

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

**Immunhistologischer Nachweis von Leukozyten,
MHC-II Antigen und Gefäßendothelien
am Corpus luteum der Hündin
im Verlauf des Zyklus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Frank Büsges

Tierarzt aus Köln

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser
Tag der mündlichen Prüfung:	10.02.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	III
2	Einleitung.....	1
3	Literatur	3
3.1	Histologie des Corpus luteums.....	3
3.2	Lutealfunktion bei der Hündin.....	6
3.3	Rolle des Immunsystems bei der Gelbkörperentwicklung.....	8
3.3.1	T-Lymphozyten	9
3.3.1.1	CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	11
3.3.1.2	CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	14
3.3.2	Major histocompatibility complex.....	16
3.3.3	Makrophagen.....	18
3.4	Endoglin.....	20
4	Material und Methoden.....	23
4.1	Probengewinnung	23
4.2	Probenaufbereitung für die Immunhistologie	24
4.2.1	Konservierung.....	24
4.2.2	Herstellung von Gefrierschnitten	24
4.2.3	Fixierung der aufgezogenen Gewebeschnitte.....	25
4.3	Immunhistologische Präparation.....	26
4.3.1	Seren und Antikörper.....	26
4.3.2	Durchführung der Immunhistologie	28
4.3.3	Kontrollen.....	31
4.4	Beschichtungen, Fixierungen, Lösungen und Puffer	32
4.5	Reagentien, Zubehör, Gerätschaften	34
4.6	Auswertung	37
4.6.1	T-Lymphozyten	39
4.6.1.1	CD4 ⁺ Zellen.....	39
4.6.1.2	CD8 ⁺ Zellen.....	41
4.6.2	Endoglin.....	42
4.6.3	MHC-II.....	44

5	Ergebnisse	45
5.1	Ergebnisse der methodischen Entwicklungsarbeiten	45
5.2	Histologisches Screening	47
5.3	Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen.....	48
5.3.1	Anti-CD4-Antikörper	50
5.3.2	Anti CD8-Antikörper	53
5.3.3	Verhältnis von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺	55
5.3.4	MHC-II	55
5.3.5	Endoglin	59
6	Diskussion	63
6.1	Diskussion der Methodik	63
6.1.1	Bestimmung des Ovulationszeitpunktes und der Diöstruslänge	63
6.1.2	Probenaufarbeitung und immunhistologisches Verfahren	63
6.1.3	Eingesetzte Antikörper	65
6.1.4	Auswertungsverfahren	67
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	69
7	Zusammenfassung	77
8	Summary	79
9	Literaturverzeichnis	81
10	Anhang	96
10.1	Als nicht spezifisch ausgetestete Antikörper	96
10.2	Tabellen.....	102

1 ABKÜRZUNGEN

A	Azeton
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
AM	Azeton Methanol Gemisch \overline{ee}
APC	Antigen presenting cell
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovines Serumalbumin
bTBS	TBS mit BSA
CD	cluster designation
DAB	Diaminobenzidin
EGF	epidermal like growth factor
-F	Flächenanteil
F/A	Formalin – Azeton Fixierung
F+A	Formalin und Azeton
F+BSA	Formalin plus 1% BSA
F+T	Formalin plus 0.1 TritonX100
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
-G	Grauwertdifferenz
GF	Gesichtsfelder
gMW	geometrischer Mittelwert
Hd.	Hund
H&E	Hämatoxilin und Eosin
hTBS	TBS mit 1% Hundeserum
Htgrd	Hintergrund
i.E.	im Einzelnen
IFN	Interferon
IGF	insulin-like growth factor
Ig-	Immunglobulin
k9	Canine
LAN	local area network
LGL	large granular lymphocyte
M	Methanol
MHC	major histocompatibility complex
mk	Monoklonal
mo	Maus
MW	Mittelwert

NK	natural killer (Zellen)
OT	Objektträger
PALS	periarterioläre Lymphozytenscheide
PFA	Paraformalin
Pfd.	Pferd
pk	Polyklonal
rat	Ratte
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SF	Streufaktor
TBS	tris-buffered saline
Tc	Suppressor T-Zellen
TCR	T cell receptor complex (CD3 und TCR)
TGF	transforming growth factor
T _H	T-Helfer-Zellen
TNF	tumor necrosis factor
vWF	von Willebrand's Faktor
Zg.	Ziege

2 EINLEITUNG

Die endokrine Kontrolle der Gelbkörperphase der Hündin läßt sich zur Zeit nicht mit einem schlüssigen Modell beschreiben. Alle Ansätze, Funktionsweisen anderer Spezies auf den Hund zu projizieren, stellten sich als ungenügend heraus: *Canis familiaris* hat einen monoöstrischen, hauptsächlich asaisionalen Sexualzyklus, dessen Gelbkörperphase unabhängig von Uterus und den luteotropen Stoffen LH und Prolaktin beendet wird.

Der Einfluß äußerer Regelfaktoren auf die Lutealfunktion scheint nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Es gilt daher das Augenmerk auf die zelluläre Kommunikation, den programmierten Zelltod und die Interaktion des Gelbkörpers mit dem Immunsystem zu lenken. Desweiteren ist zu beachten, daß die funktionelle und die strukturelle Luteolyse unter Umständen verschiedenen Bedingungen unterliegen.

Das Ovar und somit auch das Corpus luteum bestehen nicht nur aus endokrin aktiven und germinativen Zellen sowie Bindegewebe und Gefäßen, sondern es präsentiert sich dem Immunsystem und interagiert mit diesem. Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Immunzellen und Verbreitung von Histokompatibilitätsantigenen im Gelbkörper der Hündin liegen nicht vor.

Die Vaskularisation ist unabdingbar für die endokrinologische Funktion des Corpus luteums. Sie stellt gleichzeitig die Schnittstelle zum immunologischen System dar und spielt sowohl bei Aufbau, als auch bei Regression des Gelbkörpers eine entscheidende Rolle.

Diese Arbeit soll einen Teil der im Diöstrus auftretenden Leukozyten erfassen. Durch die Darstellung von Oberflächenmarkern und Gefäßendothelien soll weiterhin die Präsentation des Gelbkörpers dem Immunsystem gegenüber beschrieben werden.

Darüber hinausgehend wurde der Versuch unternommen, mittels immunhistologischer Nachweisverfahren auf die Bedeutung definierter Wachstumsfaktoren zu schließen, deren Interaktion in der Regulation der Gelbkörperfunktion bei anderen Spezies nachgewiesen worden ist. Da mit den verfügbaren Antikörpern jedoch keine spezifischen Anfärbungen erzielt werden konnten, sind die Ergebnisse dieser Erhebungen nicht in der eigentlichen Arbeit enthalten, sondern der Ergänzung halber im Anhang beigefügt.

3 LITERATUR

3.1 Histologie des Corpus luteums

Das Corpus luteum besteht aus Parenchymzellen, Fibroblasten, Endothelzellen mit Perizyten (ANDERSEN und SIMPSON, 1973; SAWYER, 1995) und Axonen von Neuronen (NAPPI et al., 1994) in zyklusabhängiger Gewichtung zueinander. Nicht endokrin aktive Zellanteile bilden über die Dauer des Zyklus hinweg die Mehrheit (LEI et al., 1991). Eine Differenzierung der Lutealzellen in große und kleine, oder in Granulosa- und Thekaluteinzellen, ist beim Hund licht- und elektronenmikroskopisch nicht möglich (ANDERSEN und SIMPSON, 1973).

Der Ovulation folgt eine schnelle Erschließung des noch mit Follikelflüssigkeit und Blut gefüllten Antrums durch Luteinzellen. Diese wiederum werden bis 4 Tage post ovulationem von losem Bindegewebe und Kapillaren erfaßt. Während dieser Prozesse sind Zellen des Immunsystems präsent. Bis zum Ende des ersten Drittels der Lutealphase ist der Rest des Antrums bindegewebig organisiert und Blut- sowie Lymphgefäße sprossen tief von der Peripherie in den Gelbkörper hinein. Große Spalten zwischen den Zellbalken zeugen von Resten der Follikelflüssigkeit. Die Lutealzellen erreichen ihre maximale Größe zwischen dem 24. und 37. Tag. Sie sind dabei mindestens von einer Seite durch Kapillaren umfaßt oder entsenden Zytoplasmaausläufer zu diesen und sind eng über ihre Mikrovilli miteinander verzahnt. Immunzellen liegen v.a. entlang der Bindegewebsbalken und in dem bindegewebigen Kern, sind aber auch zwischen den Gelbkörperzellen einge-

sprengt. Lichtmikroskopisch lassen sich Lutealzellen in verschiedenen Funktionszuständen erkennen. Einige Zellen haben keine sichtbaren Zellorganellen, sondern nur ein etwas dunkleres, fein granuliertes Endoplasma angelegt. Andere Lutealzellen sind hingegen mit reichlich Vakuolen, Parasomen und Lipidtröpfchen ausgestattet. Über die gesamte Zyklusspanne hinweg sind verschiedene Formen der Degeneration zu beobachten, während Mitosefiguren nur noch in der Mitte der Lutealphase in nicht steroidogenen Zellen vorkommen. Neben der Größenabnahme des Gelbkörpers insgesamt sind weitere Kennzeichen der fortschreitenden Regression das Auftreten großer Vakuolen und die Zunahme von Lipidtröpfchen, Bindegewebszellen und kollagenen Fasern. Schrumpfende bis lytische Lutealzellkerne, fortschreitende Volumenabnahme der Gelbkörperzellen und große Zwischenräume zwischen den Zellen (vgl. ANDERSEN und SIMPSON, 1973) begleiten die Regression des Corpus luteums.

Tabelle 1: Einteilung des Sexualzyklus der Hündin durch verschiedene Autoren
(nach CHRISTIANSEN, 1984)

Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus	CHRISTIANSEN (1984) CONCANNON (1986)
Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöst	EVANS, COLE (1931) ¹ ANDERSEN, SIMPSON (1973) ²
Proöstrus	Ö.	Diöstrus	Anöstrus	HOLST, PHEMISTER (1975)
Proöstrus	Östrus	Diöstrus	Anöstrus	FELDMAN, NELSON (1987)
Proöstrus	Ö. M.	Diöstrus	Anöstrus	STABENFELD, SHILLE (1977)
Proöstrus	Ö. M.	Pseudograv. / Grav.	Anöstrus	MCDONALD (1969)
3-16d	4-12d	60-	15-	
A	B	D	E	
	C		F	

A: blutiger Ausfluß

B-D: Verhaltensöstrus mit Ovulation bei C

E: Beendigung der Gelbkörperphase in der Gravidität (Anöstruslevel: 1ng/ml)

F: Regeneration des Endometriums abgeschlossen, Anöstruslevel bei nicht gravidem Zyklus

¹: Metöstrusdauer: 80-90d

²: Metöstrusdauer: 4,5 Monate ab Beginn Ö.

3.2 Lutealfunktion bei der Hündin

In der Literatur herrscht, im Gegensatz zu anderen Tierarten, keine einheitliche Syntax des Sexualzyklus der Hündin.

Aus Tabelle 1 auf der vorangegangenen Seite ist eindeutig zu erkennen, daß die zeitliche und namentliche Einordnung der Gelbkörperphase der Hündin erheblichen Diskussionsstoff liefert. Die endokrine Kontrolle der Lutealfunktion dieser Tierart läßt sich ebenfalls nicht mit einem schlüssigen Modell beschreiben.

Die Progesteronproduktion des Corpus luteums bei graviden und ingraviden Tieren weist eine Abhängigkeit von Prolaktin und LH in den letzten 2/3 des Lebenszeitraumes auf. Die frühe Lutealphase zeigt hingegen eine gewisse Autonomie (VICKERY et al., 1987; CONCANNON et al., 1989; OKKENS et al., 1986). Die funktionelle Regression des Gelbkörpers wird nicht durch den Mangel an Prolaktin und LH ausgelöst, da beide Hormone im späten Diöstrus und frühen Anöstrus vermehrt vorliegen (GRÄF, 1978; CHAKRABORTY, 1987; HOFFMANN und SCHNEIDER 1993). Außerdem wurde gezeigt, daß im späten Diöstrus die Rezeptoren dieser luteotropen Stoffe im Corpus luteum nicht abnehmen (FERNANDEZ et al., 1987). Der Gelbkörper ist die alleinige Progesteronquelle (LEIN et al., 1989). Für die Beendigung der Trächtigkeit ist also eine funktionelle Luteolyse unabdingbar. Bei vielen Haustierspezies übernimmt PGF₂ α uteriner Herkunft die zentrale luteolytische Rolle (NISWENDER und NETT, 1988). Bei nicht graviden Hunden konnte dieses als alleiniges Luteolysin ausgeschlossen werden (OLSON et al., 1984; OKKENS et al., 1986; HOFFMANN

et al., 1992). Es ist jedoch davon auszugehen, daß im unmittelbaren präpartalen Zeitraum die Beendigung der sekretorischen Gelbkörperphase trächtiger Hündinnen durch Prostaglandin $F2\alpha$ unterstützt wird (HOFFMANN et al., 1996; LEIN et al., 1989). In hohen Dosen verabreicht, zeigt $PGF2\alpha$ in allen Zyklusstadien eine luteolytische Wirkung (LANGE et al., 1997). Allerdings rechnen einige Autoren dem caninen Corpus luteum in der ersten Hälfte der Lutealphase eine Resistenz gegenüber $PGF2\alpha$ zu, auch bei Anwendung von pharmakologischen Dosierungen (OLSON et al., 1989). Signifikante Unterschiede der Progesteronverlaufskurve des graviden und des ingraviden Zyklus sind nicht vorhanden (ONCLIN und VERSTEGEN, 1997). Die einzige Abweichung hiervon ist ein starke Progesteronabfall einen Tag ante partum. Jene abrupte Verringerung reicht bis unter 2ng/ml Plasmaprogesteron, über dem keine Geburt möglich ist (CONCANNON et al., 1977a), während bei der ingraviden Hündin noch bis zum 110 Tag post ovulationem höhere Werte als die des Anöstrus nachgewiesen werden können (CONCANNON, 1993). Zusammenfassend ergibt sich, daß man von der Existenz eines luteolytischen Mechanismus zumindest kurz ante partum ausgehen muß; letztlich ist aber, wie bei Kaninchen, Mensch und Affe, der Terminierungsmechanismus der lutealen Progesteronsekretion immer noch unbekannt, wie bereits BAGAVANDOSS et al. (1990) und HOFFMANN et al. (1996) feststellten.

3.3 Rolle des Immunsystems bei der Gelbkörperentwicklung

Anders als die Tubuli seminiferi beim männlichen Individuum, gehört das primäre Geschlechtsorgan Ovar nicht zu den immunologisch privilegierten Organsystemen im Körper. Die Prägung des Immunsystems findet in der fetalen Phase statt. Das temporäre Organ Gelbkörper wird zeitlich weit danach zum ersten mal angelegt. Der "neue" Zelltyp Luteinzelle stellt somit eine immunologisch einmalige Zelle dar (BUKOVSKÝ und PRESL, 1991). Der Ruptur des Follikels folgt eine Organisation der ehemaligen Follikelhöhle durch eine massive Invasion von Gefäßen. Diese bieten den aus Granulosa- und / oder Thekazellen entstehenden Lutealzellen die Möglichkeit mit örtlichen oder einwandernden Immunzellen in Kontakt zu treten. Makrophagen, T-Lymphozyten und polymorphkernige Granulozyten werden im Verlaufe des ovariellen Zyklus im Ovarinterstitium und Corpora lutea bei der Ratte und dem Rind beobachtet (ADASHI, 1990; FAIRCHILD-BENYO und PATE 1992).

Eine Veränderung der Immunzellenpopulation oder der Anzahl der Leukozyten innerhalb des Corpus luteums ist also möglich und wahrscheinlich, wobei diese von der lutealen Funktion abhängig sein kann oder Wesentliches zur Gelbkörperfunktion beiträgt. Darüber hinaus läßt sich der rasche Auf- und Abbau des temporären Organs Corpus luteum nur unter aktiver Beteiligung von Komponenten der zellulären Immunabwehr gewährleisten. So nimmt deren Zahl bei vielen Tierarten (Ratte, Maus, Meerschwein, Schaf,

Schwein, Rind, Kaninchen) und Mensch zur Luteolyse hin zu (vgl. hierzu HEHNKE et al., 1994). Im früh graviden Gelbkörper treten wesentlich weniger Immunzellen auf, als im gleich alten zyklischen oder pseudograviden CL, wie beim Kaninchen gezeigt werden konnte (PATE und TOWNSON, 1994; BAGAVANDOSS et al., 1988). Untersuchungen bei FUKUOKA et al. (1992) und FAIRCHILD-BENYO und PATE (1992) haben gezeigt, daß Immunzellen oder deren Produkte die steroidogenen Funktionen von Lutealzellen im negativen Sinne beeinflussen können, während KIRSCH et al. (1981), NAITO und TAKAHASHI (1988) und EMI et al. (1991) die positiven Einflüsse von Immunzellen auf Lutealzellen aufzeigten. Die Funktion des Immunsystems ist eng mit der Stärke der Bereitstellung von Histokompatibilitätsantigenen auf der Oberfläche von Zellen verbunden (MATIS et al., 1982). Immunerkennung werden mit abweichender Expression von MHC in Verbindung gebracht (ROITT et al., 1996). Autoimmune Mechanismen scheinen bei der lutealen Regression eine Rolle zu spielen (BAGAVANDOSS et al., 1990).

3.3.1 T-Lymphozyten

T- unterscheiden sich von B- Lymphozyten durch die Bindung von Schaferythrozyten. Diese Eigenschaft ist an das CD2 Antigen gebunden. Die letztliche Linieneinordnung geschieht durch den spezifischen T-Zellrezeptor (TCR), der sich mit dem CD3 Komplex zum T-Zellrezeptor-Komplex formiert. Bei den Säugetieren sind CD4 und CD8 unterschiedliche Oberflächenglykoproteine von T-

Lymphozyten, die infolge dessen eine verschiedene MHC-Abhängigkeit haben. Unter 10% der zirkulierenden menschlichen T-Lymphozyten sind TCR-1⁺ Lymphozyten, von denen keine CD4- und nur wenige CD8-Antigen exprimieren. Die restlichen 90% sind TCR-2⁺ Lymphozyten und präsentieren zu 65% CD4 und zu 35% CD8 Antigen (PARNES, 1989; ROITT et al., 1996). Beide Antigene des Hundes scheinen in Form und Funktion, denen des Menschen ähnlich zu sein (MOORE et al., 1992).

Eine immunsuppressive Funktion ist sowohl bei CD4⁺- als auch bei CD8⁺-T-Lymphozyten zu erkennen. Diese entsteht u.a. durch direkte Zytotoxizität, auch von ca. 10% der CD4⁺ Zellen, gegenüber "antigen-presenting-cells" (APC) oder durch die Bildung von Cytokinen (ROITT et al., 1996).

Ein Anstieg der T-Zellenzahl rund um degenerierende Granulosaluteinzellen im regressiven Gelbkörper des Menschen konnte beobachtet werden. Bei jüngeren Gelbkörperstadien, nicht aber beim Corpus luteum graviditatis, erkannte man auch T-Lymphozyten in degenerativen Thekaluteinzellbalken (BUKOVSKÝ et al., 1995). Andere Autoren bemerkten diese Zunahme der T-Lymphozytenzahl auch im Verlaufe des Zyklus der Frau. Sie unterschieden aber nicht zwischen den Lutealzellpopulationen, sondern sahen eine diffuse Verteilung und fanden wesentlich mehr Makrophagen als T-Lymphozyten im Corpus luteum vertreten (HAMEED et al., 1995, SUZUKI et al., 1998). WANG et al. (1992) und PETROVSKÁ et al. (1992) wiesen den Anstieg von T-Lymphozyten im Verlaufe der Lutealphase hauptsächlich in den

Thekazelltrabekeln nach und konnten bei jungen Gelbkörpern gar keine T-Lymphozyten erkennen. Bei der Ratte wurden nur geringste, über den Zyklus hinweg konstante Mengen an T-Lymphozyten gefunden, die gleichmäßig verteilt lagen und zudem die gleiche Dichte aufwiesen wie in dem umgebenden Ovarstroma. Bei dieser Tierart zeigten sich neutrophile Granulozyten, neben Makrophagen, als die vorherrschende Leukozytenpopulation im Gelbkörper. Ihre Zahl lag in der mittleren Lutealphase am höchsten (BRÄNNSTRÖM et al., 1994). B-Lymphozyten wurden beim Menschen im Gelbkörper nicht nachgewiesen (HAMEED et al., 1995; WANG et al., 1992).

3.3.1.1 CD4⁺ T-Lymphozyten

CD4 ist ein 55-65kD Glykoprotein, das beim Menschen auf Thymozyten, peripheren T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird. Die Expression des caninen 58kD CD4 auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist umstritten (MOORE et al., 1992; RABANAL et al., 1995; COBBOLD und METCALFE, 1994).

Die Funktion von CD4 ist die Stabilisierung der Interaktion des T-Zellrezeptor-CD3-Komplexes mit dem Peptide präsentierenden MHC-II Antigen, so daß CD4 als MHC-II Rezeptor oder als MHC-II abhängiger T-Zell-Corezeptor bezeichnet werden kann; CD4 exprimierende Lymphozyten werden somit auch als "MHC-II abhängige T-Lymphozyten" beschrieben (MOORE et al., 1992;

COBBOLD und METCALFE, 1994). Deren Funktion besteht in der "Hilfe" oder "Induktion" der Immunantwort durch die Sekretion von Cytokinen. Die Stärke der Cytokinausschüttung ist abhängig von der Quantität der eingegangenen Verbindungen zwischen dem TCR und dem MHC-II Antigen (FULLER-ESPIE et al., 1997). Der Funktion entsprechend werden sie auch als T-Helfer-Zellen (TH) benannt und können anhand verschiedener Kriterien ihres Aktivierungszustandes in weitere Gruppen aufgeteilt werden:

- a) CD4⁺ T-Lymphozyten, die positiven Einfluß ("Helfer") auf die Immunantwort von T- und B-Zellen haben. Alle exprimieren CD29 und eine vom Molekulargewicht leichtere Form des "leukocyte function antigen" (LFA, CD45), das als CD45RO bezeichnet wird. CD45RO⁺ Zellen werden auch als "memory" Zellen angesprochen.
- b) CD4⁺ T-Lymphozyten, die die Suppressor- / zytotoxische Funktion der CD8⁺ Zellen unterstützen. Diese exprimieren CD45RA, eine andere Isoform des LFA.

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung des Funktionszustandes der T-Helferzellen ist die Feststellung der ausschließlich sekretierten Cytokine. Bei TH1 Zellen können IFN γ und IL-2, bei TH2 Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 beobachtet werden. Beide Populationen produzieren aber auch u.a. TNF α und IL3, was sie wiederum von anderen TH-Zellen unterscheidet. Ihrem Sekretionsmuster entsprechend, haben beide Untergruppen auch unterschiedliche Funktionen. Während TH1 Zellen mehr mit Zytotoxizität und Entzündungsgeschehen assoziiert sind, stimulieren TH2

Zellen die Antikörperproduktion von B-Zellen. Der Weg der Differenzierung hängt von der Art, Stärke und Dauer der stimulativen Reize ab, wobei beide Populationen sich auch gegenseitig über ihre Cytokine beeinflussen können (ROITT et al., 1996).

Im Corpus luteum des Kaninchens wurden MHC-II abhängige T-Lymphozyten gefunden, deren Anzahl allerdings im Verlaufe der Gravidität, Pseudogravidität oder post partum nicht signifikant anstieg (BAGAVANDOSS et al., 1990). Beim Menschen konnte nur ein sehr geringes Vorkommen an CD4⁺ Zellen im Gelbkörper erkannt werden, die sich v.a. entlang der bindegewebigen Trabekel mit Thekaluteinzellen orientieren und somit der normalen Vaskularisation zugerechnet wurden (PETROVSKA et al., 1992; HAMEED et al., 1995). Das vermehrte Auftreten von CD4⁺ Zellen entlang von Granulosaluteinzellen in alten humanen Corpora lutea wurde ebenfalls vorsichtig beurteilt:

Degenerationsformen waren schon vor dem Erscheinen dieser T-Helfer-Zellen im Corpus luteum aufgetreten und konnten somit nicht in den ursächlichen Zusammenhang mit dem Erscheinen von CD4⁺ Zellen gesetzt werden. Eine Interaktion zwischen den beiden Zellpopulationen findet offensichtlich doch statt, da beim Menschen Granulosaluteinzellen in Anwesenheit von T-Zellen während der lutealen Regression einige Makrophagenmarker, u.a. auch CD4 exprimieren (BUKOVSKÝ et al., 1995).

3.3.1.2 CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Struktur von CD8 Antigenen variiert zwischen den Spezies und den Reifungsgraden der positiven Lymphozyten stark. Es tritt als Homo-, Hetero- oder Multimer von den beiden Glykoproteinen CD8 α und CD8 β auf. CD8 stabilisiert die Verbindung des TCR von MHC-I abhängigen T-Lymphozyten mit Zellen, die MHC-I exprimieren, so daß von einem MHC-I (Co-) Rezeptor gesprochen werden kann (MOORE et al., 1992). Das canine 35kD CD8 Antigen scheint als $\alpha\beta$ Heterodimer nur auf zytotoxischen - / Suppressor T-Zellen (Tc) vorzukommen (RABANAL et al., 1995), während α -Homodimere noch von "large granular lymphocyte" (LGL) und "natural killer" -Zellen (NK-Zellen) gezeigt werden (COBBOLD und METCALFE, 1994). Ihre Hauptaufgabe ist in der Elimination von virusinfizierten Zellen zu sehen. Diese Tatsache wird durch die Abhängigkeit vom MHC-I Antigen, welches auf allen kernhaltigen Zellen zu finden ist, unterstrichen. Auch Tc-Zellen können, ähnlich den CD4⁺ Lymphozyten, aufgrund der von ihnen produzierten Cytokine in Subpopulationen mit unterschiedlichen Aufgaben unterteilt werden.

Zytotoxische T-Lymphozyten sind nur in vernachlässigbaren Mengen in den Gelbkörpern von Mensch und Schwein gefunden worden. Makrophagen und MHC-II positiven Zellen treten hier in den Vordergrund (PETROVSKA et al., 1992; HEHNKE et al., 1994). Andere Autoren fanden bei Mensch, Ratte und Rind eine Zunahme von CD8⁺ Lymphozyten im Gelbkörper während des Zyklus. Durch den Nachweis ihrer Zytotoxizität, zusammen mit den eben-

falls zunehmenden Makrophagen, wurde ihnen ein entscheidender Einfluß bei der lutealen Regression zugesprochen (BRÄNNSTRÖM et al., 1994; HAMEED et al., 1995, PENNY et al., 1999).

3.3.2 Major histocompatibility complex

Die Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst durch das Immunsystem wird durch spezielle Alloantigene gesteuert, deren Genloci als "major histocompatibility complex" (MHC) bei der Maus und als "human leukocyte antigen" (HLA) beim Menschen bekannt sind. Die entsprechenden polymorphen Zelloberflächenstrukturen werden als MHC Antigene bezeichnet, von denen es drei Klassen gibt, deren Untergruppen nach ihren Ablageorten in den Genen bezeichnet werden. Klasse eins und zwei stellen, trotz vielfach angelegter Gene, eindeutige Strukturen dar, während Klasse drei über 20 Gene mit verschiedenen Expressionsformen enthält, die funktionell und strukturell keine Ähnlichkeiten mit denen der anderen Klassen haben. MHC-I- und -II-Moleküle präsentieren Teile von endogenen oder exogenen Proteinen auf der Oberfläche von Zellen zur Interaktion u.a. mit dem Immunsystem. T-Lymphozyten erkennen mit ihrem CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex Antigene auf der Oberfläche von Zellen nur in Verbindung mit MHC Molekülen. Die MHC-II Antigene der Maus (H-2 Komplex) werden von den Genloci H-2A, E und S kodiert, während beim Menschen (HLA-Komplex) die entsprechenden Gene als HLA-DP, -DQ und -DR bezeichnet werden. MHC-II Moleküle werden in der Regel von APC's, B-Lymphozyten und, bei einigen Spezies, von aktivierten T-Lymphozyten und Endothelien exprimiert. Alle caninen Lymphozyten - auch unstimulierte - und APC's zeigen MHC-II (COBBOLD und METCALFE, 1994; RABANAL et al., 1995). Hingegen exprimieren bei Mensch und Maus T-

Lymphozyten offensichtlich nur nach Stimulation dieses Peptid (DOVEREN et al., 1985).

Normalerweise zeigen "Nicht-Immunzellen" keine MHC-II Antigene. $\text{IFN}\gamma$, aus allen aktivierten T-Zellen und Makrophagen (ALM, 1987), oder $\text{TNF}\alpha$, aus aktivierten Makrophagen und Bindegewebszellen des Corpus luteums (TERRANOVA et al., 1995), können aber z.B. Endo- und Epithelien zur Expression von MHC-II-Antigen veranlassen und so unter Umständen zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und verlängerten Entzündungsgechehen beitragen (vgl. ROITT et al., 1996). Grundsätzlich verstärkt $\text{IFN}\gamma$ die Bereitstellung von MHC-II auf vielen Zelltypen (FULLER et al., 1992). So wird in der abweichenden Expression von MHC-II-Antigen des Genlocus HLA-DR beim Menschen und in der daraus resultierenden Möglichkeit, Autoantigene auf Epithelien zu präsentieren, eine ätiologische Signifikanz in der Entwicklung von Schilddrüsen Autoimmunerkrankungen gesehen (BOTTAZZO et al., 1983). Ferner exprimieren Granulosazellen bei Patienten mit vorzeitiger Ovarinsuffizienz vermehrt MHC-II Antigene (HILL et al., 1990).

Bei Rinderlutealzellen konnte die Förderung der MHC-II Ausprägung durch $\text{IFN}\gamma$, gemindert durch LH, gezeigt werden (FAIRCHILD und PATE, 1989); zudem besteht ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der verringerten lutealen MHC-II Darstellung und der geringeren Anzahl von Immunzellen zum Zeitpunkt der Umwandlung des Corpus luteum cyclicum zum - graviditatis (PATE 1996), während gegen Ende der Lutealphase MHC-II

positive Zellen zunehmen (BUKOVSKÝ et al., 1995; HEHNKE et al., 1994, PENNY et al., 1999). Beim Menschen (BUKOVSKÝ et al., 1995) und der Ziege (KENNY, 1991) ist ebenfalls die verstärkte luteale Expression von MHC-II Antigenen am Ende der Gelbkörperphase nachgewiesen worden. Darüber hinaus ist ein triphasisches MHC-II Expressionprofil aufgezeigt worden: Einer starken MHC-II Expression der sich formierenden und der regressiven Gelbkörperzellen steht ein Rückgang in der mittleren Lutealphase gegenüber (FUJIWARA et al., 1993, PENNY et al., 1999), womit diesem Molekül auch eine Funktion bei der Formation der endokrin aktiven Zellanteile im Gelbkörper zukommt.

3.3.3 Makrophagen

Makrophagen stellen zusammen mit Lymphozyten die zentrale Instanz der zellulären Immunantwort dar. Sie kommunizieren untereinander und mit Effektorzellen über Cytokine. Um ihrer zentralen Rolle bei der Immunität und Entzündung gerecht zu werden, können sie u.a. auch als APC's agieren, exprimieren MHC-II Antigen, entlassen reaktive Sauerstoffverbindungen, bilden $\text{PGF2}\alpha$ und beteiligen sich sowohl an Gewebereorganisation als auch am Gewebeabbau (vgl. hierzu ROITT et al., 1996). Es liegt also nahe, daß diese Zellen auch eine große Bedeutung sowohl bei Auf- als auch Abbau des Corpus luteums haben. Bei vielen Spezies ist die luteale Regression mit dem Auftreten von Makrophagen im Corpus luteum verknüpft (NAFTALIN et al., 1997). Ihre Rolle am Ende der Lutealphase sehen einige Autoren

ausschließlich im Abräumen zellulären Debris und verneinen eine Beteiligung an regulativen Prozessen (HEHNKE et al., 1994; TAKAYA et al., 1997).

Allerdings wurden in jungen Gelbkörpern Makrophagen sowohl entlang sich entwickelnder, als auch im umgebenden Stroma von degenerierenden Gefäßen beobachtet, so daß diesen Leukozyten auch eine Rolle bei der Formation und Unterhaltung des Gelbkörpers zugewiesen werden muß (BUKOVSKÝ et al., 1995). Dies kann im Zusammenhang mit der Sekretion von $TNF\alpha$ stehen. Dieses Cytokin beteiligt sich hier indirekt an der Angiogenese durch das Anlocken von Leukozyten (LEIBOVICH et al., 1987). Die positiven Einflüsse auf junge Corpora lutea werden auch durch die Förderung der Progesteronproduktion von murinen Lutealzellen durch Makrophagen unterstrichen (NAITO und TAKAHASHI, 1988). Immerhin haben Makrophagen einen Anteil von 10% an der lutealen Gesamtzellzahl (WANG et al., 1992).

Bei Ratte (HEHNKE et al., 1994), Mensch (BUKOVSKÝ et al., 1995), Kaninchen (BAGAVANDOSS et al., 1988) und Ziege (KENNY, 1991) ist die Zunahme von Makrophagen zur Luteolyse hin erwiesen, wobei deren Rolle, vor allem unter dem Aspekt der $TNF\alpha$ Sekretion, zur Zeit nicht ausschließlich auf die funktionelle oder zelluläre Luteolyse beschränkt werden kann: $TNF\alpha$ wirkt zusammen mit $IFN\gamma$ zytotoxisch auf vaskuläre Endothelzellen (FAIRCHILD-BENYO und PATE, 1992) oder zumindest hemmend auf deren Wachstum (BAGAVANDOSS und WILKS, 1991).

3.4 Endoglin

Eine gute Blutversorgung ist für den raschen Aufbau des Gelbkörpers unabdingbar und stellt somit einen entscheidenden, limitierenden Faktor der Steroidogenese dar. Dies kommt durch den 50%igen Anteil der Gefäßendothelien an der Gesamtzellzahl im CL zum Ausdruck (REYNOLDS et al., 1992). Dadurch ist jede endokrin aktive Zelle zumindest über Zytoplasmaausläufe an ein oder mehrere Kapillargefäße angeschlossen (ANDERSEN und SIMPSON, 1973). Es liegt also nahe, daß der ovarielle Blutfluß mit der lutealen Progesteronproduktion korreliert und eine reduzierte Blutzufuhr eine Rolle bei der Luteolyse spielt.

Endoglin ist ein in der Zellmembran integriertes 180kD Glykoprotein, das beim Menschen von Gefäßendothelien und aktivierten Makrophagen gezeigt wird und mit hoher Affinität die TGF β 1- und TGF β 3 - Isoformen bindet und somit dem TGF β -Rezeptor System zugerechnet werden kann (O'CONNELL et al., 1992; ZHANG et al., 1996). Betaglykan, das mit dem Endoglin stark verwandt ist, bindet alle TGF β Isoformen und koexistiert mit den ubiquitären TGF β Rezeptoren 1 und 2 (CHEIFETZ et al., 1992), findet sich aber nicht auf vaskulären Endothelien (MASSAGUÉ, 1990). Endoglin besitzt Sequenzstrukturen, die von den Adhäsionsmolekülen der Integrinfamilie erkannt werden und eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation vieler Zelltypen, auch von Leukozyten, spielen (LOPEZ-CASTILLAS et al., 1991).

Endoglin wird somit eine Rolle in der Bereitstellung und Bevorratung von TGF β 1 und 3, bei deren Interaktion mit den eigentlichen TGF β -Rezeptoren und in der Zelladhäsion von z.B. Leukozyten an Gefäßendothelien, zugesprochen.

Die gemeinsame Bedeutung und die Interaktion von Makrophagen und T-Lymphozyten beim Auf- und Abbau der Gefäßversorgung des Corpus luteums im Hinblick auf die von ihnen sezernierten Wachstumsfaktoren ist vor einigen Jahren erkannt worden (BUKOVSKÝ et al., 1995). So wurde die Zunahme von Makrophagen und, später im Zyklus, auch von T-Lymphozyten um degenerierende Gefäße dargestellt. Beide Zellpopulationen wurden aber auch im Zusammenhang mit Neovaskularisation beobachtet. Diese entgegengesetzten Wirkungsrichtungen, abgestimmt auf Konditionen der Umgebung, sind ein typisches Funktionsmerkmal von Wachstumsfaktoren: Zur TGF β Familie, deren Sekretion durch Makrophagen erwiesen ist (ASSOIAN, 1984), gehören multifunktionale Wachstumsfaktoren, die abhängig vom Zelltyp, Entwicklungsstand, Differenzierungsgrad und Anwesenheit anderer Faktoren wirken. So wird die Proliferation von vaskulären Endothelzellen im Gelbkörper durch TGF β gehemmt (BAGAVANDOSS und WILKS, 1991). Diesem steht die luteotrope Funktion von TGF β positiven Makrophagen gegenüber, die im regressiven Gelbkörper nicht mehr zu finden sind (MATSUYMA et al., 1990; MATSUYMA und TAKAHASHI, 1995). An anderer Stelle wird auch auf die Diskrepanz zwischen der die Angiogenese fördernde Wirkung in vivo und der starken antiproliferativen Wirkung auf Endothelzellen

in vitro hingewiesen, wobei allerdings auch in vitro vaskuläre Strukturbildung beobachtet wurde (MASSAGUÉ, 1990; ROBERTS et al., 1986). Die antiproliferative Wirkung von TGF β findet sich in immunsuppressiven Eigenschaften wieder, steht aber auch hier im Widerspruch zur mitogenen Wirkung dieses Wachstumsfaktors. Ferner konnte TGF β als Zentralsignal eines parakrinen oder autokrinen Regelmechanismus der Gonadotropinwirkung auf Granulosaluteinzellen erkannt werden (ADASHI et al., 1989); entsprechende Beobachtungen liegen für Lutealzellen vor (NAPPI et al., 1994). Das Wirkungsspektrum der TGF β Wachstumsfaktoren innerhalb des Corpus luteums erstreckt sich somit von der Beeinflussung des Zellwachstums bis zur Steroidogenese, wobei residente und eingewanderte Zellen als TGF β -Quelle in Frage kommen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Probengewinnung

Für die Hauptversuche wurden jeweils 3 Beaglehündinnen am Tag 15, 30, 45, 60 und 75 nach der Ovulation durch Zugang über die Linea alba ovariohysterektomiert. Jedes Ovar wurde einzeln von der Blutzufuhr getrennt, abgesetzt und in eine 4°C kalte 0,8%ige Natriumchloridlösung verbracht, um die warme Ischämiezeit so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurden die Proben kältekonserviert (Kapitel 4.2.1).

Von Patienten des Klinikbetriebes wurden die Ovarien der Vorversuch- und Kontrollproben gewonnen. Das Institut für Veterinärpathologie stellte die Milz eines Hundes als Positivkontrolle für Leukozyten zu Verfügung.

Als Ovulationstag (Tag 1) wurde der Sprung des Plasmaprogesteronwertes über 5ng/ml gewertet (CONCANNON et al., 1977b).

Zur Bestimmung des Eisprunges, wurde ab dem Tag des ersten Auftretens eines leicht blutigen Ausflusses aus der Vulva täglich eine Blutprobe durch Punktion der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena in ein heparinisiertes Blutröhrchen gewonnen. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei ca. 3000rpm wurde das Plasma abgehebert und in einem Polypropylenröhrchen bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung von Progesteron im Plasma erfolgte im Prinzip mittels Radioimmunoassay nach dem von HOFFMANN et al. (1973) beschriebenen Verfahren. Zur Verifizierung und Absicherung wurde parallel zur Blutprobengewinnung auch täglich ein

Vaginalabstrich nach der bei GERRES (1991) beschriebenen Methode entnommen und zugleich das Verhalten der Hündin bei Kontakt mit einem Rüden festgestellt.

4.2 Probenaufbereitung für die Immunhistologie

4.2.1 Konservierung

Die Ovarien wurden aus ihrer Bursa befreit und die Anzahl der Gelbkörper je gewonnenem Ovar adspektorisch erfaßt. Nach Halbierung eines jeden Eierstockes wurden die erkannten Gelbkörper mit dem sie umgebenden Ovarstroma isoliert. Die andere Hälfte der Eierstöcke stand anderen Versuchen zur Verfügung. Die gewonnenen Corpora lutea wurden in Aluminiumfolienhütchen gestellt und mit 4°C kaltem Tissue-Tec® O.C.T. blasenfrei überdeckt. Direkt anschließend wurden die Hütchen in einem Bad aus 2-Methylbutan, welches von flüssigen Stickstoff umspült wurde, schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Proben bei -70°C.

Kontrollproben aus dem Klinikbetrieb und dem Institut für Veterinärpathologie wurden in gleicher Weise behandelt und gelagert.

4.2.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Von jedem Block wurden in einem Kryotom 9µm dicke Gewebeschnitte auf eindeutig beschrifteten Superfrost Plus®, APES- oder

Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger (OT) aufgezogen. Auf den OT fanden bis zu 20 Gewebeschnitte Platz.

4.2.3 Fixierung der aufgezogenen Gewebeschnitte

Die folgenden Methoden wurden in Abhängigkeit von den vorgesehenen Antikörpern auf ihre Tauglichkeit untersucht, wobei Schnitte sowohl sofort als auch erst nach mindestens 30minütigem Trocknen fixiert wurden:

- Fixierung für 5 Minuten in Azeton, Methanol oder einem Gemisch aus beiden; das Fixierungsmedium war dabei entweder auf 4°C, -20°C oder Raumtemperatur eingestellt worden. Anschließend wurden die Proben mit oder ohne Abtrocknung des Fixierungsmediums in TRIS abgepufferte NaCl-Lösung (TBS) überführt und immunhistologisch behandelt (siehe Kapitel 4.3.2).
- Fixierung in einer 4%igen gepufferten Formalinlösung (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd, PFA), wobei die Fixierungsdauer 15 Minuten betrug und die Temperatur der Lösung entweder bei Raumtemperatur oder bei 4°C lag.
- Fixierung in einer 4%igen gepufferten Formalinlösung nach Lillie (ROMEIS-B, 1989) bei Raumtemperatur und 4°C.
- Fixierung in Bouin'scher Lösung (ROMEIS-B, 1989), in Yellow-Fix (ITO und KARNOWSKY, 1968) bzw. eine kombinierte Formalin-Azeton-Fixierung (siehe Kap. 4.4 Seite 32).
- Fixierung in 4%igem Formalin mit 1% BSA oder 0,1% TritonX100 bei 4°C oder Raumtemperatur für 10 Minuten.

- Als weitere Fixierungsart wurde die Inkubation für jeweils 10 Minuten in 4%igen Formalin und Azeton bei 4°C und Raumtemperatur getestet.

Sollten Gefrierschnitte nach der Fixierung wieder eingefroren werden, so geschah dies bei koagulierenden Fixativa direkt nach dem erneuten Trocknen, oder bei vernetzenden Fixierungsmedien nach 15 minütigem Inkubieren in einer Kryoprotektionslösung aus 20-30% Sucrose.

4.3 Immunhistologische Präparation

4.3.1 Seren und Antikörper

a. Seren

Als Serum zur Blockade der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers stand kommerziell erworbenes, inaktiviertes Serum von Ziege und Pferd zur Verfügung (Vector S-1000 bzw. S-2000). Desweiteren fand Verwendung selbst gewonnenes und bei 56°C für 20 Minuten inaktiviertes Serum eines gesunden Pferdes aus dem Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere.

Hundeserum für Antikörperverdünnungen wurde von den Versuchshunden gewonnen und wie oben behandelt.

b. Kontrollserum

Als Kontrollserum für Antikörper von der Maus stand ein monoklonaler Maus anti Clostridium perfringens Toxin Antikörper (Isotyp IgG1, Klon 1F9) zur Verfügung.

c. Primäre Antikörper

In Tabelle 1 sind die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zur Anwendung gekommenen primären Antikörper aufgelistet. Hinweise zu anderen versuchsweise eingesetzten primären Antikörpern finden sich im Anhang ab Seite 96.

Bei nicht spezifisch gegen Epitope des Hundes gerichteten Antikörpern wurde dem Verdünnungspuffer TBS 1 Volumenprozent inaktiviertes Hundeserum zugegeben (hTBS).

Tabelle 1: Spezifität, Verdünnungsstufe und -puffer, Tierart und Isotyp sowie Bezugsquellen der verschiedenen primären Antikörper

Antikörper	Verdünnungsstufe; Puffer	Isotyp; (Klon)	Bezugsquelle; (Kürzel)
anti hum Endoglin	400 hTBS	mk mo IgM (8E11)	Chemicon MAB 1038 (T)
anti canin CD4	100 TBS	mk rat IgG2a (YKIX 302.9.3.7)	Vet-Pathologie ¹ & Sero- tec MCA1038 (4)
anti canin CD8	1000 TBS	mk mo IgG1 (DOG10-1-1)	Vet-Pathologie ¹ (8)
anti human vWF	50 hTBS	pk zg	am. Diagnostica #218 u. Vet-Pathologie (vWF) ¹
anti canin MHC-II	500 TBS	mk rat IgG2a (DOG26-1)	Vet-Pathologie (M) ¹

¹ Dieser und anti CD5, CD8, MHC-II und von Willebrand-Faktor wurden freundlicherweise vom Institut für Veterinärpathologie überlassen, dessen Mitarbeitern, insb. Prof. Baumgärtner und Frau Artlet ich besonderen Dank für die mannigfaltig gewährte Unterstützung zolle.

d. Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurden ausschließlich Produkte der Firma Vector Laboratories Inc. verwendet:

- biotiniliertes Pferd anti Mäuse Immunoglobulin G (BA-2000)
- biotiniliertes Ziege anti Ratten Immunoglobulin G (BA-9400)
- biotiniliertes Ziege anti Mäuse Immunoglobulin M (μ -Ketten spezifisch, BA-2020)

Die Verdünnung der Sekundärantikörper lag bei 1:200 in TBS mit 1% Hundeserum (hTBS).

e. Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)

Auch hier wurde ein kommerziell erhältliches Fertigprodukt der Firma Vector Laboratories Inc. (PK-4000) mit einer Verdünnung von 1:111 (9 μ l Komplex je Milliliter Puffer) eingesetzt.

4.3.2 Durchführung der Immunhistologie

Für die Vorversuche wurden nach Bedarf Schnittserien angefertigt. Im Hauptversuch wurden für die immunhistologische Darstellung der Antigene von jedem Block fünf 9 μ m starke Gefrierschnitte (einer davon als Negativkontrolle) hergestellt. Zwischen den einzelnen Schnitten wurde eine Gewebeschicht von mind. 90 μ m verworfen, so daß eigenständige, nicht in direkter Folge liegende Gewebeschnitte zustande kamen.

Desweiteren wurden von jedem Block zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Schnittserie H&E-Schnitte erstellt.

Der Nachweis verschiedener Antigene erfolgte mittels der ABC-Technik (HSU et al., 1981).

Die folgenden Arbeitsschritte kamen im Hauptversuch nacheinander zur Anwendung (BAUMGÄRTNER 1993):

a. Zeitpunkt der immunhistologischen Behandlung:

Sofort nach Fixierung oder, bei eingefrorenen Gewebeschnitten, nach 2 mal 5 minütigem Auftauen in TBS.

b. Blockade unspezifischer Antikörperreaktionen:

Inkubation mit 10%igem inaktiviertem Serum von Pferd oder Ziege zur Blockade unspezifischer Bindungen.

c. Inkubation mit Primärantikörpern:

Absaugen des inaktivierten Serums und Auftragen der Primärantikörperverdünnung. Je OT fungierte ein Schnitt als Negativkontrolle und wurde nur mit Puffer (TBS oder hTBS) bedeckt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht (ca. 12 Stunden). Danach Absaugen des Primärantikörpers und dreimaliges Spülen mit TBS für jeweils 5 Minuten.

d. Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Auftragen der verschiedenen Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 1% Hundeserum in TBS und Inkubation für eine halbe Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur; anschließend Absaugen und abermaliges Spülen mit TBS.

e. Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes:

Aufbringen des ABC-Reagens und Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für eine halbe Stunde; dabei Herstellung des ABC-Reagenzes laut Anleitung eine halbe Stunde vor Gebrauch: je Milliliter TBS wurden jeweils 9µl der

Substanzen A und B des PK-4000 Kits zugegeben. Danach Absaugen der ABC-Lösung, zweimaliges Waschen in TBS und Überführung für 10 Minuten in TBS mit 0,1% Tween20. Es folgt ein Einbringen der Schnitte in eine Imidazol-HCl-Lösung (0,1M Imidazol, 0,1N HCl) für 5 Minuten.

f. Farbreaktion:

Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einer Diaminobenzidin-Lösung (DAB): 100mg DAB in 200ml Imidazol-HCl-Lösung und 70µl 30%igem H₂O₂. Dreimaliges Waschen der Schnitte in Leitungswasser für jeweils 5 Minuten.

g. Gegenfärbung:

Eintauchen für Sekunden in eine Hämatoxilinlösung mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser für mindestens 10 Minuten und Überführung in Aqua dest.

h. Abschließende Fertigstellung des Präparates:

Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50-, 70-, 96%igem und zweimal absoluter Ethanol). Nach zweimaliger Inkubation in Xylol für jeweils mindestens 5 Minuten; Eindecken der Schnitte mittels Eukitt.

In den Vorversuchen wurde das immunhistologische Protokoll durch folgende weitere Schritte ergänzt:

a1. Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität:

Inkubation der OT in 0,03%iger H₂O₂ in TBS für 20 Minuten. Im Anschluß daran wurde in TBS so lange, mindestens aber 3 mal, gespült, bis keine Luftbläschen mehr auftraten.

a2. Mikrowellenbehandlung:

Zur Antigendemaskierung und / oder Fixierungsverstärkung (GOWN et al., 1993; LEONG und MILIOUS, 1993) wurden die beschickten OT, gestellt in eine Glasküvette, durch eine handelsübliche Mikrowelle 3 mal 5 Minuten in einem Citratpuffer gekocht; verdampftes Wasser mußte durch aqua dest. ersetzt werden. Nach Abkühlung, welche mit frischem Puffer zeitlich verkürzt werden konnte, wurden die OT wieder in TBS überführt.

a3. Absättigung polarer Aldehyd-, Keto- oder Carboxygruppen (Quenching):

Inkubation für 10 Minuten mit 0,1 molarem Glycin in TBS.

4.3.3 Kontrollen

Um die Spezifität des Primärantikörpers, die unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers und die endogene Peroxidaseaktivität zu überprüfen, wurde als Kontrolle auf jedem OT ein Gewebeschnitt anstelle des Primärantikörpers mit Puffer inkubiert (s.S. 29).

Desweiteren wurde jedes Gewebe mit einem Kontrollserum ("Nonsens" Primärantikörper), in diesem Falle Maus IgG1 anti Clostridium perfringens Toxin, behandelt, um die isotypabhängige, unspezifischen Bindungen der entsprechenden, typgleichen Primärantikörper zu evaluieren.

Ferner stand für die Antikörper gegen Leukozytenoberflächenantigene und MHC-II die Milz eines Hundes als Positivkontrolle zur

Verfügung. Jede in einem Aufarbeitungsgang immunhistologisch durchgezogene Schnittserie wurde mittels dieser Kontrollen verifiziert.

Die Spezifität des Antikörpers gegen humanes Endoglin wurde mittels der Reaktionsmuster des anti von Willebrand-Faktor Antikörpers überprüft. Der von Willebrand-Faktor ist ein Marker für vaskuläre Endothelzellen (GOUGOS und LETARTE, 1990; BRUSTMANN et al., 1997) und konnte somit in den Vorversuchen als Vergleich für das Anfärbemuster des Endoglin-Antikörpers herangezogen werden. Ferner konnte anhand eindeutig angefarbter Gefäßendothelien in den laufenden Schnittserien des Hauptversuches die gleichbleibende Qualität der Anfärbung durch den anti Endoglin-Antikörper verifiziert werden.

Das mögliche Vorkommen von endogenem Biotin im Gelbkörper wurde in den Vorversuchen durch die Inkubation der Schnitte mit Avidin-Biotin-Komplex und anschließender Anfärbung überprüft.

4.4 Beschichtungen, Fixierungen, Lösungen und Puffer

Beschichtung der OT	Chrom-Alaun: entfettete Objektträger in hand-warme Chromalaun-Gelatine für Sekunden eintauchen, bei Raumtemperatur trocknen. APES: 20sec 1ml APES / 50ml Azeton, 2 mal Azeton und aqua dest spülen, trocknen. bei 4°C mehrere Monate verwendbar
---------------------	---

Bologa Sandru Fixierung	- 3,7% Formalin, 10min bei Raumtemperatur (RT) - 3,7% Formalin + 0,2% Triton X 100, 10min bei Raumtemperatur - 50% Azeton, 2min bei 4°C - 100% Azeton, 2min bei 4°C - 50% Azeton, 2min bei Raumtemperatur
Bouin'sche Lösung	75ml gesättigte wässrige Picrinsäure, 25ml 4%iges Formalin, vor Gebrauch mit 45ml Eisessig anrühren, Fixierung 15-30min bei Raumtemperatur (ROMEIS, 1989)
bTBS	1% BSA in TBS
Chromalaun-Gelatine	2g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ (0,008M) und 2,5g Gelatine in 500ml aqua dest bei 40-50°C lösen, abkühlen lassen.
DAB	3,3'-Diaminobenzidin, 100mg in 200ml ImidazolHCl lösen, je 200ml 70µl H_2O_2 30%ig, filtrieren
Entfetten von OT	in Azeton baden und mit fussselfreiem Baumwolltuch abwischen.
Entwässern	aufsteigende Alkoholreihe: 70 - 90 - 96 und 2 × absoluter Ethanol
Eosin Formalin 4% PBS	gelblich, Pulver, hier 1%ig = 1g auf 100ml 4%iges Formalin in PBS nach Lillie, pH 7; 500ml Formalin 40%, NaH_2PO_4 20g, Na_2HPO_4 32,5g, aqua dest ad 5000ml
Formalin-Azeton-Fixierung	12min FormalinPBS 4% bei Raumtemperatur; 2×5min in PBS spülen; 4min Methanol bei -20°C; 1min Azeton bei -10°C; spülen
GlycinTBS	0,1M Glycin in TBS (75,07g/mol)
Hämalaun:	1g Hämatoxilin in 1000ml aqua dest (evt erhitzen), 0,2g NaJO_3 , 50g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun), schütteln (wird blauviolett), 50g Chloralhydrat, 1g Citronensäure kristallin (wird rotviolett), aufbewahren in Jenaer Glas.

HCl 1N	9,85g (!) rauchende HCl (37%), ad 1000ml aqua dest.
H&E-Färbung	10min Hämalaun, 5min wässern (spez. Bläunungsbad), aqua dest, Eosin 1%ig für 1,5min, spülen in Wasser, aqua dest, Alkohol 70%ig – 90%ig – 96%ig – absolut – absolut, Xylol 2 mal für mind. 5min, mit Eukitt eindecken
hTBS	1% oder 5% Hundeserum in TBS
ImidazolHCl	50mmol: 0,1M Imidazol = 8,51g in 1250ml aqua dest lösen, 750ml 0,1N HCl dazu, pH 7,08.
Kryoprotektion	20-30% Sucrose in TBS
NaCl 0,85%ig	= 0,145M, 8,5g/l aqua dest (15,3g plus 1,8l aqua dest)
PBS:	NaCl 8g, Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O 1,44g, KH ₂ PO ₄ 0,2g aqua dest ad 1000, pH 7,45
PBS 2fach	wie PBS × 2 bei gleicher Menge aqua dest
PFA 4%	8g Paraformalin in 100ml aqua dest unter Hitze und einigen Tropfen NaOH lösen bis die Lösung klar ist, filtrieren und abwiegen Gleiche Menge (Gewicht) 2fach konzentrierte PBS begeben.
TRIS-Puffer	0,5M, pH 7,65, 60,57g TRIS in 610ml aqua dest lösen, mit 1N HCl auf pH 7,65 einstellen (1N HCl ca. 390ml)
TBS	TRIS-Puffer 1:10 0,85%ig NaCl (0,145M) (tTBS, bTBS, hTBS)
tTBS	0,1% TritonX100 oder Tween20 in TBS
Yellow-Fix	2% Glutaraldehyd, 2% PFA, 0,02% Picrinsäure in 0,1M PBS, pH 7,2 (ITO und KARNOWSKY, 1968)

4.5 Reagentien, Zubehör, Gerätschaften

2Methylbutan	Roth 3927.1, 75,15g/mol
ABC	Vector Laboratories Inc.: Vectastain PK-4000
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma A-3648, 221,4g/mol

Aqua dest	Bidestillat oder Ionentauscher des Gießener Stadtwerke Wassers
Azeton	reinst, Merck 100013, 58,08g/mol
Blutröhrchen	Monovetten [®] , 4,5- oder 10ml NH ₄ -Heparin, Sarstedt
BSA	bovines Serumalbumin, 98-99% Albumin, Sigma A-7906
DAB	3-3' Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Dihydrat, 396,15 g/mol, Fluka 32750
Deckgläser	Menzel-Gläser 24×50mm, 24×60mm, 24×40mm, 18×18mm
Eosin	gelblich, Fluka 45240
Essigsäure	Eisessig, 99-100%ig, 60,05g/mol, Merck 818755
Ethanol	99,6%ig, Roth 5054.2, 46.07g/mol
Eukitt	Hecht-Mertens, Kiel 500ml
Faltenfilter feuchte Kammer	Ø 15cm, Schleicher & Schüll 311645 Delacre, Bahlsen Coffee
Formalin	35%: Merck 4001 47%: Merck 4003 30,03g/mol
Gelatine	handelsüblich, Plus, Aldi, Lidl
Glycerin- Gelatine	Kaisers ~, Merck 1.09242.0100
Glycin	Paesel 26-128-6405, 75,07g/mol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid, 30%ig, Fluka 95302
Hämalaun	Fluka 51210, selbst gekocht, Merck 1.09254 (Papanicolaou 1b)
HCl	Salzsäure, Konzentrat für 1N: Fluka 84424
I-AK	siehe Tabelle 1 auf Seite 27
II-AK	biot. pfd anti mo IgG (H + L) Vector BA-2000 biot. zg anti mo IgM (μ-spez.) Vector BA-2020 biot. zg anti rat IgG (H + L) Vector BA-9400 biot. zg anti rab IgG (H + L) Vector BA-1000 9μl / ml Verdünnungspuffer (1:111) oder 1:200
Imidazol	Fluka 56750, 68,08g/mol
KCl	Kaliumchlorid, Fluka 60129, 74,56g/mol
KCr(SO ₄) ₂ × 12H ₂ O	Kaliumchrom (III) sulfat – Dodecahydrat, Fluka 60151, 499,81g/mol

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat, Fluka 60220, 136,09g/mol
Kontrollserum	monoklonal mo IgG1 anti Cl. Perfringens (1F9)
Methanol	99,8%ig, Merck reinst 6009, 32,04g/mol
Monovetten®	10ml (02.264) oder 4,5ml (05.275), NH ₄ -Heparin, Sarstedt
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei, Fluka 71640, 141,96g/mol.
Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat heptahydrat, Fluka 71647, 268,07g/mol
NaCl	Natriumchlorid, Merck 106400, 58,44g/mol
NaCl 0,9%ig	B. Braun, Melsungen, 154mmol/l
Natriumcitrat	294,1g/mol, Sigma S4641
O.C.T.	Compound Tissue Tek®, Miles Inc. Elkhart IN
Objektträger	Superfrost / Plus, Menzel-Gläser gereinigt, Kanten geschliffen 76×26×1, ebenso
OT-Halter	Eigenbau aus Aluplatten, Alu-U-Profilen, Schrauben, Federn, Gummileisten und Patex
PAP-Pen	SCI München 089/7233402, Immunotech 1056
PFA	Paraformaldehyd, Fluka 76240, 30,03g/mol
Picrinsäure	211,1g/mol, Sigma P1394
Serumröhrchen	3,5ml, Polypropylen, Sarstedt 55.535
Serum inaktiviert	Pferd: Vector S-2000 und eigene Pferde Ziege: Vector S-1000 und eigene Ziege Hund: Versuchshunde
Sucrose	342,3g/mol, Serva 35580
TRIS	Fluka 93352 (Hydroxymethylammoniummethan), 121,14g/mol
Triton X100	Octylphenol-polyethylenglycol Ether, Serva, 37240
Tween20	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat, Sigma P-1379
Tween80	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat, Merck 822187, 1,08kg/l
Xylol	Merck 818754 zur Synthese, 106,17g/mol
Zitronensäure	- Monohydrat, 210,14g/mol, Sigma C1909

4.6 Auswertung

Bei der quantitativen Auswertung der immunhistologischen Schnitte wurden eindeutige Stauchungs- und Zerreißungszonen sowie Artefakte nicht in Auszählung, Grauwertbestimmung und Flächenmessung einbezogen. In allen Fällen war der hinreichende Kontrast zwischen positiver Immunreaktion und der unspezifischen Färbung ("Hintergrund") qualitative Voraussetzung für die Aufnahme in die Auswertung. Insgesamt wurden 240 histologische Schnitte dem immunhistologischen Protokoll zugeführt. Diese Zahl ergibt sich wie folgt: Fünf Versuchsgruppen zu drei Hunden; von den maximal vier gewonnenen Corpora lutea wurden je vier Schnitte gezogen (plus ein Schnitt als Negativkontrolle). Allerdings konnten, im Hinblick auf die Wahrung der Vergleichbarkeit der Gruppengröße, nur 135 Gewebeschnitte pro Primärantikörper (Zielgröße: Tag) zur statistischen Analyse gebracht werden, da maximal drei Corpora lutea je Hund und drei Schnitte je Gelbkörper auswertbar dargestellt werden konnten. Probleme ergaben sich insbesondere aus der Gewebeerhaltung, die sich nur am Tag 30 gut darstellte, während alle anderen Tage der genaueren Selektion der histologischen Schnitte und der Gesichtsfelder bedurften.

Es wurde das Bildanalyseprogramm "ImageTool", Version 2.0 alpha, der University of Texas, Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA, <ftp://maxrad6.uthscsa.edu>) verwendet. Zur Aufnahme der histologischen Schnitte stand zur Verfügung: Ein Durchlichtmikroskop der Firma Leica (Leitz DM RB), ein Farbvi-

deokameraufsatz (Sony DXC-107AB), ein leistungsstarker IBM-kompatibler Computer mit einer Videodigitalizer-Karte (CMA-Synchro, ViDiSys, Sauerlach), die Bilder mit 768 mal 576 Bildpunkten (Pixel) zu 16,8 Millionen Farben oder 256 Graustufen lieferte. Zur Wahrung der Vergleichbarkeit wurden sämtliche Messungen innerhalb von 3 Tagen durchgeführt.

Die Datenhaltung und Auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993) durchgeführt. Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s), Minima (x_{\min}) und Maxima (x_{\max}) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Datenbeschreibung mit Hilfe von geometrischen Mittelwerten (\bar{x}_g) und Streufaktoren (SF), dargestellt in der Form $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$, vorgenommen. Zur statistische Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei den angenähert normalverteilten Merkmalen eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Bei signifikantem Resultat wurden die Gruppen anschließend paarweise mit dem Student-Newman-Keuls-Verfahren verglichen (SACHS, 1992). Bei der Benennung von Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

$p \leq 0.001$	hoch signifikant
$p \leq 0.01$	Signifikant
$p \leq 0.05$	schwach signifikant
$p > 0.05$	nicht signifikant

Zur Überprüfung des in die Statistik eingegangenen Datenbestandes wurde eine vier- / fünffaktorielle Varianzanalyse (CD8, CD4, MHC-II / Endoglin) nach dem gemischten Modell mit dem Programm DMDP8V durchgeführt, welche folgende Effekte enthielt: Tag (fix), Hund innerhalb der Versuchsgruppe (zufällig), Gelbkörper (zufällig), Schnitt (zufällig) und für Endoglin zusätzlich Gesichtsfeld (zufällig). Diese Streuungszerlegung stellte die Genauigkeit der gewonnen arithmetischen Mittel der Zielgrößen durch die Darstellung der relativen Streuung der o.a. Effekte dar.

4.6.1 T-Lymphozyten

Die Anzahl CD8⁺ und CD4⁺ Zellen wurde auf die ausgezählte Fläche bezogen. Weiterhin wurde durch einfache Quotientenbildung der jeweiligen Mittelwerte das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen ermittelt.

4.6.1.1 CD4⁺ Zellen

Die Auszählung erfolgte unter Verwendung des Programms ImageTool durch Auswertung von Grauwertbildern (8bit, 256 Graustufen, Ausschnitt 768x576pixel, kalibriert auf 1200x900µm = 1,08mm²) der Farbvideoaufnahmen.

Das Grauwertintervall des braunen DAB-Polymerisationsproduktes wurde als Kriterium für die Zählung der Software angegeben. Anhand dieses Wertes präsentierte das Programm zur Kontrolle Bezirke ähnlicher Grauwerte durchnummeriert auf dem Bildschirm. Es wurden nur Bezirke gezählt, die mindestens 5 Pixel Umfang besaßen. Diese 5 Pixel entsprachen einer Strecke von 12,6µm, dem mittleren Durchmesser eines T-Lymphozyten (vgl. Abbildung 1, S. 40). Gewertet wurden nur Pixel mit einem Grauwertintervall von 106 und darunter (threshold), welcher sich in Vorversuchen als genügend kontrastreich zum umliegenden Gewebe herausgestellt hatte. Es wurden von jedem Gewebeschnitt mindestens 2 Gesichtsfelder ausgewertet, die ausschließlich Lutealgewebe zeigten. Zur automatischen Auszählung wurde ein Fünferobjektiv mit einer leichten Vergrößerung durch einen Variotubus herangezogen (1,1). Der Vergleich der manuellen mit der automatischen Zählung anhand von 10 Gesichtsfeldern erbrachte eine Korrelation von 0,967 (vgl. Seite 102).

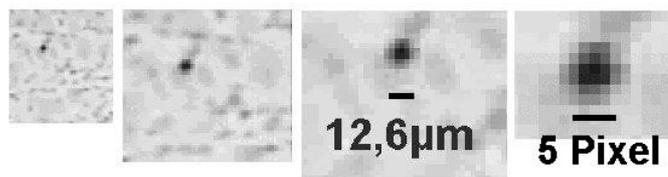


Abbildung 1: Durchmesser (µm und Pixel) von CD4⁺ Zellen: links Originalvergrößerung der Auswertung; nach rechts folgend: herangezoomt bis zur Verdeutlichung des gemessenen Durchmessers von 12,6µm und der Pixelanzahl von 5 der CD4 positiven Lymphozyten.

4.6.1.2 CD8⁺ Zellen

Die Auszählung aller CD8⁺-T-Lymphozyten erfolgte von Hand am Bildschirm des Mikroskops. Dazu wurde der Schnitt mäanderförmig unter dem Objektiv entlang bewegt und alle CD8 positiven Lymphozyten auf der gesamten Lutealfläche erfaßt. Die dabei ausgezählte Fläche des Corpus luteums wurde durch das Computerprogramm ImageTool ermittelt. Dabei wurde das digitale Abbild des CL mit der Computermaus umfahren (Abbildung 2, S. 41), sodaß das Programm, nach entsprechender Kalibrierung, die Fläche des Gelbkörpers in μm^2 lieferte. Es wurde nur einwandfreie Lutealfläche ausgezählt und ausgemessen. Zwölf zeitlich unabhängige Flächenmessungen des gleichen Objektes hatten einen Variationskoeffizient von 0,83%, wobei der Startpunkt der Umfahrung willkürlich gewählt wurde (siehe S. 102).

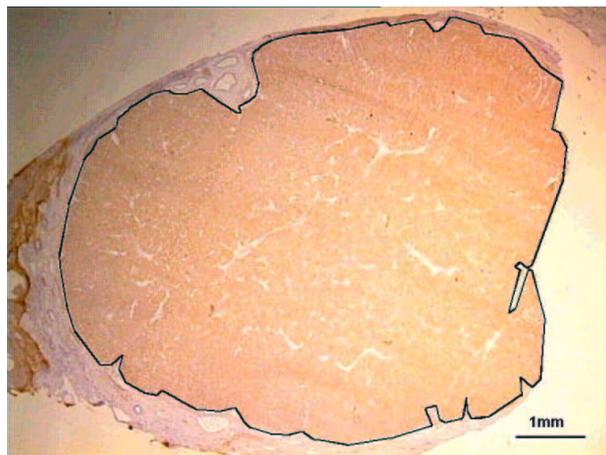


Abbildung 2: Bestimmung der Größe der ausgezählten Lutealfläche mittels Computer: Umfahren des CL in der Übersichtsaufnahme.

4.6.2 Endoglin

Für die Quantifizierung der Immunreaktion von Endoglin wurden Grauwertbilder der Lutealfläche herangezogen. Der optischen Dichte eines jeden Punktes (Pixel) des histologischen Schnittes wurde durch den Computer ein entsprechender Grauwert zugeordnet. Der Wert "0" eines solchen Pixels bedeutete dabei schwarz oder keiner Beleuchtung und "255" weiß oder maximaler Beleuchtung. Folgende Parameter wurden ausgewertet:

- a) Grauwertdifferenz als Maßstab für die optische Dichte der Immunreaktion (Abkürzung: Endoglin-G, Dimension 0-255):
Jeder einzelne Bildpunkt der digitalen Aufnahmen gab mit dem zugehörigen Grauwert (0 bis 255) die optische Dichte des braunen Präzipitates an dieser Stelle wider. Da diese optische Dichte der Intensität der Immunreaktion an dieser Stelle entspricht (NABORS et al., 1988), ließ sich aus der Differenz des mittleren Grauwertes der immunpositiven Gesichtsfelder und des mittleren Grauwertes der immunnegativen Gesichtsfelder (n=3) die mittlere optische Dichte der spezifischen Immunreaktion auf dem gewählten Gelbkörperausschnitt mittels ImageTool ermitteln. Die optische Dichte der Immunreaktion wurde somit als Grauwert zwischen 0 (maximale Immunreaktion) und 255 (keine Immunreaktion) dargestellt (Abkürzung: Endoglin-G).
- b) Flächenanteil der immunpositiven Bezirke des CL (Abkürzung: Endoglin-F, Dimension %):

Der Flächenanteil der Immunreaktion in den digitalen Gesichtsfeldern wurde mittels eines Grauwertintervalls bestimmt. Dieses Grauwertintervall entsprach dem braunen Präzipitat der Immunreaktion und wurde von dem Programm ImageTool verwendet, um alle Pixel in "0" oder "255" umzurechnen (Binarisierung). Man erhielt ein Bild aus ausschließlich schwarzen und weißen Pixeln, wobei schwarz die immunopositiven und weiß die immunonegativen Flächenanteile wiedergab (Abbildung 3). Weiße und schwarze Anteile konnten prozentual dargestellt werden. Es wurde ein Grauwertintervall von 10 bis 140 eingesetzt, schwarze Ausfällungen und blaue Zellkerne wurden auf diese Weise ausgeblendet (Abkürzung: Endoglin-F).

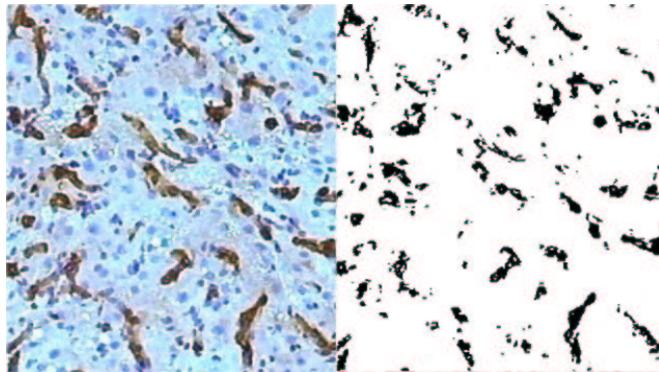


Abbildung 3: Binarisierungsbeispiel der Computergrafiken: Links Originalaufnahme, rechts binarisiert in schwarz (0) oder weiß (255) mit einem Grauwertintervall 10-140 zur statistischen Erfassung der Flächenanteile der Immunreaktion.

Es wurden zwei Aufnahmen je immunhistologischem Schnitt erfaßt. Zur Vermeidung von Schwankungen durch Verstellung der

Meßtechnik, speziell durch die Beleuchtungsstärke, wurde vor jeder Messung die Anlage anhand von 2 Schnitten neu eingestellt.

4.6.3 MHC-II

Zur statistischen Erfassung der Immunreaktion des MHC-II Antikörpers wurde analog zu Endoglin vorgegangen. Grauwertdifferenz als Maßstab für die optische Dichte (Abkürzung: MHC-II-G) und Flächeanteil der Immunreaktion (Abkürzung: MHC-II-F) wurden, wie oben unter Endoglin ab Seite 42 beschrieben, erfaßt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Ergebnisse der methodischen Entwicklungsarbeiten

Nach ersten Vorversuchen wurden Chromalaun-Gelatine beschichtete OT eingesetzt. Durch geringere Hafteigenschaften im Laufe des immunhistologischen Prozesses waren APES beschichtete und Superfrost Plus OT ungeeignet.

Die Trocknung der Gewebeschnitte vor der Fixierung stellte sich für die Hafteigenschaften auf dem OT als unerlässlich heraus. Zwar war meist das gesuchte Antigen etwas deutlicher ohne Trocknung vor der Fixierung darzustellen, jedoch wurde dieser Vorteil durch zum Teil starke Gewebeverluste und Schrumpfung der Zellen wieder aufgewogen. Bei allen Leukozytenmarkern- und MHC-II-Antikörpern stellte sich hingegen heraus, daß eine Ablüftung des koagulierenden Fixativs die Antigenität des Gelbkörper nahezu gänzlich beseitigte. Erneutes Einfrieren nach der Fixierung, auch mit Gefrierschutz, war in allen Fällen für das Corpus luteum schädlich. Einzig die Positivkontrolle Milz zeigte sich sehr unempfindlich und konnte ohne Kryoprotektion bevorratet werden. Die Fixierung bei -20°C erbrachte erhebliche Materialverluste und starke Abnahme der Antigenität.

Eine Azetonfixierung führte zu klaren, gut abgrenzbaren Reaktionen bei mäßiger Gewebeerhaltung. Methanol als Fixierungsmedium bewahrte zwar sehr gut die gewebliche Integrität, jedoch kam es zu starken Hintergrundreaktionen mit dadurch provozierter

schwieriger Differenzierung von schwachen Signalen. Ein Gemisch aus Azeton und Methanol zu gleichen Teilen stellte den besten Kompromiß dar.

Formalinfixiertes Gewebe zeigte die beste strukturelle Erhaltung, aber auch die stärkste unspezifische Hintergrundfärbung bei eher schwach ausgeprägter Immunreaktion. Die Fixierungszeit von 15 Minuten wurde als äußerste Grenze zur Überfixierung ermittelt (Hintergrundaktivität).

Die Behandlung der Präparate im Vorfeld der immunhistologischen Anfärbung mittels mikrowellenunterstützter Antigenfreilegung / Nachfixierung und die Inkubation in Glycinpuffer hatte keine positiven Auswirkungen auf die Antigenität der gesuchten Epitope. Da keine endogenen Peroxidaseaktivitäten und Biotinvorkommen am caninen Ovar festzustellen waren, wurde auf deren Blockierung im Verlaufe des immunhistologischen Protokolls verzichtet.

Die Ergebnisse aller anderen auf Formalin basierenden Fixierungsmethoden entsprachen den oben geschilderten (Bouin, Yellow-Fix, Lillie, Formalin-Azeton, Formalin + Azeton, Formalin mit BSA und TritonX100).

Für den Hauptversuch wurde 5 Minuten bei 4°C in einem Gemisch aus Azeton und Methanol zu gleichen Teilen fixiert und anschließend ohne Ablüftung des Fixativs fortgefahren.

5.2 Histologisches Screening

Die Schnittserien der H&E Präparaten der in der Immunhistologie eingesetzten Gewebeblöcke erbrachten folgende Ergebnisse: Das junge Corpus luteum (Tag 15) zeigte sich hell und aufgelockert durch große Spalten zwischen einigen Zellen. Neben kleinen, kompakten, länglichen Zellkernen von Bindegewebszellen und den etwas runderen Endothel- und Perizytenzellkernen, traten auch große, blasse Kerne auf, die sehr oft zwei Nukleolen besaßen und von viel Zytoplasma umgeben waren. Diese großen, blassen Lutealzellen machten den weitaus größten Volumenanteil in jungen Corpora lutea aus, nahmen aber im Verlaufe des Zyklus an Volumen des Zelleibes und -kernes ab. Die etwas kleineren, dichteren Gelbkörperzellen besaßen einen wesentlich kleineren, stark granulierten Zellkern und bildeten in älteren Gelbkörpern die optische Mehrheit der Lutealzellen. Mitosen konnten am Tag 15 in Lutealzellen erkannt werden, später nur noch in nicht luteinisierten Gewebekompartimenten. Das fortschreitende Alter des Gelbkörpers machte sich neben der Volumenreduktion der Luteinzellen im vermehrten Auftreten von Vakuolen und der zunehmenden Strukturierung des Gelbkörpers durch Bindegewebsbalken bemerkbar. In der lutealen Kapsel stellten sich große braune, feinkörnige Zellstrukturen dar, die intensiv von CD4 und MHC-II angefärbt wurden und als hämosiderinbeladene Makrophagen angesprochen werden konnten.

5.3 Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen

Für Endoglin wurden 270 Gesichtsfelder (jeweils 2 GF je Schnitt, s.S. 42), für CD4 813 und für MHC-II 846 Gesichtsfelder (alle den Qualitätskriterien entsprechenden GF, s.S. 39 bzw. S.41) untersucht. CD8⁺ Zellen wurden an allen 135 histologischen Schnitten gezählt und die Flächen bestimmt, insg. 2364 mm². Die Computerbilder von Endoglin und MHC-II wurden zwei Mal ausgewertet, einmal für die Bestimmung der Grauwertdifferenz zwischen Negativkontrolle und dem gefärbten Gewebe und ein weiteres Mal zur Erhebung der Flächenanteile der Immunreaktion (für Einzelwerte siehe ab Tabelle 12, S. 106).

Wie die unten stehende Tabelle 2 wiedergibt, stieg sowohl die Anzahl der Bilder als auch die ausgemessene Fläche zum Tag 30 an, um dann kontinuierlich abzufallen.

Tabelle 2: Anzahl ausgezählte Gesichtsfelder (GF) sowie Zählfläche in mm²

Tag	CD4 GF (mm ²)	MHC-II GF (mm ²)	CD8 mm ²
15	196 (211,96)	170 (183,60)	520.247
30	217 (234,36)	205 (221,40)	660.413
45	161 (173,88)	196 (211,68)	520.255
60	144 (155,52)	154 (166,32)	404.785
75	95 (102,60)	121 (130,68)	258.038
Σ GF / mm ²	813 (878.04)	846 (913.68)	2363.783

GF: Gesichtsfeld

Für Endoglin standen 270 GF zur Verfügung, 54 pro Zielgröße „Tag“.

Alle Daten wurden aufgrund rechtschiefer Verteilung logarithmisch transformiert.

Für alle Gruppen (Tag 15 bis Tag 75) konnte ein hoch signifikanter bis schwach signifikanter Einfluß auf die Zielgrößen (Endoglin, CD4, CD8 und MHC-II) ermittelt werden (einfaktorielle Varianzanalyse, BMDP7D, siehe Seite 37). Eine Übersicht gibt die unten stehende Tabelle 3; die Ergebnisse des paarweisen Gruppenvergleiches finden sich bei der Darstellung der Einzelergebnisse der jeweiligen Ziele im Anhang ab Tabelle 10 ab Seite 104.

Tabelle 3: Signifikanz der Wechselwirkungen Zielgröße / Versuchstiergruppe (Ergebnis der einfaktorielle Varianzanalyse)

Zielgröße	Signifikanz (p)
Endoglin-F ¹⁾	0,0000
Endoglin-G ¹⁾	0,0000
Endoglin-Q ¹⁾	0,0005
MHC-II-G ¹⁾	0,0001
CD4 ²⁾	0,0023
CD8 ³⁾	0,011
MHC-II-F ³⁾	0,0147
MHC-II-Q ⁴⁾	0,0948

1): hoch signifikant: $p \leq 0,001$

2): signifikant: $p \leq 0,01$

3): schwach signifikant: $p \leq 0,05$

4): nicht signifikant: $p > 0,05$

Die Einzelwerte der Streuungszzerlegung (vier- bzw. fünffaktorielle hierarchische Varianzanalyse nach dem gemischten Modell, DMDP8V, S. 37, relative Streuung zwischen den einzelnen Zielgrößen Tag, Hund, Gelbkörper und Schnitt sowie für Endoglin

zusätzlich Gesichtsfeld) finden sich in Tabelle 7 auf Seite 102, in unten abgebildeter Tabelle 4 sind zur Übersicht die Mittelwerte aufgeführt.

Tabelle 4: Relative Streuung als Ergebnis der Streuungszerlegung (gemittelt)

Hunde	16,8%
Blöcke	20,6%
Schnitte	15,8%
Gesichtsfelder (nur Endoglin)	13,6%

Es ergaben sich bei Anwendung der unter 5.1 angegebenen Fixierungsverfahren und Protokollabläufe folgende Färbemuster:

5.3.1 Anti-CD4-Antikörper

Der Antikörper gegen canines CD4 färbte im Corpus luteum eindeutig zu differenzierende T-Lymphozyten, die gehäuft entlang von größeren Bindegewebssträngen auftraten und ansonsten gleichmäßig im Lutealgewebe verteilt waren. Desweiteren wurden wesentlich größere Zellen mit unregelmäßigen Grenzen und dichtem Zytoplasma intensiv markiert, die als Makrophagen erkannt wurden (s. Abbildung 4):

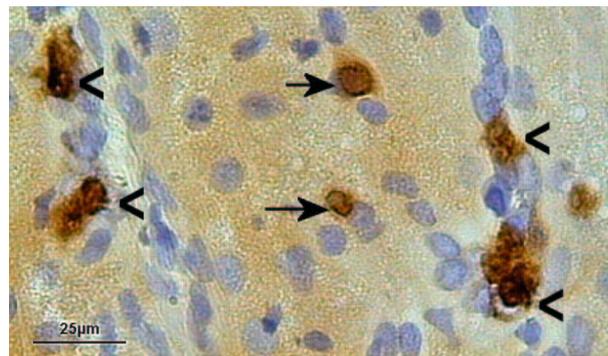


Abbildung 4: CD4⁺ Zellen im caninen Gelbkörper: mittig T-Helfer Lymphozyten (→), links und rechts Makrophagen (◄)

Diese Gebilde waren auch massiv konzentriert in der Bindegewebskapsel um die Corpora lutea herum zu finden (Abbildung 5). Die gleichen Bezirke, die auch durch die Immunreaktion des anti MHC-II Antikörpers stark angefärbt sind (vgl. S. 56), hoben sich in der H&E Darstellung leicht bräunlich von dem roten Hintergrund ab und lassen sich als hämosiderinbeladene Makrophagen ansprechen.

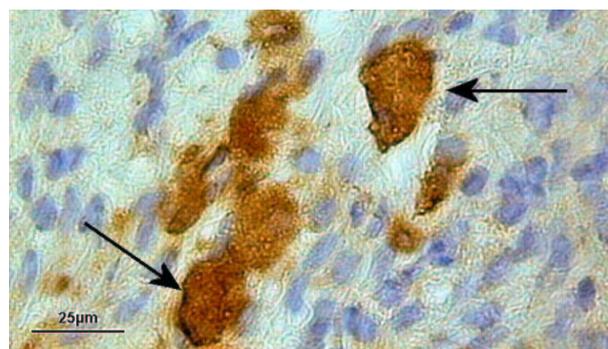


Abbildung 5: CD4⁺ Reaktionen im Bindegewebe der Corpora lutea des Hundes: Hämosiderinbeladene Makrophagen (←)

Die Positivkontrolle jeder Färbecharge verlief immer erfolgreich; trotz nicht erfolgter Ausschaltung der endogenen Peroxidaseakti-

vität, konnte auch in der Milz die positive Immunreaktion eindeutig zugeordnet werden.

Die Auszählung der CD4 immunopositiven T-Lymphozyten erbrachte einen Anteil von im Mittel 6,5 bis 8,5 Zellen/mm² zwischen den Tagen 30 bis 75, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zeigten. Mit 21,64 Zellen/mm² (SF 1,4) unterschied sich Tag 15 zu allen anderen Tagen hoch signifikant ($p < 0,001$), die Einzelwerte sind auf Seite 104 in Tabelle 10 aufgezeichnet. Eine Zusammenfassung ($\bar{X}_g \cdot SF \pm 1$) gibt unten Abbildung 6. Die relative Streuung als Ergebnis der vierfaktoriellen Varianzanalyse lag bei 27,1% für die Zielgröße Hund, 24% für die Blöcke 15,6% für die Schnitte.

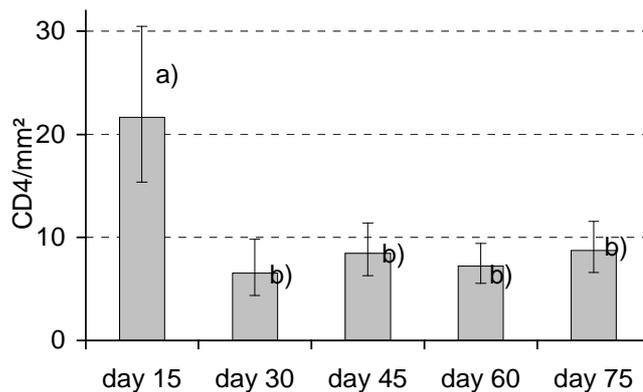


Abbildung 6: CD4⁺ T-Lymphozyten pro mm² im CL des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem, Mittelwerte ($\bar{X}_g \cdot SF \pm 1$); a) vs b) unterscheiden sich hoch signifikant mit $p < 0,001$.

5.3.2 Anti CD8-Antikörper

Die Zuordnung der Immunreaktion war am Mikroskop jederzeit eindeutig möglich (Abbildung 7). CD8⁺ T-Lymphozyten lagen gleichmäßig im Lutealgewebe verstreut (Abbildung 8), lediglich an einigen großen Bindegewebssträngen, wie dem bindegewebigen Zentrum des Gelbkörpers, traten die Zellen konzentrierter auf.

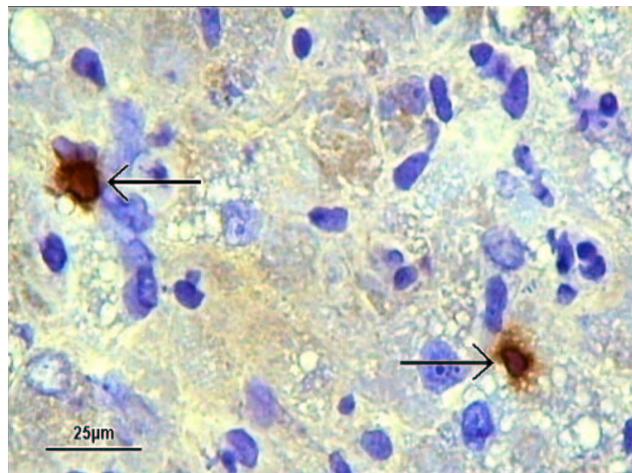


Abbildung 7: CD8⁺ Zellen im CL des Hundes: 2 immunopositive T-Lymphozyten links und rechts (Pfeile).

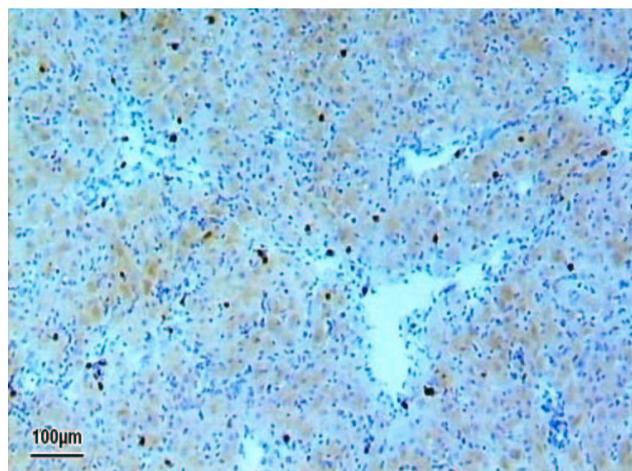


Abbildung 8: CD8⁺ Zellen im Corpus luteum des Hundes: Übersichtsaufnahme.

Die Positivkontrolle Milz wurde in jeder Sitzung erfolgreich gefärbt. Die Auszählung der CD8 immunopositiven T-Lymphozyten erbrachte folgende Werte (positive Zellen je mm²): Von anfänglich 6,55 Zellen/mm² ging die Anzahl am Tag 30 auf 2,4 zurück. Dem Anstieg der positiven Leukozyten am Tag 60 bis auf 7,3 CD8⁺/mm² folgte eine Verminderung auf 3,5 Signale je mm² am Tag 75. Die Streufaktoren lagen dabei zwischen 1,2 und 1,5. Bis auf Tag 15 und 60 unterschieden sich alle Gruppen hoch signifikant. Eine Zusammenfassung ($\bar{X}_g \cdot SF \pm 1$) gibt unten Abbildung 9. Für die Einzelwerte siehe Tabelle 11, Seite 105.

Die Varianzanalyse ergab eine relative Streuung von 37,1% zwischen den Hunden, 17,1% zwischen den Blöcken und 14,1% zwischen den Schnitten.

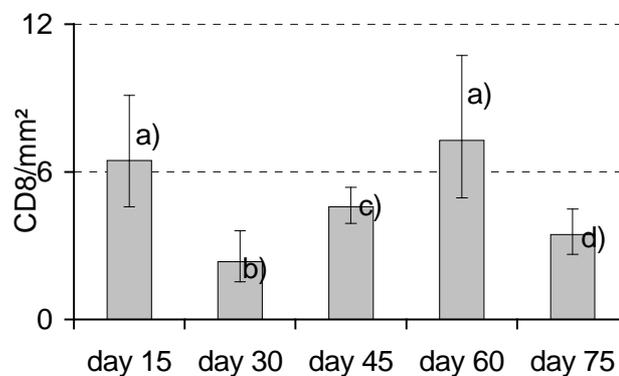


Abbildung 9: CD8⁺ Zellen/mm² im CL des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem; Mittelwerte ($\bar{X}_g \cdot SF \pm 1$); a) bis d): Säulen mit unterschiedlichen Super-scripts unterscheiden sich hoch signifikant $p < 0,001$.

5.3.3 Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺

Das Verhältnis der beiden T-Lymphozytenpopulationen CD4 und CD8 zueinander veränderte sich im Laufe des Zyklus, wie in Abbildung 10 dargestellt: Es lag am Tag 15 bei 3,4 und fiel über 2,8 und 1,8 auf 1 am Tag 60 ab, um am Tag 75 erneut auf 2,5 anzusteigen; dieser Wert entspricht ungefähr dem für Blut mit 2 festgestellten Verhältnis.

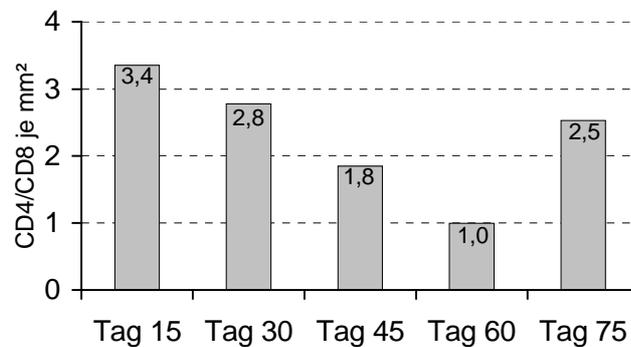


Abbildung 10: Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen/mm² zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem; Quotienten der Mittelwerte (\bar{X}_g / \bar{X}_g).

5.3.4 MHC-II

Die positive Immunreaktion des Antikörpers war nur schwer Zellen eindeutig zuzuordnen. So ließ sich nicht differenzieren, ob die bandförmigen Anfärbungen die Zellgrenzen von Lutealzellen oder Teile des Bindegewebsgerüsts und Gefäße, die die Lutealzellen umschließen, darstellen. In keinem Fall färbte sich das Zytoplasma von Lutealzellen stark an. Hingegen konnten MHC-II⁺-Lymphozyten und -Makrophagen gezeigt werden (siehe Abbildung

von 30 am Tag 15 kontinuierlich bis auf 16,6 am Tag 45 ab, um dann wieder bis auf 27,2 anzusteigen (siehe Abbildung 13). Einzelwerte sind auf Seite 106 in Tabelle 12 verzeichnet. Keinen signifikanten Unterschied gab es zwischen den Tagen 30 und 45, schwach signifikant unterschieden sich die Tage 30 und 60 sowie 15 und 75 und signifikant 45 und 60. Tag 15 und 75 unterschieden sich, bis auf die Ausnahme oben, zum Rest der Gruppen hoch signifikant.

Die statistische Untersuchung auf Varianzen erbrachte für die Hunde eine relative Streuung von 7,1%, für die Blöcke von 11,6% und für die Gewebeschnitte von 15,4%.

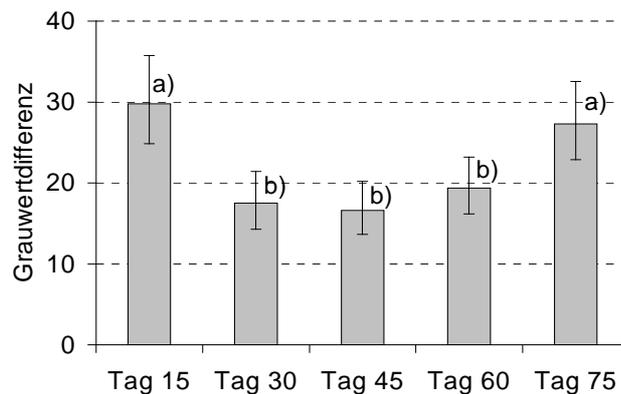


Abbildung 13: Expression von MHC-II Antigen im CL des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem: Mittlere Grauwertdifferenz (MHC-II-G); Mittelwerte ($\bar{X}_g \cdot SF \pm 1$); a) b): Säulen mit unterschiedlichen Superscripts unterscheiden sich hoch signifikant mit $p < 0,001$.

Die Bestimmung des Flächenanteils der Immunreaktion (MHC-II-F) zeigte den gleichen Verlauf wie bei der Grauwertdifferenz oben (MHC-II-G), zur Übersicht siehe Abbildung 14.

Die Streufaktoren und die Varianzen waren hingegen erheblich höher (zwischen 1,26 und 1,66 bzw. zwischen 21% und 33%). Die Einzelwerte sind in Tabelle 13 auf Seite 107 zu finden.

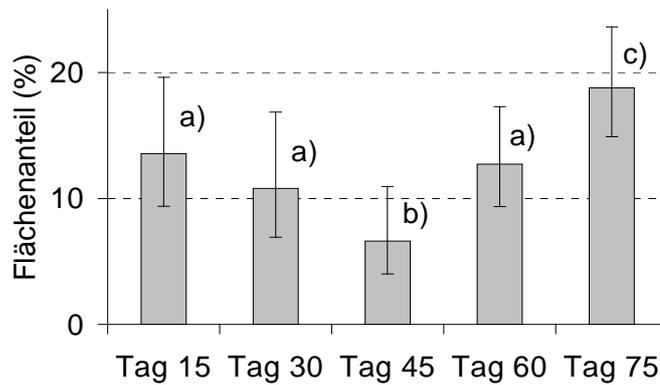


Abbildung 14: Expression von MHC-II Antigen im CL des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem: Flächenanteil in % (MHC-II-F); Mittelwerte ($\bar{X}_g \pm SF$); a) bis c): Säulen mit unterschiedlichen Superscripts unterscheiden sich hoch signifikant mit $p < 0,001$.

5.3.5 Endoglin

In den Corpora lutea wurden Gefäße und Zellen der „Monozyten / Makrophagenlinie“ selektiv angefärbt (siehe Abbildung 15, nächste Seite und Abbildung 16, Seite 60).

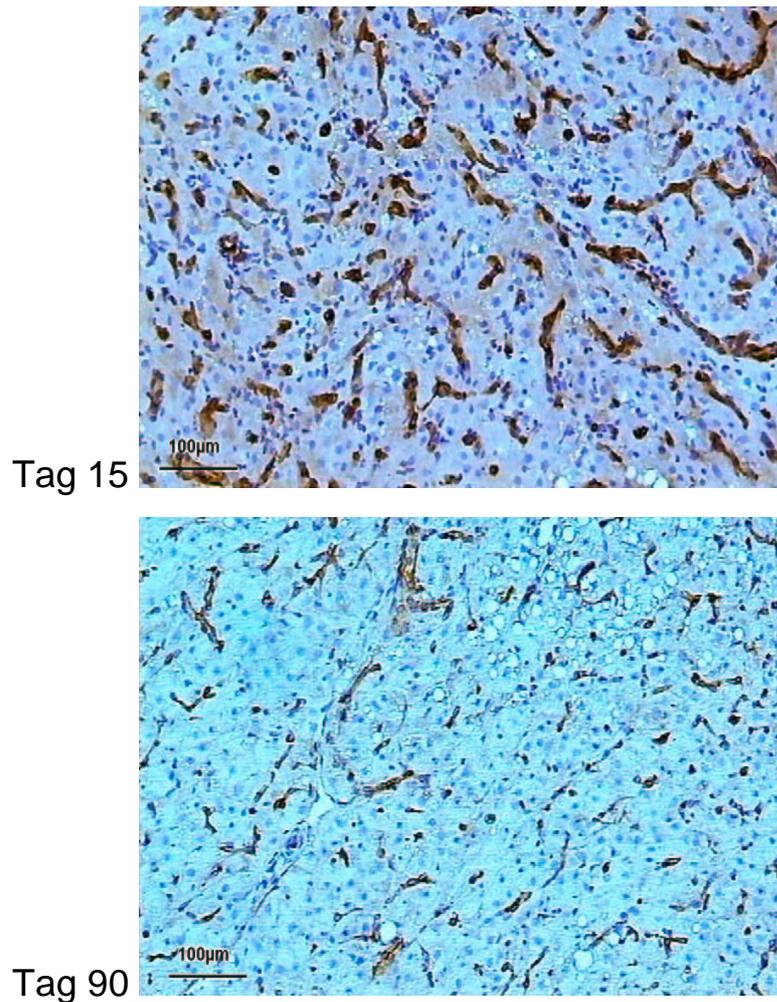


Abbildung 15: Expression von Endoglin im Gelbkörper des Hundes an den Tagen 15 und 90: es zeigen sich bandförmige, längs- und querschnittene Endoglin-positive Gefäßstrukturen, ein deutlicher Unterschied im Vaskularisationsgrad ist zwischen den Tagen 15 und 90 erkennbar.

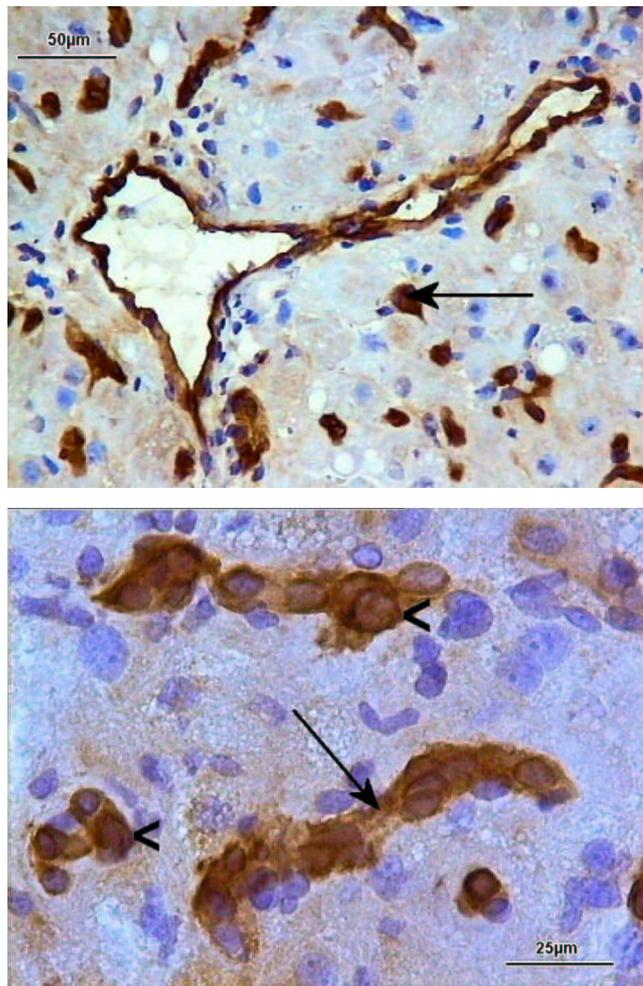


Abbildung 16: Quer- und längsgeschnittene Gefäße (←) und Makrophagen (<) im Corpus luteum der Hündin, dargestellt durch anti Endoglin.

Der Anteil von endoglinpositiven Flächen im Corpus luteum nahm von 11,5% am Tag 15 auf 5,6% am Tag 30 ab und bewegte sich danach bis zum Tag 75 in dem Intervall zwischen 5,6 und 4,0%. Der Abfall von Tag 15 auf Tag 30 war hoch signifikant ($p < 0,001$), danach waren die Unterschiede nur noch schwach ausgeprägt (s. Abbildung 17, sowie die Einzelwerte in Tabelle 14, S. 108). Die relativen Streuungen, Ergebnis der fünffaktoriellen Streuungszer-

legung, zwischen den Blöcken, Schnitten und Gesichtsfelder waren 18,5, 11,7 bzw. 14,8%.

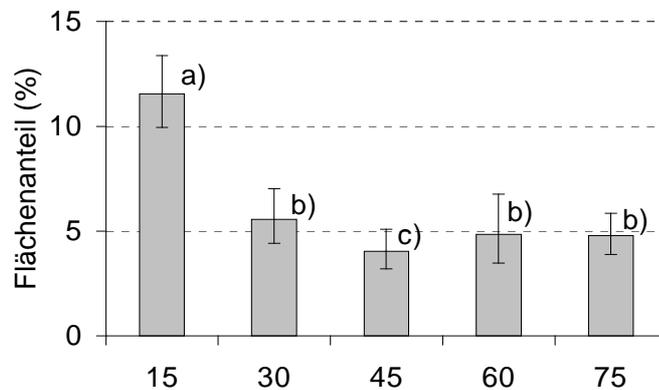


Abbildung 17: Expression von Endoglin im CL des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem, Flächenanteil in % (Endoglin-F); Mittelwerte ($\bar{X}_g \pm SF$); a) bis c): Säulen mit unterschiedlichen Superscripts unterscheiden sich mit $p < 0,001$ bis $p < 0,05$.

Die optische Dichte der Immunreaktion (Endoglin-G), dargestellt durch die mittlere Grauwertdifferenz zwischen immunopositiven Aufnahmen und negativen Gesichtsfeldern, nahm nahezu linear hoch signifikant ($p < 0,001$) zwischen den einzelnen Tagen von 25 am Tag 15 bis auf 11,2 am Tag 75 ab, siehe Abbildung 18 sowie die Einzelwerte in Tabelle 15 auf S. 109. Die fünffaktorielle Streuungszerlegung erbrachte folgende relative Streuungen: Hunde 3,05%, Blöcke 12,2%, Schnitte 20,7% und Gesichtsfelder 11,9%.

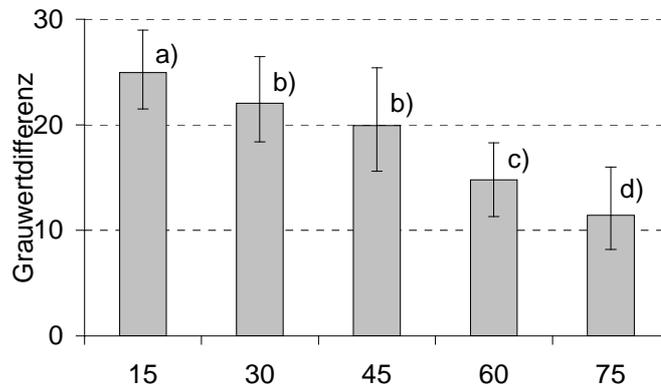


Abbildung 18: Expression von Endoglin im CL des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 post ovulationem: Grauwertdifferenz (Endoglin-G); Mittelwerte ($\bar{X}_g \pm SF$); a) bis d): Säulen mit unterschiedlichen Superscripts unterscheiden sich hoch signifikant mit $p < 0,001$.

6 DISKUSSION

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 Bestimmung des Ovulationszeitpunktes und der Diöstruslänge

Zur Bestimmung der Ovulationszeitpunkte der 15 Versuchshündinnen wurde hauptsächlich auf die Erhebung des Plasmaprogesteronspiegels durch etablierte Verfahren (HOFFMANN et al., 1973) zurückgegriffen. Die begleitende Untersuchung der Vaginalabstriche, die Beobachtung der vaginalen Ausflüsse und der Verhaltensweisen der Tiere bei Kontakt mit einem Rüden gaben hierzu den Blutentnahmezeitraum vor. Die ermittelte Länge von durchschnittlich 10 ± 3 Tagen vom erstmaligen Auftreten blutigen vaginalen Ausflusses bis zum Anstieg des Plasmaprogesteronspiegels über 5ng/ml ist konform zu den Erhebungen anderer Autoren (vgl. hierzu CHRISTIANSEN, 1984; CONCANNON et al., 1977b).

6.1.2 Probenaufarbeitung und immunhistologisches Verfahren

Die Kältekonservierung histologischen Materials hat den Vorteil, daß gesuchte Antigene im wesentlichen unverändert in dem Gewebe bewahrt werden. Dies wird allerdings mit den Nachteilen des Einfrierens erkauft. Die vermehrte Bildung von Eiskristallen bei einer zu geringen Einfriergeschwindigkeit bedeutet oft den Verlust

der morphologischen Integrität. Dies machte sich im histologischen Schnitt vom Auftreten einiger bienenwabenartiger Bezirke bis hin zum vollständigen Verlust des Objektes bemerkbar. Mit Gefrierartefakten behaftete Bezirke der histologischen Schnitte waren meist stark unspezifisch immunpositiv und somit für die Auswertung unbrauchbar. Unter diesem Aspekt stellte sich die Geschwindigkeit des indirekten Herunterkühlens in einem 2-Methylbutan-Bad, dessen Wärmeenergie durch flüssigen Stickstoff abgeleitet wurde, als nicht in jedem Fall tauglich heraus. Alternativ kann ein Objekt auch direkt in stickstoffgekühltes 2-Methylbutan eingebracht werden. Danach wird mit OCT-Tissue-Tek überschichtet und erneut schockgefroren. Allerdings wurde die äußere Schicht durch den Kontakt mit dem Kohlenwasserstoff für die Immunhistologie unbrauchbar. Dadurch eignet sich dieses Verfahren nur für große Objekte.

Unfixiert konserviertes Material wird unmittelbar vor der immunhistologischen Behandlung - meist aufgezogen auf einen Objektträger - fixiert. Dazu wird der in einem Kryotom gewonnene Gewebeschnitt auf einem OT aufgetaut und in der Regel getrocknet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß einige Antikörper in ihrer Immunreaktion eingeschränkt waren, wenn man den Schnitt vor der Fixierung einer Trocknung unterzog. Dies wurde allerdings mit sehr schlechten Hafteigenschaften erkaufte, die bis zum Totalverlust des Gewebeschnittes im Laufe des immunhistologischen Prozesses reichten. Eine weitere Besonderheit war der Verlust der immunpositiven Reaktion einiger Antikörper durch das Ablüften

des koagulierenden Fixativs vor der Weiterbearbeitung. Durch ihre starke unspezifische Antikörperreaktionen in Kombination mit schwacher spezifischer Färbung der eingesetzten Primärantikörper eignete sich die Fixierung mit quervernetzenden Fixativa nicht für die quantitative Analyse; diese ist auf kontrastreiche Objekte angewiesen. Als Fixierungsmedium für Gewebeschnitte von caninem Gelbkörper war Azeton ungeeignet, ganz im Gegensatz zu Milzgewebe (BAUMGÄRTNER, 1993). Die Zellen zeigten starke Schrumpfung und lösten sich von der Glasunterlage ab. Methanolfixiertes Gewebe hatte nicht diese negativen Eigenschaften, zeigte aber eine starke unspezifische Hintergrundaktivität, so daß letztlich eine 1:1 Mischung dieser beiden koagulierenden Fixativa verwendet wurde.

Die gesuchten Epitope wurden mittels der hinreichend etablierten ABC-Methode (BAUMGÄRTNER, 1993) immunhistologisch angefärbt. In umfangreichen Vorversuchen wurde das System abgestimmt und für den Hauptversuch standardisiert. Negativ- und Positivkontrollen des eingesetzten Primärantikörpers und des sekundären Detektionssystems begleiteten die immunhistologischen Chargen und stellten so die Vergleichbarkeit sicher.

6.1.3 Eingesetzte Antikörper

Die Antikörper gegen canine Leukozytenmarker CD4 und CD8 sowie MHC-II sind im „first international canine leukocyte antigen workshop“ charakterisiert worden (COBBOLD und METCALFE, 1994) und wurden bei jeder immunhistologischen Charge mittels

der Positivkontrolle Milz verifiziert, so daß von spezifischen Färbereaktionen ausgegangen werden kann.

Neben T-Lymphozyten markierte der Antikörper gegen das canine CD4 Epitop auch Makrophagen. Im Gegensatz zu den Angaben von MOORE et al. (1992) konnten jedoch keine neutrophilen Granulozyten aufgezeigt werden. Auch von BUKOVSKÝ et al. (1995) beim Menschen dargelegte CD4⁺ Markierung von alten Lutealzellen konnte beim Hund nicht nachvollzogen werden. Die CD4⁺ Gebilde in der Cortex der Ovarien, die ebenfalls von dem anti MHC-II-Antikörper erkannt wurden, sind als Makrophagen, beladen mit Hämosiderin, anzusehen. Die braune Anfärbung dieser Zellen in den H&E Schnitten unterstreicht dieses.

Durch den anti canin-MHC-II Antikörper wurden verschiedene MHC-II Molekül exprimierende Zelltypen des Gelbkörpers angefärbt, wozu neben den Makrophagen bestimmte T-Lymphozyten, APC's (Fibroblasten), Gefäßendothelien und auch Lutealzellen zählen (PATE, 1996; ROITT et al., 1996). Im Gegensatz zu Beobachtungen beim Rind (PATE, 1996), der Ratte (BRÄNNSTRÖM et al., 1994) und beim Menschen (BUKOVSKÝ et al., 1995) waren in den vorliegenden Untersuchungen die Lutealzellen nur undeutlich positiv. Eine Trennung in einzelne Zelltypen war nicht eindeutig möglich.

Die Spezifität des Antikörpers gegen humanes Endoglin wurde nicht mit anderen Techniken nachgewiesen. Zwar reagierte dieser Antikörper mit dem Bindegewebe der Ovarcortex, ließ aber Granu-

losazellen explizit ungefärbt. Daraus lässt sich keine unerwünschte Kreuzreaktion interpretieren.

Mikrovaskuläre endotheliale Zellen exprimieren von Willebrand-Faktor (BAGAVANDOSS und WILKS, 1991); dessen Nachweis ist somit als Positivkontrolle der Färbung mit dem anti-Endoglin Antikörper geeignet: Der von Willebrand-Faktor Antikörper markierte im Gelbkörper des Hundes die gleichen bandförmigen und runden Strukturen, die auch mit dem Antikörper gegen humanes Endoglin gekennzeichnet wurden. Die Anfärbung von Endothelzellen der Gefäße mit diesem Antikörper (GOUGOS und LETARTE, 1990) und die laufende Kontrolle durch eindeutig anzusprechender Gefäße im Corpus luteum unterstreichen die Spezifität von Endoglin.

6.1.4 Auswertungsverfahren

Die Histologie beschreibt die Gewebe des Körpers. Durch die Einführung der immunhistologischen Darstellung spezifizierter Epitope, kann ein subjektiver Eindruck der dargestellten Menge festgehalten werden. Standardisierte, semiquantitative Analysesysteme liefern statistische Daten. Genauigkeit und Reproduzierbarkeit lassen sich nur über die computergestützte Auswertung der Gewebeschnitten (CAVIA: computer-assisted video image analysis) erreichen. Durch Eichung der Anlage mit immer den gleichen, standardisierten Objekten wurde eine technische Umgebung geschaffen, die reproduzierbare Ergebnisse lieferte (BAUMGÄRTNER et al., 1992). Versuchsreihen in den Vorversuchen

belegen die statistische Sicherheit für die automatische Zählung der CD4⁺ Zellen und der Flächenmessung. In 10 Gesichtsfeldern mit CD4⁺ Zellen wurden manuell 32,13 Zellen/mm² gezählt, während das Auswerteprogramm „ImageTool“ 32,59 Zellen/mm² erkannte, siehe hierzu Tabelle 8 auf S. 102. Zur Verifizierung der Genauigkeit der Flächenmessung wurde eine Lutealfläche mit einem Variationskoeffizient von 0,83% 12 mal ausgemessen (Details in Tabelle 9 auf S. 103).

Zur Quantifizierung der optische Dichte der Immunreaktion (Kürzel: Endoglin-G und MHC-II-G) wurde der mittlere Grauwert der negativen Bezirke (Hintergrund) von dem des ausgewerteten Objektes abgezogen; so erhält man die mittlere optische Dichte der Immunreaktion. Der mittlere Grauwert stellt somit den Quotienten aus der Summe der Pixelgrauwerte und der Pixelanzahl dar. Die so gewonnenen absoluten Zahlen sind proportional zur Immunreaktion des eingesetzten Antikörpers (vgl. BASGEN et al., 1989; BROWN, 1990), da die unspezifische Immunreaktionen herausgerechnet wurden.

Zur Flächenquantifizierung des positiven Immunpräzipitats (Kürzel Endoglin-F und MHC-II-F) wurde ein in Vorversuchen ermittelter Grauwertvektor konsequent in allen Messungen angewendet.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Ruptur des Follikels folgt eine massive Invasion von Blutgefäßen. Endothelien sind die ersten dauerhaften Kontaktzellen für das Immunsystem im sich formierenden Corpus luteum und zeigen unter Umständen gewebespezifische Antigene der für das Immunsystem neu auftretenden Lutealzellen. Gleichzeitig wird die - beim Hund schon vor der Ovulation einsetzende - Progesteronproduktion angefahren. Progesteron stimuliert autokrin die luteale Funktion bei der Ratte (TANAKA et al., 1993) und beeinflusst die lokal residierenden und einwandernden Leukozyten z.B. beim Menschen (MORI et al., 1989). Die eigenen Untersuchungen mit den hohen CD4, CD8 und MHC-II Werten am Tag 15 des caninen Gelbkörperzyklus unterstreichen die in der Literatur bisher dargestellten Vorkommen von Makrophagen und T-Lymphozyten in jungen Gelbkörpern vieler Spezies (vgl. hierzu BAGAVANDOSS et al., 1990). Diese Beobachtungen können ohne weitere Betrachtung als eine einsetzenden Immunantwort zu Beginn der Lutealphase interpretiert werden. Schon früh wurde die Bedeutung von Makrophagen für die Organisation des Gelbkörpers bei Ratte und Maus vermutet (BULMER, 1964, HUME et al., 1984). Immunzellen und ihre Cytokine wirken in jungen Corpora lutea luteotrop. So fördern Makrophagen die luteotrope Wirkung von LH; ihre TNF α Produktion ist mitverantwortlich für Gefäßwachstum bei der Ratte (LEIBOVICH et al., 1987, NAITO und TAKAHASHI, 1988). Dies zeigt sich in einem engem Zusammenhang zwischen Makrophagenzahl und TNF α Produktion in allen Stadien des Corpus

luteums beim Menschen (TERRANOVA et al., 1995). Dabei ist allerdings zu beachten, daß $TNF\alpha$ bei Mensch, Ratte und Rind in der späteren Lutealphase eine entgegengesetzte, d.h. hemmende Wirkung auf das Gefäßwachstum hat (AZIM und O'SHEA, 1984; ROBY und TERRANOVA, 1989). An Orten der Degeneration und des Gewebeabbaus sind Makrophagen beim Menschen auch in der frühen Lutealphase zu finden (BUKOVSKÝ et al., 1995). Ebenfalls ist die in jungen Gelbkörpern starke Expression von MHC-II Antigenen, wie in den eigenen Versuchen dargestellt, nicht unbedingt mit einer unmittelbaren Immunantwort gekoppelt. Zwar wird die Bereitstellung von MHC-II Molekülen auf der Oberfläche von vielen caninen Zelltypen durch $IFN\gamma$ z.B. aus Makrophagen gefördert (FULLER et al., 1992) und damit eine Immunantwort eingeleitet; dies wird aber beim Rind durch LH wiederum abgeschwächt (FAIRCHILD und PATE, 1989). Die Bedeutung von Leukozyten und MHC-II Antigenen in jungen Corpora lutea darf also nicht ausschließlich in der Folge des blutigen Prozesses der Ovulation und einer daraus resultierenden Immunantwort gesehen werden, sie sind vielmehr aktiv in Aufbau und Differenzierung des Gelbkörpers eingebunden. Es ist mithin nicht davon auszugehen, daß eine effiziente Suppression der Aktivitäten dieser Leukozytenpopulation in juvenilen Gelbkörpern luteotrop wirkt. Nach diesen Betrachtungen gesehen, müßte dies eher kontraproduktiv sein. Unzweideutig ist hingegen belegt, daß beim Rind eine verzögerte luteale MHC-II Expression den Übergang des CL cyclicum zum CL graviditatis begleitet (PATE 1996). Gerade das Antigen

MHC-II (und Gewebemakrophagen) zeigen hier eine dem Funktionszustand des Gewebes angepaßte, differenzierte Wirkung, was sich in dem triphasischen Verlauf der MHC-II Molekülexpression widerspiegelt. Offensichtlich etabliert sich hier eine selbsterhaltende positive Feedbackschleife zwischen steroidproduzierenden Lutealzellen und Immunzellen zur Förderung und Erhaltung des frischen Gelbkörpers. So ist aber leider in dieser Untersuchung keine Aussage drüber zu machen, welche Zellarten genau an diesem triphasischen Verlauf der MHC-II Expression vorherrschen bzw. teilnehmen; zumindest decken sich die Beobachtungen mit denen anderer Autoren (FUJIWARA et al., 1993, PENNY et al. 1999, . BUKOVSKÝ et al., 1995) und unterstreichen die Bedeutung des MHC-II Moleküls als einen der luteotropen und -lytischen Faktoren.

Die Zellen des Immunsystems können nur mittels eines effektiven Gefäßsystems mit ihren Effektorzellen kommunizieren. Ovarieller Blutfluß korreliert mit der lutealen Progesteronproduktion, woraus zu schließen ist, daß eine inadäquate luteale Funktion mit einer herabgesetzten Vaskularisation einhergeht. Es läßt sich also nicht ausschließen, daß zumindest beim Mensch eine herabgesetzte Blutversorgung eine gewisse Rolle bei der Luteolyse spielt (REYNOLDS et al., 1992). HAMEED et al. zeigten 1995 im regressiven humanen CL eine starke Population von CD8⁺ Zellen und von Makrophagen auf und wiesen diesen eine Hauptrolle in der Luteolyse bei der Frau zu. Andere Autoren fanden bei der Ratte während des Zyklus eine konstante, geringe Zahl von T-

Lymphozyten (BRÄNNSTRÖM et al., 1994). Sowohl BUKOVSKÝ et al. (1995) als auch PETROVSKA et al. (1992) wiesen T-Lymphozyten und Makrophagen im menschlichen Corpus luteum nach. Während PETROVSKA et al. (1992) die größte Dichte an Makrophagen um den Zeitpunkt der größten Progesteronsyntheseleistung erkannten, wiesen BUKOVSKÝ et al. (1995), zu anderen Spezies konform, die größte Makrophagendichte beim Menschen um den Zeitpunkt der Luteolyse nach. PETROVSKA et al. (1992) hatten ihren Untersuchungszeitraum offensichtlich zu kurz gewählt, da BUKOVSKÝ et al. (1995) auch CL nach dem 14. Tag des Menstruationszyklus untersucht hatten. Es ist offensichtlich, daß CD4⁺ Leukozyten nur in der frühen Gelbkörperphase in das Geschehen involviert sind, wie es das vorliegende Untersuchungsergebnis über die Verteilung der CD4⁺ Zellen im Laufe des Zyklus der Hündin demonstriert. Hingegen konnte, analog zu den Untersuchungen von HAMEED et al. (1995), auch in den eigenen Untersuchungen eine Invasion von CD8⁺ Lymphozyten in das alternde Corpus luteum aufgezeigt werden. Dies spiegelt sich in dem Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ wider, das sich gegen Ende der caninen Lutealphase von normalerweise 2:1 im Blut (GEBHARD und CARTER, 1992) stark zu Gunsten der CD8⁺ T-Lymphozyten verschiebt (1:1). Da bestimmte CD8⁺ T-Lymphozyten die Immunreaktion durch ihre sezernierten Cytokine auf ähnliche Weise wie CD4⁺ T-Zellen steuern können (CARTER und DUTTON, 1996) und beim Menschen der Kontakt zum MHC-II-Antigen nachgewiesen wurde (BLAND und WHITING, 1992), scheint nach den vor-

liegenden Untersuchungen der Einfluß bestimmter cytotoxischer T-Lymphozyten bei der Regression des caninen Gelbkörpers gesichert.

Auffällig ist, daß der anti Endoglin Antikörper Zellen der Makrophagen / Monozytenlinie ausschließlich in Verbindung mit Gefäßen nachgewiesen hat, während in der Literatur von einer über das gesamte Ovar diffusen Verteilung von Makrophagen berichtet wird (BUKOVSKÝ et al., 1995). Dies deckt sich auch mit eigenen Beobachtungen: Makrophagen, identifiziert anhand der Expression von MHC-II Antigen, wurden z.B. auch in der bindegewebigen Gelbkörperkapsel gefunden. Diese weist deutlich weniger Gefäße auf als Lutealgewebe; Endoglin ist in der bindegewebigen Kapsel so gut wie nicht nachweisbar und somit sind vermutlich beim Hund dort keine aktivierten Makrophagen zu finden, da diese beim Menschen Endoglin exprimieren (O'CONNELL, 1992). Die Vermutung liegt also nahe, daß aktivierte Makrophagen im Ovar tatsächlich nur in der Nähe von Gefäßen zu beobachten sind - ein weiterer Hinweis auf eine immunologische Komponente bei der Regression des Corpus luteums. Ab dem 30. Tag bleibt der endoglinpositive Flächenanteil (mit gegenüber dem Tag 15 deutlich niedrigerem Wert) nahezu konstant, obwohl das Corpus luteum erst um den 30. Tag seine Blüte erreicht hat. Ab dem 15. Tag verringert sich auch die Intensität der Immunreaktion nahezu linear. Dies weist darauf hin, daß in der Aufbauphase die Gefäßversorgung dem Aufbau der endokrinologische Komponente vorausseilt. Dies macht weiterhin deutlich, daß die Gefäßversor-

gung in der frühen Lutealphase eine größere Rolle spielt, als sie bei der Regression diskutiert wird (REYNOLDS et al., 1992). Man geht davon aus, daß bei vielen Spezies $\text{PGF}_2\alpha$ die zentrale luteolytische Rolle übernimmt. Bei der Ratte ist eine $\text{PGF}_2\alpha$ induzierte Luteolyse vom Luteotropin Prolactin unabhängig. Nach einer funktionellen Luteolyse ist bei dieser Tierart Prolactin in der Lage, in Verbindung mit der Aktivierung des Immunsystems die strukturelle Luteolyse einzuleiten (BJURULF et al., 1998). Unter diesem Aspekt ist der Anstieg der caninen PRL-Produktion im letzten Drittel des Diöstrus bzw. der Gravidität nicht alleine als Vorbereitung und Aktivierung der Körperfunktionen und Verhaltensweisen der Hündin für die postpartalen Phase zu sehen. Auch die Rolle als Luteotropin im caninen Sexualzyklus könnte differenzierter erscheinen. Den luteotropen Eigenschaften von Prolactin könnten durch die Aktivierung des Immunsystems bei fortschreitender funktioneller Luteolyse eine antagonistische Wirkungsweisen zugerechnet werden. Ein Luteolysin uteriner Herkunft ist bei der nicht graviden Hündin auszuschließen (HOFFMANN et al., 1992). Die exogene Zufuhr von Prostaglandin in pharmakologischen Dosen verursacht auch die Regression des caninen Gelbkörpers. Kurz ante partal zeigt auch die gravide Hündin eine luteale $\text{PGF}_2\alpha$ Empfindlichkeit, die offensichtlich nicht nur im Zusammenhang mit der Vorbereitung der Geburt steht und auch einen gewissen luteolytischen Faktor beinhaltet (RIESENBECK, 1997). $\text{PGF}_2\alpha$ wirkt weniger durch Vasokonstriktion luteolytisch (WILT BANK et al., 1988), als vielmehr durch direkte Zytotoxizität gegenüber En-

dothelien (BRADDEN et al., 1988). Dieser direkte Ansatz eines Luteolysins an den Endothelzellen des Gelbkörpers findet somit ohne Beteiligung des Immunsystems statt (AZIM und O'SHEA, 1984).

Aus den untergehenden mit MHC-II Markern ausgestattete Endothelien werden Cytokine zu einer Aktivierung des Immunsystems freigesetzt. Offensichtlich neigen $CD8^+$ T-Lymphozyten zu einem von den regulären Mechanismen des Immunsystems abweichenden Verhalten, da sie beim Menschen in Kontakt mit MHC-II Antigen beobachtet wurden (BLAND und WHITING, 1992). Dies wird durch die Zunahme der Makrophagen zur Luteolyse hin unterstrichen. Einige Autoren sehen ihre Rolle hingegen hauptsächlich in der Phagozytose zellulären Debris, also in der strukturellen Luteolyse (HEHNKE et al., 1994; TAKAYA, et al., 1997). Es ist somit nicht auszuschließen, daß sich sowohl Makrophagen als auch $CD8^+$ Lymphozyten um MHC-II präsentierende und Cytokine ausschüttende Endothelien bemühen. Makrophagen werden dabei aktiviert und schütten zusammen mit den $CD8^+$ Zellen ihrerseits Botenstoffe, z.B. $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ aus, während die zytotoxischen T-Lymphozyten direkt zellschädigend agieren. $IFN\gamma$ verstärkt die MHC-II Präsentation auf bovinen Lutealzellen (FAIRCHILD und PATE, 1989, FULLER et al., 1992), während $TNF\alpha$ menschliche Endothelzellen direkt angreifen kann (AZIM und O'SHEA-J, 1984). Die Invasion von Immunzellen in das CL, die verstärkte Expression von MHC-II Antigen auf den Gelbkörperzellen sowie die gleichzeitige Regression der lutealen Vaskularisation ist ver-

gleichbar mit der Situation, wie sie in der Transplantationsmedizin bei der Abstoßung von fremden Gewebe vorkommt (BUKOVSKÝ et al., 1995). Dieser Situation liegt vermutlich ein circulus vitiosus aus Gefäßendothelien, Lutealzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten und den Mediatoren $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ zugrunde. Die Expression von MHC-II Antigen auf der Oberfläche von Lutealzellen, unter Umständen durch $IFN\gamma$ induziert, stellt somit eine Schnittstelle von Immun- und endokrinologischem System dar. Das bewährte Schema der Erkennung von „selbst“ und „nicht-selbst“ ist daher einer genaueren Betrachtung zu unterziehen. Es liegt nahe, daß ein auf den Funktionszustand des Gelbkörpers angepaßtes System der Regulation auf Zellebene vorliegt, wobei ein und derselbe Faktor ganz unterschiedliche Wirkungen haben kann. Fraglich bleibt, wann und warum es zu einem Umschalten von proliferativen zu degenerativen Prozessen kommt. Hierbei ist von einem fließenden Übergang auszugehen, da die gleichen Faktoren an beiden Prozessen zur selben Zeit beteiligt sind. Ab einem gewissen Zeitpunkt innerhalb der Gelbkörperphase überwiegen luteolytische Prozesse oder werden drüber hinaus zugeschaltet. Die Beteiligung von Immunzellen an der funktionellen lutealen Regression scheint sichergestellt.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und verschiedene Leukozytenmarker im Corpus luteum der Hündin immunhistochemisch nachzuweisen. Dies sollte in Abhängigkeit verschiedener Zyklusstadien geschehen: Hündinnen wurden an den Tagen 15, 30, 45, 60 und 75 nach dem Sprung des Plasmaprogesteronspiegels über 5ng/ml ovariohysterektomiert. Die gewonnenen Gelbkörper wurden für die Immunhistochemie schockgefroren. Bis auf anti Endoglin, eigneten sich alle heterologen Primärantikörper nicht zur zweifelsfreien Darstellung der gesuchten Moleküle. Zum Erfolg geführt werden konnten Antikörper gegen folgende canine Epitope: CD4, CD8, MHC-II und Endoglin. Die Stärke der Immunreaktion des Antikörpers gegen MHC-II und Endoglin wurde durch den Computer erfaßt (CAVIA: Grauwerte und Flächenanteile der Immunreaktion). Die Zahl der durch anti CD4⁺ markierten Leukozyten wurde durch den Computer erhoben, die der CD8⁺ Lymphozyten von Hand. MHC-II Epitope färbten sich im jungen und alten Gelbkörper (Tage 15 und 75) hoch signifikant gegenüber den übrigen Tagen stärker an. Endoglin ist differenzierter zu betrachten: Sein Flächenanteil ist am Tag 15 am größten, während die Stärke der Immunreaktion kontinuierlich zum Tag 75 hin abnimmt. An den Tagen 15 und 60 wurden 6,5, respektive 7,3 CD8⁺ Zellen je mm² gezählt, während an den übrigen Tagen die Werte zwischen 2,5 und 4,6 Zellen je mm² lagen. Mit 21,6 am Tag 15 und zwischen 6,6 und 8,7 Zellen je mm² wurden CD4⁺ T-Lymphozyten ausgezählt. Das Verhältnis

von CD4⁺ zu CD8⁺ Lymphozyten glich sich vom Tag 15 mit einem starken Überschuß an CD4⁺ Zellen (3,4) bis zum Tag 60 aus, um dann gegen Ende des Zyklus annähernd Werte wie im Blute zu erreichen (2,5). Endoglinpositive (aktivierte) Makrophagen waren nur an Gefäßen zu beobachten. Als MHC-II positive Zellen stellten sich dar (ohne ihre Gewichtung innerhalb der Gruppe erhoben zu haben): Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelien und APC. Dem MHC-II Molekül kommt zusammen mit Makrophagen eine wesentliche Rolle sowohl beim Aufbau, als auch bei der Regression des Corpus luteums zu. Die Beteiligung zytotoxischer T-Lymphozyten an der Luteolyse scheint gesichert. T-Helferzellen sind offenbar nur in der frühen Lutealphase entscheidend beteiligt. Die Rolle des Gefäßsystems bei der Luteolyse ist bisher offensichtlich in der Literatur überschätzt worden. Gerade die Interaktion von Makrophagen, MHC-II Molekül und CD8⁺ T-Lymphozyten mit Gefäßendothelien und Lutealzellen sowohl bei Auf- als auch bei Abbau des caninen Corpus luteums bedarf näherer Betrachtungen, v.a. hinsichtlich der wahrscheinlich grundlegend beteiligten Cytokine IFN γ und TNF α .

8 SUMMARY

Immunohistochemical evidence of leukocytes, MHC-II antigen and vascular endothels in the canine corpus luteum at different stages of cycle

This investigation has the following objectives: Detection of growth factors, their receptors and leukocyte subsets at different stages of canine corpus luteum development.

Ovaries from bitches were taken at day 15, 30, 45, 60 and 75 after an increase of plasma progesterone above 5ng/ml and prepared for immunohistochemical detection. All heterologeous antibodies, except Endoglin, were not suitable for precise detection of their targets. Proper results could be obtained from the following antibodies: anti canine CD4, anti canine CD8, anti canine MHC-II and anti human Endoglin. Computer-assisted video image analysis (CAVIA) was used to determine the strength of the immunohistochemical reaction of MHC-II and endoglin antibodies by using grey scale pictures. Same pictures were also used to get the occupied area of immunreaction. CD8 positive leukocytes were counted manually and CD4 positive leukocytes through computer image processing. MHC-II epitope expression was significantly elevated on days 15 and 75. Endoglin has to be described in a different manner: The immunpositive area peaked at day 15 whereas immunstrength decreased continuously from day 15 on. Cytotoxic T-lymphocytes (CD8⁺) were highest on day 15 and 60 (6.5 and 7.3) and on the other days between 2.5 and 4.6 cells per mm². The highest number of CD4 positive cells was counted on day 15

(21.6) whereas the figure for the remaining days was between 6.6 and 8.7 cells per mm². Following a start ratio of 3:4 on day 15 the CD4 / CD8 ratio balanced at day 60 (1:1) and was 2.5:1 at day 75. Endoglin marked activated macrophages could only be observed along blood vessels. Following cells were MHC-II positive (without checking their distribution within their group): macrophages, T-lymphocytes, endothelial cells and antigen presenting cells. Macrophages and the MHC-II antigen seem to play a major role in establishment and regression of the canine corpus luteum. Also cytotoxic T-lymphocytes seem to participate at luteal regression, whereas CD4⁺ cells are only involved in the early luteal phase. From our data it may be concluded that the effects of vascularisation in luteolysis seems to be overestimated. Further research should therefore concentrate on the interaction of macrophages, MHC-II antigen and cytotoxic lymphocytes with endothelial and luteal cells in the freshly developing and regressing corpus luteum, especially in the focus of the involvement of the cytokines IFN γ and TNF α .

9 LITERATURVERZEICHNIS

ADASHI-EY, RESNICK-CE, HERNANDEZ-ER, MAY-JV, PURCHIO-AF, TWARDZIK (1989)

Ovarian transforming growth factor-beta (TGF β): cellular site(s), and mechanism(s) of action.

Molecular and Cellular Endocrinology 61, 247-56.

ADASHI-EY (1990)

The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series.

Endocrine Reviews 11, 454-464.

ALM-GV (1987)

Lymphokines in the regulation of immune response.

Veterinary Immunology and Immunopathology 17, 173-182.

ANDERSEN-A, SIMPSON-ME (1973)

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

GERON-X, Inc, Los Altos, California.

ASSOIAN-RK (1984)

Macrophages secrete TGF β .

Proceedings of the National Academy of Science of the USA 84, 6020.

AZIM-TI, O'SHEA-JD (1984)

Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of corpus luteum.

Laboratory Investigation 51, 206-217.

BAGAVANDOSS-P, WIGGINS-RC, KUNKEL-SL, KEYES-PL (1988)

Localisation of macrophages and T lymphocytes and induction of TNF α in corpora lutea of pregnant and pseudo pregnant rabbits.

Biology of Reproduction 38, 56.

-
- BAGAVANDOSS-P, WIGGINS-RC, KUNKEL-SL, REMICK-DG, KEYES-PL (1990)
TNF α production and accumulation of inflammatory cells in corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits.
Biology of Reproduction 42, 367-376.
- BAGAVANDOSS-P, WILKS-JW (1991)
Isolation and characterisation of microvascular endothelial cells from developing corpus luteum.
Biology of Reproduction 44, 1132-1139.
- BASGEN-J, NEVINS-T, MICHAEL-A (1989)
Quantitation of antigen in tissue by immunofluorescence image analysis.
Journal of Immunological Methods 124, 77-83.
- BAUMGÄRTNER-W, ATZPODIEN-E, WEINTRAUT-H, SEIBOLD-G (1992)
Factors influencing computer-assisted video image analysis of immunocytochemically stained lymphocytes and macrophages in the spleen of mice.
Journal of Immunological Methods 151, 309-312.
- Baumgärtner-W (1993)
Histologische Und Immunhistologische Untersuchungen von Balb/cJ (H-2^d)-Mäusen nach Infektion mit *Coxiella burnettii*.
Habil. vet. med. Gießen.
- BJURULF-E, TOFFIA-O, SELSTAM-G, OLOFSSON-J (1998)
Luteolysis induced by a PGF 2α occurs independently of prolactin in the rat.
Biology of Reproduction 59, 17-21.
- BLAND-PW, WHITING-CV (1992)
Induction of MHC class II gene products in intestinal epithelium during graft-versus-host disease and effects on the immune function of the epithelium.
Immunology 75, 366-371.

- BOTTAZZO-GF, PUJOL-BORREL-R, HANAFUSA-T, FELDMAN-R (1983)
Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity.
The Lancet ii, 1115-1118.
- BRÄNNSTRÖM-M, GIESECKE-L; MOORE-IC; VAN DEN HEUVEL-CJ; ROBERTSON-SR (1994)
Leukocyte subpopulation in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy.
Biology of Reproduction 50, 1161-1167.
- BRADEN-TD, GAMBONI-F, NISWENDER-D (1988)
Effects of PGF 2α induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum.
Biology of Reproduction 32, 245.
- BROWN-A (1990)
Combined immunocytochemical staining and image analysis for the study of lymphocyte specificity and function in situ.
Journal of Immunological Methods 130, 111-121.
- BRUSTMANN-H, RISS-P, NAUDE-S (1997)
The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumours of the ovary: a quantitative histologic study.
Gynecology and Oncology 67, 20-26.
- BULMER-D (1964)
The histochemistry of ovarian macrophages in the rat.
Journal of Anatomy (1964) 98: 313-319
- BUKOVSKÝ-A, PRESL-J (1991)
Cell mediated and neural control of morphostasis.
Medicine Hypotheses 36, 261-268.
- BUKOVSKÝ-A, CAUDLE-MR, KEENAN-JA, WIMALASENA-J, UPADHYAYA-NB, VAN METER-SE (1995)
Is corpus luteum regression an immune-mediated event? Localisation of immune system components and LH receptor in human corpora lutea.
Biology of Reproduction 53, 1373-1384.

CARTER-LL, DUTTON-RW (1996)

Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets.

Current Opinion of Immunology 8, 336-42.

CHAKRABORTY-PK (1987)

Reproductive hormone concentrations during estrus, pregnancy and pseudopregnancy in the labrador bitch.

Theriogenology 27, 827-840.

CHEIFETZ-S, BELLON-T, CALES-C, VERA-S, BERNABEU-C, MASSAGUE-J, LETARTE-M (1992)

Endoglin is a component of the TGF β receptor system in human endothelial cells.

Journal of Biological Chemistry 267, 19027-19030.

CHRISTIANSEN-IB (1984)

Reproduction in the dog.

In: Reproduction in the dog and cat.

Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Toronto, pp. 3-221.

COBBOLD-SP, METCALFE-S (1994)

Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the first international canine leukocyte antigen workshop (CLAW).

Tissue Antigens 43, 137-147.

CONCANNON-PW, POWERS-ME, HOLDER-W, HANSEL-W (1977a)

Pregnancy and parturition in the bitch.

Biology of Reproduction 16, 517-526.

Concannon-PW, Hansel-W, Mcentree-K (1977b)

Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch.

Biology of Reproduction 17, 604-613.

CONCANNON-PW (1986)

Canine physiology of reproduction.

Small animal reproduction and infertility; BURKE-TJ, Lea & Febiger, Philadelphia, 23-77.

CONCANNON-PW, MCCANN-JP, TEMPLE-M (1989)

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

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 39, 3-25.

CONCANNON-PW (1993)

Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs.

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 47, 3-27.

DIXON-WJ (1993)

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2.

University of California Press, Berkley, Los Angeles, London.

DOVEREN-RF, BUURMAN-WA, SCHUTTE-B, GROE-NEWEGEN-CJ, VAN DER LINDEN-CJ (1985)

Class II antigens on canine T lymphocytes.

Tissue Antigens 25, 255-265.

EMI-N, KANZAKI-H, TAKAKURA-K, KARIYA-M, OKAMOTO-N, IMAI-K, MORI-T (1991)

Lymphocytes stimulate progesterone production by cultured human granulosa luteal cells.

American Journal of Obstetrics and Gynecology 65, 1469-1474.

EVANS-HM, COLE-HH (1931)

An introduction to the study of the oestrus cycle in the dog.

Manifest University of California 2, pp. 65-103.

FAIRCHILD-DL, PATE-JB (1989)

IFN γ induction of MHC antigens on cultured bovine luteal cells.

Biology of Reproduction 40, 453-457.

FAIRCHILD-BENYO-DF, PATE-JL (1992)

TNF α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability.
Endocrinology 130, 854-860.

FELDMAN-EC und NELSON-RW (1987)

Canine and female reproduction.
Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, WB
Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 399-480

FERNANDEZ-PA, BOWEN-RA, KOSTAS-AC, SAWYER-HR,
NETT-TM, OLSON-PN (1987)

Luteal function in the bitch: Changes during diestrus in pitui-
tary concentration and the number of luteal receptors for lu-
teinizing hormone and prolactin.
Biology of Reproduction 37, 804-811.

FUJIWARA-H, UEDA-M, IMAI-K (1993)

Human leukocyte antigen-DR is a differentiation antigen for
human granulosa cells.
Biology of Reproduction 49, 705-715.

FUKUOKA-M, YASUDA-K; FUJIWARA-H; KANZAKI-H; MORI-T
(1992)

Interactions between IFN γ , TNF α , and IL-1 in modulating pro-
gesterone and estradiol production by human luteinized
granulosa cells in culture.
Human Reproduction 7, 1361-1364.

FULLER-L, FERNANDEZ-J; ZHENG-S; CARRENO-M;
ESQUENAZI-V; YANG-WC; MILLER-J (1992)

Immunochemical and biochemical characterisation of purified
canine IFN γ .
Transplantation 53, 195-202.

FULLER-ESPIE-SL, MURPHY-GA, BRETT-SJ, LECHLER-RI
(1997)

Quantitative but not qualitative variation in MHC class II alters
CD4 interaction and influences T cell repertoire formation.
Cellular Immunology 10, 49-61.

GEBHARD-DH, CARTER-PB (1992)

Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies.

Veterinary Immunology and Immunopathology 33(3),187-199.

Gerres-S (1991)

Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der Pseudogravidität der Hündin.

Dissertation vet. med. Gießen.

GOUGOS-A, LETARTE-M (1990)

Primary structure of Endoglin, a RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells.

The Journal of Biological Chemistry 265, 8361-8364.

GOWN-AM, WEVER-N de, BATTIFORA-H (1993)

Microwave-based antigenic unmasking.

Applied Immunohistochemistry 1, 256-266.

GRÄF-KJ (1978)

Serum estrogen and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs.

Journal of Reproduction and Fertility 52, 9-14.

HAMEED-A, FOX-WM; KURMAN-RJ; HRUBAN-RH; PODACK-ER (1995)

Perforin expression in human cell-mediated luteolysis.

International Journal of Gynecological Pathology 14, 151-157.

HEHNKE-KE, CHRISTENSON-LK; FORD-SF; TAYLOR-M (1994)

Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during PGF₂ α -induced luteolysis.

Biology of Reproduction 50, 10-15.

HILL-JA, WELCH-WR, FARIS-HM, ANDERSON-DJ (1990)

Induction of MHC-II antigen expression in human granulosa cells by IFN γ : A potential mechanism contributing to autoimmune failure.

American Journal of Obstetrics and Gynecology 162, 534-540.

- HOFFMANN-B, KYREIN-HJ, ENDER-ML (1973)
An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Hormone Research* 4, 302-310.
- HOFFMANN-B, HÖVELER-R, HASAN-SH, FAILING-K (1992)
Ovarian and pituitary function in the dog following hysterectomy. *Journal of Reproduction and Fertility* 96, 837-845.
- HOFFMANN-B, SCHNEIDER-S (1993)
Secretion and release of LH during the luteal phase of the estrous cycle in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 47, 85-91.
- HOFFMANN-B, RIESENBECK-A, KLEIN-R (1996)
Reproductive endocrinology of the bitch. *Animal Reproduction Science* 42, 275-288.
- HOLST-PA, PHEMISTER-RD (1975)
Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch. *American Journal of Veterinary Research* 36, 705-706.
- HSU-SM, RAINE-L, FANGER-H (1981)
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29, 577-580.
- HUME-DA, HALPIN-D, CHARLTON-H, GORDON-S (1984)
The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 81, 4174.
- ITO-S, KARNOWSKY-JM (1968)
Formaldehyde-glutaraldehyde-trinitro fixation (yellow fix). *The Journal of Cell Biology* 39, 168-169a.

KENNY-N (1991)

Signaling Mechanisms and Gene Expression in the Ovary.
(ed. GIBORI-E), Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

KIRSCH-TM, FRIEDMAN-AC, VOGEL-RL, FLICKINGER-GL (1981)

Macrophages in the corpora lutea of mice: Characterisation and effects on steroid secretion.
Biology of Reproduction 25, 629-638.

LANGE-K, GÜNZEL-APEL-A, HOPPEN-H, MISCHKE-R; NOLTE-I (1997)

Effects of low doses of PGF₂α during the early luteal phase before and after implantation in beagle bitches.
Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 51, 251-257.

LEI-ZM, CHEGINI-N, RAO-CV (1991)

Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states.
Biology of Reproduction 44, 1148-1156.

LEIBOVICH-SJ, POLVERINE-PJ, SHEPARD-HM, WISEMAN-DM, SHIVLEY-V, NUSEIR-N (1987)

Macrophage induced angiogenesis is induced by TNFα.
Nature 329, 630-632.

LEIN-D, CONCANNON-P, HORNBUCKLE-WE, GILBERT-R, GLENDENING-JR, DUNLAP-HL (1989)

Termination of pregnancy in bitches by administration of PGF₂α.
Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 39, 231-240.

LEONG-A, MILIOUS-J (1993)

An assessment of the efficacy of the microwave antigen-retrieval procedure on a range of tissue antigens.
Applied Immunohistochemistry 1, 267-274.

-
- LOPEZ-CASTILLAS-F, CHEIFETZ-S, DOODY-J, ANDRES-JL, LANE-WS, MASSAGUÉ-J (1991)
Structure and expression of the membrane proteoglycan heparan sulfate proteoglycan, a component of the TGF β receptor system.
Cell 67, 785-795.
- MASSAGUE-J (1990)
The TGF β Family.
Annual Reviews of Cellular Biology 6, 597-641.
- MATIS-LA, JONES-PP, MURPHY-DB, HEDRICK-SM, LERNER-EA, JANEWAY-CA, MCNICHOLAR-JM, SCHWARTZ-RH (1982)
Immune response gene function correlates with the expression of Ia antigen.
Journal of Experimental Medicine 155, 508-511.
- MATSUYAMA-S, SHIOTA-K, TAKAHASHI-M (1990)
Possible role of TGF β as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell culture.
Endocrinology 127, 1561-7.
- MATSUYAMA-S, TAKAHASHI-M (1995)
Immunoreactive transforming growth factor (tgf)-beta in rat corpus luteum: ir-tgf beta is expressed by luteal macrophages.
Endocrine Journal 42, 203-217.
- MCDONALD-LE (1969)
Reproduction patterns of dogs.
In: Veterinary Endocrinology and Reproduction.
Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 377-385.
- MOORE-PF, ROSSITO-PV, DANILENKO-DM, WIELENGA-JJ, RAFF-RF, SEVERNS-E (1992)
Monoclonal Antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocytes subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils.
Tissue Antigens 40, 75-85.

- MORI-T, FUKUOKA-M, TAKAKURA-K (1989)
Regulation of steroidogenic function during luteinization.
Clinical Biological Research 294, 117-128.
- NABORS-LB, SONGU-MIZE-E, MIZE-RR (1988)
Quantitative immunocytochemistry using an image analyser.
II. Concentration standards for transmitter immunocytochemistry.
Journal of Neuroscience Methods 26, 25-34.
- NAFTALIN-DM, BOVE-SE, KEYES-PL, TOWNSON-DH (1997)
Estrogen withdrawal induces macrophage invasion in the rabbit corpus luteum.
Biology of Reproduction 56, 1175-1180.
- NAITO-K, TAKAHASHI-M (1988)
The effects of peritoneal macrophages on monolayered luteal cell progesterin secretion in the rat.
Endocrinology Japan 35, 439-446.
- NAPPI-C, GARGIULO-AR, CARLO-CD (1994)
The human luteal paracrine system: current concepts.
Journal of Endocrinological Investigations 17, 825-836.
- NISWENDER-GD, NETT-TM (1988)
The corpus luteum and its control.
In: The Physiology of Reproduction (KNOBIL-E, NEILL-J eds.), Raven Press, New York, pp. 489-525.
- O'CONNELL-PJ, MCKENZIE-A, FISICARO-N, ROCKMAN-SP, PEARSE-MJ, D'APICE-AJ (1992)
Endoglin: A 180kd endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule.
Clinical and experimental Immunology 90, 154-159.
- OKKENS-AC, BEVERS-MM, DIELMAN-SJ, WILLEMSE-AH, LUBBERINK-AA (1986)
Influence of hysterectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog.
Journal of Reproduction and Fertility 77, 187-192.

OLSON-PN, BOWEN-RA, BEHRENDT-MD, OLSON-JD, NETT-TM (1984)

Concentrations of progesterone and LH in the serum of diestrus bitches before and after hysterectomy.

American Journal of Veterinary Research 45, 149-153.

OLSON-PN, NETT-TM, BOWEN-RA, SAWYER-HR, NISWENDER-GD (1989)

Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility.

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 39, 27-40.

ONCLIN-K, VERSTEGEN-J (1997)

Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches.

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 51, 203-208.

PARNES-JR (1989)

Molecular function and biology of CD8 and CD4.

Advances in Immunology 44, 265-311.

PATE-JL, TOWNSON-DH (1994)

Novel local regulators in luteal regression.

Journal of Animal Science 72, 31-42.

PATE-JL (1996)

Intercellular communication in the bovine corpus luteum.

Theriogenology 45, 1381-1397.

PENNY-L, ARMSTONG-D, BRAMLEY-T, WEBB-R, COLLINS-R, WATSON-E (1999)

Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis.

Journal of Reproduction and Fertility 115, 87-96.

PETROVSKÁ-M, SEDLAK-R; NOUZA-K; PRESL-J; KINSKY-R (1992)

Development and distribution of the white blood cells within various structures of the human menstrual corpus luteum examined using an image analysis system.
American Journal of Reproductive Immunology 28, 77-80.

RABANAL-RM, FERRER-L, ELSE-RW (1995)

Immunohistochemical detection of canine leukocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissue.
Veterinary Immunology Immunopathology 47, 13-23.

REYNOLDS-LP, KILLILIA-SD, REDMER-DA (1992)

Angiogenesis in the female reproductive system.
The FASEB Journal 6, 886-892.

RIESENBECK-A (1997)

Untersuchungen über die Verfügbarkeit von LH bei ingraviden und graviden Hündinnen und zur Bedeutung des Regelfaktors PGF 2α für die Luteolyse im peripartalen Zeitraum.
Dissertation vet. med. Gießen.

ROBERTS-A, SPORN-MB, ASOIAN-RK, SMITH-JM, ROCHE-NS (1986)

TGF β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 83, 4167-4171.

ROBY-KF und TERRANOVA-PF (1989)

Localisation of TNF α in rat and bovine ovary using immunocytochemistry and cell blot: Evidence for granulosa production.
Growth factors and ovary. Editor: HIRSHFIELD-AN. Plenum Press, New York, 273-278.

ROITT-I, BROSTOFF-J, MALE-D (1996)

Immunology, 4. Auflage
Mosby; London, Baltimore, Barcelona, Bogotá, Boston, etc.

ROMEIS-B (1989)

Mikroskopische Technik.

Urban & Schwarzenberg, 17. Auflage.

SACHS-L (1992)

Angewandte Statistik, 7. Auflage.

Springer Verlag; Heidelberg.

STABENFELDT-GH, SHILLE-VM (1977)

Reproduction in the dog and cat.

In: Reproduction in Domestic Animals (eds: COLE-HH, CUPPS-PT), 3rd Ed

Academic Press, New York 3, pp. 499-527.

SAWYER-HR (1995)

Structural and functional properties of the corpus luteum of pregnancy.

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 49, 97-110.

SUZUKI-T, SASANO-H, TAKAYA-R, FUKAYA-T, YAJIMA-A, DATE-F, NAGURA-H (1998)

Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterisation.

Human Reproduction 13, 2186-2191.

TAKAYA-R, FUKAYA-T, SASANO-H, SUZUKI-T, TAMURA-M, YAJIMA-A (1997)

Macrophages in normal cycling human ovaries; immunohistochemical localisation and characterisation.

Human Reproduction 12, 1508-1512.

TANAKA-N, IWAMASA-J, MATSUURA-K, OKAMURA-H (1993)

Effects of progesterone and anti-progesterone RU486 on ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity during ovulation in the gonadotrophin-primed immature rat.

Journal of Reproduction and Fertility 97, 167-172.

TERRANOVA-PF, HUNTER-VJ; ROBY-KF; HUNT-JS (1995)

TNF α in the female reproductive tract.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 209, 325-342.

VICKERY-BH, BERGSTROM-K, HILLER-M, GOODPASTURE-JC (1987)

Effect of deterselix, a long acting LHRH antagonist, on luteal function and pregnancy in beagle bitches.

Biology of Reproduction, Supplement Abstracts 145, 297.

WANG-LJ, PASCOE-V, PETRUCCO-OM, NORMAN-RJ (1992)

Distribution of leukocyte subpopulation in the human corpus luteum.

Human Reproduction 7, 197-202.

WILTBANK-MC, DYSKO-KP, GALLAGHER-PL (1988)

Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum

Journal of Reproduction and Fertility 54, 513.

ZHANG-H, SHAW-A, MAK-A, LETARTE-M (1996)

Endoglin is a component of the TGF β Receptor complex of human pre-B leukemic cells.

Journal of Immunology 156, 565-573.

10 ANHANG

10.1 Als nicht spezifisch ausgetestete Antikörper

In Vorversuchen wurden verschiedene Antikörper gegen Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und Leukozytenmarker auf ihre Eignung zum Einsatz in der Immunhistologie auf Gewebe vom Hund untersucht. Die Antikörper sollten einwandfrei das gesuchte Epitop markieren und für die quantitative Analyse hinreichend kontrastreiche Ergebnisse liefern. In Tabelle 5 sind die überprüften Antikörper aufgelistet, die diesen Anforderungen nicht entsprechen:

Tabelle 5: Speziespezifität, Tierart, Isotyp sowie Bezugsquellen von Antikörper, die sich in Vorversuchen als nicht ausreichend spezifisch erwiesen

Antikörper	Spezies	Isotyp (Klon)	Bezugsquelle (Kürzel)
Anti CD3	human	pk rab	DAKO 0452 (3) ³
Anti CD45	human	mk mo IgG1 (X16/99)	Novocastra NCL-LCA (45) ¹
Anti CD45RO	human	mk mo IgG2 κ (UHL-1)	BioGenex 113M (45-2) ²
Anti CD5	canin	mk rat IgG2a (DOG17-4-8)	Vet-Pathologie (5) ³
Anti aFGF	bovin	pk rab	Upstate 06-101 (aF)
Anti aFGF	bovin	pk rab	Prof. Schams (aF2) ⁴
Anti bFGF	bovin	mk mo IgG1 κ (P3UI)	Upstate 05-118 (bF)

¹ freundlicherweise von Novocastra zur Austestung überlassen.

² von Biogenex dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt

³ dankenswerter Weise von Prof. Baumgärtner zur Verfügung gestellt.

⁴ von Prof. Schams, Weihenstephan als Geschenk erhalten.

Tabelle 5: Fortsetzung

Antikörper	Spezies	Isotyp (Klon)	Bezugsquelle (Kürzel)
Anti bFGF	bovine	pk rab	Prof. Schams (bF2) ⁴
Anti EGF	human	mk mo IgG1 (EGF-10)	Sigma E-2520 (EF)
Anti EGFR	human	mk mo IgG1 (29.1)	Sigma E-2760 (ER)
Anti FGFR	bovin	mk mo IgM (VBS1)	Chemicon MAB 125 (F)
Anti FGFR (flg)	human	mk mo IgG (VBS6)	Santa Cruz sc-276 (F2)
Anti IGF-IR	human	mk mo IgG1 (3B7)	Santa Cruz sc-462 (I)
Anti IGF-IR	human	mk mo IgG (α IR3)	Oncogene GR11 (I2)
Anti IGF-I	?	pk rab (6.11.91)	Prof. Schams (ICH) ⁴
anti IFN γ	human	pk rab	Serotec AHP253 (IFN)
anti Lysozym	human	pk rab	DAKO A0099 (L) ³
anti MHC-II	canin	mk rat IgG2a (YKIX.334.2.1)	Serotec MCA 1044 (M2)
anti Monozyten / Makrophagen	human	mk mo IgG (MAC387)	Serotec MCA874G (MM)
anti TGF α	human	mk mo IgG2a κ (213-4.4)	Oncogene GF-10 (TG)
anti TGF α	?	pk rab (2.8.95)	Prof. Schams (TG2) ⁴
Anti TGF α	human	pk schf	Calbiochem 619330 (TG3)
Anti TNF α	human	pk rab	Genzyme IP-300 (TN) ¹
Anti TNF α	Human	pk rab	Chemicon AB1400 (TN2)
Anti TNF α	?	pk rab (24.02.94)	Prof. Schams (TN3) ⁴

Die in obiger Tabelle 5 aufgelisteten Antikörper wurden in Vorversuchen nach verschiedenen Fixierungsmethoden der auf OT aufgezogenen Gewebeschnitte ausgetestet. Tabelle 6 stellt die bei

¹ freundlicherweise von Genzyme zur Austestung überlassen

den Antikörpern angewendeten Fixierungsmethoden dar, wobei folgender Schlüssel zu beachten ist:

A = Azeton; M = Methanol; AM = Azeton/Methanol Gemisch; PFA = Formalin 4%ig aus Paraformaldehyd; F/A = Formalin-Azeton Fixierung (siehe S. 25); F+BSA = Formalin plus 1% BSA; F+T = Formalin plus 0.1% TritonX100; F+A = Formalin und Azeton.

Tabelle 6: Fixierungsmethoden von Gelbkörpergefrierschnitten zum Einsatz bei verschiedenen Antikörpern

AK	eingesetzte Fixierungen
aF	A, AM, PFA
aF2	A, AM, PFA
bF	A, AM, PFA
bF2	A, AM, PFA
EF	A, AM, PFA
ER	A, AM, PFA
F	A, AM, PFA, Lillie
F2	A, AM
I	A, PFA, Lillie
I2	A, AM
ICH	A, AM
T	A, PFA, F+T, F+BSA, B7ouin, Yellow, M, Lillie, AM, F/A, F+A
TG	A, AM, PFA
TG2	A, AM
TG3	A, AM
IFN	A, AM, PFA
TN	A, AM, PFA
TN2	A, AM
TN3	A, AM
3	A, AM, PFA, Bouin
4	A, AM, PFA, Lillie, Bouin
45	A, AM
45-2	A
5	A
8	A, Lillie, AM, PFA, Bouin
L	A, AM
M	A, PFA, Lillie, AM
M2	A, AM
MM	A, AM, PFA
vWF	A

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine fehlende oder schlechte Immunreaktion eines Antikörpers nicht durch einen grundlegenden Wechsel des Fixierungsmediums hergestellt oder verbessert werden konnte. Letztlich hat sich das koagulierende Fixativ Azeton bzw. ein Gemisch aus Azeton und Methanol, bei allen Antikörpern, auch den nicht für den Hauptversuch herangezogenen, behaupten können. Lediglich leichte Abwandlung der Fixierungsprozedur, wie Dauer, Temperatur und Trocknung, waren für den Erfolg der späteren immunhistologischen Färbung relevant.

Folgend sind die Reaktionsmuster der verschiedenen Antikörper im Einzelnen aufgeführt:

pk rab anti rd aFGF, Upstate 06-101 (aF): Der Antikörper färbte alle Zellkerne.

rab anti rd aFGF Serum, Prof. Schams (aF2): s.o.

mk mo IgG anti rd bFGF, Upstate 05-118 (bF): Es wurden alle Zellen im Corpus luteum angefärbt, die Zellkerne dabei nur schwach.

rab anti rd bFGF Serum, Prof. Schams (bF2): Es wurde alles angefärbt

mk mo IgG1 anti hum EGF, Sigma E-2520 (EF): Das Färbemuster entspricht dem des Endoglin, allerdings wesentlich undeutlicher und kontrastärmer.

mk mo IgG1 anti hum EGF Rezeptor, Sigma E-2760 (ER): Es wurden in der Ovarikortex einige Zelleiber von Granulosazellen der Primärfollikeln schwach gefärbt.

mk mo IgG anti rd FGFR, Chemicon MAB 125 (F): Der Antikörper färbte, unabhängig von der Verdünnungsstufe, alle Zelltypen stark an, z.T. auch die Zellkerne. Um die Corpora lutea bandförmig herum aufgereihte Zellhaufen mit granulomatösem Inhalt reagierten ebenfalls stark positiv.

mk mo IgG anti hum FGFR, Santa Cruz sc-276 (F2): Dieser Antikörper färbte das gesamte Bindegewebszytoplasma incl. Gefäße, sowie schwach Zellkerne der Lutealzellen. Die Bindegewebsstränge im CL traten hervor.

mk mo IgG anti hum IGF-IR, Santa Cruz SC-462 (I): Granulosazellen (Membran und Cytoplasma) der Primärfollikel waren stark immunogen. Bei Sekundärfollikel war diese Färbung weniger ausgeprägt. Innerhalb des Corpus luteum kam es zu keiner Reaktion. Weiterhin zeigten sich Gefäßintima und – media stark positiv.

mk mo IgG anti hum IGF-IR, Oncogene GR11 (I2): Der Antikörper zeigte im Corpus luteum eine ausgeprägte Färbung von Kerne und Zytoplasma aller Zellen. In der Ovarkortex war dies nicht so ausgeprägt.

rab anti IGF-I Serum, Prof. Schams (IH): Der Antikörper färbte alle Zelltypen gleichmäßig an, wobei die Kerne stark positiv reagierten.

mk mo IgG anti hum TGF α , Oncogene GF10 (TG): Alle Zellen und Zellkerne färbten sich gleichmäßig an.

rab anti TGF α Serum, Prof. Schams (TG2): siehe wie vor.

pk schf anti hum TGF α , Calbiochem 619330 (TG3): siehe wie vor.

pk rab anti hum IFN γ , Serotec AHP253 (IFN): siehe wie vor.

pk rab anti hum TNF α , Genzyme IP-300 (TN): siehe wie vor, einzig die besonders starke Färbung von Granulosazellen war auffällig.

pk rab anti hum TNF α , Chemicon AB 1400 (TN2): siehe TG3

rab anti TNF α Serum, Prof. Schams (TN3): siehe wie vor.

pk rab anti hum CD3, DAKO A 0452: Die positive Immunreaktion hob sich, auch in den Kontrollen, nicht deutlich von der starken Hintergrundaktivität ab.

mk mo IgG1 anti hum CD45, Novocastra NCL-LCA (45): Dieser Antikörper zeigte keine Immunreaktion.

mk mo IgG2 α anti hum CD45RO, BioGenex 113M (45-2): Es wurden alle Zellkerne angefärbt.

mk rat anti hd CD5, Dog17 Vet-Pathologie: Keine Färbung auf den histologischen Schnitten der Ovarien. Die Positivkontrolle Milz färbte, trotz starker Hintergrundaktivität, eindeutig.

pk rab anti hum Lysozym, DAKAO A 0099 (L): Dieser Antikörper färbte alles auf dem histologischen Schnitt braun an.

mk mo anti hum Monozyten / Makrophagen, Serotec MCA874G (MM): Es zeigten sich unbeständig in einigen schwer definierbaren Zellbezirken verwaschene Reaktionen.

10.2 Tabellen

Tabelle 7: Einzelwerte der Streuungszerlegung (vier- / fünffaktorielle hierarchische Varianzanalyse).

	Hunde	Blöcke	Schnitte	GF
CD4	27.1%	24.0%	15.6%	
CD8	37.1%	17.0%	14.1%	
Endoglin-F	≈ 0	18.5%	11.7%	14.8%
Endoglin-G	3.05%	12.2%	20.7%	11.9%
Endoglin-Q	12.3%	18.7%	16.4%	14.1%
MHC-II-G	7.1%	11.6%	15.4%	
MHC-II-F	25.1%	33.2%	21.1%	
MHC-II-Q	22.9%	29.7%	11.4%	

GF: Gesichtsfelder

Tabelle 8: Statistische Sicherheit der automatische Zählung der CD4⁺ Zellen: Manuelle und Computerausählung im Vergleich.

GF	CD4/mm ² manuell	CD4/mm ² ImageTool
1	33.33	34.26
2	26.85	28.70
3	27.78	26.85
4	27.78	25.93
5	40.74	43.52
6	36.11	34.26
7	20.37	18.52
8	30.56	34.26
9	28.70	31.48
10	49.07	48.15
MW	32.13	32.59
SD	8.14	8.57

Korrelation: 0.967, t-Test: 0.45

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; GF: Gesichtsfelder

Tabelle 9: Statistische Sicherheit der Flächenmessung: wiederholte Ausmessung der gleichen Fläche.

Area (μm^2)		Area (μm^2)	
1	8,926,861.29	8	8,935,786.91
2	8,853,472.85	9	8,982,811.71
3	8,995,208.41	10	9,091,820.00
4	8,830,167.06	11	8,989,010.06
5	9,000,580.31	12	8,987,191.88
6	8,910,580.29	MW	8,961,737.33
7	9,037,357.18	SD	74,249.92
		VK%	0.83%

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; VK%: Variationskoeffizient

Tabelle 10: CD4⁺ Zellen im Corpus luteum des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 (positive Zellen / mm²); Computerauswertung

Hd	Block	Schnitt	Tag 15	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75
1	1	1	32.59	7.20	6.83	9.57	6.71
1	1	2	20.71	7.59	6.60	10.45	6.48
1	1	3	25.93	9.26	5.32	8.45	8.95
1	2	1	19.44	6.76	6.22	9.26	11.11
1	2	2	19.79	5.56	7.87	9.72	7.87
1	2	3	24.31	5.74	6.35	9.26	11.11
1	3	1	18.62	11.81	17.2	4.80	6.48
1	3	2	18.87	12.04	15.56	5.48	6.48
1	3	3	22.75	10.56	13.43	5.40	8.80
2	1	1	18.52	8.02	11.88	5.79	9.26
2	1	2	15.05	8.23	10.29	6.48	8.33
2	1	3	15.74	8.92	9.03	6.48	8.33
2	2	1	14.09	9.72	9.49	7.41	6.48
2	2	2	12.14	8.98	8.33	10.88	6.48
2	2	3	12.04	8.33	9.88	9.95	5.86
2	3	1	16.76	8.02	10.685	5.95	7.87
2	3	2	13.54	6.69	9.31	6.17	7.41
2	3	3	17.50	8.85	9.455	6.64	6.48
3	1	1	33.10	4.78	6.79	6.11	8.02
3	1	2	37.45	4.86	7.41	6.02	8.22
3	1	3	29.84	5.16	6.02	8.80	9.54
3	2	1	21.76	3.24	6.13	8.10	16.11
3	2	2	28.09	2.78	6.67	6.25	12.96
3	2	3	36.11	3.52	6.48	3.94	10.93
3	3	1	27.43	4.44	10.03	10.49	14.93
3	3	2	32.77	5.79	7.67	7.04	11.57
3	3	3	32.98	3.40	8.52	7.04	12.65
geo. Mittelwert			21.646	6.553	8.474	7.234	8.738
Streuung			1.408	1.497	1.348	1.304	1.323

Student-Newman-Keuls-Test

Tag 30	9.54E-12			
Tag 45	1.56E-10	0.009		
Tag 60	2.63E-11	0.244	0.023	
Tag 75	2.38E-10	0.003	0.388	0.008

Gesichtsfelder	196	217	161	144	95
mm ²	211.68	234.36	173.88	155.52	102.6

Tabelle 11: CD8⁺ Zellen im Corpus luteum des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 (positive Zellen / mm²); Auszählung von Hand

Hd	Block	Schnitt	Tag 15	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75
1	1	1	9.11	2.10	6.34	4.93	2.51
1	1	2	11.21	1.84	5.07	4.78	2.56
1	1	3	10.72	1.77	3.71	4.57	2.32
1	2	1	8.08	1.90	3.31	5.00	3.07
1	2	2	9.10	1.97	3.98	5.33	3.81
1	2	3	8.16	1.60	4.98	4.88	2.87
1	3	1	11.57	1.82	4.25	3.99	4.25
1	3	2	12.05	2.32	3.51	3.26	5.16
1	3	3	9.54	2.51	3.24	3.92	5.94
2	1	1	4.87	4.81	4.49	11.12	4.58
2	1	2	4.58	4.08	4.33	10.78	4.27
2	1	3	4.84	4.32	4.64	10.56	3.91
2	2	1	3.99	3.50	5.56	8.78	2.38
2	2	2	3.89	4.83	5.62	11.38	3.26
2	2	3	4.37	3.70	5.27	11.58	2.26
2	3	1	6.66	3.27	4.54	9.05	4.63
2	3	2	6.59	3.79	5.35	8.68	3.44
2	3	3	4.64	3.98	4.66	9.24	3.07
3	1	1	4.88	1.24	5.01	9.37	3.545
3	1	2	4.94	1.33	4.32	8.39	3.415
3	1	3	5.61	1.74	4.63	8.06	3.115
3	2	1	5.32	1.09	4.97	7.12	2.725
3	2	2	5.47	1.91	4.56	6.73	3.535
3	2	3	5.70	2.25	4.53	7.45	2.565
3	3	1	6.72	1.79	4.8	11.68	4.44
3	3	2	6.18	2.36	5.17	9.62	4.30
3	3	3	6.09	1.78	4.53	10.06	4.505
geom. Mittelwert			6.456	2.358	4.589	7.287	3.454
Streu faktor			1.410	1.533	1.172	1.473	1.302

Student-Newman-Keuls-Test

Tag 30	5.54E-10			
Tag 45	5.75E-05	1.93E-10		
Tag 60	0.094	3.03E-11	1.05E-06	
Tag 75	1.44E-07	5.01E-04	1.14E-05	4.40E-09
Fläche in mm ²	520.25	660.41	520.25	404.78 258.04

Tabelle 12: Mittlere Grauwertdifferenz zwischen Kontrolle und MHC-II positivem Anteil zwischen den Tagen 15 und 75 im Corpus luteum des Hundes (MHC-II-G).

Hd	Block	Schnitt	Tag 15	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75
1	1	1	29.75	21.60	21.50	20.17	24.67
1	1	2	36.75	17.40	17.00	20.17	22.67
1	1	3	32.75	17.00	13.00	14.67	27.42
1	2	1	26.10	15.80	14.92	16.50	26.50
1	2	2	40.67	17.60	16.56	22.44	22.00
1	2	3	33.52	14.25	15.92	25.38	31.50
1	3	1	27.21	12.17	22.00	20.50	22.50
1	3	2	26.33	16.92	21.40	19.33	30.00
1	3	3	39.22	13.42	22.75	16.17	23.67
2	1	1	30.27	15.80	20.52	22.00	25.33
2	1	2	30.92	17.38	18.24	23.00	34.33
2	1	3	27.87	14.33	20.50	24.00	23.83
2	2	1	30.73	18.55	13.67	20.00	34.58
2	2	2	28.83	18.75	19.92	23.00	39.67
2	2	3	20.58	14.38	14.67	18.00	33.00
2	3	1	21.20	16.83	15.67	18.83	28.42
2	3	2	20.80	15.29	14.86	21.83	22.42
2	3	3	27.38	12.14	10.88	19.33	21.92
3	1	1	27.00	24.19	13.33	17.00	32.83
3	1	2	28.50	20.08	13.73	13.73	34.33
3	1	3	27.00	22.33	14.50	11.50	22.33
3	2	1	34.27	18.54	17.15	22.47	22.47
3	2	2	41.10	16.92	13.21	22.17	26.07
3	2	3	33.07	18.56	15.73	18.92	25.87
3	3	1	30.64	23.89	15.33	20.00	28.50
3	3	2	34.80	21.33	19.06	21.25	34.50
3	3	3	30.04	26.71	20.83	18.50	26.50
geom. Mittelwert			29.801	17.509	16.612	19.377	27.280
Streudefaktor			1.199	1.223	1.216	1.197	1.192

Student-Newman-Keuls-Test

Tag 30	3.16E-13				
Tag 45	2.46E-14	0.164			
Tag 60	2.27E-11	0.030	0.002		
Tag 75	0.038	5.57E-11	2.36E-12	5.75E-09	
Gesichtsfelder	170	205	196	154	121

Tabelle 13: Flächenanteil (%) von MHC-II positiven Anfärbungen im Corpus luteum des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 (MHC-II-F).

Hd	Block	Schnitt	Tag 15	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75
1	1	1	13.08	21.28	13.01	12.95	19.36
1	1	2	16.99	14.71	10.77	7.22	20.24
1	1	3	15.43	17.69	8.47	4.83	23.47
1	2	1	14.49	14.93	7.94	7.71	25.27
1	2	2	24.65	14.93	10.09	11.61	18.90
1	2	3	19.83	15.33	8.65	14.71	24.50
1	3	1	15.11	16.23	8.62	18.75	15.78
1	3	2	13.09	16.32	8.75	16.90	17.85
1	3	3	20.15	16.60	7.01	14.47	15.95
2	1	1	11.75	5.20	7.88	18.44	14.82
2	1	2	13.00	5.74	6.62	17.26	20.09
2	1	3	11.99	4.35	8.33	18.96	9.83
2	2	1	13.72	8.57	3.37	12.56	23.62
2	2	2	11.65	10.19	6.65	13.49	28.72
2	2	3	6.22	8.27	4.09	11.28	21.93
2	3	1	7.90	6.99	11.19	10.60	16.14
2	3	2	7.10	6.74	8.66	12.34	16.63
2	3	3	8.10	5.51	5.74	11.40	15.86
3	1	1	10.52	9.90	2.19	15.35	23.47
3	1	2	10.28	8.39	2.29	13.17	26.05
3	1	3	10.07	9.55	2.78	9.42	14.91
3	2	1	22.77	11.54	5.01	14.85	15.63
3	2	2	26.89	9.58	3.81	13.61	17.31
3	2	3	19.69	10.06	5.07	12.42	17.12
3	3	1	15.48	17.02	8.96	14.36	19.15
3	3	2	16.63	14.67	9.33	15.11	21.24
3	3	3	14.08	19.01	13.50	13.75	15.98
geom. Mittelwert			13.572	10.824	6.622	12.724	18.782
Streufaktor			1.447	1.560	1.655	1.359	1.259

Student-Newman-Keuls-Test

Tag 30	0.029			
Tag 45	1.57E-07	9.21E-05		
Tag 60	0.157	0.109	1.04E-08	
Tag 75	2.97E-04	9.75E-08	7.83E-16	3.50E-07

Tabelle 14: Flächenanteil (%) von Endoglin positiven Anfärbungen im Corpus luteum des Hundes zwischen den Tagen 15 und 75 (Endoglin-F).

Tag	Hd	Block	1-GF1	1-GF2	2-GF1	2-GF2	3-GF1	3-GF2	
15	1	1	10.02	14.16	10.69	11.25	12.91	13.98	11.537
15	1	2	12.43	10.28	12.91	13.02	14.46	11.20	1.159
15	1	3	15.10	13.73	11.89	10.51	13.13	11.35	13.376
15	2	1	10.97	10.49	11.59	9.98	10.18	11.55	9.952
15	2	2	8.81	6.69	9.82	11.16	9.92	10.18	
15	2	3	11.75	11.21	11.84	13.04	10.15	8.95	gMW
15	3	1	11.11	11.37	11.81	9.77	11.90	13.35	SF
15	3	2	12.87	16.87	11.62	12.58	12.31	12.76	Max
15	3	3	11.63	11.85	11.52	11.41	11.87	11.67	Min
30	1	1	4.44	5.38	5.15	6.03	4.92	7.64	5.567
30	1	2	5.36	7.03	3.64	5.42	4.47	7.17	1.260
30	1	3	5.82	4.63	3.91	4.44	5.34	6.77	7.016
30	2	1	6.98	5.03	3.73	4.51	4.80	4.48	4.418
30	2	2	5.77	3.71	3.91	3.88	3.69	5.41	
30	2	3	6.71	6.26	4.20	6.38	6.51	8.53	
30	3	1	5.06	7.54	4.58	5.11	6.02	7.32	
30	3	2	6.56	7.72	6.75	6.33	5.99	7.92	
30	3	3	8.07	6.82	6.16	6.54	6.19	5.75	
45	1	1	3.89	5.59	4.57	5.16	5.56	4.82	4.041
45	1	2	3.94	4.11	4.18	4.42	4.49	5.57	1.261
45	1	3	5.03	4.64	3.80	4.62	3.56	3.02	5.095
45	2	1	4.60	3.14	3.76	4.28	3.53	4.01	3.204
45	2	2	3.51	3.08	2.51	2.02	2.42	2.58	
45	2	3	5.45	4.25	4.24	4.29	6.42	6.06	
45	3	1	3.80	4.27	3.74	4.40	2.86	3.93	
45	3	2	4.20	4.14	4.10	4.09	4.05	4.29	
45	3	3	3.36	4.02	5.97	3.53	3.56	4.36	
60	1	1	3.54	2.59	5.48	5.16	2.53	3.19	4.854
60	1	2	2.20	2.29	4.40	3.85	3.23	2.70	1.393
60	1	3	8.60	7.99	8.33	7.92	9.33	9.82	6.762
60	2	1	4.83	4.95	5.09	4.93	5.41	5.49	3.485
60	2	2	4.13	3.53	4.69	3.91	6.21	4.64	
60	2	3	4.31	5.47	4.53	4.80	6.65	7.69	
60	3	1	5.65	5.50	4.34	5.04	4.78	6.29	
60	3	2	5.06	6.12	4.54	4.15	5.32	4.35	
60	3	3	5.16	6.08	4.42	4.59	5.21	5.27	

Tabelle 14: Fortsetzung Endoglin Flächenanteil (%)

Tag	Hd	Block	1-GF1	1-GF2	2-GF1	2-GF2	3-GF1	3-GF2	
75	1	1	5.36	3.31	5.08	5.19	5.10	7.79	4.775
75	1	2	4.28	4.09	3.46	5.00	4.01	4.92	1.227
75	1	3	5.14	5.67	4.60	3.74	3.27	3.92	5.862
75	2	1	3.30	3.29	4.37	4.19	4.67	4.94	3.891
75	2	2	5.26	4.47	3.53	4.87	5.39	5.37	
75	2	3	5.20	4.35	4.43	4.38	3.45	3.50	
75	3	1	5.17	4.75	4.75	4.83	4.64	5.11	
75	3	2	6.06	6.71	5.51	4.92	5.07	4.95	
75	3	3	6.76	6.13	7.01	6.38	6.13	5.45	

Student-Newman-Keuls-Test

	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75
Tag 15	4.84E-38	4.77E-45	1.74E-38	2.51E-42
Tag 30		4.46E-11	0.021	1.36E-04
Tag 45			1.77E-04	6.95E-05
Tag 60				0.183

gMW: geometrischer Mittelwert; SF. Streufaktor

Tabelle 15: Mittlere Grauwertdifferenz zwischen Kontrolle und Endoglin positivem Anteil zwischen den Tagen 15 und 75 im Corpus luteum des Hundes (Endoglin-G).

Tag	Hd	Block	1-GF1	1-GF2	2-GF1	2-GF2	3-GF1	3-GF2	
15	1	1	20.33	26.33	23.33	26.33	32.33	33.33	24.941
15	1	2	23.67	24.67	18.67	19.67	28.67	20.67	1.161
15	1	3	26.67	22.67	28.67	26.67	27.67	26.67	28.957
15	2	1	28.00	26.00	30.00	25.00	26.00	32.00	21.483
15	2	2	23.33	20.33	27.33	28.33	28.33	28.33	
15	2	3	20.00	17.00	29.00	29.00	24.00	25.00	gMW
15	3	1	20.67	20.67	20.67	26.67	21.67	27.67	SF
15	3	2	24.00	30.00	26.00	26.00	20.00	22.00	Max
15	3	3	23.33	23.46	25.46	25.96	26.08	26.96	Min
30	1	1	27.67	30.67	23.67	31.67	32.67	23.67	22.049
30	1	2	21.33	22.33	19.33	23.33	21.33	25.33	1.200
30	1	3	23.67	22.67	26.67	26.67	24.67	25.67	26.459
30	2	1	29.00	25.00	23.00	23.00	25.00	25.00	18.375

Tabelle 15: Fortsetzung Endoglin Grauwertdifferenz

Tag	Hd	Block	1-GF1	1-GF2	2-GF1	2-GF2	3-GF1	3-GF2	
30	2	2	23.67	16.67	19.67	19.67	19.67	22.67	
30	2	3	26.00	23.00	23.00	24.00	26.00	26.00	4.40954
30	3	1	17.67	19.67	16.67	15.67	15.67	19.67	3.67446
30	3	2	19.33	19.33	18.33	16.33	22.33	23.33	
30	3	3	18.00	15.00	22.00	21.00	18.00	19.00	
45	1	1	19.33	26.33	19.33	21.33	23.33	22.33	19.904
45	1	2	18.67	17.67	23.67	19.67	24.67	22.67	1.276
45	1	3	19.00	17.00	23.00	24.00	22.00	21.00	25.398
45	2	1	18.00	15.00	21.00	20.00	21.00	20.00	15.599
45	2	2	17.67	15.67	9.67	9.67	9.67	11.67	
45	2	3	24.67	23.67	26.67	25.67	31.67	31.67	
45	3	1	19.00	21.00	21.00	22.00	17.00	19.00	
45	3	2	19.25	19.50	21.00	20.88	21.00	21.00	
45	3	3	17.67	19.67	23.67	24.67	18.67	19.67	
60	1	1	14.33	11.33	25.33	23.33	12.33	15.33	14.787
60	1	2	13.67	14.67	18.67	16.67	17.67	16.67	1.310
60	1	3	15.33	12.33	18.33	17.33	19.33	21.33	19.371
60	2	1	12.25	12.13	16.50	15.50	17.50	18.00	11.288
60	2	2	9.00	7.00	15.00	14.00	25.00	21.00	
60	2	3	9.00	13.00	12.00	14.00	22.00	23.00	
60	3	1	11.67	10.67	16.67	15.67	14.67	14.67	
60	3	2	13.00	14.00	17.00	14.00	15.00	18.00	
60	3	3	12.00	14.00	9.00	9.00	14.00	14.00	
75	1	1	15.33	8.33	15.33	16.33	22.33	23.33	11.420
75	1	2	8.67	8.67	9.67	12.67	6.67	10.67	1.396
75	1	3	15.00	14.00	11.00	14.00	12.00	15.00	15.942
75	2	1	10.00	12.00	15.00	16.00	18.00	17.00	8.180
75	2	2	4.33	4.33	14.33	8.33	10.33	11.33	
75	2	3	11.67	10.67	7.67	11.67	9.67	7.67	
75	3	1	11.42	10.67	12.54	12.92	11.92	12.67	
75	3	2	14.67	15.67	11.67	9.67	7.67	7.67	
75	3	3	11.67	11.67	15.67	14.67	8.67	8.67	

Student-Newman-Keuls-Test

	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75	gMW: geom. Mittelwert
Tag 15	1.34E-04	8.68E-09	1.36E-24	4.20E-35	
Tag 30		0.009	3.09E-15	1.36E-25	SF: Streufaktor
Tag 45			3.79E-09	1.32E-18	
Tag 60				1.53E-05	

Tabelle 16: Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen, ausgezählte Flächen (mm²).

	Tag 15	Tag 30	Tag 45	Tag 60	Tag 75
CD4/CD8	3,353	2,779	1,847	0,993	2,530
mm ²	365,96	377,30	347,06	337,88	311,42

Tabelle 17: Zuordnung der Hunde zu den verschiedenen Corpus luteum Blöcken bei der Färbung mit anti CD8 Antikörpern.

	Hund 1	Hund 2	Hund 3
Tag 15	Jana	Sally	Ferdi
1	177	154	127
2	178	157	129
3	180	158	130
Tag 30	Jeani	Bine	Cora
1	134	121	87
2	135	122	88
3	137	123	89
4	136	136 ist 89	
Tag 45	Billi	Hexe	Jule
1	113	141	148
2	115	143	149
3	116	144	150
Tag 60	Pebbles	Anka	Daisi
1	172	36	59
2	173	38	60
3	174	39	61
Tag 75	Gypsy	Ella	Luise
1	15	43	189
2	19	45	190
3	29	48	191
	29 = Ina		

Tabelle 18: Zuordnung der Hunde zu den verschiedenen Corpus luteum Blöcken bei der Färbung mit anti CD4 Antikörpern.

	Hund 1	Hund 2	Hund 3
Tag 15	Jana	Sally	Ferdi
1	177	154	127
2	180	156	129
3	181	158	(130)
4	178	178 ist 127	
5	182	182 ist 129	
Tag 30	Jeani	Bine	Cora
1	134	122	87
2	135	123	88
3	136	121	89
Tag 45	Hexe	Jule	Billi
1	141	148	113
2	142	149	115
3	144	(150)	116
Tag 60	Pebbles	Anka	Daisi
1	172	38	59
2	173	39	60
3	174	35	61
4	171	171 ist 35	
Tag 75	Gypsy	Ella	Luise
1	15	43	190
2	19	45	191
3	17	48	189
4	29	29 ist 17	

() = gemittelt

Tabelle 19: Zuordnung der Hunde zu den verschiedenen Corpus luteum Blöcken bei der Färbung mit anti MHC-II Antikörpern.

	Hund 1	Hund 2	Hund 3
Tag 15	Jana	Sally	Ferdi
1	178	154	127
2	180	157	129
3	182	158	(130)
4	177	177 ist 127	
5	181	181 ist 129	
Tag 30	Jeani	Bine	Cora
1	134	120	88
2	135	121	89
3	136	122	90
Tag 45	Billi	Hexe	Jule
1	113	140	148
2	115	141	149
3	116	142	150
4		144 ist 116	
Tag 60	Pebbles	Anka	Daisi
1	171	36	59
2	172	38	60
3	174	39	61
4	173	173 ist 36	
Tag 75	Gypsy	Ella	Luise
1	15	43	190
2	19	45	191
3	29	48	189
	29 ist Ina		

() = gemittelt

Tabelle 20: Zuordnung der Hunde zu den verschiedenen Corpus luteum Blöcken bei der Färbung mit anti Endoglin Antikörpern.

	Hund 1	Hund 2	Hund 3
Tag 15	Jana	Sally	Ferdi
1	177	154	127
2	178	156	129
3	180	158	(130)
4	181 ist 127		
5	182 ist 129		
Tag 30	Jeani	Bine	Cora
1	134	121	87
2	135	122	88
3	137	123	89
Tag 45	Hexe	Jule	Billi
1	140	148	113
2	141	149	(115)
3	144	150	116
Tag 60	Pebbles	Anka	Daisi
1	172	(36)	59
2	173	38	60
3	174	39	61
Tag 75	Gypsy	Ella	Luise
1	15	43	(189)
2	19	45	190
3	29	48	191

() = gemittelt

Danksagung

Vielen Dank Herrn Prof. Baumgärtner, Frau Artlet und Herrn Dr. Wünschmann aus der Veterinärpathologie für alle Antikörper und für ständiges Ohr bei kleinen und großen Problemen rund um die Immunhistologie.

Großen Dank zolle ich Professor Leiser und Team für ihre ausdauernde Unterstützung.

Ganz besonderen Dank schulde ich Prof. Hoffmann für ständige Gesprächsbereitschaft, Ratschläge, Tips und überlassenem Thema.

Auch ein großes Dankeschön an Frau Dr. Riesenbeck, Herrn Vielemeyer und Frau Dr. Klein für die vielen Stunden bei der Kastration der Tiere sowie Carmen Schumacher und Willi Damm für ihren Laboreinsatz.

Großen Dank schulde ich auch Prof. Schams für etliche Tips und die mitgebrachten Antikörper.

Herrn Dr. Failing danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Aufarbeitung der erhobenen Daten.

Herzlichen Dank den Firmen Novocastra, Biermann und Genzyme für die Überlassung von verschiedenen Antikörpern.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.