicht vorkommt.

Vimentin ist in den endometrialen Epithelzellen *in situ* lediglich innerhalb der Endometrose sowie in seltenen Fällen in den Zellen des luminalen Epithels und der Drüsenausführungsgänge nachweisbar. Demgegenüber tritt dieser Intermediärfilament-Bestandteil in mEEZ *in vitro* regelmäßig auf. Insbesondere in solchen Zellen, die aus physiologisch inaktiven Endometrien gewonnen und kultiviert wurden, verläuft der entsprechende Nachweis tendenziell häufiger mit positivem Ergebnis. Zahlreiche Stromazellen *in situ* exprimieren, ebenso wie die Mehrheit der mESZ *in vitro*, Vimentin.

Sowohl in den Epithelzellen des Pferdeendometriums *in situ* als auch in den mEEZ *in vitro* kann Desmin nicht nachgewiesen werden. Während das Protein in den Stromazellen *in situ* lediglich teilweise innerhalb der Endometrose und im physiologisch inaktiven Endometrium vorkommt, exprimieren die kultivierten mESZ regelmäßig Desmin: meist reagieren mindestens 50 % der Zellen in den einzelnen Proben positiv.

Der Nachweis von α -Glattmuskel-Aktin fällt in endometrialen Epithelzellen *in situ* negativ aus. Im Gegensatz dazu tritt eine Expression dieses Mikrofilament-Bestandteils in Proben kultivierter mEEZ verhältnismäßig häufig auf. Während α -GMA-positive Stromazellen *in situ* lediglich teilweise im Stratum compactum sowie innerhalb der Endometrose vorkommen, kann eine Expression des Proteins in der Mehrheit der kultivierten mESZ festgestellt werden.

Im Untersuchungsgut bestehen offenbar keine deutlichen Einflüsse der Funktionsmorphologie der Spenderendometrien zum Zeitpunkt der Zellisolierung auf die in den Zellen zu beobachtende Expressionshäufigkeit und -intensität der Zytokeratine 18 und 19 sowie von Desmin und α -Glattmuskel-Aktin. Lediglich die aus physiologisch

inaktiven Endometrien isolierten und kultivierten mEEZ (n = 5) reagieren, wie die entsprechenden Uterindrüsen *in situ*, ausschließlich negativ für K8; zudem exprimieren sie *in vitro* tendenziell häufiger Vimentin als die aus proliferativ oder sekretorisch differenzierten Endometrien gewonnenen mEEZ.

4.6 Transmissionselektronenmikroskopie

4.6.1 Epithelzellen

Nahezu alle Zellen auf den exemplarisch untersuchten, mit mEEZ inkubierten Millicell[®]-Membranen (n = 3) zeigen, unabhängig von der Zellmorphologie, an der den Membranen gegenüberliegenden freien Zelloberfläche einen unterschiedlich dichten Besatz mit kurzen Mikrovilli (Abb. 4.39, S. 73). Zilierte Zellen sind hingegen nicht nachweisbar. Gelegentlich treten an der freien Oberfläche Zytoplasmaprotrusionen auf.

Interzelluläre Verbindungen kommen regelmäßig in Form von *tight junctions* und *Zonulae adhaerentes* in den lateralen Zellregionen vor (Abb. 4.40, S. 73). Zudem können im Bereich der gesamten seitlichen Zelloberfläche häufig Interdigitationen beobachtet werden (Abb. 4.41 und 4.42, S. 73). Die Interzellularräume stellen sich zum Teil deutlich erweitert dar (Abb. 4.39 und 4.40, S. 73). Insbesondere in den der Wachstumsoberfläche zugewandten Bereichen weisen die Zellen häufig Membraneinfaltungen auf; diese kommen teilweise auch in den seitlichen Membranregionen vor. Gelegentlich treten Ausstülpungen der Zellen in die Poren der Millicell[®]-Membran auf.

Innerhalb des Zytoplasmas sind in zahlreichen Zellen verschieden große, elektronenoptisch leere Sekretionsvakuolen nachweisbar (Abb. 4.42, S. 73), welche gehäuft nahe der freien Zelloberfläche auftreten. Glykogengranula bzw. deren Negativabdrücke sind in den ausgewählten Proben nicht erkennbar.

Insgesamt stellen sich die untersuchten mEEZ als vergleichsweise organellenarm dar. Neben rauem endoplasmatischem Retikulum (rER), das meist in kurzen Fragmenten vorkommt, weisen die Zellen rund- bis längsovale Mitochondrien vom Crista-Typ (Abb. 4.42, S. 73), einen Golgi-Apparat sowie Ribosomen auf.

Die Form des Zellkerns variiert von rund bis längsoval (Abb. 4.42, S. 73).

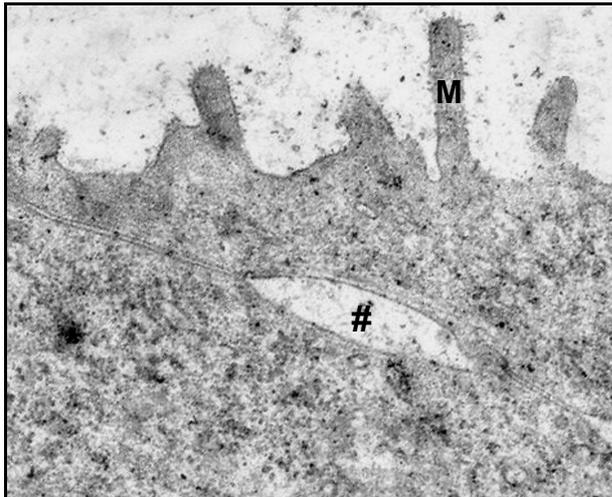


Abb. 4.39: Membraneinsatz, mEEZ. Die Zellen weisen an ihrer freien Oberfläche einen Besatz mit Mikrovilli (M) auf. Der Interzellularraum ist zum Teil erweitert (Raute).
TEM, Uranylazetat/Blei,
Gerätevergrößerung 12.000 x

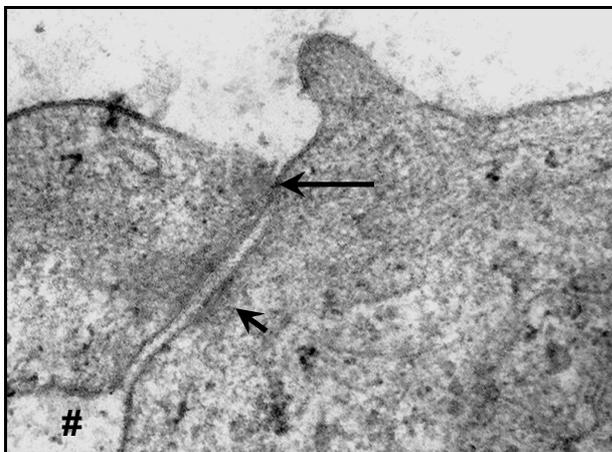


Abb. 4.40: Membraneinsatz, mEEZ. Zwischen benachbarten Zellen sind *tight junctions* (langer Pfeil) und *Zonulae adhaerentes* (kurzer Pfeil) ausgebildet. Der Interzellularraum ist zum Teil erweitert (Raute).
TEM, Uranylazetat/Blei,
Gerätevergrößerung 50.000 x

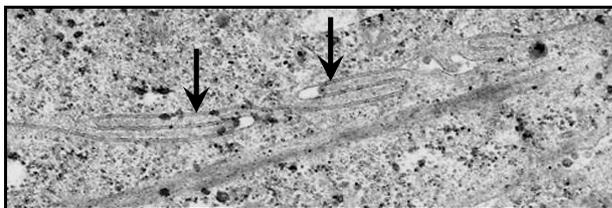


Abb. 4.41: Membraneinsatz, mEEZ. Benachbarte Zellen sind seitlich durch Interdigitationen verbunden (Pfeile).
TEM, Uranylazetat/Blei,
Gerätevergrößerung 7.000 x

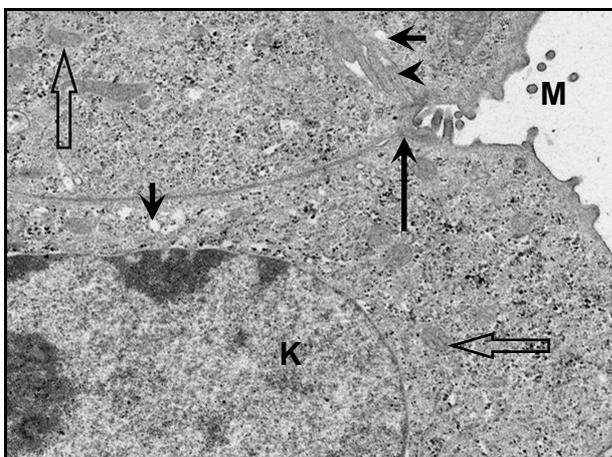


Abb. 4.42: Membraneinsatz, mEEZ. Innerhalb des Zytoplasmas befinden sich Sekretionsvakuolen (kurze Pfeile) sowie Mitochondrien (offene Pfeile). Interzelluläre Verbindungen in Form von *tight junctions* (langer Pfeil) und Interdigitationen (Pfeilspitze). Zellkern (K), Mikrovilli-Querschnitte (M).
TEM, Uranylazetat/Blei,
Gerätevergrößerung 7.000 x

4.6.2 Stromazellen

Die auf den Millicell[®]-Membranen kultivierten mESZ weisen in keiner der ausgewählten Proben (n = 3) Oberflächenmodifikationen in Form von Mikrovilli oder *tight junctions* auf. Die Zellen bilden häufig lange Ausläufer, welche zwischen benachbarten Zellen großflächige Überlappungen zeigen können (Abb. 4.43). Gelegentlich sind Ausstülpungen in die Poren der Millicell[®]-Membran hinein zu beobachten. Eine Produktion von Interzellularsubstanz in Form kollagener Fasern ist nicht zu verzeichnen. Innerhalb des Zytoplasmas sind weder Sekretionsvakuolen noch Glykogengranula nachweisbar. Demgegenüber findet sich ein deutlich ausgebildetes rER in Form langer Zisternen; diese weisen zum Teil eine parallele Anordnung auf, meist sind sie jedoch dilatiert und enthalten mäßig elektronendichtes Material (Abb. 4.43). Daneben sind zahlreiche runde bis längsovale Mitochondrien vom Crista-Typ (Abb. 4.44), ein Golgi-Apparat sowie einige freie Ribosomen vorhanden. Der Zellkern besitzt eine von rundoval bis längsoval variierende Gestalt.

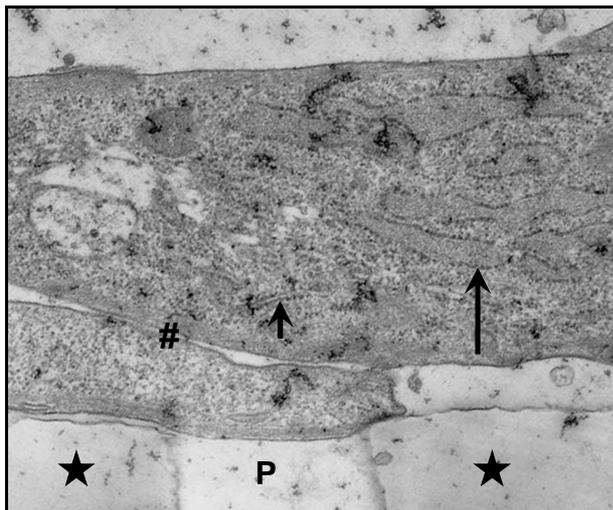


Abb. 4.43: Membraneinsatz, mESZ. Benachbarte Zellen zeigen Überlappungen (Raute), weisen jedoch keine interzellulären Verbindungen auf. Die Zisternen des deutlich ausgebildeten rER sind meist dilatiert (langer Pfeil), daneben kommen auch parallele Anordnungen vor (kurzer Pfeil). Millicell[®]-Membran (Stern) mit Pore (P). TEM, Uranylazetat/Blei, Gerätevergrößerung 12.000 x

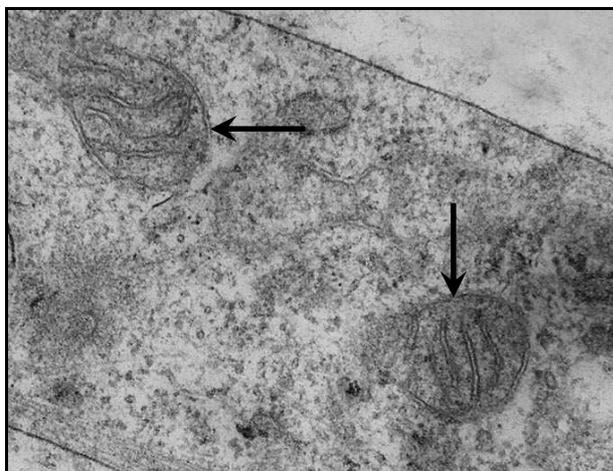


Abb. 4.44: Membraneinsatz, mESZ. Die Zellen enthalten zahlreiche Mitochondrien (Pfeile). TEM, Uranylazetat/Blei, Gerätevergrößerung 30.000 x

5 DISKUSSION

5.1 Ziel der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die morphologische und funktionelle Charakterisierung endometrialer Epithel- und Stromazellen des Pferdes *in vitro*. Dadurch soll die Basis für weiterführende Untersuchungen an diesem Zellkulturmodell geschaffen werden, so dass insbesondere bei einer gezielten Änderung definierter Kulturbedingungen, d. h. bei einer Einwirkung von Störfaktoren/Noxen eine Beurteilung der Auswirkungen dieser Beeinflussung ermöglicht wird.

5.2 Kritische Beurteilung des Untersuchungsmaterials

In dieser Arbeit wurden Endometriumproben verschiedener Zyklusphasen zur Zellgewinnung und anschließenden Kultivierung herangezogen, um das Vorliegen zyklusabhängiger Unterschiede der Eigenschaften der kultivierten Zellen zu überprüfen, wie sie bei humanen Endometriumzellkulturen beschrieben werden (FLEMING u. GURPIDE 1982, MATTHEWS et al. 1992, MYLONAS et al. 2003b). In wenigen Fällen besteht im eigenen Untersuchungsgut eine Diskrepanz zwischen dem klinisch dokumentierten bzw. anhand der ovariellen Funktionsmorphologie bestimmten Zyklusstand und der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellisolierung. Die Betrachtungen zur Zyklusabhängigkeit basieren daher ausschließlich auf dem endometrialen Zyklus, d. h. der histomorphologisch erfassten endometrialen Differenzierung. Diese tritt in den untersuchten Proben sowohl in Form physiologisch inaktiver als auch proliferativer bzw. sekretorischer Funktionsmorphologie auf, so dass alle im Zuge des regulär ablaufenden Zyklus auftretenden endometrialen Funktionszustände Berücksichtigung finden. Darüber hinaus sind einzelne Proben einer irregulären proliferativen bzw. sekretorischen Differenzierung, einem Übergangszustand zwischen Sekretion und Proliferation sowie einer Sekretionsmorphologie im Rahmen der Gravidität zuzuordnen.

Bei den mittels transzervikaler Biopatientnahme gewonnenen Endometrien lebender, klinisch genitalgesunder Stuten wurden histopathologisch keine entzündlichen Veränderungen festgestellt; demgegenüber wiesen einige der toten Stuten eine nicht-exsudative Endometritis auf, für die im Rahmen der makroskopischen Untersuchung unmittelbar vor der Probenentnahme keine Hinweise bestanden, so dass diese Endometrien nicht von der Zellisolierung ausgeschlossen wurden. Weiterhin stellte das Vorliegen einer Endometrose kein Ausschlusskriterium für die Aufbereitung des Gewebes zur Kultivierung dar, da diese Erkrankung klinisch nicht erfassbar ist.

Während in den wenigen Beschreibungen kultivierter equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen bis auf eigene Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010, THEUSS et al. 2010) stets Bioptate zur Zellisolierung herangezogen werden (BRADY et al. 1992, 1993, WATSON et al. 1992, DAY et al. 1998, BUSCHATZ 2007), finden bei anderen Spezies neben Bioptaten (OSTEEN et al. 1989, MERVIEL et al. 1995) auch operativ oder postmortal gewonnene Uteri (CHERNY u. FINDLAY 1990, TIEMANN et al. 1994, ARSLAN et al. 1995, CLASSEN-LINKE et al. 1997) Verwendung.

Ausgehend von den Ergebnissen der vorgestellten Arbeit eignen sich sowohl Bioptate als auch vollständige Uteri zur Zellgewinnung zum Zwecke der Kultivierung. Damit finden sich bei dem Probenmaterial euthanasierter Stuten keine Anhaltspunkte für einen Verlust der Lebensfähigkeit der isolierten Zellen, wie er von BUSCHATZ (2007) angenommen wird. Die Euthanasie aller in der vorliegenden Studie zur Zellgewinnung verwendeten Stuten wurde mit dem Pharmakon T 61[®] durchgeführt; bei BUSCHATZ (2007) finden sich keine Angaben über die Euthanasiemethode. Das Bestehen möglicher Zusammenhänge zwischen der Art des Euthanasiemittels (Barbiturate versus T 61[®]) und der Anzüchtbarkeit der isolierten Zellen kann somit bisher nicht abschließend beurteilt werden. Eine mögliche Ursache für die differierenden Kultivierungserfolge könnte zudem auch eine unterschiedliche Zeitdauer zwischen dem Euthanasievorgang und dem Beginn der Gewebsaufarbeitung für die Kultivierung sein.

Ein Vorteil der Zellisolierung aus transzervikal entnommenen Endometriumbioptaten gegenüber den postmortal gewonnenen Uteri ist die Möglichkeit der prospektiven Bestimmung des klinisch erfassbaren Zyklusstandes. Die Zellvitalität ist aufgrund der in der Regel deutlich kürzeren Zeitspanne zwischen Bioptatentnahme und Beginn der Zellisolierung tendenziell höher, da zwischen dem Tod des Tieres und der Zellisolierung meist eine etwas längere Zeitdauer besteht. Weiterhin steht einer sterilen Entnahmetechnik mittels Biopsiezange eine potenzielle Kontamination des Gewebes im Zuge der postmortalen Exenteration der Gebärmutter gegenüber. Unter Tierenschutzaspekten stellt die transzervikale Entnahme eines Endometriumbioptates einen minimalinvasiven Eingriff am lebenden Tier dar, welcher sich selbst bei wiederholter Probenentnahme innerhalb eines kurzen Zeitraumes nicht negativ auf die Reproduktionsaussichten der Stute auswirkt (WATSON u. SERTICH 1992). Dennoch ist gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes eine Anzeige des Versuchsvorhabens bei der zuständigen Behörde erforderlich.

Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung vollständiger Uteri ist die theoretisch mögliche, sehr hohe Anzahl zu gewinnender Zellen, welche bei der Beprobung lebender Stuten durch die Größe des Bioptates limitiert ist.

Die Anzahl der isolierten Zellen hat Einfluss auf die Verfügbarkeit von Zellpellets zur Untersuchung der isolierten und separierten Zellen unmittelbar vor Beginn der Kulti-

vierung. Während im Falle der mESZ die „kritische“ Zellzahl von ca. 1 Million nicht für die Kultivierung benötigter Zellen häufig erreicht wird, steht seitens der mEEZ in der Regel kein ausreichendes Zellmaterial zur Verfügung. Diese Tatsache ist nicht zuletzt auch bedingt durch eine inhomogene Verteilung der Zellen innerhalb der Suspension. So werden in den Zellverbänden, welche den überwiegenden Anteil der in den Pellets auftretenden Zellen beinhalten, zwar punktuell hohe Zellzahlen erreicht, dazwischen befinden sich innerhalb des Pellets jedoch sehr zellarme Areale, in denen lediglich wenige Einzelzellen lokalisiert sind. Für eine repräsentative Aussage sind die mEEZ-Pellets daher weniger geeignet. Im Gegensatz dazu liegt in den mESZ-Suspensionen und daher auch in den zugehörigen Pellets eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der überwiegend einzeln auftretenden Zellen vor, so dass von einer Repräsentativität dieses Untersuchungsmaterials auszugehen ist.

Die aus physiologisch inaktiven Endometrien (klinisch als Winteranöstrus klassifizierter Zyklusstand) gewonnenen mEEZ zeigen im Rahmen der Nativmikroskopie während des Mediumwechsels keine erhöhte Kreuzkontamination mit mESZ. Demgegenüber liegt der Separationserfolg bezüglich der aus den physiologisch inaktiven Endometrien isolierten mESZ in 4 der 5 angelegten Kulturen in einem derart niedrigen Bereich, dass eine Einstufung als Monokultur nicht vertretbar ist. Insgesamt sind daher physiologisch inaktive Endometrien des Pferdes als nicht geeignet für die Gewinnung stromaler Zellen anzusehen.

Die Ursache für die Kreuzkontamination mit epithelialen Zellen liegt wahrscheinlich in der deutlich geringeren Größe und einer möglicherweise dadurch bedingten abweichenden physikalischen Dichte der Uterindrüsen im Vergleich zum zyklisch aktiven Endometrium. Dadurch können die epithelialen Zellverbände bei der Filtration die Poren des Siebgewebes passieren. Zudem wird möglicherweise auch im Zuge der Dichtegradientenzentrifugation eine unzureichende Auftrennung der verschiedenen Zellpopulationen erreicht. Somit erfordert die Primärkultivierung endometrialer Stromazellen in der Zyklusphase des Winteranöstrus eine Modifizierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellseparationsverfahrens. Wird nicht zwangsläufig eine Primärkultur angestrebt, kann, ausgehend von einer primären Mischkultur epithelialer und stromaler Zellen, der Versuch einer Zellseparation mittels Kurzzeittrypsinisierung unternommen werden, in deren Rahmen eine selektive Ablösung der Stromazellen vom Substrat erfolgt (MERVIEL et al. 1995).

5.3 Histochemische und immunhistologische Untersuchungen des Endometriums *in situ*

Die Ergebnisse der histochemischen (Alzianblau-Färbung, PAS-Reaktion) und immunhistologischen Untersuchungen bezüglich der Expression von Vimentin, Desmin

und α -Glattmuskel-Aktin stimmen sowohl im gesunden zyklisch aktiven als auch physiologisch inaktiven Endometrium sowie bei Vorliegen einer Endometriose im wesentlichen mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren überein (FREEMAN et al. 1990, AUPPERLE 1997, CAUSEY et al. 2000, RAILA 2000, WALTER et al. 2001, AUPPERLE et al. 2003, 2004, HOFFMANN 2006, HOFFMANN et al. 2009), wobei gegenüber diesen in der vorliegenden Arbeit die im Folgenden dargestellten Abweichungen auftreten.

Bezüglich des Nachweises von Proteoglykanen ist im eigenen Untersuchungsgut entgegen der Ergebnisse von FREEMAN et al. (1990) festzustellen, dass auch im luminalen Epithel des physiologisch inaktiven Endometriums ein Teil der Zellen Alzianblau-positiv reagiert. Zudem finden sich ergänzend zu den Angaben von FREEMAN et al. (1990), CAUSEY et al. (2000) und HOFFMANN (2006) auch im Bereich der Drüsenausführungsgänge positiv reagierende Zellen.

Der Nachweis PAS-positiven Materials gelingt im eigenen Untersuchungsgut entgegen der Ergebnisse von HOFFMANN (2006), jedoch übereinstimmend mit den Angaben von FREEMAN et al. (1990) und CAUSEY et al. (2000) auch in den Zellen des luminalen Epithels. Ergänzend zu den Resultaten dieser Autoren finden sich in der vorliegenden Arbeit auch in den duktalem Epithelzellen Polysaccharide/Glykoproteine.

Während AUPPERLE et al. (2004) in Epithelzellen des gesunden Endometriums in keinem Fall eine Vimentin-Expression feststellen konnten, ist im eigenen Untersuchungsgut gelegentlich in Zellen des histomorphologisch unveränderten luminalen Epithels eine positive Reaktion für Vimentin zu beobachten. Vergleichbare Befunde konnten bereits in eigenen Vorarbeiten erhoben werden (BÖTTCHER et al. 2010).

Übereinstimmend mit AUPPERLE et al. (2004), tritt im eigenen Untersuchungsgut in den endometrialen Stromazellen *in situ* in keinem Fall eine Expression von Zytokeratinen auf.

Eine subtypspezifische Untersuchung der Zytokeratin-Expression in den Epithelien des equinen Endometriums erfolgte bisher lediglich in eigenen Vorarbeiten. Dabei war in zahlreichen Epithelzellen Zytokeratin 19 nachweisbar, während die Zytokeratine 8 und 18 kaum oder gar nicht exprimiert wurden; zudem fanden sich positive Reaktionsprodukte für K8 und K18 ausschließlich in Zellen der Uterindrüsen, während K19 auch in luminalen und duktalem Epithelien auftrat (BÖTTCHER et al. 2010).

Auch in der vorliegenden Arbeit finden sich im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung auf K8 im zyklisch aktiven Endometrium ausschließlich im Bereich der Uterindrüsen positiv reagierende Zellen. Demgegenüber wird K18 auch in einem Teil der Zellen des Oberflächenepithels und der Drüsenausführungsgänge exprimiert. Für K19 ist eine starke Schwankung der Anzahl positiv reagierender Zellen festzustellen, z. T. ist das Protein in den einzelnen Proben nur in wenigen Zellen nachweisbar.

Eine mögliche Ursache dieser Diskrepanzen könnte die deutlich geringere und daher weniger repräsentative Probenzahl in den eigenen Vorarbeiten sein. Zudem liegt bezüglich des Nachweises von K19 eine andere Probenvorbehandlung und Antikörperverdünnung bei der Anfertigung der immunhistologischen Präparate vor: so wurden, abweichend von dem von BÖTTCHER et al. (2010) verwendeten Protokoll (Vorbehandlung mit Protease, Primärantikörper-Verdünnung 1:100), die aufgezogenen Schnitte in Zitrat-Puffer gekocht und der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt. Die Änderung war erforderlich geworden, da die in dieser Arbeit als Kultursubstrat genutzten Millicell®-PET-Membraneinsätze sich als nicht Protease-stabil erwiesen hatten.

Bei beiden Protokollen treten deutliche Unterschiede zu den Untersuchungsergebnissen bezüglich der endometrialen Zytokeratin-Expression in anderen Spezies zu Tage: K8, K18 und K19 werden als typische Keratine einfacher Epithelien, einschließlich des Endometriums, sowohl des Menschen (MOLL et al. 1983, BÁRTEK et al. 1986, OLSON et al. 2002, OWENS u. LANE 2003, MO et al. 2006) als auch der Maus (MAGIN et al. 1998, TAMAI et al. 2000) angesehen.

Die Zytokeratin-Expression im equinen Endometrium zeigt AUPPERLE et al. (2004) zufolge bei Verwendung eines Anti-Zytokeratin-pan-Antikörpers keine zyklusabhängigen Schwankungen. Dies kann bei der subtypspezifischen Detektion der Zytokeratine 8, 18 und 19 im eigenen Untersuchungsgut für das zyklisch aktive Endometrium ebenfalls festgestellt werden. Demgegenüber ist im physiologisch inaktiven Endometrium K8 in keinem Fall nachweisbar, während K19 tendenziell häufiger und intensiver als im zyklisch aktiven Endometrium exprimiert wird. Im humanen Endometrium können OLSON et al. (2002) dagegen eine zyklusunabhängige Expression von K18 und K19 sowohl in den luminalen als auch den glandulären Epithelzellen nachweisen. Im Gegensatz dazu beobachten diese Autoren jedoch eine Abhängigkeit der Expression von K13 (welches nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ist) sowohl vom endometrialen Zyklus als auch von der Epithelzellsubpopulation, da dieses Zytokeratin in keinem Fall in den Drüseneithelien auftritt.

Bei Vorliegen einer Endometrose kann im eigenen Untersuchungsgut bezüglich aller drei untersuchten Zytokeratine (K8, K18, K19) in etwas unterschiedlichem Maße eine tendenziell häufigere und intensivere Expression beobachtet werden. Eine derartige Beeinflussung der subtypunabhängigen Zytokeratin-Expression können AUPPERLE et al. (2004) nicht feststellen.

Eine mögliche Ursache der im eigenen Untersuchungsgut teilweise bestehenden Abhängigkeit der Expression der untersuchten Zytokeratin-Subtypen sowohl von bestimmten Zyklusphasen (Winteranöstrus) als auch dem Vorliegen pathologischer Zustände (Endometrose) könnten verschiedene physiologische bzw. pathologische Differenzierungszustände der betroffenen Epithelzellen sein, da die einzelnen Sub-

typen der Zytokeratine im Allgemeinen als Differenzierungsmarker angesehen werden (HUTTON et al. 1998, CHU u. WEISS 2002, MOLL et al. 2008).

5.4 Charakterisierung der Zellen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung

5.4.1 Morphologie

In den Zellpellets der mEEZ dominieren in Verbänden liegende Zellen (= Zelltyp 1), deren Morphologie der von Uterindrüsenanschnitten *in situ* vergleichbar ist. Zahlreiche Autoren berichten hinsichtlich isolierter endometrialer Epithelzellen überwiegend von einem Auftreten in Form von Drüsenverbänden (SATYASWAROOP et al. 1979, VARMA et al. 1982, MULHOLLAND et al. 1988, WATSON et al. 1992, BRADY et al. 1993, CLASSEN-LINKE et al. 1997, MYLONAS et al. 2003b, BUSCHATZ 2007).

Demgegenüber werden die Stromazellen im Zuge der enzymatischen Gewebedissoziation meist als Einzelzellen isoliert (WALTON et al. 1986, ZHANG et al. 1991, WATSON et al. 1992, VIGANÒ et al. 1993, MYLONAS et al. 2003b, BUSCHATZ 2007), können jedoch auch in kleinen „Zellklumpen“ auftreten (WATSON et al. 1992). Auch im eigenen Untersuchungsgut liegen die Zellen in den mESZ-Pellets überwiegend in vereinzelter Form vor (= Zelltyp 2).

Da im Zuge der Zellisolierung jedoch auch eine Abtrennung einzelner Epithelzellen aus den Drüsenschläuchen möglich erscheint (beispielsweise durch das regelmäßige Aspirieren der Verdauungslösung als mechanische Unterstützung der enzymatischen Zersetzung der Gewebeprobe), ist ein epithelialer Ursprung der einzeln liegenden Zellen nicht gänzlich auszuschließen.

Insgesamt ist daher eine Unterscheidung isolierter endometrialer Epithel- und Stromazellen ausschließlich anhand morphologischer Kriterien nicht sicher möglich, wenngleich davon auszugehen ist, dass es sich bei den in Verbänden liegenden Zellen (Zelltyp 1) am ehesten um Epithelzellen handelt, während die einzeln liegenden Zellen (Zelltyp 2) am ehesten Stromazellen darstellen.

5.4.2 Zytochemie, Immunzytologie

Über zytochemische und immunzytologische Eigenschaften isolierter endometrialer Zellen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung finden sich in der Literatur nur sehr wenige Angaben, da die entsprechenden Untersuchungen in der Regel nur an bereits kultivierten Zellen stattfinden. Daher beschränken sich die nachfolgenden Überlegungen z. T. nur auf die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen.

Unmittelbar vor Beginn der Kultivierung sind sowohl in den mEEZ als auch den mESZ keine Proteoglykane nachweisbar. Somit erfolgt entweder im Rahmen der

Aufarbeitung für die Kultivierung eine Selektion zu Ungunsten der epithelialen Zellpopulationen, welche *in situ* Alzianblau-positiv reagieren können (luminales Epithel, Drüsenausführungsgänge, endometrotische Uterindrüsen), oder die Proteoglykane werden im Zuge der Zellisolierung und -separation aus den Zellen freigesetzt.

Zu letzterer Hypothese könnte auch der im Vergleich zu allen endometrialen Epithelzellpopulationen *in situ* deutlich niedrigere Anteil PAS-positiver mEEZ in den Pellets passen. Da sich zumindest im zyklisch aktiven Endometrium sowohl im luminalen und dukталen als auch im glandulären Epithel in nahezu allen Zellen Polysaccharide/Glykoproteine nachweisen lassen, erscheint eine Selektion zu Gunsten der wenigen *in situ* nicht positiv reagierenden Zellen äußerst unwahrscheinlich. Passend zu der fehlenden Nachweisbarkeit von Polysacchariden/Glykoproteinen in den endometrialen Stromazellen *in situ* enthalten insgesamt nur sehr wenige Typ-2-Zellen PAS-positive Strukturen.

An Ausstrichpräparaten equiner endometrialer Zellen kann BUSCHATZ (2007) unmittelbar vor Beginn der Kultivierung in nahezu allen der aufgrund der Separationsschritte als Epithelzellen anzusehenden Zellen Zytokeratin nachweisen. Demgegenüber reagieren nur sehr wenige der entsprechend als Stromazellen separierten Zellen positiv; diese werden von der Autorin als einzeln liegende Epithelzellen klassifiziert. Bei der subtypspezifischen Untersuchung isolierter humaner endometrialer Drüsenepithelien unmittelbar vor Beginn der Kultivierung tritt in allen Zellen eine Expression von K8, K18 und K19 auf, was als eindeutiges Merkmal zur Unterscheidung von stromalen Zellen genutzt wird (MYLONAS et al. 2000).

Eine derartige eindeutige Unterscheidung kann am eigenen Untersuchungsgut nicht vorgenommen werden, da bereits *in situ* nicht alle Epithelzellen diese Zytokeratin-Subtypen exprimieren. Hiermit vereinbar ist die fehlende Nachweisbarkeit von K8 und K18 in jeglichen pelletierten Zellen sowie von K19 in einem Teil der morphologisch an Uterindrüsenfragmente erinnernden Zellen des Typs 1 (siehe Kap. 5.4.1, S. 80). Die positive Reaktion für K19 in einigen der Typ-2-Zellen lässt auf einen epithelialen Ursprung der entsprechenden Zellen schließen. Demzufolge kommen, wie bereits zuvor vermutet (siehe Kap. 5.4.1, S. 80), nach den Isolierungs- und Separationsschritten nicht nur in Verbänden, sondern auch einzeln auftretende Epithelzellen vor.

Eine mögliche Ursache für den Nachweis von Vimentin in wenigen Zellen des Typs 1 könnte die Isolierung von Drüsenepithelien aus endometrotischen Herden sein, da diese *in situ* sowohl im eigenen Untersuchungsgut als auch den Angaben von AUPPERLE et al. (2004) und HOFFMANN et al. (2009) zufolge Vimentin exprimieren können. Aufgrund der Morphologie der Zellverbände ist eher nicht von einem stromalen oder vaskulären Ursprung der Typ-1-Zellen auszugehen.

Während BUSCHATZ (2007) in allen der (aufgrund ihrer negativen Reaktion für Zytokeratin) als Stromazellen klassifizierten equinen endometrialen Zellen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung Vimentin nachweisen kann, gelingt dies im eigenen Untersuchungsgut nur in einem vergleichsweise kleinen Teil der Zellen des Typs 2. Der Anteil der Stromalen Vimentin-Expression *in situ* liegt sowohl im eigenen Untersuchungsgut als auch den Ergebnissen von AUPPERLE et al. (2004) zufolge deutlich höher. Möglicherweise kommt es im Zuge des Isolierungs- und Separationsprozesses, welcher nicht zuletzt mit einer atypischen rund-ovalen Form der Typ-2-Zellen einhergeht, zu Alterationen des Zytoskeletts, die zu einer Abnahme der Immunreaktivität führen. Änderungen der Architektur des Vimentin-Netzwerkes in runden, nicht auf einem Substrat haftenden Zellen *in vitro* werden beispielsweise von FRANKE et al. (1979) beobachtet.

Grundsätzlich ist bezüglich des Vimentin-Nachweises in den Einzelzellen auch ein epithelialer Ursprung (Isolierung aus der Endometrose, siehe oben) sowie eine Kontamination mit Gefäßwandzellen in Betracht zu ziehen. Das Vorhandensein endothelialer Zellen wird von BUSCHATZ (2007) (bei Verwendung einer im Vergleich zur vorliegenden Arbeit nahezu identischen Isolierungs- und Separationsmethode) durch den fehlenden immunzytologischen Nachweis endothelzellspezifischer Antigene in allen isolierten Zellpopulationen ausgeschlossen. Über eine mögliche Kontamination mit Blutgefäßmyozyten kann keine definitive Aussage getroffen werden.

BUSCHATZ (2007) kann unmittelbar vor Beginn der Kultivierung in den equinen endometrialen Stromazellen weder α -Glattmuskel-Aktin noch Desmin nachweisen. Im eigenen Untersuchungsgut können Desmin und α -GMA *in situ* nicht in endometrialen Epithelien nachgewiesen werden. Passend dazu ist auch in den Typ-1-Zellen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung keine Expression zu beobachten. Demgegenüber reagiert ein kleiner Teil der Zellen des Typs 2 positiv. Ursächlich kommt zum einen eine Isolierung und Separation von endometriotischen Stromazellen in Frage, welche, ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowie nach den Angaben von RAILA (2000), WALTER et al. (2001), AUPPERLE et al. (2004) und HOFFMANN et al. (2009), eine Desmin- und/oder α -GMA-Expression aufweisen können. Zum anderen könnte diese Eigenschaft der Typ-2-Zellen auf eine Kontamination der jeweiligen Zellfraktion mit Myozyten der Gefäßwände hinweisen, da diese *in situ* α -GMA (WALTER et al. 2001) und Desmin (AUPPERLE et al. 2004) exprimieren. Weiterhin ist in Anlehnung an die Ergebnisse von MASUR et al. (1996) eine beginnende Differenzierung Stromaler Zellen zu Myofibroblasten durch den Verlust der interzellulären Kontakte bei der Dissoziation zu Einzelzellen in Betracht zu ziehen.

5.5 Morphologie und Differenzierung der kultivierten Endometriumzellen

5.5.1 Morphologie

Hinsichtlich der Morphologie endometrialer Zellen *in vitro* finden sich in der Literatur sehr häufig Berichte über die Phasenkontrastmikroskopie bei Kultivierung auf impermeablen Glas-/Plastikoberflächen. Diese Angaben sind aufgrund der Betrachtungsebene (Aufsicht) nicht oder nur bedingt mit dem eigenen Untersuchungsgut (Schnittansicht) vergleichbar. Daneben wird häufig Matrigel™ und/oder Kollagen als Substrat verwendet, was häufig zu einer Zellproliferation in das Substrat hinein und damit zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen führt (WHITE et al. 1990, CLASSEN-LINKE et al. 1997), so dass deren morphologische Charakteristika ebenfalls nur bedingt mit denen des eigenen Untersuchungsgutes vergleichbar sind.

5.5.1.1 Epithelzellen

Im eigenen Untersuchungsgut sind auf den Querschnitten der mit mEEZ inkubierten Millicell®-Membranen insgesamt 4 verschiedene Zelltypen nachweisbar. Lediglich einer dieser Zelltypen (Typ 3) kann ausschließlich auf mEEZ-Membranen beobachtet werden, während die anderen Typen jeweils ein morphologisches Pendant auf den mit mESZ inkubierten Membranen besitzen. Die Anteile der verschiedenen Zelltypen in der Schnittebene unterscheiden sich: am häufigsten treten die Zelltypen 1 und 2 auf, wobei sie etwa gleich große Anteile ausmachen; der Zelltyp M kommt vergleichsweise am seltensten vor. Bei diesen mehrschichtig wachsenden Zellen könnte es sich möglicherweise um Residuen der eingesäten Drüsenschläuche handeln, da nach Ansicht von VIGANÒ et al. (1993) die Einsaat der Epithelzellen in Form präexistenter Zellverbände zu Schwierigkeiten bei der Ausbildung von Monolayern führen kann. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von GLASSER et al. (1988) an Kulturen endometrialer Epithelzellen der Ratte treten die iso- bis hochprismatischen Zellen (Typ 3) wahrscheinlich in Bereichen der Wachstumsoberfläche auf, in denen die Konfluenz der Zellen schon etwas länger besteht als in den übrigen Arealen, da den Zellen bei einem Fortschreiten der Zellteilung immer weniger Fläche zur Verfügung steht. Dadurch sind in den Zellen des Typs 3 nicht nur ultrastrukturelle, sondern auch lichtmikroskopische Anzeichen einer Polarisierung erkennbar.

MUNSON et al. (1990) beobachten bei Kultivierung boviner endometrialer Epithelzellen auf unbeschichteten Zellulose-Membranen an der Gas-Flüssigkeits-Grenze eine den Typen 1 und 3 des eigenen Untersuchungsgutes ähnliche ultrastrukturelle und lichtmikroskopische Morphologie; im Gegensatz dazu besitzen die Zellen bei Überschichtung mit dem Kulturmedium eine flache Form.

Ein kuppenförmiges Wachstum oder die Ausbildung von Hohlräumen innerhalb mehrschichtig wachsender Zellkolonien, wie sie sowohl von BUSCHATZ (2007) als auch im Rahmen eigener Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010) beobachtet wird, tritt innerhalb der Schnittebene in keiner der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben auf. Dies könnte möglicherweise durch Unterschiede in der Zusammensetzung des Substrates und/oder des Kulturmediums begründet sein.

Auf Glasoberflächen kultivierte Epithelzellen des humanen Endometriums weisen KIRK et al. (1978) zufolge häufig ein zweischichtiges Wachstum auf; zudem stellen diese Autoren einen Zusammenhang zwischen einem kuppenförmigen Zellwachstum und einer hohen Einsaatdichte fest.

Bei Kultivierung endometrialer Epithelzellen verschiedener Spezies auf impermeablen Glas- oder Plastikoberflächen stellen sich die Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie entweder morphologisch ähnlich dar oder es sind zwei morphologisch verschiedene Zelltypen erkennbar. So berichten VARMA et al. (1982) und VIGANÒ et al. (1993) über entsprechende Kulturen humaner Zellen ohne morphologische Unterscheidung verschiedener Zelltypen, während OSTEEN et al. (1989) und MATTHEWS et al. (1992) zwei verschiedene Morphologien differenzieren. Letzteres trifft ebenso für Epithelzellen des Stutenendometriums zu (WATSON et al. 1992, THEUSS et al. 2010).

Zur ultrastrukturellen Unterscheidung der Epithelzellen von den Stromazellen dienen in endometrialen Kulturen des Menschen (KIRK et al. 1978, VARMA et al. 1982, KLEINMAN et al. 1983, CENTOLA et al. 1984, HOPFER et al. 1994), des Kaninchens (RICKETTS et al. 1983, MULHOLLAND et al. 1988) und des Pferdes (BRADY et al. 1993) der Nachweis von Mikrovilli und *tight junctions* in den epithelialen Zellen. Auch im eigenen Untersuchungsgut treten derartige Modifikationen der Zelloberfläche ausschließlich in den exemplarisch untersuchten mEEZ-Proben auf, was als Bestätigung des epithelialen Ursprungs dieser Zellpopulation zu betrachten ist.

Zudem ist das Vorhandensein von *tight junctions* Ausdruck einer Polarisierung der Zelle, da diese Membranstrukturen die für die apikalen und basolateralen Membrandomänen spezifischen Proteine voneinander trennen und für diese eine Diffusionsbarriere darstellen (SIMONS u. FULLER 1985, RODRIGUEZ-BOULAN u. NELSON 1989). Dennoch scheinen derartige Oberflächenmodifikationen kein zwingend zu erfüllendes Kriterium einer Polarisierung zu sein, da VEGA-SALAS et al. (1987) und RODRIGUEZ et al. (1994) in epithelialen Zelllinien der Hundeniere *in vitro* eine polarisierte Lokalisation apikaler Membranproteine trotz des Fehlens von *tight junctions* nachweisen können. Die Entwicklung eines polarisierten Phänotyps wird durch Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte initiiert (RODRIGUEZ-BOULAN u. NELSON 1989). Somit kommt der Wachstumsoberfläche eine wichtige Rolle für die Zellpolarität *in vitro* zu (CHAMBARD et al. 1981, HALL et al. 1982). Insbesondere durch die Ermög-

lichung eines basolateralen Nährstoffzutritts wird eine Polarisierung der kultivierten Zellen gefördert (SIMONS u. FULLER 1985). In der vorliegenden Arbeit wird dieser Tatsache durch die Kultivierung auf permeablen Kunststoffoberflächen Rechnung getragen.

Ungeachtet des im eigenen Untersuchungsgut erfolgten transmissionselektronenmikroskopischen Nachweises von *tight junctions* kann in den kultivierten mEEZ mehrheitlich keine deutliche lichtmikroskopisch erfassbare Polarisierung der Zellen festgestellt werden. Auch in endometrialen Epithelzellen des Menschen und des Kaninchens *in vitro* gelingt VARMA et al. (1982) bzw. MULHOLLAND et al. (1988) trotz einer nicht oder nicht deutlich für eine Polarisierung sprechenden lichtmikroskopischen Zellmorphologie der ultrastrukturelle Nachweis von *tight junctions*. *In situ* weisen die flachen Zellen des einschichtigen Plattenepithels, welches z. B. als Deckepithel seröser Häute vorkommt, *tight junctions* auf, die die Zellmembran in unterschiedliche Domänen trennen (LIEBICH 2009).

Hinsichtlich der über diese Oberflächenstrukturen hinaus zu verzeichnenden Befunde entsprechen die ultrastrukturellen Charakteristika im eigenen Untersuchungsgut im wesentlichen der von BUSCHATZ (2007) beobachteten Morphologie equiner endometrialer Epithelzellen *in vitro*. Darüber hinaus besitzen auch kultivierte Epithelzellen des Endometriums anderer Spezies eine ähnliche Ausstattung mit Zellorganellen. Dabei beschreiben RICKETTS et al. (1983) entsprechend der in der vorliegenden Arbeit zu verzeichnenden Ultrastruktur eine relative Armut endometrialer Epithelzellen des Kaninchens an rauem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat. Während VARMA et al. (1982) in humanen endometrialen Epithelzellen *in vitro* ebenfalls nur wenig rER und wenige Mitochondrien nachweisen können, stellen sich diese Zellen den Angaben von CENTOLA et al. (1984) zufolge als reich an rER, Mitochondrien, Glykogengranula und Lipidtropfen dar. Letztere kommen in den exemplarisch untersuchten Proben des eigenen Untersuchungsmaterials nicht vor. Auch Glykogengranula sind in diesen Proben nicht nachweisbar, was übereinstimmend von anderen Autoren sowohl für equine endometriale Epithelzellen *in vitro* (BUSCHATZ 2007) als auch *in situ* berichtet wird (SAMUEL et al. 1979, KEENAN et al. 1991, TUNON et al. 1995, RAILA 2000). Neben einer tatsächlichen Abwesenheit ist eine mangelnde Nachweisbarkeit des Glykogens aufgrund des verwendeten Aufarbeitungsprotokolls für die Elektronenmikroskopie in Betracht zu ziehen. Eine deutliche Darstellung elektronendichter Glykogengranula gelingt mit Hilfe einer spezifischen histo-/zytochemischen Nachweismethode (LO et al. 1987).

Insgesamt sind die morphologischen Charakteristika der equinen endometrialen Epithelzellen *in vitro* am ehesten mit der von RAILA (2000) beschriebenen Morphologie während der Sekretionsphase des equinen Endometriums *in situ* vergleichbar. Zu diesem Schluss kommt auch BUSCHATZ (2007) bei Kultivierung der Zellen auf Matrigel™.

5.5.1.2 Stromazellen

Auf den Querschnitten der mit mESZ inkubierten Millicell[®]-Membranen können in der vorliegenden Arbeit insgesamt 3 verschiedene Zelltypen nachgewiesen werden, welche morphologisch nicht von den auf den mEEZ-Membranen vorhandenen Zellen unterschieden werden können. Am häufigsten ist in der Schnittebene der Zelltyp 2 sichtbar, während der Zelltyp 1 etwas weniger häufig auftritt. Mehrschichtig wachsende Zellen (Typ M) kommen vergleichsweise selten vor. Ein Übereinanderwachsen wird u. a. von mehreren Autoren in Kulturen endometrialer Stromazellen des Menschen (VARMA et al. 1982), des Kaninchens (RICKETTS et al. 1983) und des Pferdes (BUSCHATZ 2007) beschrieben.

Im Falle von auf impermeablen Glas- oder Plastikoberflächen gewachsenen endometrialen Stromazellen verschiedener Spezies verzeichnen einige Autoren im Zuge der Phasenkontrastmikroskopie zwei morphologisch verschiedene Zelltypen, während in anderen Studien von einer im wesentlichen einheitlichen Morphologie der Zellen berichtet wird. Letztere Eigenschaft kennzeichnet Stromazellkulturen der Stute (WATSON et al. 1992, THEUSS et al. 2010) und des Kaninchens (RICKETTS et al. 1983). Sie wird darüber hinaus z. T. auch für entsprechende Kulturen humaner Zellen angegeben (KIRK et al. 1978, OSTEEN et al. 1989, VIGANÒ et al. 1993), während andere Autoren diesbezüglich zwei morphologisch differente Zelltypen beobachten (VARMA et al. 1982, MATTHEWS et al. 1992, MYLONAS et al. 2003b). Hinsichtlich der Ultrastruktur entsprechen die zytologischen Charakteristika im eigenen Untersuchungsgut im wesentlichen der von BUSCHATZ (2007) beobachteten Morphologie equiner endometrialer Stromazellen *in vitro*. Kultivierte Stromazellen des humanen Endometriums besitzen eine vergleichbare Organellenausstattung (VARMA et al. 1982, HOPFER et al. 1994), jedoch sind die von HOPFER et al. (1994) beobachteten Fettvesikel im eigenen Untersuchungsgut nicht erkennbar. Übereinstimmend mit diesen Autoren stellen sich die Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums häufig dilatiert dar, was unter Einbeziehung der Elektronendichte des Zisterneninhaltes im Sinne einer hohen Syntheseleistung interpretiert werden kann (GHADIALLY 1997).

Übereinstimmend mit den Angaben von BUSCHATZ (2007) sind die morphologischen Charakteristika der kultivierten Stromazellen des Pferdeendometriums insgesamt am ehesten mit der von RAILA (2000) beschriebenen *In-situ*-Morphologie während der Sekretionsphase vergleichbar.

5.5.2 Zytochemie

5.5.2.1 Alzianblau-Färbung

Der Nachweis von Proteoglykanen fällt in allen kultivierten Zellen negativ aus, was die Ergebnisse eigener Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010) bestätigt. Die Ursache

könnte einerseits ein Sistieren der Proteoglykan-Synthese *in vitro* darstellen. Zum anderen sind, wie bereits angedeutet (siehe Kap. 5.4.2, S. 80 ff.), Selektionsmechanismen in Betracht zu ziehen, d. h. Proteoglykan-produzierende Zellen des luminalen und duktales Epithels sowie der Endometrose werden entweder bereits durch den Isolierungs- und Separationsprozess von der mEEZ-Fraktion ausgeschlossen oder sie wachsen nach der Einsaat in die Kulturgefäße nicht an bzw. sterben im Verlauf der Kultivierung ab.

5.5.2.2 PAS-Reaktion

Verglichen mit den zyklisch aktiven Endometrien können in den glandulären Epithelien während der physiologischen Inaktivität deutlich seltener Polysaccharide/Glykoproteine nachgewiesen werden. Auch in den kultivierten Zellen ist PAS-positives Material deutlich häufiger in den aus sekretorisch oder proliferativ differenzierten Endometrien gewonnenen mEEZ nachweisbar als in den entsprechenden während des Winteranöstrus isolierten Zellen, welche nur vereinzelt positiv reagieren. Insofern scheint diesbezüglich ein Zusammenhang zwischen dem Zyklusstand zum Zeitpunkt der Zellisolierung und der Syntheseleistung *in vitro* zu bestehen. Jedoch liegt auch bei den aus zyklisch aktiven Endometrien gewonnenen Zellen der Anteil positiv reagierender mEEZ z. T. unter den *in situ* zu beobachtenden Anteilen PAS-positiver Drüsenepithelien. CENTOLA et al. (1984) kultivieren humane endometriale Epithelzellen der Proliferations-, Sekretions- und der Menstrualphase. Den Untersuchungen dieser Autoren zufolge fällt die PAS-Reaktion zyklusunabhängig in nahezu allen Zellen positiv aus. Ebenfalls in kultivierten endometrialen Epithelzellen des Menschen gelingt KLEINMAN et al. (1983), BIRKENFELD et al. (1988), WHITE et al. (1990) und CLASSEN-LINKE et al. (1997) der ultrastrukturelle Nachweis von Glykogengranula. In endometrialen Stromazellen der Stute werden Polysaccharide/Glykoproteine *in situ* weder im eigenen Untersuchungsgut noch von HOFFMANN (2006) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu reagiert ein nicht unerheblicher Anteil der kultivierten mESZ PAS-positiv. In der Literatur existieren diesbezüglich nur sehr wenige, teils widersprüchliche Angaben (CENTOLA et al. 1984). Elektronenmikroskopisch können TRENT et al. (1980) in humanen endometrialen Stromazellen *in vitro* Glykogenpartikel nachweisen.

5.5.3 Immunzytologie

5.5.3.1 Zytokeratine

Die Expression von Zytokeratinen wird als Hauptunterscheidungsmerkmal kultivierter endometrialer Epithel- und Stromazellen verschiedener Spezies angesehen (OSTEEN et al. 1989, MERVIEL et al. 1995, CLASSEN-LINKE et al. 1997,

MYLONAS et al. 2000, 2003b, BUSCHATZ 2007), da auch *in situ* der Nachweis von Zytokeratinen ausschließlich in den epithelialen Zellen gelingt (AUPPERLE et al. 2004, MO et al. 2006). Einige Autoren betrachten bei ihren Untersuchungen die Zytokeratine als Gesamtheit (OSTEEN et al. 1989, CLASSEN-LINKE et al. 1997, AUPPERLE et al. 2004, BUSCHATZ 2007), während andere verschiedene Keratin-Subtypen mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen (MATTHEWS et al. 1992, VIGANÒ et al. 1993, MYLONAS et al. 2000, 2003b, MO et al. 2006). MERVIEL et al. (1995) verwenden für ihre Untersuchungen sowohl Anti-pan-Zytokeratin-Antikörper als auch solche, die selektiv die Zytokeratine 8, 18 und 19 erfassen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen eigener Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010) exprimiert im eigenen Untersuchungsgut keine der Epithelzellsubpopulationen (luminale, duktale, glanduläre Epithelien) *in situ* durchgängig die Zytokeratine 8, 18 und 19. Dies trifft bezüglich der kultivierten mEEZ zwar auch auf K8 und K18 zu, nicht jedoch auf K19, welches in allen mEEZ *in vitro* nachweisbar ist.

Seitens der mESZ treten vereinzelt K8- und K19-positive Zellen auf. Diese sind als kontaminierende Epithelzellen anzusehen.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Expression von Zytokeratin 19 als Kriterium zur Unterscheidung kultivierter endometrialer Epithel- und Stromazellen des Pferdes herangezogen werden, wie dies auch bei humanen endometrialen Zellkulturen durch MATTHEWS et al. (1992), VIGANÒ et al. (1993), MERVIEL et al. (1995) und MYLONAS et al. (2000, 2003b) erfolgt. Diese Autoren treffen die Unterscheidung auch anhand der Expression der Zytokeratine 8 und/oder 18, was bei der Spezies Pferd, ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, nicht möglich ist.

Hinsichtlich der Expressionshäufigkeit und -intensität der einzelnen Zytokeratine sind zwischen den morphologisch unterschiedlichen Zelltypen der mEEZ nur geringe Unterschiede feststellbar. Hierzu passen die Untersuchungen von KLYMKOWSKY et al. (1983), denen zufolge Zytokeratine *in vitro* nicht in die Herbeiführung oder Aufrechterhaltung der Zellgestalt involviert sind. Dennoch spielen sie eine wichtige Rolle für die mechanische Stabilität der Einzelzelle und des Zellverbandes (MA et al. 2001, COULOMBE u. OMARY 2002, MOLL et al. 2008), worin möglicherweise die deutliche Expression von K19 *in vitro* begründet sein könnte. Nach Ansicht von OWENS u. LANE (2003) geht osmotischer Stress mit nicht unerheblichen mechanischen Belastungen der Zelle einher, da er in einer Zellschwellung oder -schrumpfung resultiert. Derartige osmotische Einflüsse sind auch in einer von den Regulationsmechanismen des lebenden Organismus abgekoppelten Zellkultur in Betracht zu ziehen. Eine weitere mögliche Ursache der Aufregulierung der K19-Expression unter *In-vitro*-Bedingungen könnte dessen Einstufung als phylogenetisch „altes“ Keratin sein, dessen Protein- und Genomstruktur von der der anderen Zytokeratine abweicht (BADER et al. 1986).

5.5.3.2 Vimentin

Zahlreiche Stromazellen *in situ* exprimieren, ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowie den Angaben von AUPPERLE et al. (2004), Vimentin. Während diese Autoren, ebenso wie HOFFMANN et al. (2009), eine epitheliale Vimentin-Expression ausschließlich im Rahmen einer Endometrose beschreiben, konnte zusätzlich sowohl in eigenen Vorarbeiten (BÖTTCHER et al. 2010) als auch in der vorliegenden Arbeit gelegentlich eine positive Reaktion für Vimentin in histomorphologisch unveränderten Oberflächenepithelzellen festgestellt werden. Im humanen Endometrium tritt zyklusabhängig eine physiologische Expression von Vimentin in den Uterindrüsen auf (NISOLLE et al. 1995).

Sowohl ein Teil der mEEZ als auch der mESZ des eigenen Untersuchungsgutes exprimiert Vimentin. Dabei liegt der Anteil positiv reagierender mESZ in den einzelnen Kulturen zumeist deutlich höher als der der mEEZ. Lediglich im Falle der aus physiologisch inaktiven Endometrien isolierten mEEZ können Anteile Vimentin-exprimierender Zellen erreicht werden, die mit denen der mESZ vergleichbar sind. Eine mögliche Ursache für diesen vergleichsweise hohen Anteil könnte die gravierende Änderung des Aktivitätszustandes der Zellen sein, da diese aus einer Phase der Inaktivität in die Kulturumgebung verbracht werden, wo es zu einer Zellproliferation kommt (FRESHNEY 2010). So wird die häufig auftretende *In-vitro*-Expression von Vimentin in epithelialen Zellen diverser Organe im Zusammenhang mit der Zellteilungsaktivität (AUBIN et al. 1980, ZIEVE et al. 1980) oder der Anpassung an das Wachstum unter Kulturbedingungen angesehen (FRANKE et al. 1979, OSBORN et al. 1980, VIRTANEN et al. 1981). Auch in kultivierten Epithelzellen des Endometriums verschiedener Spezies wird, ebenso wie in den Stromazellen, eine Vimentin-Expression beobachtet (MUNSON et al. 1988, ZHANG et al. 1991, MATTHEWS et al. 1992, CLASSEN-LINKE et al. 1997, MYLONAS et al. 2000, GALABOVA-KOVACS et al. 2004, BUSCHATZ 2007). Diese kann daher nicht zu einer Unterscheidung zwischen epithelialen und stromalen Zellen des Endometriums *in vitro* beitragen.

Verglichen mit den von BUSCHATZ (2007) an kultivierten equinen endometrialen Epithelzellen erhobenen Ergebnissen fällt in den mEEZ des eigenen Untersuchungsgutes, insbesondere in den aus sekretorisch oder proliferativ differenzierten Endometrien isolierten Zellen, der immunzytologische Vimentin-Nachweis erheblich häufiger negativ aus. Möglicherweise kommen daher die in dieser Arbeit auf die Zellen *in vitro* einwirkenden Milieubedingungen denen im lebenden Organismus etwas näher als die von BUSCHATZ (2007) beschriebenen Kulturparameter.

5.5.3.3 Desmin, α -Glattmuskel-Aktin

Desmin wird in den endometrialen Stromazellen *in situ* unter physiologischen Bedingungen lediglich während des Winteranöstrus exprimiert (AUPPERLE et al. 2003). Daneben treten Desmin-positive Stromazellen u. a. bei endometrialen Fehldifferenzierungen auf (ELLENBERGER et al. 2002). RAILA (2000), WALTER et al. (2001) sowie HOFFMANN et al. (2009) beobachten eine stromale Expression von Desmin und α -GMA im Rahmen der Endometrose. Zudem kommt gelegentlich eine α -GMA-Expression in Stromazellen des histomorphologisch unveränderten Stratum compactum vor (WALTER et al. 2001). Auch im eigenen Untersuchungsgut werden keine diesen Angaben widersprechenden Befunde erhoben.

In den kultivierten mESZ kann mehrheitlich sowohl Desmin als auch α -GMA nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft ist sowohl bei kultivierten humanen endometrialen Stromazellen bekannt (MERVIEL et al. 1995), als auch mit den Ergebnissen von BUSCHATZ (2007) vereinbar, die eine im Verlauf der Kulturdauer zunehmende Expression dieser beiden Proteine in equinen endometrialen Stromazellen beschreibt und sie daher als Myofibroblasten anspricht. Diese werden von SAPPINO et al. (1990) in verschiedene Typen eingeteilt: den V-Typ (ausschließlich Expression von Vimentin), den VA-Typ (Koexpression von Vimentin und α -GMA), den VD-Typ (Koexpression von Vimentin und Desmin) und den VAD-Typ (Koexpression von Vimentin, α -GMA und Desmin). Diese Typen entsprechen unterschiedlichen Ausreifungsgraden der myofibroblastischen Differenzierung, welche in den VD- und VAD-Typen die höchste myoide Ausreifung erfährt (SAPPINO et al. 1990, KOBAYASHI et al. 1998). RAILA (2000) überträgt diese Einteilung der Myofibroblasten auf die im Rahmen der equinen Endometrose zu beobachtenden Veränderungen der endometrialen Stromazellen. Wie bereits zuvor dargelegt (siehe Kap. 5.4.2, S. 80 ff.), kann somit weder eine selektive Kultivierung endometrotischer Stromazellen noch von Zellen muskulären Ursprungs gänzlich ausgeschlossen werden. Allerdings treten sowohl im eigenen Untersuchungsgut als auch den Ergebnissen von BUSCHATZ (2007) zufolge unter den kultivierten mESZ auch dann α -GMA- und Desmin-positive Zellen auf, wenn die Zellisolierung aus endometrosefreiem Gewebematerial erfolgt, weshalb die Autorin für die myoide Differenzierung Stressfaktoren verantwortlich macht, die im Zuge der Zellisolierung und -kultivierung auf die Stromazellen einwirken. Im Rahmen ihrer Untersuchungen kann BUSCHATZ (2007) zum Teil auch die von MASUR et al. (1996) beobachtete Myofibroblastendifferenzierung als Folge eines Verlustes der Zell-Zell-Kontakte im Zuge der Gewebedissoziation nachvollziehen.

Je nach Fragestellung der *In-vitro*-Kultivierung endometrialer Stromazellen des Pferdes ist die Differenzierung zu Myofibroblasten als Nachteil anzusehen. Insbesondere bei Studien zur Pathogenese der Endometrose wird dadurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Verhältnisse *in situ* bzw. *in vivo* erschwert. Daher schlägt

BUSCHATZ (2007) eine Modifikation der Medienzusammensetzung vor. Trotz der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Änderung dieses Kulturparameters wird im eigenen Untersuchungsgut keine offensichtliche Verminderung der Myofibroblastendifferenzierung erreicht. Diese angestrebte Verminderung könnte möglicherweise durch eine Erhöhung der Aussaatdichte bewirkt werden, da diese einen Einfluss auf die α -GMA-Expression hat (MASUR et al. 1996, BUSCHATZ 2007). Eine vollständige Unterbindung der Myofibroblastendifferenzierung ist jedoch, ausgehend von den Ergebnissen von MASUR et al. (1996), wahrscheinlich auch bei hoher Aussaatdichte nicht zu erreichen. Zudem ist die Begrenzung des zur Verfügung stehenden Zellmaterials zu bedenken, insbesondere bei der Zellgewinnung aus transzervikal entnommenen Endometriumbiopsaten.

Während eine Expression von Desmin und α -Glattmuskel-Aktin in endometrialen Epithelzellen *in situ* nicht auftritt, kann im eigenen Untersuchungsgut ein nicht unerheblicher Anteil α -GMA-positiver mEEZ beobachtet werden. Eine Kontamination mit Stromazellen ist anhand der Zytokeratin-19-Expression aller mEEZ auszuschließen. Gemäß den Ergebnissen eigener Vorarbeiten kann bei bestimmten Kulturbedingungen eine deutliche Mehrheit der equinen endometrialen Epithelzellen *in vitro* eine Expression von α -Glattmuskel-Aktin zeigen, während Desmin in keinem Fall nachweisbar ist (BÖTTCHER et al. 2010). Verglichen mit diesen Untersuchungen ist der Anteil α -GMA-exprimierender mEEZ in der vorliegenden Arbeit geringer, so dass ein Zusammenhang mit den Kulturbedingungen wahrscheinlich ist und die in dieser Studie gewählten Wachstumsparameter eher zu einer Epithelzell-typischen Differenzierung führen. Insbesondere der Serumanteil des Kulturmediums enthält eine Vielzahl von größtenteils nicht exakt definierten Substanzen (LINDL 2000, SCHMITZ 2007, FRESHNEY 2010), deren Einfluss auf die zelluläre Differenzierung *in vitro* daher nicht eindeutig zu beurteilen ist.

Bei Berichten über kultivierte endometriale Epithelzellen finden sich in den meisten Fällen keine Angaben über die Expression myoider Differenzierungsmarker. Es ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass diesbezügliche Untersuchungen aufgrund einer abweichenden Erwartungshaltung vielfach unterbleiben. Der immunzytologische Nachweis von Desmin sowie α -GMA in kultivierten endometrialen Epithelzellen des Menschen verläuft den Angaben von MERVIEL et al. (1995) zufolge mit negativem Ergebnis, woraus diese Autoren eine Abwesenheit myoepithelialer Zellen schlussfolgern. Myoepithelzellen sind durch eine Koexpression von Zytokeratinen und α -GMA gekennzeichnet (FRANKE et al. 1980, NORBERG et al. 1992). Diese Eigenschaft wird bei Zellkulturen verschiedener Spezies genutzt, um das Vorhandensein von Zellen myoepithelialen Ursprungs zu bestätigen bzw. auszuschließen, beispielsweise bei Schweißdrüsenzellen des Menschen (SCHÖN et al. 1999) und des Rindes (FRANKE et al. 1980), bei Mammaepithelien der Ratte (FRANKE et al.

1980) und des Rindes (HENSEN et al. 2000) oder bei Speicheldrüsengewebe der Ratte (FRANKE et al. 1980). Desmin hingegen ist weder in den von FRANKE et al. (1980) kultivierten Myoepithelzellen nachweisbar noch in denen humaner Brust-, Schweiß- und Speicheldrüsen *in situ* (MIETTINEN 1988).

Da die Uterindrüsen nicht von Myoepithel umgeben sind, kann eine selektive Kultivierung präexistenter myoepithelialer Zellpopulationen im eigenen Untersuchungsgut ausgeschlossen werden. Vielmehr ist von einer *De-novo*-Synthese des α -Glattmuskel-Aktins in Zellen epithelialen Ursprungs auszugehen. Die Ursachen hierfür liegen wahrscheinlich, ebenso wie für die stromalen Zellen angenommen (siehe oben), in den artifiziellen Bedingungen des Zellkultursystems, welche als Stressfaktoren auf die Zellen einwirken. Zudem ist eine Beteiligung von Aktinfilamenten an der Zellausbreitung auf der Wachstumsoberfläche denkbar. So können KIRK et al. (1978) mittels Zeitrafferaufnahmen eine deutliche Migrationsaktivität humaner endometrialer Epithelzellen *in vitro* feststellen.

5.6 Abhängigkeit der Kulturergebnisse von der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellgewinnung

Wenige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen einen Zusammenhang zwischen den Kultivierungsparametern bzw. den Eigenschaften der kultivierten Zellen und der Funktionsmorphologie der Spenderendometrien zum Zeitpunkt der Zellisolierung erkennen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von VARMA et al. (1982), MATTHEWS et al. (1992), VIGANÒ et al. (1993) und MERVIEL et al. (1995) besteht im eigenen Untersuchungsgut keine Abhängigkeit der Morphologie der kultivierten Zellen vom endometrialen Zyklus. Auch der Zellertrag bei der Isolierung ist unabhängig vom endometrialen Differenzierungszustand, was ebenfalls von VARMA et al. (1982), OSTEEN et al. (1989) und VIGANÒ et al. (1993) beobachtet wird. Lediglich die Zeitdauer bis zum Erreichen der Konfluenz ist bei den aus sekretorisch differenzierten Endometrien isolierten mESZ größer als bei Verwendung proliferativ differenzierter Endometrien, während bei den mEEZ diesbezüglich keine offensichtlichen Unterschiede zutage treten. Im Gegensatz dazu berichten MATTHEWS et al. (1992) und MYLONAS et al. (2000) bei der Kultivierung humaner endometrialer Epithelzellen aus der sekretorischen Phase von geringeren Kulturerfolgen als bei der Zellgewinnung während der proliferativen Phase des endometrialen Zyklus. Dagegen können andere Autoren keine Zyklusabhängigkeit von Kulturerfolg (OSTEEN et al. 1989) oder Wachstumsrate (VARMA et al. 1982) feststellen.

Hinsichtlich der Zyklusabhängigkeit des Separationserfolges, d. h. der Kulturreinheit, finden sich in der Literatur differierende Angaben. So berichten KIRK et al. (1978) über eine Reinheit der Epithelzellfraktion von 90 % bei Zellisolierung in der proliferativen Phase gegenüber 70 % bei sekretorischer endometrialer Differenzierung. Diese

Autoren verwenden zum Zwecke der Zellseparation, wie in der vorliegenden Arbeit, die Methoden der Filtration und Differenzialadhärenz, nicht jedoch der Dichtegradientenzentrifugation. OSTEEN et al. (1989) können bei der Zellseparation mittels mehrerer Filtrations- und Sedimentationsschritte keine zyklusabhängigen Unterschiede der Kulturreinheit beobachten. Im eigenen Untersuchungsgut zeigen lediglich die aus physiologisch inaktiven Endometrien gewonnenen mESZ einen niedrigen Separationserfolg (siehe Kap. 5.2, S. 75 ff.), während die aus sekretorisch oder proliferativ differenzierten Endometrien isolierten mESZ, ebenso wie alle mEEZ, ausgehend von der Zytokeratin-19-Expression zum Zeitpunkt der Konfluenz eine Kulturreinheit von $\geq 95\%$ bzw. von 100% aufweisen. Unabhängig von der endometrialen Funktionsmorphologie erreicht BUSCHATZ (2007) bei beiden kultivierten Zellfraktionen des equinen Endometriums Reinheiten von jeweils mindestens 98% .

Die zytochemischen und immunzytologischen Charakteristika der kultivierten Zellen zeigen im eigenen Untersuchungsgut keine wesentlichen Zusammenhänge zur Funktionsmorphologie der Spenderendometrien zum Zeitpunkt der Zellisolierung. Hinsichtlich der Expressionsintensität fallen weder seitens der mEEZ noch der mESZ zyklusabhängige Unterschiede auf. Dies trifft ebenso für die Expressionshäufigkeit in allen mESZ sowie in den aus proliferativ oder sekretorisch differenzierten Endometrien gewonnenen mEEZ zu. Lediglich einige Eigenschaften der aus physiologisch inaktiven Endometrien isolierten mEEZ weichen von denen der aus den übrigen endometrialen Differenzierungszuständen gewonnenen Zellen ab: während die PAS-Reaktion nur selten und der Nachweis von Zytokeratin 8 in keinem Fall mit positivem Ergebnis verläuft, wird Vimentin tendenziell häufiger exprimiert. Verglichen mit der Phase der zyklischen Aktivität zeigen die glandulären Epithelien *in situ* während des Winteranöstrus sowohl im eigenen Untersuchungsgut als auch den Angaben von FREEMAN et al. (1990) zufolge deutlich seltener eine Produktion von Polysacchariden/Glykoproteinen. Übereinstimmend wird Zytokeratin 8 von den Epithelzellen der physiologisch inaktiven Endometrien und von den aus ihnen isolierten mEEZ nicht exprimiert. Hinsichtlich des Nachweises von Vimentin ist eine Übertragbarkeit der *in situ* während des Winteranöstrus bestehenden Eigenschaften der Epithelzellen schwierig, da eher von einer *De-novo*-Synthese in den kultivierten mEEZ auszugehen ist (siehe Kap. 5.5.3.2, S. 89).

5.7 Fazit

Anhand ihrer spezifischen immunzytologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften können die in der vorliegenden Arbeit im Zuge der Zellseparation voneinander getrennten und bis zum Zeitpunkt der Konfluenz kultivierten mutmaßlichen endometrialen Epithel- bzw. Stromazellen tatsächlich als epitheliale bzw. stromale Zellen

identifiziert werden. Insbesondere die Expression von Zytokeratin 19 stellt ein verlässliches Kriterium zur Unterscheidung dieser beiden Populationen dar, da die als mEEZ kultivierte Zellfraktion stets positiv für Zytokeratin 19 reagiert, sich unter den mESZ jedoch nur vereinzelt positive Zellen finden, welche als kontaminierende Epithelzellen anzusehen sind. Mit Hilfe des verwendeten Isolierungs-, Separations- und Kultivierungsverfahrens können daher sehr hohe Reinheiten der beiden Zellfraktionen erreicht werden.

Demgegenüber ist eine Unterscheidung der kultivierten epithelialen und stromalen Zellen mittels Lichtmikroskopie anhand rein morphologischer Kriterien nicht möglich. Unmittelbar vor Beginn der Kultivierung gelingt eine eindeutige Zelldifferenzierung mit Hilfe der verwendeten Untersuchungsmethoden weder anhand morphologischer noch immunzytologischer Eigenschaften.

Bei der Zellisolierung aus physiologisch inaktiven Endometrien können seitens der Stromazellen nur unzureichende Separationserfolge erzielt werden. Zudem weichen einige der zytochemischen und immunzytologischen Eigenschaften der aus derartigen Endometrien gewonnenen Epithelzellen von den entsprechenden Charakteristika der aus proliferativ oder sekretorisch differenzierten Endometrien isolierten Zellen ab. Insgesamt ist daher die Isolierung und Kultivierung equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen während des Winteranöstrus im Vergleich zur Phase der zyklischen Aktivität als weniger geeignet anzusehen.

5.8 Weiterführende Untersuchungen im Zellkulturmodell

Um ein dem Endometrium *in vivo* bzw. *in situ* möglichst ähnliches *In-vitro*-Modell zu schaffen, können verschiedene Methoden der Kokultivierung endometrialer Epithel- und Stromazellen zur Anwendung kommen (ARNOLD et al. 2001, BLÄUER et al. 2005, LÜ et al. 2009), da bei einer Kokultur die gegenseitige Einflussnahme der verschiedenen Zellpopulationen aufeinander ermöglicht wird. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Charakterisierung der Epithel- und Stromazellen in Monokultur stellt die Basis zukünftiger Kokultivierungsversuche dar, da für eine Interpretation interzellulärer Wechselwirkungen eine vorhergehende Ermittlung der Zelleigenschaften bei Fehlen einer derartigen wechselseitigen Beeinflussung sinnvoll ist.

Untersuchungen zur Zyklusdynamik können *in vitro* durch den Zusatz von Steroidhormonen zum Kulturmedium, sowohl in Mono- (GALABOVA-KOVACS et al. 2004) als auch in Kokultur (BLÄUER et al. 2005), realisiert werden.

Weiterhin bietet sich die Untersuchung des Einflusses von dem Nährmedium zugesetzten oder, im Falle der Kokultur, im Rahmen interzellulärer Wechselwirkungen auftretender Wachstumsfaktoren (z. B. *transforming growth factors*, Matrixmetalloproteinasen) an, zumal eine Beteiligung derartiger Mediatoren an der Pathogenese der

equinen Endometrose diskutiert wird (RAILA 2000, HOFFMANN et al. 2009, KIESOW et al. 2011).

Immortalisierte Zelllinien kommen u. a. bei endometrialen Zellen des Menschen (MERVIEL et al. 1995), des Schweines (WANG et al. 2000), des Schafes (JOHNSON et al. 1999) sowie des Amerikanischen Nerzes (MOREAU et al. 1995) zum Einsatz. Durch die Immortalisierung wird die Begrenzung der Anzahl möglicher Teilungen einer Zelle aufgehoben, d. h. ein Erreichen des Hayflick-Limits (HAYFLICK 1965) wird verhindert und die Zellen können *in vitro* unbegrenzt vermehrt werden. Die Verwendung immortalisierter Zellen bietet den Vorteil der Unabhängigkeit von frischen Gewebeproben. Insbesondere könnte somit auch im Winter eine Kultivierung der Zellen stattfinden, da sich in der vorliegenden Arbeit die Phase der physiologischen Inaktivität (Winteranöstrus) als wenig geeignet zur Isolierung und Kultivierung equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen erwiesen hat (siehe Kap. 5.7, S. 93 f.).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Denny Böttcher

Morphologisch-funktionelle Charakterisierung equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen in Monokultur unter Einbeziehung immunzytologischer und transmissionselektronenmikroskopischer Methoden

Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2011

99 S., 47 Abb., 10 Tab., 235 Lit., 4 S. Anhang

Schlüsselworte: Zellkultur, Endometrium, Pferd, Epithelzellen, Stromazellen, Morphologie, Immunzytologie

Ziel der vorliegenden Arbeit war die morphologische und funktionelle Charakterisierung endometrialer Epithel- (EEZ) und Stromazellen (ESZ) des Pferdes bei separater Primärkultur auf permeablen Kunststoffoberflächen mit Hilfe (immun-)zytologischer, zytochemischer und transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungen, einschließlich einer vergleichenden Betrachtung der immunhistologischen und histochemischen Eigenschaften der Epithel- und Stromazellen *in situ*. Mögliche Zusammenhänge zwischen der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellisolierung und den Zelleigenschaften *in vitro* sollten überprüft werden.

Zur Zellgewinnung dienten transzervikal entnommene Endometriumbioptate (n = 14) sowie vollständige Uteri euthanasierter Stuten (n = 6). Parallel entnommene Gewebeproben wurden fixiert und als *In-situ*-Vergleichsmaterial verwendet. Nach einer mechanischen und enzymatischen Gewebedissoziation erfolgte die Trennung von Epithel- und Stromazellen mittels Filtration, Dichtegradientenzentrifugation sowie Differenzialadhärenz. Ein Teil der aufgereinigten Zellen wurde Formalin-fixiert und für (immun-)zytologische und zytochemische Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich des Separationserfolges, aufbereitet. Die Kultivierung der übrigen Zellen beider Zellarten fand separat voneinander auf unbeschichteten Membraneinsätzen (Millicell® PET) in einem Gemisch aus DMEM und Ham's F-12 unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (ESZ bis ca. 60 % Konfluenz) bzw. unter Zusatz von 2,5 % fötalem Kälberserum sowie verschiedener Additive (ESZ ab ca. 60 % Konfluenz sowie EEZ) bei 37 °C in wasserdampfgesättigter, mit 5 % CO₂ angereicherter Raumluft statt. Konfluente Kulturen wurden in Formalin bzw. Glutaraldehyd fixiert und für die Lichtmikroskopie respektive Transmissionselektronenmikroskopie aufgearbeitet.

Zum Zeitpunkt der Zellisolierung befanden sich die Endometrien überwiegend in der Phase der physiologischen Inaktivität (n = 5) oder der regulären zyklischen sekretorischen (n = 8) bzw. proliferativen (n = 3) Aktivität. In jeweils einer der Gewebeproben war eine irreguläre sekretorische, eine irreguläre proliferative bzw. eine im Übergang

zwischen Sekretion und Proliferation anzuesiedelnde Funktionsmorphologie festzustellen. In einem weiteren Fall wurden die Zellen aus einem graviden Uterus isoliert. Die Separation von ESZ während des Winteranöstrus verlief mit unzureichendem Erfolg, die Kulturen zeigten eine starke Kontamination mit epithelialen Zellen. Die morphologischen, immunzytologischen und zytochemischen Eigenschaften der beiden separierten Zellpopulationen unmittelbar vor Beginn der Kultivierung ermöglichten keine eindeutige Unterscheidung zwischen Epithel- und Stromazellen. Bei den aus sekretorisch differenzierten Endometrien isolierten ESZ war die Zeitdauer bis zum Erreichen der Konfluenz tendenziell länger als bei Verwendung proliferativ differenzierter Endometrien, während bei den EEZ diesbezüglich keine deutlichen Unterschiede erkennbar waren. Zum Zeitpunkt der Konfluenz konnten anhand der lichtmikroskopischen Morphologie 4 verschiedene EEZ- und 3 verschiedene ESZ-Typen nachgewiesen werden. Ultrastrukturell war eine Unterscheidung der EEZ von den ESZ möglich, innerhalb dieser beiden Zellpopulationen besaßen die lichtmikroskopisch verschiedenen Zelltypen jedoch jeweils vergleichbare Eigenschaften. Ein Zusammenhang zwischen der *In-vitro*-Morphologie und dem Zyklusstand zum Zeitpunkt der Zellisolierung war nicht zu erkennen. Unabhängig von der lichtmikroskopischen Morphologie wiesen die EEZ in der Regel laterale Zellverbindungen in Form von *tight junctions* auf, was auf einen polarisierten Phänotyp schließen lässt. Der Nachweis von Proteoglykanen mittels Alzianblau-Färbung verlief in allen kultivierten Zellen mit negativem Ergebnis. Mit Hilfe der PAS-Reaktion waren in der Mehrzahl der EEZ sowie in zahlreichen ESZ *in vitro* Polysaccharide/Glykoproteine nachweisbar. Die kultivierten EEZ exprimierten stets Zytokeratin 19 und in keinem Falle Desmin; in einem Teil der Zellen konnten die Zytokeratine 8 und 18, Vimentin sowie α -Glattmuskel-Aktin nachgewiesen werden. Demgegenüber enthielten die ESZ keines der untersuchten Zytokeratine, zum Teil trat in diesen Zellen jedoch eine Expression von Vimentin, Desmin und α -Glattmuskel-Aktin auf. Insgesamt war ein eindeutiger Nachweis des zellulären Ursprungs equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen *in vitro* ausschließlich anhand der Zytokeratin-19-Expression möglich. Die Eigenschaften der kultivierten EEZ wichen bei der Zellisolierung aus physiologisch inaktiven Endometrien hinsichtlich der PAS-Reaktion sowie des Nachweises von Zytokeratin 8 und Vimentin von denen der aus den aktiven Endometrien gewonnenen Zellen ab. Darüber hinaus wurden keine deutlichen Einflüsse der endometrialen Funktionsmorphologie zum Zeitpunkt der Zellisolierung auf die zytochemischen und immunzytologischen Charakteristika der kultivierten Zellen offensichtlich. Auf der Grundlage dieser Arbeit können weiterführende Untersuchungen im Zellkulturmodell des equinen Endometriums erfolgen, insbesondere hinsichtlich von Veränderungen der Zelleigenschaften bei Einwirken definierter Milieufaktoren.

7 SUMMARY

Denny Böttcher

Morphological and functional characterization of equine endometrial epithelial and stromal cells in monoculture including the application of immunocytochemistry and transmission electron microscopy

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

Submitted in June 2011

99 pages, 47 figures, 10 tables, 235 references, 4 pages appendix

Keywords: cell culture, endometrium, horse, epithelial cells, stromal cells, morphology, immunocytochemistry

The aim of this study was 1) the morphological and functional characterization of equine endometrial epithelial and stromal cells grown separately in primary cultures on permeable plastic surfaces by the use of cytological and (immuno-)cytochemical investigations as well as transmission electron microscopy, and 2) the comparison of these results with the (immuno-)histochemical characteristics of the epithelial and stromal cells *in situ*. Potential correlations between the endometrial functional morphology at the time of cell isolation and the properties of the cells *in vitro* should be investigated.

The cells were isolated from transcervical endometrial biopsies (n = 14) and from whole uteri of euthanized mares (n = 6), respectively. Tissue specimens collected at the same time were fixed in order to compare the *in situ* characteristics of the epithelial and stromal cells with the *in vitro* features of the cultured cells. After a mechanical and enzymatic dissociation of the tissues, epithelial and stromal cells were separated by a combination of filtration, density gradient centrifugation and differential adhesion methods. One fraction of the purified cells was fixed in formalin and prepared for cytological and (immuno-)cytochemical examinations, especially regarding the success of cell separation. The remaining cells were cultured separately on uncovered Millicell[®] PET membranes at 37 °C in a humidified atmosphere (air: 95 %, CO₂: 5 %). Endometrial stromal cells were grown in a mixture of DMEM and Ham's F-12 added with 10 % of foetal calf serum until they covered about 60 % of the culture surface. Afterwards, they were cultured in a mixture of DMEM, Ham's F-12, 2.5 % of foetal calf serum and various additives. The latter composition of culture medium was also applied to the endometrial epithelial cells during the whole time of cultivation. Confluent cultures were fixed either in formalin or glutaraldehyde, and processed for light microscopy and transmission electron microscopy, respectively.

At the time of cell isolation, most of the endometria were physiologically inactive (n = 5) or they exhibited a regular cyclic secretory (n = 8) or proliferative (n = 3) activity. Concerning three further endometria, one showed a functional morphology of an

irregular secretion, one of an irregular proliferation and one of a transition from the secretory to the proliferative phase. In one case, the cells were isolated from a gravid uterus.

Separation of endometrial stromal cells during winter anoestrus revealed unsatisfying results, as the cultures showed contamination with epithelial cells.

The morphological and (immuno-)cytochemical characteristics of both separated cell populations directly before the beginning of cultivation did not enable unambiguous distinction between stromal and epithelial cells.

Stromal cells isolated from secretory phase endometria mostly needed a longer time to reach confluence than stromal cells obtained from proliferative phase endometria, whereas epithelial cells from proliferative and secretory phase endometria did not show remarkable differences in growth. Light microscopy of confluent cultures revealed 4 morphologically different types of epithelial cells and 3 different types of stromal cells. Regardless of the particular types, all epithelial cells and all stromal cells showed similar ultrastructural properties, respectively. In contrast, the epithelial cells were distinguishable from the stromal cells by transmission electron microscopy. *In vitro* morphology did not relate to the endometrial functional morphology at the time of cell isolation. Independent of their light microscopical morphology, the endometrial epithelial cells mostly exhibited tight junctions as lateral intercellular connections, which points to a polarised phenotype.

Proteoglycans could not be detected in any cultured cells by alcian blue staining. By means of periodic acid-Schiff (PAS) reaction, polysaccharides/glycoproteins were found in most endometrial epithelial cells and in many stromal cells *in vitro*. The cultured endometrial epithelial cells always expressed cytokeratin 19, but never desmin. To some extent, these cells showed expression of cytokeratins 8 and 18, as well as vimentin and α -smooth muscle actin. The stromal cells did not immunostain for cytokeratins 8, 18 or 19, but partly expressed vimentin, desmin and α -smooth muscle actin. Altogether, only the expression of cytokeratin 19 gave definite evidence of the cellular origin of equine endometrial epithelial and stromal cells *in vitro*. Regarding PAS reaction and the expression of cytokeratin 8 and vimentin, the characteristics of cultured epithelial cells isolated from physiologically inactive endometria differed from those of epithelial cells gained from active endometria. Beyond this, the endometrial functional morphology at the time of cell isolation did not have any considerable influence on the (immuno-)cytochemical properties of the cultured cells.

This work provides the basis for further investigations in the cell culture model of the equine endometrium, especially concerning changes in the cellular characteristics when selected environmental factors act upon the cells.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adams GP, Bosu WT. Reproductive physiology of the nonpregnant mare. An overview and update. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988;4:161-76.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 5. Aufl. New York: Garland Science; 2008.

Ameen NA, Figueroa Y, Salas PJ. Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci.* 2001;114:563-75.

Anon. Matrigel™ Basement Membrane Matrix Phenol Red Free. Product Specification Sheet. 2008;Cat. No. 356237:1-3.

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

Arslan A, Almazan G, Zingg HH. Characterization and co-culture of novel nontransformed cell lines derived from rat endometrial epithelium and stroma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995;31:140-8.

Arthur GH. An analysis of the reproductive function of mares based on post-mortem examination. *Vet Rec.* 1958;70:682-5.

Aubin JE, Osborn M, Franke WW, Weber K. Intermediate filaments of the vimentin-type and the cytokeratin-type are distributed differently during mitosis. *Exp Cell Res.* 1980;129:149-65.

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

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

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

Aupperle H, Steiger K, Reischauer A, Schoon HA. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the physiological and pathological inactivity of the equine endometrium. *Pferdeheilkunde.* 2003;19:629-32.

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

Bader BL, Magin TM, Hatzfeld M, Franke WW. Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *EMBO J.* 1986;5:1865-75.

Bader H. Erkrankungen des Uterus. In: Dietz O, Huskamp B, Hrsg. *Handbuch Pferdepraxis.* 3. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2006. S. 598-620.

- Balcarova-Ständer J, Pfeiffer SE, Fuller SD, Simons K. Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. *EMBO J.* 1984;3:2687-94.
- Bártek J, Bártková J, Taylor-Papadimitriou J, Rejthar A, Kovarik J, Lukás Z, Vojtesek B. Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies. *Histochem J.* 1986;18:565-75.
- Bentin-Ley U, Lindenberg S, Horn T, Larsen JF. Ultrastructure of endometrial epithelial cells in a three-dimensional cell culture system for human implantation studies. *J Assist Reprod Genet.* 1995;12:632-8.
- Bentin-Ley U, Pedersen B, Lindenberg S, Larsen JF, Hamberger L, Horn T. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J Reprod Fertil.* 1994;101:327-32.
- Bhargava Periwal S, Farooq A, Bhargava VL, Bhatla N, Vij U, Murugesan K. Tamoxifen increases the proliferation of human endometrial stromal cells in in vitro. A model for evaluation of endometrial hyperplasia. *Indian J Exp Biol.* 1995;33:977-9.
- Birkenfeld A, Ezra Y, Ron N, Navot D, Granovsky S, Schenker JG, Levij IS, Vlodavsky I. Indication of selective growth of human endometrial epithelial cells on extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988;24:1188-92.
- Bitton-Casimiri V, Rath NC, Psychoyos A. A simple method for separation and culture of rat uterine epithelial cells. *J Endocrinol.* 1977;73:537-8.
- Bläuer M, Heinonen PK, Martikainen PM, Tomas E, Ylikomi T. A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Hum Reprod.* 2005;20:864-71.
- Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum.* 1972;43:404-9.
- Böttcher D, Theuss T, Kappe A, Sobiraj A, Schoon HA, Ellenberger C. Morpho-functional characterization of equine endometrial epithelial cells in vitro - preliminary results. *Pferdeheilkunde.* 2010;26:70-9.
- Bracher V. Treatment of CDE: Chemical curettage with irritant solutions. *Equine Vet J.* 1992;25:187.
- Brady HA, Burghardt RC, Evans JW, Blanchard TL, Varner DD. Intercellular communication in mare endometrial epithelium isolated during estrus and diestrus. *Journal of Equine Veterinary Science.* 1992;12:227-32.
- Brady HA, Burghardt RC, Evans JW, Blanchard TL, Varner DD, Bruemmer JE. Model system for the study of uterine trophoblast interactions in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science.* 1993;13:506-11.
- Brandt GW. The significance and interpretation of uterine biopsy in the mare. *Proceedings of the Annu Meet Am Assoc Equine Pract.* 1970;16:279-94.
- Brunckhorst D, Schoon HA, Bader H, Sieme H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität.* 1991;7:44-51.
- Buschatz S. Etablierung und Charakterisierung einer Zellkultur equiner endometrialer Epithel- und Stromazellen. [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.

- Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8:443-50.
- Campbell GR, Chamley-Campbell J, Groschel-Stewart U, Small JV, Anderson P. Antibody staining of 10-nm (100-Å) filaments in cultured smooth, cardiac and skeletal muscle cells. *J Cell Sci.* 1979;37:303-22.
- Casslen BG, Harper MJ. Human endometrial epithelial cells grown on collagen in serum-free medium. Estrogen responsiveness and morphology. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991;125:101-8.
- Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.* 1997;138:1379-94.
- Causey RC, Ginn PS, Katz BP, Hall BJ, Anderson KJ, LeBlanc MM. Mucus production by endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000;56:333-9.
- Centola GM, Cisar M, Knab DR. Establishment and morphologic characterization of normal human endometrium in vitro. *In Vitro.* 1984;20:451-62.
- Chambard M, Gabrion J, Mauchamp J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J Cell Biol.* 1981;91:157-66.
- Chaminadas G, Propper AY, Royez M, Prost O, Remy-Martin JP, Adessi GL. Culture of epithelial and stromal cells of guinea-pig endometrium and the effect of oestradiol-17 β on the epithelial cells. *J Reprod Fertil.* 1986;77:547-58.
- Chen F, Chang R, Trivedi M, Capetanaki Y, Cryns VL. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278:6848-53.
- Cherny RA, Findlay JK. Separation and culture of ovine endometrial epithelial and stromal cells: evidence of morphological and functional polarity. *Biol Reprod.* 1990;43:241-50.
- Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002;40:403-39.
- Classen-Linke I, Kusche M, Knauthe R, Beier HM. Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 1997;287:171-85.
- Cooke P. A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. *J Cell Biol.* 1976;68:539-56.
- Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:110-22.
- Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multi-purpose scaffolds. *Nat Cell Biol.* 2004;6:699-706.
- Dallenbach-Hellweg G. *Histopathology of the Endometrium.* 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1987.

- Davis DL, Blair RM. Studies of uterine secretions and products of primary cultures of endometrial cells in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993;48:143-55.
- Day WE, Bowen JA, Barhoumi R, Bazer FW, Burghardt RC. Endometrial connexin expression in the mare and pig: evidence for the suppression of cell-cell communication in uterine luminal epithelium. *Anat Rec.* 1998;251:277-85.
- Doig PA, McNight JD, Miller RB. The use of the endometrial biopsy in the infertile mare. *Can Vet J.* 1981;22:72-6.
- Egelman EH. The structure of F-actin. *J Muscle Res Cell Motil.* 1985;6:129-51.
- Ellenberger C. Funktionelle Pathologie des equinen Ovars und daraus resultierende endometriale Differenzierungsstörungen [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.
- Ellenberger C, Aupperle H, Bartmann CP, Hoppen HO, Schoon D, Schoon HA. Endometrial maldifferentiation caused by ovarian disorders in the mare - morphological and immunohistochemical studies. *Theriogenology.* 2002;58:499-502.
- Evans TJ, Ganjam VK, Miller MA, Niswender KD, Krause WJ, Youngquist RS. Relationship between the degree of endometrial periglandular fibrosis and the presence of angiotensin-converting enzyme in the equine endometrium. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000;56:393-8.
- Evans TJ, Miller MA, Ganjam VK, Niswender KD, Eilersieck MR, Krause WJ, Youngquist RS. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *Am J Vet Res.* 1998;59:1209-14.
- Fernandez-Shaw S, Shorter SC, Naish CE, Barlow DH, Starkey PM. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres. *Hum Reprod.* 1992;7:156-61.
- Ferreira-Dias G, Nequin LG, King SS. Morphologic characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II, and III, using light and scanning electron microscopy. *Am J Vet Res.* 1994;55:1060-5.
- Findlay JK, Salamonsen LA, Cherny RA. Endometrial function: studies using isolated cells in vitro. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1990;12:181-223.
- Fleming H. Structure and function of cultured endometrial epithelial cells. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999;17:93-106.
- Fleming H, Gorpide E. Growth characteristics of primary cultures of stromal cells from human endometrium. *J Steroid Biochem.* 1982;16:717-20.
- Flores JM, Rodriguez A, Sanchez J, Gomez-Cuetara C, Ramiro F. Endometrosis in mares: incidence of histopathological alterations. *Reprod Dom Anim.* 1995;30:61-5.
- Fortier MA, Guilbault LA, Grasso F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil.* 1988;83:239-48.
- Franke WW, Schmid E, Freudenstein C, Appelhans B, Osborn M, Weber K, Keenan TW. Intermediate-sized filaments of the prekeratin type in myoepithelial cells. *J Cell Biol.* 1980;84:633-54.
- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:5034-8.

Franke WW, Schmid E, Winter S, Osborn M, Weber K. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res.* 1979;123:25-46.

Frazer GS, Rossol TJ, Threlfall WR, Weisbrode SE. Histopathologic effects of dimethyl sulfoxide on equine endometrium. *Am J Vet Res.* 1988;49:1774-81.

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

Freshney RI. Tumour cells disaggregated in collagenase. *Lancet.* 1972;300:488-9.

Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications. 6. Aufl. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010.

Freshney RI, Freshney MG. Culture of epithelial cells. 2. Aufl. New York: Wiley-Liss; 2002.

Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 1998;279:514-9.

Fuchs E, Karakesisoglou I. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* 2001;15:1-14.

Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:345-82.

Galabova-Kovacs G, Walter I, Aurich C, Aurich JE. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology.* 2004;61:963-76.

Ganjam VK, Evans TJ. Equine endometrial fibrosis correlates with 11β -HSD₂, TGF- β ₁ and ACE activities. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;248:104-8.

Gerschenson LE, Conner EA, Yang J, Andersson M. Hormonal regulation of proliferation in two populations of rabbit endometrial cells in culture. *Life Sci.* 1979;24:1337-43.

Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J Reprod Fertil.* 1999;116:167-75.

Ghadially FN. Endoplasmic reticulum. In: Ghadially FN. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 4. Aufl. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997. S. 433-602.

Glasser SR, Julian J, Decker GL, Tang JP, Carson DD. Development of morphological and functional polarity in primary cultures of immature rat uterine epithelial cells. *J Cell Biol.* 1988;107:2409-23.

Goldman RD, Follett EA. Birefringent filamentous organelle in BHK-21 cells and its possible role in cell spreading and motility. *Science.* 1970;169:286-8.

Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol.* 1996;134:971-83.

Gordon LR, Sartin EM. Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. *Journal of Equine Medicine and Surgery.* 1978;2:328-36.

Granger BL, Lazarides E. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell*. 1978;15:1253-68.

Granger BL, Lazarides E. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell*. 1979;18:1053-63.

Groothuis PG, McGuire WJ, Vallett JL, Grieger DM, Davis DL. Retinol and estradiol regulation of retinol binding protein and prostaglandin production by porcine uterine epithelial cells in vitro. *J Anim Sci*. 2002;80:2688-94.

Gross TL, LeBlanc MM. Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. *J Am Vet Med Assoc*. 1984;184:1379-82.

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

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

Häfner I. Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute [Dissertation med.vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1999.

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

Hall HG, Farson DA, Bissell MJ. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:4672-6.

Hatzfeld M, Franke WW. Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J Cell Biol*. 1985;101:1826-41.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.

Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, Poutrel B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci*. 2000;83:418-29.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:79-90.

Hoffmann C. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der equinen Endometrose unter besonderer Berücksichtigung endometrialer Proteine und Kohlenhydrate [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2006.

Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B, Schoon HA. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci*. 2009;111:261-78.

Holinka CF, Gurside E. Proliferative potential and polymorphism of human endometrial stromal cells. *Gynecol Endocrinol*. 1987;1:71-81.

- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature*. 1990;347:44-9.
- Hopfer H, Rinehart CA, Jr., Vollmer G, Kaufman DG. In vitro interactions of endometrial stromal and epithelial cells in Matrigel: reorganization of the extracellular matrix. *Pathobiology*. 1994;62:104-8.
- Hurtgen JP. Uterine Abnormalities. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Hrsg. *Equine Reproduction*. 2. Aufl. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2011. S. 2669-73.
- Hutton E, Paladini RD, Yu QC, Yen M, Coulombe PA, Fuchs E. Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. *J Cell Biol*. 1998;143:487-99.
- Ip W, Fellows ME. Fluorescent measurement of desmin intermediate filament assembly. *Anal Biochem*. 1990;185:10-6.
- Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol*. 1991;113:155-60.
- Johnson GA, Burghardt RC, Newton GR, Bazer FW, Spencer TE. Development and characterization of immortalized ovine endometrial cell lines. *Biol Reprod*. 1999;61:1324-30.
- Keenan LR, Forde D, McGeady TA, Quinn PJ, Roche JF. Ultrastructure of the endometrium of mares in anoestrus, oestrus, dioestrus and early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*. 1991;44:695-6.
- Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc*. 1978;172:241-62.
- Kenney RM, Condon W, Ganjam VK, Channing C. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their state of viability or atresia. *Reprod Fertil* 1979;27 (Suppl.):163-71.
- Kenney RM, Doig PA. Equine Endometrial Biopsy. In: Morrow DA, Hrsg. *Current Therapy in Theriogenology*. 2. Aufl. Philadelphia: WB Saunders; 1986. S. 723-9.
- Kiesow C, Ellenberger C, Schoon HA. Pathogenese der equinen Endometrose: Bedeutung der Wachstumsfaktoren Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 und - β 3 sowie des Enzyms Matrixmetalloproteinase-2. *Pferdeheilkunde* 2011;27:4-14.
- Kirk D, King RJ, Heyes J, Peachey L, Hirsch PJ, Taylor RW. Normal human endometrium in cell culture. I. Separation and characterization of epithelial and stromal components in vitro. *In Vitro*. 1978;14:651-62.
- Kleinman D, Sharon Y, Sarov I, Insler V. Human endometrium in cell culture: a new method for culturing human endometrium as separate epithelial and stromal components. *Arch Gynecol*. 1983;234:103-12.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*. 1986;25:312-8.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and Characterization of Type-IV Procollagen, Laminin, and Heparan-Sulfate Proteoglycan from the EHS Sarcoma. *Biochemistry*. 1982;21:6188-93.

- Klemmt PAB, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometrotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril*. 2006;85:564-72.
- Klymkowsky MW, Miller RH, Lane EB. Morphology, behavior, and interaction of cultured epithelial cells after the antibody-induced disruption of keratin filament organization. *J Cell Biol*. 1983;96:494-509.
- Knudson O, Velle W. Ovarian oestrogen levels in the non-pregnant mare: relationship to histological appearance of the uterus and to clinical status. *J Reprod Fertil*. 1961;2:130-7.
- Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of α -smooth muscle actin. *Early Hum Dev*. 1998;51:223-33.
- Laurila P, Virtanen I, Stenman S. Intermediate filaments in enucleation of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1981;131:41-6.
- Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem*. 1982;51:219-50.
- Lazarides E, Balzer DR. Specificity of desmin to avian and mammalian muscle cells. *Cell*. 1978;14:429-38.
- Lehmann J. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur prognostischen Bewertung der equinen Endometrose [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2010.
- Ley WB. Treating endometriosis in mares. *Veterinary Medicine*. 1994;89:778-88.
- Liebich HG. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2009.
- Lindl T. Zell- und Gewebekultur. 4. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2000.
- Lo HK, Malinin TI, Malinin GI. A modified periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate staining sequence for enhanced contrast and resolution of glycogen depositions by transmission electron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1987;35:393-9.
- Lü SH, Wang HB, Liu H, Wang HP, Lin QX, Li DX, Song YX, Duan CM, Feng LX, Wang CY. Reconstruction of engineered uterine tissues (EUTs) containing smooth muscle layer in collagen/matrigel scaffold in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:1611-8.
- Ma L, Yamada S, Wirtz D, Coulombe PA. A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks. *Nat Cell Biol*. 2001;3:503-6.
- Magin TM, Schroder R, Leitgeb S, Wanninger F, Zatloukal K, Grund C, Melton DW. Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. *J Cell Biol*. 1998;140:1441-51.
- Mahfoudi A, Fauconnet S, Bride J, Beck L, Remy-Martin JP, Nicollier M, Adessi GL. Serum-free culture of stromal and functionally polarized epithelial cells of guinea-pig endometrium: a potential model for the study of epithelial-stromal paracrine interactions. *Biol Cell*. 1992;74:255-65.

- Mahfoudi A, Nicollier M, Propper AY, Coumes-Marquet S, Adessi GL. Establishment of endometrial glandular epithelial cell subculture in a serum-free, hormonally defined medium, on a basement membrane matrix. *Biol Cell*. 1991;71:255-65.
- Marceau N, Schutte B, Gilbert S, Loranger A, Henfling ME, Broers JL, Mathew J, Ramaekers FC. Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp Cell Res*. 2007;313:2265-81.
- Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4219-23.
- Matthews CJ, Redfern CP, Hirst BH, Thomas EJ. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril*. 1992;57:990-7.
- McGuire PG, Seeds NW. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem*. 1989;40:215-27.
- Merviel P, Degeorges A, Salat-Baroux J, Calvo F. Normal human endometrial cells in culture: characterization and immortalization of epithelial and stromal cells by SV 40 large T antigen. *Biol Cell*. 1995;84:187-93.
- Miettinen M. Antibody specific to muscle actins in the diagnosis and classification of soft tissue tumors. *Am J Pathol*. 1988;130:205-15.
- Miller RK, Khuon S, Goldman RD. Dynamics of keratin assembly: exogenous type I keratin rapidly associates with type II keratin in vivo. *J Cell Biol*. 1993;122:123-35.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11:231-8.
- Mo B, Vendrov AE, Palomino WA, DuPont BR, Apparao KB, Lessey BA. ECC-1 cells: a well-differentiated steroid-responsive endometrial cell line with characteristics of luminal epithelium. *Biol Reprod*. 2006;75:387-94.
- Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:705-33.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31:11-24.
- Moll R, Levy R, Czernobilsky B, Hohlweg-Majert P, Dallenbach-Hellweg G, Franke WW. Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract. *Lab Invest*. 1983;49:599-610.
- Moreau GM, Arslan A, Douglas DA, Song J, Smith LC, Murphy BD. Development of immortalized endometrial epithelial and stromal cell lines from the mink (*Mustela vison*) uterus and their effects on the survival in vitro of mink blastocysts in obligate diapause. *Biol Reprod*. 1995;53:511-8.
- Mulholland J, Winterhager E, Beier HM. Changes in proteins synthesized by rabbit endometrial epithelial cells following primary culture. *Cell Tissue Res*. 1988;252:123-32.
- Mulisch M, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.

- Munson L, Chandler KS, Schlafer DH. Cultivation of bovine fetal and adult endometrial epithelial cells. *Journal of Tissue Culture Methods*. 1988;11:129-33.
- Munson L, Wilkinson JE, Schlafer DH. Effects of substrata on the polarization of bovine endometrial epithelial cells in vitro. *Cell Tissue Res*. 1990;261:155-61.
- Mylonas I, Jeschke U, Winkler L, Makovitzky J, Richter DU, Briese V, Friese K. Immunohistochemical expression of inhibin-alpha in human endometrium and the in vitro secretion of inhibin, estradiol and cortisol in cultured human endometrial glandular cells. *Arch Gynecol Obstet*. 2003a;268:142-50.
- Mylonas I, Speer R, Makovitzky J, Richter DU, Briese V, Jeschke U, Friese K. Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodefin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium. *Histochem Cell Biol*. 2000;114:405-11.
- Mylonas I, Winkler L, Jeschke U, Briese V, Friese K. Untersuchungen zur Isolierung, Reinigung und Kultivierung von humanen endometrialen Zellen und zur In-vitro-Expression von Inhibin in glandulären Epithelzellen. *Zentralbl Gynakol*. 2003b;125:415-23.
- Negami AI, Tominaga T. Gland and epithelium formation in vitro from epithelial cells of the human endometrium. *Hum Reprod*. 1989;4:620-4.
- Ngai J, Coleman TR, Lazarides E. Localization of newly synthesized vimentin subunits reveals a novel mechanism of intermediate filament assembly. *Cell*. 1990;60:415-27.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Coexpression of cytokeratin and vimentin in eutopic endometrium and endometriosis throughout the menstrual cycle: evaluation by a computerized method. *Fertil Steril*. 1995;64:69-75.
- Norberg L, Dardick I, Leung R, Burford-Mason AP, Rippstein P. Immunogold localization of actin and cytokeratin filaments in myoepithelium of human parotid salivary gland. *Ultrastruct Pathol*. 1992;16:555-68.
- Oddsottir C, Björnsdottir S, Riley SC, Watson ED. Development of endometrial fibrosis in the mare. *Reprod Dom Anim Suppl* 2008;43(s3):25.
- Olson GE, Winfrey VP, Blaeuer GL, Palisano JR, NagDas SK. Stage-specific expression of the intermediate filament protein cytokeratin 13 in luminal epithelial cells of secretory phase human endometrium and peri-implantation stage rabbit endometrium. *Biol Reprod*. 2002;66:1006-15.
- Omary MB. "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest*. 2009;119:1756-62.
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med*. 2004;351:2087-100.
- Ordener C, Cypriani B, Vuillermoz C, Adessi GL. Epidermal growth factor and insulin induce the proliferation of guinea pig endometrial stromal cells in serum-free culture, whereas estradiol and progesterone do not. *Biol Reprod*. 1993;49:1032-44.
- Oriolo AS, Wald FA, Ramsauer VP, Salas PJ. Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res*. 2007;313:2255-64.
- Osborn M, Franke W, Weber K. Direct demonstration of the presence of two immunologically distinct intermediate-sized filament systems in the same cell by double immunofluorescence

- microscopy. Vimentin and cytokeratin fibers in cultured epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1980;125:37-46.
- Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, Gorstein F. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens. *Fertil Steril.* 1989;52:965-72.
- Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays.* 2003;25:748-58.
- Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 2004;301:1-7.
- Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton.* 2010;67:630-4.
- Piva M, Flieger O, Rider V. Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent. *Biol Reprod.* 1996;55:1333-42.
- Raila G. Zur Pathogenese der Endometrose der Stute - Morphologisch-funktionelle Untersuchungen - [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.
- Ricketts AP, Hagensee M, Bullock DW. Characterization in primary monolayer culture of separated cell types from rabbit endometrium. *J Reprod Fertil.* 1983;67:151-60.
- Ricketts SW. The barren mare: Diagnosis, prognosis, prophylaxis and treatment for genital abnormality. Part II. *In Practice.* 1989;11:156-64.
- Ricketts SW, Alonso S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Vet J.* 1991a;23:185-8.
- Ricketts SW, Alonso S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet J.* 1991b;23:189-92.
- Roberts C. Intrauterine kerosene in equids: Historical perspectives. *Equine Vet J.* 1992;25:186.
- Rodriguez ML, Brignoni M, Salas PJ. A specifically apical sub-membrane intermediate filament cytoskeleton in non-brush-border epithelial cells. *J Cell Sci.* 1994;107:3145-51.
- Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science.* 1989;245:718-25.
- Rossdale PD, Ricketts SW. *Equine stud farm medicine.* 2. Aufl. Eastborne: Baillere Tindall; 1980.
- Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Berlin: Paul Parey Verlag; 1991.
- Samuel CA, Ricketts SW, Rossdale PD, Steven DH, Thurley KW. Scanning electron microscope studies of the endometrium of the cyclic mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1979;287-92.
- Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest.* 1990;63:144-61.

- Satyaswaroop PG, Bressler RS, de la Pena MM, Gurpide E. Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;48:639-41.
- Schmid E, Schiller DL, Grund C, Stadler J, Franke WW. Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J Cell Biol.* 1983;96:37-50.
- Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2007.
- Schön M, Benwood J, O'Connell-Willstaedt T, Rheinwald JG. Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. *J Cell Sci.* 1999;112:1925-36.
- Schoon D, Grüniger B, Wrede S, Kriesten S, Menger S, Bartmann CP. Vascular lesions in the equine endometrium. *Pferdeheilkunde.* 1997a;13:546.
- Schoon D, Schoon HA, Klug E. Angiopathien im Endometrium der Stute: Diagnose und prognostische Bedeutung. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hrsg. 13. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten; 1994 Mrz 24-25; Wiesbaden. S. 17-28.
- Schoon HA, Schoon D, Klug E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde.* 1992;8:355-62.
- Schoon HA, Schoon D, Klug E. Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde.* 1997b;13:453-64.
- Schoon HA, Schoon D, Kötter B, Runge A, Klug E. Zu Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hrsg. 21. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.; 1995 Mrz 21; Bad Nauheim. S. 273-82.
- Schoon HA, Schoon D, Ohnesorge B, Klug E. Zu Diagnose, Pathogenese und Bedeutung endometrialer Zysten bei der Stute. *Pferdeheilkunde.* 1993;9:215-21.
- Schoon HA, Schoon D, Wiegandt I, Bartmann CP, Aupperle H. "Endometrial maldifferentiation" - A clinically significant diagnosis in equine reproduction? *Pferdeheilkunde.* 1999;15:555-9.
- Schoon HA, Wiegandt I, Schoon D, Aupperle H, Bartmann CP. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: a histological and immunohistological study. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000;56:381-91.
- Schutte B, Henfling M, Kolgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP, Nap M, Björklund V, Björklund P, Björklund B, Lane EB, Omary MB, Jörnvall H, Ramaekers FCS. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res.* 2004;297:11-26.
- Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DAD, Rogers MA, Wright MW. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol.* 2006;174:169-74.
- Sharma R, Srivastava S, Bajpai VK, Balapure AK. Histological and ultrastructural regulation in rabbit endometrial explants by estrogen in serum-free culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002;38:293-7.

- Sheldrick EL, Flick-Smith HC, Dos Santos Cruz GJ. Oxytocin receptor binding activity in cultured ovine endometrium. *J Reprod Fertil.* 1993;98:521-8.
- Shibeshi W, Abraham G, Kneuer C, Ellenberger C, Seeger J, Schoon HA, Ungemach FR. Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008;44:179-84.
- Simons K, Fuller SD. Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol.* 1985;1:243-88.
- Singer KH, Scarce RM, Tuck DT, Whichard LP, Denning SM, Haynes BF. Removal of fibroblasts from human epithelial cell cultures with use of a complement fixing monoclonal antibody reactive with human fibroblasts and monocytes/macrophages. *J Invest Dermatol.* 1989;92:166-70.
- Skalli O, Chou YH, Goldman RD. Intermediate filaments: not so tough after all. *Trends Cell Biol.* 1992;2:308-12.
- Soellner P, Quinlan RA, Franke WW. Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:7929-33.
- Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:593-625.
- Strankmeyer O. Morphometrische Untersuchungen am Endometrium zyklischer und ovariectomierter, hormonbehandelter Stuten [Dissertation med. vet]. Hannover: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; 1993.
- Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat.* 2008;29:351-60.
- Takahashi H, Iga K, Sato T, Takahashi M, Okano A. Isolation and culture of bovine endometrial epithelial cells in a serum-free culture system. *J Reprod Dev.* 2001;47:181-7.
- Tamai Y, Ishikawa T, Bosl MR, Mori M, Nozaki M, Baribault H, Oshima RG, Taketo MM. Cytokeratins 8 and 19 in the mouse placental development. *J Cell Biol.* 2000;151:563-72.
- Theuss T, Böttcher D, Kappe A, Schoon HA, Ellenberger C. Establishment of a new method for isolation and culture of equine endometrial epithelial and stromal cells. *Pferdeheilkunde.* 2010;26:63-9.
- Tiemann U, Schneider F, Tuchscherer A, Becker F. Influence of epidermal growth factor and steroids on the proliferation of cultured uterine cells in bovine treated with different gonadotropins. *Reprod Dom Anim.* 1994;29:513-24.
- Trent JM, Davis JR, Payne CM. The establishment and morphologic characterization of finite cell lines from normal human endometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;136:352-62.
- Tunon AM, Rodriguez-Martinez H, Haglund A, Albiñá A, Magnusson U, Einarsson S. Ultrastructure of the secretory endometrium during oestrus in young maiden and foaled mares. *Equine Vet J.* 1995;27:382-8.

- Uchima FD, Edery M, Iguchi T, Bern HA. Growth of mouse endometrial luminal epithelial cells in vitro: functional integrity of the oestrogen receptor system and failure of oestrogen to induce proliferation. *J Endocrinol.* 1991;128:115-20.
- Uehara Y, Campbell GR, Burnstock G. Cytoplasmic filaments in developing and adult vertebrate smooth muscle. *J Cell Biol.* 1971;50:484-97.
- Van Camp SD. Endometrial biopsy of the mare. A review and update. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988;4:229-45.
- Van Niekerk CH, Gerneke WH, van Heerden JS. Anatomical and histological observations on the reproductive tract of mares with abnormal oestrous cycles. *J S Afr Vet Assoc.* 1973;44:141-52.
- Van Niekerk CH, Morgenthal JC, Gerneke WH. Relationship between the morphology of and progesterone production by the corpus luteum of the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;23:171-5.
- Varma VA, Melin SA, Adamec TA, Dorman BH, Siegfried JM, Walton LA, Carney CN, Norton CR, Kaufman DG. Monolayer culture of human endometrium: methods of culture and identification of cell types. *In Vitro.* 1982;18:911-8.
- Vega-Salas DE, Salas PJ, Gundersen D, Rodriguez-Boulan E. Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 1987;104:905-16.
- Viganò P, Di Blasio AM, Dell'Antonio G, Vignali M. Culture of human endometrial cells: a new simple technique to completely separate epithelial glands. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1993;72:87-92.
- Vikstrom KL, Lim SS, Goldman RD, Borisy GG. Steady state dynamics of intermediate filament networks. *J Cell Biol.* 1992;118:121-9.
- Virtanen I, Lehto VP, Lehtonen E, Vartio T, Stenman S, Kurki P, Wager O, Small JV, Dahl D, Badley RA. Expression of intermediate filaments in cultured cells. *J Cell Sci.* 1981;50:45-63.
- Vogel HJ, Humke E. Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich zu dem anderer Säugetiere und des Menschen. *Zentralbl Veterinarmed [C].* 1973;2:271-9.
- Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res.* 1992;202:1-8.
- Walter I, Handler J, Miller I, Aurich C. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histol Histopathol.* 2005;20:1105-13.
- Walter I, Handler J, Reifinger M, Aurich C. Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction.* 2001;121:581-6.
- Walton LA, Siegfried JM, Nelson KG, Siegal G, Kaufman DG. Endometrial stromal cells in culture: an attempt to understand the genesis and biologic activity of uterine sarcomas. *Gynecol Oncol.* 1986;24:247-57.

- Wang G, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Isolation, immortalization, and initial characterization of uterine cell lines: an in vitro model system for the porcine uterus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36:650-6.
- Wang HB, Lu SH, Lin QX, Feng LX, Li DX, Duan CM, Li YL, Wang CY. Reconstruction of endometrium in vitro via rabbit uterine endometrial cells expanded by sex steroid. *Fertil Steril.* 2010;93:2385-95.
- Watson ED, Aubrey ES, Zanecosky HG, Sertich PL. Isolation and culture of glandular epithelial and stromal cells from the endometrium of mares. *J Reprod Fertil.* 1992;95:269-75.
- Watson ED, Sertich PL. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. *J Am Vet Med Assoc.* 1992;201:438-40.
- Wewer UM, Damjanov A, Weiss J, Liotta LA, Damjanov I. Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. *Differentiation.* 1986;32:49-58.
- White TE, di Sant'Agnes PA, Miller RK. Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26:636-42.
- Xiao CW, Goff AK. Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *J Reprod Fertil.* 1998;112:315-24.
- Yamauchi N, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Sato T, Ito A, Hashizume K. A three-dimensional cell culture model for bovine endometrium: regeneration of a multicellular spheroid using ascorbate. *Placenta.* 2003;24:258-69.
- Zhang YL, Davis DL. Morphology of luminal and glandular epithelial cells from pig endometrium grown on plastic or extracellular matrices. *J Anim Sci.* 2000;78:131-8.
- Zhang Z, Paria BC, Davis DL. Pig endometrial cells in primary culture - morphology, secretion of prostaglandins and proteins, and effects of pregnancy. *J Anim Sci.* 1991;69:3005-15.
- Zieve GW, Heidemann SR, McIntosh JR. Isolation and partial characterization of a cage of filaments that surrounds the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 1980;87:160-9.

9 ANHANG

9.1 Reagenzien für die Zellkultur

HBSS (Hank's balanced salt solution)

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. H15-009

Hank's BSS (1x), ohne Ca & Mg, ohne Phenolrot

Antibiotikum/Antimykotikum (ABAM)

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. P11-002

enthält in 0,9%iger NaCl-Lösung:

10000 U/ml Penicillin G

10 mg/ml Streptomycinsulfat

25 µg/ml Amphotericin B

Kollagenase-II

Biochrom AG, Berlin

Kat.-Nr. C II-22

Kollagenase 2, Typ CLS II, Trockensubstanz, 254 U/mg

Konzentration: 2000 U/ml

Aktivität: 1 U setzt 1 µmol L-Leucin-Äquivalent in 5 Stunden bei 37 °C aus Kollagen frei

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,2, 300 mOsm)

Stammlösung:

42 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)

9,26 g Na₂HPO₄ x 2H₂O p.a. (Fa. Merck, Darmstadt)

2,15 g K₂HPO₄ (Fa. Merck, Darmstadt)

destilliertes Wasser ad 100 ml

Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in destilliertem Wasser

Verdauungslösung

Stammlösung:

100 mg Kollagenase-II (2000 U/ml)

12,7 ml PBS

Gebrauchslösung:

800 µl Stammlösung

3600 µl HBSS

160 µl ABAM

RPMI 1640

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. E15-885

RPMI 1640, mit L-Glutamin (stabilisiert), mit Phenolrot

Easycoll Separating Solution

Biochrom AG, Berlin

Kat.-Nr. L 6143

Easycoll, isotonisch, Dichte 1,124 g/ml

Trypanblau

Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Kat.-Nr. T8154

0,4%ig

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. E15-877

DMEM High Glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin, ohne Phenolrot

Ham's F-12

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. E15-016

Ham's F-12, ohne L-Glutamin

Antimykotikum (AM)

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. P11-001

enthält in 0,9%iger NaCl-Lösung: 250 µg/ml Amphotericin B

Fetales Kälberserum (FKS)

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. A15-649

Fötales Kälberserum „Gold“, Kategorie „EU“

HEPES-Puffer (1 M)

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. S11-001

enthält: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

ITS Supplement

PAA Laboratories, Cölbe

Kat.-Nr. F01-015

enthält in 0,9%iger NaCl-Lösung:

Insulin: 1000 mg/l

Transferrin: 550 mg/l

Natriumselenit: 0,68 mg/l

Hydrokortison

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kat.-Nr. H0888-1G

≥ 98 %

Human EGF

Biochrom AG, Berlin

Kat.-Nr. 103066

Human Epidermal Growth Factor, rekombinant, Quelle: E. coli, Aktivität: $\geq 1 \cdot 10^7$ units/mg**9.2 Reagenzien für die (Immun-)Zytologie und die Immunhistologie****Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,2, 300 mOsm)**Stammlösung:

42 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)

9,26 g Na₂HPO₄ x 2H₂O p.a. (Fa. Merck, Darmstadt)2,15 g K₂HPO₄ (Fa. Merck, Darmstadt)

destilliertes Wasser ad 100 ml

Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 in destilliertem Wasser

Zitrat-Puffer (10 mM, pH 6,0)Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt):

- 21,01 g C₆H₈O₇ x H₂O in 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung B:

0,1 M Natriumzitrat (Fa. Merck, Darmstadt):

- 29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \times H_2O$ in 1000 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

9 ml Stammlösung A

41 ml Stammlösung B

450 ml destilliertes Wasser

Tris Buffered Saline (TBS) (pH 7,6)**Stammlösung:**

60,57 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)

610 ml destilliertes Wasser

390 ml HCl 1 N (Fa. Merck, Darmstadt)

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml 0,8 % NaCl (Fa. Merck, Darmstadt) in destilliertem Wasser

3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Lösung

100 mg DAB (Fa. Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm)

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1):

6,81 g Imidazol (Fa. Merck, Darmstadt)

destilliertes Wasser ad 1000 ml

500 ml 0,1 M HCl

70 μ l H_2O (30 %) (Fa. Merck, Darmstadt)

10 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-A. Schoon für die Überlassung des sehr interessanten Themas, das mir einen Einstieg in die Arbeit mit Zellkulturen ermöglicht hat, sowie für die hervorragende Betreuung und die stets freundliche fachliche und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. D. Schoon möchte ich ebenfalls für die jederzeit freundliche und sachkundige fachliche Hilfe danken.

Bei Herrn Dr. Alexander Kappe bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken und die Hilfe bei den „ersten Schritten“ auf dem für mich neuen Gebiet.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Dr. Christin Ellenberger („Elli“) für ihre kompetente wissenschaftliche und freundschaftliche persönliche Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Sobiraj sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig, insbesondere Sophie Stoebe, Manuela Heine, Lydia Hildebrandt und Philipp Müller, für die Entnahme der Uterusbiopate sowie die klinisch-gynäkologische Untersuchung der beprobten Stuten.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig für die kommunikative Unterstützung bei der Materialgewinnung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Tobias Theuß bedanken, der mit mir gemeinsam den Weg dieses Dissertationsvorhabens beschritten hat und mit dem ich mich stets sowohl in wissenschaftlicher wie auch privater Hinsicht freundschaftlich austauschen konnte. Ohne ihn hätte sich dieses Projekt fachlich sicherlich schwieriger und auf persönlicher Ebene ganz sicher langweiliger dargestellt.

Ein riesiges Dankeschön geht an Maritta Wipplinger („Wippi“) für die tatkräftige und engagierte Unterstützung in Sachen Immunhistologie/Immunzytologie sowie für die „mütterliche“ Sorge um das persönliche Wohl.

Meinen großen Dank möchte ich Frau P. Schleinitz, Frau C. Pleitz, Frau B. Uhlemann und Tom Hornemann für die Anfertigung der histologischen/zytologischen

Schnitte aussprechen. Zudem gebührt Frau P. Schleinitz mein ausdrücklicher Dank für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate.

Herrn PD Dr. Getu Abraham möchte ich für die kollegiale fachliche Unterstützung bei „zellkulturspezifischen“ Problemen danken.

Ein ganz großes Dankeschön für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit geht an meine „aktuellen“ und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Veterinär-Pathologie: Kristin M., Kirsten, Anja, Anna, Mariana, Kathrin, Sabine, Sarah R., Anne, Heike, Kerstin, Kristin K., Hilke, Maria, Sandra, Eileen, Frauke, Veronika, Jan, Wolf, Heidrun und Sarah B.

Daniela Schilling und Gesine Kubaile-Jahn danke ich von Herzen für die Unterstützung in jeglichen organisatorischen Fragen.

Bei Ralf-Peter Dobroschke, Lars Riesche und Bernd Richter möchte ich mich für die gute und heitere Zusammenarbeit bedanken.

Auch meinen Freunden (sofern sie nicht ohnehin schon weiter oben genannt wurden) möchte ich für ihre Unterstützung ein ganz herzliches Dankeschön aussprechen.

Mein ausgesprochen großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre stete Unterstützung beim Erreichen meiner Ziele.

Zu guter Letzt, aber ganz sicher nicht am geringsten, möchte ich Stefan danken, der mich durch alle Höhen und Tiefen hinweg liebevoll und geduldig unterstützt und begleitet hat.