Klinikum Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Urolithiasis bei Schafböcken

Marlene Sickinger

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Erkrankungen der Wiederkäuer

Gießen
2019

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
http://dnb.ddb.de

© 2019 by Verlag:
Deutsche **V**eterinärmedizinische **G**esellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-519-4
1. Auflage 2019

Verlag:
DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvg.de
www.dvg.de

Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Veterinärmedizin

Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der
Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz

Urolithiasis bei Schafböcken

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Erkrankungen der Wiederkäuer

im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dr. med. vet. Marlene Sickinger

Gießen
2019

Für das Leben, die Leichtigkeit, die Zufriedenheit, das Glück

und für die Kraft, immer einmal mehr aufzustehen

als wir umgeworfen werden!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I
Abbildungsverzeichnis II
Tabellenverzeichnis V
Einleitung 1
Literaturübersicht 3
1. Evidenzbasierte Veterinärmedizin – Meta-Analyse und systematischer Review 3
2. Urolithiasis beim kleinen Wiederkäuer 5
2.1 Embryologische Entwicklung und Anatomie des Harntraktes 5
2.2 Histologischer Aufbau der Urethra 5
2.3 Innervation von Blase und Urethra 7
2.4 Steinbildung und -zusammensetzung 7
2.5 Epidemiologie und Pathogenese 9
2.6 Bildgebende Verfahren zur Darstellung des unteren Harntraktes 11
2.7 Therapeutische Möglichkeiten und deren Limitationen 14
3. Immunhistochemische Untersuchungen an Präputial- und Urethralgewebe 20
Immunologie 20
3.1 Lokale Immunabwehr 20
3.2 Cluster of differentiation CD 3-Komplex (Pan-T-Zell-Marker) 21
3.3 CD 8 (Marker für zytotoxische T-Lymphozyten) 21
3.4 CD 79α (Pan-B-Zell-Marker) 22
3.5 MAC 387 (Makrophagen-Marker) 22
Neuropeptide im unteren Harntrakt 22
3.6 Substanz P im Urogenitaltrakt 23
3.7 VIP im Urogenitaltrakt 24
3.8 Neurofilamente im Urogenitaltrakt 25
Material und Methoden 26
Abschnitt 1 – Meta-Analyse 26
Abschnitt 2 – Sonographie der Urethra 28
Abschnitt 3 – Immunhistochemische Untersuchungen 31
Abschnitt 4 – Modifikation bestehender Operationstechniken 44
Statistik 45
Ergebnisse 48
Abschnitt 1 – Meta-Analyse 48
1. Prävalenz der Urolithiasis bei Schaf- und/oder Ziegenböcken 48
2. Sind Rasse- bzw. Speziesprädispositionen für das Auftreten von Urolithiasis bekannt? 56

3. Sind kastrierte männliche Tiere häufiger betroffen als intakte Böcke? ... 56
4. Welche Operationsmethode bietet die beste Erfolgsrate? ... 56
Abschnitt 2 – Sonographie der Urethra ... 61
Abschnitt 3 – Immunhistochemische Untersuchungen ... 73
1. Morphometrie an HE-gefärbten Schnitten ... 73
2. Immunhistochemie ... 75
3. Neuropeptide und Innervationsdichte in der Urethra ... 79
Abschnitt 4 – Modifikation bestehender Operationstechniken ... 86
Diskussion ... 91
Abschnitt 1 – Meta-Analyse ... 91
1. Prävalenz von Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken ... 91
2. Kastration ... 92
3. Erfolgsrate nach Durchführung chirurgischer Operationsverfahren bei obstruktiver Urolithiasis am Schaf- und/oder Ziegenbock ... 93
Abschnitt 2 – Sonographie ... 94
Abschnitt 3 – Immunhistochemische Untersuchungen ... 97
1. Technische Aspekte ... 97
2. Histomorphometrie ... 98
3. Lokale zelluläre Immunabwehr ... 99
4. Neuropeptide und Gesamtinnervationsdichte ... 104
Abschnitt 4 – Modifikation bestehender Operationstechniken ... 106
Zusammenfassung ... 108
Summary ... 113
Literaturverzeichnis ... 117
Danksagung ... 138

Anhang
A Verwendete Geräte
B Verwendete Software
C Listen der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen für die Meta-Analysen
D Protokolle Immunhistochemie

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Ak	Antikörper
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan-3-triethoxysilylpropylamin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat
d. h.	das heißt
EBM	Evidenzbasierte Medizin
EBVM	Evidenzbasierte Veterinärmedizin
HE	Hämatoxilin-Eosin
IC	interstitielle Cystitis
IHC	Immunhistochemie
Il	Interleukin
IR	immunreaktiv
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LUT	lower urinary tract
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
mm	Millimeter
NANC	non-adrenerg-non-cholinerg
NF	Neurofilament
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PICO	Population, Intervention, Comparison, Outcomes
SP	Substanz P
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pars penina der Harnröhre eines 6 Monate alten Schaflammes 6
Abb. 2: Lamina interna praeputii des Bockes aus Abbildung 1. 6
Abb. 3: Darstellung der fünf Lokalisationen zur Untersuchung der Urethra am Schaflamm in linker Seitenlage 30
Abb. 4: Lokalisation der Proben-Entnahmestellen 32
Abb. 5: Entnommenes Gewebestück 33
Abb. 6: Positivkontrolle für CD 3 36
Abb. 7: Negativkontrolle für CD 3 36
Abb. 8: Positivkontrolle für CD 79α 37
Abb. 9: Negativkontrolle für CD 79α 37
Abb. 10: Positivkontrolle für MAC 387. 38
Abb. 11: Negativkontrolle für MAC 387 38
Abb. 12: Positivkontrolle für Substanz P. 39
Abb. 13: Negativkontrolle für Substanz P 39
Abb. 14: Positivkontrolle für VIP 40
Abb. 15: Negativkontrolle für VIP 40
Abb. 16: Positivkontrolle für Neurofilament 41
Abb. 17: Negativkontrolle für Neurofilament 41
Abb. 18: Anordnung der fünf Blickfelder zur digitalen Erfassung der Ergebnisse der Immunhistochemie. 42
Abb. 19: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse hinsichtlich der Prävalenz von Urolithiasis bei Hirse-basierter Fütterung 50
Abb. 20: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse hinsichtlich der Prävalenz von Urolithiasis bei Mais-basierter Fütterung 52
Abb. 21: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Amputation des Processus urethralis 58
Abb. 22: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Anlegen einer Perinealen Urethrostomie 59
Abb. 23: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Marsupialisation der Blase 59
Abb. 24: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Sonographie-gestützter Katheterzystotomie. 60

Abb. 25: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Katheterzystotomie im Rahmen einer Laparotomie 60
Abb. 26: Sonographische Quer- und Längsschnitt-Aufnahmen der 5 untersuchten Lokalisationen am Penis eines Lammes 63
Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse getrennt nach Untersucher für die Lokalisationen Glans penis und Pars penina 64
Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse getrennt nach Untersucher für die Lokalisationen distale und proximale Flexur 65
Abb. 29: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse getrennt nach Untersucher für die Lokalisation Arcus ischiadicus 66
Abb. 30: Gegenüberstellung der Messergebnisse beider Untersucher (U1 und U2) für die mittleren Urethraldurchmesser (längs) 68
Abb. 31: Gegenüberstellung der Messergebnisse beider Untersucher (U1 und U2) für die mittleren Urethraldurchmesser (quer) 68
Abb. 32: Gegenüberstellung der berechneten Größe „mittlerer Urethraldurchmesser“ (D) anhand der Messergebnisse beider Untersucher 69
Abb. 33: Gegenüberstellung der berechneten Größe „Urethralfläche“ (F) anhand der Messergebnisse beider Untersucher 69
Abb. 34: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die mittleren Urethraldurchmesser (längs) 70
Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die mittleren Urethraldurchmesser (quer) 71
Abb. 36: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die berechneten mittleren Urethraldurchmesser (gesamt) 71
Abb. 37: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die berechnete mittlere Urethralfläche 72
Abb. 38: Darstellung des Gruppenvergleichs für die Urethralfläche. 74
Abb. 39: Darstellung des Gruppenvergleichs für die Fläche des Urothels 74
Abb. 40: CD 3 IR-positive T-Zellen im Bereich der Basalmembran sowie innerhalb des Urothel 75
Abb. 41: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für CD 3 positive T-Zellen 76
Abb. 42: IR-positive Zellen für CD 79α in der Submukosa der Präputialschleimhaut bei einem Schaflamm mit Urolithiasis 77

Abb. 43: IR-positiven Anfärbung von MAC 387 in der Submukosa der Präputialschleimhaut eines Lammes ... *78*
Abb. 44: Darstellung einer SP-IR-positiven Anfärbung in der Submukosa der Urethralschleimhaut eines Lammes ... *80*
Abb. 45: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für Substanz P ... *80*
Abb. 46: Darstellung VIP-IR-positiver Anfärbungen in Ganglien und Nervenfasern des periurethralen Gewebes. ... *82*
Abb. 47: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für VIP ... *82*
Abb. 48: NF-IR-positive Anfärbungen der Nervenfaserbündel im periurethralen Gewebe ... *84*
Abb. 49: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für NF ... *84*
Abb. 50: Graphische Darstellung der negativen Korrelation zwischen SP immun-reaktiver Fläche und der Anzahl an CD 3 IR-pos. Zellen bei Böcken mit Urolithiasis. ... *85*
Abb. 51: Trendelenburg-Position bei einem Schaflamm zur Endoskopie der Urethra ... *86*
Abb. 52: Operations-Situs I: Paramediane Laparotomie und Zystozentese ... *87*
Abb. 53: Operations-Situs II: Normograde Urethroskopie ... *87*
Abb. 54: Operations-Situs III: Retrogrades Einbringen eines Führdrahtes in die Urethra ... *88*
Abb. 55: Operations-Situs IV: Retrogrades Einbringen eines Ballonkatheters in die Blase ... *88*
Abb. 56: Operations-Situs V: Kontrolle des korrekten Sitzes des Ballonkatheters ... *89*
Abb. 57: Endoskopische Darstellungnder Plica vesicalis bei einem Schaflamm ... *89*
Abb. 58: Harnkonkremente in der proximalen Urethra des Schaflammes aus Abb. 51.. ... *90*
Abb. 59: Endoskopische Aufnahme einer obstruktiven Urolithiasis ... *90*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zur Gewichtsentwicklung und Größenzunahme der verwendeten Lämmer..... 29

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper 35

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse der Meta-Analyse zur Prävalenz von Urolithiasis bei Hirse-dominierter Fütterung 49

Tabelle 4: Übersicht über die Verzerrungsanfälligkeit der Studien mit Hirse-basierter Fütterung 51

Tabelle 5: Übersicht über Ergebnisse der Meta-Analyse zur Prävalenz von Urolithiasis bei Mais-dominierter Fütterung 52

Tabelle 6: Übersicht über die Verzerrungsanfälligkeit der Studien mit Mais-basierter Fütterung 53

Tabelle 7: Ergebnisse der Meta-Analyse zur Erfolgsrate nach Therapie der Urolithiasis anhand von Fall-Kontroll-Studien. 57

Tabelle 8: Ergebnisse der Meta-Analyse zur Erfolgsrate nach Therapie der Urolithiasis anhand von Fallstudien 58

Tabelle 9: Ergebnisse der Meta-Analyse zur Erfolgsrate nach Therapie der Urolithiasis kombiniert 58

Tabelle 10: Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse zur sonographischen Morphometrie 67

Tabelle 11: Korrelationskoeffizienten zum Interobserver-Vergleich im Rahmen der sonographischen Morphometrie der Urethra 67

Tabelle 12: Übersicht über die p-Werte für den paarweisen Gruppenvergleich bezüglich VIP 81

Einleitung

Die Entstehung von Harnsteinen und das Auftreten einer obstruktiven Urolithiasis gelten beim männlichen kleinen Wiederkäuer als nicht seltene Erkrankung mit oft tödlichem Ausgang (Hay, 1990; George et al., 2007). Die Ursache der Kalkulogenese gilt als multifaktoriell und scheint stark fütterungsabhängig zu sein (Crookshank et al., 1967; Bellenger et al., 1981; Rakestraw et al., 1995; Ewoldt et al., 2008; Sun et al., 2010a; Sullivan et al., 2013). Ungeklärt ist bisher jedoch der Umstand, weswegen in Gruppen gleicher Fütterungs- und Umwelteinflüsse nicht alle Tiere gleichermaßen erkranken. Als prädisponierender Faktor wird häufig ein unterentwickelter Urogenitaltrakt bei kastrierten Böcken aufgrund des fehlenden Testosteroneinflusses angeführt (Kumar et al., 1982; Dühlmeier et al., 2007). Aussagekräftige Studien hierzu fehlen jedoch weitestgehend (Marsh und Safford, 1957; Bailey, 1975; Kumar et al., 1982; Bani Ismail et al., 2007). Ebenso unbefriedigend erscheinen die in der Literatur beschriebenen Therapieverfahren hinsichtlich der langfristigen Wiederherstellung eines ungestörten Harnabsatzes bei betroffenen Tieren (Van Weeren et al., 1987a, 1987b; Rakestraw et al., 1995; Ewoldt et al., 2006; Van Metre und Fubini, 2006).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit mehreren Aspekten der Harnsteinerkrankung beim Schafbock und gliedert sich in vier Abschnitte: Eine strukturierte Auswertung der vorhandenen Literatur, die Untersuchung des Urogenitaltraktes mittels Sonographie sowie auf histologischer Ebene und viertens die Entwicklung einer neuen Operationstechnik bei Patienten mit obstruktiver Urolithiasis.

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand einer Meta-Analyse die vorhandene Literatur hinsichtlich gezielter Fragestellungen auf ihre Validität nach den Kriterien der evidenzbasierten Medizin zu bewerten. Die konkreten Fragestellungen hierbei lauteten:

1. Wie hoch liegt die anhand der Literatur geschätzte Prävalenz von Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken?
2. Gibt es Spezies- oder Rasseprädispositionen?
3. Sind kastrierte männliche Tiere häufiger betroffen als intakte Böcke?
4. Welche Operationsmethode verspricht den besten Erfolg?

Im Anschluss hieran wurden ultrasonographische, histologische sowie immunhistochemische Untersuchungen der Harnröhre sowie der Präputialschleimhaut durchgeführt, um der Frage nachzugehen, welche funktionellen Grundlagen einer vermutlichen Varianz der interindividuellen Disposition hinsichtlich der Entstehung einer obstruktiven Urolithiasis zugrunde liegen. So sollte anhand sonographischer in-vivo Messung der Urethraldurchmesser

von Schafböcken sowie anhand einer morphometrischen in-vitro Messung an histologischen Schnitten des Urethralgewebes derselben Böcke ermittelt werden, ob sich kastrationsabhängig Unterschiede in der Größenentwicklung des Urethrallumens bzw. in der Höhe des Urothels darstellen lassen.

Untersuchungen zur lokalen Immunabwehr in Präputium und/oder Urethra sowie zu eventuell vorhandenen lokalen inflammatorischen Prozessen wurden vergleichend zwischen kastrierten und intakten Böcken durchgeführt. Das Innervationsmuster hinsichtlich Nervenfasergehalt und Neuropeptidgehalt war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Außerdem wurden die oben beschriebenen Untersuchungen der Urethra ebenfalls an Böcken durchgeführt, welche aufgrund einer Harnsteinerkrankung euthanasiert werden mussten.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Operationstechnik zur Therapie der Urolithiasis hatte folgende Fragestellungen zu bearbeiten:

1. Kann im Rahmen einer Urethroskopie ein Ballonkatheter in die Harnröhre gesunder Schlachtlämmer eingebracht werden?
2. Ist es anhand dieser Technik möglich, bei Böcken mit obstruktiver Urolithiasis eine Wiederherstellung der Patenz des Urethrallumens ohne Eröffnung der Urethra zu erreichen und kann anschließend ein Ballonkatheter in die Urethra eingelegt werden?

Literaturübersicht

1. Evidenzbasierte Veterinärmedizin – Meta-Analyse und systematischer Review

Unter evidenzbasierter Medizin (EBM) oder evidenzbasierter Veterinärmedizin (EBVM) versteht man das Bestreben, durch zusammenfassende Betrachtung der vorhandenen verfügbaren Information hinsichtlich einer bestimmten Fragestellung den zum Betrachtungszeitpunkt wissenschaftlich gesicherten Kenntnisstand zu erlangen (Keene, 2000; Higgins und Green, 2011). Die Bedeutung der EBVM hat in den letzten Jahren rasant zugenommen. Während im Jahr 2012 für den Suchbegriff „evidence based medicine“ im Rahmen einer Medline-Suche 47074 Publikationen gefunden wurden (Simoneit et al., 2012), sind es heute (Stand 02.03.2018) bereits 149970. Unter dem Suchbegriff „evidence based veterinary medicine“ können heute 2545 Publikationen gefunden werden, wohingegen es im Jahr 2012 lediglich 209 Literaturstellen waren. Um die vorhandene Literatur anhand ihrer Evidenz zu bewerten, ist es notwendig, sie in die sogenannten Evidenzstufen einzuteilen (Simoneit et al., 2012). Auf dem Gebiet der Humanmedizin bietet die „Cochrane database“ bzw. die „Cochrane Library“ Zugriff auf hochwertige, evidenzbasierte Literatur. Für den Veterinärmediziner steht mit „http://webapps.nottingham.ac.uk/refbase/“ ebenfalls eine solche Datenbank zur Verfügung (Sargeant und O'Connor, 2014b). Zudem wurden Checklisten entwickelt, um dem interessierten Leser die Zuordnung der verfügbaren Literatur in die entsprechenden Evidenzstufen zu vereinfachen (Arlt et al., 2010). Die zusammenfassende Bewertung mehrerer Studien kann anhand von Meta-Analysen erfolgen (Wagner, 2014). Eine solche Meta-Analyse stellt die Anwendung statistischer Methoden auf mehrere Studien gleicher Thematik dar, um einen gemeinsamen Konsens aus den Einzelergebnissen ziehen zu können. Dieser gemeinsame Konsens, sprich die gewonnene Evidenz der Meta-Analyse übertrifft dabei die Aussagekraft jeder Einzelstudie (Arlt und Heuwieser, 2005). Grundvoraussetzung für die Durchführung einer solchen Meta-Analyse ist jedoch das Vorhandensein einer Vielzahl an hochwertigen Studien (randomisierte, kontrollierte klinische Studien) gleicher Fragestellung, woran es in der Veterinärmedizin häufig mangelt (Keene, 2000).

Die Evidenzstufen werden gebildet durch 4 Kaskaden. Die Stufe höchster Evidenz nehmen dabei – neben den Meta-Analysen – die randomisierten, kontrollierten klinischen Studien selbst ein. Die zweite Stufe der Evidenzkaskade wird gebildet von nicht-randomisierten, klinischen Studien sowie von experimentellen Studien. Stufe 3 und 4 der Evidenz bilden deskriptive Studien bzw. Fallberichte oder Expertenmeinungen (Keene, 2000; Arlt und Heuwieser, 2005; Higgins und Green, 2011; Simoneit et al., 2012).

Sowohl die „Cochrane database“ als auch die „database of veterinary systematic reviews – VetSRev“ stellt eine Datenbank sogenannter systematischer Reviews dar. Diese unterscheiden sich von den klassischen narrativen Review-Artikeln durch ihre vorgegebene Gliederung und durch ihre Zielsetzung der Beantwortung einer speziellen Fragestellung (Sargeant und O'Connor, 2014b). Anleitungen zur Erstellung eines solchen systematischen Reviews sind online frei zugänglich (Cochrane handbook) und werden darüber hinaus in diversen Publikationen thematisiert (O'Connor et al., 2014a; O'Connor et al., 2014b; Sargeant et al., 2014a, 2014b; Sargeant und O'Connor, 2014a).

Eine Meta-Analyse stellt einen Unterpunkt dieser systematischen Reviews dar. Vorhandene Literatur zu einer speziellen Fragestellung wird zunächst möglichst umfassend recherchiert (Sargeant und O'Connor, 2014b). Erst nach der Recherche erfolgt eine Sichtung dieser sogenannten Primärliteratur hinsichtlich ihrer Relevanz für die anfangs definierte Fragestellung. Aus den relevanten Studien werden anschließend Daten gesammelt und hinsichtlich ihrer „Verzerrungsanfälligkeit“ (risk of bias) bewertet (Sargeant und O'Connor, 2014a). Eine Meta-Analyse stellt die quantitative Auswertung der erhobenen Daten mehrerer Studien dar und bezieht sich hierbei meist auf den Vergleich zweier Ereignisse (beispielsweise Erkrankungshäufigkeit in einer Kontroll- und einer Versuchsgruppe) im Rahmen kontrollierter klinischer Studien (Rufibach und Held, 2013). Ebenfalls möglich sind Meta-Analysen zu epidemiologischen Fragestellungen. Hierbei beschränkt sich die Analyse jedoch auf die statistische Heterogenitätsprüfung. Nur wenn eine ausreichende Homogenität der untersuchten Studien vorliegt, kann eine gemeinsame Effektgröße über diese Studien gebildet bzw. geschätzt werden (Rufibach und Held, 2013). Eine qualitative, beschreibende Auswertung der erhobenen Daten im Rahmen eines systematischen Reviews ist jedoch ebenso möglich und von Wert für den wissenschaftlich orientierten Veterinär-/Mediziner (O'Connor et al., 2014a; Sargeant und O'Connor, 2014b). Den Abschluss systematischer Reviews bilden die Präsentation der Ergebnisse und deren Interpretation (Sargeant und O'Connor, 2014b).

Vom klinischen Standpunkt aus betrachtet ist der Sinn einer solchen Meta-Analyse, den Patienten mit der bestmöglichen Therapieoption versorgen zu können (Schmidt, 2007). Um hier zu einer bestmöglichen klinischen Entscheidung kommen zu können, sind neben der EBVM die eigene klinische Erfahrung sowie die Bedürfnisse des Patienten bzw. des Patientenbesitzers zu berücksichtigen (Schmidt, 2007).

2. Urolithiasis beim kleinen Wiederkäuer

2.1 Embryologische Entwicklung und Anatomie des Harntraktes

Der Harntrakt wird gebildet aus den Nieren, den Ureteren, der Blase und der Urethra. Er entsteht in der Embryonalphase aus der Urogenitalplatte des intermediären Mesoderms, aus den Wolff`schen Gängen und dem Sinus urogenitalis. Beim männlichen Individuum entwickelt sich die primitive Urethra zu einer kurzen Urethra propria (vom Trigonum vesicae der Blase bis zu den Mündungsstellen der Samenleiter) und zu einem Becken- und Penisanteil der distalen Urethra (Rüsse, 1990). Anatomisch betrachtet liegt die rechte Niere zwischen der letzten Rippe und dem zweiten Lendenwirbel (L2), wohingegen die linke Niere in der rechten Hälfte des Abdomens zwischen L4 und L5 zu finden ist. Die beiden Nieren des kleinen Wiederkäuers sind bohnenförmig und weisen ähnlich wie beim Hund eine glatte Oberfläche auf (Vollmerhaus, 1999). Der Urin sammelt sich im Nierenbecken und wird über die beiden Ureteren zur Harnblase hin abgeleitet. Die Blase selbst besteht aus drei histologisch zu differenzierenden Schichten; der Serosa auf der Oberfläche des Organs, der Muscularis und der Mucosa als innere Auskleidung der Blase. Übersteigt das Urinvolumen das Fassungsvermögen der Blase, so setzt die Miktion ein und der Urin fließt entlang der Urethra beginnend am Trigonum vesicae ab. Dort münden beim männlichen Tier die Samenleiter auf dem Colliculus seminalis in die Urethra. Diese Mündungsstelle repräsentiert die Grenze zwischen präprostatischem und prostatischem Teil der pelvinen Urethra. Anschließend an die Umschlagstelle der Urethra in der Flexura ischiadica nach ventral verläuft die Harnröhre eingebettet in Penisgewebe und endet im Processus urethralis an der Penisspitze. Der Penis aller Wiederkäuer ist vom fibroelastischen Typ, bestehend aus zwei Corpora cavernosa und einem singulären Corpus spongiosum. Dieser Corpus spongiosum formt den ventralen Anteil des Penis und trägt die, in diesen eingebettete, Urethra. Prädisponierte Stellen für das Auftreten von Harnröhren-Obstruktionen sind die anatomisch vorgeformten Engstellen im Verlauf der Harnröhre. Namentlich die Beckenflexur (Flexura ischiadica), die s-förmige Flexur (Flexura sigmoidea), die Glans penis und der fadenförmige Fortsatz an der Penisspitze (Processus urethralis) (Van Metre, 2004).

2.2 Histologischer Aufbau der Urethra

Die harnableitenden Wege bestehen aus dem Nierenbecken, den Harnleitern, der Harnblase und der Harnröhre. Diese Strukturen weisen im Wesentlichen eine einheitliche Wandarchitektur auf (Smollich, 1992a; Welsch, 2003). Die Schleimhaut des harnableitenden Systems besteht aus einem mehrschichtigen hochprismatischen Übergangsepithel, dem sogenannten Urothel (Abb.

1). Dessen Aufbau erlaubt eine gewisse Anpassung an die physiologischerweise auftretenden Dehnungszustände bei bzw. während der Miktion (Weyrauch et al., 1998). Nach lateral folgen die Schichten der bindegewebigen Propria mucosae, die Tunica muscularis und die Tunica serosa. Die Harnröhre ist beim männlichen Tier in ihrem distalen Verlauf in den Penis eingebettet und wird dort als Harn-Samen-Röhre (Canalis urogenitalis) bezeichnet (Smollich, 1992b; Welsch, 2003). Die Schleimhaut der männlichen Harnröhre weist ein polygonales Epithel auf und geht im Bereich des Processus urethralis in ein mehrschichtiges Plattenepithel über, welches sich bis auf das Innenblatt (Lamina interna praeputii) des Präputiums fortsetzt (Abb. 2) (Smollich, 1992b).

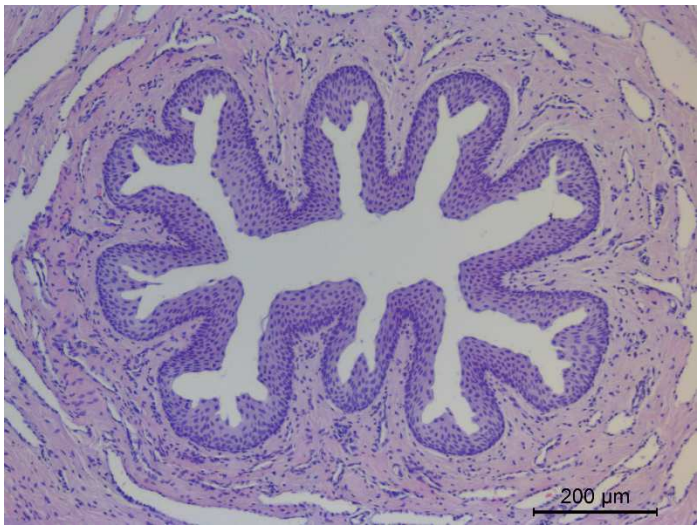


Abb. 1: Pars penina der Harnröhre eines 6 Monate alten Lacaune x Milchschafbockes; HE 10x. Zentral gelegen die sternförmig in Falten gelegte Schleimhaut der Harnröhre eingebettet in ein Corpus cavernosum urethrae.

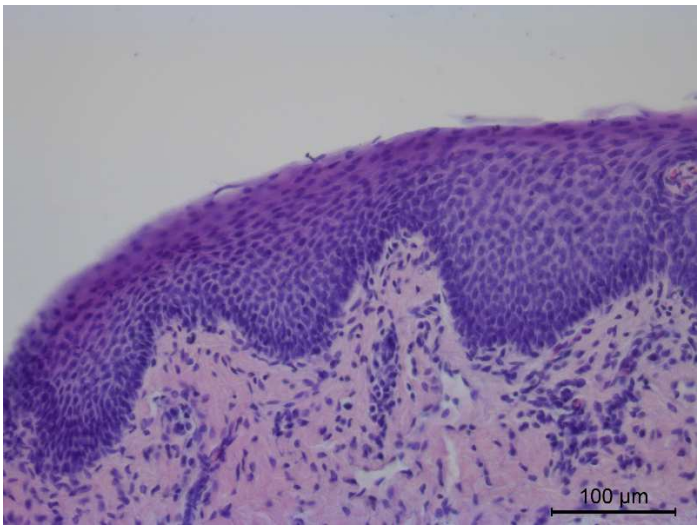


Abb. 2: Lamina interna praeputii des Bockes aus Abbildung 1; HE 20x. Mehrschichtiges Plattenepithel des Innenblatts des Präputiums.

2.3 Innervation von Blase und Urethra

Die Innervation von Blase und Urethra erfolgt sowohl zentral als auch peripher. Sensorische sowie motorische Fasern sind durch ein hochspezialisiertes Zusammenspiel an der Miktion (der Blasenentleerung) beteiligt. Die willkürliche Steuerung der Blasenmuskulatur wird durch den permanenten Informationsaustausch zwischen Effektororgan (Blase / Urethra) und der Großhirnrinde bewerkstelligt. Verarbeitete Reize werden vom Großhirn an das zentrale Miktionszentrum in der Pons weitergeleitet. Dieses steht über motorische Seitenstrangneurone mit dem sakralen Miktionszentrum in Verbindung (Braun und Jünemann, 2012) und geht in die peripheren Schaltkreise des Plexus pelvicus über. Dieses Nervengeflecht stellt die parasympathische Leitungsbahn dar, während die Fasern des Plexus hypogastricus aus dem sympathischen Thorakalstrang entspringen. Anteile des Nervus pudendus sind für die somatische Innervation der Blase und der Urethra verantwortlich (Braun und Jünemann, 2012). Die Blasenentleerung wird durch eine Aktivierung des Detrusormuskels über den cholinergen Parasympathikus vermittelt. Neben den klassischen Signalwegen der adrenergen und cholinergen Reizweiterleitung des vegetativen Nervensystems an postganglionären Neuronen kommt den Neurotransmittern des non-adrenergen non cholinergen Systems eine entscheidende Bedeutung zu (Diener, 2000). Am unteren Harntrakt (lower urinary tract; LUT) besitzen beispielsweise die Neuropeptide Substanz P und vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) kontraktile bzw. relaxierende Wirkungen und scheinen bei Störungen der Blasenentleerung oder bei Erkrankungen des LUT beteiligt zu sein (Arms und Vizzard, 2011).

Für einen ungestörten Harnabsatz sind entgegenläufige muskuläre Aktionen an Blase und Urethra notwendig. Ist die Füllungskapazität der Blase erreicht, kommt es zu einer parasympathisch vermittelten Aktivierung der glatten Muskulatur der Blase und somit zu einem Druckanstieg in der Blase. Dies aktiviert die Relaxation der urethralen glatten Muskulatur und triggert die Freisetzung von NO und VIP. Adrenerge und somatisch cholinerge exzitatorische Einflüsse werden unterdrückt (Fowler et al., 2008).

2.4 Steinbildung und -zusammensetzung

Bezüglich der Steinbildung werden in der Literatur zwei Hypothesen beschrieben: Die Kristallisationstheorie und die Matrix-Theorie (Förster, 1988).

Die Kristallisationstheorie beruht auf der Tatsache, dass es in gesättigten Salzlösungen zur Bildung von Kristallen kommt (Sun et al., 2010a). Diese Kristalle stellen einen sogenannten Nidus (Kern oder Ausgangspunkt) für die Anlagerung weiterer Kristalle und für die Bildung von Steinen dar (homogene Nukleation). Besteht der Nidus aus Bakterien, Fibrin oder

Epithelzellen, wie diese beispielsweise im Falle einer Zystitis vermehrt im Urin auftreten, so wird der Mechanismus der Kristallisation als heterogene Nukleation bezeichnet (Lonsdale, 1968; Förster, 1988).

Die Matrix-Theorie begründet sich auf der Annahme, dass die Steinbildung nur aufgrund von Mukoproteinen möglich ist, welche eine Kittsubstanz für die Agglutination und für die nachfolgende Steinbildung darstellen (Hay, 1990; Sullivan et al., 2013). Bei kleinen Wiederkäuern bestehen Harnsteine hauptsächlich aus Magnesium, Ammonium, Phosphaten, Calcium, Carbonaten, Oxalaten and Silicaten (Nottle, 1982; Oryan und Razavi, 1993; Clark et al., 1999; Gutierrez et al., 2000; Kannan und Lawrence, 2010; Mavangira et al., 2010; Sun et al., 2010a). Alle diese Mineralien neigen dazu, Kristalle auszubilden, wenn ihre maximale spezifische Löslichkeit erreicht ist. Abhängig vom jeweiligen Fütterungsverhältnis dieser Mineralien zueinander werden Tiere, welche die entsprechende Futterration erhalten, den einen oder anderen Steintyp ausbilden (Crookshank et al., 1967; Davis et al., 1969; Cuddeford, 1987). Hinsichtlich der für Wiederkäuer häufigsten Steinart finden sich uneinheitliche Ergebnisse in der Literatur; bei Magnesium-Ammonium-Phosphat (Struvit) und Calcium-Carbonat (Calcit) scheint es sich jedoch um zwei gleichermaßen wichtige Mineralzusammensetzungen im Bereich der Wiederkäuermedizin zu handeln (Bellenger et al., 1981; Wenkel et al., 1998; Mavangira et al., 2010; Sun et al., 2010a; Makhdoomi und Gazi, 2013; Sullivan et al., 2013). Da der physiologische pH-Wert des Urins beim Wiederkäuer leicht alkalisch ist und da sowohl Harnsteine auf Phosphorbasis als auch Calcitsteine zur Kristallisation in alkalischem Urin neigen, sind diese Erkenntnisse nicht verwunderlich (Ewoldt et al., 2008; Sullivan et al., 2013). Manning und Blaney (1986) konnten speziesspezifische Unterschiede in der Steinzusammensetzung für Schafe und Ziegen aus Queensland ermitteln. Während Urolithen aus Schafen hauptsächlich aus Calciumcarbonat mit Magnesiumcarbonat-Anteilen bestanden, waren diejenigen Steine aus Ziegen aus Magnesiumphosphat aufgebaut. In einer neueren Untersuchung an fünf Merino-Feinwollschafen aus China konnte auch für Schafe diese Steinart (Kaliummagnesiumphosphate) ermittelt werden (Pan et al., 2011), wobei zusätzlich Magnesiumpyrophosphat-Steine in der Niere eines dieser Schafe analysiert wurden. Für Ziegen wurden in dieser Region hauptsächlich Struvitsteine festgestellt (Sun et al., 2010b). Eine ältere regionale Studie aus dem Raum Jena gibt für die Zusammensetzung der analysierten Harnsteine von Schafen (n = 31) als vornehmliches Mineral Magnesium-Ammonium-Phosphat (Struvit) an (Wenkel et al., 1998). Dieselbe Studie ermittelte bei Ziegen Calciumoxalat sowie Calciumphosphat-Steine.

2.5 Epidemiologie und Pathogenese

Das Vorkommen von Harnsteinen ist bereits seit der Antike bekannt (Modlin, 1980). Die Prävalenz für Urolithiasis bei Schaf und Ziege hat innerhalb des letzten Jahrhunderts gewisse Änderungen erfahren (Robinson et al., 2008). Während in der Literatur der 30er Jahre des vergangenen Jahrhunderts das Auftreten von obstruktiver Urolithiasis als sporadisches Geschehen gehandelt wird (zitiert nach (Weaver, 1969)), ist diese Erkrankung zu einem häufigen Problem in großen Mastbeständen (Bellenger et al., 1981; Parker, 1981; Hay, 1990) sowie in kleineren Herden und bei Tieren aus Hobbyhaltungen avanciert (Kümper, 1994; Nwaokorie et al., 2015). Über saisonale und regionale Häufungen dieser Erkrankung wurde berichtet (Oehme und Tillmann, 1965; Nottle, 1982; Salman et al., 1988). Bei Zuchtböcken scheint die Obstruktion der Urethra infolge Urolithiasis eine der häufigsten tödlichen Erkrankungen zu sein (Förster, 1988), wobei hier mitunter wirtschaftliche oder nutzungskorrelierte Überlegungen zur Euthanasie des Tieres führen (Van Weeren et al., 1987a; Doster und Grotelueschen, 1996). Für die Lämmermast werden Urolithiasis-Inzidenzen von bis zu 10 % angegeben (Hay, 1990), wobei die Mortilitätsrate bei etwa 60-100 % liegen soll (Hay, 1990; Kümper, 1994).

Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten – einer im Vergleich zum weiblichen Tier sehr langen und engen Urethra – tritt diese Erkrankung nahezu ausschließlich bei intakten und kastrierten männlichen Wiederkäuern auf (Bostedt und Dedié, 1996; Van Metre et al., 1996a; Behrens et al., 2001; Dühlmeier et al., 2007). So wurden für die Calcit-Urolithiasis bei Ziegen unter anderem die Risikofaktoren ”männlich” und ”kastriert” als risikoreicher eingestuft als „weiblich“ und „unkastriert“ (Nwaokorie et al., 2015). Im Rahmen einer retrospektiven Untersuchung an Ziegenböcken mit Urolithiasis konnte ermittelt werden, dass im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant mehr kastrierte Böcke als intakte Böcke betroffen waren (George et al., 2007).

Der vornehmliche Sitz der Verlegung der Harnröhre befindet sich bei kleinen Wiederkäuern im Bereich der Beckenflexur oder der distalen Flexura sigmoidea sowie am Processus urethralis (Kümper, 1994; Van Metre et al., 1996a; Ganter, 2001). Für Schafe wird eine gewisse Rasseprädisposition für das Merinolandschaf sowie für Schwarzkopfschafe konstatiert (Kümper, 1994; Bostedt und Dedié, 1996). Bei Ziegen wurde eine Rasseprädisposition für die Afrikanische Zwergziege ermittelt (George et al., 2007).

Generell besteht in der Literatur Einigkeit dahingehend, dass das Auftreten von Urolithiasis fütterungsabhängig ist (Bushman et al., 1964; Packett und Hauschild, 1964; Bushman et al., 1965; Robbins et al., 1965; Huntington et al., 1977; Cuddeford, 1987). Ein hoher Getreideanteil

in der Ration führt zu einer übermäßigen Phosphorzufuhr und begünstigt neben anderen Faktoren die Entstehung von Phosphat-Urolithen (Vipperman, Jr. et al., 1969; Hoar et al., 1970a; Sato und Omori, 1977). Das Zusammenspiel von Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphor und Magnesium war Gegenstand einer Vielzahl von Fütterungsversuchen mit dem Ziel, eine ideale Zusammensetzung der Ration in Hinblick auf eine Urolithiasis-Prophylaxe zu ermitteln (Hoar et al., 1969, 1970a, 1970b). Als ideal angesehen wird – auch heute noch – ein Kalzium-Phosphor-Verhältnis von 2:1 (Vipperman, Jr. et al., 1969). Statistische Aufarbeitungen der Wahrscheinlichkeiten, bei definierten Mineralstoffkonzentrationen an Urolithiasis zu erkranken, wurden durchgeführt (Lamprecht, Jr. et al., 1969a, 1969b). Diese Untersuchungen erstreckten sich sowohl auf die Mineralstoffkonzentrationen in der Ration als auch auf die Blutserum-Konzentrationen sowie die Exkretion dieser Elemente im Urin. So lässt sich anhand der Blutserumkonzentrationen für Phosphor, Kalzium, Magnesium und Kalium sowie anhand deren Exkretion im Urin, anhand des Harnvolumens, des spezifischen Gewichts des Urins, des pH-Werts und der titrierbaren Azidität des Urins durch Anwendung einer aufwendigen Formel mit einer Sicherheit von 75 % abschätzen, ob ein Tier Harnsteine bilden wird oder nicht (Lamprecht, Jr. et al., 1969a).

Weitere Studien an Schafen und Ziegen wurden publiziert, in denen Faktoren ermittelt wurden, welche die experimentelle Beeinflussbarkeit der Steinbildung betrafen (Davis et al., 1969; Stewart et al., 1990; Wang et al., 2009). Die Beteiligung einer Infektion mit Ureaplasma an der Urolithogenese wurde vermutet, konnte jedoch statistisch nicht bewiesen werden (Livingston, Jr. et al., 1984). Anhand der oben genannten und in der Literatur im Detail beschriebenen Risikofaktoren ist der typische Urolithiasis-Patient mit Calcitstein-Urolithiasis eine kastrierte, männliche afrikanische Zwergziege mit einem Alter über 1 Jahr (Nwaokorie et al., 2015).

Die Ausbildung bzw. das Auftreten von Harnsteinen bei Schafen und Ziegen wurde in einer Reihe von Fütterungsversuchen näher beleuchtet (Crookshank et al., 1967; Unanian et al., 1985; Sullivan et al., 2013). Wechselnde Zusammensetzungen der Rationen insbesondere im Hinblick auf den Gehalt an Phosphor, Kalzium und Magnesium wurden verfüttert und die Inzidenz von Urolithiasis in den Versuchsgruppen ermittelt. Für betroffene Böcke konnten höhere Serumgehalte an Magnesium und Phosphor bei niedrigeren Kalziumkonzentrationen ermittelt werden (Crookshank et al., 1967; Unanian et al., 1985). Die Inzidenzen im Rahmen dieser Experimente schwanken je nach Futterzusammensetzung zwischen 23 und 57 %. Die höchsten Inzidenzen wurden für eine Ration mit einem Kalzium-Phosphorverhältnis von 1:2 verzeichnet (Crookshank et al., 1967).

Zur Prophylaxe der Struvitbildung (oder anderer Phosphatsteine) wird ein Urin-pH-Wert von 6-6,5 empfohlen (Jones et al., 2009). Die Anwendung des beim Rind von der Hypokalzämie-Prophylaxe bekannten DCAD-Konzeptes mit Zufütterung von Ammoniumchlorid ermöglicht bei einem DCAD von 0 mEq / kg eine sichere Urinansäuerung ohne dabei zu einer metabolischen Azidose im Blut zu führen (Jones et al., 2009). Die Verabreichung von entweder 1-2 % Kaliumchlorid oder 0,5-1 % Ammoniumchlorid zur Ration werden als protektiv gegenüber der Ausbildung von Harnsteinen angesehen (Crookshank, 1970; Emerick et al., 1972; Stewart et al., 1991). Eine Ansäuerung des Urins durch Gabe von 450 mg Ammoniumchlorid pro kg KGW und Tag hat zwar positive Auswirkungen auf eine Reduktion der Inzidenz von Phosphatsteinen, nicht jedoch auf die Ausbildung von Kalzium-basierten Harnsteinen (Mavangira et al., 2010), da die Ansäuerung hier zu einer erhöhten Freisetzung und fraktionierten Elimination von Kalzium im Urin führt. Die Effekte von Ammoniumchlorid im Sinne der Risikoerhöhung an Kalzium-basierter Urolithiasis zu erkranken, gleicht hierbei derjenigen bei einer kalziumreichen Fütterung auf Luzerne- oder Kleebasis (Mavangira et al., 2010). Die Autoren geben jedoch auch Harnstein-protektive Effekte einer erhöhten Chlorid-Ausscheidung bei Ammoniumchlorid-Fütterung an und fordern weiterführende Studien zu dieser Thematik. Auch andere Arbeitsgruppen raten bei einer langfristigen Fütterung saurer Salze zu einer Überwachung der Elektrolytkonzentrationen sowie der Knochendichte, da aufgrund einer gesteigerten Kalzium-Exkretion zum einen die Gefahr der Calcitsteinbildung steigt und zum anderen eine sekundäre Osteoporose entstehen kann (Stratton-Phelps und House, 2004).

2.6 Bildgebende Verfahren zur Darstellung des unteren Harntraktes

Röntgen

Die röntgenologische Darstellung des unteren Harntraktes wird insbesondere in der Kleintiermedizin als Routinemaßnahme im Rahmen der Diagnostik bei Verdacht auf eine bestehende Harnsteinerkrankung durchgeführt (Bartges und Callens, 2015). Indikationen zur Anfertigung einer solchen Übersichtsaufnahme des kaudalen Abdomens können sowohl in Harntrakt-assoziierten Symptomen (z.B. Dysurie, Strangurie oder Pollakisurie) als auch in unspezifischen Symptomen (z.B. Anorexie, akutes Abdomen) begründet liegen (Hecht, 2015). Eine Darstellung der physiologischen Urethra mittels solcher Übersichtsaufnahmen im laterolateralen bzw. ventrodorsalen Strahlengang ist jedoch nicht möglich (Hecht, 2015). Bei Patienten mit obstruktiver Urolithiasis können diese Steine in 85 % der Fälle mittels nativer

Röntgendarstellung erkannt werden wobei sich Struvitsteine als nicht röntgendicht erwiesen haben (Kinsley et al., 2013).

Die genaue und in allen Fällen mögliche Darstellung des Verlaufes der Urethra macht daher die Anwendung eines Kontrastmittels notwendig, wobei üblicherweise ein Positivkontrastmittel (beispielsweise Jod-haltige Präparate) verwendet wird (Hecht, 2015). Zur Darstellung der Urethra kann sowohl eine Zystourethrographie mit antegrader Darstellung der Urethra durchgeführt werden als auch eine retrograde Darstellung mittels retrograder Instillation von Kontrastmittel in die Urethra (Palmer et al., 1998; Hecht, 2015). Zur Abklärung von Harnabfluss-Störungen, welche nicht durch Nativröntgen erkannt werden können, wird beim kleinen Wiederkäuer die Durchführung einer Positivkontrastaufnahme empfohlen, wobei das Kontrastmittel über einen Ballonkatheter nach Zystotomie in die Blase zu instillieren ist (Palmer et al., 1998; Kinsley et al., 2013). Die Technik einer Ausscheidungsurographie kann zur Darstellung der Urethra nicht empfohlen werden, da selbst eine konstante Darstellung der Ureteren nicht sicher gewährleistet ist (Palmer et al., 1998). Da es kein zur Anwendung beim Wiederkäuer zugelassenes Kontrastmittel gibt, kann entweder die Umwidmung eines für Kleintiere zugelassenen, jodhaltigen Positivkontrastmittels erfolgen oder aber bevorzugt eine verdünnte PVP-Jod-Lösung mit bestehender Zulassung für kleine Wiederkäuer verwendet werden. In beiden Fällen ist allerdings die aufgrund der Umwidmung bestehende Wartezeit von 7 Tagen auf Milch (beim weiblichen Tier) und 28 Tagen auf Fleisch einzuhalten.

Sonographie

Die Sonographie stellt eine gut anwendbare, nicht-invasive diagnostische Methode beim kleinen Wiederkäuer dar, welche zur Untersuchung des Reproduktionstraktes aber auch in der Internistik und Chirurgie häufige Anwendung findet (Scott, 2012; AlLugami et al., 2017). Bei Vorliegen einer obstruktiven Urolithiasis stellt die transabdominale Sonographie (5 MHz Linear- oder Sektorschallkopf) neben der bereits oben beschriebenen radiologischen Untersuchung das diagnostische Mittel der Wahl dar (Scott und Sargison, 2010; Scott, 2013, 2016). Die transabdominale Darstellung der dilatierten Blase in Verbindung mit der charakteristischen klinischen Symptomatik bietet die Möglichkeit, innerhalb von fünf Minuten die Diagnose „obstruktive Urolithiasis“ vor Ort und ohne Zeitverzögerung aufgrund des Anfertigens einer Blutuntersuchung im Labor zu stellen (Scott, 2016). Laut Scott (2000) gilt hierbei eine das Becken um bis zu 10 cm oder mehr überragende Harnblase als unphysiologisch, da die Blase physiologischerweise beim Schafbock intrapelvin gelegen ist und sich daher der transabdominalen sonographischen Untersuchung entzieht. Bei transrektal durchgeführter

Sonographie lässt sich die Harnblase bei weiblichen kleinen Wiederkäuern ebenso darstellen wie bei gesunden und an obstruktiver Urolithiasis erkrankten Böcken, wobei eine Vermessung der dilatierten Blase bei erkrankten Tieren aufgrund der begrenzten Eindringtiefe der Rektalschallsonden nicht möglich ist (Braun et al., 1992b; Braun et al., 1992a; Steininger und Braun, 2012). Eine physiologische Blase stellt sich bei weiblichen Saanen-Ziegen sonographisch als echogene schmale Linie mit einer Dicke von 1,4 ± 0,38 mm dar (Steininger und Braun, 2012) und erreicht bei männlichen Bergschafen eine Dicke von 2 ± 1 mm (Braun et al., 1992a).

Für die prognostische Einschätzung bei Vorliegen einer obstruktiven Urolithiasis sollte außerdem stets eine transkutane sonographische Untersuchung zumindest der rechten Niere durchgeführt werden (Scott, 2000, 2016). Sofern es durch den Rückstau von Urin in das Nierenbecken bereits zu einer ausgeprägten Hydronephrose gekommen ist, ist die Prognose für das Tier als sehr schlecht einzustufen und die Euthanasie sollte in diesen Fällen aus Tierschutzgründen einem Therapieversuch vorgezogen werden (Scott, 2013).

Für die sonographische Darstellung der distalen harnableitenden Wege werden in der Kleintiermedizin Schallköpfe mit Frequenzen von 7,5 MHz oder darüber empfohlen. Die Untersuchung findet am Patienten in Rückenlage statt (Poulsen Nautrup und Lüerssen, 2007). Zur besseren Erkennbarkeit wird empfohlen, eine Sonde in die Urethra einzuführen. Über diese kann entweder direkt – durch Darstellung der Sonde selbst – oder aber durch Instillation von aufgeschüttelter Kochsalzlösung über Mikrobläschen die Urethra dargestellt werden (Kumon et al., 2004; Poulsen Nautrup und Lüerssen, 2007). Beim Menschen bereitet die Darstellung der Urethra in der Regel keine Probleme, da hier die willentliche Miktion zur Dilatation der Urethra ausgenutzt werden kann. Alternativ kann ein Ballonkatheter in der Fossa navicularis, welche sich im Bereich der apikalen Urethra beim Mann befindet, fixiert werden und über diesen Katheter kann Spüllösung in die Urethra instilliert werden. Die Harnröhre stellt sich dann als anechogenes Band flankiert von den echogenen Urothelanschnitten dar (Shaida und Berman, 2012).

CT und MRT-Darstellung der harnableitenden Wege

Eine Darstellung der harnableitenden Wege kann mittels Computer- oder Magnetresonanz-Tomographie erfolgen (Karpenstein et al., 2011; Hecht, 2015; Heilmann, 2016). Diese Techniken erfordern jedoch einen erheblichen apparativen Aufwand und sind somit kostenintensiv. Eine Anwendung beim kleinen Wiederkäuer ist daher nur für spezielle Fragestellungen und für Hobbytiere denkbar. In der Humanmedizin werden CT- und MRT-

Untersuchungen in der Beurteilung und Klassifikation von Blasenkrebs sowie zur Untersuchung von Harnabsatzstörungen inklusive der Steindetektion eingesetzt (Deruyver et al., 2016; Ritter, 2016).

2.7 Therapeutische Möglichkeiten und deren Limitationen

Die obstruktive Urolithiasis stellt die häufigste Indikation für einen chirurgischen Eingriff am Harntrakt bei kleinen Wiederkäuern dar (Kinsley et al., 2013). In der Literatur findet sich eine Vielzahl an möglichen Therapieansätzen und operativen Verfahren, welche zur Behandlung dieser Erkrankung eingesetzt werden können (Van Metre et al., 1996a). Diese Therapieformen reichen von der konservativ-medikamentösen Therapie über die Amputation des Processus urethralis oder aber die Laser-Lithotripsie bis hin zur Transplantation von Backenschleimhaut zur Wiederherstellung einer intakten Harnröhre nach obstruktiver Urolithiasis (Oehme und Tillmann, 1965; Weaver, 1969; Halland et al., 2002; Gill und Sod, 2004; Van Metre, 2004). Generell sind bei den chirurgischen Techniken Eingriffe an der Urethra selbst abzugrenzen von Operationstechniken, welche die Blase miteinbeziehen. Mögliche Operationen an der Urethra sind hierbei die Urethrotomie inklusive Amputation des Processus urethralis, die perineale oder ischiale Urethrostomie sowie die Penektomie (Penisamputation). Für Tiere im Zuchteinsatz werden Techniken empfohlen, welche die Urethra schonen und stattdessen eine Drainage der Blase nach außen unter Umgehung der Urethra erzeugen. Hierzu zählen die einfache Zystotomie, die Katheterzystostomie und die Marsupialisation der Blase (Van Metre et al., 1996b; Van Metre, 2004).

Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie bei obstruktiver Urolithiasis besteht aus der parenteralen Anwendung analgetisch-spasmolytischer Pharmaka eventuell in Verbindung mit Sedativa. Diese konservative Therapie wird 12 bis 18 Stunden nach Erstbehandlung als erfolglos eingestuft, wenn bis zu diesem Zeitpunkt kein Urinabfluss beobachtet wird (Oehme und Tillmann, 1965). Allerdings geben die genannten Autoren an, dass die Wirkung der Spasmoanalgesie bzw. der Sedation hauptsächlich auf eine Streckung der Flexura sigmoidea und somit eine passive sekundäre Weitung der Urethra zurückzuführen ist. Eine ursächliche medikamentöse Therapie stellt die Instillation von Walpole-Pufferlösung in die Blase von Böcken mit Urolithiasis dar (Cockcroft, 1993; Janke et al., 2009). Diese Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4,5 besteht aus Natriumacetat, Eisessig und destilliertem Wasser (Janke et al., 2009). Der Sinn der Instillation dieser Lösung in die Blase von Patienten mit Urolithiasis

besteht darin, eventuell vorhandene Harnsteine durch die Ansäuerung des Urins mittels der sauren Pufferlösung auflösen zu können. In beiden genannten Publikationen wird die Instillation von Walpole-Pufferlösung nicht als alleinige Therapie, sondern als Begleittherapie nach Amputation des Processus urethralis sowie einer gleichzeitigen anti-inflammatorischen und analgetischen Therapie beschrieben. In Einzelfällen werden Erfolge durch die Gabe von Allopurinol bei Urat-assoziierter Urolithiasis beschrieben (Raza et al., 2012).

Konservativ-mechanische Eingriffe an der Urethra

Amputation des Processus urethralis

Eine der häufigsten Lokalisationen eines oder mehrerer Harnsteine beim kleinen Wiederkäuer ist der Processus urethralis (Kümper, 1994; Bostedt und Dedié, 1996). Das Festsetzen von Steinen in diesem dünnen fadenförmigen Fortsatz der Urethra führt nahezu immer zu deren Obstruktion. Daher ist die einfachste initial häufig angewandte Therapieform die Amputation des verlegten Processus urethralis (Haven et al., 1993; Kümper, 1994; Bostedt und Dedié, 1996; Dühlmeier et al., 2007). Eine langfristige negative Beeinflussung der Fertilität von Zuchtböcken, welche einer Amputation des Processus urethralis unterzogen werden, scheint entgegen der häufig von Schafzüchtern geäußerten Meinung nicht zu bestehen (Van Metre, 2004). Dennoch wird eine 2-wöchige Deckruhe empfohlen, da Blutungen an der Amputationsstelle die Samenqualität negativ beeinflussen können (Van Metre, 2004).

Katheterisierung der Harnröhre

Im Zuge der Amputation des Processus urethralis kann die Urethra mit Hilfe kleinlumiger Katheter sondiert und anschließend gespült werden (Van Weeren et al., 1987b; Van Metre et al., 1996a). Für eine Katheterisierung der Urethra bis in die Blase sind sehr lange (1-2 m) Katheter notwendig (Van Metre, 2004). Verkomplizierend kommt ein beim kleinen Wiederkäuer im kaudalen Bereich der ischialen Urethra vorhandener Recessus urethralis hinzu (Van Metre, 2004). Diese blind endende Aussackung der Harnröhre führt zu einem sehr häufigen Misserfolg beim Versuch, einen Katheter in die Blase vorzuschieben (Ewoldt et al., 2008). Auch retrograd durch Hydropulsion in der Urethra zurückgespülte Urolithen können sich in diesen Recessus setzen, fallen jedoch nach der Spülung wieder in die Urethra zurück (Ewoldt et al., 2008). Aufgrund dieser mechanischen Hindernisse, der schlechten Erfolgsrate bei retrograden Spülversuchen und aufgrund der Reizung der Urethralschleimhaut raten einige Autoren daher von einer retrograden Katheterisierung und Spülung der Harnröhre ab oder wenden diese zumindest selbst nicht an (Rakestraw et al., 1995; Ewoldt et al., 2006). In neueren

Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Katheterisierung der Harnblase mittels Spezialkatheter und Führdraht ohne weitere Hilfsmittel möglich ist (Reppert et al., 2016).

Chirurgische Eingriffe an der Urethra

Urethrotomie

Kann die Obstruktion der Urethra durch Amputation des Processus urethralis nicht behoben werden, so schließt sich als weitere chirurgische Maßnahme die Möglichkeit einer Urethrotomie im Verlauf der Harnröhre im Bereich des die Urethra obstruierenden Urolithen an (Oehme und Tillmann, 1965; Van Metre et al., 1996a; Makhdoomi und Gazi, 2013). Die Urethra sollte hierbei nach Entfernung des Urolithen in beiderlei Richtung ohne Widerstand spülbar sein (Van Metre et al., 1996a). Die Urethrotomie-Stelle wird nach Abschluss der Operation mittels Einzelheften verschlossen, wobei zur Sicherung der Durchgängigkeit der Urethra ein Katheter in die Harnröhre eingelegt werden kann (Van Metre, 2004).
Die Urethrotomie steht einer Zuchtnutzung des Patienten nicht prinzipiell entgegen, wobei aufgrund von Verwachsungen an der Urethrotomie-Stelle eine eventuell vorsichtige bis schlechte Prognose hinsichtlich der Zuchttauglichkeit zu stellen ist (Van Metre, 2004).

Urethrostomie

Generell unterschieden werden die perineale sowie die ischiale Urethrostomie – je nach Lokalisation des artifiziell erzeugten Stomas (Van Metre et al., 1996b; Van Metre, 2004). Aufgrund der Fixation des Penis an der äußeren Haut im Perineal- bzw. Ischialbereich schließt diese Form der Therapie die weitere Nutzung des Tieres zur Zucht aus, da ein Ausschachten des Penis im Anschluss an diese Operation nicht mehr möglich ist (Van Weeren et al., 1987a; Van Metre, 2004). Aufgrund der hohen Gefahr einer Striktur bzw. der hohen Rezidivrate von 45-78 % werden diese Urethrostomie-Verfahren als sogenannte Verwertungstechniken angesehen, welche eine kurzfristige Schlachtung des betroffenen Tieres zum Ziel haben (Van Weeren et al., 1987a; Haven et al., 1993). Mit der Intention einer längerfristigen Patenz des erzeugten Stomas wurde ein modifiziertes Verfahren der proximalen perinealen Urethrostomie beschrieben (Tobias und van Amstel, 2013). Langzeiterfahrungen zu dieser Technik fehlen jedoch.

Penisamputation

Dieses Operationsverfahren wird als Verwertungstechnik angesehen und wurde für kastrierte sowie intakte Wiederkäuer und Schweine entwickelt (May et al., 1998; Van Metre, 2004). Der

Penis wird hierbei proximal der Obstruktion durchtrennt und so präpariert, dass der Amputationsstumpf im Bereich des Perineums über die äußere Haut nach außen zu liegen kommt (Van Metre, 2004). Der distale Penisteil kann hierbei entweder verbleiben oder entfernt werden (Van Metre, 2004).

Extrakorporale und intrakorporale Stoßwellenlithotripsie

Die Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) wurde 1985 in der Humanmedizin zur Therapie der Urolithiasis etabliert (Rassweiler et al., 2016). Da die Anwendung dieser Technik jedoch mehrerer Sitzungen bedarf und keine unmittelbare Entfernung der Steinfragmente möglich ist, wurde diese Technik mittlerweile nahezu komplett durch die intrakorporale Lithotripsie ersetzt (Rassweiler et al., 2016). Eine Lithotripsie innerhalb des Körpers wurde durch die Anwendung semirigider sowie flexibler Endoskope mit Arbeitskanal möglich. Im Bereich der Human-Urologie stellt die Ureterorenoskopie mit Anwendung entsprechender Stoßwellensonden oder aber des Holmium-YAG-Lasers mittlerweile einen der häufigsten Eingriffe und in vielen Fällen das Therapieverfahren der Wahl dar (Bach, 2016).

Laserlithotripsie

Insbesondere in der Humanmedizin ist die Anwendung der Urethroskopie mit Laserlithotripsie eine standardmäßig angewandte Diagnostik- und Therapieform bei Nieren-, Ureter- und Blasensteinen (Halland et al., 2002; Bach, 2016). Die Laserlithotripsie mittels Holmium-YAG-Laser (Yttrium-Aluminium-Garnet) stellt hier den Goldstandard der intrakorporalen Lithotripsie dar (Bach, 2016). Auch bei Hängebauchschweinen und Ziegen wurde diese Diagnostik- und Therapieform erfolgreich angewendet (Halland et al., 2002). Allerdings ist hierfür eine kostenintensive apparative Grundausstattung von Nöten und die Anwendung beim kleinen Wiederkäuer ist aufgrund der sehr langen Urethra problembehaftet (Halland et al., 2002).

Plastische Chirurgie an der Harnröhre / Stents

In Einzelfällen wurden Transplantationen von Backenschleimhaut (Gill und Sod, 2004) zur plastischen Wiederherstellung der Urethra bzw. das Einsetzen von Stents in die Urethra als Therapie beschrieben (Van Metre und Fubini, 2006). Die Praktikabilität und standardmäßige Anwendbarkeit dieser Verfahren sollte jedoch noch weiter untersucht und durch Studien belegt werden (Van Metre und Fubini, 2006).

Chirurgische Eingriffe an der Blase

Marsupialisation der Blase

Die Marsupialisation der Blase stellt das operative Anlegen eines künstlichen Blasenstomas im Inguinalbereich dar – die operative Technik hierzu ist seit langem bekannt (May et al., 1998). Über das Stoma können sowohl Urin als auch Urolithen ungehindert abgehen. Trotz einiger Nachteile wie beispielsweise der obligat auftretenden Inkontinenz, einer Dermatitis im Stomabereich oder des Vorfalls von Urothel aus der Stomaöffnung sehen einige Autoren diese Therapieform als akzeptable Langzeitlösung einer obstruktiven Urolithiasis an (May et al., 1998; Fortier et al., 2004). Das Anlegen einer solchen Blasenfistel kann mittlerweile auch Laparoskopie-gestützt erfolgen und scheint nach Einschätzung der Autoren dem laparotomischen Verfahren hinsichtlich des postoperativen Schmerzes und der Rekonvaleszenz überlegen zu sein (Hunter et al., 2012). Eine Weiterentwicklung der Marsupialisation ist mit der sogenannten Vesicopräputialen Anastomose (VPA) gegeben (Cypher et al., 2017). Hierbei wird eine Anastomose zwischen Marsupialisationsstoma und Präputium geschaffen. Da dieses Verfahren jedoch bisher nur an einer sehr begrenzten Fallzahl (n = 4) beschrieben ist, weisen die Autoren darauf hin, das Verfahren zunächst noch kritisch zu betrachten und dessen Anwendung im Einzelfall gut abzuwägen.

Zystotomie

Unter Zystotomie versteht man das chirurgische Eröffnen der Harnblase im Rahmen einer Laparotomie. Diese Operation dient dazu, Harnsteine aus der Blase zu entfernen und anschließend mittels normograder und / oder retrograder Urethralspülung die Patenz der Harnröhre zu überprüfen (Van Metre et al., 1996b). Bei alleiniger Zystotomie werden in der Literatur Erfolgsraten zwischen 73 und 88 % angegeben (Haven et al., 1993; Van Metre et al., 1996b).

Katheterzystostomie

Eine weitere mögliche Therapie bei Vorliegen einer obstruktiven Urolithiasis ist das temporäre Einlegen eines Ballonkatheters in die Blase (Rakestraw et al., 1995; Van Metre et al., 1996b). Für das Einbringen eines solchen Ballonkatheters in die Blase wurden mehrere technische Verfahren beschrieben (Iselin et al., 2001; Dühlmeier et al., 2007; Franz et al., 2008; Fazili et al., 2010). Diese beinhalten sowohl die klassische Laparotomie (Iselin et al., 2001), als auch weitere Abwandlungen dieser Technik („Fingerspitzenmethode“ nach (Fazili et al., 2010)), teils auch unter Zuhilfenahme moderner technischer Verfahren wie Sonographie und Endoskopie

(Dühlmeier et al., 2007; Franz et al., 2008). Sinn dieses Verfahrens ist es, zunächst einen Abfluss von Urin über den Ballonkatheter sicherzustellen. In den auf die Operation folgenden Tagen wird durch Verschluss des Katheters (Rakestraw et al., 1995; Van Metre, 2004; Ewoldt et al., 2008) bzw. durch vorsichtiges Befüllen der Blase mit Spüllösung ein normogrades Spülen der Urethra (im Sinne einer Urohydropropulsion) versucht, um eine Durchgängigkeit der Harnröhre wiederherzustellen (Constable et al., 2016; Heilmann, 2016).

3. Immunhistochemische Untersuchungen an Präputial- und Urethralgewebe

Immunologie

3.1 Lokale Immunabwehr

Trotz seiner exponierten anatomischen Lage gilt der Harntrakt als weitestgehend steril (Zasloff, 2007). Dieser Umstand ist unter anderem beweisend für die Existenz eines komplexen und wirkungsvollen lokalen Immunsystems (Zasloff, 2007). Die Mukosa-assoziierten Lymphatischen Gewebe (MALT – mucosa associated lymphoid tissues) setzen sich zusammen aus den lymphatischen Systemen des Gastrointestinal-, des Respirations- und des Urogenitaltraktes (Holmgren und Czerkinsky, 2005; Williams, 2012b; Acosta-Dibarrat et al., 2014). Generell wird in der Immunbiologie unterschieden zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Lösch et al., 2000; Williams, 2012a). Während das angeborene Immunsystem sowohl humorale Substanzen als auch zelluläre Bestandteile umfasst, besteht die erworbene Immunabwehr ausschließlich aus zellulären Komponenten (Williams, 2012c, 2012d). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören die Granulozyten, die Monozyten und Makrophagen sowie dendritische Zellen. Die erworbene Immunabwehr basiert auf natürlichen Killerzellen, B- und T-Lymphozyten, welche ihren Ursprung bzw. ihre Reifung im Knochenmark (B-Zellen) oder dem Thymus (T-Zellen) erfahren (Williams, 2012a). Naive T-Zellen werden im Thymus durch Prägung anhand entsprechender T-Zell-Rezeptoren (TCR – T-cell-receptors) zu T-Helferzellen (Th-Zellen; CD 4) oder Zytotoxischen T-Zellen (CD 8). Ihre Aufgaben sind die Aktivierung anderer Immunzellen bzw. die Lyse erkannter Antigene (Williams, 2012c). Eine direkte Lyse oder ein direktes Erkennen antigener Strukturen ist jedoch nicht möglich. Hierfür müssen Pathogene durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) durch die Ausbildung von MHC I und MHC II Molekülen angezeigt werden (Williams, 2012c). Eine genaue Unterscheidung der T-Lymphozyten erfolgt anhand ihrer biochemischen Oberflächenstruktur. Diese Klassifizierung wird als „Cluster of differentiation“ (CD) bezeichnet und stammt ursprünglich aus der Humanmedizin, wurde jedoch auf andere Spezies übertragen (Howard und Morrison, 1994). Die Glykoproteinstruktur der Zelloberfläche erlaubt eine Systematisierung der Zellen, wobei die CD-Moleküle oft Bestandteile der T-Zell-Rezeptoren darstellen.

Die lokale Immunabwehr der Präputialschleimhaut sowie der männlichen Urethra ist Gegenstand einer Reihe humanmedizinischer Studien, welche sich sowohl mit der Immunbiologie als auch mit den Pathogenitätsmechanismen venerischer Erkrankungen

befassen (Pudney und Anderson, 1995; Brunst et al., 1998; Pudney und Anderson, 2011; Ganor et al., 2013). Entsprechende veterinärmedizinische Arbeiten liegen bei Mäusen und Meerschweinchen wie auch bei Wiederkäuern vor (Howard und Morrison, 1994; Quayle et al., 1994; Wang et al., 2010; Acosta-Dibarrat et al., 2014). Hinsichtlich einer eventuell vorhandenen Beziehung zwischen dem Zeitpunkt der Kastration bzw. dem Auftreten einer Harnsteinerkrankung mit der Verteilung der lokalen Immunzellen in der Urethra findet sich in der Literatur kein Hinweis. Diese Kenntnislücke soll daher Gegenstand der eigenen Untersuchungen sein.

3.2 Cluster of differentiation CD 3-Komplex (Pan-T-Zell-Marker)

Der „cluster of differentiation" CD 3 umschreibt einen als CD 3 / T-Zell-Rezeptor-Komplex bezeichneten Baustein der T-Zellmembran, welcher aus mehreren Glykoproteinen besteht (Hein, 1992). Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einem konstanten und einem variablen Komplex-Anteil. Der konstante Teil setzt sich aus 3 CD 3-Ketten (γ, δ und ε) zusammen, während der variable Anteil entweder aus einem α β- oder einem γ δ- Heterodimer besteht (Hein, 1992). Die Funktionen des CD 3-Komplexes umfassen sowohl die stabile Verankerung des Rezeptors innerhalb der Zellwand der T-Lymphozyten als auch die Signaltransduktion nach der Aktivierung der Zelle durch Binden eines spezifischen Liganden an den Rezeptor (Antigen gebunden an antigenpräsentierende Zelle) (Hein, 1992). Bezüglich der Interspeziesvariabilität des CD 3-Rezeptors besteht hinsichtlich der α β-Anteile weitestgehend Übereinstimmung zwischen Wiederkäuern, Mensch und Maus. Eine größere Variabilität zwischen den genannten Spezies ist jedoch für den γ δ-Anteil zu verzeichnen (Hein, 1992).

3.3 CD 8 (Marker für zytotoxische T-Lymphozyten)

CD 8-positive T-Lymphozyten stellen eine Untergruppe der T-Zellen dar (Hein, 1992) und werden in großer Anzahl sowohl intraepithelial als auch in der Lamina propria der Urethralschleimhaut nachgewiesen (Pudney und Anderson, 1995). Ihre Funktion im Rahmen der lokalen Immunität auf den Schleimhäuten des Körpers wird sowohl als zytotoxische T-Zelle als auch als T-Zelle mit immunsuppressiver Wirkung angegeben (Pudney und Anderson, 1995). Eine immunsuppressive Wirkung im Sinne einer immunologischen Toleranz z.B. gegen autoantigentragende Spermien oder exogene Antigene soll beim Menschen gegeben sein (Pudney und Anderson, 1995; Holmgren und Czerkinsky, 2005).

3.4 CD 79α (Pan-B-Zell-Marker)

Ähnlich wie für CD 3 bereits oben ausgeführt, versteht man unter CD 79α einen Bestandteil des B-Zellrezeptors (Koyama et al., 1997). Dieser Rezeptorkomplex besteht aus CD 79α und CD 79β, wobei dieses Heterodimer am extrazellulären Ende nicht-kovalent an eines der fünf transmembranären Immunglobulin-Moleküle (IgM, IgD, IgG, IgE oder IgA) bindet (Koyama et al., 1997; Chu und Arber, 2001). Die intrazellulären Anteile dienen der Signaltransduktion im Zytoplasma (Chu und Arber, 2001). In unreifen B-Zellen konnten CD 79 α und –β-Ketten ohne Bindung an Immunglobulin-Moleküle nachgewiesen werden (Koyama et al., 1997). Generell werden jedoch beide Bestandteile des CD 79 nahezu ausschließlich auf B-Zellen exprimiert. Antikörper gegen diesen Komplex können daher in der Immunhistochemie als potenter B-Zell-Marker genutzt werden (Chu und Arber, 2001).

3.5 MAC 387 (Makrophagen-Marker)

Der Antikörper-Klon MAC 387 ist gerichtet gegen das intrazytoplasmatisch sowie membranständig gelegene Calprotectin, welches auch als Bestandteil der S100-Proteinfamilie bezeichnet wird (Nacken et al., 2003). Dieses α, β-Heterodimer findet sich im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten und wird auf der Zellmembran von Monozyten exprimiert (Striz und Trebichavsky, 2004). Von dort kann es bei Aktivierung der Zelle sezerniert werden und dient als klinisches Diagnostikum akuter und chronischer Entzündungsreaktionen (Nacken et al., 2003; Striz und Trebichavsky, 2004). Bei Ratten, welche nach einer chronischen Infektion mit Ureaplasma parvum Struvit-Harnsteine entwickelt haben, konnte ein erhöhter Gehalt an proinflammatorischem S100A8 im Blasengewebe nachgewiesen werden. Das Blasenepithel dieser Tiere weist eine hohe Zahl an S100A8- sowie S100A9-positiven Zellen auf, was bei Vergleichstieren mit chronischer Harntraktentzündung ohne Harnsteinbildung nicht der Fall ist (Reyes et al., 2009). Die Autoren schließen daher auf eine Beteiligung des angeborenen lokalen Immunsystems – namentlich der lokalen Entzündungsreaktion in der Blase mit vermehrter Produktion des Biomarkers S100A8 – bei der Ausbildung von Struvit-Harnsteinen.

Neuropeptide im unteren Harntrakt

Neuropeptide haben eine gewebespezifische Verteilung und Funktion im unteren Harntrakt (lower urinary tract – LUT) und sind eng mit dem physiologischen Ablauf der Miktion verknüpft (Merrill et al., 2013). Bei Vorliegen einer Dysfunktion im LUT (z.B. Entzündungen) kommt es zu Veränderungen der Expression und der Funktion der Neuropeptide im Sinne einer

gestörten Balance im Neuropeptidmuster, was wiederum zu einer Störung der normalen Miktion führen kann (Arms und Vizzard, 2011; Merrill et al., 2013).
Die Bedeutung der Neuropeptide (wie beispielsweise SP und VIP) wird anhand der Vielzahl an immunhistochemischen Studien am intramuralen Nervenfasergeflecht der Blase sowie im Bereich der Urethra unterschiedlicher Spezies deutlich (Majewski et al., 1999; Sienkiewicz et al., 2004; Arrighi et al., 2008; Kedia et al., 2015). Diesbezügliche Untersuchungen beim kleinen Wiederkäuer fehlen jedoch.

3.6 Substanz P im Urogenitaltrakt

Das Neuropeptid Substanz P (SP) besteht aus 11 Aminosäuren und gehört zu der Gruppe der Tachykinine (Dockray, 1987). Seine prokinetische Wirkung im Magen-Darmtrakt des kleinen Wiederkäuers vermittelt SP durch Bindung an die G-Protein gekoppelten Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3 (Oh-ishi et al., 2013). Im Urogenitaltrakt wird dieses Peptid neben anderen Neuropeptiden mit der Physiologie der Blasenentleerung in Verbindung gebracht (Arrighi et al., 2008; Arms und Vizzard, 2011). Außerdem kommt Substanz P eine wichtige Bedeutung bei der parakrinen Vermittlung der Nozizeption, bei inflammatorischen Prozessen, bei der Entwicklung von Ödemen sowie funktionell bei der Ejakulation zu (Rau et al., 2014). Hinweise für die Beteiligung von Substanz P bei der Übertragung sensibler Reize und der Kontrolle glattmuskulärer Kontraktilität in der Urethra konnten mittels immunhistochemischer Untersuchungen an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen von Schafböcken identifiziert werden (Arciszewski, 2004). Entsprechende in-vivo-Effekte sind aufgrund pharmako-physiologischer Untersuchungen an der Urethra von weiblichen Ratten bekannt (Radziszewski et al., 2003). Hier führte die Applikation von Substanz P zu einer kräftigen, phasischen Kontraktion glatter Muskulatur und dadurch zu einer intraurethralen Drucksteigerung. Neben diesen unmittelbaren Effekten des Neuropeptids Substanz P auf die glatte Muskulatur der Urethra und der Blase scheint der Konzentration dieses Peptids innerhalb des Urothels besondere Bedeutung beizukommen. Bei Katzen mit feliner interstitieller Zystitis (FIC) konnten beispielsweise deutlich erhöhte Konzentrationen an Substanz P im Blasenurothel nachgewiesen werden (Birder et al., 2010). Die Autoren bringen diese – im Vergleich zu gesunden Katzen deutlich erhöhten – Neuropeptidkonzentrationen mit der Vermittlung des chronischen Blasenschmerzes durch Zellen des Urothels an Astrozyten des Rückenmarks in Verbindung. Generell besteht in der Literatur Übereinstimmung dahingehend, dass Substanz P als Tachykinin neben den klassischen adrenergen Neurotransmittern in die afferente sensible Reizweiterleitung aus dem unteren Harntrakt eingebunden ist und über diese

Signaltransduktionswege die Blasenfunktion beeinflusst (Andersson, 1996). So hat die lokale Freisetzung von Substanz P aus sensorischen Nervenfasern in der Blase verschiedene Effekte zur Folge. Hierzu gehören z.B. glattmuskuläre Kontraktionen, eine Förderung weiterer Neurotransmitterfreisetzung aus Nervenfasern, Vasodilatation und eine erhöhte Plasmapermeabilität (Andersson, 1996).

3.7 VIP im Urogenitaltrakt

VIP besteht aus 28 Aminosäuren und findet sich bei Säugetieren in Neuronen des Gastrointestinaltraktes, des Gehirns und Rückenmarks sowie im Urogenitaltrakt (Dockray, 1987). Seine Wirkung vermittelt dieses Peptid nach Bindung an seine spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (VPAC 1 und VPAC 2) und Freisetzung von cAMP (Yoshiyama und Groat, 2008). Eine veränderte Expression und Wirkung dieses Peptids bei pathologischen Zuständen lässt vermuten, dass VIP eine Rolle bei der Physiologie und Pathologie des Harnabsatzes hat (Yoshiyama und Groat, 2008). VIP-IR Fasern wurden beim Schwein sowohl in der weiblichen als auch in der männlichen distalen Urethra nachgewiesen, wobei beim männlichen Tier eine wesentlich geringere Anzahl dieser VIP-IR Fasern zu verzeichnen war (Sienkiewicz et al., 2004). Im Gegensatz zu dieser geringen Anzahl an VIP-IR Fasern in der Umgebung der männlichen Urethra des Schweines, konnten zahlreiche VIP-IR Fasern im Peniskörper dieser Tierart nachgewiesen werden (Majewski et al., 1999). Diese Autoren schreiben VIP eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Erektion beim Schwein zu. Diese wird über eine Inhibition glatter Muskulatur des Penis im Sinne einer arteriellen Vasodilatation und einer Relaxation des Sinusoidalen Systems des Corpus cavernosum erreicht (Majewski et al., 1999).

Das Vorkommen VIP-immunreaktiver Fasern sowie eine relaxierende Wirkung von VIP werden ebenfalls an der glatten Muskulatur der Blase sowie der Urethra mehrerer Spezies beschrieben (Hund, Katze, Kaninchen, Schwein, Rind und Mensch) (Arrighi und Domeneghini, 1998; Arrighi et al., 2008; Yoshiyama und Groat, 2008; Kedia et al., 2015). Im Gegensatz hierzu findet sich in der Literatur kein Hinweis zu entsprechenden Untersuchungen am kleinen Wiederkäuer. Lediglich bezüglich der Innervation der akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Schafbock wird im Rahmen einer Studie an fünf Schafböcken das Vorhandensein VIP-immunreaktiver Fasern in der Samenblasendrüse (Glandula vesicularis), der Glandula bulbourethralis sowie der Prostata beschrieben (Arciszewski und Wasowicz, 2006). Die eigenen Untersuchungen an der distalen Urethra des Schafbockes stellen somit erstmalig Informationen zur VIP-IR Innervation der Harnröhre bereit.

3.8 Neurofilamente im Urogenitaltrakt

Neurofilamente gehören mit einem Durchmesser von 10 nm zu den Intermediärfilamenten. Im zentralen sowie im peripheren Nervensystem bestehen Neurofilamente aus 4 Untereinheiten. Diese sind in beiden Nervensystemen aufgebaut aus drei Polypeptidketten unterschiedlichen Molekulargewichts (70, 160 und 200 kDa), sowie α-Internexin als viertem Bestandteil des Heteropolymers im zentralen Nervensystem. Im peripheren Nervensystem wird diese vierte Untereinheit als Peripherin bezeichnet (Yuan et al., 2012).

Der Nachweis von Neurofilamenten mittels immunhistochemischer Verfahren dient der Darstellung der Gesamtinnervation eines Gewebes und wurde sowohl am Gastrointestinaltrakt als auch am Urogenitaltrakt des kleinen Wiederkäuers erfolgreich durchgeführt (Yamamoto et al., 1994; Marettova und Maretta, 2002; Garcia-Pascual et al., 2010; Prochnau et al., 2013). So konnten die genannten Studien beispielsweise ein dichtes Netz an Nervenfasern in der Blättermagenwand des Schafes sowie in der quergestreiften Muskulatur der Urethra beim Schaf nachweisen. Im Rahmen einer Schaf-Modell-Studie zur Bluthochdruck-Therapie mittels renaler Denervation wurde eine immunhistochemische Darstellung Neurofilament-immunreaktiver Fasern verwendet, um mögliche Risiken dieser Therapie abzuschätzen. Hierbei konnte als Wirkungsmechanismus der Radiofrequenz-Ablation in Nierenarterien eine Reduktion an Nervenfasern im Umfeld dieser Arterien ermittelt werden.

Die immunhistochemische Anfärbung von Neurofilamenten gilt demnach als Standard-Verfahren der Immunhistochemie.

Material und Methoden

Abschnitt 1 – Meta-Analyse

Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit war es, anhand evidenzbasierter, systematischer Aufarbeitung der bestehenden Literatur zu ermitteln, ob die Durchführung einer Meta-Analyse zu folgenden Fragestellungen möglich ist und diese gegebenenfalls durchzuführen:

1. Wie hoch liegt die weltweit anhand der Literatur geschätzte Prävalenz von Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken?
2. Gibt es Spezies- oder Rasseprädispositionen?
3. Sind kastrierte männliche Tiere häufiger betroffen als intakte Böcke?
4. Welche Operationsmethode verspricht den besten Erfolg?

Hierfür wurde eine umfangreiche Literaturrecherche der Datenbanken des Hessischen Bibliotheks- und Informationssystems (HeBIS), PubMed, Medline (OvidSP) und des Web of Science durchgeführt. Dies erfolgte für jede Fragestellung in getrennten Literatursuchen. In die jeweilige Recherche einbezogen wurden Texte, welche sich mit der Spezies Schaf und / oder Ziege befassten. Artikel, die das Auftreten von Urolithiasis bei weiblichen Schafen oder Ziegen zur Thematik hatten, wurden nicht berücksichtigt. Es wurden ausschließlich deutsch- oder englischsprachige Artikel ausgewertet, welche entweder in elektronischer Form oder aber als Druckausgabe in einer der an das Universitätsbibliothekssystem angeschlossenen Archive erhältlich waren. Nach abgeschlossener Literatursuche und Import der Titel in das Literaturverwaltungsprogramm Citavi (Version 5; Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz) wurde etwaig doppelt erfasste Literatur automatisch entfernt. Anschließend wurden die Referenzen nach der Aussagekraft zur entsprechenden Fragestellung gesichtet und je nach vorliegender Fallzahl gewichtet. In den Literaturstellen nicht explizit angegebene Daten (beispielsweise die Prävalenz in Prozent) wurden soweit möglich aus vorliegenden Daten berechnet und in die Analyse miteinbezogen.

Lagen genügend als relevant eingestufte Literaturstellen vor, so wurde zur Überprüfung der Homogenität für zweidimensionale Fragestellungen das statistische Verfahren des χ^2-Tests durchgeführt. Beim Vorliegen nicht homogener Studien wurde eine zusammenfassende gemeinsame Punktschätzung mit Angabe der 95%-Konfidenzgrenzen vorgenommen.

Bezüglich der Evaluation der Erfolgsraten der beim kleinen Wiederkäuer angewandten Operationstechniken wurde die Meta-Analyse mithilfe des Software-Programms R (Version

3.4.1) (R Core Team, 2017) und dem R-Paket meta (Version 4.9-0) (Schwarzer, 2007) am Institut für medizinische Informatik der JLU Gießen durchgeführt. Dieses Programm ist ein kostenfrei zur Verfügung stehendes Software Produkt, welches statistische Analysen und graphische Darstellungen ermöglicht. Für den Heterogenitätsgrad gibt dieses Programm die Prüfgrößen I^2 nach Higgins/Thompson (Higgins et al., 2003) sowie τ^2 nach DerSimonian und Laird (1986) aus.

Ad 1) Für die Bearbeitung der ersten Fragestellung (Prävalenz von Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken) wurden folgende Suchbegriffe verwendet (#1 UND #2 UND #3):

a. Incidence ODER epidemiology ODER occurrence ODER prevalence
b. Sheep ODER goat ODER goats ODER “small ruminant” ODER “small ruminants” ODER ruminant ODER ruminants
c. Urolithiasis ODER “urinary stone” ODER “urinary stones” ODER “urinary calculi”

Ad 2) Für die Bearbeitung der zweiten Fragestellung (Rasse- bzw. Speziesprädisposition für Urolithiasis) wurden folgende Suchbegriffe verwendet (#1 UND #2 UND #3 UND #4)

a. Predisposition ODER “genetic predisposition” ODER inheritance
b. Breed ODER breeds ODER species
c. Sheep ODER goat ODER goats ODER “small ruminant” ODER “small ruminants” ODER ruminant ODER ruminants
d. Urolithiasis ODER “urinary stone” ODER “urinary stones” ODER “urinary calculi”

Ad 3) Die Recherche zu der Frage nach einer gehäuften Harnstein-Erkrankung kastrierter Böcke erfolgte mittels folgender Suchbegriffe:

a. castration ODER castrated ODER castrate ODER neuter ODER spay ODER desex ODER sterilize ODER sterilized
b. male ODER wether ODER mutton ODER ram ODER "sexually intact" ODER testosterone
c. sheep ODER goat ODER goats ODER "small ruminant" ODER "small ruminants" ODER ruminant ODER ruminants
d. urolithiasis ODER "urinary stone" ODER "urinary stones" ODER "urinary calculi"

Ad 4) Zur Ermittlung der Erfolgsraten der beschriebenen Operationsmethoden wurden zur Literaturrecherche folgende Suchbegriffe verwendet:

a. surgery ODER operation ODER technique
b. "success rate" ODER "success rates" ODER outcome
c. sheep ODER goat ODER goats ODER "small ruminant" ODER "small ruminants" ODER ruminant ODER ruminants
d. urolithiasis ODER "urinary stone" ODER "urinary stones" ODER "urinary calculi"

Die Literaturrecherche für alle Fragestellungen erfolgte im Januar 2018.

Abschnitt 2 – Sonographie der Urethra

Die sonographischen Untersuchungen der Harnröhre wurden an insgesamt 34 männlichen Schlachtlämmern der Rassen Lacaune und Ostfriesisches Milchschaf durchgeführt. Die Tiere wurden im Alter von 14-21 Tagen zugekauft und in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen eingestallt. Die Tierhaltung erfolgte in nach §11 Tierschutzgesetz-akkreditierten Boxen (Boxennummern 21-24) in Gruppen bis zu fünf Tieren auf einer Fläche von 11,3 m2 auf Stroh. In den Boxen standen den Lämmern jeweils Heu und frisches Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Aufzucht der Lämmer erfolgte mit Milchaustauscher (CombiMilk®; Agravis Raiffeisen, Münster und Hannover) und Kraftfutter (LammGold®, Raiffeisen RWZ, Köln) in sinkender beziehungsweise steigender Menge. Eine detaillierte Auflistung zur Gewichtsentwicklung und Größenzunahme findet sich in Tabelle 1.

Die Bocklämmer wurden bei Einstallung und hiernach täglich klinisch untersucht und anschließend per Losverfahren auf 3 Gruppen (Frühkastration K1, Spätkastration K2 und Kontrollgruppe K0) randomisiert. Die Tiere der Gruppe 1 (K1; n = 11) wurden nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase chirurgisch kastriert. Bei den Böcken der Gruppe 2 (K2; n = 11) erfolgte die Kastration im Alter von fünf Monaten. Die Gruppe 3 (K0; n = 12) diente als Kontrollgruppe und wurde nicht kastriert.

Tabelle 1: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen (s) zu den Parametern Gewichtsentwicklung (kg Körpergewicht), Scheitel-Steiß-Längen (SSL) sowie mittlere Rückenhöhe (RH) aller Lämmer ohne Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit. In Teilen publiziert in AlLugami et al. (2017). Alle Lämmer wurden in regelmäßigen Abständen gewogen und die SSL sowie RH wurde ermittelt. Die täglichen Zunahmen wurden für den Zeitraum von 99 Tagen (4 Monate- 3 Wochen) berechnet.

Alter	Mittleres KGW in kg	s	Mittlere SSL in cm	s	Mittlere RH in cm	s
3 Wochen	10,8	2,7	64,5	4,8	46,7	2,8
1 Monat	13,1	3,1	*	*	*	*
3 Monate	20,3	4,0	*	*	*	*
4 Monate	32,9	4,3	90,4	5,4	62,4	3,8
Differenzen im Zeitraum 3 Wochen bis 4 Monate	22,1	1,6	25,9	0,6	15,7	1,0
Mittlere tägliche Zunahme	0,223	0,02	0,26	0,006	0,16	0,01

Die chirurgische Kastration erfolgte als bedeckte Kastration mittels Kappenschnitt und doppelter Ligatur der Ductus seminiferes bzw. Plexus pampiniformes. Hierfür wurden die Lämmer gewogen und anschließend nach Gewicht mittels Xylazinhydrochlorid 2 % (Xylazin 20 mg/ml®, Serumwerk Bernburg) und Ketamin 10% (Ketamin 100 mg/ml®, CP Pharma) anästhesiert und intubiert. Das Narkosestadium wurde durch Inhalation mit Isofluran (Isofluran CP®, CP Pharma) aufrechterhalten. Die lokale Anästhesie des Samenstranges wurde mit Procainhydrochlorid (Procasel®, Selectavet) durchgeführt. Als Begleittherapie erhielten die Lämmer Amoxicillin (Betamox®, Bayer Vital GmbH) über 3 Tage s. c. sowie eine zweimalige Behandlung mit Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim) s. c. im Abstand von 24 Stunden. Die Applikation von Tetanusserum (Tetanusserum®, WDT) erfolgte einmalig in einer Dosierung von 3 ml pro Lamm s. c. vor Operationsbeginn (Bauer et al., 2018).

Zur Kastration wurden die Lämmer in rechter Seitenlage auf einem hydraulischen Operationstisch positioniert und die linke Hintergliedmaße wurde vorsichtig in abduzierter Position fixiert. Das Operationsfeld im Skrotalbereich wurde rasiert, mittels Alkohol entfettet und jodiert. Die Kastration erfolgte nach Kappenschnitt und Eröffnung des Skrotums durch Ligatur der Ductus deferentes in der Tunica vaginalis und Absetzen der beiden Hoden.

Alle Bocklämmer wurden dreimal sonographisch untersucht: im Alter von 4-5 Wochen, mit 4-5 Monaten und vor der Schlachtung mit 6 Monaten.

Die sonographische Darstellung der Urethra erfolgte mit Hilfe des Toshiba aplio XG (Toshiba Medical Europe, Zoetermeer, Niederlande) durch transkutane Ultrasonographie mittels eines 12 MHz-Linearschallkopfes. Für die Vermessung des Urethrallumens wurden fünf

Lokalisationen definiert (Abb. 3): Die Glans penis (Position 1), der distale Anteil der peninen Urethra (Position 2), die distale Flexura sigmoidea (Position 3), proximal der Flexura sigmoidea (Position 4) und an der Umschlagstelle der Urethra am Arcus ischiadicus (Position 5). Auf eine Darstellung der pelvinen Harnröhre wurde aus Tierschutzgründen verzichtet, da die Einführung einer Rektalsonde insbesondere bei den Lämmern im Alter von 4-5 Wochen als zu invasiv eingestuft wurde.

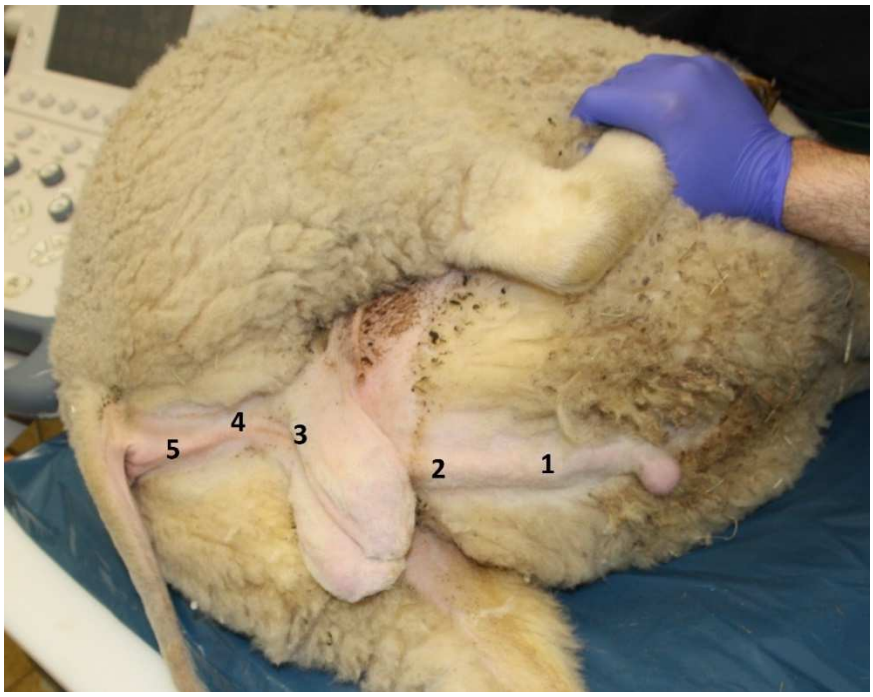


Abb. 3: Darstellung der fünf Lokalisationen zur Untersuchung der Urethra am Schaflamm in linker Seitenlage. Zu beachten ist, dass sich die Glans penis (1) im nicht ausgeschachteten Zustand des Penis ca. 10 cm innerhalb des Präputiums befindet. Der Penisteil der Urethra (2), die distale (3) und proximale (4) Flexur sowie die Umschlagstelle der Urethra am Arcus ischiadicus (5) sind markiert.

Alle Untersuchungen erfolgten am nicht sedierten Tier in linker Seitenlage. Hierfür wurden die Lämmer durch zwei Hilfspersonen vorsichtig auf einem gepolsterten Untersuchungstisch abgelegt und locker fixiert. Die hier verwendete Untersuchungstechnik wurde bereits vorab publiziert (AlLugami et al., 2017). Um eine möglichst gute Anbindung der Sonde zu erreichen, wurden die Lämmer im Bereich des Unterbauches sowie kaudal des Scrotums vorsichtig geschoren (Abb. 3). Anschließend wurde Ultraschall-Kontaktgel auf die Haut sowie den Schallkopf aufgetragen. Während der Untersuchung wurde ein möglichst sanfter, gleichmäßiger Andruck des Ultraschallkopfes eingehalten, um gleichmäßige Untersuchungsergebnisse zu erzielen. Durch die möglichst sanfte Ankopplung sollte eine

Kompression des Urethrallumens vermieden werden. Die Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Untersuchungen erfolgte im Rahmen von Vorversuchen. Die eigentlichen sonographischen Untersuchungen an den Lämmern sowie die anschließenden Auswertungen der Ultraschallbilder erfolgten durch zwei unabhängige Untersucher. Durch diese Doppeluntersuchung sollte der Einfluss des Untersuchers auf das Untersuchungsergebnis bestimmt werden (Inter-Observer-Validität). Die Auswertung der Ultraschallbilder erfolgte durch Vermessen des Urethrallumens mit Hilfe der Messfunktion im Programm easyImage® (easyVet, softguide GmbH, Hannover).

Die Kastration der Bocklämmer sowie die sonographischen Untersuchungen wurden der zuständigen Behörde vor Beginn der Untersuchungen zur Bewertung vorgelegt. Das Vorhaben wurde von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) als nicht anzeige- oder genehmigungspflichtig eingestuft.

Abschnitt 3 – Immunhistochemische Untersuchungen

Fragestellungen bzw. Ziele der Untersuchungen

Zystitiden werden häufig im Zusammenhang mit dem Auftreten von Harngries oder aber dem Vorhandensein von Urolithen gesehen. Da Zystitiden wiederum meist als aufsteigende Infektionen des Urogenitaltraktes entstehen, liegt die Vermutung nahe, dass bei Patienten mit Urolithiasis eine im Vergleich zum Gesunden veränderte lokale Immunabwehr vorliegt. Unter der Voraussetzung, dass kastrierte Schafböcke tatsächlich häufiger an Urolithiasis erkranken als intakte Kontrolltiere, könnte dies ebenfalls mit einer veränderten lokalen Immunabwehr im Präputialbereich bzw. des Urothels in der distalen Urethra einhergehen. Das Ziel der eigenen Untersuchungen ist es daher, mögliche Unterschiede bezüglich der lokalen Immunabwehr anhand des immunhistochemischen Nachweises von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten im Urethralgewebe und der Präputialschleimhaut zu untersuchen.

Probenentnahme

Die Proben für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden entsprechend der im Rahmen der Sonographie untersuchten fünf Lokalisationen (Glans penis, Pars penina urethrae, distale und proximale Flexura sigmoidea und Flexura ischiadica) entnommen (Abb. 4). Zusätzlich wurde jeweils eine Probe der Präputialschleimhaut gewonnen. Die Urethraproben wurden zur Orientierung der Ausrichtung (kranial oder kaudal) mit Hilfe eines kranial am Gewebestück angebrachten Nahtmaterials markiert (Abb. 5).

Zusätzlich zu den 34 Schlachtlämmern, welche für die sonographische Untersuchung der Urethra verwendet wurden, wurden 8 Böcke mit bestehender Urolithiasis beprobt. Es handelte sich hierbei um Tiere im Alter zwischen 4,5 Monaten und 13 Jahren. Während der 13-jährige Bock kastriert war und aus einer Hobbyhaltung stammte, waren die übrigen sieben Böcke intakt und gehörten den Rassen Merino Landschaf oder Rhönschaf an.

Die Tiere wurden entweder im Rahmen der tierärztlichen Behandlung aufgrund infauster Prognose euthanasiert oder entstammten dem Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

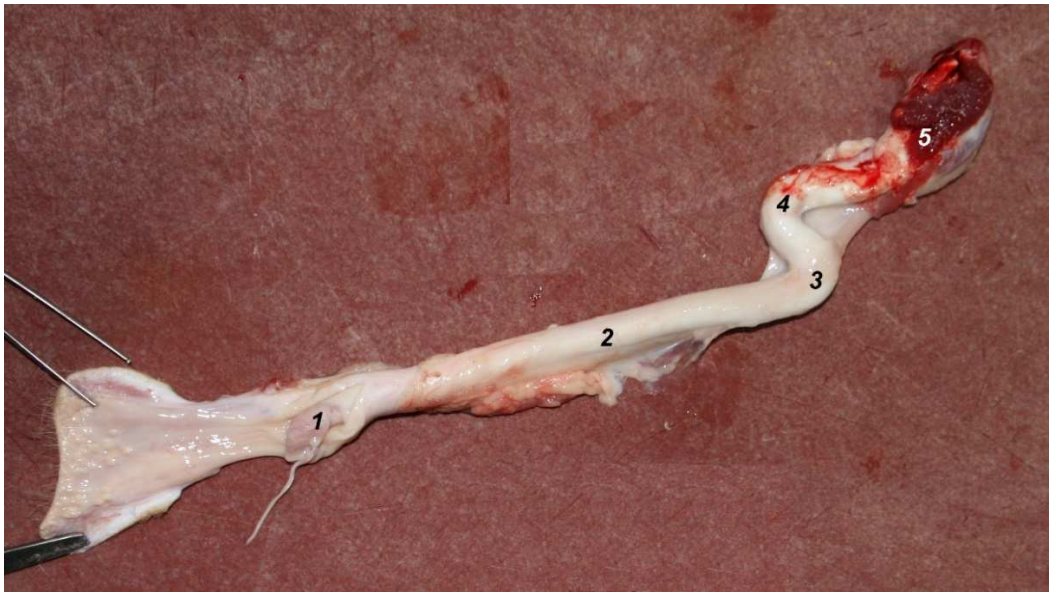


Abb. 4: Lokalisation der Proben-Entnahmestellen: 1 = Glans penis; 2 = Pars penina urethrae; 3 = distale Flexura sigmoidea; 4 = proximale Flexura sigmoidea, 5 = Urethra im Bereich der Flexura ischiadica.

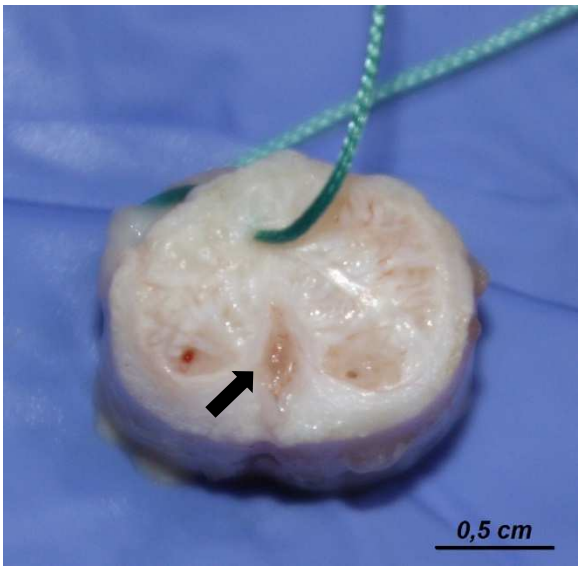


Abb. 5: Probenentnahme: Penis im Querschnitt; das Nahtmaterial markiert die kraniale Schnittfläche, der Blockpfeil die Urethra.

Fixierung der Proben

Die für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen benötigten Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen und in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert (immunhistochemische und histomorphometrische Untersuchungen). Nach Abschluss der Fixierung (24 h Formalin; Aufbewahrung im Kühlschrank) erfolgte ein gründliches Waschen der Probenstücke in PBS (6 Spülungen) mit anschließendem Überführen der Gewebeproben in 70 % Ethanol.

Nach entsprechender weiterer Aufarbeitung der Proben wurden die Gewebestücke für die histologischen Untersuchungen in Paraffin eingebettet und für die jeweiligen immunhistochemischen Färbungen in einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten und auf APES-beschichtete Objektträger verbracht.

Untersuchungsmethoden

Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung erfolgte im Institut für Veterinärpathologie mit Hilfe des automatischen Färbesystems Thermo Scientific Microm HMS 740 Robot Stainer (Fisher Scientific GmbH; Schwerte). Die als Übersichtsfärbung angewendete HE-Färbung nutzt die Reaktion des basischen Farbstoffes Hämatoxylin mit sauren Zellbestandteilen sowie des sauren Farbstoffes Eosin mit basischen Zellanteilen. Dies führt zu einer Blaufärbung der Zellkerne und zu einer Rotfärbung des Zellplasmas sowie kollagener Fasern.

Histomorphometrie an HE gefärbten Schnitten

Die Vermessung des Urethrallumens erfolgte mit Hilfe der Messfunktion des Programms Adobe Photoshop® (Adobe Systems Software, Dublin, Ireland) an digitalisierten Aufnahmen der Urethra. Die Urethra wurde hierfür bei 10-facher Vergrößerung dargestellt und die Fläche innerhalb der Mucosafalten der Urethra mittels Grafiktablett markiert und vermessen. Diese Auswertung erfolgte an mittels HE gefärbten Urethra-Schnitten aller fünf Lokalisationen wie oben beschrieben.

Die Vermessung des Urothels erfolgte ebenfalls mit der Software Photoshop. Hierbei wurde die Fläche des Urothels als Differenz aus Gesamtfläche und Fläche des Urethrallumens bestimmt.

Zur Ermittlung möglicher Beziehungen zwischen Urethralfläche und Epithelfläche wurden die Quotienten aus diesen beiden Messgrößen gebildet.

Immunhistochemie

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Verfahren stellen einen indirekten Nachweis des zu detektierenden Epitopes dar. Der jeweils spezifische Primärantikörper bindet hierbei an das nachzuweisende Peptid. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird durch Bindung eines evtl. biotinylierten Sekundärantikörpers oder mittels Bindung eines Meerrettich-Peroxidase-Systems in Verbindung mit einer enzymatischen Farbreaktion (PAP- bzw. ABC/DAB-Reaktion oder HRP/DAB-Reaktion) sichtbar und somit auswertbar gemacht. In indirekten immunhistochemischen Nachweisverfahren ist anstelle enzymatischer Farbreaktionen der Einsatz fluoreszierender Sekundärantikörper ebenfalls möglich. Diese Methode kam hier jedoch nicht zum Einsatz.

Verwendete Antikörper und Kontrollen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen gegen CD 3 (T-Zell-Marker), CD 79α (B-Zell-Marker), MAC 387 (Makrophagen-Marker), Substanz P, Vasoaktives Intestinales Polypeptid sowie gegen Neurofilamente (Gesamtnervenfaser-Marker) durchgeführt. Die Angaben zu den verwendeten Antikörpern inklusive der jeweiligen Verdünnungen und Nachweismethoden sind in Tabelle 2 ersichtlich. Die Protokolle zu den einzelnen Färbungen finden sich im Anhang.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Spezies	Verdünnung
Anti-CD 3	Dako	Kaninchen	1:50
Anti-CD 79	Acris	Maus	1:100
Anti-MAC 387	Dako	Maus	1:1000
Anti-SP	Bio rad	Ratte	1:100
Anti-VIP	Bio rad	Kaninchen	1:50
Anti-NF	Dako	Maus	1:400

In jeder Färbung wurden Positiv- sowie Negativkontrollen mitgeführt. Die Positivkontrollen (Abb. 6, 8, 10, 12, 14 und 16) bestanden hierbei aus Schafgewebe (Darm, Gehirn, Rückenmark), welches die jeweilige nachzuweisende Substanz bzw. die entsprechende Zelle sicher enthielt. Im Falle der Negativkontrollen (Abb. 7, 9, 11, 13, 15 und 17) wurde der Primärantikörper der Reaktion durch ein Ersatzprotein ersetzt.

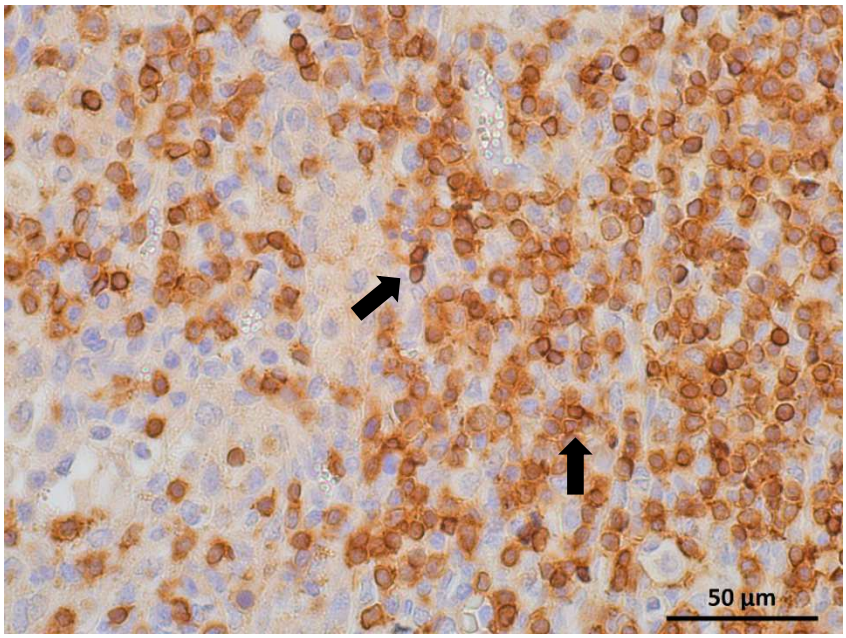


Abb. 6: Positivkontrolle für CD 3 im Lymphknoten des Schafes. Deutliche Anfärbungen der CD 3-IR-positiven T-Zellen (Blockpfeile).

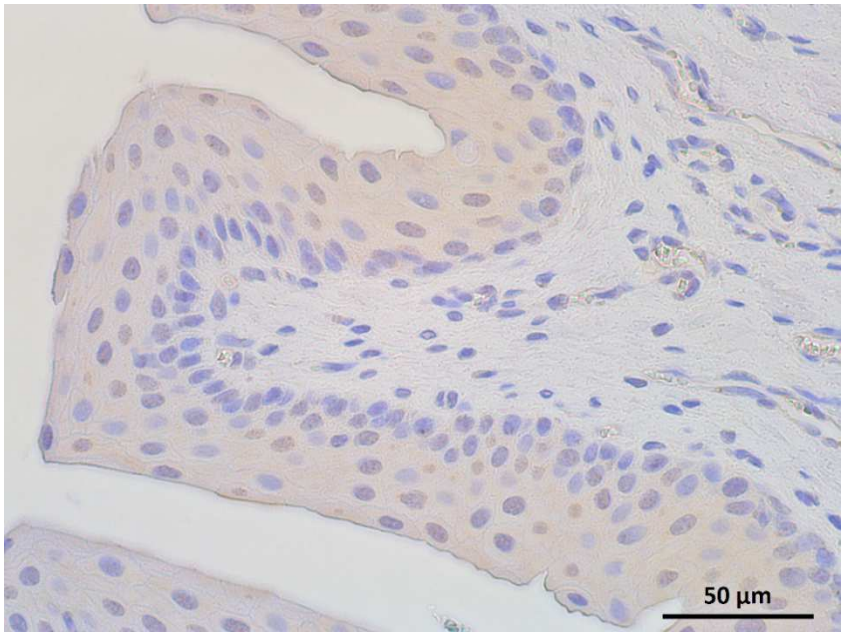


Abb. 7: Negativkontrolle für CD 3 (Ersatz des Primärantikörpers durch Ersatzprotein) an der Urethra eines Lammes. Der Sekundärantikörper wurde wie im Protokoll vorgesehen aufgetragen.

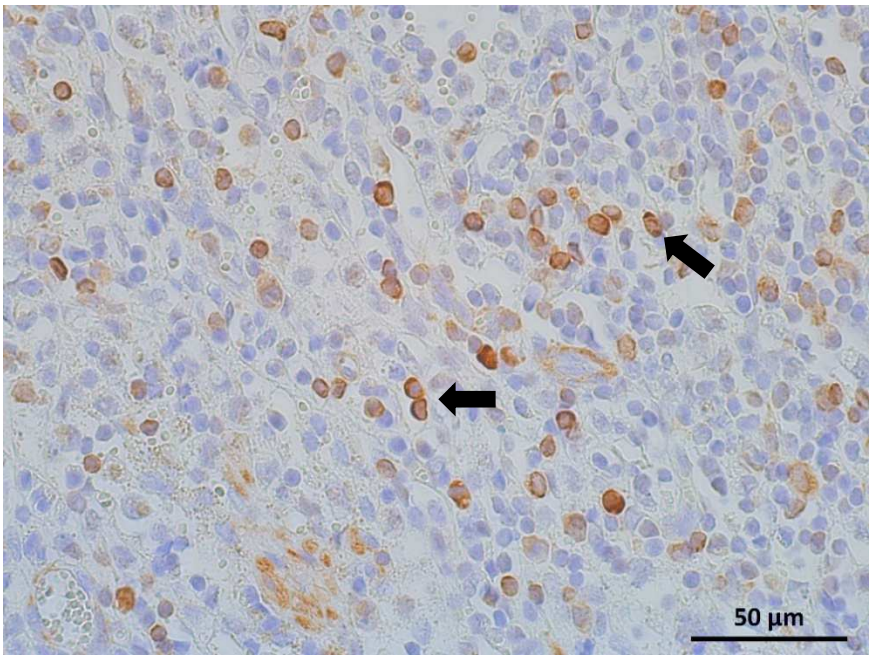


Abb. 8: Positivkontrolle für CD 79α im Lymphknoten des Schafes. Deutliche Anfärbungen der CD 79α-IR Zellen (Blockpfeile).

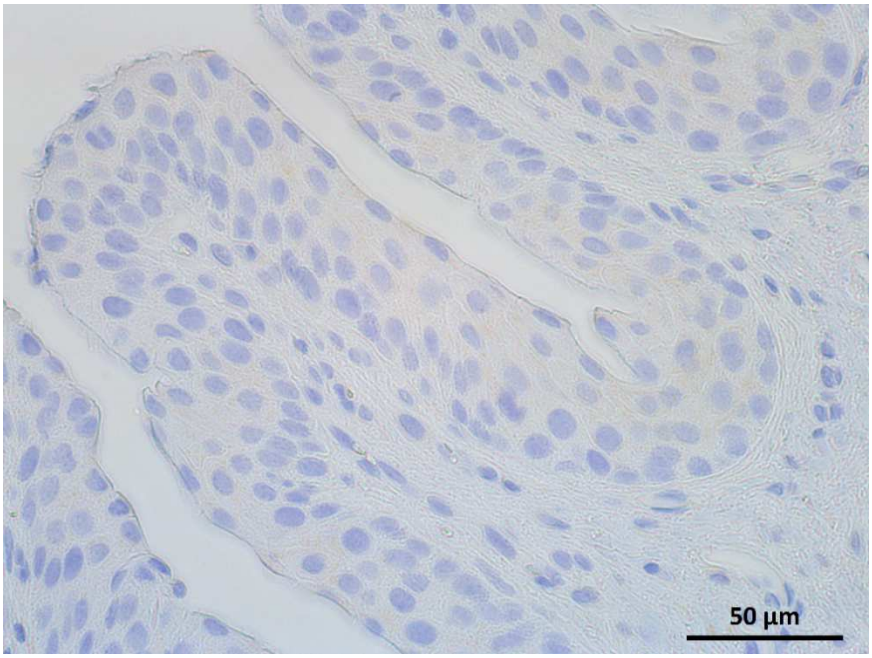


Abb. 9: Negativkontrolle für CD 79α (Ersatz des Primärantikörpers durch Ersatzprotein) an der Urethra eines Lammes. Der Sekundärantikörper wurde wie im Protokoll vorgesehen aufgetragen.

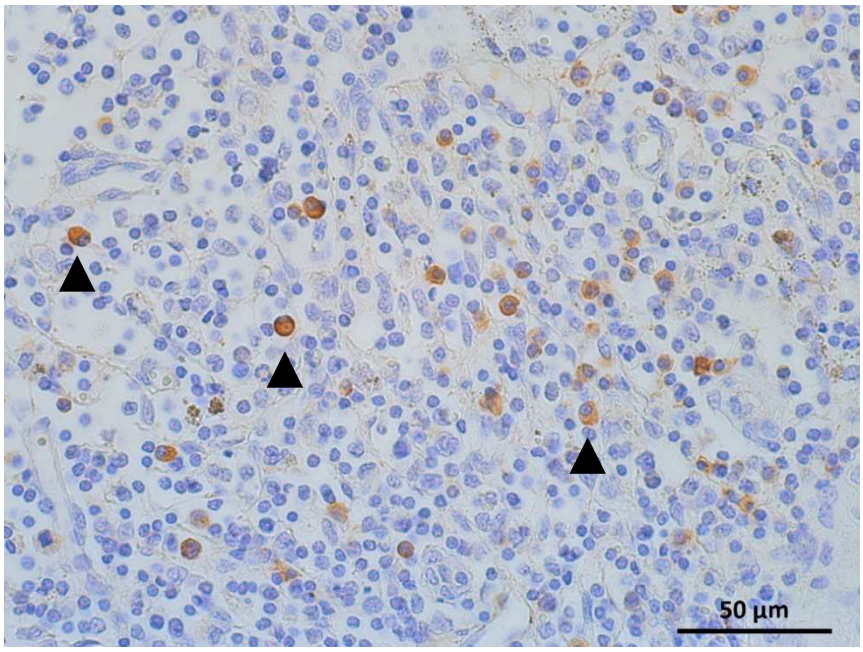


Abb. 10: Positivkontrolle für MAC 387 am Lymphknoten des Schafes. IR-positive MAC 387-Zellen sind durch Pfeilspitzen markiert.

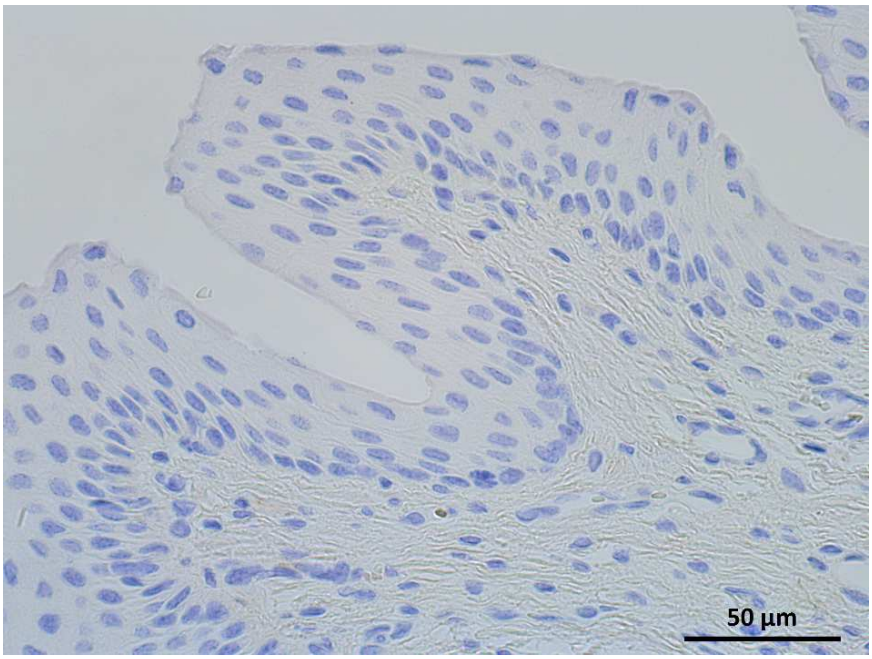


Abb. 11: Negativkontrolle für MAC 387 (Ersatz des Primärantikörpers durch Ersatzprotein) an der Urethra eines Lammes. Der Sekundärantikörper wurde wie im Protokoll vorgesehen aufgetragen.

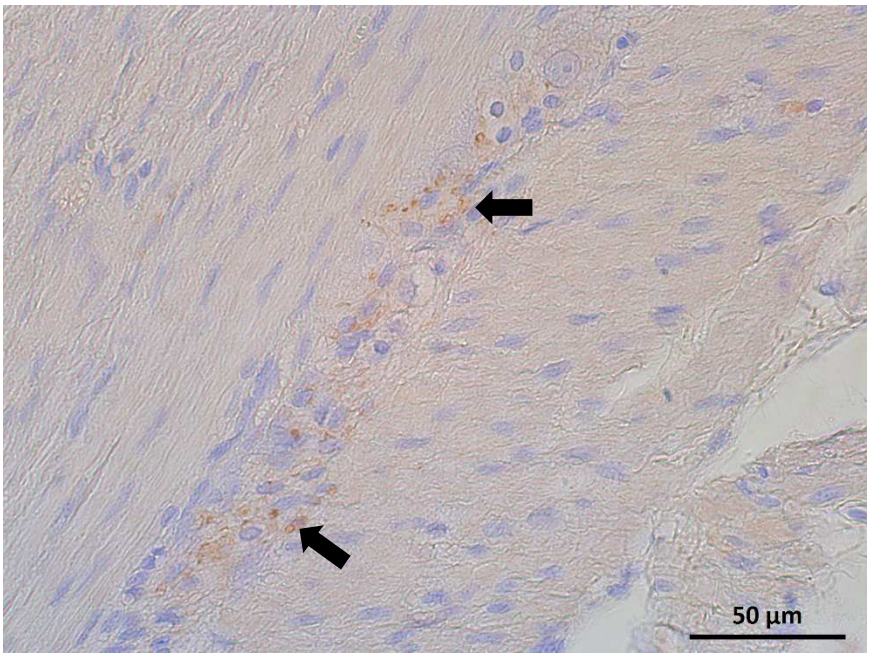


Abb. 12: Positivkontrolle für Substanz P am Darm des Schafes. IR-positive Anfärbungen von Neuropeptidgranula in Nervenfasern eines Ganglions zwischen Stratum longitudinale und Stratum circulare der Tunica muscularis sind durch Blockpfeile markiert.

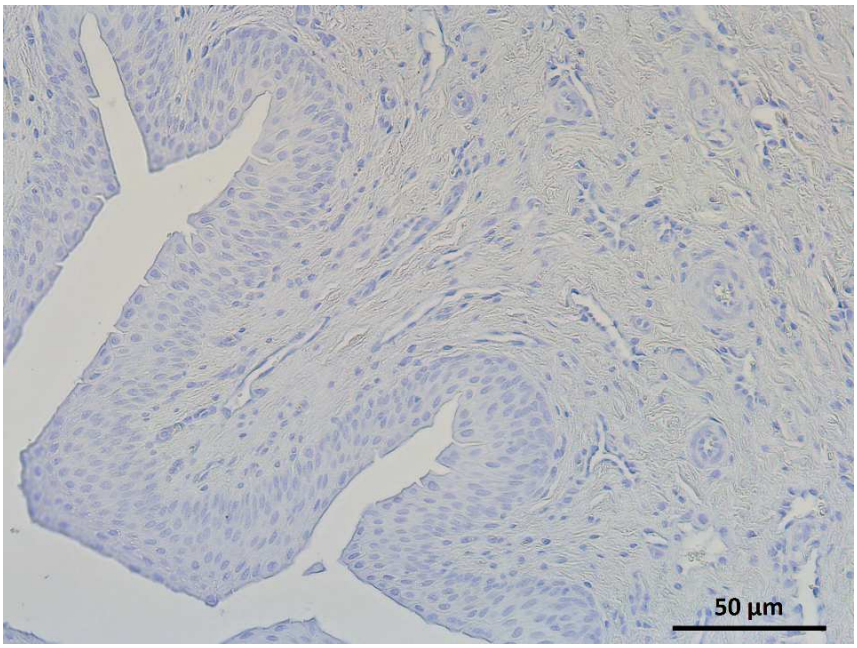


Abb. 13: Negativkontrolle für Substanz P (Ersatz des Primärantikörpers durch Ersatzprotein) an der Urethra eines Lammes. Der Sekundärantikörper wurde wie im Protokoll vorgesehen aufgetragen.

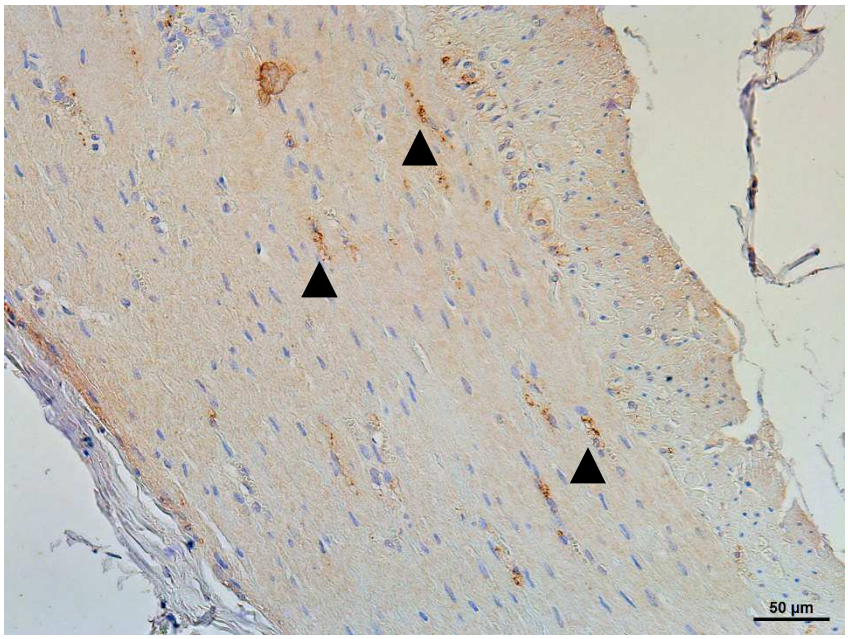


Abb. 14: Positivkontrolle für VIP am Darm des Schafes. IR-positive Anfärbungen von Neuropeptidgranula in Nervenfasern des Stratum longitudinale und Stratum circulare der Tunica muscularis (Pfeilspitze).

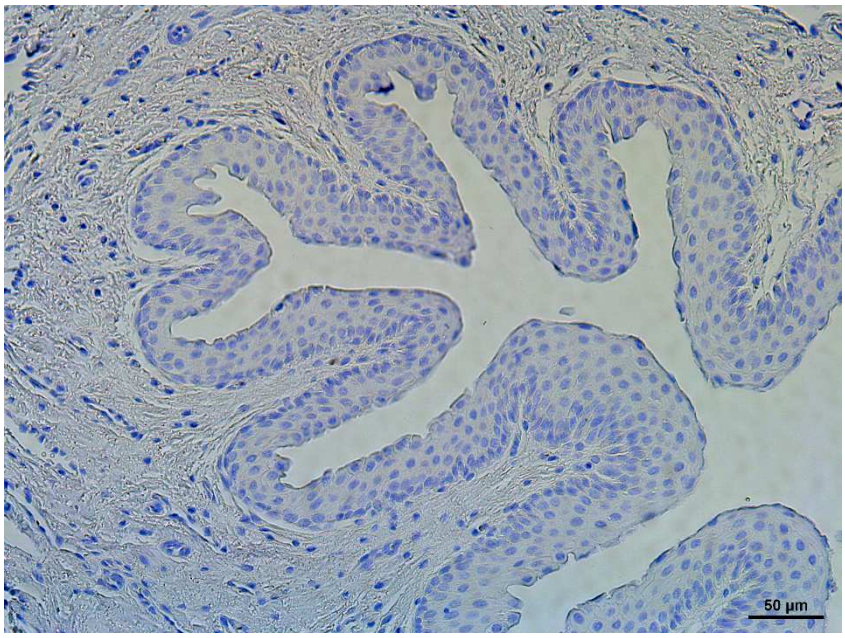


Abb. 15: Negativkontrolle für VIP (Ersatz des Primärantikörpers durch Ersatzprotein) an der Urethra eines Lammes. Der Sekundärantikörper wurde wie im Protokoll vorgesehen aufgetragen.

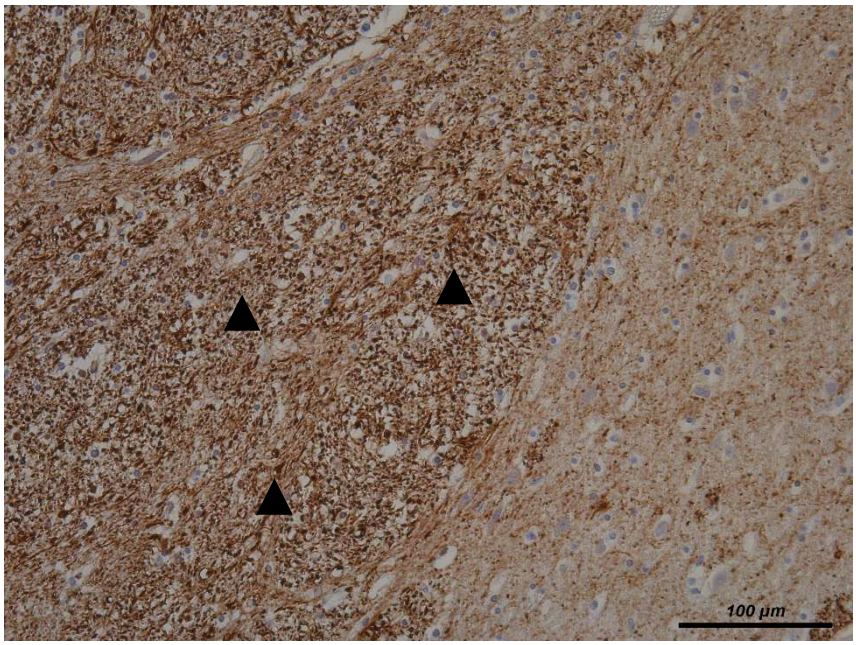


Abb. 16: Positivkontrolle für Neurofilament am Gehirn des Schafes. Deutlich erkennbare IR-positive Anfärbungen von Nervenfasern (Pfeilspitzen).

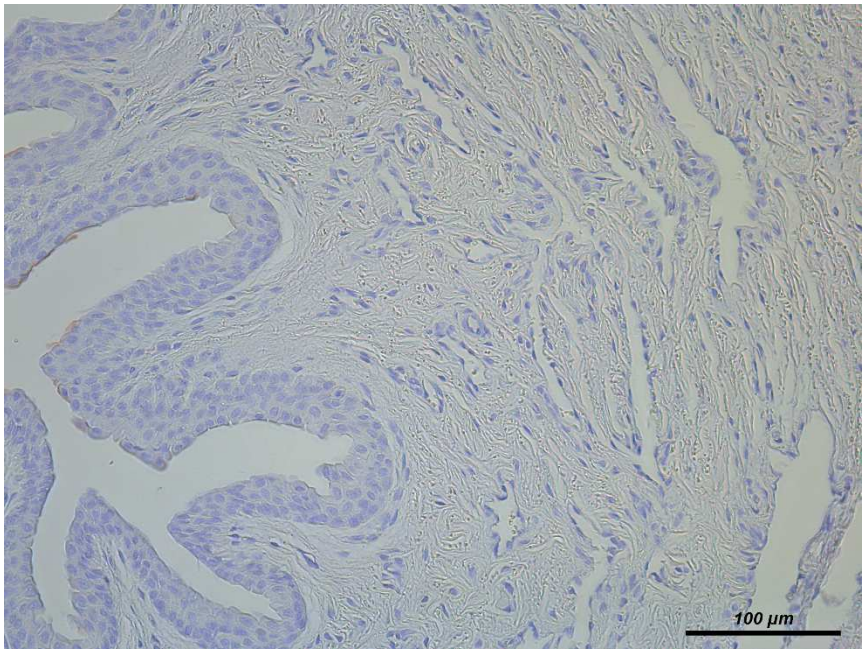


Abb. 17: Negativkontrolle für Neurofilament (Ersatz des Primärantikörpers durch Ersatzprotein) an der Urethra eines Lammes. Der Sekundärantikörper wurde wie im Protokoll vorgesehen aufgetragen.

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Generell wurde zur qualitativen sowie zur quantitativen Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen ein Lichtmikroskop inklusive Kameraeinheit der Firma Leica verwendet (Leica DMR; Fa. Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar). Nach Sichtung der Gewebeschnitte erfolgte zur weiteren Auswertung die digitale Erfassung von jeweils fünf Bildausschnitten mit einer jeweiligen Fläche von 234649,3 μm^2 bei einer 20-fachen Vergrößerung sowie von 58662,3 μm^2 bei einer 40-fachen Vergrößerung. Diese fünf Blickfelder wurden jeweils im Uhrzeigersinn um die Urethra angelegt, wobei stets bei 12 Uhr begonnen wurde und der Abstand zwischen den Bildausschnitten ca. 72° betrug (Abb. 18). Innerhalb dieser fünf digital erfassten Blickfelder wurde die jeweilige Zielstruktur (B- oder T-Zellen, Makrophagen, Neuropeptid-IR-Areale oder Nervenfasern) analysiert und zur statistischen Auswertung zu einer Summe zusammengefasst.

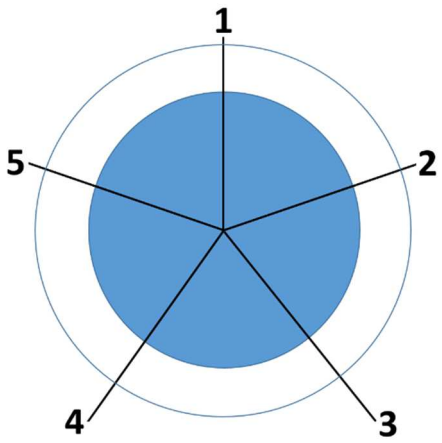


Abb. 18: Anordnung der fünf Blickfelder zur digitalen Erfassung der Ergebnisse der Immunhistochemie. Bei der Aufnahme der digitalen Bilder wurde darauf geachtet, dass sich die Bildausschnitte nicht überlappten.

Färbungen auf CD 3-IR-positive T-Zellen

Im Falle der immunreaktiven Anfärbung lokal im Gewebe befindlicher T-Zellen wurden diese mittels Zählwerkzeug des Softwareprogrammes Adobe Photoshop® (Adobe Systems Software, Dublin, Irland) ausgezählt und für die weitere statistische Bearbeitung der Daten in einer Datentabelle zusammengefasst. Es wurden sowohl diejenigen IR-positiven Zellen gezählt, welche sich im Bereich des Urothels befanden als auch diejenigen, die in der Submukosa lokalisiert waren. Gleiches galt für die Anfärbungen des Präputiums entsprechend.

Färbungen auf CD 79α-IR-positive B-Zellen

Die immunhistochemisch auf CD 79α gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Softwareprogrammes Adobe Photoshop® (Adobe Systems Software, Dublin, Irland) gesichtet und analysiert. Das Vorgehen entsprach hierbei demjenigen wie unter CD 3 beschrieben.

Färbungen auf MAC 387-IR-positive Zellen (Makrophagen)

Die Analyse der auf MAC 387 gefärbten Gewebeschnitte erfolgte analog zu den Färbungen CD 3 und CD 79α.

Färbungen auf Substanz P, VIP und NF

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Zellen wurde für die Anfärbung der Neuropeptide Substanz P und VIP ein spezifischeres Mittel zur Analyse gewählt. Da sowohl Substanz P als auch VIP in mehr oder weniger großen Vesikeln innerhalb von Nervenfasern dargestellt werden, wurde für die Auswertung dieser Färbung mit Hilfe des Zauberstabwerkzeugs in Adobe Photoshop diejenige IR-positive Substanz P- bzw. VIP-Fläche in Relation zur Gesamtfläche des Bildausschnitts ermittelt und ebenfalls für die weitere Auswertung in einer Datentabelle zusammengefasst. Für den Gesamtnervenfaser-Marker NF wurde ebenso verfahren.

Abschnitt 4 – Modifikation bestehender Operationstechniken

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Operationstechnik ist es, bei Patienten mit diagnostizierter obstruktiver Urolithiasis eine frei durchgängige Urethra zu schaffen, ohne dass diese nach lateral eröffnet wird. Bei bisher in der Literatur beschriebenen und in praxi durchgeführten Operationsmethoden kommt es als Komplikation nach dem chirurgischen Eingriff häufig zu narbigen Verwachsungen und somit zu einer erneuten Einengung der Urethra. Die hier dargestellte Technik soll eine Eröffnung der Urethra unnötig machen. Nach Vorbereitung des Patienten für die Operation wird im Rahmen einer Laparotomie die Blase eröffnet, entleert und von allen erreichbaren Konkrementen befreit. Anschließend wird normograd über das Trigonum vesicae ein flexibles Endoskop in die Urethra eingeführt und unter Sichtkontrolle bis zur Obstruktionsstelle vorgeschoben. Dort befindliche Harnsteine werden über ein Dormiakörbchen in die Blase zurückgezogen und entfernt. Um eine narbige Verwachsung der Urethra an der ehemaligen Lokalisation des Steins oder der Steine zu verhindern, wird retrograd über den Processus urethralis oder ggf. nach Absetzen desselben ein Ballonkatheter bis in die Blase geführt. Um die Plica vesicalis urethrae überwinden zu können bedient man sich eines Führdrahtes, welcher antegrad über die Blase in die Urethra eingeführt und am Processus urethralis aus der Urethra ausgeführt wird. Der einzusetzende Ballonkatheter wird entlang dieses Führdrahtes bis in die Blase geschoben und dort per Ballon geblockt. Der Katheter verbleibt zur Sicherstellung des Harnflusses in der Urethra und kann nach etwa 5-7 Tagen entfernt werden.

Bevor eine Durchführung der Operationstechnik im Rahmen einer diagnostischen Urethroskopie an Klinikpatienten erfolgen kann, wird die Praktikabilität dieser Methode an drei gesunden Schlachtlämmern überprüft. Hierfür werden nach vorheriger Meldung dieses Vorhabens bei der zuständigen Tierschutzbeauftragten (JLU-Meldungsnummer 600_M) drei Schlachtlämmer angekauft und durch Injektion von Pentobarbital-Natrium (Release® 500 mg/ml; 100 mg/kg KGW i.v.) euthanasiert. Nach sicherem Eintritt des Todes (fehlende Reflexe und Sistieren der Herz- und Atemfunktion) werden die Lämmer für die Durchführung der Operationstechnik in Rückenlage auf einem Operationstisch ausgebunden. Die Lagerung der Tiere erfolgt in 45° Trendelenburg-Lage. Das Operationsfeld wird vorbereitet und eine paramediane Laparotomie etwa 2-3 cm rechts der Medianen und handbreit kaudal des Präputiums wird durchgeführt. Nach Freilegen der Blase wird diese mittels atraumatischer Klemme am Blasenpol fixiert, durch Zystozentese entleert und anschließend durch eine Stichinzision eröffnet. Über diese Inzisionsstelle wird ein flexibles Endoskop mit Arbeitskanal

(Broncho-Fiberskop 3 mm; Fa. Storz, Tuttlingen) in die Urethra eingebracht. Der Urethralverlauf kann mit Hilfe dieses Endoskopes in toto dargestellt werden. Über den Arbeitskanal der Optik wird ein Führdraht eingeschoben, welcher nach Entfernen des Endoskopes in der Urethra verbleibt und das Einführen eines Ballonkatheters über die Urethra bis in die Blase erlaubt.

Statistik

Analytische Verfahren und Meta-Analysen

Die statistischen Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der AG Biomathematik des Fachbereichs Veterinärmedizin sowie mit dem Institut für Medizinische Informatik des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Innerhalb der einzelnen Fragestellungen (geschätzte Prävalenz von Urolithiasis, Spezies- oder Rasseprädisposition, Prädisposition kastrierter Böcke und Erfolgsrate der verschiedenen Operationsmethoden) wurden die 95%-Konfidenzintervallgrenzen für die Urolithiasis-Prävalenzen der evaluierten Studien mit Hilfe des Programms Bias 9.08 berechnet (Ackermann, 2014). Im Anschluss wurde mit demselben Programm zur Überprüfung der Homogenität der χ^2-Test durchgeführt (Haldane, 1940). Im Falle von nicht vollständig homogenen Studien wurde mittels Konfigurationsfrequenzanalyse eine Bewertung der einzelnen Studien hinsichtlich ihrer Abweichung der Prävalenz von der Gesamtprävalenz in Bezug auf die relative Häufigkeit vorgenommen (Krauth und Lienert, 1973).

Bezüglich der Studien mit Verwendung verschiedener operativer Verfahren zur Therapie einer obstruktiven Urolithiasis wurde die Meta-Analyse mit Hilfe des Software Programmes R (Version 3.4.1) (R Core Team, 2017) und dem R-Paket meta (Version 4.9-0) (Schwarzer, 2007) durchgeführt. Hier erfolgten eine Abschätzung des Heterogenitätsgrades und das Ermitteln eines gemeinsamen gewichteten Schätzers zur Erfolgsrate als Effektmaß.

Sonographische Morphometrie

Die Daten aus den sonographischen Messungen wurden nach der allgemeinen deskriptiven Statistik zur Ermittlung des Einflusses der Zielgrößen Gruppe, Lokalisation und Zeitpunkt der Messung mittels einer 3-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung analysiert. Um den Einfluss des Untersuchers auf das Ergebnis der Messung zu bestimmen, wurden eine Korrelationsanalyse, ein globaler Mittelwertvergleich (t-Test für abhängige Stichproben) sowie

eine Bland-Altman-Analyse durchgeführt. Anhand dieser Auswertungen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen den Messergebnissen der Untersucher nachweisen?
2. Sind die ermittelten Messwerte im Mittel verschieden?
3. Hängt der Unterschied von der Höhe des gemessenen Wertes ab?

Histologische Morphometrie

Die statistische Auswertung mit dem Ziel des Vergleichs des Urethrallumens bzw. der Dicke des Urothels an den fünf untersuchten Lokalisationen zwischen den Gruppen wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse für die Lokalisationen getrennt voneinander durchgeführt. Aufgrund präparationsbedingt fehlender Werte in der Gruppe der Böcke mit Urolithiasis wurde diese Gruppe aus der Analyse ausgeschlossen und zur Auswertung der verbleibenden Daten eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Mit in diesen Vergleich einbezogen wurde der Quotient aus Urethral- und Urothelfläche.

Bei der Analyse der Daten fiel ein Bock durch hochgradig abweichende Urethralflächen an Lokalisation 4 (proximale Flexura sigmoidea) auf. Da sich im histologischen Bild das Urothel stark abgeflacht darstellte, wurde die Vermutung angestellt, dass es sich bei diesem Bock um eine während der Schlachtung artifiziell gedehnte Harnröhre handeln könnte. Wegen dieser starken Abweichung von den anderen gemessenen Werten (maximale Urethralfläche an Lokalisation 4 von 0,71 mm^2 vs. 0,24 mm^2) wurde der Bock mit der Ohrmarken-Endnummer 556 aus der Auswertung der histologischen Morphometrie ausgeschlossen.

Im Anschluss an den globalen Vergleich wurden paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppenpaaren (intakt vs. spätkastriert, früh- vs. spätkastriert und intakt vs. frühkastriert) mit anschließender Bonferroni Holm Adjustierung des Signifikanzniveaus durchgeführt. Die Signifikanzgrenzen lagen in den paarweisen Gruppenvergleichen bei $p < 0,017$; $p < 0,025$ und $p < 0,05$.

Immunhistochemie

Die Daten der immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst im Rahmen einer allgemeinen deskriptiven statistischen Datenbeschreibung gesichtet. Die Residualanalyse ergab hierbei, dass die Daten nicht normalverteilt waren. Daher folgte eine logarithmische bzw. (für den Parameter CD 3) eine Wurzeltransformation der Daten. Anschließend wurden zur Klärung der Frage nach eventuell bestehenden Gruppenunterschieden bezüglich der Parameter CD 3, SP, VIP und NF jeweils zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholung bezüglich der

Lokalisation durchgeführt. Aufgrund einzelner fehlender Werte kam der Wald-Test zum Einsatz. Hinsichtlich der Untersuchungen am Präputium der Böcke wurde entsprechend eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Hier wurde für den Parameter VIP der exakte Kruskal-Wallis-Test mit dem Software Paket StatXact (Cytel, Cambridge, USA) gerechnet (Mehta, 1991).

Um möglicherweise bestehende Korrelationen zwischen den Färbungen zu ermitteln wurden zusätzlich Korrelationsanalysen getrennt nach Gruppe und Lokalisation durchgeführt.

Ergebnisse

Abschnitt 1 – Meta-Analyse

1. Prävalenz der Urolithiasis bei Schaf- und/oder Ziegenböcken

Die Literaturrecherche zur Prävalenz der Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken ergab anhand der oben angegebenen Suchbegriffe insgesamt 235 Titel, welche in die weitere Literatursichtung einbezogen wurden. Nach Entfernen der anhand der Auswahlkriterien (Dubletten, Tierart, Sprache, Verfügbarkeit, Aussage zur Prävalenz von Urolithiasis etc.) definierten Publikationen verblieben 24 Literaturstellen in der Auswertung, welche im Anhang aufgelistet werden. Aufgrund der großen Variabilität der in den unterschiedlichen Studien durchgeführten Fütterungszusammensetzungen konnte allerdings keine direkte Vergleichbarkeit der Studien herbeigeführt werden, so dass lediglich annäherungsweise gleiche Fütterungsgruppen definiert werden konnten. Die Effektstärke der hier durchgeführten Prävalenzstudie war der prozentuale Anteil von Urolithiasisfällen an der Gesamttierzahl der einzelnen Versuche in den analysierten Studien. Vergleichbare Fütterungsverhältnisse konnten lediglich für eine Fütterung auf Hirse- und auf Maisbasis (18 Einzelversuche in vier verschiedenen Studien bzw. sechs Einzelversuche in fünf verschiedenen Studien) ermittelt werden.

Die 95 % Konfidenzgrenzen der einzelnen Studien wurden berechnet und sind in den folgenden Tabellen 3 und 5 ersichtlich. Die graphische Darstellung der kombinierten Auswertungen findet sich in den Abb. 19 und 20. Eine Übersicht über die Einstufung der Verzerrungsanfälligkeit (risk of bias) ist in den Tabellen 4 und 6 gegeben.

Tabelle 3: Übersicht über die in den einzelnen Studien angegebenen oder ermittelten Prävalenzen von Urolithiasis (Uro.) bei Hirse-dominierter Fütterung unter Angabe der 95 % Konfidenzintervallgrenzen in %.

Autor	Studie Nr.	Uro.	gesund	gesamt	Prävalenz in %	95 % KI in % untere / obere Grenze	
Crookshank et al.	27	194	43	237	82	76,3	86,5
Crookshank et al.	28	15	9	24	63	40,6	81,2
Crookshank et al.	29	13	11	24	54	32,8	74,4
Crookshank et al.	32	14	10	24	58	36,6	77,9
Crookshank et al.	33	1	18	19	21	0	26
Crookshank et al.	36	2	17	19	11	1,3	33,1
Crookshank et al.	38	9	12	21	43	21,8	66
Crookshank et al.	39	9	12	21	43	21,8	66
Crookshank et al.	43	15	7	22	68	45,1	86,1
Davis et al.	51	8	3	11	73	39	94
Packett & Hauschild	116	9	7	16	56	29,9	80,2
Robbins et al.	118	15	9	24	63	40,6	81,2
Robbins et al.	119	13	11	24	54	32,8	74,4
Robbins et al.	123	4	15	19	21	6,1	45,6
Robbins et al.	126	2	17	19	11	1,3	33,1
Robbins et al.	128	9	12	21	43	21,8	66
Robbins et al.	129	9	12	21	43	21,8	66
Robbins et al.	133	15	7	22	68	45,1	86,1

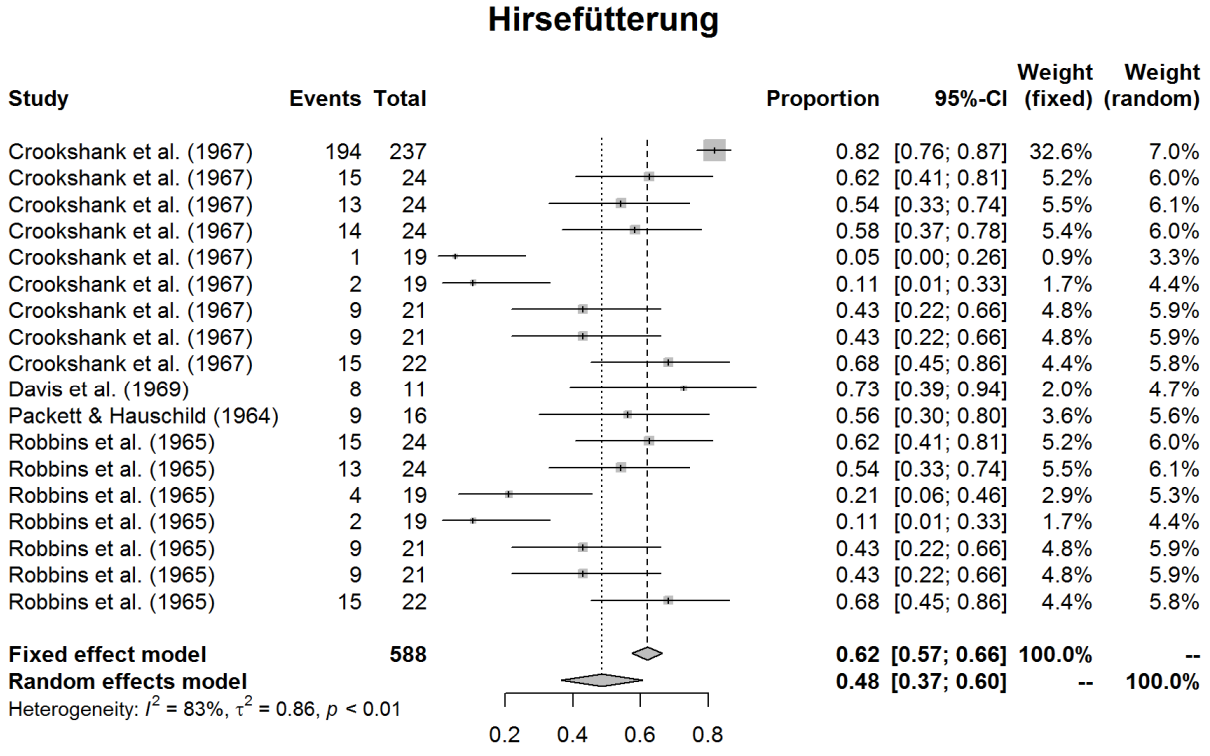


Abb. 19: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse hinsichtlich der Prävalenz von Urolithiasis bei Hirse-basierter Fütterung. Das Effektmaß ist der Anteil an Böcken, welche im Rahmen der einzelnen Studien Harnsteine entwickelt haben (Proportion). Innerhalb des Forest-plots aufgetragen sind diese Proportionen sowie das jeweilige 95 % Konfidenzintervall. Der gemeinsame geschätzte Effekt wird getrennt nach fixed effect und random effects Modell angegeben. Die Maßzahlen für den Heterogenitätsgrad (I^2 und τ^2) finden sich in der Abbildung unten links und deuten ein hohes Maß an Heterogenität an.

Tabelle 4: Übersicht über die Verzerrungsanfälligkeit der einzelnen Studien mit Hirse-basierter Fütterung im Hinblick auf die genannten Parameter. Die Elemente links stellen Studienkriterien dar, welche nach Einstufung der Autorin zu den entsprechenden Verzerrungsanfälligkeiten in der Spalte „Risk of Bias" führen. Wurde beispielsweise eine Randomisierung der Probanden im Versuch vorgenommen, so resultiert dies in einer geringen Verzerrungsanfälligkeit aufgrund der Zufälligkeit der Probandenauswahl. Können alle Probanden bis zum Ende des Versuchs beurteilt werden, besteht also kein Informationsverlust, so bedingt dies eine geringe Verzerrungsanfälligkeit hinsichtlich der Transparenz der verfügbaren Informationen. Das Risiko einer verzerrten Auswertungssicherheit besteht in eher geringem Maße, da kein Informationsverlust besteht und zumindest in 50 % der Studien eine Randomisierung der Probanden vorlag.

Studie	Element			Risk of Bias		
Nr.	***Randomisierung***	***Verblindung***	***Informationsverlust***	***Zufälligkeit der Auswahl***	***Auswertungssicherheit***	***Information***
27	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
28	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
29	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
32	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
33	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
36	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
38	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
39	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
43	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
51	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
116	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
118	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
119	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
123	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
126	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
128	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
129	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering
133	nein	nicht genannt	nein	hoch	gering	gering

Tabelle 5: Übersicht über die in den einzelnen Studien angegebenen oder ermittelten Prävalenzen von Urolithiasis bei Mais-dominierter Fütterung unter Angabe der 95 % Konfidenzintervallgrenzen in % siehe oben

Autor	Studie Nr.	Uro.	gesund	gesamt	Prävalenz in %	95% KI in % untere / obere Grenze	
Bushman et al. (1964)	2	0	14	14	0	0	19,3
Bushman et al. (1965)	18	0	19	19	0	0	14,6
Hoar et al.	66	4	26	30	13	3,8	30,7
Huntington et al.	74	1	29	30	3	0	17,2
Packett & Hauschild	117	7	11	18	39	17,3	64,3
Sato & Omori	135	0	6	6	0	0	39,3

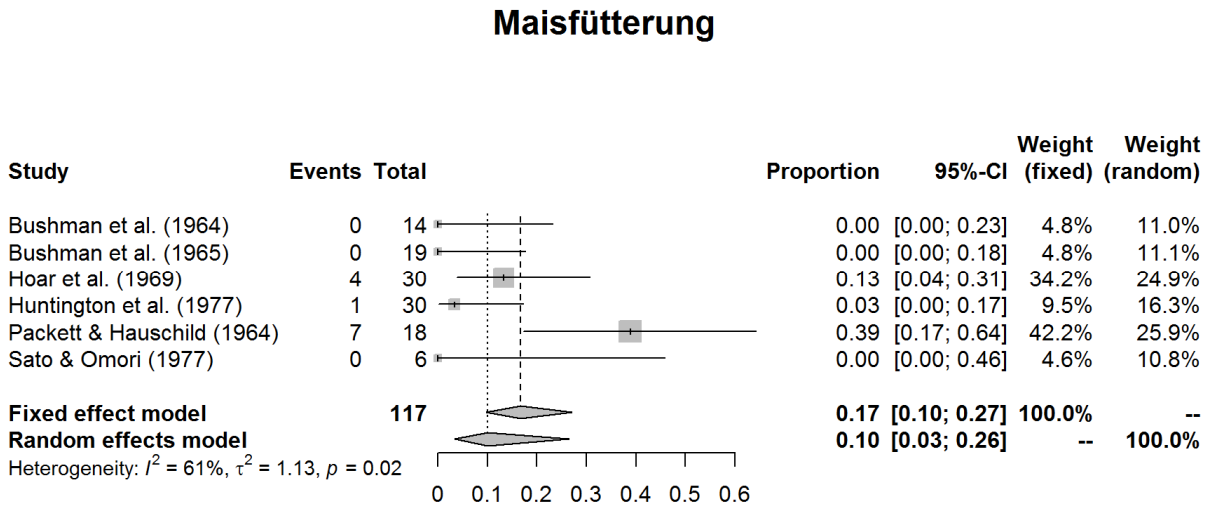


Abb. 20: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse hinsichtlich der Prävalenz von Urolithiasis bei Mais-basierter Fütterung. Das Effektmaß ist der Anteil an Böcken, welche im Rahmen der einzelnen Studien Harnsteine entwickelt haben (Proportion). Innerhalb des Forest-plots aufgetragen sind diese Proportionen sowie das jeweilige 95 % Konfidenzintervall. Der gemeinsame geschätzte Effekt wird getrennt nach fixed effect und random effects Modell angegeben. Die Maßzahlen für den Heterogenitätsgrad (I^2 und τ^2) finden sich in der Abbildung unten links und deuten ein moderates bis wesentliches Maß an Heterogenität an.

Tabelle 6: Übersicht über die Verzerrungsanfälligkeit der einzelnen Studien mit Mais-basierter Fütterung im Hinblick auf die genannten Parameter. Die Elemente links stellen Studienkriterien dar, welche nach Einstufung der Autorin zu den entsprechenden Verzerrungsanfälligkeiten in der Spalte „Risk of Bias“ führen. Wurde beispielsweise keine Randomisierung der Probanden im Versuch vorgenommen, so resultiert dies in einer hohen Verzerrungsanfälligkeit aufgrund der Zufälligkeit der Probandenauswahl. Können alle Probanden bis zum Ende des Versuchs beurteilt werden, besteht also kein Informationsverlust, so bedingt dies eine geringe Verzerrungsanfälligkeit hinsichtlich der Transparenz der verfügbaren Informationen. Das Risiko einer verzerrten Auswertungssicherheit scheint fraglich, da zwar kein Informationsverlust besteht aber mit Ausnahme einer der Studien keine Randomisierung der Probanden vorlag.

Studie	**Element**			**Risk of Bias**		
Nr.	***Randomisierung***	***Verblindung***	***Informationsverlust***	***Zufälligkeit der Auswahl***	***Auswertungssicherheit***	***Information***
2	nein	nicht genannt	nein	hoch	fraglich	gering
18	nein	nicht genannt	nein	hoch	fraglich	gering
66	nein	nicht genannt	nein	hoch	fraglich	gering
74	ja	nicht genannt	nein	gering	gering	gering
117	nein	nicht genannt	nein	hoch	fraglich	gering
135	nein	nicht genannt	nein	hoch	fraglich	gering

Für die Hirse- bzw. Mais-dominierten Fütterungen wurde im Falle der Hirsefütterung ein χ^2-Test durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben im Falle der Maisfütterung wurde zum Test auf Homogenität der Haldane-Dawson`s U-Test durchgeführt (Haldane, 1940). In beiden Fällen ergaben sich hierbei hochsignifikante Unterschiede ($p < 0{,}001$) bezüglich der oben angegebenen Studien. In den mittels der Software „R" erstellten Forest-plots spiegelt sich dieses hohe Maß an Heterogenität in einem I^2 von 83 % für die Hirse- und 61 % für die Maisfütterung.
Zur näheren Beurteilung, welche der Studien vom Durchschnitt aller begutachteten Studien abweichen, wurde jeweils eine Einstichproben-Konfigurationsfrequenzanalyse durchgeführt (Lehmacher, 1981). Die Signifikanzgrenze wurde im Falle der Hirsefütterung nach Bonferroni-Adjustierung auf $p < 0{,}003$ und im Falle der Maisfütterung auf $p < 0{,}008$ festgesetzt.
Hierbei erwiesen sich die Hirse-Studien Nummern 27, 33, 36, 123 und 126 als signifikant vom Studiendurchschnitt abweichend, während bei der Maisfütterung lediglich die Studie mit der Nummer 117 (Packett und Hauschild, 1964) signifikant vom Studiendurchschnitt abweicht ($p = 0{,}000015$).

Unter Berücksichtigung bzw. Miteinbeziehung dieser von der Gesamtprävalenz abweichenden Studien ergibt sich eine gemeinsame ungewichtete Prävalenz für eine Hirse-dominierte Fütterung von 48,6 %. Nach einer Gewichtung der Studien anhand ihrer Fallzahlen ergibt sich eine gemeinsame gewichtete Prävalenz von 60,5 %.
Hierbei wird die ungewichtete Prävalenz als Mittelwert der Prävalenzen über alle Studien berechnet. Im Falle der gewichteten Prävalenz erfolgt die Berechnung als gewichteter Mittelwert gemäß folgender Formel:

$$\bar{x}\,(\text{gewichtet}) = \frac{\sum i\, xi\, gi}{\sum i\, gi} = \frac{x_1 \times g_1 + x_2 \times g_2 + \cdots + x_n \times g_n}{g_1 + g_2 + \cdots + g_n}$$

Wobei gilt: x_i = Prävalenz in % und g_i = Probandenzahl je Studie

Werden die von der Gesamtprävalenz signifikant abweichenden Studien aus der Berechnung der gemeinsamen Prävalenz herausgenommen, so ergeben sich für die gemeinsame ungewichtete Prävalenz 56,1 % und für die gemeinsame gewichtete Prävalenz 55,6 %.

Für die Mais-dominierte Fütterung lassen sich entsprechend folgende geschätzten Prävalenzen ermitteln: Unter Berücksichtigung aller evaluierten Studien kann eine gemeinsame ungewichtete Prävalenz von 9,2 % gegenüber einer gemeinsamen gewichteten Prävalenz von

10,1 % berechnet werden. Wird die Studie von Packett und Hauschild (1964) (als signifikant von der Gesamtprävalenz abweichend) nicht in die Berechnung integriert, so resultiert dies in einer gemeinsamen ungewichteten Prävalenz von 3,2 %. Diesem Wert steht eine gewichtete Prävalenz von 5,1 % entgegen.

Die graphische Darstellung der Meta-Analyse für die Mais-basierte Fütterung weicht hinsichtlich der fixed effect und der random effect Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher zugrundeliegender Formeln von den oben angegebenen gewichteten und ungewichteten Mittelwerten ab. Das Software Programm „R“ nutzt zur Durchführung der Gewichtung folgendes Verfahren: Zur Berechnung des gemeinsamen, gepoolten Schätzers für die Prävalenz wird zunächst eine Kontinuitätskorrektur durchgeführt. Dazu werden bei allen Studien ohne Erkrankungsfälle (Auftreten von Urolithiasis im Versuch) Häufigkeiten von 0,5 eingesetzt. Aufgrund in der Regel nicht normal verteilter Proportionen wird eine logarithmische Transformation durchgeführt und die Varianzen für diese Proportionen werden berechnet (Formeln 1 und 2). Für die Konfidenzintervalle der einzelnen Studien wird das exakte Clopper-Pearson-Intervall der Binomial-Verteilung verwendet.

Formel 1 (Logarithmische Transformation): $l = \ln (p/1-p)$

Formel 2 (logarithmische Varianz): $\mathrm{Var}(l) = \frac{1}{(N \times p)} + \frac{1}{(N \times (1-p))}$

Wobei gilt: p = beobachtete Prävalenz und N = Anzahl der untersuchten Tiere

Die Gewichtung der Studien ergibt sich aus der inversen Varianz der Studien. Für die Gewichtung und Berechnung des gemeinsamen Schätzers wird zum einen davon ausgegangen, dass die Durchführung der Studien homogen ist. In diesem Fall wird angenommen, dass die Variabilität der Varianzen rein zufallsbedingt ist. Andererseits wird für den Fall der Heterogenität der Studien davon ausgegangen, dass die Variabilität der Prävalenzen durch einen zufälligen Faktor und einen Heterogenitätsfaktor bedingt ist. Um die Heterogenität der Studien τ^2 zu schätzen, wird die Methode von DerSimonian und Laird (1986) angewandt.

Liegt keine Heterogenität vor, kann von einem Fixed-Effects-Modell ausgegangen werden und die Gewichte werden direkt aus der inversen Varianz berechnet. Bei Vorliegen von Heterogenität wird die Varianz der Studien zunächst mit τ^2 korrigiert und dann aus der inversen Varianz berechnet.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die geschätzte Prävalenz für das Auftreten einer Urolithiasis-Erkrankung bei Hirse-basierter Fütterung zwischen 48 und 62 % liegt und einer Prävalenz von 10 bis 17 % bei Maisfütterung gegenübersteht.

2. Sind Rasse- bzw. Speziesprädispositionen für das Auftreten von Urolithiasis bekannt?

Die im Abschnitt Material und Methoden beschriebene Literatursuche ergab lediglich einen Treffer (Nwaokorie et al., 2015). Auch eine von der ursprünglich geplanten Suche abweichende Recherche hinsichtlich einer rasse- bzw. speziesspezifisch unterschiedlichen Exkretion von beispielsweise Phosphor konnte die Trefferanzahl nicht erhöhen. Bei der genannten Literaturstelle handelt es sich um eine retrospektive Auswertung von 832 Harnsteinen, welche zur Analyse an das Minnesota Harnsteinzentrum eingesandt worden waren. Die Auswertung der anamnestischen Angaben zu diesen Harnsteinen ergibt ein höheres Risiko für afrikanische Zwergziegen, an Calciumcarbonat-Urolithiasis zu erkranken. Aufgrund fehlender weiterer Literaturstellen kann eine Auswertung im Rahmen einer Meta-Analyse nicht erfolgen.

3. Sind kastrierte männliche Tiere häufiger betroffen als intakte Böcke?

Die Literaturrecherche zur Häufigkeit des Auftretens von Urolithiasis bei kastrierten Schaf- und Ziegenböcken ergab anhand der oben angegebenen Suchbegriffe insgesamt 130 Titel, welche in die weitere Literatursichtung einbezogen wurden. Nach Entfernen der anhand der Auswahlkriterien (Dubletten, Tierart, Sprache, Verfügbarkeit, Aussage zur Prävalenz von Urolithiasis bei Kastraten etc.) definierten Publikationen verblieben 15 Literaturstellen in der Auswertung (Details siehe Anhang). Nach weiterer Sichtung dieser 15 Artikel konnten in 4 dieser Literaturstellen Angaben hinsichtlich der Häufigkeit von Urolithiasis bei kastrierten sowie bei unkastrierten Böcken ermittelt werden. Da es sich bei diesen Studien jedoch ausnahmslos um retrospektive Fallstudien ohne die Betrachtung einer gesunden Kontrollpopulation handelt, kann eine Auswertung im Rahmen einer Meta-Analyse nicht erfolgen.

4. Welche Operationsmethode bietet die beste Erfolgsrate?

Die Literaturrecherche zur Erfolgsrate nach Durchführung chirurgischer Operationsverfahren bei obstruktiver Urolithiasis am Schaf- und/oder Ziegenbock ergab anhand der oben angegebenen Suchbegriffe insgesamt 39 Literaturstellen, welche in die weitere Sichtung und Auswertung einbezogen wurden. Nach Entfernen der anhand der Auswahlkriterien (Dubletten, Tierart, Sprache, Verfügbarkeit, Aussage zur Erfolgsrate nach chirurgischer Therapie der

obstruktiven Urolithiasis etc.) definierten Publikationen verblieben 16 Literaturstellen in der Auswertung (Details siehe Anhang). Bei diesen Studien handelt es sich um Kohorten- bzw. Fall-Kontroll-Studien sowie Fallstudien-Berichte. Einzelfallberichte sowie narrative Reviews wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Nach Sichtung der einzelnen Studien erfolgte eine Aufarbeitung der Daten je nach angewandter Methode. Die Durchführung der Meta-Analyse erfolgte mittels des Programms R (Version 3.3.2) und dem R-Paket meta (Version 4.8-1) im Institut für Medizinische Informatik (IMI) der JLU Gießen. Aussagen können getroffen werden für die Amputation des Processus urethralis, für das Anlegen einer Perinealen Fistel (PU), für die Marsupialisation der Blase, für die ultraschallgestützte Katheterzystotomie sowie die Katheterzystotomie via Laparotomie.

Es erfolgte zunächst eine nach Studienart separat aufgearbeitete Analyse der in die Meta-Analyse eingeschlossenen Studien. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse dieser Analysen in den Tabellen 7 und 8 dargestellt.

Im Anschluss daran erfolgte eine gemeinsame Auswertung beider Studientypen. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 9.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse für die kombinierte Analyse ist in den Abbildungen 21 bis 25 ersichtlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Marsupialisation der Blase als Therapie bei obstruktiver Urolithaisis die höchste Erfolgsrate (77 %) ermittelt werden konnte. Dieser folgen die Perineale Urethrostomie (71 %), die Katheterzystotomie via Laparotomie (66 %) und die Amputation des Processus urethralis (41 %).

Tabelle 7: Zusammenstellung der Ergebnisse der Meta-Analyse anhand der vorliegenden Fall-Kontroll-Studien (n = 5).

Methode	Gemeinsame Erfolgsrate	95% KI
Amputation Proc. urethralis	0,48	0,36-0,61
Perineale Urethrostomie	0,83	0,45-0,97
Marsupialisation	0,70	0,47-0,86
Sonographische Katheter-Zystotomie	0,15	0,06-0,34
Katheterzystotomie via Laparotomie	0,48	0,37-0,59

Tabelle 8: Zusammenstellung der Ergebnisse der Meta-Analyse anhand der vorliegenden Fallstudien (n = 11).

Methode	Gemeinsame Erfolgsrate	95% KI
Perineale Urethrostomie	0,69	0,52-0,82
Katheterzystotomie via Laparotomie	0,79	0,71-0,86

Tabelle 9: Zusammenstellung der Ergebnisse aller in die Meta-Analyse eingeschlossenen Studien (n = 16).

Methode	Gemeinsame Erfolgsrate	95% KI
Amputation Proc. urethralis	0,41	0,31-0,51
Perineale Urethrostomie	0,71	0,56-0,83
Marsupialisation	0,77	0,59-0,89
Sonographische Katheter-Zystotomie	0,15	0,06-0,34
Katheterzystotomie via Laparotomie	0,66	0,59-0,73

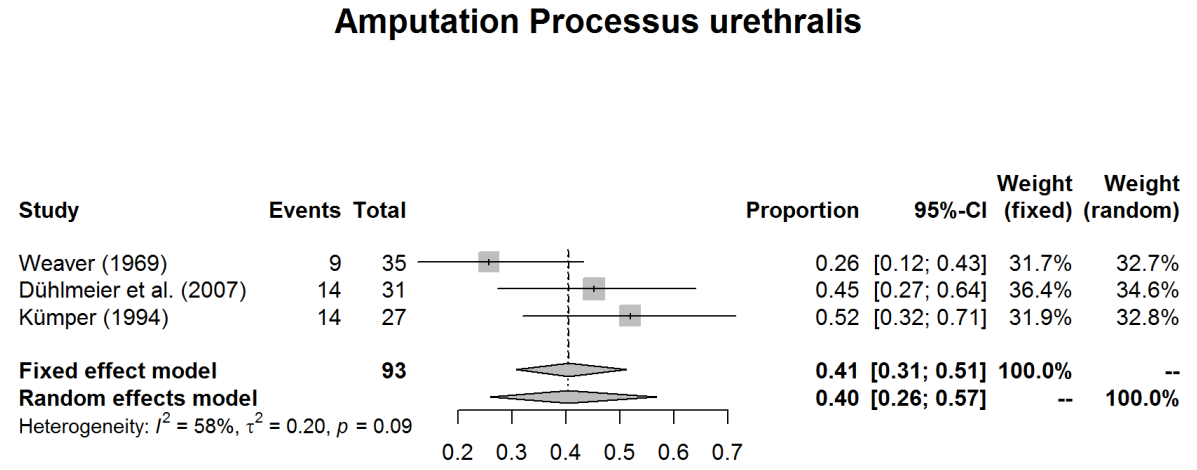


Abb. 21: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Amputation des Processus urethralis. Das Heterogenitätsmaß I^2 deutet mit 58 % eine moderate Heterogenität der Studien an. Das gemeinsame geschätzte Effektmaß (hier die Erfolgsrate nach Amputation des Processus urethralis) liegt demnach bei 41 % (fixed effect Modell).

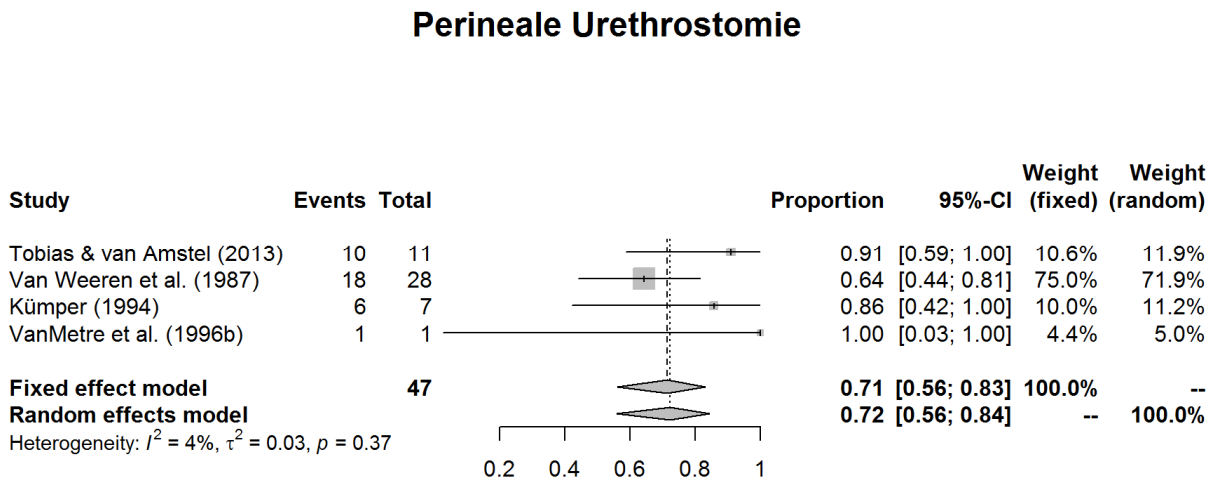


Abb. 22: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Anlegen einer Perinealen Urethrostomie. Das Heterogenitätsmaß I^2 deutet mit 4 % eine vernachlässigbare Heterogenität der Studien an. Das gemeinsame geschätzte Effektmaß (hier die Erfolgsrate nach Perinealer Urethrostomie) liegt demnach bei 71 % (fixed effect Modell).

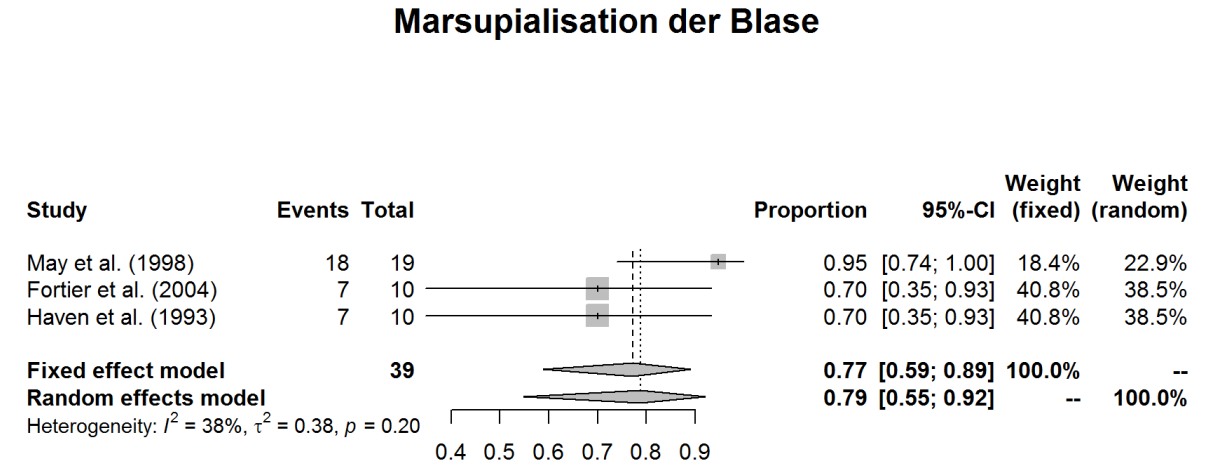


Abb. 23: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Marsupialisation der Blase. Das Heterogenitätsmaß I^2 deutet mit 38 % eine geringe Heterogenität der Studien an. Das gemeinsame geschätzte Effektmaß (hier die Erfolgsrate nach Marsupialisation der Blase) liegt demnach bei 77 % (fixed effect Modell).

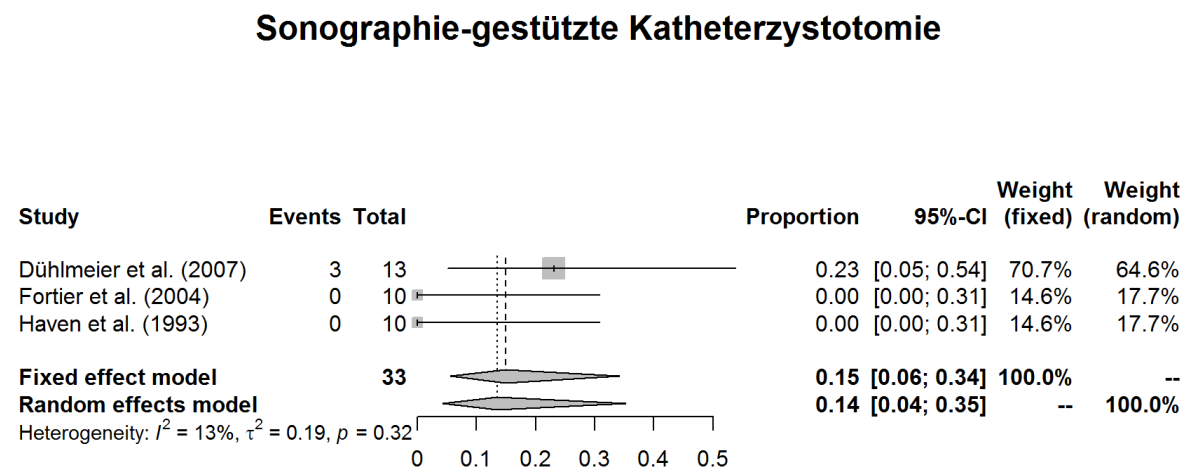


Abb. 24: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Sonographie-gestützter Katheterzystotomie. Das Heterogenitätsmaß I^2 deutet mit 13 % eine vernachlässigbare Heterogenität der Studien an. Das gemeinsame geschätzte Effektmaß (hier die Erfolgsrate nach Sonographie-gestützter Implantation eines Ballonkatheters in die Blase) liegt demnach bei 15 % (fixed effect Modell).

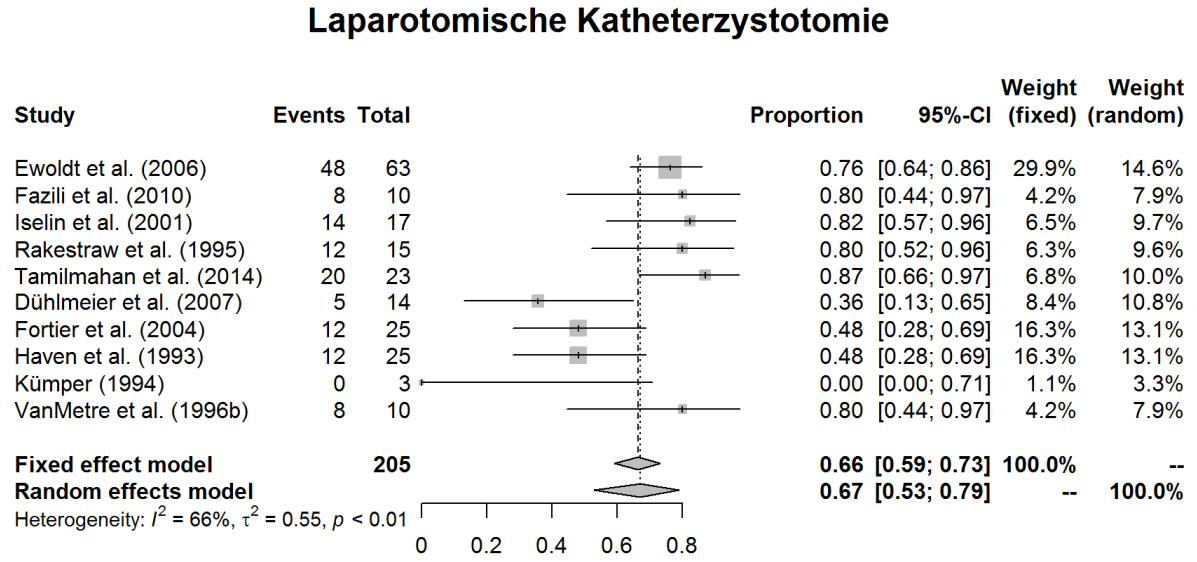


Abb. 25: Forest-plot für die kombinierte Meta-Analyse bezüglich der Erfolgsraten nach Katheterzystotomie im Rahmen einer Laparotomie. Das Heterogenitätsmaß I^2 deutet mit 66 % eine moderate bis nicht vernachlässigbare Heterogenität der Studien an. Das gemeinsame geschätzte Effektmaß (hier die Erfolgsrate nach Implantation eines Ballonkatheters in die Blase) liegt demnach bei 66 % (fixed effect Modell) bzw. 67 % (random effect Modell).

Abschnitt 2 – Sonographie der Urethra

Die Sonographie der Urethra konnte bei allen Lämmern, wie bereits beschrieben, durchgeführt werden (AlLugami et al., 2017). Die Lagerung und Fixierung der Probanden in linker Seitenlage wurde ausnahmslos sehr gut toleriert. Ein Aufgasen der Lämmer während der Untersuchung konnte nicht beobachtet werden. Beide Untersucher konnten das Lumen der Urethra in ihrem gesamten Verlauf regelmäßig darstellen und für die spätere Auswertung aufzeichnen (Abb. 26). Die Messergebnisse (Urethrallumen quer und längs) wurden gespeichert und für die statistische Auswertung nach Untersucher, Gruppenzugehörigkeit der Lämmer, Zeitpunkt sowie Lokalisation sortiert.

Im Rahmen der dreifaktoriellen ANOVA wurden zunächst getrennt nach Untersucher eventuell vorhandene globale Gruppenunterschiede bestimmt. Hierfür wurden die beiden Variablen *mittlerer Durchmesser der Harnröhre* und *Fläche der Urethra* je Untersucher in Abhängigkeit von Zeitpunkt der Untersuchung und Lokalisation betrachtet (Abb. 27-29).

Für den Untersucher 1 konnten statistisch signifikante globale Unterschiede für den Parameter *mittlerer Durchmesser der Urethra* ermittelt werden ($p = 0{,}0017$). Die mittleren Harnröhrendurchmesser lagen hierbei zwischen 0,34 mm und 0,43 mm für die frühkastrierten Böcke, zwischen 0,35 mm und 0,48 mm für die spätkastrierten Böcke und zwischen 0,34 mm und 0,57 mm für die intakten Böcke.
Es bestand ein hochsignifikanter globaler Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten ($p < 0{,}0001$). Außerdem ergab sich eine hochsignifikante Wechselwirkung zwischen dem Untersuchungszeitpunkt und der Gruppenzugehörigkeit ($p < 0{,}0001$). Dies bedeutet, dass sich die Zunahmen der Harnröhrendurchmesser vom Untersuchungszeitpunkt 1 bis 3 zwischen den Gruppen unterscheiden.
Die untersuchten Lokalisationen unterschieden sich global betrachtet nicht signifikant ($p = 0{,}59$). Eine Wechselwirkung zwischen Lokalisation und Gruppe konnte jedoch nachgewiesen werden ($p = 0{,}0081$). Wechselwirkungen zwischen Untersuchungszeitpunkt und Lokalisation sowie zwischen Zeit, Lokalisation und Gruppe erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Für den Untersucher 2 konnten hinsichtlich der Variablen des mittleren Urethraldurchmessers keine statistisch signifikanten globalen Gruppenunterschiede nachgewiesen werden. Die Messwerte für den mittleren Harnröhrendurchmesser lagen bei Untersucher 2 zwischen

0,32 mm und 0,38 mm für die frühkastrierten Böcke, zwischen 0,33 mm und 0,42 mm für die spätkastrierten Böcke und zwischen 0,32 mm und 0,48 mm bei den intakten Böcken. Der globale Zeitunterschied war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Die Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe konnte auch für Untersucher 2 als statistisch signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,0012$). Der Vergleich der Lokalisationen verlief ohne den Nachweis einer statistischen Signifikanz ($p = 0,3163$). Ebenso waren die Wechselwirkungen zwischen Lokalisation und Gruppe, zwischen Zeit und Lokalisation sowie zwischen Zeit, Lokalisation und Gruppe statistisch nicht signifikant.
Die Ergebnisse der Vermessung der Urethralflächen verliefen für beide Untersucher entsprechend derjenigen der mittleren Urethraldurchmesser. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 10 ersichtlich.

Im Anschluss an die dreifaktorielle Varianzanalyse wurde der Einfluss der Untersucher (Interobserver-Vergleich) auf die Messergebnisse näher untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Fragestellung hierbei war, ob ein Zusammenhang zwischen den Messwerten der beiden Untersucher nachzuweisen ist. Es konnte für die beiden Untersucher U1 und U2 eine statistisch signifikante, positive Korrelation mit dem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,5174$ bezüglich des Längs- und $R = 0,5388$ für den Querdurchmesser der Urethra ermittelt werden. Für die mittleren Durchmesser betrug der Korrelationskoeffizient $R = 0,5673$ und für die berechnete Urethralfläche $R = 0,574$ (siehe Tabelle 11). Die graphische Darstellung dieser Korrelationen und die entsprechenden Hauptkomponentengleichungen sind in den Abb. 30 bis 31 zu finden.

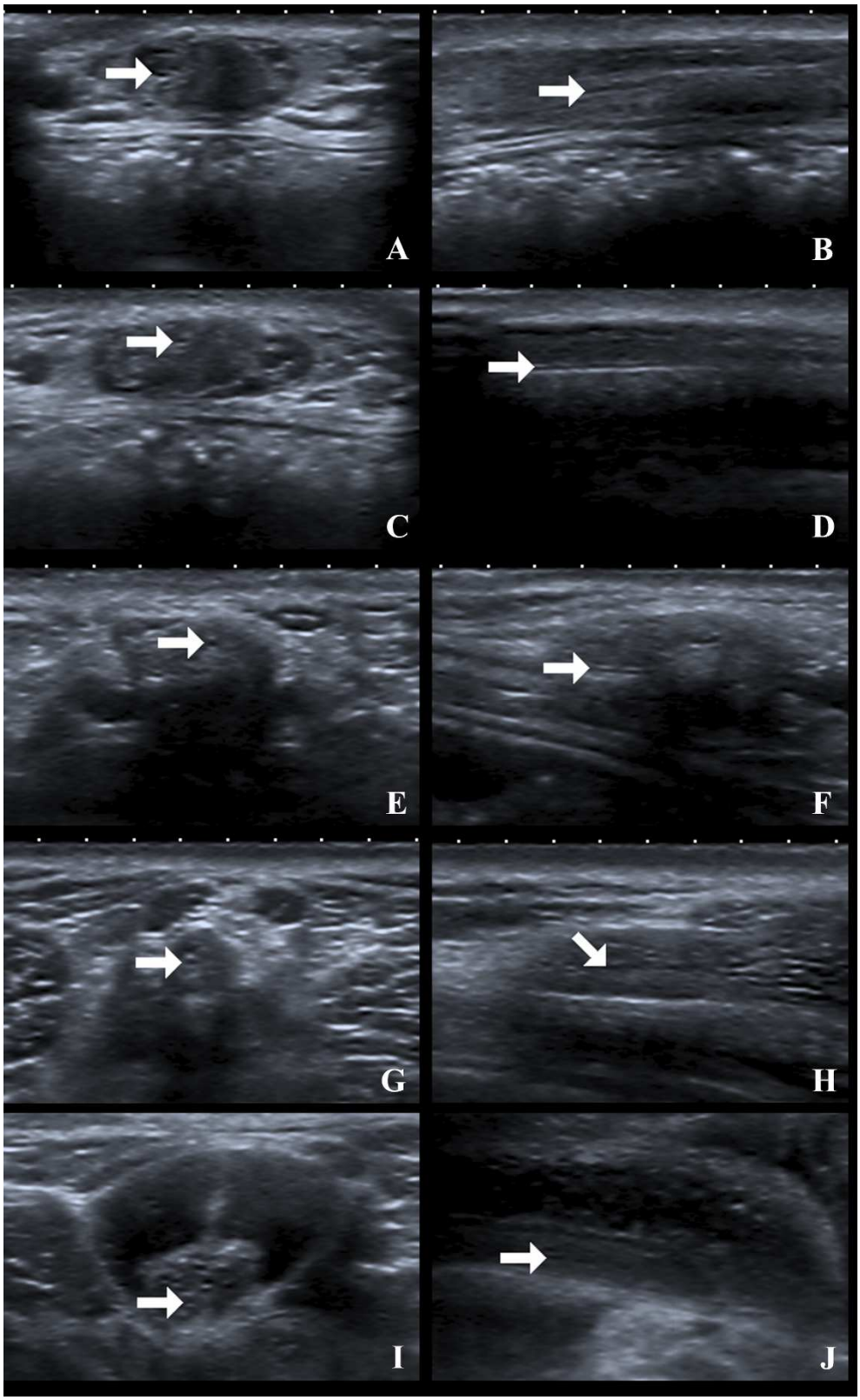
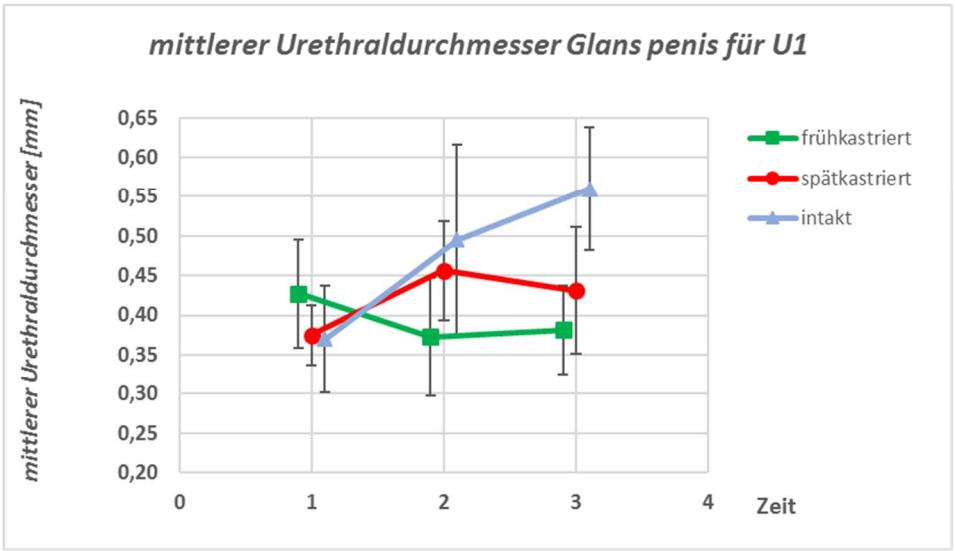
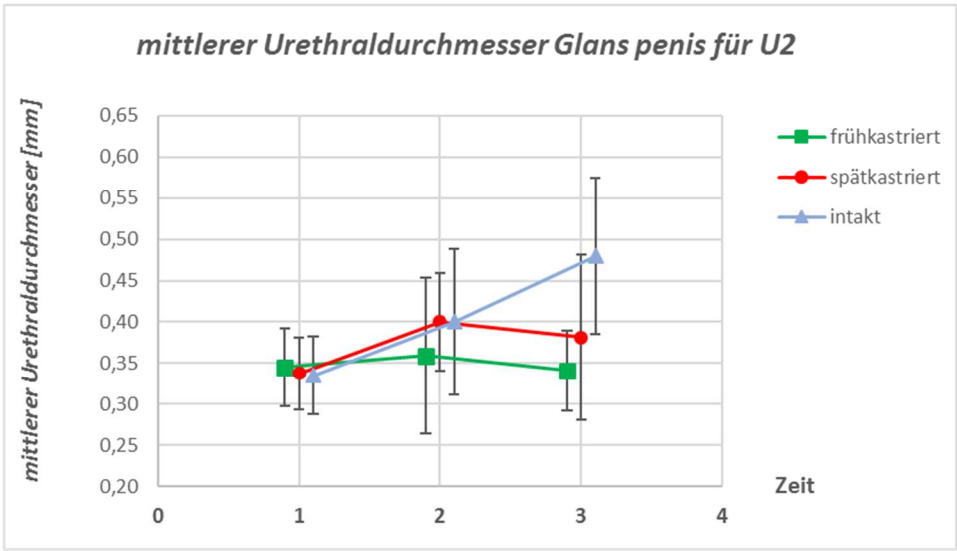
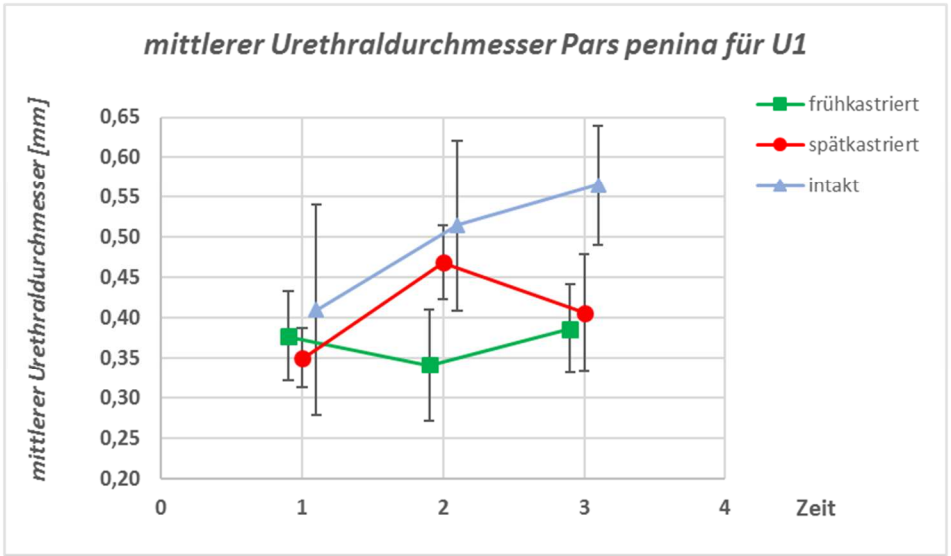


Abb. 26: In der Abbildung jeweils paarweise angeordnet finden sich die sonographischen Quer- und Längsschnitt-Aufnahmen der fünf untersuchten Lokalisationen am Penis eines Lammes. (A+B) Glans penis, (C+D) Pars penina, (E+F) distale Flexura sigmoidea, (G+H) proximale Flexura sigmoidea und (I+J) Beckenflexur. Die Lage der Urethra ist in allen Einzelbildern durch einen Blockpfeil markiert.







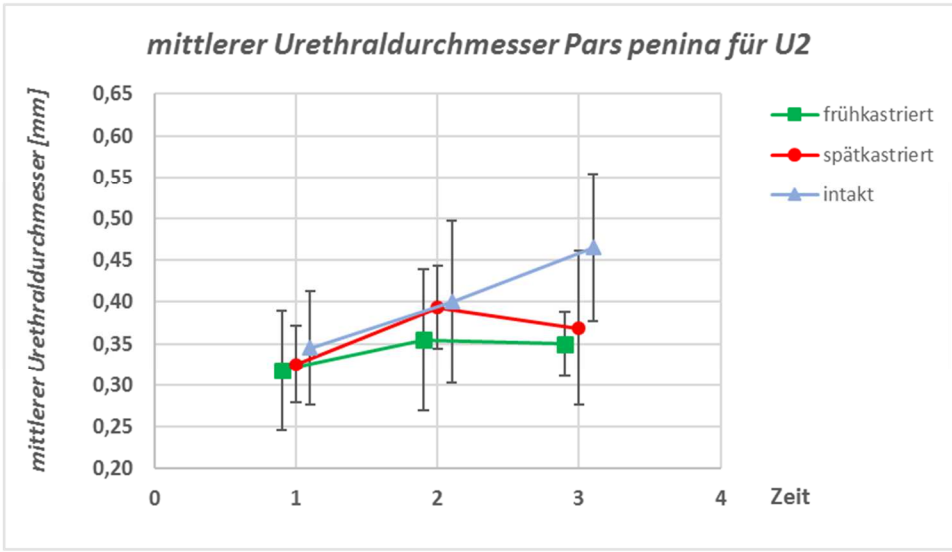


Abb. 27: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse getrennt nach Untersucher 1 und 2 (U1; U2) für die Lokalisationen Glans penis und Pars penina der Urethra. Zu erkennen ist, dass die Messungen von U1 stets höhere Werte ergeben als bei U2.

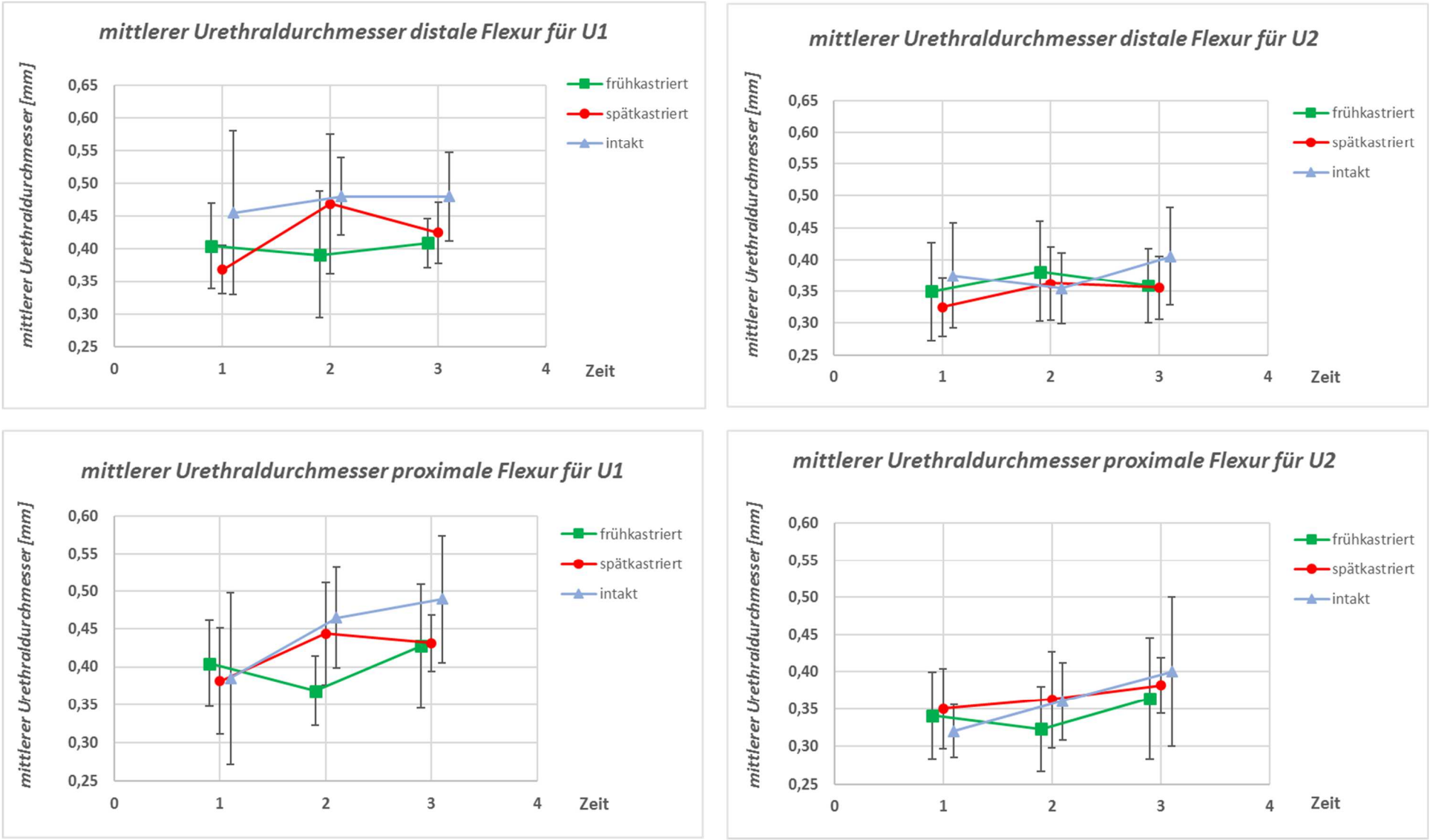


Abb. 28: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse getrennt nach Untersucher 1 und 2 (U1; U2) für die Lokalisationen distale und proximale Flexur der Urethra. Zu erkennen ist, dass die Messungen von U1 stets höhere Werte ergeben als bei U2.

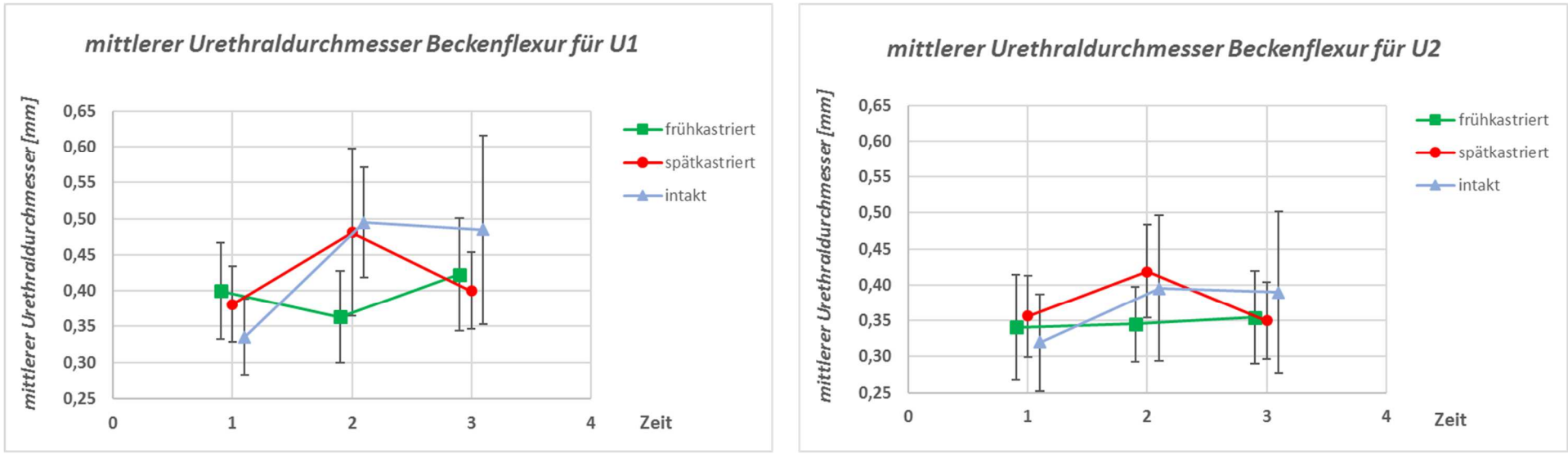


Abb. 29: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse getrennt nach Untersucher 1 und 2 (U1; U2) für die Lokalisation Arcus ischiadicus der Urethra. Zu erkennen ist, dass die Messungen von U1 stets höhere Werte ergeben als bei U2.

Tabelle 10: Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung bzgl. des Faktors Zeit zum Vergleich der Versuchsgruppen (G), der Lokalisationen (L) und der Untersuchungszeitpunkte (Z)

Variable	Haupteffekte (p-Werte)			Zweifachwechselwirkung (p-Werte)			Dreifachwechselwirkung (p-Wert)
	Gruppe	Lokalisation	Zeit	Z x G	L x G	Z x L	Z x L x G
Durchmesser Urethra (U1)	0,0017	0,5922	< 0,0001	< 0,0001	0,0081	0,5149	0,0761
Durchmesser Urethra (U2)	0,1102	0,3163	< 0,0001	0,0012	0,1090	0,1882	0,5080
Fläche (U1)	0,0009	0,6139	< 0,0001	< 0,0001	0,0084	0,4033	0,0772
Fläche (U2)	0,0889	0,3258	< 0,0001	0,0004	0,1583	0,1767	0,4508

Tabelle 11: Zusammenstellung der Korrelationskoeffizienten zum Interobserver-Vergleich der sonographischen Morphometrie der Urethra

Parameter	Korrelationskoeffizient (R)	p-Wert
Urethraldurchmesser längs (Da)	0,517	< 0,001
Urethraldurchmesser quer (Db)	0,539	< 0,001
Mittlerer Urethraldurchmesser (Da + Db / 2)	0,567	< 0,001
Urethralfläche (F)	0,574	< 0,001

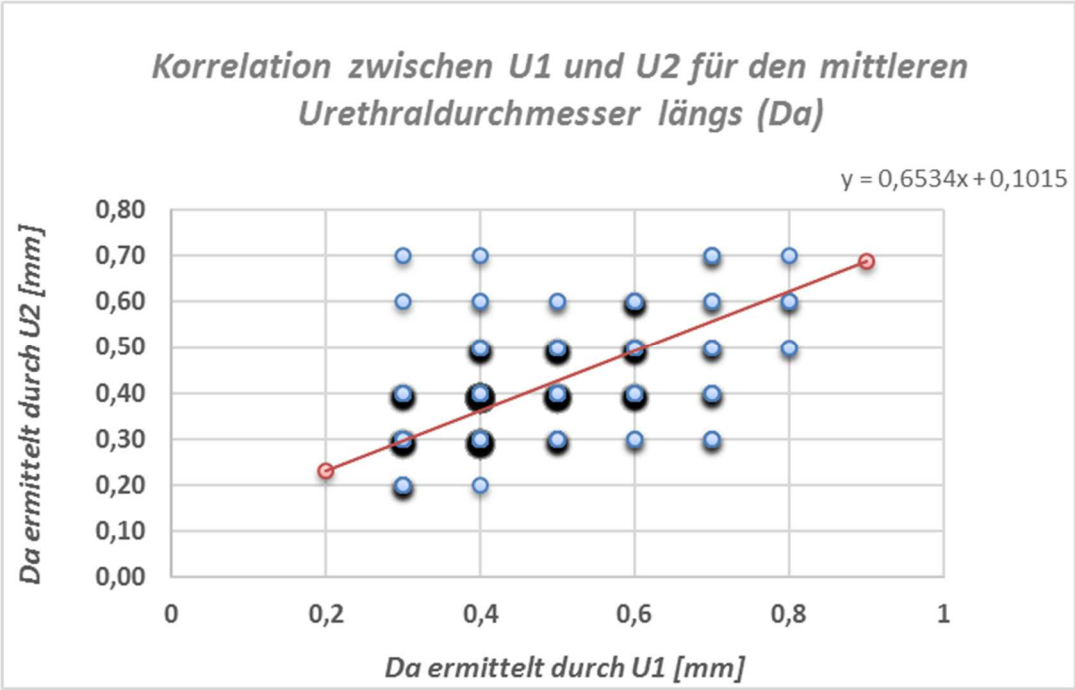


Abb. 30: Gegenüberstellung der Messergebnisse beider Untersucher (U1 und U2) für die mittleren Urethraldurchmesser (längs [Da]). Die eingezeichnete Gerade repräsentiert die Hauptkomponentengleichung (Formel siehe Graphik).

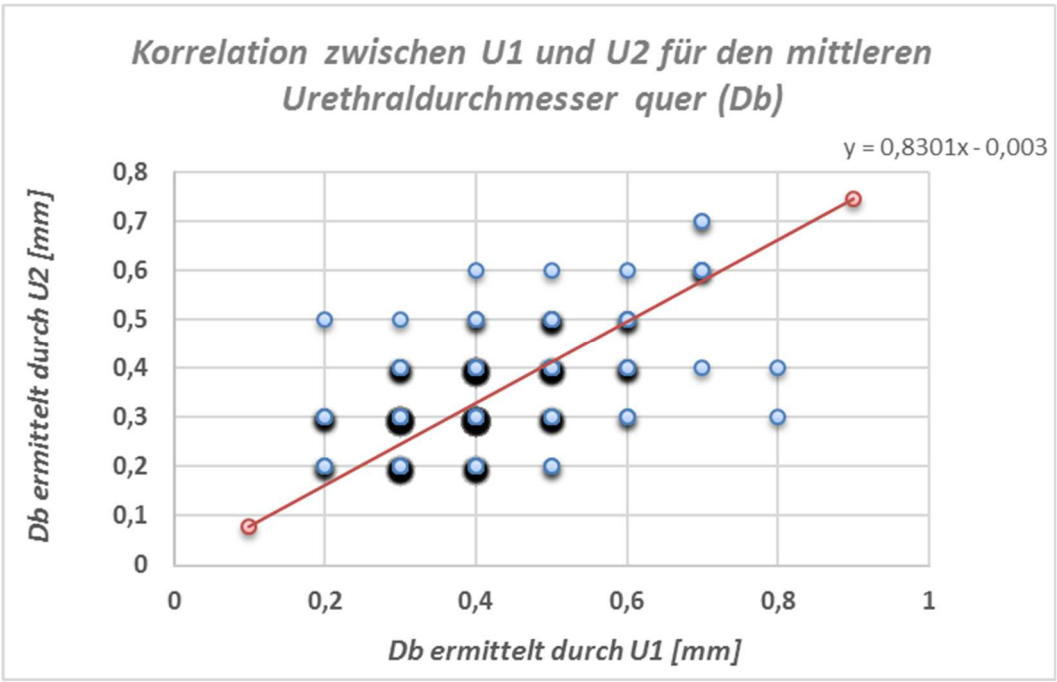


Abb. 31: Gegenüberstellung der Messergebnisse beider Untersucher (U1 und U2) für die mittleren Urethraldurchmesser (quer [Db]). Die eingezeichnete Gerade repräsentiert die Hauptkomponentengleichung (Formel siehe Graphik).

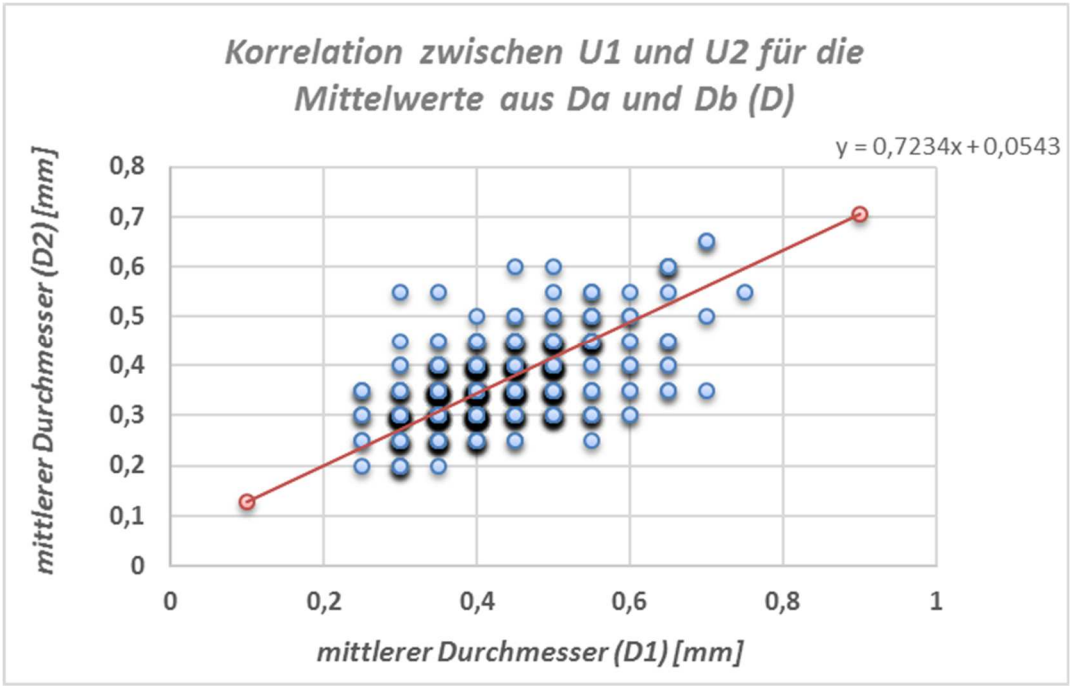


Abb. 32: Gegenüberstellung der berechneten Größe „mittlerer Urethraldurchmesser“ (D) anhand der Messergebnisse beider Untersucher (D1 entspricht Untersucher 1; D2 entspricht Untersucher 2). Die eingezeichnete Gerade repräsentiert die Hauptkomponentengleichung (Formel siehe Graphik).

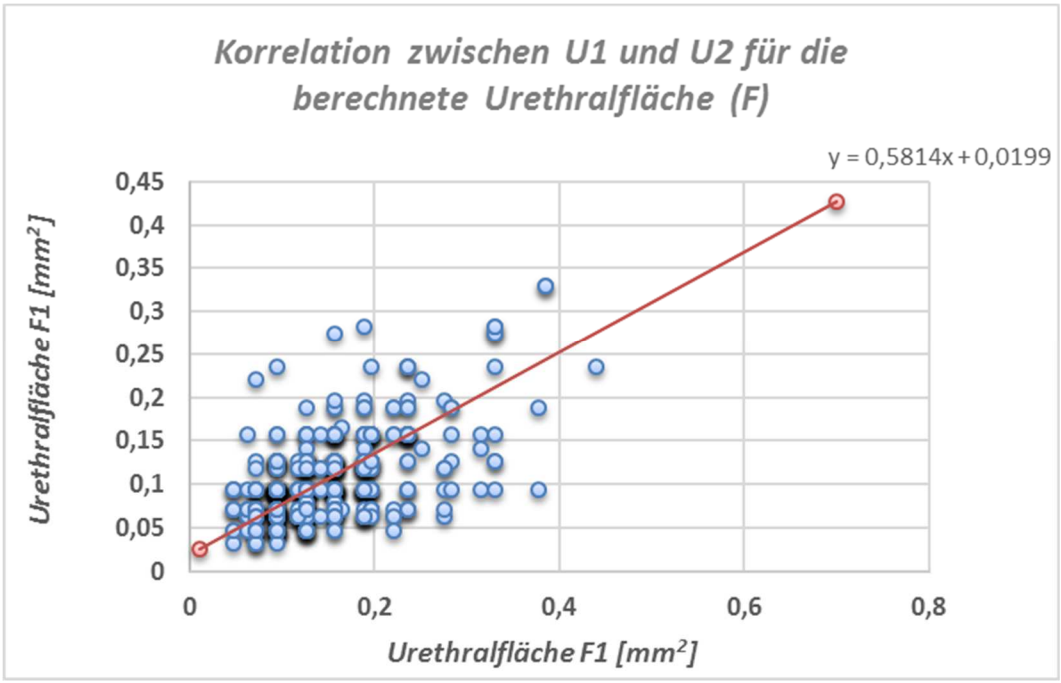


Abb. 33: Gegenüberstellung der berechneten Größe „Urethralfläche“ (F) anhand der Messergebnisse beider Untersucher (entsprechend F1 = Untersucher 1 und F2 = Untersucher 2). Die eingezeichnete Gerade repräsentiert die Hauptkomponentengleichung (Formel siehe Graphik).

Im Rahmen eines globalen Mittelwertvergleichs zwischen den Untersuchern U1 und U2 konnte nachgewiesen werden, dass Untersucher 1 stets höhere Messwerte ermittelte als dies für Untersucher 2 der Fall war. Die Differenzen der Mittelwerte für den Längs- und Querdurchmesser, den mittleren Urethraldurchmesser sowie für die Urethralfläche unterschieden sich jeweils statistisch hochsignifikant ($p < 0{,}0001$).

Diese Unterschiede zwischen den Untersuchern waren umso größer, je größer der gemessene Wert war. Dies konnte anhand einer Bland-Altman-Analyse gezeigt werden und ist in den Abb. 34 bis 37 dargestellt.

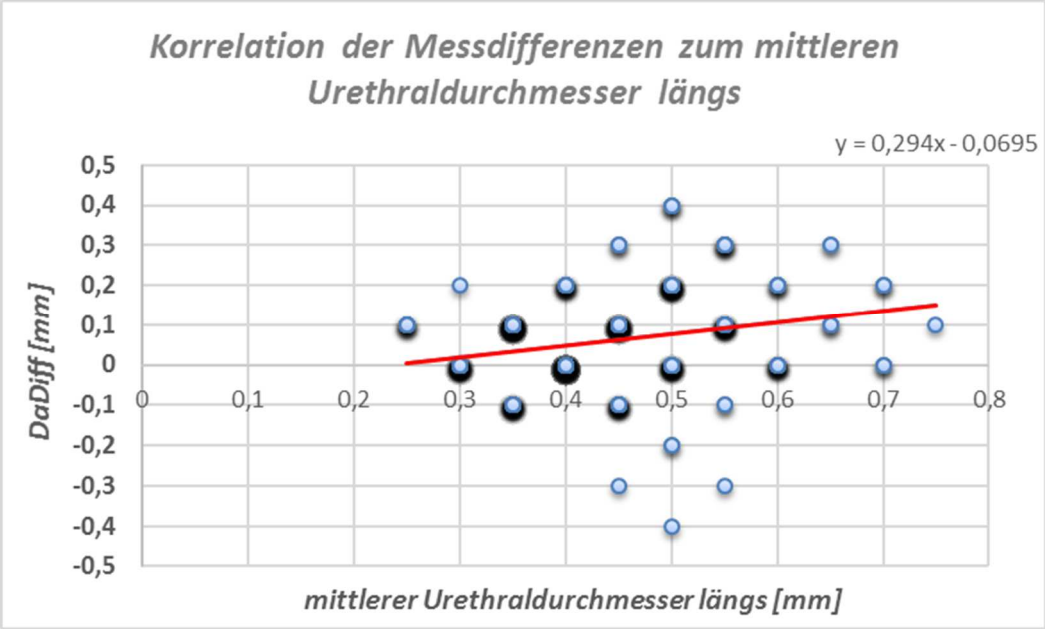


Abb. 34: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die mittleren Urethraldurchmesser längs. Die rot eingezeichnete Regressionsgerade gibt einen Trend dahingehend an, dass die Interobserver-Unterschiede mit der Höhe der gemessenen Werte zunehmen.

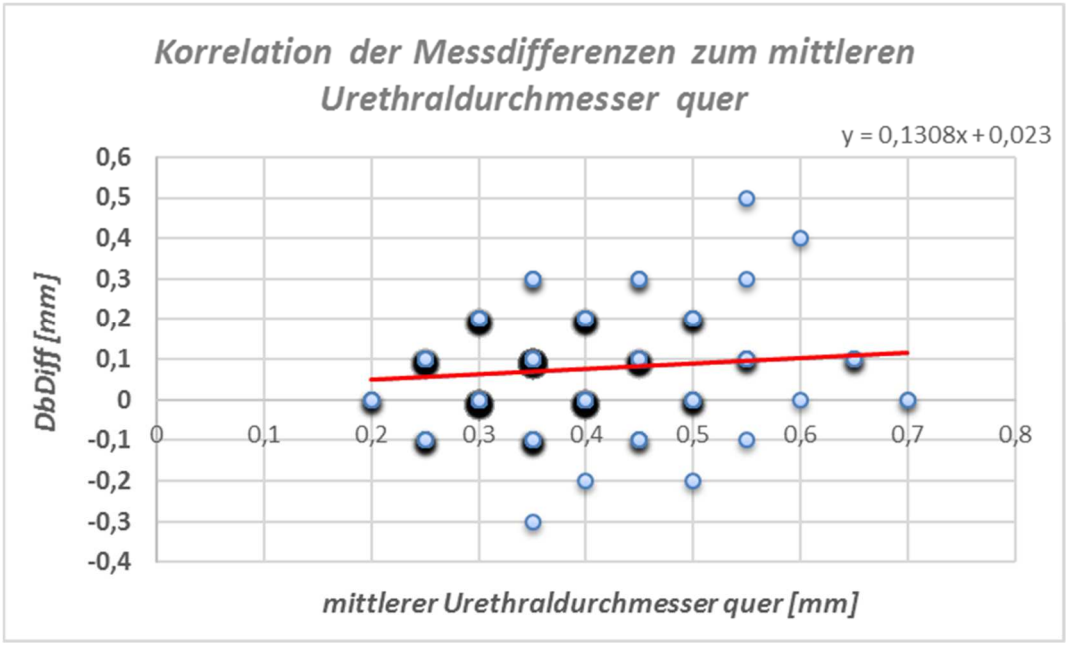


Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die mittleren Urethraldurchmesser quer. Die rot eingezeichnete Regressionsgerade gibt einen Trend dahingehend an, dass die Interobserver-Unterschiede mit der Höhe der gemessenen Werte zunehmen.

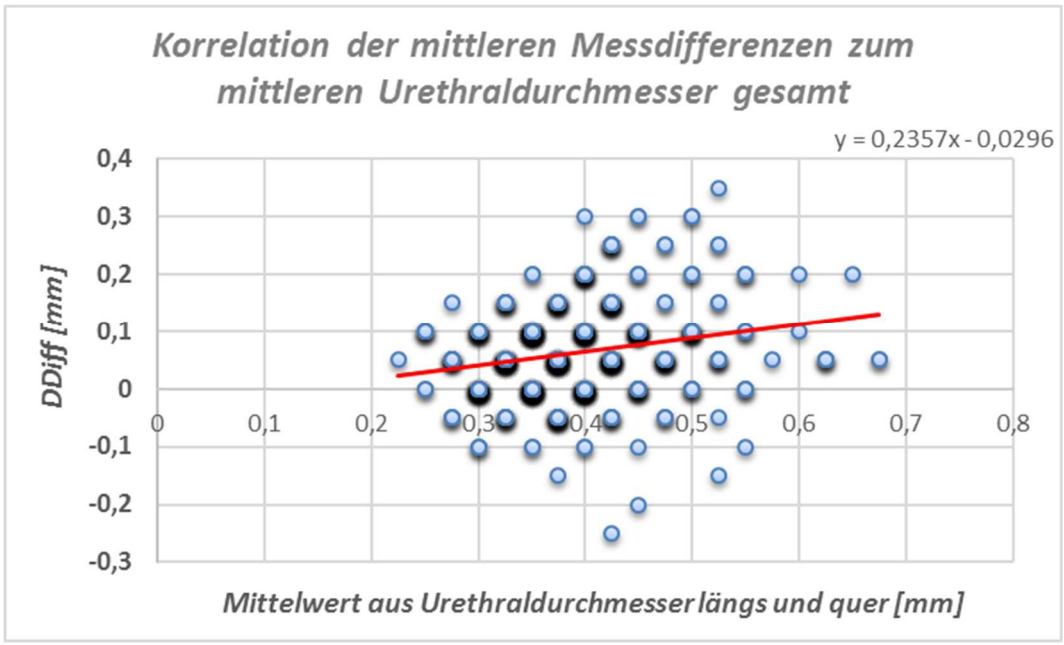


Abb. 36: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die berechneten mittleren Urethraldurchmesser gesamt. Die rot eingezeichnete Regressionsgerade gibt einen Trend dahingehend an, dass die ermittelten Interobserver-Unterschiede mit steigenden Werten zunehmen.

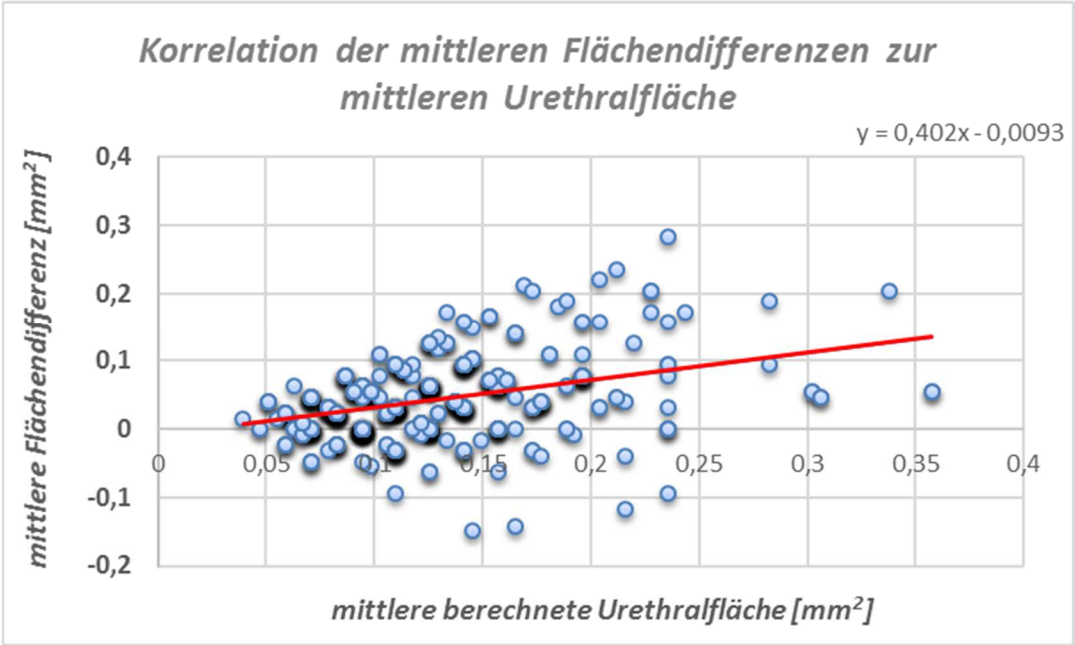


Abb. 37: Darstellung der Ergebnisse der Bland-Altman-Analyse für die berechnete mittlere Urethralfläche. Die rot eingezeichnete Regressionsgerade gibt einen Trend dahingehend an, dass die ermittelten Interobserver-Unterschiede mit steigenden Werten zunehmen.

Abschnitt 3 – Immunhistochemische Untersuchungen

1. Morphometrie an HE-gefärbten Schnitten

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme und histologischen Untersuchung waren alle Böcke aus der Sonographie-Studie sechs Monate alt und waren der Schlachtung zugeführt worden. Die Urethra dieser Bocklämmer wies durchweg ein mehrschichtiges Urothel auf. Bei allen Böcken mit Ausnahme der Harnsteinböcke, von denen zusätzlich im Rahmen der Sektion am Institut für Veterinärpathologie der JLU Gießen Proben entnommen wurden, konnten die Urethralfläche sowie die Fläche des Urothels vermessen werden. Im Falle der Böcke mit Urolithiasis wurde im Rahmen der Sektion die Urethra längs eröffnet, so dass an diesen Präparaten keine Flächen bestimmt werden konnten. Aufgrund der dadurch sehr lückenhaften Datensätze für die Patienten mit Urolithiasis wurden die restlichen Daten dieser Tiere aus der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Für die Messwerte der früh- bzw. spätkastrierten sowie der intakten Böcke konnten folgende Ergebnisse verzeichnet werden: Der globale Gruppenvergleich ergab für den Parameter *Urethralfläche* keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,51$; Abb. 38). Bezüglich der untersuchten Lokalisationen ergab sich jedoch ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$). Es bestand hierbei eine signifikante Wechselwirkung zwischen Gruppe und Lokalisation ($p = 0,03$). Die Urethralfläche an Lokalisation 3 ist beispielsweise in der Gruppe der Frühkastrierten deutlich kleiner als in den beiden anderen Gruppen. Im paarweisen Vergleich der Gruppen konnte ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied der Lokalisationen für die Gruppenvergleiche „intakt“ versus „frühkastriert“ sowie „frühkastriert“ versus „spätkastriert“ ermittelt werden ($p < 0,0001$). Ebenfalls signifikant unterscheiden sich die Lokalisationen zwischen den Gruppen „intakt“ und spätkastriert“ ($p = 0,002$).

Die Vermessung der Fläche des die Urethra auskleidenden *Urothels* unterschied sich global betrachtet zwischen den Gruppen signifikant ($p = 0,04$). Es war ein statistisch hochsignifikanter Lokalisationsunterschied nachzuweisen ($p < 0,001$). Eine Wechselwirkung zwischen Lokalisation und Gruppe bestand nicht ($p = 0,53$; Abb. 39). Im paarweisen Gruppenvergleich konnte für keine der Gruppenpaarungen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden, wobei sich der Vergleich zwischen den Gruppen „intakt“ und „spätkastriert“ sehr nahe an der Signifikanzgrenze bewegt ($p = 0,018$; Signifikanzgrenze bei $p < 0,017$).

Um die Verbindung zwischen Urethral- und Urothelfläche näher zu untersuchen wurden die Quotienten aus diesen beiden Flächen gebildet und nach logarithmischer Transformation ebenfalls mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgewertet. Hierbei konnten keine

signifikanten globalen Gruppenunterschiede festgestellt werden (p = 0,578). Bezüglich der Lokalisationen ergaben sich signifikante Unterschiede (p = 0,015), jedoch ohne Wechselwirkung zwischen Lokalisation und Gruppe (p = 0,298).

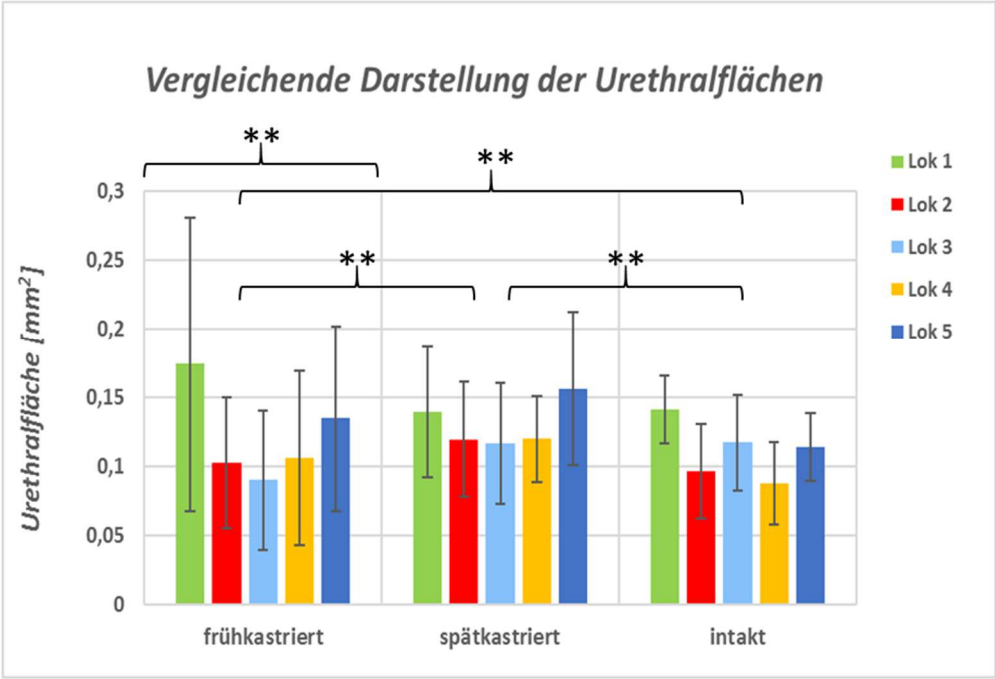


*Abb. 38: Darstellung des Gruppenvergleichs für die Urethralfläche (global; p = 0,51). Die Lokalisationen unterscheiden sich sowohl global betrachtet als auch zwischen den Gruppen hochsignifikant voneinander (p < 0,0001). Signifikante Unterschiede sind mittels ** markiert.*

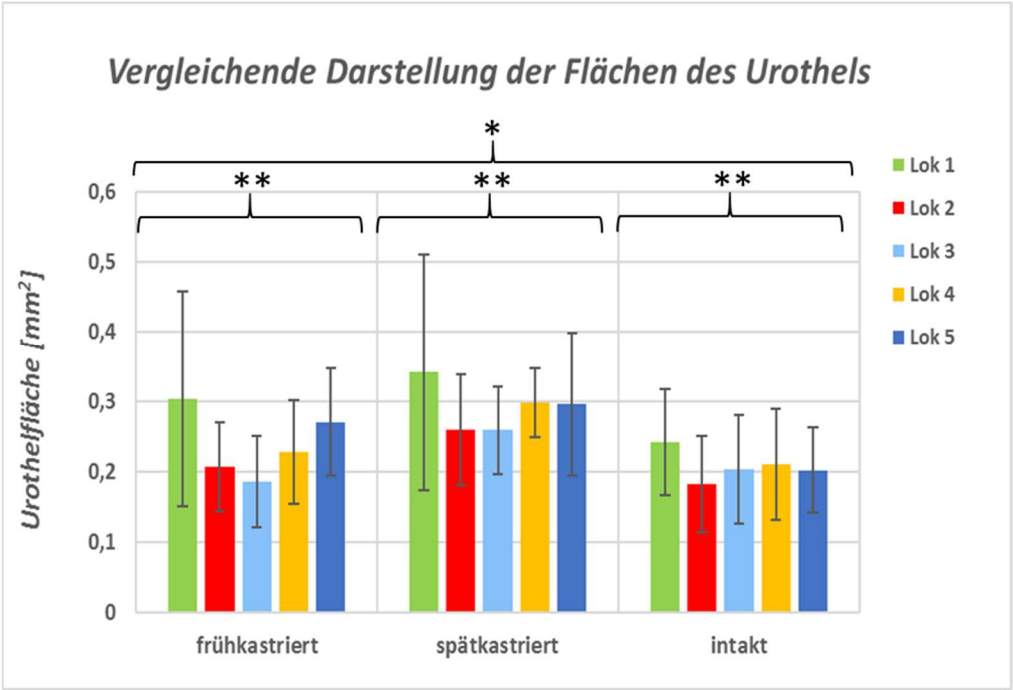


*Abb. 39: Darstellung des Gruppenvergleichs für die Fläche des Urothels (globaler Unterschied; p = 0,04; *). Die Lokalisationen unterscheiden sich sowohl global als auch innerhalb der Gruppen hochsignifikant voneinander (p < 0,001; **).*

2. Immunhistochemie

Zelluläre Immunität in der Urethra

CD 3 – Färbung

CD 3 IR-positive Zellen waren bei allen untersuchten Böcken sowohl in den Urethralproben als auch in der Präputialschleimhaut nachweisbar. Bei manchen Böcken kam es zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung im Bereich des Urothels bei trotzdem deutlich abgrenzbaren spezifischen Anfärbungen der CD 3 positiven T-Zellen (Abb. 40).

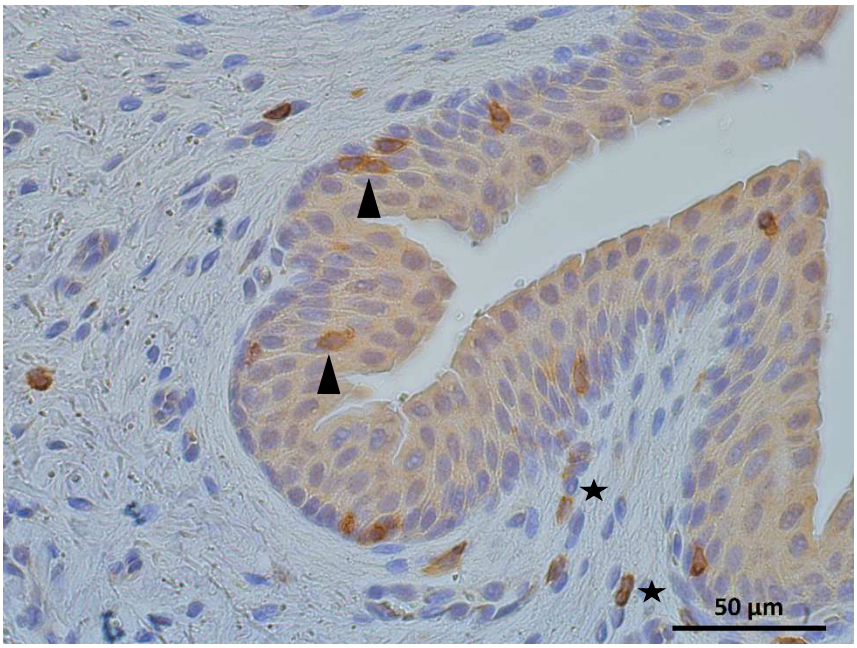


Abb. 40: CD 3 IR-positive T-Zellen auf Höhe der Basalmembran sowie innerhalb des Urothels (Pfeilspitze) bei einem Schaflamm. Ebenfalls IR-positive Zellen im submukösen Bindegewebe (Stern).

Die statistische Analyse hinsichtlich dieses Parameters konnte keinen statistisch signifikanten globalen Gruppenunterschied nachweisen. Die Lokalisationen unterschieden sich jedoch statistisch signifikant voneinander ($p = 0{,}002$; Abb. 41). Ebenso bestand eine signifikante Wechselwirkung zwischen Gruppe und Lokalisation ($p = 0{,}004$). Der Effekt der Lokalisation ist demnach nicht bei allen Gruppen derselbe. Die Lokalisationsunterschiede hängen von den Gruppen ab, d. h. die Lokalisationen verhalten sich innerhalb der Gruppen unterschiedlich. In der Gruppe der intakten Böcke ist eine ausgeglichene Verteilung der CD 3 IR-positiven Zellen vorhanden, während bei den früh- und spätkastrierten Tieren eine Zunahme der Immunzellen von distal nach proximal zu verzeichnen ist. Im Falle einer Harnsteinerkrankung fällt eine

Reduktion der CD 3 IR-positiven Zellen an den Lokalisationen 2 bis 4 auf. Die Details hierzu sind in Abbildung 41 ersichtlich.

Die Anzahl an CD 3 IR-positiven Zellen im Präputium war deutlich höher als dies im Bereich der Urethra der Fall war. Die untersuchten Gruppen wiesen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

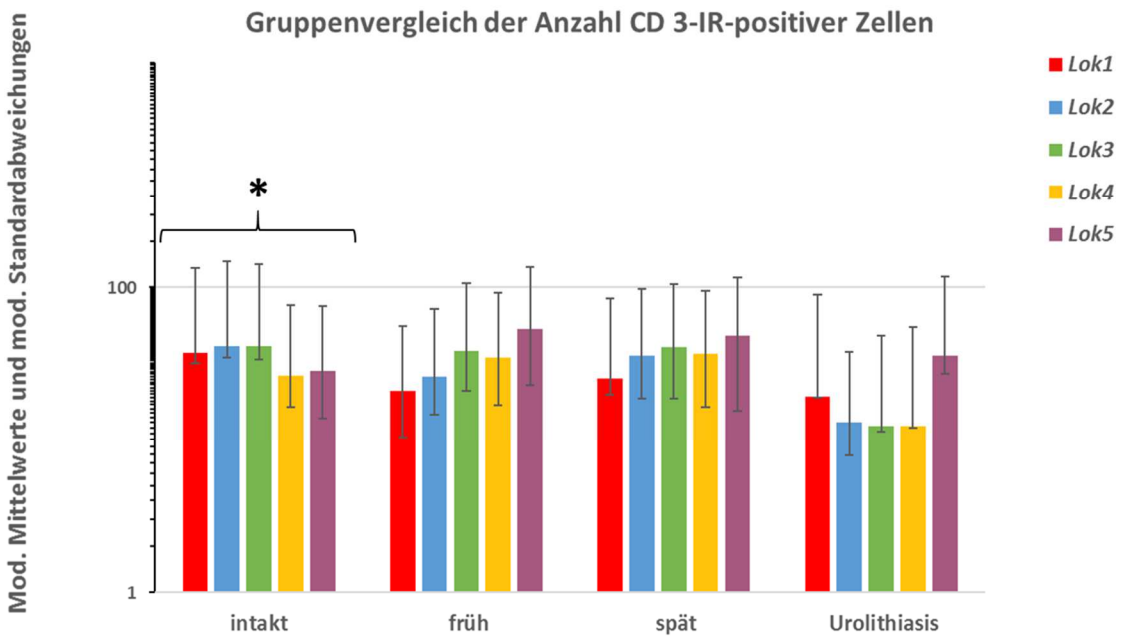


*Abb. 41: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für CD 3 positive T-Zellen. Der statistisch signifikante Lokalisationsunterschied ist von der Gruppenzugehörigkeit abhängig und ist mittels * markiert.*

CD 79α – Färbung

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen gegen den CD 79α-Komplex konnten lediglich bei wenigen der untersuchten Böcke (je Gruppe n = 5) in einzelnen der Urethralschnitte CD 79α-immunreaktive Zellen nachgewiesen werden. Ebenso konnten im Präputialgewebe bei wenigen Böcken vereinzelt IR-positive Zellen gefunden werden (Abb. 42). Diese befanden sich ausnahmslos im Bereich von Gefäßen innerhalb der Bindegewebsschicht der Submukosa. Eine quantitative Auswertung und Untersuchung der Gewebeproben von weiteren Tieren aus den einzelnen Untersuchungsgruppen entfiel daher aufgrund fehlender ersichtlicher Relevanz.

Die Positivkontrollen zu den Färbungen verliefen stets mit positivem Ergebnis (siehe Material und Methoden Teil Abschnitt 3).

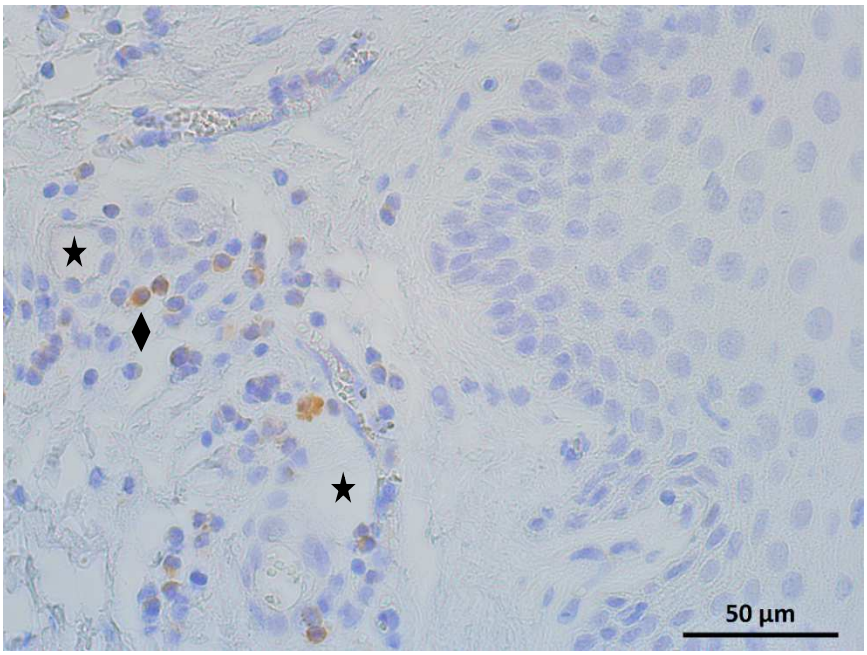


Abb. 42: Vereinzelte, schwach IR-positive Zellen (markiert durch Raute) für CD 79α in der Submukosa der Präputialschleimhaut bei einem Schaflamm mit Urolithiasis. Auffällig ist die unmittelbare Nähe zu Gefäßen (Stern). Rechts im Bild ist das mehrschichtige Epithel des Präputiums zu erkennen.

MAC 387 - Färbung

Die Färbungen gegen das Protein MAC 387 verliefen ebenso wie bereits für CD 79α beschrieben (Abb. 43). Auch hier erfolgte (aufgrund fehlender ersichtlicher Relevanz) keine quantitative Auswertung und Untersuchung der Gewebeproben von weiteren Tieren aus den einzelnen Untersuchungsgruppen.

Die Positivkontrollen zu den Färbungen verliefen stets mit positivem Ergebnis (siehe Material und Methoden Teil Abschnitt 3).

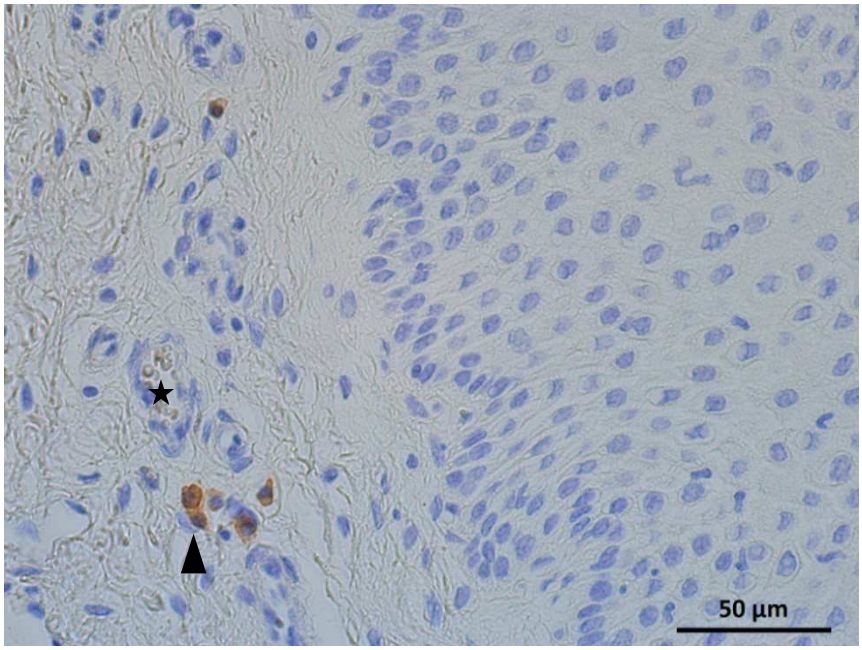


Abb. 43: Beispielhafte Darstellung einer sporadisch nachweisbaren IR-positiven Anfärbung von MAC 387 (Pfeilspitze) in der Submukosa der Präputialschleimhaut eines Lammes. Wiederum Nähe zu umliegenden Gefäßen erkennbar (Stern).

3. Neuropeptide und Innervationsdichte in der Urethra

Substanz P-Färbung

Die immunhistochemische Färbung gegen das Neuropeptid Substanz P verlief in nahezu allen Urethralschnitten der untersuchten Böcke konstant positiv (Abb. 44). Es wurden sowohl quer als auch längs angeschnittene SP-IR-positive Nervenfasern dargestellt, welche entweder innerhalb von Ganglien zu finden waren oder sich häufig in unmittelbarer Nähe von Gefäßen zeigten.

Schafböcke mit Urolithiasis zeigten eine deutlich reduzierte Anfärbung für Substanz P.

Diese reduzierte Anfärbung für Substanz P bei Böcken mit Urolithiasis zeigte sich in der statistischen Auswertung in einem hochsignifikanten globalen Gruppenunterschied ($p < 0{,}0001$). Die Lokalisationen unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander. Ebenso bestand keine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Gruppe und Lokalisation (Abb. 45).

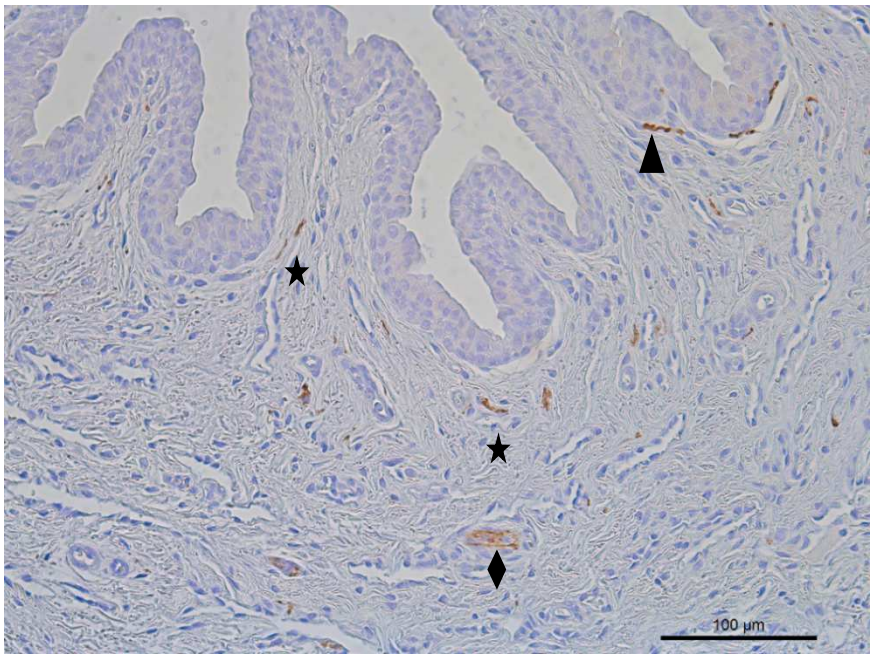


Abb. 44: Darstellung einer SP-IR-positiven Anfärbung (Pfeilspitze) in der Submukosa der Urethralschleimhaut eines Lammes. Die Anfärbungen befinden sich innerhalb der Nervenfasern von Ganglien (Raute) oder sind in der Nähe umliegender Gefäße lokalisiert (Stern).

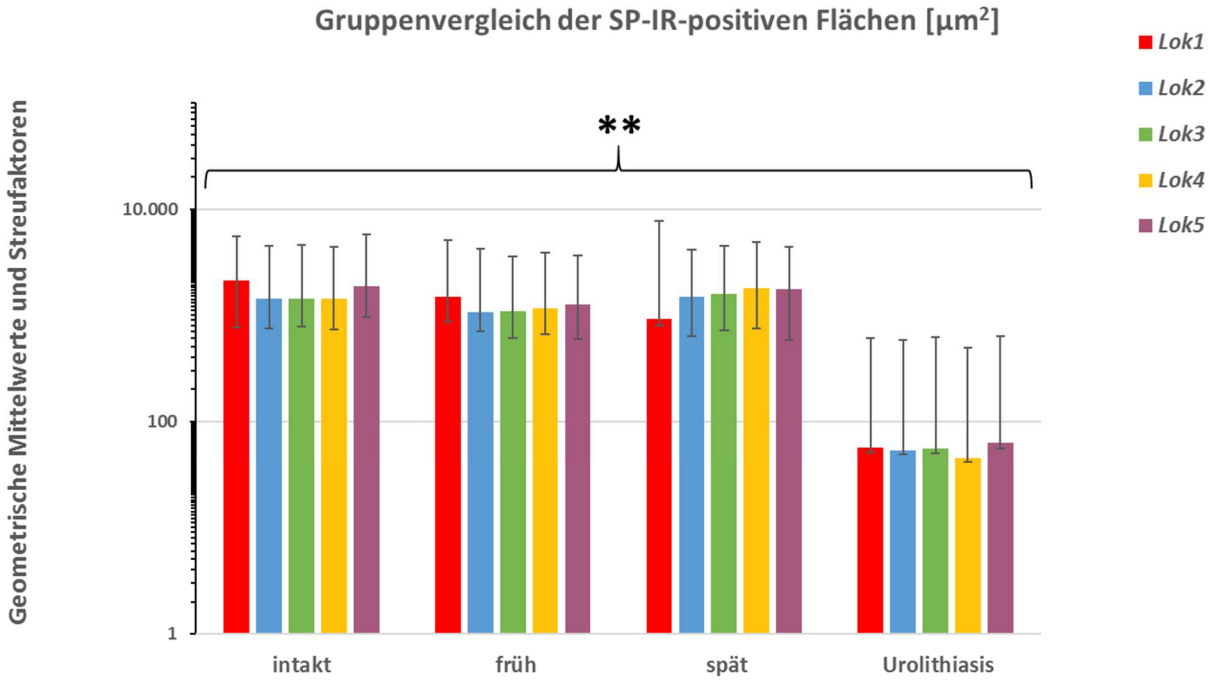


*Abb. 45: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für Substanz P. Der statistisch hochsignifikante globale Gruppenunterschied wird verursacht durch die Gruppe der an Urolithiasis erkrankten Böcke und ist mittels ** markiert.*

VIP-Färbung

Insgesamt zeigten sich dezente Anfärbungen für das relaxierende Neuropeptid VIP. Lediglich in Lokalisation fünf (Beckenflexur) konnten bei allen Böcken konstant deutliche Anfärbungen verzeichnet werden (Abb. 46).

Die deutlichere Anfärbung für VIP im Bereich des Arcus ischiadicus resultierte in der statistischen Auswertung in einem hochsignifikanten Lokalisationsunterschied ($p < 0{,}0001$). Außerdem konnte ein signifikanter globaler Gruppenunterschied nachgewiesen werden ($p = 0{,}02$). Eine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen den Faktoren Gruppe und Lokalisation bestand hierbei nicht (Abb. 47).

Im paarweisen Gruppenvergleich konnte gezeigt werden, dass sich die Gruppe der Böcke mit Urolithiasis hinsichtlich des Parameters VIP signifikant von allen anderen Gruppen unterscheidet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht über die p-Werte für den paarweisen Gruppenvergleich bezüglich VIP

Gruppenvergleich	p-Werte
Urolithiasis vs. intakt	0,006
Urolithiasis vs. frühkastriert	0,05
Urolithiasis vs. spätkastriert	0,003

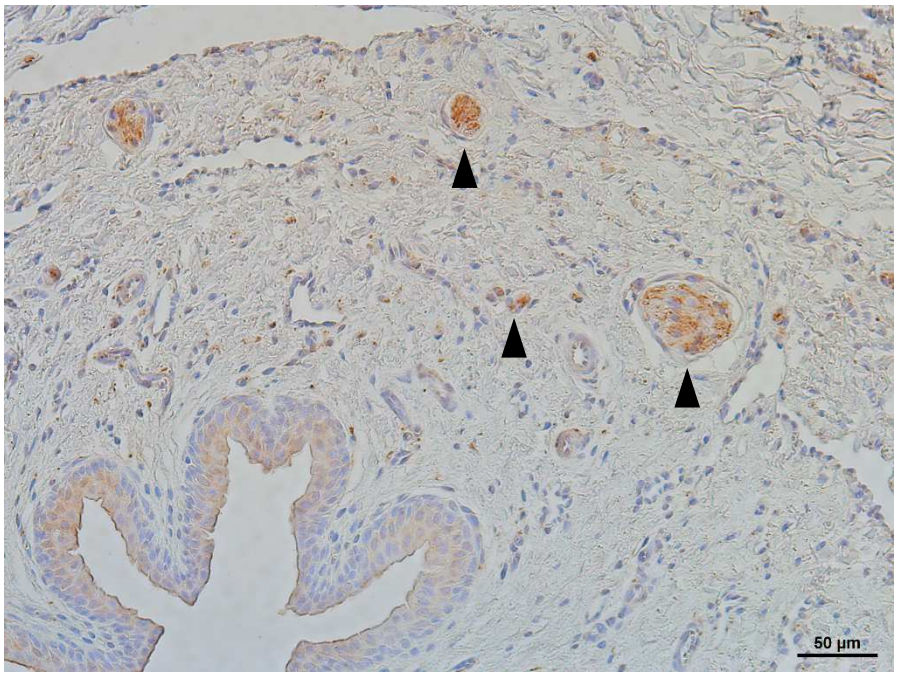


Abb. 46: Darstellung VIP-IR-positiver Anfärbungen (Pfeilspitze) in Ganglien und Nervenfasern des periurethralen Gewebes.

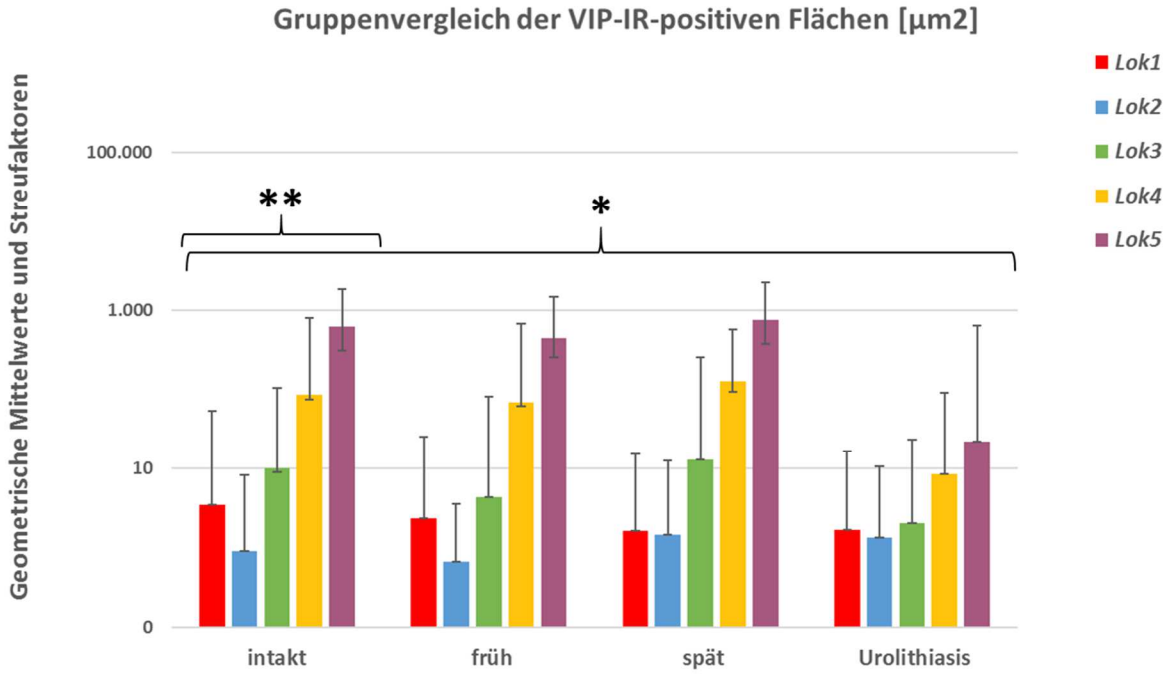


*Abb. 47: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für VIP. Der statistisch hochsignifikante Lokalisationsunterschied wird verursacht durch die in Lokalisation 5 deutlicher ausgeprägten Anfärbungen und ist mittels ** markiert. Der ebenfalls bestehende statistisch signifikante globale Gruppenunterschied ist mittels * markiert.*

NF-Färbung

Die Gesamtinnervation wurde durch immunhistochemische Anfärbung des Neurofilaments dargestellt. In allen Schnitten wurden IR-positive Signale detektiert. Besonders deutlich war die Anfärbung der Nervenfasern im Bereich des Arcus ischiadicus (Lokalisation 5) (Abb. 48), aber auch die anderen vier Lokalisationen wiesen durchgängig positive Signale für NF auf.

Anhand der Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA konnten sowohl bezüglich des globalen Gruppenvergleichs als auch bezüglich des Lokalisationsvergleiches hochsignifikante Unterschiede ermittelt werden ($p < 0,0001$) (Abb. 49). Eine eventuell bestehende Wechselwirkung zwischen den Faktoren Gruppe und Lokalisation wies keine statistische Signifikanz auf.

Der im Anschluss an die zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführte paarweise Gruppenvergleich für den Parameter NF wies hochsignifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Böcke mit Urolithiasis und den anderen Untersuchungsgruppen auf. Die p-Werte aller möglichen Anpaarungen lagen bei $p < 0,0001$.

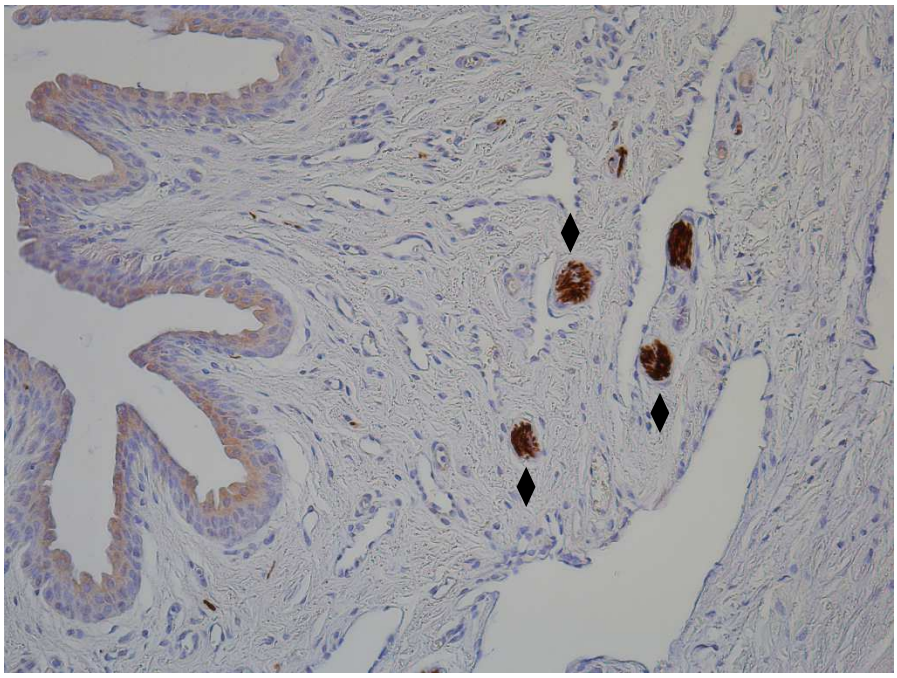


Abb. 48: NF-IR-positive Anfärbungen der Nervenfaserbündel (Raute) im periurethralen Gewebe an Position 5 eines Studienbockes.

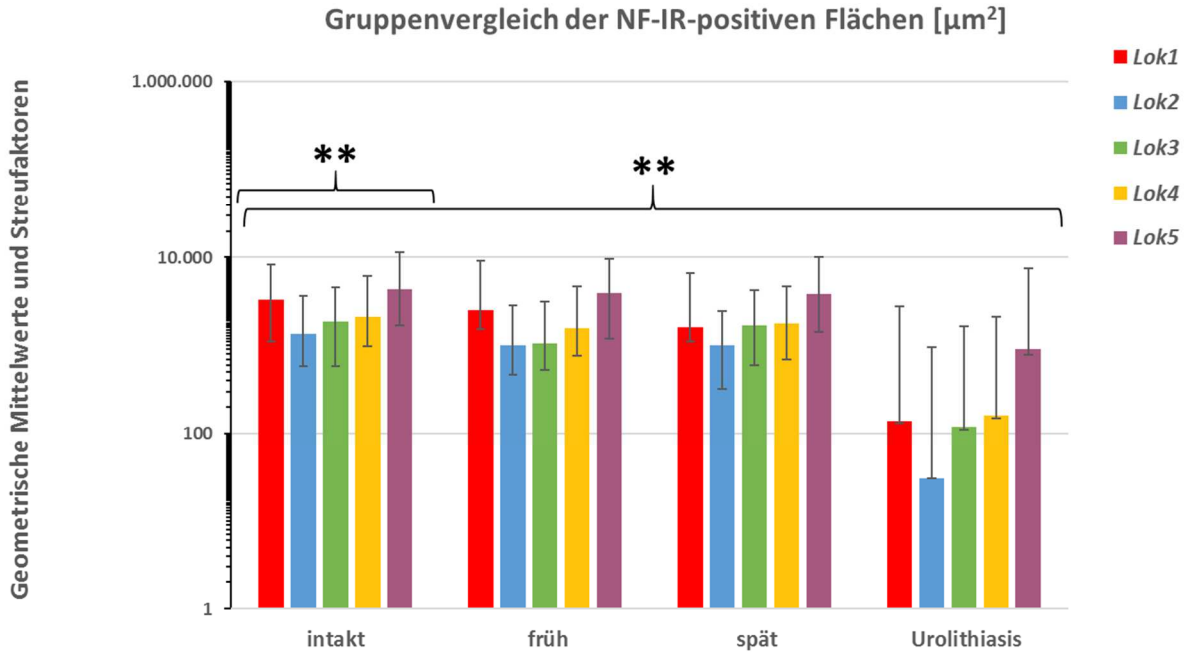


*Abb. 49: Graphische Darstellung des Gruppenvergleichs für NF. Die statistisch hochsignifikanten globalen Gruppen- sowie Lokalisationsunterschiede sind mittels ** markiert.*

Korrelationsanalysen

Bezüglich der möglicherweise vorhandenen Korrelationen zwischen den einzelnen Färbungen konnte lediglich bei den an Urolithiasis erkrankten Böcken an Lokalisation 2 eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der Substanz P immunreaktiv positiven Fläche und der Anzahl an IR-positiven CD 3 T-Zellen ermitteln werden ($p = 0,02$; $R = -0,8$; Abb. 50). Die Korrelationsanalysen der anderen Gruppen bzw. Lokalisationen verlief mit statistisch nicht signifikantem Ergebnis.

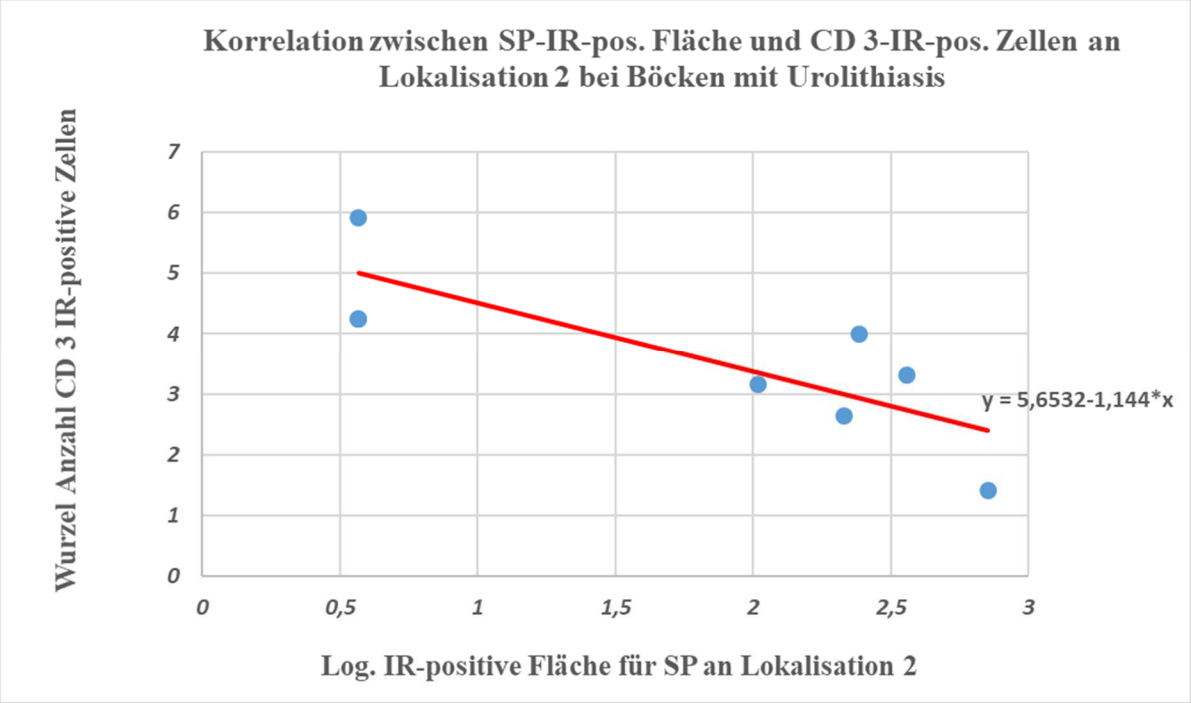


Abb. 50: Graphische Darstellung der negativen Korrelation zwischen Substanz P immunreaktiver Fläche und der Anzahl an CD 3 IR-pos. Zellen bei Böcken mit Urolithiasis.

Abschnitt 4 – Modifikation bestehender Operationstechniken

Bei allen drei gesunden Schlachtlämmern war es möglich, die Operationsmethode wie oben beschrieben durchzuführen (Abb. 51-56). Auffällig hierbei war, dass eine mehrfache Wiederholung der Endoskopie oder ein mehrfaches Katheterisieren der Urethra zu einer deutlichen Erhöhung des Widerstandes beim Einführen des Endoskopes respektive des Urethralkatheters geführt hat. Entsprechende Schleimhautschädigungen waren im endoskopischen Bild zu erkennen (Abb. 57).

Neben der bereits beschriebenen Methode, das Endoskop über die Blase in die Urethra einzuführen, gelang es außerdem, das Endoskop retrograd bis in die Blase einzuführen. Nach endoskopischer Darstellung des Recessus urethralis (Abb. 57) und Überwinden desselben, konnte ein Führdraht in die Blase eingelegt werden. Über diesen Führdraht war es möglich, einen Ballonkatheter in die Blase einzubringen und ihn dort zu blocken. Eventuell vorhandene Harnkonkremente bzw. Harnsteine sind im endoskopischen Bild leicht zu identifizieren (Abb. 58).

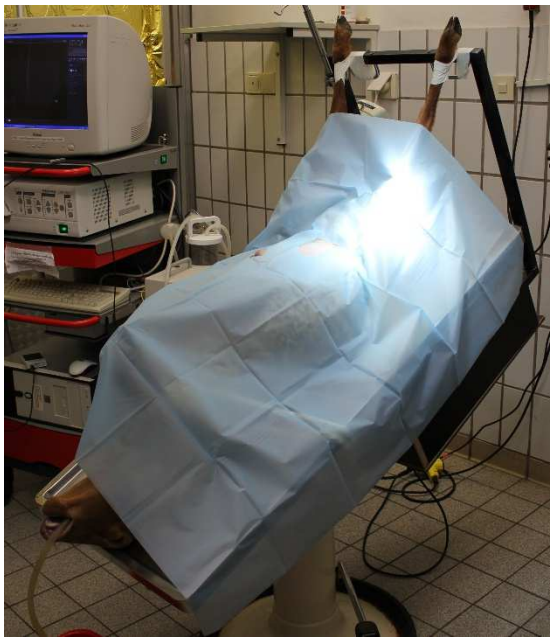


Abb. 51: 45° Trendelenburg-Position bei einem Schaflamm zur Endoskopie der Urethra mit endoskopischem Einlegen eines transurethralen Ballonkatheters in die Blase.

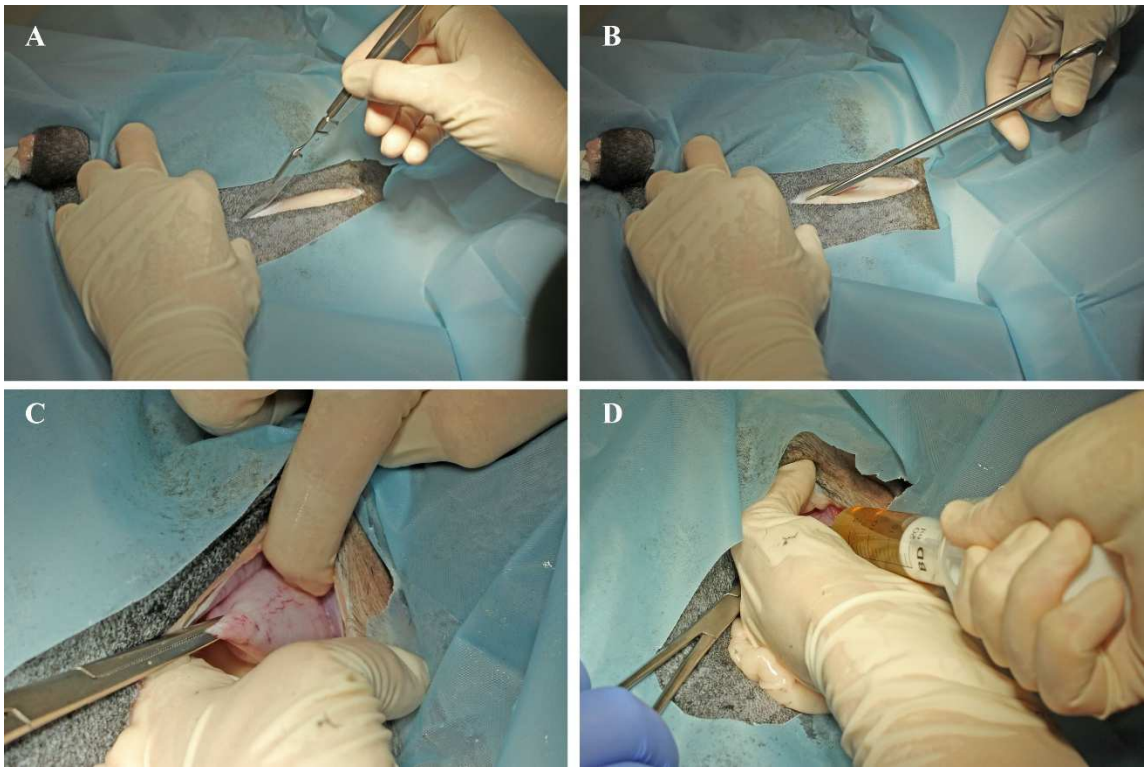


Abb. 52: (A) Anlegen eines Hautschnittes und (B) Präparieren des Zuganges zur paramedianen Laparotomie; (C) Aufsuchen und Darstellen des kranialen Blasenpols mit (D) anschließendem Entleeren der Blase mittels intraoperativer Zystozentese

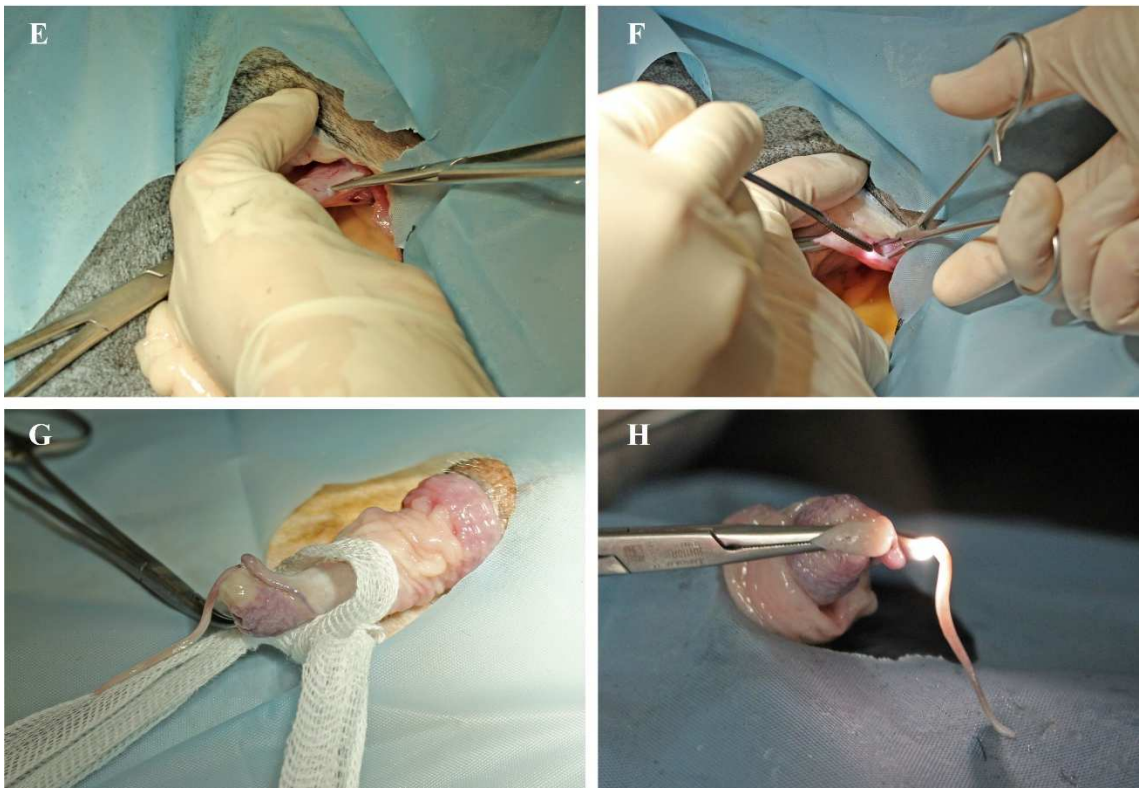


Abb. 53: (E) Eröffnen der Blase und (F) Einführen eines flexiblen Endoskopes in das Cavum vesicae; (G) Vorlagern des Penis aus der Präputialscheide und (H) Vorschieben des Endoskopes bis zum Processus urethralis

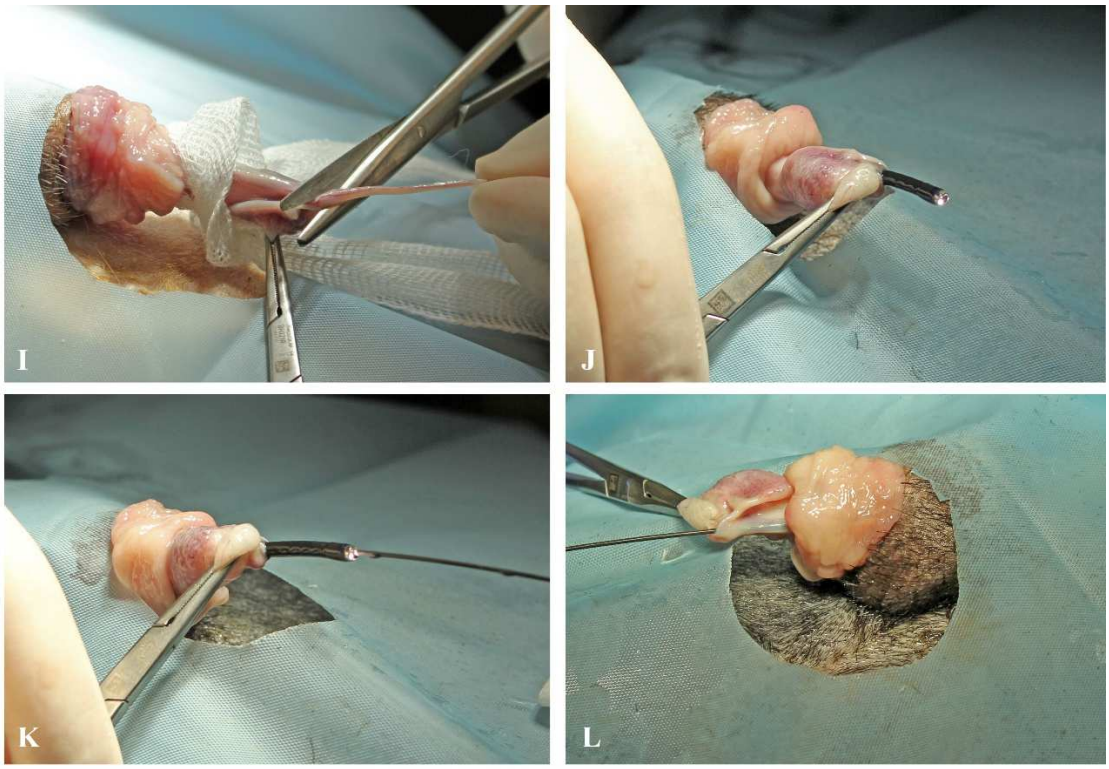


Abb. 54: (I) Absetzen des Processus urethralis, falls dieser für die Passage des Endoskopes zu eng ist, und (J) Ausführen der Endoskopspitze und des Führdrahtes (K). Zurückziehen des Endoskopes aus der Urethra unter Verbleib des Führdrahtes (L).

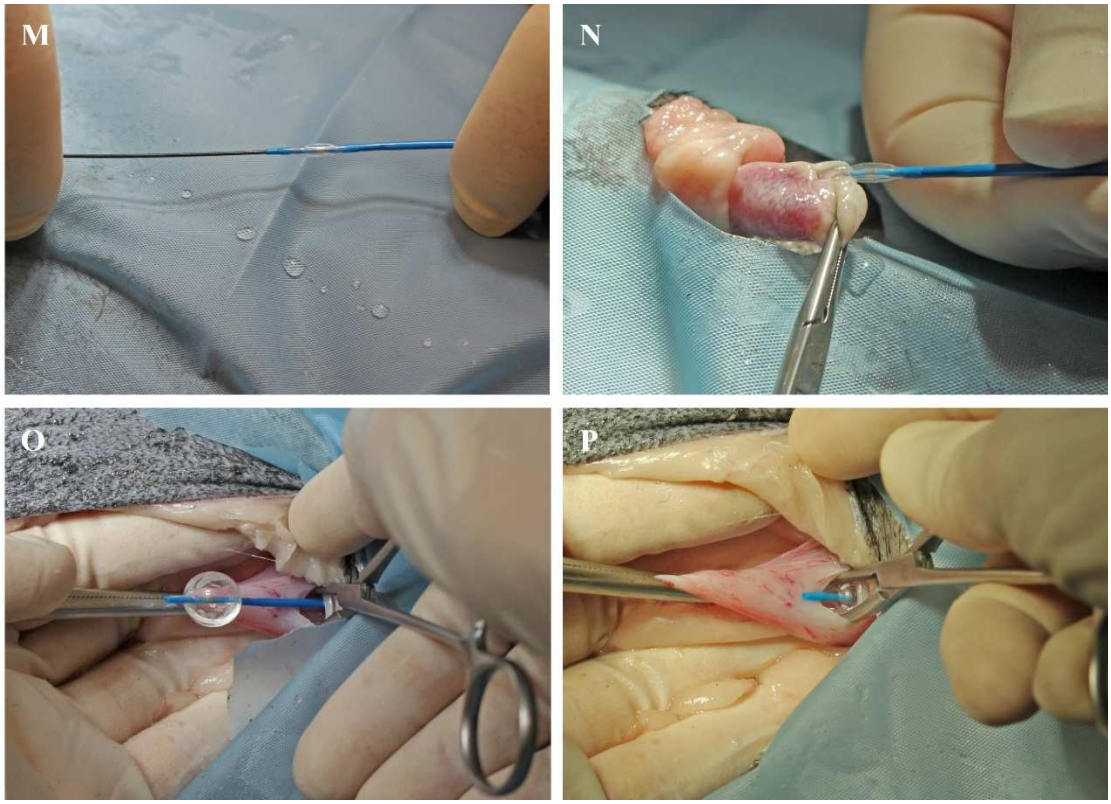


Abb. 55: (M) Einführen des Führdrahtes in den Ballonkatheter und Vorschieben desselben über die Urethra (N) bis in die Harnblase (O). Nach Blocken des Ballons Zurückverlagerung in die Blase (P) mit anschließendem Sitz im Trigonum vesicae.

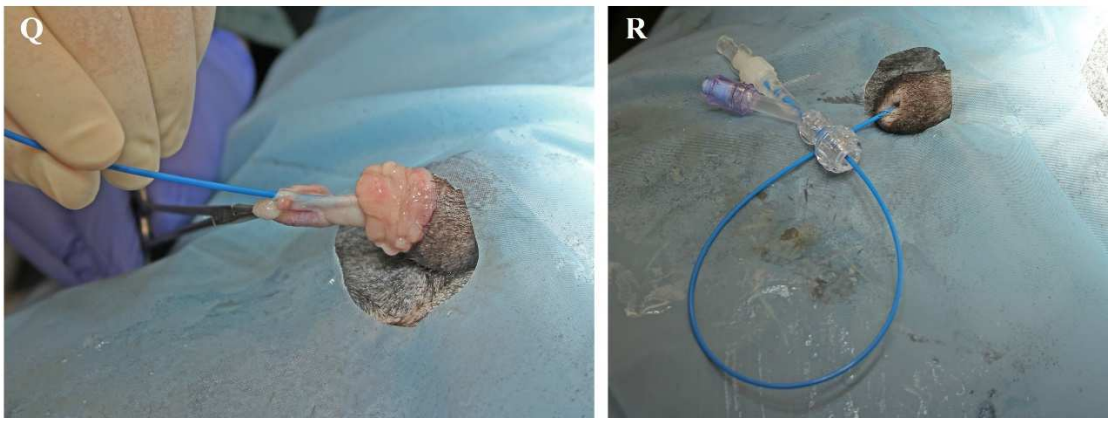


Abb. 56: (Q) Durch leichten Zug am Katheter Kontrolle des festen Sitzes und Fixation an der ventralen Bauchwand möglich (R).

Abb. 57: Retrograd durchgeführte Endoskopie der Harnröhre mit Darstellung der Plica vesicalis bei einem 5 Monate alten Schaflamm. Die im Bild mittels Blockpfeil markierte Schleimhautlamelle trennt die Urethra vom blind endenden Recessus urethralis ab und stellt ein häufiges Hindernis bei der retrograden Katheterisierung der Urethra des kleinen Wiederkäuers dar. Zu beachten ist die durch versuchte Katheterisierung traumatisierte Schleimhaut des Recessus urethralis (obere Bildhälfte).

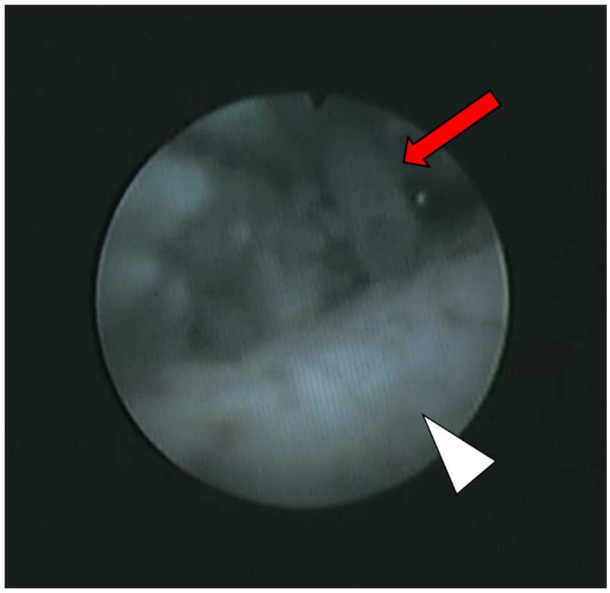


Abb. 58: Harnkonkremente (im Bild mittels Blockpfeil markiert) in der proximalen Urethra des Schaflammes aus Abb. 51. Die durch die Konkremente traumatisierte Schleimhaut der Urethra ist in der unteren Bildhälfte deutlich zu erkennen und mittels Pfeilspitze markiert.

Eine therapeutische Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens bei einem Klinik-Patienten mit obstruktiver Urolithiasis musste leider aufgrund einer bereits manifesten Nekrose der Penisspitze unterbleiben. Die Nutzung des Tieres als Zuchtbock konnte nicht gewährleistet werden, sodass sich die Besitzer des Tieres gegen einen weiteren Therapieversuch entschieden. Eine Endoskopie der Urethra am euthanasierten Bock wurde dennoch durchgeführt (Abb. 59).

Abb. 59: Endoskopische Aufnahme einer obstruktiven Urolithiasis bei einem 2-jährigen Merino Schafbock im Bereich der distalen Beckenflexur. Das Endoskop wurde in diesem Fall im Rahmen einer Zystotomie normograd in die Urethra eingeführt.

Diskussion

Abschnitt 1 – Meta-Analyse

1. Prävalenz von Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken

Prävalenz-Studien beschäftigen sich mit der Häufigkeit einer bestimmten Erkrankung oder eines Merkmals innerhalb einer definierten Gruppe (der Population) zu einem bestimmten Zeitpunkt (Müller, 2017). Im Rahmen der eigenen Meta-Analyse zur Prävalenz von Urolithiasis konnten jedoch keine Daten zur Situation in der Population gefunden werden (weder international noch national). Daher kann nur eine Schnittmenge der Gesamtpopulation beurteilt werden. Diese Schnittmenge besteht aus den Kontrollgruppen der untersuchten Studien und unterliegt dem Einfluss einer annähernd gleichen Fütterung. Somit ist lediglich eine Aussage zu der Situation unter dem gegebenen Fütterungseinfluss möglich. Dies ist bei der Interpretation der vorgelegten Ergebnisse zu berücksichtigen. Außerdem ist zu beachten, dass in beiden untersuchten Subpopulationen ein hohes Maß an Heterogenität vorliegt. Dieses wird angezeigt durch die hohen Werte für das Maß I^2 nach Higgins / Thompson (Higgins et al., 2003). Da Knippschild et al. (2015) bereits ab einem I^2-Wert von 50 % von der Durchführung einer Meta-Schätzung abraten, wurde in der eigenen Studie eine solche Schätzung zwar durchgeführt, jedoch wurde dies jeweils ergänzt um die gemeinsame Effektgröße der gemeinsamen Prävalenz nach Entfernen der signifikant vom Studiendurchschnitt abweichenden Einzelstudien.

Innerhalb der im Rahmen der Analyse bewerteten Studien besteht zudem ein nicht zu vernachlässigender Verzerrungseffekt. Dieser besteht in einem Randomisierungsbias (Sargeant und O'Connor, 2014a), d. h. die Art der Gruppeneinteilung erfolgte nicht in allen Studien zufällig, sondern in einigen Studien gewichtsabhängig. Dies ist zwar in veterinärmedizinischen Studien eine häufig angewandte Methode der Gruppenzuteilung (Sargeant und O'Connor, 2014a), muss jedoch im Sinne einer Auswahlverzerrung kritisch betrachtet werden. Außerdem handelt es sich bei der bearbeiteten Fragestellung um eine epidemiologische Erhebung. Es können also keine klassischen Effektstärken ermittelt werden, wie es sonst in Meta-Analysen der Fall ist (O'Connor et al., 2014b). Hierfür wäre beispielsweise der Vergleich zweier Behandlungsmethoden oder zweier Eigenschaften innerhalb der Population notwendig. Die Ergebnisse der eigenen Studie sind somit unter Vorbehalt zu sehen, liefern jedoch insbesondere nach Einbezug der Homogenitätstests eine in ihrer Verlässlichkeit höhere Aussage als die Einzelstudien. Somit ist im Falle einer Hirse-basierten Fütterung bei kleinen Wiederkäuern von einer geschätzten gemeinsamen Prävalenz für Urolithiasis von 55,6 % und bei Mais-basierter

Fütterung von einer solchen von 5,1 % auszugehen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Analyse der Hirse-basierten Fütterung wesentlich mehr Studien einschloss als dies im Falle der Maisfütterung möglich war. Daher ist die Aussage zur Prävalenz im erstgenannten Fall verlässlicher.

Neben diesen rein statistisch formalen Kritikpunkten ist zu bedenken, dass in Deutschland eine Hirse-basierte Fütterung kleiner Wiederkäuer eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Stattdessen werden bei der Fütterung von Schafen und auch in der Lämmermast eher Mischfuttermittel auf Gersten-, Hafer- oder Maisbasis angeboten (Pries und Menke, 2005). Welche Urolithiasis-Prävalenz eine Gerste- oder Hafer-basierte Fütterung zur Folge hat, kann anhand der untersuchten Daten nicht ermittelt werden. Somit sind die Ergebnisse der Meta-Analyse nicht unbedingt auf die Schafpopulation in Deutschland anzuwenden.

Herausragende Bedeutung haben die erhobenen Daten jedoch international in den weltweit größten Produktionsländern für Schaf- und Ziegenprodukte (Fleisch, Milch, Wolle), namentlich Australien, China, Indien, Neuseeland und Pakistan (Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2018). In diesen Ländern stellt eine Hirse- bzw. Mais-basierte Fütterung kleiner Wiederkäuer ein übliches Vorgehen dar. Dies erklärt, weswegen die für die Meta-Analyse zur Verfügung stehende Literatur Angaben zu dieser Futtergrundlage enthält.

2. Kastration

Bezüglich der Frage, ob kastrierte männliche kleine Wiederkäuer häufiger an Urolithiasis erkranken, kann keine evidenzbasierte Aussage getroffen werden. Hier herrscht ein deutliches Publikationsbias vor, welches darin besteht, dass epidemiologische Erhebungen hierzu völlig fehlen. Entsprechende Aussagen beziehen sich lediglich auf die retrospektive Auswertung verschiedener Patientenkollektive aus unterschiedlichen Kliniken (Haven et al., 1993; Ewoldt et al., 2006; Dühlmeier et al., 2007). Für die Klärung der Frage, ob kastrierte Tiere tatsächlich häufiger betroffen sind als intakte Tiere, ist eine solche Herangehensweise jedoch nicht zielführend. Hier müssten epidemiologische Untersuchungen an intakten sowie kastrierten Tieren unter identischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen durchgeführt werden. Die Verzerrung innerhalb der genannten retrospektiven Studien stammt hingegen insbesondere von einer überdurchschnittlich hohen Zahl an kastrierten (Ziegen-)Böcken im Bereich der Hobbyhaltung. Während die Halter dieser Liebhabertiere aufgrund ihres emotionalen Bezuges zu ihrem Tier eher bereit sind, eine Therapiemaßnahme bei Urolithiasis zu veranlassen, stellt dies häufig für den Berufsschäfer keine Alternative dar. Dies wiederum hat zur Folge, dass Böcke aus Berufsschäfereien eher zeitnah nach Erkrankung geschlachtet werden und somit

auch in keinem Patientenkollektiv auftreten. Vordergründig erscheint die Anzahl an Kastraten innerhalb der behandelten Patienten also höher als diejenige an intakten Tieren. Die eigentliche Situation sähe bei einer Populations-basierten Analyse daher vermutlich anders aus.

3. Erfolgsrate nach Durchführung chirurgischer Operationsverfahren bei obstruktiver Urolithiasis am Schaf- und/oder Ziegenbock

Da in der eigenen Meta-Analyse keine direkte Gegenüberstellung zweier Therapiemethoden erfolgte, sondern lediglich die Erfolgsrate der verschiedenen Operationsmethoden in verschiedenen Studien überprüft wurde, besteht das Ergebnis nicht wie klassischerweise dargestellt als „Odds Ratio“ oder „Risk Ratio“ (O'Connor et al., 2014b), sondern als Proportion erfolgreich mit der jeweiligen Methode therapierter Patienten. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da es keine Standard-Methode bzw. keinen international anerkannten Gold-Standard für die Therapie bei obstruktiver Urolithiasis beim kleinen Wiederkäuer gibt, wenngleich bei Ziegen die Durchführung einer Katheterzystotomie als erfolgversprechend eingestuft wird (Videla und van Amstel, 2016). Daher erfolgte keine klassische PICO-Analyse mit Vergleich zweier Interventionen (Schmidt, 2007).

Die Ergebnisse der durchgeführten Meta-Analyse müssen, wie bereits für die Ergebnisse der Prävalenzstudie diskutiert, zumindest teilweise unter Vorbehalt gesehen werden. Während für die Verfahren der Perinealen Urethrostomie, für die Marsupialisation der Blase sowie für die ultraschallgestützte Katheterzystotomie jeweils ein geringes Maß an Heterogenität ermittelt wurden, wiesen die Einzelstudien hinsichtlich der Amputation des Processus urethralis und der laparotomischen Katheterzystotomie höhere Heterogenitäten auf. Dies gilt entsprechend der Einteilung des Cochrane Handbuchs (Higgins und Green, 2011) insbesondere für die laparotomische Katheterzystotomie mit I^2 = 66 %. Für Werte zwischen 50 % und 90 % wird hier von einer möglicherweise substantiellen Heterogenität gesprochen. Diese ist vermutlich begründet durch ein sehr heterogenes Patientenkollektiv in den untersuchten Studien. Dennoch lassen sich zumindest anhand des fixed effect Modells gemeinsamen Erfolgsraten vergleichen und eine gewisse Reihung der Therapieverfahren erstellen. Demnach stellt die Marsupialisation mit einer gemeinsamen geschätzten Erfolgsrate von 0,77 die effektivste Therapiemethode dar. In absteigender Reihenfolge schließen sich die Perineale Urethrostomie (0,71), die laparotomische Katheterzystotomie (0,66), die Amputation des Processus urethralis

(0,41) sowie die sonographische Katheterzystotomie an (0,15). Nicht zu vernachlässigen ist jedoch, dass in dieser Betrachtungsweise den Komplikationsraten und Begleiterscheinungen

keinerlei Beachtung geschenkt wird. So ist beispielsweise die unabdingbare Inkontinenz nach Marsupialisation für Besitzer von Hobbytieren eine gravierende Begleiterscheinung, über die aufgeklärt werden muss und welche pflegerische Maßnahmen nach sich zieht (May et al., 1998). Stützt sich die Behandlungsentscheidung des behandelnden Tierarztes alleine auf die Daten aus der Meta-Analyse, so widerspricht dies dem eigentlichen Sinn einer solchen Analyse. Wie Schmidt (2007) bereits klar herausgestellt hat, dient die EBVM zwar der Ermittlung des wissenschaftlich korrekten Vorgehens, die eigene klinische Erfahrung sowie die Bedürfnisse der Tiere und diejenigen ihrer Besitzer dürfen dennoch nicht unberücksichtigt bleiben.

Abschnitt 2 – Sonographie

Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Darstellung der Urethra auch beim jungen Bocklamm im Alter von 3-4 Wochen mit ausreichender Sicherheit möglich ist. Während entsprechende sonographische Untersuchungen am oberen Harntrakt von weiblichen sowie männlichen Ziegen, Schafen und Rindern bereits seit längerem in der Literatur genannt werden (Braun et al., 1992b; Braun et al., 1992a; Braun, 1993; Scott, 2000, 2013), sind die hier präsentierten Untersuchungen nach derzeitigem Kenntnisstand der erste Versuch, intra-vitam Messungen der Harnröhre am Schaflamm vorzunehmen. Bezüglich des Vergleichs der Daten von kastrierten und intakten Schafböcken konnte gezeigt werden, dass sich die Gruppen global betrachtet voneinander unterscheiden. Die Durchmesser der Urethra sowie das Urethrallumen fallen im Mittel bei den kastrierten Tieren niedriger aus als bei den intakten Kontrolltieren. Allerdings muss hierbei gesagt werden, dass lediglich für den Untersucher 1 statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden konnten. Außerdem muss die in dieser Untersuchung ermittelte geringe Korrelation zwischen den beiden Untersuchern kritisch hinterfragt werden. Diese Ergebnisse können mehrere Ursachen haben. Einerseits könnte der unterschiedliche Grad an Erfahrung beider Untersucher zu diesem Ergebnis beigetragen haben. Ähnliche Effekte konnten bereits für sonographische Untersuchungen zur Otitis media beim Kalb beobachtet werden (Gosselin et al., 2014). Die Autoren ermittelten in ihrer Studie eine nur moderate Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse für die beiden eingesetzten Untersucher und führten dieses Ergebnis ebenfalls auf einen unterschiedlichen Erfahrungsstand zurück.

Anhand der statistischen Analyse der sonographischen Morphometrie in der eigenen Studie konnte gezeigt werden, dass Untersucher 1 stets höhere Messwerte ermittelte als Untersucher 2, und dass diese Unterschiede mit der Größe des Messwertes zunahmen. Dies könnte neben der größeren Erfahrung des Untersuchers 1 an einem näheren zeitlichen Bezug zur Durchführung

der Untersuchung gelegen haben. Während Untersucher 1 die Auswertungen meist in direktem zeitlichem Zusammenhang mit den sonographischen Untersuchungen durchgeführt hat, wurden die Auswertungen durch Untersucher 2 erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Dies hatte zur Folge, dass ein geringerer Bezug zur eigentlichen Untersuchung bestand und sehr viele Daten aufgelaufen waren. Dies wiederum führte dazu, dass die aufgewendete Zeit pro durchzuführender Auswertung dadurch geringer wurde. Eventuell könnte dies die Auswertung insgesamt negativ beeinflusst haben. Auszuschließen ist dagegen, dass die Untersucher zum Zeitpunkt der Auswertung Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der untersuchten Böcke hatten, da auf den Sonographie-Bildern keine entsprechenden Vermerke hinterlegt wurden. Eine klassische Verblindung der erzeugten Daten (mit separaten Untersuchern und Auswertenden) lag jedoch nicht vor. Ein solches Vorgehen zur Vermeidung eines eventuellen Zuordnungs-Bias wird zwar für sonographische Diagnostikverfahren am Rind empfohlen (Buczinski und O'Connor, 2016), war aber aus organisatorischen Gründen nicht durchführbar.

Bei der Durchführung der sonographischen Untersuchungen insgesamt ist ebenfalls als kritisch zu beurteilen, dass im Rahmen der eigenen Studie nicht die Möglichkeit bestand, eine definierte Andruckstärke der Ultraschallsonde anzuwenden. Eine Kontrolle der Andruckstärke kann beispielsweise durch Anbringen eines elektronischen Drucksensors an die Ultraschallsonde gewährleistet werden (Alpert et al., 2017). Ein solches System stand jedoch für die hier präsentierten Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die eigenen sonographischen Untersuchungen gut geeignet sind, die Verhältnisse an der distalen Urethra verlässlich darzustellen. Hierfür spricht, dass das Wachstum der Bocklämmer und die damit verbundene Größenzunahme des Urethrallumens von beiden Untersuchern mit einer hohen statistischen Signifikanz nachgewiesen wurden (zeitlicher Verlauf). Außerdem konnten beide Untersucher zeigen, dass das Urethrallumen bei kastrierten Tieren kleiner ist als bei intakten Tieren. Der Umstand, dass die Ergebnisse bei Untersucher 2 das Signifikanzniveau nicht erreicht haben, wird wie bereits erwähnt, auf den Erfahrungsgrad dieses Untersuchers zurückgeführt. Es ist daher davon auszugehen, dass bei stets gleichem Untersucher auch vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, so wie dies auch im Rahmen der Vorversuche bereits erfolgt war. Die Anwendung der Sonographie zur Darstellung des Urethrallumens kann also als Diagnostikum durchaus empfohlen werden. Indikationen zum Einsatz dieser Untersuchungstechnik werden sowohl bei Fällen bestehender Harnabsatzstörung gesehen, als auch zur prophylaktischen Untersuchung und Einschätzung des Risikos, eine obstruktive Urolithiasis zu entwickeln. Die im Rahmen der Studie ermittelten, physiologischerweise bei kastrierten sowie intakten Bocklämmern

vorhandenen Urethraldurchmesser dienen als Referenzwerte und konnten bereits veröffentlicht werden (AlLugami et al., 2017). Unter der Voraussetzung, dass die Urethra bei einem sehr früh (im Alter von ca. 3 Wochen) kastrierten Bocklamm keine oder nur eine marginale Größenzunahme erfährt, sollte – diesen Referenzwerten entsprechend – eine Kastration bei einem sonographisch ermittelten mittleren Urethraldurchmesser von weniger als 0,4 mm eventuell eher zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen (AlLugami et al., 2018). Zu beachten ist hierbei, dass es sich um den Durchmesser der kollabierten Harnröhre (also nicht während des Harnabsatzes) handelt. In diesem Punkt ist ein weiterer Kritikpunkt der genutzten Technik begründet. Während beim Menschen eine sonographische Untersuchung der Urethra während des willentlich kontrollierbaren Harnabsatzes und einer damit maximal gedehnten Urethra möglich ist (Shaida und Berman, 2012; Chen et al., 2017), ist dies beim Tier nicht durchführbar. Im Interspezies-Vergleich kommt dem Einfluss der Kastration auf den unteren Harntrakt insbesondere beim Hund eine große Bedeutung zu. Nach Kastration weiblicher Tiere großwüchsiger Rassen kommt es häufig zu einer Harninkontinenz mit Absinken des Verschlussdrucks der Urethra (Reichler, 2010). Geschlechtsunabhängig liegt diesem Verlust des Urethralschlusses nach neueren Untersuchungen eine Abnahme der Urethralmuskulatur in Verbindung mit einem höheren Anteil an Kollagenfasern in der Urethralwand zugrunde (Ponglowhapan et al., 2008). Ein exzessiver Einbau kollagener Fasern bedingt hierbei eine verminderte Elastizität der Urethra. Die vorhandene Literatur gibt jedoch keinen Hinweis zu möglichen Konsequenzen dieser morphologischen Veränderungen hinsichtlich des Durchmessers der Urethra. Eine Beeinflussung des Urethrallumens ist jedoch nach eigener Einschätzung wahrscheinlich. Betrachtet man die Verhältnisse an der Urethra im Geschlechtervergleich, so fällt auf, dass der Kollagengehalt der Urethra beim kastrierten Rüden in etwa demjenigen bei der unkastrierten Hündin entspricht. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Rüden nach Kastration wesentlich seltener inkontinent werden als Hündinnen. Übertragen auf die eigenen Ergebnisse lässt sich hieraus ableiten, dass die sonographisch feststellbaren geringeren Urethrallumen bei kastrierten Schafböcken vermutlich in einer verminderten Elastizität der Urethra begründet sind. Das in der zeitlichen Entwicklung nach der Kastration eintretende Größenwachstum und damit eine Zunahme des Urethrallumens kann aufgrund der Kollagenisierung der Urethra nicht adäquat erfolgen und führt relativ gesehen zu einer Verengung derselben.

Abschnitt 3 – Immunhistochemische Untersuchungen

1. Technische Aspekte

Die Anwendung immunhistochemischer Methoden findet ihren Ursprung in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts und wurde hier an Mäusen zur Zelldifferenzierung innerhalb von retikulären Sarkomen genutzt (Taylor, 1976). In den bis heute vergangenen 40 Jahren hat sich insbesondere der Anspruch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit einer Quantifizierung solch immunhistochemischer Färbungen deutlich erhöht (Taylor und Levenson, 2006; Taylor, 2015). Um eine verlässliche quantitative Analyse von IHC-Verfahren überhaupt durchführen zu können, sind reproduzierbare und kontrollierbare IHCs unerlässlich (Taylor, 2015). Dies gelingt ausschließlich, wenn der bisherige Kenntnisstand möglicher, die Färbungen beeinflussender Faktoren, Beachtung findet. Hierzu zählen insbesondere die Probengewinnung und deren Präparation, die Fixationsart und -dauer, die Wahl der verwendeten Antikörper, die Anwendung von Antigen-Retrieval-Systemen, der Untersucher selbst sowie das Labor, in welchem die Untersuchungen durchgeführt werden (Walker, 2006; Taylor, 2015). Unter bestimmten Voraussetzungen ist es jedoch möglich, immunhistochemische Färbungen nicht als reine „Färbung“ sondern eher als quantifizierbare Immunoassays auf Gewebeebene anzusehen, welche durchaus mit den Ergebnissen von ELISA-Systemen vergleichbar sein können (Taylor, 2015). Hierfür ist allerdings ein hohes Maß an technischer Ausrüstung sowie die Anwendung aus der Qualitätssicherung bekannter Standardprotokolle notwendig (Taylor, 2015). Für die eigenen Untersuchungen konnten hier nicht alle geforderten Punkte erfüllt werden. So stand beispielsweise kein automatisiertes System zur Durchführung der IHC-Färbungen zur Verfügung. Die Anwendung intrinsischer Kontrollproteine und die Ermittlung von Extinktionskurven in Abhängigkeit von der Fixationsdauer, wie Taylor (2015) sie fordert, unterblieben ebenfalls. Um eine mögliche Beeinflussung der Fixationsdauer jedoch trotzdem ausschließen oder zumindest minimieren zu können, erfolgte die Probengewinnung sowie die Fixation und Aufarbeitung der Gewebestücke stets strikt nach Protokoll. Einflüsse, welche jedoch trotz größter Sorgfalt nicht ausgeschlossen werden können, sind die Temperatur und Luftfeuchte während der Probenentnahme, die Lichtintensität, der die Proben ausgesetzt waren, sowie die Dauer des Verbleibs im Paraffinblock bis zur eigentlichen Untersuchung.

Die Analysen der gefärbten (immun-)histologischen Schnitte erfolgten anhand definierter Prozessprotokolle und etablierter Methoden (Walker, 2006; Sickinger et al., 2008) und werden daher trotz der oben genannten beeinflussenden Faktoren als verlässlich angesehen. Bei der

Ermittlung der IR-positiven CD 3 Zellen handelte es sich lediglich um das Auszählen der markierten Zellen in definierten Bildausschnitten. Hierbei war die Intensität der Anfärbung nicht von Belang, da der Vergleich zwischen den Gruppen und den Lokalisationen sich auf die reine Anwesenheit dieser CD 3-positiven T-Zellen bezog. Daher ist die mögliche Beeinflussung durch externe Faktoren hier nicht relevant. Für die Auswertung der Neuropeptid-Färbungen und für die Ermittlung der Gesamtinnervationsdichte anhand IR-positiver Flächen gelten andere Voraussetzungen. Hier konnte jedoch auf bereits etablierte Verfahren zurückgegriffen werden (Lee et al., 2002; Sickinger et al., 2008), welche wie bereits oben erwähnt mit höherem apparativem Aufwand weiter verbessert werden könnten.

2. Histomorphometrie

Ein genereller Kritikpunkt an der Methode der histologischen Morphometrie wird häufig in der Durchführung der Probenaufarbeitung und der Fixation des Gewebes gesehen (Walker, 2006). Durch die Anwendung des Fixationsmittels Formaldehyd kommt es ebenso zu Schrumpfungen im Gewebe wie durch die Zeitdauer zwischen Probenentnahme und Fixation (Umstattd et al., 2017). In welchem Umfang diese Prozesse vorliegen und ob diese im Rahmen der eigenen Studie bei allen Böcken und auch zwischen den Lokalisationen in gleichem Maße auftreten, kann nicht sicher beantwortet werden. Die Ergebnisse aus Vermessungen der Urethra anhand histologischer Schnitte und HE-Färbung sollten daher nur unter Beachtung der genannten Kritikpunkte beurteilt werden.

Nichtsdestotrotz stellt das Verfahren der histologischen Morphometrie eine seit langem etablierte Methode dar (Cullen et al., 1981a, 1981b; Augsburger et al., 1993; Augsburger und Cruz-Orive, 1995). Des Weiteren stellt die Histomorphometrie auch in der Humanmedizin den Goldstandard bzw. die Bezugsgröße sonographischer Untersuchungen dar, bei denen die Befunde der Ultraschalluntersuchung stets per histologischer Morphometrie überprüft werden (Bracero et al., 2017).

Im Rahmen der eigenen Studie konnte bezüglich der histomorphometrisch ermittelten Urethralfläche kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden. Die Gruppen unterschieden sich zwar bezüglich der Lokalisationen hochsignifikant voneinander, jedoch nicht insgesamt betrachtet. Auffallend ist dennoch eine deutlich geringere Urethralfläche im Bereich der distalen Flexura sigmoidea in der Gruppe der frühkastrierten Böcke. Dies entspricht zumindest tendenziell den Ergebnissen von Bani Ismail et al. (2007), die signifikante Gruppenunterschiede zwischen kastrierten und intakten Tieren – im Sinne einer Verengung der Urethra bei Kastraten – nachweisen konnten. Da im Rahmen der Studie dieser Autoren

allerdings die Messwiederholungen bezüglich der dort untersuchten drei Lokalisationen nicht mit in die statistische Auswertung einbezogen wurden, können die Ergebnisse nur indirekt miteinander in Beziehung gesetzt werden. Da in der eigenen Studie die exaktere statistische Methode und eine höhere Tierzahl (n = 11) verwendet wurde als bei Bani Ismail et al. (2007) (n = 5), wird davon ausgegangen, dass die eigenen Ergebnisse zuverlässiger sein könnten als diejenigen der genannten Arbeitsgruppe. Es ist also davon auszugehen, dass sich die Urethralfläche bei Frühkastrierten nicht in allen Lokalisationen von derjenigen bei intakten Böcken unterscheiden.

Immunhistochemische Untersuchungen an der Urethra weiblicher Schafe konnten bezüglich des Auftretens von Östrogenrezeptoren im Verlauf der Urethra keinen Einfluss der Kastration ermitteln (Augsburger und Führer, 2014), während beim Hund ein solcher Einfluss auf histologische Strukturen der Harnröhre nachgewiesen werden konnte (Augsburger et al., 1993; Augsburger und Cruz-Orive, 1995; Reichler et al., 2007). Bei kastrierten Hündinnen wurde eine höhere LH-Rezeptor Expression sowie eine generell geringere Masse an glatter Muskulatur nachgewiesen.

Zusammenfassend kann also gefolgert werden, dass bezüglich des Einflusses der Kastration auf die anatomisch-histologische Struktur der Urethra Interspeziesunterschiede vorzuliegen scheinen.

3. Lokale zelluläre Immunabwehr

T-Zellen

Physiologie

Bezüglich der lokalen zellulären Immunabwehr im Urogenitaltrakt des gesunden, intakten, männlichen kleinen Wiederkäuers gibt es in der Literatur derzeit nur sehr wenige Referenzstellen (Acosta-Dibarrat et al., 2014). Die verfügbaren Daten beschränken sich auf eine vergleichende Studie zur Anzahl und Art vorhandener Immunzellen im Präputium und im Beckenteil der Urethra von vier gesunden Schlachtböcken im Alter von einem Jahr. Die Arbeitsgruppe um Acosta-Dibarrat et al. (2014) konnte zeigen, dass im Präputium deutlich mehr CD 4 Zellen vorhanden sind als im Beckenteil der Urethra. Für die CD 8-IR-positiven Zellen konnten die Autoren keine signifikanten Unterschiede ermitteln.

Dieses Ergebnis deckt sich mit der eigenen Studie dahingehend, dass im Präputium bei Lämmern deutlich höhere Anzahlen an CD 3-IR-positiven Zellen detektiert werden konnten als dies im Bereich der Urethra der Fall war. Nicht mit Sicherheit geschlossen werden kann, ob dieser höhere Anteil an CD 3-IR-positiv markierten Zellen ebenfalls durch die Untergruppe CD

4-positiver T-Zellen entstanden ist. Die Untersuchungen von Acosta-Dibarrat et al. (2014) legen dies jedoch nahe.

In Ergänzung hierzu konnte in der präsentierten Arbeit erstmals gezeigt werden, dass im Verlauf der Urethra (von der Penisspitze bis zur Beckenflexur) beim gesunden, intakten Bock eine ausgeglichene Verteilung an CD 3 IR-positiven Zellen vorliegt.

Die lokale zelluläre Immunabwehr beim weiblichen kleinen Wiederkäuer ist in der Literatur ebenfalls sehr spärlich behandelt. Da jedoch sowohl für das Rind als auch für das Schwein eine deutliche Zyklusabhängigkeit der Verteilung der lokalen Immunzellen sowie eine Häufung dieser Zellen in den distalen Abschnitten des Genitaltraktes beschrieben wird (Lorenzen et al., 2015; Dadarwal et al., 2017; Selak, 2018), kann auch für das Schaf ein entsprechendes Verteilungsmuster mit Zyklusabhängigkeit der lokalen Immunität im Genitaltrakt vermutet werden.

Einfluss der Kastration

Der Einfluss der Kastration auf die lokalen Immunzellen in der Urethra des männlichen kleinen Wiederkäuers waren nach eigenem Kenntnisstand erstmals Gegenstand der Forschung und liefern somit einen wesentlichen Wissenszuwachs auf diesem Gebiet.

Während sich die Anzahl der CD 3 IR-positiven Zellen nicht signifikant von derjenigen beim intakten Bock unterschied, konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der Immunzellen zwischen den Lokalisationen verändert. Im Gegensatz zu einer ausgeglichenen Verteilung bei intakten Tieren konnte sowohl bei früh- als auch bei spätkastrierten Tieren eine Zunahme der CD 3-Zellen in Richtung der Beckenflexur der Urethra ermittelt werden. Wenngleich auch nicht signifikant, so ist doch tendenziell zu erkennen, dass sich bei den kastrierten Böcken eine geringere Anzahl an CD 3-Zellen im Bereich der Glans penis finden lässt als bei den intakten Vergleichstieren.

Der Effekt einer Kastration auf die Immunzellen konnte anhand einer kastrationsbedingten Aktivierung bzw. Beschleunigung der T-Zell-Differenzierung und Reifung innerhalb des Thymus an Labornagern gezeigt werden (Sutherland et al., 2005; Radojevic et al., 2007). Diese Aktivierung des Immunsystems mit Auswanderung reifer Zellen in die Effektororgane wird im Rahmen der Humanmedizin zur Therapie bei Prostatakarzinomen angewendet (Pu et al., 2016). Diese Androgen-Deprivations-Therapie (androgen deprivation therapy – ADT) führt in Kombination mit einer Chemotherapie zu einem synergistischen Effekt und zu einer höheren Erfolgsrate in der Tumortherapie bei Männern mit Prostatakarzinom. Ziel dieser Therapie ist es, den immunsuppressiven Effekt von Testosteron zu beheben, welcher in Verbindung mit der

im Rahmen der Pubertät einsetzenden Thymusatrophie zu sehen ist (Sutherland et al., 2005; Foo et al., 2017). Vier Monate nach erfolgter chemischer Kastration sind beim Mann im peripheren Blut signifikant höhere Zahlen an T-Zellen nachzuweisen. Bezüglich der T-Zell-Anzahlen im Gewebe finden sich jedoch keine Angaben (Sutherland et al., 2005).
Übertragen auf die eigenen Ergebnisse bedeutet dies, dass ein entsprechender Anstieg der lokalen T-Zellen in der Urethra nach Kastration beim Bock entweder nicht erfolgt oder im Vergleich zum Labornager oder Menschen verzögert eintritt. Eine Absenkung lokaler T-Zellen nach initial erfolgtem Anstieg könnte vorliegen, da entsprechende Effekte eines lediglich vorübergehenden T-Zell-Anstiegs auch bei der Maus nachgewiesen wurden (Tang et al., 2012). Daher könnte sowohl bei den früh- als auch bei den spätkastrierten Böcken zwar initial eine solche Erhöhung der T-Zellen vorgelegen haben, zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Untersuchung war jedoch kein signifikanter Unterschied zu den intakten Böcken nachzuweisen. Zusammenfassend ist zu folgern, dass lokal an der Urethra beim Schafbock weder zwei noch vier Monate nach Kastration eine Erhöhung der CD 3 IR-positiven T-Zellen nachzuweisen ist. Um den zeitlichen Effekt nach Kastration beurteilen zu können, wären jedoch weitere Studien notwendig.

Vorliegen krankhafter Zustände

Die Bedeutung von γδ-T-Zellen für die lokale Immunabwehr konnte für die Maus gezeigt werden (Brunst et al., 1998) und scheint auch beim Menschen sowohl bei entzündlichen Erkrankungen der Harnröhre als auch bei Urolithiasis beteiligt zu sein (Brunst et al., 1998; Kazeko et al., 2008). Während in Tupfer- und Harnproben von Männern mit Urethritis höhere Anteile an γδ-T-Zellen ermittelt werden konnten (Brunst et al., 1998), zeigte sich die Anzahl an CD-3-positiven Zellen im Blutserum bei Patienten mit Urolithiasis und Pyelonephritis im Vergleich zu Gesunden signifikant reduziert (Kazeko et al., 2008). Da die Primärstrukturen u.a. der CD3 γ-, δ- und ε-Ketten bei Schafen, Mäusen und Menschen ein hohes Maß an Sequenzübereinstimmungen aufweisen (Hein, 1992), erscheint es legitim, die Ergebnisse der oben genannten Studien mit denjenigen der eigenen Studie zu vergleichen. Hierbei fällt auf, dass die Lämmer der eigenen Studie keine entsprechenden statistisch signifikanten Gruppenunterschiede hinsichtlich der Anzahl an CD 3-IR-positiven Zellen aufwiesen. Bei genauerer Betrachtung ist jedoch ein tendenziell geringerer Anteil an CD 3 Zellen bei den Böcken mit bestehender Urolithiasis zu verzeichnen. Dies wiederum lässt sich anhand der bereits oben erwähnten Untersuchungen an Mäusen und am Menschen erklären. Die reduzierten Blutserumkonzentrationen an CD 3-T-Zellen sind als ein Verbrauch dieser Zellen und

Auswanderung ins Gewebe zu werten (Husband, 1987). Die bei an Urethritis erkrankten Männern zu verzeichnenden höheren Anteile an γδ-T-Zellen in Urinproben und Urethraltupfern resultieren aus der Gewebewanderung und dem Übertritt der T-Zellen über das Urothel in das Lumen der Urethra. Die in der eigenen Studie zumindest tendenziell geringeren Anzahlen an CD 3-IR-positiven T Zellen könnten durch die ausschließlich lange bestehende Erkrankung der Böcke der Urolithiasisgruppe in Verbindung mit bereits unternommenen Therapieversuchen gesehen werden. Bei diesen Tieren ist es vermutlich bereits zu einem Verlust dieser T-Zellen aus dem Gewebe in das Lumen der Urethra mit anschließender Ausschwemmung gekommen. Distal einer obstruktiven Urolithiasis ist diese Ausschwemmung im Zuge der Probenentnahme und Fixation zu sehen.

Bei den Böcken mit Urolithiasis sind insbesondere im Bereich der Penisspitze und im Bereich des Arcus ischiadicus größere Anzahlen an CD 3-IR-positiven Zellen nachweisbar. Dies wiederum bedeutet, dass die Böcke mit Urolithiasis im Vergleich zu denjenigen anderer Gruppen eine reduzierte Anzahl an CD 3 Zellen im Penisteil der Urethra aufweisen. Eine mögliche Erklärung für diesen Lokalisationsunterschied könnte in einer der bekannten anatomischen Prädilektionsstellen für eine Obstruktion der Urethra begründet sein (Van Metre, 2004). Kommt es im Bereich der Flexura sigmoidea (Lokalisationen 3 und 4) zu einer Obstruktion, so finden insbesondere hier inflammatorische Vorgänge und damit auch ein Verlust an CD 3-T-Zellen über das Lumen der Urethra statt. Eine mögliche Beeinflussung der eigenen Ergebnisse in der Gruppe der Urolithiasis-Böcke durch eine erfolgte Kastration kann vernachlässigt werden, da lediglich einer der untersuchten Böcke kastriert war.

Beim Menschen werden Harnwegsinfektionen sowie das Risiko an HIV zu erkranken mit dem Vorhautstatus in Verbindung gebracht (Ruebben und Ruebben, 2012). Beschnittene Jungen und Männer weisen hierbei ein reduziertes Risiko für Harnwegsinfekte sowie für eine HIV-Infektion auf. Auf Schaflämmer übertragen, könnte der im juvenilen Zustand physiologische Status einer nicht vorlagerbaren Glans penis demzufolge ebenfalls mit einem erhöhten Risiko einer Harnwegsinfektion verbunden sein. Da die im juvenilen Zustand bestehenden Verwachsungen zwischen Präputium und Glans penis bei kastrierten Böcken auch im adulten Stadium bestehen bleiben (Belonje, 1965), scheint dieser Umstand eventuell mit einem erhöhten Risiko für das Entwickeln einer Urolithiasis verbunden zu sein. Die Testosteronabhängigkeit der Lösungsvorgänge dieser juvenilen Verwachsungen wurde in der Literatur bereits früh beschrieben und mit dem Entstehen von Urolithiasis in Verbindung gebracht (Belonje, 1965). Angaben zu den zugrundeliegenden Mechanismen finden sich dagegen nicht in der Literatur und sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

B-Zellen und Makrophagen

CD 79α-IR-positive B-Zellen sowie Makrophagen treten im Gewebe vermehrt bei chronischen Entzündungen auf (Reyes et al., 2009; Wang et al., 2010; Gamper et al., 2013). In der Humanmedizin wird dies beispielsweise bei Interstitieller Zystitis (IC) als diagnostischer Marker in Verbindung mit Urotheldegeneration gesehen (Gamper et al., 2013). Bei Patienten mit IC finden sich clusterartige Ansammlungen von B- und T-Zellen im Gewebe, während bei den gesunden Probanden lediglich einige wenige CD 79α-IR-positive B-Zellen im Gewebe zu finden sind (Gamper et al., 2013). Dies entspricht den Beobachtungen am eigenen Probandenkollektiv. Entgegen der Erwartung, dass bei Patienten mit Urolithiasis deutlich erhöhte CD 79α-IR-positive Signale zu finden sein würden, waren auch bei diesen Tieren lediglich vereinzelt IR-positive B-Zellen zu finden. Dies entspricht einer physiologischen Zellverteilung. Da auch bei den Patienten mit Urolithiasis lediglich vereinzelt IR-positive Signale für CD 79α zu verzeichnen waren, lässt sich hieraus ableiten, dass es sich bei einer Urolithiasis um ein akutes Geschehen ohne B-Zell-Beteiligung handelt. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Wang et al. (2010) unterstützt. Diese Arbeitsgruppe konnte beim Meerschweinchen nachweisen, dass eine Beteiligung von B-Zellen an einer lokalen Immunantwort nach experimenteller Infektion mit Chlamydia-Spezies in der Urethra erst nach 14 Tagen auftritt. Die maximale Anzahl an B-Zellen wurde in dieser Studie nach 21 Tagen erreicht.

Entsprechendes konnte für MAC 387-positive Makrophagen erhoben werden. Auch hier handelt es sich bei den wenigen im Gewebe vorhandenen Zellen um die physiologische Gewebeausstattung an lokalen Immunzellen beim Schaf (Acosta-Dibarrat et al., 2014). Da auch hinsichtlich dieses Parameters bei Urolithiasis-Böcken nur vereinzelt Anfärbungen sichtbar waren, scheinen weder B-Zellen noch Makrophagen eine große Bedeutung im Rahmen der Entzündungsvorgänge bei Urolithiasis zu spielen. Anders verhält sich dies bei experimentell induzierten, chronischen Harnwegsinfektionen bei der Ratte (Reyes et al., 2009). Hier konnte anhand von Proteinextraktionen eine massiv erhöhte Konzentration von S100A8 (Calprotectin) bei einer chronischen Ureaplasma-Infektion und Urolithiasis nachgewiesen werden. Eine vornehmliche Bedeutung von Makrophagen hinsichtlich der lokalen Immunität in der Urethra konnten auch Quayle et al. (1994) nachweisen. Deren Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass neben CD 4 und CD 8-IR-positiven T-Zellen insbesondere Makrophagen in der Urethra der Maus vorkommen. Hier scheint ein deutlicher Speziesunterschied zwischen Ratten, Mäusen und Schafen zu bestehen.

4. Neuropeptide und Gesamtinnervationsdichte

Physiologie

Die Innervation der Urethra inklusive ihrer Neuropeptidversorgung ist Gegenstand einiger weniger Studien, welche zumeist an Ratten und Mäusen durchgeführt wurden (Arms und Vizzard, 2011; Barry et al., 2017). Hierbei wurden in allen Schichten der Urethra Nervenfaserbündel sowie Neuropeptid IR-positive Anfärbungen detektiert. Untersuchungen an der Tierart Schaf beschäftigen sich dagegen zumeist mit den akzessorischen Geschlechtsdrüsen oder der Muskulatur der Urethra bzw. haben elektromyographische Fragestellungen (Cottrell et al., 1978; Gonzalez-Soriano et al., 2003; Arciszewski, 2004; Chen und Creed, 2004; Arciszewski und Wasowicz, 2006). Nach eigenem Kenntnisstand fehlt jedoch bisher jegliche Literatur zur Innervationsdichte sowie zum Neuropeptidgehalt am unteren Harntrakt von Böcken unter Berücksichtigung des Kastrationsstatus sowie der Verhältnisse bei Urolithiasis. Die eigene Arbeit liefert hierzu einen neuen Beitrag.

Bezüglich der Innervationsdichte ist unabhängig von der Gruppenzuordnung festzuhalten, dass die Innervationsdichte an der Glans penis sowie proximal am Arcus ischiadicus am höchsten ist. Ähnliche Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe um Majewski et al. (1999) für die Innervation des Penis bei Schweinen vorweisen. Da es sich sowohl beim Schwein als auch beim Schaf um Tierarten mit fibroelastischem Penistyp handelt, sollte ein direkter Vergleich der Ergebnisse zulässig sein. Unterschiede ergeben sich allerdings hinsichtlich der Neuropeptidgehalte. Während Majewski et al. (1999) in ihrer Studie hauptsächlich VIP-IR-positive Nervenfasern und nur in geringem Umfang SP-IR-positive Fasern nachweisen konnten, verhält sich dies in der eigenen Studie genau umgekehrt. Hier konnten größere Mengen an SP als an VIP detektiert werden. Dementsprechende Befunde sind ebenfalls für das Schwein an der pelvinen Urethra beschrieben (Sienkiewicz et al., 2004). Wie in der eigenen Studie ermittelt, konnte diese Forschergruppe eine sehr intensive Innervation der Urethralmuskulatur, zahlreiche IR-positive Anfärbungen für das Tachykinin Neuropeptid Y sowie eine geringere Anzahl an VIP-IR-positiven Signalen nachweisen.

Einfluss der Kastration

Da im Rahmen der eigenen Untersuchungen weder hinsichtlich der Innervationsdichte noch hinsichtlich der Neuropeptide SP und VIP statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Kastrationsstatus nachzuweisen waren, scheint es – zumindest in diesen Punkten – unerheblich zu sein, ob das Tier kastriert oder intakt ist. Die Kastration scheint weder auf die Innervationsdichte noch auf die Gewebsverteilung der Neuropeptide Einfluss zu nehmen.

Dieser fehlende Einfluss der Kastration auf die Neuropeptidversorgung der Urethra scheint jedoch sowohl lokalisations- als auch speziesspezifisch zu sein. So konnte im Gegensatz hierzu bei der Ratte ein Effekt der Kastration auf den Gehalt an Neuropeptid Y im Samenleiter nachgewiesen werden. Nach Kastration waren deutlich geringere Gehalte dieses Neuropeptids nachzuweisen, wobei die kontraktionshemmende Wirkung des Neuropeptids Y auf den Nebenhodenteil des Samenleiters ebenfalls beeinflusst wurde. Im Gegensatz hierzu bestand dieser Einfluss im prostatischen Teil des Samenleiters nicht (Bitran et al., 1991). Auch bezüglich der Innervationsdichte weisen kastrierte Ratten einen reduzierten Gehalt an Nervenfasern in der quergestreiften Muskulatur des Pubococcygealmuskels auf (Alvarado et al., 2013).

Da in der Literatur jedoch speziesübergreifend keine Aussage hinsichtlich des Kastrationseinflusses auf den Gehalt an Substanz P und VIP sowie auf die Innervationsdichte zu finden ist, stellen die eigenen Ergebnisse erstmals neue Daten zur Verfügung. Weitere Untersuchungen hierzu sollten durchgeführt werden, um den Kenntniszugewinn weiter ausbauen zu können.

Vorliegen krankhafter Zustände

Anders sieht es dagegen im krankhaften Zustand aus. Hier ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den gesunden Böcken und denjenigen, welche an Urolithiasis erkrankt waren. Allerdings ist bei der Interpretation dieser Ergebnisse kritisch zu bedenken, dass es sich um sehr heterogene Gruppen handelt. Während die Gruppen der frühkastrierten, spätkastrierten und intakten Lämmer demselben Genpool entstammen sowie identisch gehalten wurden, war dies für die Urolithiasis-Gruppe nicht zu realisieren. Hier musste aus Gründen des Tierschutzes auf Probenmaterial zurückgegriffen werden, welches dem Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen entstammte. Da hier naturgemäß keine Alters- bzw. Haltungs-Kohorten angeliefert werden, konnte das untersuchte Probenmaterial nur heterogener Natur sein. Nichtsdestotrotz wurde im Sinne von Taylor (2015) eine möglichst identische Probenaufbereitung gewährleistet, um eine Vergleichbarkeit der Gruppen (wenn auch mit den genannten Einschränkungen) herstellen zu können.

Weiterhin ist kritisch zu hinterfragen, ob es sich bei den ermittelten Unterschieden bezüglich der Innervationsdichte sowie des Neuropeptidgehaltes bei den Böcken mit Urolithiasis um die Folge der Erkrankung mit Verbrauch von Neuropeptiden sowie Gewebsuntergang handelt, oder ob diese Unterschiede in irgendeiner Weise die Ursache der Erkrankung widerspiegeln. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, müssten Untersuchungen an ein und demselben Tier vor und

nach Entstehen einer obstruktiven Urolithiasis durchgeführt werden. Aufgrund des immensen zeitlichen Aufwandes war eine solche Untersuchung in diesem Fall jedoch unterblieben.
Anhand der Erfahrungen aus eigenen Studien (Sickinger, 2007) ist zu vermuten, dass es sich bei der reduzierten Innervationsdichte sowie den reduzierten Neuropeptidgehalten im periurethralen Gewebe von Schafböcken mit Urolithiasis eher um eine Folge dieser Erkrankung denn um deren Ursache handelt. Da in der Literatur keinerlei Studien bezüglich des Neuropeptidgehaltes bei an Urolithiasis erkrankten Tieren oder Menschen verfügbar sind, kann hier jedoch keine wissenschaftlich begründete Schlussfolgerung gezogen werden.
Hinsichtlich der Heilungsaussichten nach überstandener obstruktiver Urolithiasis-Erkrankung ist jedoch aufgrund der immunhistochemisch nachgewiesenen Reduktion der Innervationsdichte im Bereich der Urethra davon auszugehen, dass Störungen beim Harnabsatz sowie bei der Ejakulation als Folge auftreten könnten. Dies legen auch Ergebnisse einer Studie an männlichen Ratten nahe (Juárez und Cruz, 2014). Bei diesen Tieren wurden sowohl der Harnabsatz als auch die Ejakulation nach Denervation des äußeren Urethralsphinkters, des Musculus ischiocavernosus und des Musculus bulbospongiosus untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten Störungen sowohl der Miktion (erhöhte Harnabsatzfrequenz, vermindertes Volumen, Harnträufeln) als auch einer physiologischen Kopulation (höhere Anzahl an Intromissionen) und Ejakulation (mangelhafte Expulsion, retrograde Ejakulation) zeigen.

Abschnitt 4 – Modifikation bestehender Operationstechniken

Die hier durchgeführte Operationsmethode am kleinen Wiederkäuer stellt eine Modifikation und Kombination bereits beschriebener Verfahren dar (Streeter et al., 2001; Halland et al., 2002; Ewoldt et al., 2006; Reppert et al., 2016). In der eigenen Kadaver-Studie wurde nach derzeitigem Kenntnisstand zum ersten Mal versucht, einen Ballonkatheter Endoskop-gestützt durch die sehr lange und dünne Urethra des männlichen Schaflammes zu führen, ohne diese zu eröffnen. Dieser Katheter konnte bei allen Schafböcken im Versuch sicher in die Urethra eingesetzt werden. Ob es bei einem erkrankten Tier möglich ist, Urolithen endoskopisch aus der Urethra zu entfernen und anschließend einen solchen Katheter im Sinne eines „Stents“ einzusetzen, kann anhand der vorliegenden Erfahrungen und Daten nicht abgeschätzt werden. Mit Hilfe der neu entwickelten Operationstechnik sollte es jedoch trotzdem möglich sein, die in der Literatur häufig beschriebenen Komplikationen der Narbenstriktur an der Urethra (insbesondere nach Urethrotomie oder Urethrostomie) zu umgehen (Gill und Sod, 2004; Van Metre, 2004).

Generell ist die endoskopische Entfernung von Urolithen aus der Harnröhre auch beim kleinen Wiederkäuer möglich. Die Anwendung intrakorporaler Stoßwellen oder aber einer Laser-Lithotripsie beim Wiederkäuer ist in der Literatur beschrieben (Streeter et al., 2001; Halland et al., 2002). Die Autoren konnten bei 15 Ziegen (Halland et al., 2002) sowie bei einem Bullen (Streeter et al., 2001) durch die Anwendung einer Laser-Lithotripsie die Patenz der Harnröhre wiederherstellen. Allerdings äußern beide Autoren Bedenken dahingehend, ob dieser doch sehr hohe materielle und personelle Aufwand insbesondere in der Nutztiermedizin praktikabel erscheint. Die eigene Methode ohne die Anwendung solcher (zugegebener Maßen sehr eleganten und auch effektiven) Systeme könnte daher zur Entfernung eventuell die Urethra obstruierender Urolithen sehr hilfreich sein. Durchaus zum Einsatz kommen könnten Lithotriptoren bei Hobbytieren, welche dem Besitzer einen höheren emotionalen und daher auch höheren monetären Wert darstellen. In diesen Fällen ist die Therapieform nach den Maßstäben der in der Kleintiermedizin üblichen Therapiemöglichkeiten zu wählen (Heilmann, 2016).

Verkompliziert wird die Durchführung einer Harnröhren-Endoskopie beim Wiederkäuer in jedem Falle durch die anatomischen Verhältnisse (s-förmige Flexur) sowie den Tonus des Musculus retractor penis. Letztgenannter Komplikationsfaktor war selbstverständlich im Rahmen der eigenen Kadaverstudie nicht vorhanden und das Vorlagern des Penis war somit sehr viel einfacher zu bewerkstelligen als beim lebenden Bock in Allgemeinanästhesie. Da das Vorlagern des Penis und die Streckung der Flexura sigmoidea jedoch für die Durchführung einer Urethroskopie zwingend notwendig ist, könnte dies bei der Anwendung der beschriebenen Methode in der Praxis eventuell zu Problemen führen. Abhilfe sollte hier die Durchführung einer Epiduralanästhesie mit 2%-iger Procainhydrochlorid-Lösung in einer Dosierung von 0,4-0,6 ml/kg schaffen (Nuss et al., 2017). Verzichtet man auf die Durchführung einer Epiduralanästhesie, kann dies eine unvollständige Streckung der Flexur zur Folge haben. Dies wiederum verhindert ein sanftes Vorschieben der sehr dünnen, flexiblen Ureteroskope, welche zur Endoskopie der Urethra Verwendung finden. Wird dann durch Drehen oder Drücken versucht, die Flexur zu überwinden, kommt es sehr häufig zu Faserbrüchen in den Endoskopen (Halland et al., 2002). Dies macht sich durch schwarze Flecken im Sichtfeld bis hin zum Totalausfall des Gerätes bemerkbar (Bach, 2016).

Zusammenfassung

Gegenstand der Arbeit

Das Auftreten von Harnsteinen stellt sowohl im Bereich der Berufsschäferei als auch bei Hobbytieren insbesondere beim männlichen Tier ein folgenschweres Problem dar. Setzen sich Harnsteine in der Urethra fest, kommt es zu einer obstruktiven Urolithiasis mit Rückstau von Urin in die Blase. Dies ist als Notfall zu betrachten und endet ohne Therapie meist tödlich.

Als Risikofaktoren dieser Erkrankung gelten die Fütterung, das Geschlecht, die Anatomie der Harnröhre, der Kastrationsstatus sowie geographische Daten hinsichtlich der Haltung (Weide, Flüssigkeitsversorgung).

In der eigenen Studie sollte daher anhand von Meta-Analysen die durchschnittliche Prävalenz von Harnsteinen, der Einfluss von Spezies- bzw. Rasse, der Einfluss der Kastration sowie die Erfolgsrate bei verschiedenen Therapieoptionen ermittelt werden.

In der Literatur wird häufig eine Prädisposition für das Entstehen einer obstruktiven Urolithiasis bei (früh-)kastrierten Böcken angeführt, wobei diese mit einer Minderentwicklung der Urethra nach der Kastration in Verbindung gebracht wird. Daher sollte in der eigenen Studie mittels sonographischer Vermessung der Harnröhre kastrierter sowie intakter Bocklämmer gezeigt werden, ob sich kastrierte Bocklämmer hinsichtlich ihres Urethrallumens von intakten Lämmern unterscheiden.

Da die Bildung von Harnsteinen stets um einen Nidus stattfindet, welcher außer durch Zelldetritus beispielsweise im Rahmen von Entzündungen des unteren Harntraktes entstehen kann wurden immunhistochemische Untersuchungen der Harnröhre sowie des Präputiums durchgeführt. Hier sollte geklärt werden, ob sich kastrierte, intakte und an Urolithiasis erkrankte Böcke hinsichtlich ihrer lokalen Immunabwehr im Präputium sowie hinsichtlich der periurethralen Neuropeptidgehalte unterscheiden. Hierfür wurden Untersuchungen zur Gewebeverfügbarkeit von CD-3-T-Zellen, CD-79 α-B-Zellen und MAC 387-Makrophagen ebenso durchgeführt wie Untersuchungen zu den Miktions-beeinflussenden Neuropeptiden Substanz P und VIP.

Abschließend wurde im Rahmen einer Kadaverstudie untersucht, ob die Modifikation bestehender Operationsmethoden die Möglichkeit bietet, eine obstruktive Urolithiasis unter Schonung der Urethra chirurgisch zu therapieren. Sinn dieser Methode ist es, ein solches Verfahren am Patienten zu etablieren und dadurch insbesondere den Besitzern von Liebhabertieren eine langfristig erfolgreiche Behandlungsmöglichkeit bei Urolithiasis bieten zu können.

Material und Methoden

Die Meta-Analysen wurden anhand der verfügbaren Literatur entsprechend der vorab definierten Fragestellungen durchgeführt.

Sonographische und immunhistochemische Untersuchungen wurden an insgesamt 34 männlichen Lämmern der Rassen Lacaune und Ostfriesisches Milchschaf durchgeführt. Die Tiere wurden im Alter von 14-21 Tagen zugekauft und per Losverfahren auf die Gruppen „Frühkastration“ (Kastration im Alter von drei bis vier Wochen), „Spätkastration“ (Kastration im Alter von vier Monaten) und „Intakt“ (keine Kastration) randomisiert. Sonographische Untersuchungen erfolgten eine Woche nach Aufstallung, im Alter von 4 Monaten sowie im Alter von sechs Monaten vor der Schlachtung. Die Sonographie wurde am Tier in linker Seitenlage durchgeführt, wobei ein Linearschallkopf mit einer Frequenz von 12 MHz zum Einsatz kam. Die Urethra wurde in ihrem Verlauf an fünf definierten Lokalisationen sonographisch untersucht und die Bilder dieser Untersuchungen wurden für die spätere Auswertung digital erfasst und gesichert (Software Programm easyVet®).

Bei der Schlachtung der Lämmer wurden der Penis sowie das Präputium der Böcke gewonnen und für die immunhistochemischen Untersuchungen präpariert. Entsprechende Proben wurden zusätzlich von acht Böcken mit diagnostizierter obstruktiver Urolithiasis entnommen. Diese Tiere wurden entweder aufgrund infauster Prognose euthanasiert oder entstammten dem Patientengut des Instituts für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Gewebeproben aller Tiere wurden in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten als indirekte Immunhistochemie je nach Protokoll des entsprechenden Antikörpers für die Substanzen CD 3, CD 79 α, MAC 387, SP, VIP und NF.

Zur Erprobung einer modifizierten Operationstechnik zur Therapie der obstruktiven Urolithiasis wurden drei gesunde Schlachtlämmer angekauft und euthanasiert. Die Durchführung der modifizierten Operationsmethode erfolgte nach Eintritt des Todes am in Trendelenburg-Position fixierten Tierkörper.

Ergebnisse

Meta-Analysen

Meta-Analysen konnten für die Prävalenz der Urolithiasis bei Hirse- sowie bei Mais-basierter Fütterung durchgeführt werden. Die gemeinsame geschätzte gewichtete Prävalenz für die Hirse-basierte Fütterung liegt demnach bei 60,5 %. Werden signifikant vom Studiendurchschnitt abweichende Studien aus der Meta-Analyse herausgenommen kann eine gemeinsame gewichtete Prävalenz von 55,6 % ermittelt werden. Entsprechend gelten für die Maisfütterung gewichtete Prävalenzen von 10,1 bzw. 5,1 %. Werden aufgrund der Heterogenität der Studien logarithmische Transformationen in die Auswertung einbezogen so resultiert dies in einer gemeinsamen geschätzten gewichteten Prävalenz für die Mais-basierte Fütterung von 17 %.

Hinsichtlich der Fragestellungen zur Spezies- bzw. Rasseprädisposition sowie zu einem möglichen Einfluss des Kastrationsstatus auf das Entwickeln einer obstruktiven Urolithiasis konnte aufgrund fehlender verwendbarer Literatur keine Meta-Analyse durchgeführt werden.

Die anhand der Erfolgsrate ermittelte Operationsmethode mit den besten Ergebnissen stellt die Marsupialisation der Blase dar. Für dieses Operationsverfahren konnte eine gemeinsame gewichtete Erfolgsrate von 77 % ermittelt werden. In absteigender Reihenfolge bezüglich der Erfolgsraten folgen die Perineale Urethrostomie (71 % Erfolgsrate), die Laparotomische Katheterzystotomie (66 % Erfolgsrate), die Amputation des Processus urethralis (41 % Erfolgsrate) sowie die sonographische Katheterzystotomie (15 % Erfolgsrate).

Sonographische Morphometrie

Bei allen in der Studie untersuchten Lämmern war es möglich, die Urethra in ihrem Verlauf sonographisch darzustellen und zu vermessen. Hierbei konnten für den mittleren Urethraldurchmesser zumindest durch einen von zwei Untersuchern signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ($p = 0,0017$). Die Harnröhrendurchmesser lagen bei frühkastrierten Schafböcken zwischen 0,34 mm und 0,43 mm, bei spätkastrieren Tieren zwischen 0,34 mm und 0,48 mm sowie bei intakten Böcken zwischen 0,34 mm und 0,57 mm. Beide Untersucher konnten für die mittleren Urethraldurchmesser hochsignifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten nachweisen ($p < 0,0001$), wobei eine Wechselwirkung zwischen dem Zeitpunkt und der Gruppe bestand. Hinsichtlich der Lokalisationen waren keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln. Zwischen den Ergebnissen der beiden Untersucher U1 und U2 bestand eine schwache positive Korrelation mit $R = 0,57$. Hierbei fiel auf, dass Untersucher U1 stets höhere Messwerte ermittelte als dies für Untersucher U2 der Fall war.

Histomorphometrie

Bezüglich der Urethralfläche konnten am histologischen Präparat keine signifikanten Gruppenunterschiede ermittelt werden, wobei sich die Lokalisationen hochsignifikant voneinander unterschieden ($p < 0,0001$). Die Fläche der Urethralschleimhaut wies signifikante Unterschiede auf ($p = 0,04$). Bei Spätkastrierten war eine größere Schleimhautfläche zu ermitteln als bei den intakten Vergleichstieren.

Immunhistochemie

Generell waren im Bereich des Präputiums deutlich mehr CD 3 IR-positive Zellen nachzuweisen als dies in der Urethra der Fall war. Es konnten jedoch weder im Präputium noch in der Urethra signifikante Gruppenunterschiede ermittelt werden. Die nachgewiesenen signifikanten Lokalisationsunterschiede ($p = 0,002$) waren aufgrund der bestehenden Wechselwirkung zwischen Lokalisation und Gruppe von der Gruppenzugehörigkeit abhängig. Eine quantitative Analyse CD 79 α IR-positiver B-Zellen sowie MAC 387 IR-positiver Makrophagen entfiel aufgrund lediglich sehr vereinzelt im Gewebe angefärbter Zellen.

Hinsichtlich der Neuropeptidgehalte bzw. der Gesamtinnervationsdichte des Urethralgewebes waren bei Böcken mit Urolithiasis für Substanz P ($p < 0,0001$), VIP ($p = 0,02$) sowie für die Neurofilamente ($p < 0,0001$) signifikant weniger IR-positive Anfärbungen zu verzeichnen als bei den gesunden Vergleichstieren. Eine insgesamt höhere Innervationsdichte war im Lokalisationsvergleich gruppenübergreifend im Bereich des Arcus ischiadicus festzustellen ($p < 0,0001$).

Modifizierte Operationsmethode

Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierte modifizierte Operationsmethode mit Einlegen eines Blasenkatheters durch die Urethra konnte an 3 gesunden Schafböcken ohne große Probleme durchgeführt werden. Die Erprobung am Patienten kann daher in einem nächsten Schritt erfolgen.

Schlussfolgerungen

Generell stehen nur wenige Literaturquellen für die Durchführung von Meta-Analysen zu den gewählten Fragestellungen zur Verfügung. Die Entstehung von Harnsteinen beim kleinen Wiederkäuer ist wie bereits bekannt fütterungsabhängig. Bei Hirse-basierter Fütterung liegen die geschätzten gewichteten Prävalenzen bei etwa 60 %. Dem gegenüber stehen geschätzte Prävalenzen von 10-20 % bei Mais-basierter Fütterung.

Sollen an obstruktiver Urolithiasis erkrankte Schafböcke chirurgisch therapiert werden, so bieten die Marsupialisation der Blase, die Perineale Urethrostomie sowie die laparotomische

Katheterzystotomie zufriedenstellende Erfolgsraten. In die Überlegungen der Wahl des im Einzelfall adäquaten Verfahrens sind die persönlichen Erfahrungen und Kompetenzen des Operateurs sowie der Besitzerwunsch einzubeziehen.

Am lebenden Tier können durch erfahrene Untersucher signifikante Unterschiede im Urethraldurchmesser zwischen kastrierten und intakten Bocklämmern ermittelt werden. Der Einfluss der Kastration auf den Urethraldurchmesser konnte anhand der eigenen Ergebnisse nachgewiesen werden, wenngleich die Vermessung der Harnröhre großer Sorgfalt und Erfahrung bedarf. Im Einzelfall kann das oben beschriebene Untersuchungsverfahren eine Entscheidungshilfe zum Kastrationszeitpunkt liefern. Werden bei der Sonographie der Harnröhre nur sehr geringe Durchmesser ermittelt, so sollte eine Kastration zu einem späteren Zeitpunkt in Erwägung gezogen werden. Anhand der eigenen Untersuchungsergebnisse wird von einer Kastration im Alter von 3 Wochen abgeraten und eine solche ab einem Alter von 4 Monaten angeraten.

Die lokale Immunabwehr in Präputium und distaler Urethra scheint beim Schafbock hauptsächlich T-Zell-assoziiert zu sein. Aufgrund der wesentlich höheren Anzahl an CD 3-positiven T-Zellen im Präputium ist zu vermuten, dass hier ein wesentlicher Anteil der Immunreaktion bei einer imminenten aufsteigenden Infektion erfolgt.

Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigen, dass die Kastration beim Schafbock keinen Einfluss auf den Neuropeptidgehalt sowie die Innervationsdichte an der Urethra hat. Im Falle des Auftretens einer obstruktiven Urolithiasis wird das Neuropeptidmuster massiv gestört und aufgrund von Zellzerstörung kommt es zu einer Reduktion der nachweisbaren Nervenfaserbündel im Verlauf der Harnröhre. Diese massiven Gewebsschädigungen können sich auch nach erfolgter Therapie negativ auswirken – beispielsweise im Sinne eines Rezidivs aufgrund einer Narbenstriktur der Urethra.

Anhand der am gesunden Schafbock durchgeführten Endoskopie-gestützten Implantation eines transurethralen Blasenkatheters scheint eine potente Operationstechnik zur Verfügung zu stehen, um die Wiederherstellung des Harnflusses per vias naturales nach obstruktiver Urolithiasis zu erreichen. Insbesondere für wertvolle Zuchttiere oder aber für Liebhabertiere könnte mit Hilfe dieser Methode eventuell eine langfristig erfolgreiche Methode mit Restauration der Urethra ohne Narbenstrikturen zu entwickeln sein. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Summary

Objectives

The occurrence of uroliths in fattening lambs and companion animals presents a problem with serious consequences, especially among the males. The entrapment of uroliths in the urethra and consequent development of obstructive urolithiasis leads to retention of urine within the urinary bladder, an emergency with fatal consequence if no therapy is provided.

Nutrition, sex, anatomy of the urethra, castration status, and geographic data concerning housing (field, availability of water) are potential risk factors.

In this study, we aimed to determine the mean prevalence of uroliths and the influence of species, breed, and castration status, and to evaluate the success rates of several therapeutic options by means of meta-analyses.

Predisposition for the development of urolithiasis in early castrated wethers because of urethral hypotrophy after castration is well described in the literature. Therefore, we compared sonographic measurements of the urethra in castrated versus intact male lambs to detect possible differences in the luminal sizes of the urethra.

Moreover, the formation of uroliths always begins at a nidus that is formed by cell detritus or in the context of inflammatory processes in the lower urinary tract; hence, immunohistological examinations of the urethra and the prepuce were performed. To clarify if castrated and intact male lambs and animals with urolithiasis showed differences in local mucosal immunity at the prepuce or the periurethral neuropeptide distribution, we examined the tissue levels of CD-3-T-cells, CD-79 α-B-cells, and MAC 387-macrophages, and the miction-influencing neuropeptides, substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP).

Finally, a cadaver study was conducted in male lambs to evaluate a modification of the existing surgical methods to reestablish urethral patency in patients with obstructive urolithiasis, in terms of the long-term success rate, especially in companion animals.

Material and methods

Meta-analyses were performed on reported studies in the literature using specific questions and search terms.

Ultrasonography and immunohistochemical examinations were conducted in 34 male crossbred lambs (Lacaune x Ostfriesisches Milchschaf). Animals were purchased at the age of 14-21 days-old and randomly allocated to the following examination groups: early castration, castration at the age of 3 to 4 weeks; late castration, castration at the age of 4 months; and intact, no

castration. Ultrasonographic examinations using a linear probe with a frequency of 12 MHz were conducted with the animals in left lateral recumbency at 1-week after acclimatization, 4-months of age, and 6-months of age. The urethra was examined in its entire course at five defined locations and digital images were stored for subsequent analysis using the easyVet® software program.

At slaughter, the penis and the prepuce were harvested from the lambs and prepared for immunohistochemistry. Equivalent tissue samples were taken from eight rams with diagnosed obstructive Urolithiasis. Those animals were either humanely euthanized because of a fatal prognosis or originated from the Institute for Veterinary Pathology of the Justus-Liebig-University of Gießen.

The tissue samples of all animals were fixed in 4% formalin solution and embedded in paraffin. Immunohistochemical staining was conducted using the indirect method according to antibody-specific protocols for CD 3, CD 79 α, MAC 387, SP, VIP, and NF.

To explore the clinical applicability of a modified surgical technique to restore urethral patency after obstructive urolithiasis, three healthy fattening lambs were purchased and humanely euthanized. The modified surgical procedure was conducted on the cadavers fixed in the Trendelenburg-position.

Results

Meta-analyses

With regard to the prevalence of urolithiasis in animals with sorghum- and corn-based feeding, the combined estimated weighted prevalence in animals with sorghum-based feeding was 60.5%; and by removing single studies that reported significantly different means compared to the study mean, the combined weighted prevalence was 55.6%. In animals with corn-based feeding, the corresponding weighted prevalence was 10.1% and 5.1%, respectively. Based on logarithmical transformations because of heterogeneity of the studies, the combined estimated weighted prevalence was 17% in animals with corn-based feeding.

With regard to species- or breed-related predispositions for the development of obstructive urolithiasis, or the possible influence of castration status, no meta-analysis could be performed due to lack of reports in the literature.

Based on the success rates, the best surgical method to treat obstructive urolithiasis is the marsupialization of the urinary bladder, with a combined weighted success rate of 77% followed by perineal urethrostomy (71%), laparotomic catheter cystostomy (66%), amputation of the processus urethralis (41%), and ultrasonographic catheter cystostomy (15%), in order.

Sonographic morphometry

In all lambs included in the study, ultrasonographic examination was possible. Measurements of the urethra in its entire course by at least one of two examiners, revealed significant group-wise differences in the mean urethral diameter ($P = 0.0017$). Urethral diameters in early castrated lambs ranged between 0.34 mm and 0.43 mm, in late castrated animals the urethral diameters ranged between 0.34 mm and 0.48 mm, and in intact male lambs the urethral diameters ranged between 0.34 mm and 0.57 mm, respectively. By both examiners, the mean urethral diameters at the different examination time-points showed significant differences ($P < 0.0001$), with mutual interaction between examination time and group; however, with regard to the locations, no significant differences could be determined. The values obtained by examiners 1 and 2 showed weak correlation ($R = 0.57$); especially, the readings by examiner 1 were consistently higher than those of examiner 2.

Histomorphometry

In the histological preparations, the urethral luminal areas showed no significant group-wise differences; whereas, locations differed significantly ($P < 0.0001$). The urethral mucosal area showed significant differences between the groups ($P = 0.04$). In the late castration group, a bigger mucosal area could be measured compared to that in the in intact group.

Immunohistochemistry

Overall, there were markedly more CD 3 immunoreactive cells in the prepuce than in the urethral tissue, without significance. Significant differences between locations ($P = 0.002$) over groups were due to mutual interactions between location and group.

Quantitative analysis of the CD 79α-IR-positive B-cells and the MAC 387 IR-positive macrophages could not be performed because of sparse distribution of these cell types within the tissue samples.

With regard to the neuropeptide contents and the overall nerve density of the urethral tissue, there was significantly less positive staining for SP ($P < 0.0001$), VIP ($P = 0.02$), and NF ($P< 0.0001$) in rams suffering from urolithiasis, as compared to those in the healthy controls. The comparison of locations over groups showed a higher innervation density at the arcus ischiadicus ($P < 0.0001$).

Modified surgical technique

Within the study design, the surgical technique with implantation of a transurethral vesical catheter could be performed successfully in three healthy male lambs without significant

adverse events. A clinical trial in subjects with obstructive urolithiasis is required as the next step.

Conclusions

The meta-analysis with regard to the chosen questions was limited by the lack of adequate reports in the literature. The development of uroliths in small ruminants has been shown to be dependent on the nutrition status. The approximate weighted prevalence was 60% in animals with sorghum-based feeding, whereas, 10-20% in animals with corn-based feeding.

With regard to surgical therapy in sheep rams with obstructive urolithiasis, marsupialization of the urinary bladder, perineal urethrostomy, and laparotomic catheter cystostomy resulted in satisfactory success rates. In planning and selecting the best surgical approach in individual cases, the surgeons' personal experience and competence, as well as the owners` requests should be considered.

In conscious living animals, significant differences in the urethral diameters between castrated and intact male lambs may be determined by experienced examiners. Nevertheless, in our study, the results indicated a significant influence of castration on the urethral diameter. In individual cases, the above described technique may help in the surgeons' decision-making with respect to the time for castration. If ultrasonography of the urethral diameter reveals only small values, castration should be delayed and considered at a future time-point. According to the presented results, castration is advised rather at the age of 4 months than at the age of 3 weeks.

Local immunity of the prepuce and the distal urethra in sheep rams appeared to be mainly T-cell-associated. The higher count of CD 3-positive T-cells in the prepuce, suggests a predominant role of these cells in the immune response to assurgent infections.

The results of immunohistochemistry showed that castration had no effect on the content of neuropeptides, as well as the innervation density of the urethra in the sheep ram. In case of obstructive urolithiasis, the pattern of neuropeptide distribution is severely disturbed and cell damage leads to a reduction in detectable periurethral bundles of nerve fibers. This severe tissue damage is supposed to have negative impact on therapeutic outcome, leading to relapses because of urethral strictures for example.

The endoscope-assisted implantation of a transurethral vesical catheter in healthy rams is an effective surgical technique for restoration of urethral patency in patients with obstructive urolithiasis. Especially, in valuable breeding animals or in companion animals, this method could be the basis for development of a method to restore the urethra without stricture formation with a high long-term success rate. However, further scientific studies are required to test this hypothesis.

Literaturverzeichnis

Ackermann H (2014)
Medizinische Biometrie. Epsilon-Verlag, 7. Auflage, Hochheim Darmstadt: 124-126.

Acosta-Dibarrat J, Buendía-Jiménez A, Soriano-Vargas E, Oca-Jiménez RM de, Tórtora-Pérez J (2014)
Distribution of immune response cells in the pelvic urethra and the prepuce of rams.
Pesquisa Veterinária Brasileira 34: 270-276.

AlLugami A, Pückler K von, Sickinger M (2018)
Sonographische Darstellung der distalen Harnröhre beim männlichen Schaflamm.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 46: 196-200.

AlLugami A, Pückler K von, Wehrend A, Sickinger M (2017)
Sonography of the distal urethra in lambs.
Acta Veterinaria Scandinavica 59: 652.

Alpert Y, Ben-Moshe B, Shvalb N, Piura E, Tepper R (2017)
The Effect of the Pressure Exerted on the Maternal Abdominal Wall by the US Probe on Fetal MCA Peak Systolic Velocity.
Ultraschall in der Medizin 38: 44-50.

Alvarado M, Lara-García M, Cuevas E, Berbel P, Pacheco P (2013)
Denervation and castration effects on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in male rats.
Anatomical Record 296: 1634-1639.

Andersson KE (1996)
Neurotransmitters and neuroreceptors in the lower urinary tract.
Current opinion in Obstetrics & Gynecology 8: 361-365.

Arciszewski MB (2004)
Distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP) and galanin (GAL) immunoreactive nerve fibers in the seminal vesicle and prostate of the male sheep.
Annals of Anatomy 186: 83-87.

Arciszewski MB, Wasowicz K (2006)
Noradrenergic and cholinergic innervation of the accessory sexual glands in male sheep.
Acta Veterinaria Hungarica 54: 71-83.

Arlt S, Dicty V, Heuwieser W (2010)
Evidence-based medicine in canine reproduction: quality of current available literature.
Reproduction in Domestic Animals 45: 1052-1058.

Arlt S, Heuwieser W (2005)
Evidence based veterinary medicine.
Deutsche tierärztliche Wochenschrift 112: 146-148.

Arms L, Vizzard MA (2011)
Neuropeptides in lower urinary tract function.
Handbook of Experimental Pharmacology 202: 395-423.

Arrighi S, Bosi G, Cremonesi F, Domeneghini C (2008)
Immunohistochemical study of the pre- and postnatal innervation of the dog lower urinary tract: morphological aspects at the basis of the consolidation of the micturition reflex.
Veterinary Research Communications 32: 291-304.

Arrighi S, Domeneghini C (1998)
Immunolocalization of regulatory peptides and 5-HT in bovine male urogenital apparatus.
Histology and Histopathology 13: 1049-1059.

Augsburger HR, Cruz-Orive LM (1995)
Stereological analysis of the urethra in sexually intact and spayed female dogs.
Acta Anatomica 154: 135-142.

Augsburger HR, Cruz-Orive LM, Arnold S (1993)
Morphology and stereology of the female canine urethra correlated with the urethral pressure profile.
Acta Anatomica 148: 197-205.

Augsburger HR, Führer C (2014)
Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in the urethra of sexually intact, ovariectomized, and estrogen-substituted ovariectomized sheep.
International Urogynecology Journal 25: 657-662.

Bach T (2016)
Ureterorenoskopie bei Urolithiasis. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M (Hrsg.), Die Urologie. Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg: 525-537.

Bailey CB (1975)
Siliceous urinary calculi in bulls, steers, and partial castrates.
Canadian Journal of Animal Science 55: 187-191.

Bani Ismail ZA, Al-Zghoul MF, Al-Majali AM, Khraim NM (2007)
Effects of castration on penile and urethral development in Awassi lambs.
Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 10: 29-34.

Barry CM, Ji E, Sharma H, Yap P, Spencer NJ, Matusica D, Haberberger RV (2017)
Peptidergic nerve fibers in the urethra. Morphological and neurochemical characteristics in female mice of reproductive age.
Neurourology and Urodynamics 37: 960-970.

Bartges JW, Callens AJ (2015)
Urolithiasis.
The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 45: 747-768.

Bauer B, Hannemann R, Lendl C, Strobel H, Ganter M (2018)
Painful procedures in small ruminants - castration of rams and bucks. An overview.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 46: 115-128.

Behrens H, Ganter M, Hiepe T, Braun U (2001)
Organkrankheiten. In: Behrens H, Ganter M, Hiepe T, Braun U (Hrsg.), Lehrbuch der Schafkrankheiten. Parey 4. Auflage, Berlin: 35-40.

Bellenger CR, Rutar AJ, Ilkiw JE, Salamon S (1981)
Urolithiasis in goats.
Australian Veterinary Journal 57: 56.

Belonje PC (1965)
I. An investigation into a problem of urinary calculi in Merino wethers. II. Observations on the post natal development of the penis in Merino ram Iambs and wethers: the possible relationship to the passage of urinary calculi. [not specified].
Journal of the South African Veterinary Medical Association 36: 381-383.

Birder LA, Wolf-Johnston AS, Chib MK, Buffington CA, Roppolo JR, Hanna-Mitchell AT (2010)
Beyond Neurons: Involvement of Urothelial and Glial Cells in Bladder Function.
Neurology and Urodynamics 29: 88-96.

Bitran M, Torres G, Fournier A, Pierre SS, Pablo Huidobro-Toro J (1991)
Age and castration modulate the inhibitory action of neuropeptide Y on neurotransmission In the rat vas deferens.
European Journal of Pharmacology 203: 267-274.

Bostedt H, Dedié K (1996)
Harnwege. In: Bostedt H, Dedié K (Hrsg.), Schaf- und Ziegenkrankheiten. Ulmer 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: 371-380.

Bracero LA, Huff C, Blitz MJ, Plata MJ, Seybold DJ, Broce M (2017)
Ultrasound and histological measurements of dividing membrane thickness in twin gestations.
Ultrasound in Obstetrics & Gynecology 50: 470-475.

Braun PM, Jünemann K-P (2012)
Anatomie, Physiologie und Innervation des Harntraktes. In: Schultz-Lampel D, Goepel M, Haferkamp A (Hrsg.), Urodynamik. Springer Berlin Heidelberg 3., vollständig überarbeitete Auflage, Berlin, Heidelberg: 11-16.

Braun U (1993)
Ultrasonographic examination of the left kidney, the urinary bladder, and the urethra in cows.
Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A 40: 1-9.

Braun U, Schefer U, Fohn J (1992a)
Urinary tract ultrasonography in normal rams and in rams with obstructive urolithiasis.
The Canadian Veterinary Journal 33: 654-659.

Braun U, Schefer U, Gerber D (1992b)
Ultrasonography of the urinary tract of female sheep.
American Journal of Veterinary Research 53: 1734-1739.

Brunst M, Shahmanesh M, Sukthankar A, Pearce JH, Gaston JS (1998)
Isolation and characterisation of T lymphocytes from the urethra of patients with acute urethritis.
Sexually Transmitted Infections 74: 279-283.

Buczinski S, O'Connor AM (2016)
Specific Challenges in Conducting and Reporting Studies on the Diagnostic Accuracy of Ultrasonography in Bovine Medicine.
The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 32: 1-18.

Bushman DH, Emerick RJ, Embry LB (1964)
Incidence of urinary calculi in sheep as affected by various dietary phosphates.
Journal of Animal Science 23: 671-675.

Bushman DH, Emerick RJ, Embry LB (1965)
Experimentally induced ovine phosphatic urolithiasis: relationships involving dietary calcium, phosphorus and magnesium.
The Journal of Nutrition 87: 499-504.

Chen L, Feng C, Lv X-G, Fan H-H, Joshi P, Barbagli G, Zhao Y-M, Xu Y-M, Li Z, Hu B, Fu Q (2017)
Three-Dimensional Computerized Model Based on the Sonourethrogram: A Novel Technique for Evaluating the Anterior Urethral Stricture.
The Journal of Urology 199: 568-575.

Chen XM, Creed KE (2004)
Histochemical and contractile properties of striated muscles of urethra and levator ani of dogs and sheep.
Neurology and Urodynamics 23: 702-708.

Chu PG, Arber DA (2001)
CD79: a review.
Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology 9: 97-106.

Clark P, Swenson CL, Osborne CA, Ulrich LK (1999)
Calcium oxalate crystalluria in a goat.
Journal of the American Veterinary Medical Association 215: 77-78.

Cockcroft PD (1993)
Dissolution of obstructive urethral uroliths in a ram.
The Veterinary Record 132: 486.

Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Gruenberg W (2016)
Diseases of the urinary system. In: Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Gruenberg W (Hrsg.), Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Elsevier Health Sciences, 11th ed., London: 1095-1154.

Cottrell DF, Iggo A, Kitchell RL (1978)
Electrophysiology of the afferent innervation of the penis of the domestic ram.
The Journal of Physiology 283: 347-367.

Crookshank HR (1970)
Effect of ammonium salts on the production of ovine urinary calculi.
Journal of Animal Science 30: 1002-1004.

Crookshank HR, Robbins JD, Kunkel HO (1967)
Relationship of dietary mineral intake to serum mineral level and the incidence of urinary calculi in lambs.
Journal of Animal Science 26: 1179-1185.

Cuddeford D (1987)
Role of magnesium in the aetiology of ovine urolithiasis in fattening store lambs and intensively fattened lambs.
The Veterinary Record 121: 194-197.

Cullen WC, Fletcher TF, Bradley WE (1981a)
Histology of the canine urethra II. Morphometry of the male pelvic urethra.
The Anatomical Record 199: 187-195.

Cullen WC, Fletcher TF, Bradley WE (1981b)
Histology of the canine urethra. I. Morphometry of the female urethra.
The Anatomical Record 199: 177-186.

Cypher EE, van Amstel SR, Videla R, Clark KF, Anderson DE (2017)
Vesicopreputial anastomosis for the treatment of obstructive urolithiasis in goats.
Veterinary Surgery 46: 281-288.

Dadarwal D, Palmer C, Griebel P (2017)
Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract.
Theriogenology 104: 62-71.

Davis WD, Scott R, JR, Crookshank HR, Spjut HJ (1969)
Factors affecting experimentally induced calculous disease in sheep.
The Journal of Urology 101: 383-389.

DerSimonian R, Laird N (1986)
Metaanalysis in clinical trials.
Controlled Clinical Trials 7: 177-188.

Deruyver Y, Hakim L, Franken J, Ridder D de (2016)
The use of imaging techniques in understanding lower urinary tract (dys)function.
Autonomic Neuroscience 200: 11-20.

Diener M (2000)
Vegetatives Nervensystem. In: Engelhardt von W, Breves G (Hrsg.), Physiologie der Haustiere. Enke 1. Auflage, Stuttgart: 100-109.

Dockray GJ (1987)
Physiology of enteric neuropeptides.
Physiology of the Gastrointestinal Tract 1: 41-66.

Doster AR, Grotelueschen DM (1996)
Reproductive Problems in Rams.
Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension. B-2: 1-3.

Dühlmeier R, Zibell G, Altrock A von, Roth C, Schroeder C, Thies K, Ganter M (2007)
Urolithiasis in small ruminants - methods of treatment and recovery.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 35: 175-182.

Emerick RJ, King HR, Embry LB (1972)
Influence of dietary potassium and of transaconitic acid on mineral metabolism related to ovine phosphatic urolithiasis.
Journal of Animal Science 35: 901-907.

Ewoldt JM, Anderson DE, Miesner MD, Saville WJ (2006)
Short- and long-term outcome and factors predicting survival after surgical tube cystostomy for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants.
Veterinary Surgery 35: 417-422.

Ewoldt JM, Jones ML, Miesner MD (2008)
Surgery of obstructive urolithiasis in ruminants.
The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 24: 455-465.

Fazili MR, Malik HU, Bhattacharyya HK, Buchoo BA, Moulvi BA, Makhdoomi DM (2010)
Minimally invasive surgical tube cystotomy for treating obstructive urolithiasis in small ruminants with an intact urinary bladder.
The Veterinary Record 166: 528-531.

Foo YZ, Nakagawa S, Rhodes G, Simmons LW (2017)
The effects of sex hormones on immune function. A meta-analysis.
Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 92: 551-571.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (2018)
Food and agriculture data. http://www.fao.org/faostat/en/#home (03.07.2018).

Förster D (1988)
Urolithiasis beim Schaf.
Praktischer Tierarzt 5: 31-38.

Fortier LA, Gregg AJ, Erb HN, Fubini SL (2004)
Caprine obstructive urolithiasis: requirement for 2nd surgical intervention and mortality after percutaneous tube cystostomy, surgical tube cystostomy, or urinary bladder marsupialization.
Veterinary Surgery 33: 661-667.

Fowler CJ, Griffiths D, Groat WC de (2008)
The neural control of micturition.
Nature Reviews Neuroscience 9: 453-466.

Franz S, Dadak AM, Schöffmann G, Coppens P, Khol JL, Baumgartner W, Dupre G (2008)
Laparoscopic-assisted implantation of a urinary catheter in male sheep.
Journal of the American Veterinary Medical Association 232: 1857-1862.

Gamper M, Viereck V, Eberhard J, Binder J, Moll C, Welter J, Moser R (2013)
Local immune response in bladder pain syndrome/interstitial cystitis ESSIC type 3C.
International Urogynecology Journal 24: 2049-2057.

Ganor Y, Zhou Z, Bodo J, Tudor D, Leibowitch J, Mathez D, Schmitt A, Vacher-Lavenu M-C, Revol M, Bomsel M (2013)
The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages.
Mucosal Immunology 6: 776-786.

Ganter M (2001)
Urolithiasis. In: Behrens H, Ganter M, Hiepe T, Braun U (Hrsg.), Lehrbuch der Schafkrankheiten. Parey 4., vollständig neubearbeitete Auflage, Berlin: 37-40.

Garcia-Pascual A, Labadía A, Garcia-Flores M, Sancho M, Triguero D (2010)
Refractoriness of urethral striated muscle contractility to nitric oxide-dependent cyclic GMP production.
Nitric oxide: biology and chemistry 23: 26-33.

George JW, Hird DW, George LW (2007)
Serum biochemical abnormalities in goats with uroliths: 107 cases (1992-2003).
Journal of the American Veterinary Medical Association 230: 101-106.

Gill MS, Sod GA (2004)
Buccal mucosal graft urethroplasty for reversal of a perineal urethrostomy in a goat wether.
Veterinary Surgery 33: 382-385.

Gonzalez-Soriano J, Martin-Palacios S, Rodriguez-Veiga E, Triguero D, Costa G, Garcia-Pascual A (2003)
Nitric oxide synthase in the external urethral sphincter of the sheep. Immunohistochemical and functional study.
Journal of Urology 169: 1901-1906.

Gosselin VB, Babkine M, Gains MJ, Nichols S, Arsenault J, Francoz D (2014)
Validation of an Ultrasound Imaging Technique of the Tympanic Bullae for the Diagnosis of Otitis Media in Calves.
Journal of Veterinary Internal Medicine 28: 1594-1601.

Gutierrez C, Escolar E, Juste MC, Palacios MP, Corbera JA (2000)
Severe urolithiasis due to trimagnesium orthophosphate calculi in a goat.
Veterinary Record 146: 534.

Haldane JBS (1940)
The Mean and Variance of chi 2, When Used as a Test of Homogeneity, When Expectations are Small.
Biometrika 31: 346.

Halland SK, House JK, George LW (2002)
Urethroscopy and laser lithotripsy for the diagnosis and treatment of obstructive urolithiasis in goats and pot-bellied pigs.
Journal of the American Veterinary Medical Association 220: 1831-1834.

Haven ML, Bowman KF, Engelbert TA, Blikslager AT (1993)
Surgical management of urolithiasis in small ruminants.
The Cornell Veterinarian 83: 47-55.

Hay L (1990)
Prevention and treatment of urolithiasis in sheep.
In Practice 12: 87-91.

Hecht S (2015)
Diagnostic imaging of lower urinary tract disease.
The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 45: 639-663.

Heilmann RM (2016)
Minimal-invasive interventionelle Verfahren am Urogenitaltrakt von Hund und Katze.
Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere 44: 105-15.

Hein WR (1992)
Structure and diversity of ruminant T-cell receptors.
Annals of Veterinary Research 23: 262-265.

Higgins J, Green S (2011)
Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. https://handbook-5-1.cochrane.org/ (16.08.2018).

Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG (2003)
Measuring inconsistency in meta-analyses.
Biometrical Journal (Clinical research ed.) 327: 557-560.

Hoar DW, Emerick RJ, Embry LB (1969)
Ovine phosphatic urolithiasis as related to the phosphorus and calcium contents and acid-base-forming effects of all-concentrate diets.
Journal of Animal Science 29: 647-652.

Hoar DW, Emerick RJ, Embry LB (1970a)
Influence of calcium source, phosphorus level and acid-base-forming effects of the diet of feedlot performance and urinary calculi formation in lambs.
Journal of Animal Science 31: 118-125.

Hoar DW, Emerick RJ, Embry LB (1970b)
Potassium, phosphorus and calcium interrelationships influencing feedlot performance and phosphatic urolithiasis in lambs.
Journal of Animal Science 30: 597-600.

Holmgren J, Czerkinsky C (2005)
Mucosal immunity and vaccines.
Nature Medicine 11: 45-53.

Howard CJ, Morrison WI (1994)
The leukocytes: markers, tissue distribution and functional characterization. In: Goddeeris BML, Ivan MW (Hrsg.), Cell-mediated immunity in ruminants. CSC press Florida 1st ed., Florida: 1-17.

Hunter BG, Huber MJ, Riddick TL (2012)
Laparoscopic-assisted urinary bladder marsupialization in a goat that developed recurrent urethral obstruction following perineal urethrostomy.
Journal of the American Veterinary Medical Association 241: 778-781.

Huntington GB, Emerick RJ, Embry LB (1977)
Sodium bentonite or sodium bicarbonate as aids in feeding high-concentrate diets to lambs.
Journal of Animal Science 45: 804-811.

Husband AJ (1987)
Perspectives in mucosal immunity. A ruminant model.
Veterinary Immunology and Immunopathology 17: 357-365.

Iselin U, Lischer C. J., Braun U, Steiner A (2001)
Zystotomie mit und ohne Implantation eines präpubikalen Ballonkatheters zur Behandlung der obstruktiven Urolithiasis beim kleinen Wiederkäuer: eine retrospektive Studie.
Wiener Tierärztliche Monatsschrift 88: 39-45.

Janke JJ, Osterstock JB, Washburn KE, Bissett WT, Roussel AJ, Hooper RN (2009)
Use of Walpole's solution for treatment of goats with urolithiasis: 25 cases (2001-2006).
Journal of the American Veterinary Medical Association 234: 249-252.

Jones ML, Streeter RN, Goad CL (2009)
Use of dietary cation anion difference for control of urolithiasis risk factors in goats.
American Journal of Veterinary Research 70: 149-155.

Juárez R, Cruz Y (2014)
Urinary and ejaculatory dysfunction induced by denervation of specific striated muscles anatomically related to the urethra in male rats.
Neurourology and Urodynamics 33: 437-442.

Kannan KVA, Lawrence KE (2010)
Obstructive urolithiasis in a Saanen goat in New Zealand, resulting in a ruptured bladder.
New Zealand Veterinary Journal 58: 269-271.

Karpenstein H, Klumpp S, Seyrek-Intas D, Kramer M (2011)
Ultrasonography in Disorders of the Urinary Tract of Dogs and Cats.
Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere 39: 281-288.

Kazeko NI, Zhmurov VA, Borovskii AA, Oskolkov SA, Mariupolskii AA, Dobrovolskaia MD, Evlochko AS (2008)
[Immunological indices in urolithiasis patients with secondary pyelonephritis].
Urologiiâ˜1: 11-15.

Kedia GT, Uckert S, Oelke M, Sonnenberg JE, Sohn M, Kuczyk MA, Hedlund P (2015)
Expression and distribution of phosphodiesterase isoenzymes in the human male urethra.
Urology 85: 964.e1-6.

Keene BW (2000)
Towards evidence-based veterinary medicine.
Journal of Veterinary Internal Medicine 14: 118-119.

Kinsley MA, Semevolos S, Parker JE, Duesterdieck-Zellmer K, Huber M (2013)
Use of plain radiography in the diagnosis, surgical management, and postoperative treatment of obstructive urolithiasis in 25 goats and 2 sheep.
Veterinary Surgery 42: 663-668.

Knippschild S, Baulig C, Krummenauer F (2015)
Heterogenität in Meta-Analysen - kein Vergleich von Äpfeln und Birnen erlaubt.
Journal of Dental Implantology 31: 224-229.

Koyama M, Ishihara K, Karasuyama H, Cordell JL, Iwamoto A, Nakamura T (1997)
CD79 alpha/CD79 beta heterodimers are expressed on pro-B cell surfaces without associated mu heavy chain.
International Immunology 9: 1767-1772.

Krauth J, Lienert GA (1973)
Die Konfigurationsfrequenzanalyse und ihre Anwendung in Psychologie und Medizin. Verlag Karl Alber GmbH, Freiburg-München: 187 S.

Kumar R, Kumar A, Singh H, Singh B, Prakash P (1982)
Effect of castration on urethra and accessory sex glands in goats.
Indian Veterinary Journal 59: 304-308.

Kumon H, Ozawa H, Nose H, Ohta H, Nishigaki K (2004)
Basic study on velocity-flow urodynamics using Doppler sonography: simultaneous detection of cavitation and Doppler signals in an artificial urethral model.
International Journal of Urology 11: 628-633.

Kümper H (1994)
Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken. Klinisches Bild, Therapiemöglichkeiten und prognostische Beurteilung.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 22: 234-241.

Lamprecht WO, Jr., Darroch JG, Crookshank HR (1969a)
Statistical analysis of blood serum composition urine excretion levels and occurrence of urolithiasis in sheep.
Journal of Animal Science 28: 714-716.

Lamprecht WO, Jr., Darroch JG, Crookshank HR (1969b)
Statistical analysis of dietary mineral intake and the occurrence of urolithiasis in sheep.
Journal of Animal Science 28: 386-390.

Lee CMY, Kumar RK, Lubowski DZ, Burcher E (2002)
Neuropeptides and nerve growth in inflammatory bowel diseases - A quantitative immunohistochemical study.
Digestive Diseases and Sciences 47: 495-502.

Lehmacher W (1981)
A More Powerful Simultaneous Test Procedure in Configural Frequency Analysis.
Biometrical Journal 23: 429-436.

Livingston CW, Jr., Calhoun MC, Gauer BB, Baldwin BC, Jr. (1984)
Effect of experimental infection with ovine ureaplasma upon the development of uroliths in feedlot lambs.
Israel Journal of Medical Sciences 20: 958-961.

Lonsdale K (1968)
Epitaxy as a growth factor in urinary calculi and gallstones.
Nature 217: 56-58.

Lorenzen E, Follmann F, Jungersen G, Agerholm JS (2015)
A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection.
Veterinary Research 46: 116.

Lösch U, Cihak J, Erhard MH, Kaspers B (2000)
Abwehr. In: Engelhardt von W, Breves G (Hrsg.), Physiologie der Haustiere. Enke 1. Auflage, Stuttgart: 204-216.

Majewski M, Kaleczyc J, Mayer B, Schemann M, Weihe E, Lakomy M (1999)
Innervation of the fibro-elastic type of the penis: an immunohistochemical study in the male pig.
Acta Histochemica 101: 71-101.

Makhdoomi D, Gazi M (2013)
Obstructive urolithiasis in ruminants – A review.
Veterinary World 6: 233.

Manning RA, Blaney BJ (1986)
Epidemiological aspects of urolithiasis in domestic animals in Queensland.
Australian Veterinary Journal 63: 423-424.

Marettova E, Maretta M (2002)
Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary.
Acta Histochemica 104: 431-434.

Marsh H, Safford JW (1957)
Effect of deferred castration on urethral developoment in calves.
Journal of the American Veterinary Medical Association 4: 342-344.

Mavangira V, Cornish JM, Angelos JA (2010)
Effect of ammonium chloride supplementation on urine pH and urinary fractional excretion of electrolytes in goats.
Journal of the American Veterinary Medical Association 237: 1299-1304.

May KA, Moll HD, Wallace LM, Pleasant RS, Howard RD (1998)
Urinary bladder marsupialization for treatment of obstructive urolithiasis in male goats.
Veterinary Surgery 27: 583-588.

Mehta CR (1991)
StatXact. A Statistical Package for Exact Nonparametric Inference.
The American Statistician 45: 74-75.

Merrill L, Girard B, Arms L, Guertin P, Vizzard MA (2013)
Neuropeptide/Receptor Expression and Plasticity in Micturition Pathways.
Current Pharmaceutical Design 19: 4411-4422.

Modlin M (1980)
A history of urinary stone.
South African Medical Journal 58: 652-655.

Müller UO (2017)
Prävalenz. https://www.pschyrembel.de/Prävalenz/K0HLC/doc/ (06.03.2018).

Nacken W, Roth J, Sorg C, Kerkhoff C (2003)
S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity.
Microscopy Research and Technique 60: 569-580.

Nottle MC (1982)
Renal calculi in apparently normal sheep.
Australian Veterinary Journal 58: 256-259.

Nuss K, Schwarz A, Ringer S (2017)
Lokalanästhesien beim Wiederkäuer.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 45: 159-173.

Nwaokorie EE, Osborne CA, Lulich JP, Fletcher TF, Ulrich LK, Koehler LA, Buettner MT (2015)
Risk factors for calcium carbonate urolithiasis in goats.
Journal of the American Veterinary Medical Association 247: 293-299.

O'Connor AM, Anderson KM, Goodell CK, Sargeant JM (2014a)
Conducting systematic reviews of intervention questions I: Writing the review protocol, formulating the question and searching the literature.
Zoonoses and Public Health 61 Suppl 1: 28-38.

O'Connor AM, Sargeant JM, Wang C (2014b)
Conducting systematic reviews of intervention questions III: Synthesizing data from intervention studies using meta-analysis.
Zoonoses and Public Health 61 Suppl 1: 52-63.

Oehme FW, Tillmann H (1965)
Diagnosis and treatment of ruminant urolithiasis.
Journal of the American Veterinary Medical Association 147: 1331-1339.

Oh-ishi T, Shimoda T, Hayashi H, Onaga T (2013)
Role of tachykinins and neurokinin receptor subtypes in the regulation of motility of the forestomach and abomasum in conscious sheep.
Neuropeptides 47: 9-18.

Oryan A, Razavi M (1993)
Nephrolithiasis in Iranian sheep.
Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A 40: 639-640.

Packett LV, Hauschild JP (1964)
Phosphorus, calcium and magnesium relationships in ovine urolithiasis.
The Journal of Nutrition 84: 185-190.

Palmer JL, Dykes NL, Love K, Fubini SL (1998)
Contrast radiography of the lower urinary tract in the management of obstructive urolithiasis in small ruminants and swine.
Veterinary Radiology & Ultrasound 39: 175-180.

Pan X-L, Wen Z-S, Zou X-T, Zhou E-K, Kou H-Q, Xu Z-R, Zhang W-J (2011)
Chemical composition and microstructure of uroliths associated with the feeding of high-level cottonseed meal diet to sheep.
Research in Veterinary Science 91: 405-411.

Parker BN (1981)
Urolithiasis in calves and lambs.
The Veterinary Record 108: 545-546.

Ponglowhapan S, Church DB, Khalid M (2008)
Differences in the proportion of collagen and muscle in the canine lower urinary tract with regard to gonadal status and gender.
Theriogenology 70: 1516-1524.

Poulsen Nautrup C, Lüerssen D (2007)
Harnröhre. In: Poulsen Nautrup C, Tobias R (Hrsg.), Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. Schlütersche, 4., unveränderte Auflage, Hannover: 237-240.

Pries M, Menke A (2005)
Futterwerttabelle für Schafe.
http://lwknrw.de/landwirtschaft/tierproduktion/schafhaltung/pdf/tabellen-futterwerte-schafe.pdf (14.03.2018).

Prochnau D, Romeike BF, Bischoff S, Schubert H, Figulla HR, Surber R (2013)
Reduction of neurofilaments following renal denervation with radiofrequency current in a sheep model.
International Journal of Cardiology 168: 4450-4452.

Pu Y, Xu M, Liang Y, Yang K, Guo Y, Yang X, Fu Y-X (2016)
Androgen receptor antagonists compromise T cell response against prostate cancer leading to early tumor relapse.
Science Translational Medicine 8: 1-12.

Pudney J, Anderson D (2011)
Innate and acquired immunity in the human penile urethra.
Journal of reproductive immunology 88: 219-227.

Pudney J, Anderson DJ (1995)
Immunobiology of the human penile urethra.
The American Journal of Pathology 147: 155-165.

Quayle AJ, Pudney J, Munoz DE, Anderson DJ (1994)
Characterization of T lymphocytes and antigen-presenting cells in the murine male urethra.
Biology of Reproduction 51: 809-820.

R Core Team (2017)
R: A language and environment for statistical computing. https://cran.r-project.org/ (16.08.2018).

Radojevic K, Arsenovic-Ranin N, Kosec D, Pesic V, Pilipovic I, Perisic M, Plecas-Solarovic B, Leposavic G (2007)
Neonatal castration affects intrathymic kinetics of T-cell differentiation and the spleen T-cell level.
The Journal of Endocrinology 192: 669-682.

Radziszewski P, Soller W, Mattiasson A (2003)
Calcitonin gene-related peptide and substance P induce pronounced motor effects in the female rat urethra in vivo.
Scandinavian Journal of Urology and Nephrology 37: 275-280.

Rakestraw PC, Fubini SL, Gilbert RO, Ward JO (1995)
Tube cystostomy for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants.
Veterinary Surgery 24: 498-505.

Rassweiler JJ, Hruza M, Klein JT (2016)
Extrakorporale Stoßwellentherapie der Urolithiasis. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M (Hrsg.), Die Urologie. Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg: 503-523.

Rau KK, Petruska JC, Cooper BY, Johnson RD (2014)
Distinct subclassification of DRG neurons innervating the distal colon and glans penis/distal urethra based on the electrophysiological current signature.
Journal of Neurophysiology 112: 1392-1408.

Raza A, Muhammad G, Manzoor A, Ahmad M, Ijaz M (2012)
Clinical Efficacy of Allopurinol and Ketoprofen in the Treatment of Urate Associated Urolithiasis in Bucks-Case Report.
International Journal of Molecular Veterinary Research 2: 22-24.

Reichler IM (2010)
Kastrationsnebenwirkungen Harninkontinenz und Welpenfell bei der Hündin. Eine Übersicht zu Pathophysiologie, Diagnose und Therapie.
Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere 3: 157-162.

Reichler IM, Welle M, Sattler U, Jöchle W, Roos M, Hubler M, Barth A, Arnold S (2007)
Comparative quantitative assessment of GnRH- and LH-receptor mRNA expression in the urinary tract of sexually intact and spayed female dogs.
Theriogenology 67: 1134-1142.

Reppert EJ, Streeter RN, Simpson KM, Taylor JD (2016)
Retrograde catheterization of the urinary bladder in healthy male goats by use of angiographic catheters.
American Journal of Veterinary Research 77: 1295-1299.

Reyes L, Alvarez S, Allam A, Reinhard M, Brown MB (2009)
Complicated urinary tract infection is associated with uroepithelial expression of proinflammatory protein S100A8.
Infection and Immunity 77: 4265-4274.

Ritter M (2016)
Bildgebung der Urolithiasis. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M (Hrsg.), Die Urologie. Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg: 479-487.

Robbins JD, Kunkel HO, Crookshank HR (1965)
Relationship of dietary mineral intake to urinary mineral excretion and incidence of urinary calculi in lambs.
Journal of Animal Science 24: 76-82.

Robinson MR, Norris RD, Sur RL, Preminger GM (2008)
Urolithiasis: Not just a 2-legged animal disease.
Journal of Urology 179: 46-52.

Ruebben I, Ruebben H (2012)
CME Certified Training.
Urologe 51: 1005-1014.

Rufibach K, Held L (2013)
Meta-Analyse. In: Held L, Rufibach K, Seifert B (Hrsg.), Medizinische Statistik. Konzepte, Methoden, Anwendungen. Pearson Studium, München: 414-431.

Rüsse I (1990)
Harn- und Geschlechtsorgane. In: Rüsse I, Sinowatz F (Hrsg.), Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey, 2. Auflage, Berlin: 304-313.

Salman MD, Dargatz DA, Kimberling CV, Reif JS, Hopper GE (1988)
Rates of diseases and their associated costs in two Colorado sheep feedlots (1985-1986).
Journal of the American Veterinary Medical Association 193: 1518-1523.

Sargeant JM, Kelton DF, O'Connor AM (2014a)
Randomized controlled trials and challenge trials: design and criterion for validity.
Zoonoses and Public Health 61 Suppl 1: 18-27.

Sargeant JM, Kelton DF, O'Connor AM (2014b)
Study designs and systematic reviews of interventions: building evidence across study designs.
Zoonoses and Public Health 61 Suppl 1: 10-17.

Sargeant JM, O'Connor AM (2014a)
Conducting systematic reviews of intervention questions II: Relevance screening, data extraction, assessing risk of bias, presenting the results and interpreting the findings.
Zoonoses and Public Health 61 Suppl 1: 39-51.

Sargeant JM, O'Connor AM (2014b)
Introduction to systematic reviews in animal agriculture and veterinary medicine.
Zoonoses and Public Health 61 Suppl 1: 3-9.

Sato H, Omori S (1977)
Incidence of urinary calculi in goats fed a high phosphorus diet.
The Japanese Journal of Veterinary Science 39: 531-537.

Schmidt PL (2007)
Evidence-based veterinary medicine. Evolution, revolution, or repackaging of veterinary practice?
The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 37: 409-417.

Schwarzer G (2007)
Meta. An R package for meta-analysis.
R news 7: 40-45.

Scott P (2000)
Ultrasonography of the urinary tract in male sheep with urethral obstruction.
In Practice 22: 329-333.

Scott P (2013)
Transabdominal Ultrasonographic Examination of 26 Sheep with Suspected Urinary Tract Disease (2010-2012).
Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis 2: 1-5.

Scott P (2016)
Practical Use of Ultrasound Scan in Small Ruminant Medicine and Surgery.
The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 32: 181-205.

Scott PR (2012)
Applications of diagnostic ultrasonography in small ruminant reproductive management.
Animal Reproduction Science 130: 184-186.

Scott PR, Sargison ND (2010)
Abdominal ultrasonography as an adjunct to clinical examination in sheep.
Small Ruminant Research 92: 108-119.

Selak A (2018)
Untersuchung zum vaginalen schleimhautassoziierten Abwehrsystem bei Sauen.
Dissertationsschrift Veterinärmedizin, Giessen.

Shaida N, Berman LH (2012)
Ultrasound of the male anterior urethra.
The British Journal of Radiology 85 Spec No 1: S94-101.

Sickinger M (2007)
Neuropeptidgehalt der bovinen Labmagenwand in Abhängigkeit von Rasse und Verlagerungszustand. Dissertationsschrift Veterinärmedizin, Giessen.

Sickinger M, Leiser R, Failing K, Doll K (2008)
Evaluation of differences between breeds for substance P, vasoactive intestinal polypeptide, and neurofilament 200 in the abomasal wall of cattle.
American Journal of Veterinary Research 69: 1247-1253.

Sienkiewicz W, Kaleczyc J, Czaja K, Lakomy M (2004)
Adrenergic, nitrergic and peptidergic innervation of the urethral muscle in the boar.
Folia Histochemica et Cytobiologica 42: 89-94.

Simoneit C, Heuwieser W, Arlt S (2012)
Die evidenzbasierte Veterinarmedizin im Praxisalltag.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 40: 186-192.

Smollich A (1992a)
Ableitende Harnwege. In: Smollich A, Michel G (Hrsg.), Mikroskopische Anatomie der Haustiere. Fischer 2. Auflage, Jena: 229-232.

Smollich A (1992b)
Geschlechtssystem. In: Smollich A, Michel G (Hrsg.), Mikroskopische Anatomie der Haustiere. Fischer 2. Auflage, Jena: 267-276.

Steininger K, Braun U (2012)
Ultrasonography of the urinary tract in 29 female Saanen goats.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 154: 67-74.

Stewart SR, Emerick RJ, Pritchard RH (1990)
High dietary calcium to phosphorus ratio and alkali-forming potential as factors promoting silica urolithiasis in sheep.
Journal of Animal Science 68: 498-503.

Stewart SR, Emerick RJ, Pritchard RH (1991)
Effects of dietary ammonium chloride and variations in calcium to phosphorus ratio on silica urolithiasis in sheep.
Journal of Animal Science 69: 2225-2229.

Stratton-Phelps M, House JK (2004)
Effect of a commercial anion dietary supplement on acid-base balance, urine volume, and urinary ion excretion in male goats fed oat or grass hay diets.
American Journal of Veterinary Research 65: 1391-1397.

Streeter RN, Washburn KE, Higbee RG, Bartels KE (2001)
Laser lithotripsy of a urethral calculus via ischial urethrotomy in a steer.
Journal of the American Veterinary Medical Association 219: 640-643.

Striz I, Trebichavsky I (2004)
Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation.
Physiological Research 53: 245-253.

Sullivan K, Freeman S, van Heugten E, Ange-van Heugten K, Wolfe B, Poore MH (2013)
Impact of two types of complete pelleted, wild ungulate feeds and two pelleted feed to hay ratios on the development of urolithogenic compounds in meat goats as a model for giraffes.
Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97: 566-576.

Sun W-D, Wang J-Y, Zhang K-C, Wang X-L (2010a)
Study on precipitation of struvite and struvite-K crystal in goats during onset of urolithiasis.
Research in Veterinary Science 88: 461-466.

Sun W-D, Zhang K-C, Wang J-Y, Wang X-L (2010b)
The chemical composition and ultrastructure of uroliths in Boer goats.
Veterinary Journal 186: 70-75.

Sutherland JS, Goldberg GL, Hammett MV, Uldrich AP, Berzins SP, Heng TS, Blazar BR, Millar JL, Malin MA, Chidgey AP, Boyd RL (2005)
Activation of Thymic Regeneration in Mice and Humans following Androgen Blockade.
The Journal of Immunology 175: 2741-2753.

Tang S, Moore ML, Grayson JM, Dubey P (2012)
Increased CD8+ T-cell function following castration and immunization is countered by parallel expansion of regulatory T cells.
Cancer Research 72: 1975-1985.

Taylor CR (1976)
Immuno-histological observations upon the development of reticulum cell sarcoma in the mouse.
The Journal of Pathology 118: 201-219.

Taylor CR (2015)
Quantitative in situ proteomics; a proposed pathway for quantification of immunohistochemistry at the light-microscopic level.
Cell and Tissue Research 360: 109-120.

Taylor CR, Levenson RM (2006)
Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II.
Histopathology 49: 411-424.

Tobias KM, van Amstel SR (2013)
Modified proximal perineal urethrostomy technique for treatment of urethral stricture in goats.
Veterinary Surgery 42: 455-462.

Umstattd LA, Mills JC, Critchlow WA, Renner GJ, Zitsch RP (2017)
Shrinkage in oral squamous cell carcinoma. An analysis of tumor and margin measurements in vivo, post-resection, and post-formalin fixation.
American Journal of Otolaryngology 38: 660-662.

Unanian MM, Rosa JS, SILVA A (1985)
Experimental urolithiasis in goats - possible causes and prophylaxis.
Pesquisa Agropecuaria Brasileira 20: 467-474.

Van Metre DC (2004)
Urolithiasis. In: Fubini SL, Ducharme NG (Hrsg.), Farm Animal Surgery. Saunders, St Louis: 534-547.

Van Metre DC, Fubini SL (2006)
Ovine and caprine urolithiasis: another piece of the puzzle.
Veterinary Surgery 35: 413-416.

Van Metre DC, House JK, Smith BP, George LW, Angelos SM, Angelos JA, Fecteau G (1996a)
Obstructive urolithiasis in ruminants: Medical treatment and urethral surgery.
Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian 18: 317-327.

Van Metre DC, House JK, Smith BP, Thurmond MC, George LW, Angelos SM, Angelos JA, Fecteau G (1996b)
Obstructive urolithiasis in ruminants: Surgical management and prevention.
Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian 18: 275-289.

Van Weeren PR, Klein WR, Voorhout G (1987a)
Urolithiasis in small ruminants. I. A retrospective evaluation of urethrostomy.
The Veterinary Quarterly 9: 76-79.

Van Weeren PR, Klein WR, Voorhout G (1987b)
Urolithiasis in small ruminants. II. Cysto-urethrography as a new aid in diagnosis.
The Veterinary Quarterly 9: 79-83.

Videla R, van Amstel S (2016)
Urolithiasis.
The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice 32: 687-700.

Vipperman PE, Jr., Preston RL, Kintner LD, Pfander WH (1969)
Role of calcium in the nutritional etiology of a metabolic disorder in ruminants fed a high grain ration.
The Journal of Nutrition 97: 449-462.

Vollmerhaus B (1999)
Harnorgane. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E (Hrsg.), Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Parey, 8. Auflage, Berlin: 309-340.

Wagner T (2014)
Metaanalysen zur Therapie der bovinen Dermatitis digitalis. Dissertationsschrift Veterinärmedizin, Giessen.

Walker RA (2006)
Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I.
Histopathology 49: 406-410.

Wang J-Y, Sun W-D, Wang X-L (2009)
Comparison of effect of high intake of magnesium with high intake of phosphorus and potassium on urolithiasis in goats fed with cottonseed meal diet.
Research in Veterinary Science 87: 79-84.

Wang Y, Nagarajan U, Hennings L, Bowlin AK, Rank RG (2010)
Local host response to chlamydial urethral infection in male guinea pigs.
Infection and Immunity 78: 1670-1681.

Weaver AD (1969)
Obstructive urolithiasis in sheep.
The Veterinary Record 84: 320-324.

Welsch U (2003)
Ableitende Harnwege. In: Welsch U (Hrsg.), Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer 1. Auflage, München: 422-425.

Wenkel R, Berg W, Prange H (1998)
Harnsteine bei Kleintieren und anderen Tierarten - eine retrospektive Studie aus den Jahren 1980-1989.
Deutsche tierärztliche Wochenschrift 105: 182-186.

Weyrauch KD, Smollich A, Schnorr B (1998)
Harnsystem. In: Weyrauch KD, Smollich A, Schnorr B (Hrsg.), Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Enke, Stuttgart: 93-97.

Williams AE (2012a)
Basic concepts in immunology. In: Williams AE (Hrsg.), Immunology: Mucosal and body surface defences. Wiley, 1st ed, West Sussex, UK: 1-19.

Williams AE (2012b)
Immunology of the urogenital tract and conjunctiva. In: Williams AE (Hrsg.), Immunology: Mucosal and body surface defences. Wiley 1 st ed, West Sussex, UK: 177-195.

Williams AE (2012c)
The adaptive immune system. In: Williams AE (Hrsg.), Immunology: Mucosal and body surface defences. Wiley 1 st ed, West Sussex, UK: 41-67.

Williams AE (2012d)
The innate immune system. In: Williams AE (Hrsg.), Immunology: Mucosal and body surface defences. Wiley 1 st ed, West Sussex, UK: 20-40.

Yamamoto Y, Kitamura N, Yamada J, Atoji Y, Suzuki Y, Yamashita T (1994)
Structure of the enteric nervous system in the sheep omasum as revealed by neurofilament protein-like immunoreactivity.
Journal of Anatomy 184: 399-405.

Yoshiyama M, Groat WC de (2008)
The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract.
Journal of molecular neuroscience 36: 227-240.

Yuan A, Rao MV, Veeranna, **Nixon RA** (2012)
Neurofilaments at a glance.
Journal of Cell Science 125: 3257-3263.

Zasloff M (2007)
Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract.
Journal of the American Society of Nephrology 18: 2810-2816.

Danksagung

Nachdem für den Abschluss dieser Arbeit so manch größeres Hindernis zu nehmen war, freue ich mich umso mehr, heute diese Zeilen tippen zu dürfen.

Mein innigster Dank geht an den Präsidenten der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Prof. Dr. Joybrato Mukherjee, der die Finanzierung meiner Stelle und damit letztlich die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Nicht weniger möchte ich meinen Mentoren und meiner Mentorin am Fachbereich Veterinärmedizin danken: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer, Prof. Dr. Axel Wehrend und Prof. Dr. Sabine Wenisch. Sie alle haben sich in so vielfältiger Weise für mich eingesetzt, waren mit konstruktiven Ratschlägen, Lösungswegen bei scheinbar unüberwindbaren Problemen und mit ganz persönlicher, emotionaler Unterstützung immer für mich da – DANKE!

Außerdem möchte ich an dieser Stelle ein ganz herzliches Dankeschön an meine Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen richten. Unmittelbar an meinen Projekten beteiligt waren hierbei Uschi und Ammar. Insgesamt hat mir aber jeder von Euch eine zweite Familie an der Klinik geschenkt und ich danke Euch sehr, dass Ihr mich auch übermüdet, hungrig und verzweifelt immer ertragen habt und es teilweise immer noch tut. Vielen lieben Dank an Euch alle!

Besonders freut mich, dass in dieser doch sehr anstrengenden Zeit Freundschaften entstanden sind, die ich nicht mehr missen möchte:
Sabine, ohne die Aufmunterungen, Cappuccino und Kekse, aber auch ohne Deine fachliche Unterstützung wäre diese Arbeit noch schwieriger gewesen. Vielen Dank!
Rainer, ich danke Dir für Deine Ratschläge, so manchen Erfahrungsaustausch und dafür, dass mir Deine Tür immer offensteht.
Marian, Du warst immer für mich da und ich hoffe, dass wir uns auch weiterhin nicht aus den Augen verlieren werden.

Reto, Dir gilt besonderer Dank für die Hilfe bei der Endoskopie meiner Schafböcke. Aber weit darüber hinaus, hast Du (zusammen mit Christiane) dafür gesorgt, dass so manch suboptimaler Tag an der Uni spätestens abends vergessen war.

An der Klinik für Kleintierchirurgie und den beiden benachbarten Instituten für Veterinärphysiologie und Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität gibt es ebenso viele nette Menschen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Hier geht ein herzliches Dankeschön an Dr. Kerstin von Pückler, Prof. Dr. Joachim Roth, Jolanta Murgott, Prof. Dr. Christiane Herden und Silke Gantz.

Frau Prof. Christiane Pfarrer danke ich für die Übernahme der Mentorenschaft im ProProfessur Programm der hessischen Universitäten, an dem ich im Zeitraum 2016 / 2017 teilgenommen habe.

Hannah, an Dich vielen Dank für die Unterstützung bei der Formatierung dieser Arbeit!

Michele, tausend Dank für die Rettung in allen Technikfragen – auch wenn Du eigentlich selbst keine Zeit hattest.

DANKE an alle, die mich auf meinem Weg begleitet haben und begleiten. Es gab so viele Begegnungen mit Menschen, die mir wichtig geworden sind und die alle einen Teil zu dem beigetragen haben, was nun zum Abschluss kommen darf.

Und damit komme ich auch zum Schluss meiner Ausführungen und möchte mich hier von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Es gab so viele Höhen und Tiefen in den letzten Jahren, dass es mich immer wieder wundert, erstaunt, mit tiefer Dankbarkeit erfüllt und einfach nur freut, dass Ihr trotzdem immer da seid. Und auch wenn ich es eigentlich nie sage: Ich liebe Euch mit allem was ich bin!

ANHANG

A **Verwendete Geräte**

B **Verwendete Software**

C **Listen der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen für die Meta-Analysen**

D **Protokolle Immunhistochemie**

Anhang A – Verwendete Geräte

- Leica DMR Lichtmikroskop; Fa. Leica Microsystems Wetzlar GmbH; Wetzlar, Germany
- Leica MC170 HD; Fa. Leica Microsystems Wetzlar GmbH; Wetzlar, Germany
- Leica RM 2125RT Mikrotom; Fa. Leica Microsystems Wetzlar GmbH; Wetzlar, Germany
- Storz Bronchofiberskop 60003VB1; Fa. Storz Endoskope; Tuttlingen, Germany
- Thermo Scientific Microm HMS 740 Robot Stainer; Fa. Fisher Scientific GmbH; Schwerte, Germany
- Tissue-Tek® Film® Folieneindeckautomat; Fa. Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen, Germany
- Toshiba aplio XG; Toshiba Medical Europe; Zoetermeer, Niederlande

Anhang B – Verwendete Software

- Adobe Photoshop CS5.1; Adobe Systems Software; Dublin, Ireland
- BiAS. für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 9.08. Epsilon-Verlag; Hochheim, Darmstadt, Germany
- Citavi 5; Swiss Academic Software GmbH; Wädenswil, Schweiz
- easyImage in easyVet, softguide GmbH; Hannover, Germany
- Leica Application Suite, Version 4.3.0; Fa. Leica Microsystems Wetzlar GmbH; Wetzlar, Germany
- R (Version 3.4.1) und R-Paket meta (Version 4.9-0); open source software; http://www.r-statistik.de/

Anhang C – Listen der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen für die Meta-Analysen

C.1 Liste der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen zur Meta-Analyse hinsichtlich der Prävalenz der Urolithiasis bei Schaf- und/oder Ziegenböcken

C.2 Liste der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen zur Meta-Analyse hinsichtlich der Frage zur Häufigkeit des Auftretens von Urolithiasis bei kastrierten Schaf- und Ziegenböcken

C.3 Liste der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen zur Meta-Analyse hinsichtlich der Erfolgsrate nach Durchführung chirurgischer Behandlungsverfahren bei obstruktiver Urolithiasis

C.1 – Liste der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen zur Meta-Analyse hinsichtlich der Prävalenz der Urolithiasis bei Schaf- und/oder Ziegenböcken

1. Bellenger, C.R., Rutar, A.J., Ilkiw, J.E., Salamon, S. (1981): Urolithiasis in goats.
   Australian Veterinary Journal 57, 56.
2. Bushman, D.H., Emerick, R.J., Embry, L.B. (1964): Incidence of urinary calculi in sheep as affected by various dietary phosphates.
   Journal of Animal Science 23, 67–675.
3. Bushman, D.H., Emerick, R.J., Embry, L.B. (1965): Experimentally induced ovine phosphatic urolithiasis: relationships involving dietary calcium, phosphorus and magnesium.
   Journal of Nutrition 87, 499–504.
4. Crookshank, H.R., Robbins, J.D., Kunkel, H.O. (1967): Relationship of dietary mineral intake to serum mineral level and the incidence of urinary calculi in lambs.
   Journal of Animal Science 26, 1179–1185.
5. Cuddeford, D. (1987): Role of magnesium in the aetiology of ovine urolithiasis in fattening store lambs and intensively fattened lambs.
   Veterinary Record 121, 194–197.
6. Davis, W.D., Scott, R.J.R., Crookshank, H.R., Spjut, H.J. (1969): Factors affecting experimentally induced calculous disease in sheep.
   Journal of Urology 101, 383–389.
7. Hoar, D.W., Emerick, R.J., Embry, L.B. (1970a): Influence of calcium source, phosphorus level and acid--base-forming effects of the diet of feedlot performance and urinary calculi formation in lambs.
   Journal of Animal Science 31, 118–125.
8. Hoar, D.W., Emerick, R.J., Embry, L.B. (1970b): Potassium, phosphorus and calcium interrelationships influencing feedlot performance and phosphatic urolithiasis in lambs.
   Journal of Animal Science 30, 597–600.
9. Huntington, G.B., Emerick, R.J., Embry, L.B. (1977): Sodium bentonite or sodium bicarbonate as aids in feeding high-concentrate diets to lambs.
   Journal of Animal Science 45, 804–811.
10. Lamprecht, W.O. Jr., Darroch, J.G., Crookshank, H.R. (1969a): Statistical analysis of blood serum composition urine excretion levels and occurrence of urolithiasis in sheep.
    Journal of Animal Science 28: S. 714-716.

11. Livingston, C.W. Jr., Calhoun, M.C., Gauer, B.B., Baldwin, B.C. Jr. (1984): Effect of experimental infection with ovine ureaplasma upon the development of uroliths in feedlot lambs.
Israel Journal of Medical Sciences 20, 958–961.
12. Nottle, M.C. (1982): Renal calculi in apparently normal sheep.
Australian Veterinary Journal 58, 256–259.
13. Oryan, A., Razavi, M. (1993): Nephrolithiasis in Iranian sheep.
Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A 40, 639–640.
14. Packett, L.V., Hauschild, J.P. (1964): Phosphorus, calcium and magnesium relationships in ovine urolithiasis.
Journal of Nutrition 84, 185–190.
15. Robbins, J.D., Kunkel, H.O., Crookshank, H.R. (1965): Relationship of dietary mineral intake to urinary mineral excretion and incidence of urinary calculi in lambs.
Journal of Animal Science 24, 76-82.
16. Salman, M.D., Dargatz, D.A., Kimberling, C.V., Reif, J.S., Hopper, G.E. (1988): Rates of diseases and their associated costs in two Colorado sheep feedlots (1985-1986).
Journal of the American Veterinary Medical Association 193, 1518–1523.
17. Sato, H., Omori, S. (1977): Incidence of urinary calculi in goats fed a high phosphorus diet.
Japanese Journal of Veterinary Science 39, 531–537.
18. Stewart, S.R., Emerick, R.J., Pritchard, R.H. (1990): High dietary calcium to phosphorus ratio and alkali-forming potential as factors promoting silica urolithiasis in sheep.
Journal of Animal Science 68, 498–503.
19. Stewart, S.R., Emerick, R.J., Pritchard, R.H. (1991): Effects of dietary ammonium chloride and variations in calcium to phosphorus ratio on silica urolithiasis in sheep.
Journal of Animal Science 69, 2225–2229.
20. Sun, W.D., Wang, J.Y., Zhang, K.C., Wang, X.L. (2010a): Study on precipitation of struvite and struvite-K crystal in goats during onset of urolithiasis.
Research in Veterinary Science 88, 461–466.
21. Tiruneh, R. (2000): A retrospective study on ruminant urethral obstruction in Debre Zeit area, Ethiopia.
Révue de Medicine Vétérinaire 151, 855–860.

22. Udall, R.H. (1962): Studies on urolithiasis. V. The effects of urinary pH and dietary sodium chloride on the urinary excretion of proteins and the incidence of calculosis

American Journal of Veterinary Research 23, 1241–1245.

23. Wang, J.Y., Sun, W.D., Wang, X.L. (2009): Comparison of effect of high intake of magnesium with high intake of phosphorus and potassium on urolithiasis in goats fed with cottonseed meal diet.
Research in Veterinary Science 87, 79–84.
24. Wen, Z.S., Pan, X.L., Xu, Z.R., Zou, X.T. (2011): Effect of Dietary Cottonseed Meal on the Occurrence of Urolithiasis in Chinese Merino Sheep from Xinjiang Region (China): A Pilot Study.
Journal of Animal and Veterinary Advances 10, 1383–1388.

C.2 – Liste der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen zur Meta-Analyse der Frage zur Häufigkeit des Auftretens von Urolithiasis bei kastrierten Schaf- und Ziegenböcken

1. Belonje, P.C. (1965): I. An investigation into a problem of urinary calculi in Merino wethers. II. Observations on the post natal development of the penis in Merino ram Iambs and wethers: the possible relationship to the passage of urinary calculi. [not specified].
   Journal of the South African Veterinary Medical Association 36, 381–383.
2. Dühlmeier, R., Zibell, G., von Altrock, A., Roth, C., Schroeder, C., Thies, K.; Ganter, M. (2007): Urolithiasis in small ruminants - methods of treatment and recovery.
   Tierärztliche Praxis Ausgabe G Grosstiere Nutztiere 35, 175–182.
3. Ewoldt, J.M., Anderson, D.E., Miesner, M.D., Saville, W.J. (2006): Short- and long-term outcome and factors predicting survival after surgical tube cystostomy for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants.
   Veterinary Surgery 35, 417–422.
4. Iselin, U., Lischer, C.J., Braun, U., Steiner, A. (2001): Cystotomy with and without temporary prepubic foleycatheter implantation for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants; a retrospectiv study. [German].
   Wiener Tierärztliche Monatsschrift 88, 39–45.
5. Livingston, C.W., Calhoun, M.C., Gauer, B.B., Baldwin, B.C. (1984): Effect of experimental infection with ovine ureaplasma upon the development of uroliths in feedlot lambs.
   Israel Journal of Medical Sciences 20, 958–961.
6. Makhdoomi, D.M., Gazi, M.A. (2013): Obstructive urolithiasis in ruminants - a review.
   Veterinary World 6, 233–238.
7. Mavangira, V., Cornish, J.M., Angelos, J.A. (2010): Effect of ammonium chloride supplementation on urine pH and urinary fractional excretion of electrolytes in goats. [Erratum in J Am Vet Med Assoc. 2011 Feb 1;238(3):317].
   Journal of the American Veterinary Medical Association 237, 1299–1304.
8. Nwaokorie, E.E., Osborne, C.A., Lulich, J.P., Fletcher, T.F., Ulrich, L.K., Koehler, L.A., Buettner, M.T. (2015): Risk factors for calcium carbonate urolithiasis in goats.
   Journal of the American Veterinary Medical Association 247, 293–299.
9. Pearce, S.G., Dearo, A.C., Howard, B.E., Brisson, B.A. (2003): Management of obstructive urolithiasis and concurrent urethral rupture in a goat.

Australian Veterinary Journal 81, 268–270.

10. Schwantag, S., Wehbrink, D., Puorger, M., Bleul, U. (2007): Bladder rupture in a six-day-old lamb with urolithiasis.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G Grosstiere Nutztiere 35, 210.
11. Sharma, A.K., Mogha, I.V., Singh, G.R., Amarpal Aithal, H.P. (2007): Incidence of urethral obstruction in animals.
Indian Journal of Animal Sciences 77, 455–456.
12. Sharma, A.K., Singh, G.R., Aithal, H.P., Mohindroo, J. (2009): Clinical and surgical management of urethral obstruction in male goats.
Indian Journal of Small Ruminants 15, 121–124.
13. Stone, W.C., Bjorling, D.E., Trostle, S.S., Hanson, P.D., Markel, M.D. (1997): Prepubic urethrostomy for relief of urethral obstruction in a sheep and a goat.
Journal of the American Veterinary Medical Association 210, S. 939.
14. Tamilmahan, P., Mohsina, A., Karthik, K., Gopi, M., Gugjoo, M.B., Rashmi; Zama, M.M.S. (2014): Tube cystostomy for management of obstructive urolithiasis in ruminants.
Veterinary World 7, 234–239.
15. Tarunbir Singh; A., Kinjavdekar, P., Aithal, H.P., Pawde, A.M., Pratap, K., Mukherjee R. (2008): Obstructive urolithiasis in domestic animals: a study on pattern of occurrence and etiology.
Indian Journal of Animal Sciences 78, 599–603.

C.3 – Liste der in der Auswertung verbliebenen Literaturstellen zur Meta-Analyse der Erfolgsrate nach Durchführung chirurgischer Behandlungsverfahren bei obstruktiver Urolithiasis

1. Dühlmeier, R., Zibell, G., von Altrock, A., Roth, C., Schroeder, C., Thies, K.; Ganter, M. (2007): Urolithiasis in small ruminants - methods of treatment and recovery.
   Tierärztliche Praxis Ausgabe G Grosstiere Nutztiere 35, 175–182.
2. Ewoldt, J.M., Anderson, D.E., Miesner, M.D., Saville, W.J. (2006): Short- and long-term outcome and factors predicting survival after surgical tube cystostomy for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants.
   Veterinary Surgery 35, 417–422.
3. Fazili, M.R., Malik, H.U., Bhattacharyya, H.K., Buchoo, B.A., Moulvi, B.A., Makhdoomi, D.M. (2010): Minimally invasive surgical tube cystotomy for treating obstructive urolithiasis in small ruminants with an intact urinary bladder.
   Veterinary Record 166, 528–531.
4. Fortier, L.A., Gregg, A.J., Erb, H.N., Fubini, S.L. (2004): Caprine obstructive urolithiasis: requirement for 2nd surgical intervention and mortality after percutaneous tube cystostomy, surgical tube cystostomy, or urinary bladder marsupialization.
   Veterinary Surgery 33, 661–667.
5. Halland, S.K., House, J.K., George, L.W. (2002): Urethroscopy and laser lithotripsy for the diagnosis and treatment of obstructive urolithiasis in goats and pot-bellied pigs.
   Journal of the American Veterinary Medical Association 220, 1831–1834.
6. Haven, M.L., Bowman, K.F., Engelbert, T.A., Blikslager, A.T. (1993): Surgical management of urolithiasis in small ruminants.
   The Cornell Veterinarian 83, 47–55.
7. Iselin, U., Lischer, C.J., Braun, U., Steiner, A. (2001): Zystotomie mit und ohne Implantation eines präpubikalen Ballonkatheters zur Behandlung der obstruktiven Urolithiasis beim kleinen Wiederkäuer: eine retrospektive Studie.
   Wiener Tierärztliche Monatsschrift 88, 39-45.
8. Janke, J.J., Osterstock, J.B., Washburn, K.E., Bissett, W.T., Roussel, A.J., Hooper, R.N. (2009): Use of Walpole's solution for treatment of goats with urolithiasis: 25 cases (2001-2006).
   Journal of the American Veterinary Medical Association 234, 249–252.

9. Kümper, H. (1994): Urolithiasis bei Schaf- und Ziegenböcken. Klinisches Bild, Therapiemöglichkeiten und prognostische Beurteilung.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G Grosstiere Nutztiere 22, 234–241.
10. May, K.A., Moll, H.D., Wallace, L.M., Pleasant, R.S., Howard, R.D. (1998): Urinary bladder marsupialization for treatment of obstructive urolithiasis in male goats.
Veterinary Surgery 27, 583–588.
11. Rakestraw, P.C., Fubini, S.L., Gilbert, R.O., Ward, J.O. (1995): Tube cystostomy for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants.
Veterinary Surgery 24, 498–505.
12. Tamilmahan, P., Mohsina, A., Karthik, K., Gopi, M., Gugjoo, M.B., Rashmi; Zama, M.M.S. (2014): Tube cystostomy for management of obstructive urolithiasis in ruminants.
Veterinary World 7, 234–239.
13. Tobias, K.M., van Amstel, S.R. (2013): Modified proximal perineal urethrostomy technique for treatment of urethral stricture in goats.
Veterinary Surgery 42, 455–462.
14. Van Metre, D.C., House, J.K., Smith, B.P., Thurmond, M.C., George, L.W., Angelos, S.M., Angelos, J.A., Fecteau, G. (1996b): Obstructive urolithiasis in ruminants: Surgical management and prevention.
Compendium on Continuing Education for the practicing Veterinarian 18, S275-S289.
15. Van Weeren, P.R., Klein,W.R., Voorhout, G. (1987a): Urolithiasis in small ruminants. I. A retrospective evaluation of urethrostomy.
Veterinary Quarterly 9, 76–79.
16. Weaver, A.D. (1969): Obstructive urolithiasis in sheep.
Veterinary Record 84, 320–324.

Anhang D – Protokolle Immunhistochemie

D.1 Kaninchen anti CD 3 (polyclonal)

D.2 Maus anti CD 79α (Maus monoclonal, Clone HM57)

D.3 Maus anti MAC 387 (monoclonal)

D.4 Ratte anti SP (monoclonal)

D.5 Kaninchen anti VIP (polyclonal)

D.6 Maus anti human NF (monoclonal, Clone 2F11)

D.1 – Protokoll Immunhistochemie

Kaninchen anti **CD 3** (polyclonal)

Gewebe: Urethra / Präputium Schafbock
Prinzip: HRP-Polymer Komplex Kaninchen
Chromogen: DAB

Schritt	**Reagenz**	**Zeit**	**Bedingung**
Entparaffinieren	Xylol	3 min	Abzug
	Xylol	3 min	
	Xylol	3 min	
Entwässern	Isopropanol	3 min	
	Isopropanol	3 min	
	96 % Alkohol	3 min	
	80 % Alkohol	3 min	
	Aqua dest.	3 min	
	TBS	5 min	
Vorbehandlung	Citratpuffer pH 6	20 min	97°C (30 min vorher warmstellen)
	TBS	2 x 5 min	
Peroxidase Block	0,5 % H_2O_2 in Methanol (3 ml H_2O_2 + 177 ml Methanol)	30 min	RT
Spülen	TBS	2 x 5 min	RT
Proteinblock	1,5 % Ziegenserum in TBS	15 min	Shandon racks; RT
Inkubieren	Primärantikörper in Dako-Verdünner-Lsg. (Ak 1:50) Negativkontrolle ohne Ak	45 min	RT
Spülen	TBS	3 x 4 min	Shandon racks
Inkubieren	Inkubation mit Polymer-Enhancer	20 min	RT
Spülen	TBS	3 x 4 min	RT
Inkubieren	Inkubation mit HRP-Polymer	20 min	RT
Spülen	TBS	3 x 4 min	
Detektieren	DAB (100 mg DAB, 200 ml Imidazol, 70 µl H_2O_2 pro Küvette)	6 min	Küvette mit Rührer
Spülen	TBS	3 x 3 min	
Spülen	Aqua dest.	5 min	
	Kardasewitch	5 min	
Spülen	Gründlich spülen mit Aqua dest.; Mindestens 1 Wechsel		
Gegenfärben	Papanicolaous / Hämatoxylin	13 - 40 sec	
Bläuen	Leitungswasser	5 min	
Spülen	Aqua dest.		
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Iso	Je 3 min	
	Xylol	10 min	
Eindeckeln	Automat		

D.2 – Protokoll Immunhistochemie

Maus anti **CD 79α** (Maus monoclonal, Clone HM57)

Gewebe: Urethra / Präputium Schafbock
Prinzip: indirekte Immunhistochemie (ABC-Methode)
Chromogen: DAB

Schritt	**Reagenz**	**Zeit**	**Bedingung**
Entparaffinieren	Xylol	3 min	Abzug
	Xylol	3 min	
	Xylol	3 min	
Entwässern	Isopropanol	3 min	
	Isopropanol	3 min	
	96 % Alkohol	3 min	
	80 % Alkohol	3 min	
Peroxidase Block	0,5 % H_2O_2 in Methanol (3 ml H_2O_2 + 177 ml Methanol)	30 min	RT
Spülen	TBS	5 min	RT
Vorbehandlung	Citratpuffer pH 6	20 min	97°C (30 min vorher warmstellen)
Proteinblock	Pferdeserum in TBS	10 min	Shandon Racks; RT
Inkubieren	Primärantikörper in TBS/1% BSA (Ak 1:100)	über Nacht	4°C (Kühlschrank)
	Negativkontrolle mit „Ak-Ersatz“ (T1 1:100)		
Spülen	TBS	3 x 5 min	Shandon racks
Inkubieren	Sekundär-Ak (Horse anti Mouse biotinyliert; 1:110)	30 min	RT
Spülen	TBS	3 x 5 min	RT
Inkubieren	ABC elite Kit (mind. 45 min vorher ansetzen)	30 min	
Spülen	TBS	3 x 5 min	
Detektieren	DAB (100 mg DAB, 200 ml Imidazol, 70 µl H_2O_2 pro Küvette)	10 min	Küvette mit Rührer
Spülen	TBS	3 x 3 min	
Spülen	Aqua dest.	5 min	
	Kardasewitch	5 min	
Spülen	Gründlich spülen mit Aqua dest.; Mindestens 1 Wechsel		
Gegenfärben	Papanicolaous / Hämatoxylin	13 - 40 sec	
Bläuen	Leitungswasser	5 min	
Spülen	Aqua dest.		
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Iso	Je 3 min	
	Xylol	10 min	
Eindeckeln	Automat		

D.3 – Protokoll Immunhistochemie

Maus anti **MAC 387** (monoclonal)

Gewebe: Urethra / Präputium Schafbock
Prinzip: indirekte Immunhistochemie (PAP)
Chromogen: DAB

Schritt	**Reagenz**	**Zeit**	**Bedingung**
Entparaffinieren	Xylol	3 min	Abzug
	Xylol	3 min	
	Xylol	3 min	
Entwässern	Isopropanol	3 min	
	Isopropanol	3 min	
	96 % Alkohol	3 min	
	80 % Alkohol	3 min	
Peroxidase Block	0,5 % H_2O_2 in Methanol (3 ml H_2O_2 + 177 ml Methanol)	30 min	RT
Spülen	TBS	5 min	RT
Vorbehandlung	Protease 0,05 %	5 min	37°C (Wärmeschrank)
Spülen	TBS	3x5 min	Küvette
Proteinblock	10 % Rattenserum in TBS	10 min	Shandon Racks; RT
Inkubieren	Primärantikörper in TBS/1% BSA (Ak 1:1000) Negativkontrolle mit „Ak-Ersatz“ (T1 1:1000)	über Nacht	4 °C (Kühlschrank)
Spülen	TBS	3 x 5 min	Shandon racks
Inkubieren	Sekundär-Ak (Ratte anti Maus; 1:100)	30 min	RT
Spülen	TBS	3 x 5 min	RT
Inkubieren	Maus PAP (1:500)	30 min	
Spülen	TBS	3 x 5 min	
Detektieren	DAB (100 mg DAB, 200 ml Imidazol, 70 µl H_2O_2 pro Küvette)	10 min	Küvette mit Rührer
Spülen	TBS	3 x 3 min	
Spülen	Aqua dest.	5 min	
	Kardasewitch	5 min	
Spülen	Gründlich spülen mit Aqua dest.; Mindestens 1 Wechsel		
Gegenfärben	Papanicolaous / Hämatoxylin	13 - 40 sec	
Bläuen	Leitungswasser	5 min	
Spülen	Aqua dest.		
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Iso	je 3 min	
	Xylol	10 min	
Eindeckeln	Automat		

D.4 – Protokoll Immunhistochemie

Ratte anti **SP** (monoclonal)

Gewebe: Urethra / Präputium Schafbock
Prinzip: indirekte Immunhistochemie (ABC-Methode)
Chromogen: DAB

Schritt	**Reagenz**	**Zeit**	**Bedingung**
Entparaffinieren	Xylol	3 min	Abzug
	Xylol	3 min	
	Xylol	3 min	
Entwässern	Isopropanol	3 min	
	Isopropanol	3 min	
	96 % Alkohol	3 min	
	80 % Alkohol	3 min	
Peroxidase Block	0,5 % H_2O_2 in Methanol (3 ml H_2O_2 + 177 ml Methanol)	30 min	RT
Spülen	TBS	5 min	RT
KEIN	***ANTIGEN RETRIEVAL***		
Proteinblock	5 % Kaninchenserum in TBS	15 min	Shandon Racks; RT
Inkubieren	Primärantikörper in TBS 5% Kaninchenserum (Ak 1:100) Negativkontrolle mit „Ak-Ersatz“ (KK 1:2500)	Über Nacht	4 °C (Kühlschrank)
Spülen	TBS	3 x 5 min	Shandon racks
Inkubieren	Sekundär-Ak (Kaninchen anti Ratte biotinyliert; 1:300)	30 min	RT
Spülen	TBS	3 x 5 min	RT
Inkubieren	ABC elite Kit (mind. 45 min vorher ansetzen)	30 min	
Spülen	TBS	3 x 5 min	
Detektieren	DAB (100 mg DAB, 200 ml Imidazol, 70 µl H_2O_2 pro Küvette)	2 min	Küvette mit Rührer
Spülen	TBS	3 x 3 min	
Spülen	Aqua dest.	5 min	
	Kardasewitch	5 min	
Spülen	Gründlich spülen mit Aqua dest.; Mindestens 1 Wechsel		
Gegenfärben	Papanicolaous / Hämatoxylin	13 - 40 sec	
Bläuen	Leitungswasser	5 min	
Spülen	Aqua dest.		
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Iso	Je 3 min	
	Xylol	10 min	
Eindeckeln	Automat		

D.5 – Protokoll Immunhistochemie

Kaninchen anti **VIP** (polyclonal)

Gewebe: Urethra / Präputium Schafbock
Prinzip: HRP-Polymer Komplex Kaninchen
Chromogen: DAB

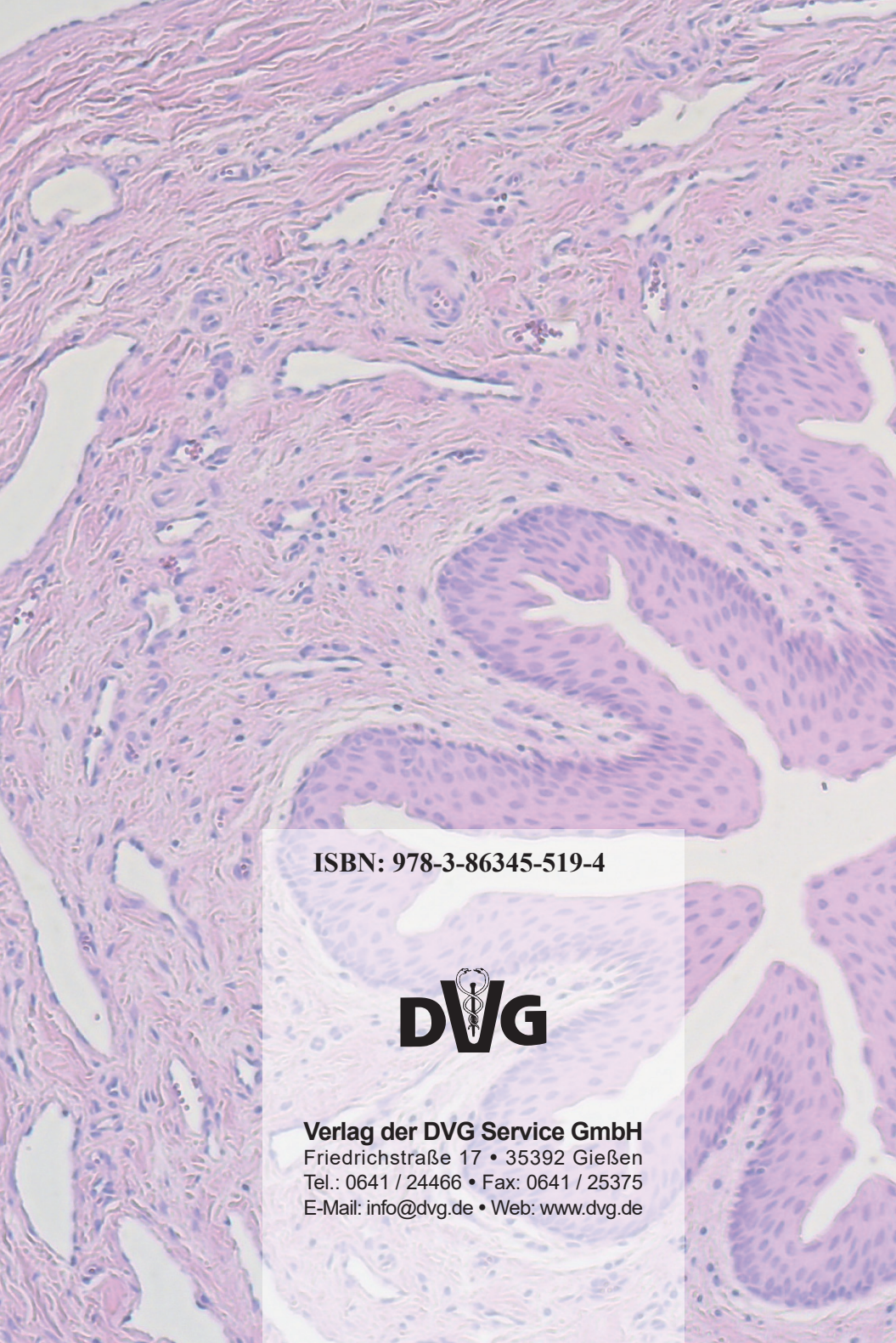
Schritt	**Reagenz**	**Zeit**	**Bedingung**
Entparaffinieren	Xylol	3 min	Abzug
	Xylol	3 min	
	Xylol	3 min	
Entwässern	Isopropanol	3 min	
	Isopropanol	3 min	
	96 % Alkohol	3 min	
	80 % Alkohol	3 min	
	Aqua dest.	3 min	
	TBS	5 min	
Vorbehandlung	Citratpuffer pH 6	20 min	97°C (30 min vorher warmstellen)
	TBS	2 x 5 min	
Peroxidase Block	0,5 % H_2O_2 in Methanol (3 ml H_2O_2 + 177 ml Methanol)	30 min	RT
Spülen	TBS	2 x 5 min	RT
Proteinblock	1,5 % Ziegenserum in TBS	15 min	Shandon Racks; RT
Inkubieren	Primärantikörper in Dako-Verdünner-Lsg. (Ak 1:50) Negativkontrolle ohne Ak	35 min	RT
Spülen	TBS	3 x 4 min	Shandon racks
Inkubieren	Inkubation mit Polymer-Enhancer	20 min	RT
Spülen	TBS	3 x 4 min	RT
Inkubieren	Inkubation mit HRP-Polymer	20 min	RT
Spülen	TBS	3 x 4 min	
Detektieren	DAB (100 mg DAB, 200 ml Imidazol, 70 µl H_2O_2 pro Küvette)	4 min	Küvette mit Rührer
Spülen	TBS	3 x 3 min	
Spülen	Aqua dest.	5 min	
	Kardasewitch	5 min	
Spülen	Gründlich spülen mit Aqua dest.; Mindestens 1 Wechsel		
Gegenfärben	Papanicolaous / Hämatoxylin	13 - 40 sec	
Bläuen	Leitungswasser	5 min	
Spülen	Aqua dest.		
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Iso	je 3 min	
	Xylol	10 min	
Eindeckeln	Automat		

D.6 – Protokoll Immunhistochemie

Maus anti human **NF** (monoclonal, Clone 2F11)

Gewebe: Urethra / Präputium Schafbock
Prinzip: indirekte Immunhistochemie (ABC-Methode)
Chromogen: DAB

Schritt	**Reagenz**	**Zeit**	**Bedingung**
Entparaffinieren	Xylol	3 min	Abzug
	Xylol	3 min	
	Xylol	3 min	
Entwässern	Isopropanol	3 min	
	Isopropanol	3 min	
	96 % Alkohol	3 min	
	80 % Alkohol	3 min	
Peroxidase Block	0,5 % H_2O_2 in Methanol (3 ml H_2O_2 + 177 ml Methanol)	30 min	RT
Spülen	TBS	5 min	RT
Proteinblock	Pferdeserum in TBS	10 min	Shandon Racks; RT
Inkubieren	Primärantikörper in TBS (Ak 1:400)	30 min	37 °C
	Negativkontrolle mit „Ak-Ersatz“ (T1 1:400)		
Spülen	TBS	3 x 5 min	Shandon racks
Inkubieren	Sekundär-Ak (Horse anti Mouse biotinyliert; 1:110)	30 min	RT
Spülen	TBS	3 x 5 min	RT
Inkubieren	ABC elite Kit (mind. 45 min vorher ansetzen)	30 min	
Spülen	TBS	3 x 5 min	
Detektieren	DAB (100 mg DAB, 200 ml Imidazol, 70 µl H_2O_2 pro Küvette)	10 min	Küvette mit Rührer
Spülen	TBS	3 x 3 min	
Spülen	Aqua dest.	5 min	
	Kardasewitch	5 min	
Spülen	Gründlich spülen mit Aqua dest.; Mindestens 1 Wechsel		
Gegenfärben	Papanicolaous / Hämatoxylin	13 sec – 40 sec	
Bläuen	Leitungswasser	5 min	
Spülen	Aqua dest.		
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Iso	je 3 min	
	Xylol	10 min	
Eindeckeln	Automat		



ISBN: 978-3-86345-519-4

Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de