

# Auswirkung einer Progestagen-Langzeit-Applikation auf Sexualzyklus und Endometrium des Pferdes – Zwei Seiten einer therapeutischen Medaille

E. Klug<sup>1</sup>, C.P. Bartmann<sup>1</sup>, Astrid Schöning<sup>1</sup>, Doris Schoon<sup>2</sup> und H. A. Schoon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover

<sup>2</sup>Institut für Veterinär-Pathologie, Universität Leipzig

## Zusammenfassung

Zur Überprüfung des Einflusses einer Langzeitapplikation des Progestagens Regumate® (0,044 mg/kg KGW Altrenogest) auf das Geschlechtsverhalten, klinische und endokrinologische Ovarfunktionen sowie an Hand von Endometriumbiopsien auf endometriale Morphofunktionen wurden 2 x 2 Stuten (A–B; C–D) in unterschiedlichen Regimen einer prolongierten oralen Applikation des Präparates unterzogen.

Während der Behandlungsphasen zeigten die Stuten synchron ein signifikantes Sistieren der äußeren Rossessymptomatik und eine Reduzierung des aus Ovargröße und Follikelpopulation gebildeten Ovarscores. Blutprogesteron und -östrogen lagen während der Behandlungsphasen auf basalen Werten. Nach Medikament-Entzug kam es zu einem Wachstumsschub der Ovarfollikel parallel zur einem signifikanten Anstieg von Östrogen, der von einem Anstieg von Progesteron gefolgt wurde und somit stattgehabte Ovulationen im Behandlungsintervall signalisiert wurden.

In den Endometriumbiopsien wurden zusätzlich zur Standard-Histopathologie immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis der Östrogen- und Progesteronrezeptoren durchgeführt sowie der Proliferationsmarker Ki67 bestimmt. Histologisch wurde unter der Regumate-Applikation bei grundsätzlich irregulärer glandulärer Differenzierung überwiegend eine Sekretionsmorphologie und eine reduzierte Proliferationsaktivität festgestellt. Alle Stuten zeigten zu Beginn der Behandlungen pathohistologisch eine deutliche, superfizielle, teils exsudative, eosinophilenbeteiligte Endometritis, die im weiteren Verlauf der Behandlung spontan verschwand und nicht wiederkehrte.

Bei den Progesteronrezeptoren war bei allen Probandinnen in den Behandlungspausen ein deutlicher Anstieg zu erkennen. Bei den endometrialen Östrogenrezeptoren wurde eine deutliche Kumulation um den Zeitpunkt des Blutöstrogenanstiegs in der Behandlungspause (Stuten A–B) oder zum zweiten Östrogenpeak unter der Regumatebehandlung (Stuten C–D) gemessen. Gegen Behandlungsende wurde eine insgesamt herabgesetzte Rezeptorexpression beobachtet.

**Schlüsselwörter:** Sexualzyklus Stute, Progesteron-Langzeit-Applikation, Sexualverhalten, Endometriumreaktionen

## Influence of longterm progestin application on sexual cycle and endometrial structures and functions of the mare

For investigating the influence of progestin long term application of the progestin REGUMATE® on sexual behaviour, clinical and endocrine ovarian functions, and on endometrial reactions documented by biopsy 2 x 2 adult precycling mares (A–B; C–D) were exposed to two different regimens of a long term progestin application by daily oral administration of 0,044 mg /kg BW altrenogest .

Estrous behaviour was absent during periods when Regumate was being administered and ovar-score – established by ovarian diameter and follicle population – decreased. Blood progesterone and estrogen values were only basal during treatment periods. After ceasing Regumate administration a significant growth of follicles was observed as well as a significant peak of estrogen followed by increasing values of progesterone indicating ovulation during the interval of absence of the drug.

With biopsies besides routine pathohistological diagnostic immunohistological investigations for receptors of estrogen and progesterone and the special proliferation marker Ki67 were performed. During the periods of progestin administration the endometrium exhibited basically an irregular glandular differentiation mainly expressing rather a histomorphology of secretion than proliferation.

In the endometrial tissue of all the mares treated initially distinct signs of superficial, partly exsudative eosinophilic inflammation could be proved which disappeared soon spontaneously. During treatment intervals there was a distinct rise of progesterone receptors and estrogen receptors cumulated during estrogen peaks in the treatment intervals (mares A–B) or the second estrogen maximum under progestin treatment (mares C–D). Towards final treatment period generally a declining receptor expression was observed.

**keywords:** sexual cycle of mare, progestin longterm application, sexual behaviour, reaction of endometrium

## Einleitung

Progestagene finden in der Reproduktionsmedizin des Pferdes eine vielseitige Anwendung. Gemäß ihrer lutealen Rolle im sexualendokrinen Steuerungskreis werden sie einerseits gelegentlich zur Progesteronsubstitution in den graviden Phasen der Stute anempfohlen. Andererseits finden sie infolge ihres negativen Feedbacks auf den übergeordneten Hypothalamus-Hypophysen-Komplex Verwen-

dung in der exogenen Zyklussteuerung (Noden et al. 1975). Indikationsbereiche bei der Individualbehandlung beziehen sich auf die Zyklusakzentuierung und Östrusinduktion in der saisonalen Übergangsphase, der Interöstrusverlängerung, Hinausschieben der Fohlenrosse und – sehr häufig angefordert – der Rossesuppression oder Rosseverschiebung bei Sportstuten sowie der kontinuierlichen Substitution bei

ovarietomierten Rezipientenstuten im Rahmen des Embryotransfers.

Im Stutenherdenmanagement ist vor allem im Zuge der instrumentellen Samenübertragung die Zyklussynchronisation ein ökonomisches Angebot für die praktische Pferdezucht. Während die hier aufgeführten Indikationsbereiche mit Ausnahme der substituierten Rezipientinnen eine nur kurzfristige Applikation von Progestagenen erfordern, wird für Stuten im Sparteinsatz relativ häufig die Applikation von Gestagenen über einen längeren, nach Wochen und Monaten bemessenen Zeitraum praktiziert. Die Verabreichung der Progestagene erfolgt unterschiedlich und wird in Injektionsform mit Kurz- und Langzeitpräparaten, per os oder per vaginam mittels Scheideneinlagen praktiziert.

Der Indikationsbereich der Progestagene als graviditätsstützende Substitutionstherapie ist umstritten. Während z.B. *Nitschelm und Van der Horst (1976)*, *Günzel und Merkt (1979)* und *Perry-Weeks und Holtan (1987)* über positive klinische Ergebnisse in frühen und späteren Graviditätsphasen berichten, wird die substituierende Wirkung zur Stützung der Gravidität grundsätzlich eher verneint oder gar bestritten (*Stolla und Leidl, 1979; Allen, 1984; Ginther, 1985*). Die Applikation von Progestagenen zur Zyklussteuerung in den verschiedenen saisonalen Phasen ist in zahlreichen Studien untersucht und ihre Wirksamkeit bestätigt worden z.B. *Merkt (1974)* (Injektion-Langzeitpräparation), *Webel (1975)*, *Webel et al. (1982)* *Palmer (1979)*, *Squires et al. (1979)* und *Allen et al. (1980)*, *Alexander und Irvine (1991)* (per os-Applikation), *Lübbecke (1992)* und *Lübbecke et al. (1994)* (Vaginalapplikation).

Eine spezielle Untersuchung über die Rolle exogener Progestagene auf das postpartale Zyklusgeschehen der Stute legten *Loy et al. (1982)* vor. Mit gleichem endokrinologischem Ansatz wurden Zyklussynchronisationsversuche an Stuten durchgeführt, die mit exogen applizierten Progestagenen einen guten Synchronisierungsgrad für den Östrus nicht aber für die Ovulation erzielten (*Bristol 1981; Bristol et al. 1983*).

Die Effektivität der gestagenen Eigenschaften exogener Progestagene wurde durch die Applikation an ovariectomierten Rezipientenstuten in Embryotransferversuchen demonstriert (*Hinrichs et al. 1985; Shideler et al. 1982; McKinnon et al. 1988*).

Der Indikationsbereich der gezielten Rosseunterdrückung mittels Progestagenen wurde von *Webel und Squires (1982)* untersucht, nach deren Ergebnissen eine Rosseunterdrückung mit diesem Wirkstoff zu jeder Phase des Zyklus möglich ist.

*Paul et al. (1995)* legen einen Strategieplan zur Rosseverschiebung bei Sportstuten vor, in dem sie den Stuten nach zwischenzeitlichen Behandlungen mit dem Progestagen die Wiederkehr in den Östrus erlauben.

Relativ wenige Untersuchungen liegen über die Auswirkungen der Progestagenapplikation auf die endometrialen Funktionen vor. Während die bisher genannten Autoren keinen negativen Effekt auf die Fruchtbarkeit der behandelten Stuten beobachten konnten, untersuchten *Washburn et al. (1982)* die endouterine Phagozytoseaktivität bei streptokok-

keninfizierten, ovariectomierten Stuten und stellten eine Depression der Abwehrmechanismen fest. *Colbern et al. (1987)* präsentierten ein Modell zum Studium der Endometritis bei mit Progestagenen vorbehandelten Stuten. Sie beobachteten eine zeitliche Koinzidenz von Progestagenapplikation und endouteriner Keimanwesenheit. *Alexander und Irvine (1991)* ermittelten eine höhere Inzidenz bakterienkontaminierter Endometrien nach Gestagenbehandlung im Vergleich zum Behandlungsbeginn.

Nur wenig ist über die Auswirkung exogen applizierter Progestagene auf die histo-morphologischen Vorgänge des Endometriums bei der Stute bekannt. Gelegentlich eigener Untersuchungen wurden in der Kasuistik von zwei 9 bzw. 10jährigen Warmblutstuten, die vorberichtlich über 4 Monate einer Progestagen-Dauerbehandlung (Chlormadinonazetat gefolgt von Allyltrenbolon) zur Unterdrückung von unerwünschter Rosseesymptomatik exponiert gewesen waren, nahezu kongruente Aberrationen der endometrialen Histo-morphologie aufgedeckt. Die Stuten präsentierten sich klinisch mit aufkommendem äußeren Östrusverhalten, multifollikulären Ovarien und ultrasonographisch auffälliger intramuraler uteriner Ödematisierung. In den Sexualsteroidhormonen lagen hohe (9 bzw. 25 pg/ml) Plasmaöstrogen- und nur basale Progesteron- (0,19 bzw. 0,07 ng/ml) und Testosteronwerte (0,01 bzw. 0,02 ng/ml) vor. Histopathologische Untersuchungen an Endometriumbiopsien ergaben bei beiden Probanden neben einem ausgeprägten Schleimhautödem zyklus-dyssynchrone irreguläre, glanduläre Epithelien mit teils atrophischen, teils sekretorischen Funktionszuständen, die nach Absetzen der Medikation in einem Zeitraum von etwa 3 Wochen weitgehend zur Normalsituation sich zurückentwickelten. Dieses bisher bei Stuten nicht be-

**Tab. 1:** Zeitschema der Regumate®-Dauerbehandlung.

Time schedule of Regumate® longterm application.

Stuten	Regumate-Applikation in Tagen		
	+	-	+
A und B	45	22	12
C und D	32	16	36

schriebene histologische Bild entspricht Befunden endometriomorphologischer Zustände in der Humanmedizin nach Dauerapplikation von Progestagenen (*Dallenbach-Hellweg 1987*).

Im Rahmen der hier vorgelegten Studie soll über endometriale Reaktionen bei Stuten, die unterschiedlich lang mit dem Progestagen Regumate® behandelt worden sind, berichtet werden.

## Material und Methodik

Für die Untersuchungen standen 4 nichtfohlenführende Warmblutstuten im Alter von 5–14 Jahren im Februar, März und April 1997 zur Verfügung. Die Tiere wurden in individu-

eller Offenboxen-Auslauf-Kombination mit Stroheinstreu gehalten und bei freier Selbsttränke mit üblicher Heu- und Haferfütterung gefüttert. Nach Feststellung des allgemeinen Gesundheits- und gynäkologischen Ausgangsstatus in einem Vorlauf von 1 Woche erhielten ab 1. Februar die Stuten in unterschiedlichen Zeitschemata täglich Regumate® (17 alpha-Allyl-17beta-hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one; Altrenogest Roussel-Uclaf – Serum-Werk Bernburg AG) per os in einer Dosierung von 0,044 mg/kg/KGW, was einer mittleren Verabreichungsmenge von 8 ml Regumate® für 450 kg mittlerer KM entspricht. Stuten A und B erhielten die Medikation zunächst über 45 Tage und nach einem medikationsfreien Intervall von 22 Tagen eine weitere Applikation über 12 Tage. Die Stuten C und D wurden zunächst 32 Tage lang behandelt und nach einem 16tägigen behandlungsfreien Intervall erneut über einen Zeitraum von 36 Tagen therapiert (Tab. 1). Hiermit wurden im Wesentlichen die Applikationssequenzen 'lang-Pause-kurz' und 'kurz-Pause-lang' eingestellt. Die Stuten C und D erhielten am letzten Tag der ersten Behandlungsserie einmalig Prostaglandin F2alpha (Interpros® 5 mg Essex-Pharma).

Während der gesamten Untersuchungsphase wurde wöchentlich mindestens einmal der klinische und unter Einbeziehung der Ultrasonographie der gynäkologische Status einschließlich Geschlechtsverhalten erhoben. Aus den Ovarbefunden (Größe und Follikel) wurde ein Ovar-Score gebildet, der die Gesamtgröße des Ovars beinhaltet. Progesteron, Östrogen und Testosteron wurden im Plasma von wöchentlich einmal aus der Vena jugularis entnommenem Blut mittels Radio-Immuno-Assay gemessen (Endokrinologielabor Prof. Dr. Hoppen, Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover). Die histo-morphologischen Untersuchungen erfolgten mittels Endometriumbiopsien, die mittels Kevorkian-Biopsiezange (Fa. Hauptner, Solingen) unter Visualisierung des Scheideninnenraums und Fixation der Portio vaginalis uteri mit Hilfe einer Faßzange und Zervixpassage blind aus dem dorsalen Schleimhautbereich des rechten oder linken Uterushorns in enger Nachbarschaft zur Uterusbifurkation entnommen wurden. Nach den Untersuchungen von Runge (1995) ergibt sich in dieser Lokalisation die höchste Repräsentanz der Gewebeproben für das gesamte Endometrium. Bis zur histologischen Aufarbeitung wurden die Gewebestückchen in 4 %igem Formalin in Eppendorfröhrchen aufbewahrt (Schoon et al. 1992).

Nach etwa 3 Monaten wurden die Stuten erneut untersucht. Von diesen zu diesem Zeitpunkt noch eindeutig zyklischen, genital unauffälligen Tieren gelangte jeweils eine Uterusbiopsie zur histologischen Untersuchung.

Die Biopsieproben wurden nach Standardverfahren in Paraplast eingebettet und Hämatoxylin-Eosin-gefärbt. Für die immunhistologische Untersuchung (PAP-Technik) gelangten kreuzreagierende monoklonale Antikörper aus der Maus zur Anwendung: Östrogenrezeptor (clone 6F11; Östrogenrezeptormolekül, Epitope Domänen A, B, C), Progesteronrezeptor (clone PR4-12; Progesteronrezeptor A, unbekanntes Epitop), Proliferationsmarker Ki67-Antigen (clone MM1). Die Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS) nach

Remmele und Stegner (1987) berücksichtigte die Färbintensität und den Prozentsatz positiver Zellen.

## Ergebnisse

### Geschlechtsverhalten

Bei den Stuten handelte es sich zu Beginn der Behandlungen um bereits weitgehend zyklische Tiere, wie aus den Sexualsteroid-Hormonwerten (Abb. 2a + b) und dem Ovardimensionen-Score (Abb. 1) erkennbar wird. In enger zeitli-

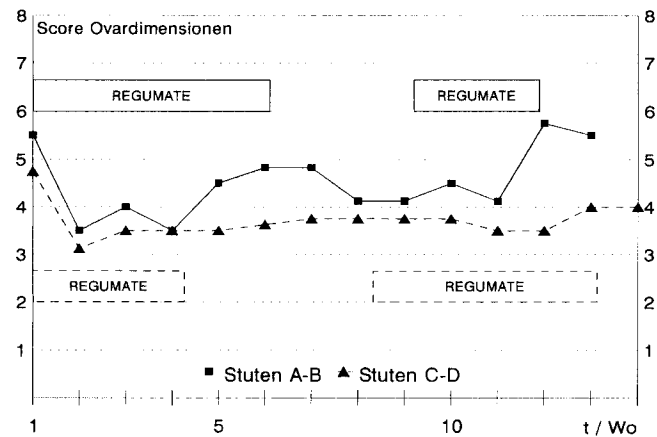


Abb. 1: Score der Ovardimensionen.

Score of ovary dimensions.

cher Korrelation zur Progestagenapplikation war die äußere Rossesymptomatik wie Duldungsverhalten und Konfiguration des äußeren Genitale eindeutig nicht vorhanden. Nach Absetzen der Behandlung setzte die Rossesymptomatik bereits nach 2 Tagen mit deutlicher Ausprägung ein und sistierte innerhalb von 24 Stunden nach festgestellter Ovulation.

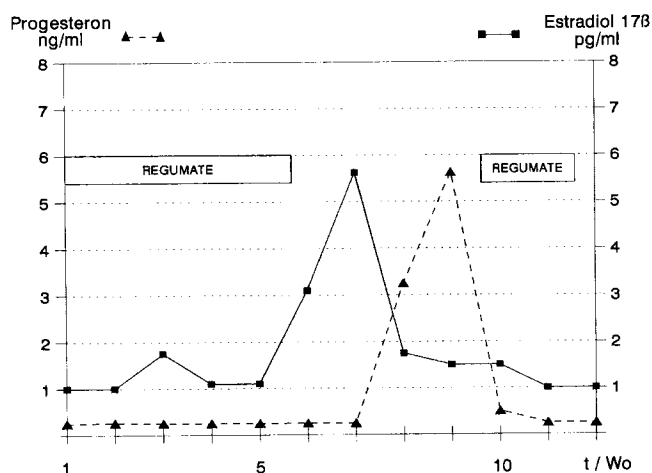
### Ovar-Score

Die Ovardimensionen zeigten bei den Stuten beider Behandlungsregime eine signifikante Reduzierung unmittelbar nach Beginn der jeweils ersten Behandlungsperiode, wie sich dies im Score ausdrückt (Abb. 1). Auch im späteren Verlauf der Untersuchungsanordnung wird eine behandlungssynchrone Suppression des Scores deutlich. Insgesamt wurde im Trend ein allmählicher Anstieg der Ovardimensionen über den Untersuchungszeitraum hin erkennbar.

### Sexual-Steroidhormone

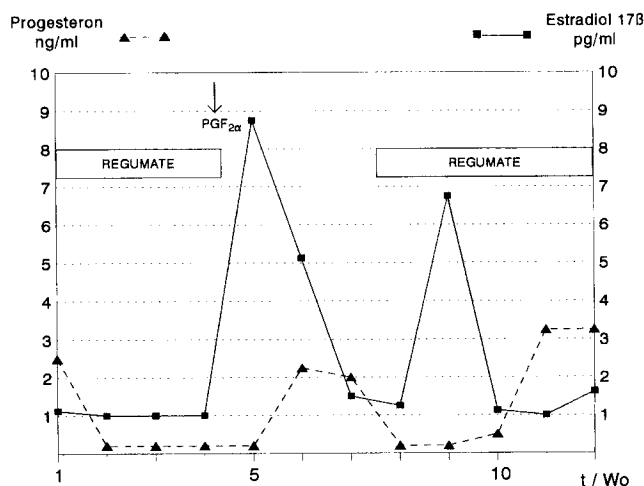
Die jeweils mitgemessenen Testosteronwerte betragen bei den Stuten beider Behandlungsregime durchgehend im Mittel  $0,012 \pm 0,003$  ng/ml.

Die Östradiol 17 $\beta$ - und Progesteronwerte waren bei den Stute A–B unter der Regumate®-Applikation stets auf basalem Niveau (Abb. 2a). Nach Entzug der Behandlung stieg Östrogen signifikant auf östrische Werte an, um dann im periovulatorischen Bereich wieder abzufallen. In diesem Zeitabschnitt stiegen auch die Progesteronwerte signifikant



**Abb. 2a:** Blutöstrogen und -progesteron-Konzentrationen während der verschiedenen Behandlungsphasen und Pausen der Stuten A-B.

Blood oestrogens and progesterone during the different treatment periods and intervals of mares A-B.



**Abb. 2b:** Blutöstrogen und -progesteron-Konzentration während der verschiedenen Behandlungsphasen und Pausen der Stuten C-D.

Blood oestrogens and progesterone during the different treatments periods and intervals of mares C-D.

an, die dann unter der zweiten Behandlungsserie mit Regumate® wiederum signifikant abfielen. Bei den Stuten C-D mit einem abgeänderten Behandlungsregime (Abb. 2b) ist der zeitliche Verlauf beider Hormone gleich denen der anderen Stutengruppe. Im Abschnitt der zweiten Regumate®-Applikation wurde jedoch bei gleichzeitig basalen Progesteronwerten ein Östrogenanstieg beobachtet, gefolgt von einem Ansteigen der Progesteronwerte.

#### Histologie

Die Biopsieproben, die Anfang Januar vor Behandlungsbeginn entnommen wurden, zeigen das typische Bild der saisonalen Inaktivität.

Nach Therapiebeginn setzt eine sich steigernde ungleichmäßige Sekretion ein. Die Drüsendichte nimmt zu, ihre Lumina weiten sich, das Zytoplasma erscheint feinvakuolig bis

schaumig. Die Zellgrenzen der Drüsenepithelien zum Lumen verlaufen unscharf. Die Epithelzellkerne weisen eine Polymorphie und Depolarisierung auf (Abb. 3). Bei einer Stute sind nach vierwöchiger Regumate®-Therapie Mitosen feststellbar.



**Abb. 3:** Irregulär differenzierte Uterindrüsen mit überdeutlicher Sekretionsmorphologie und weiten Lumina, Kerne polymorph und depolarisiert. (H-E Färbung, Gerätevergrößerung 300 x)

Irregular differentiation of glandular epithelia with signs of abundant secretion, widened lumina and polymorphous nuclei, some in depolarised positions. (H-E staining, magnification 300 x)

In der Therapiepause sind Anzeichen einer ungleichmäßig proliferativen Aktivität zu erkennen. Neben kollabierten Drüsenlumina lassen sich um den Ovulationstermin Mitosen nachweisen. Ein typisches Rosseödem der Mukosa ist bei keiner Stute ausgebildet.

Nach der Ovulation setzt eine relativ gleichmäßige Sekretion der Drüsen ein, die unter Einfluß der zweiten Regumate®-Applikation unregelmäßiger und insgesamt weniger ausgeprägt erscheint, verglichen mit der während der ersten Therapie. Bei einer Stute sind zwei Wochen nach Beginn dieser Therapiephase Mitosen in den Drüsenepithelien nachzuweisen.

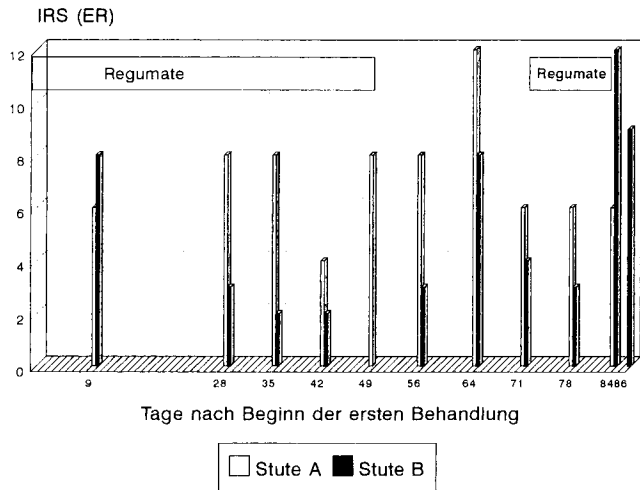
Zum Ende der zweiten Behandlungsperiode fällt die Aktivität des Endometriums ab, die Drüsen werden kleiner mit engen Lumina und kleinen dunklen Kernen.

Bei allen vier Stuten ist zwei bis drei Wochen nach Beginn der ersten Behandlung eine deutliche oberflächliche, teils exsudative Endometritis unter Beteiligung zahlreicher eosinophiler Granulozyten nachzuweisen. Diese hält bis zur sechsten bzw. siebten Woche an. Sie tritt bei keiner Stute wieder auf, auch nicht während der zweiten Behandlungsphase.

Die Kontrollbiopsien drei Monate nach Absetzen der Behandlung ergaben bei zwei Stuten (jeweils eine pro Gruppe) zum Zeitpunkt der Follikelphase eine irreguläre glanduläre Differenzierung mit hyperplastischen glandulären Epithelien sowie einer mäßig ausgeprägten Polymorphie der teils depolarisierten Kerne.

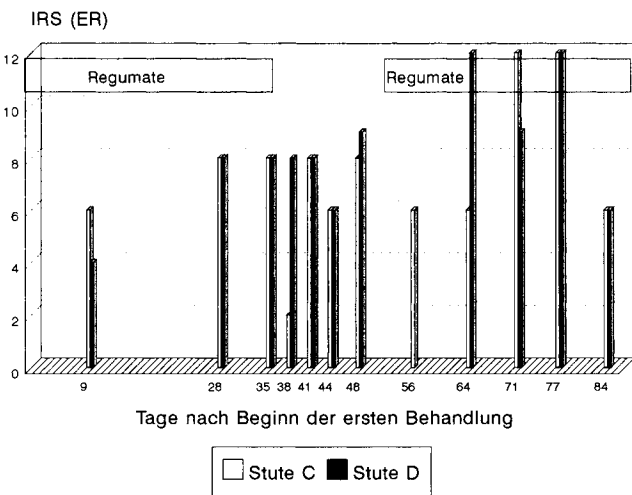
#### Immunhistologie

Der Östrogenrezeptornachweis in den Drüsenepithelien (Abb. 4a und 4b) bewegt sich bei drei Stuten während des



**Abb. 4a:** Immunhistologischer Östrogenrezeptorstatus (IRS) der Drüsenepithelien der Stuten A und B.

Immunohistological oestrogen receptor status (IRS) of the glandular epithelia (mares A and B).

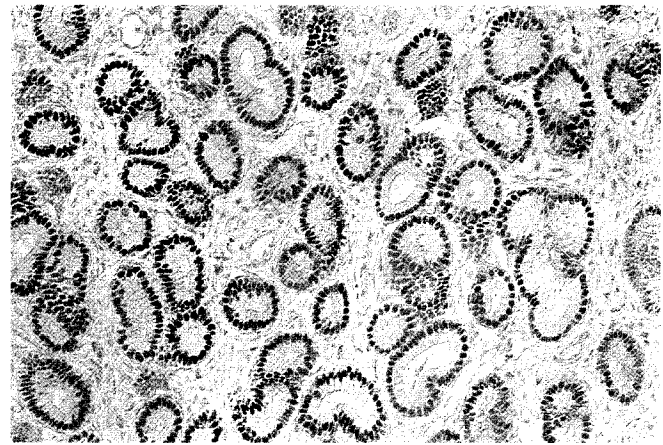


**Abb. 4b:** Immunhistologischer Östrogenrezeptorstatus (IRS) der Drüsenepithelien der Stuten C und D.

Immunohistological oestrogen receptor status (IRS) of the glandular epithelia (mares C and D).

ersten Therapieintervalls auf anfangs mittlerem, später hohem Niveau, eine Ausnahme bildet Stute B mit niedrigen Werten. Nach dem Absetzen des Regumate® ist bei den Stuten A und B ein deutlicher Peak um den Ovulationstermin zu erkennen. Die Stuten C und D zeigen im Verlauf der zweiten Behandlung, zeitlich versetzt, einen starken Anstieg des Östrogenrezeptorgehaltes (Abb. 5), dieser bleibt bei den Stuten A und B aus. Nach Therapieende tritt ausschließlich bei der Stute B ein Peak auf.

Die Progesteronrezeptoren der Drüsenepithelien zeigen während des ersten Therapieintervalls bei allen vier Patientinnen individuell sehr unterschiedliche Verläufe (Abb. 6a und 6b). In der Therapiepause läßt sich um den Ovulationstermin ein deutlicher Anstieg bei allen Probanden erkennen. Bei den Stuten A, C und D bildet sich während der zweiten Behandlungsphase anfangs ein Plateau auf hohem Niveau



**Abb. 5:** Immunhistologischer Östrogenrezeptornachweis hoher Immunreaktiver Score der Drüsenepithelien, annähernd alle Kerne reagieren mit hoher Farbintensität positiv. (Östrogenrezeptornachweis, PAP-Technik, Gerätevergrößerung 120 x)

Immunohistology of oestrogen receptors high reactivity of the glandular epithelia, nearly 100 % of the nuclei react positively showing a high staining intensity. (Oestrogen receptor, PAP technique magnification 120 x)

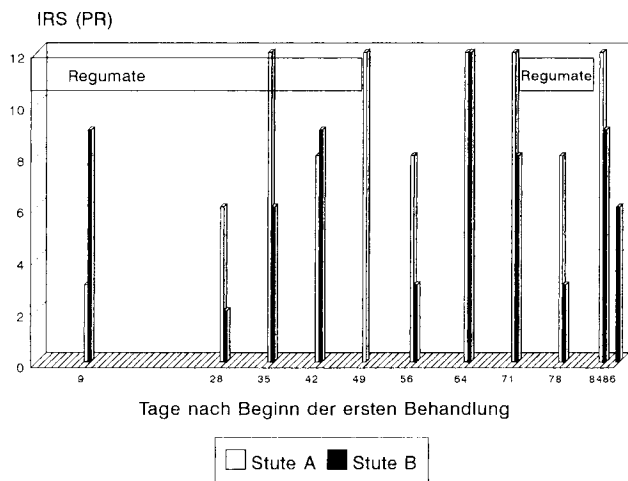
aus, die Werte fallen bei den Stuten B, C und D zum Therapieende in den mittleren Bereich ab (Abb. 7).



**Abb. 7:** Immunhistologischer Progesteronrezeptornachweis mittlerer Immunreaktiver Score der Drüsenepithelien, zahlreiche Kerne reagieren mit mittlerer Färbintensität. (Progesteronrezeptornachweis, PAP-Technik, Gerätevergrößerung 120 x)

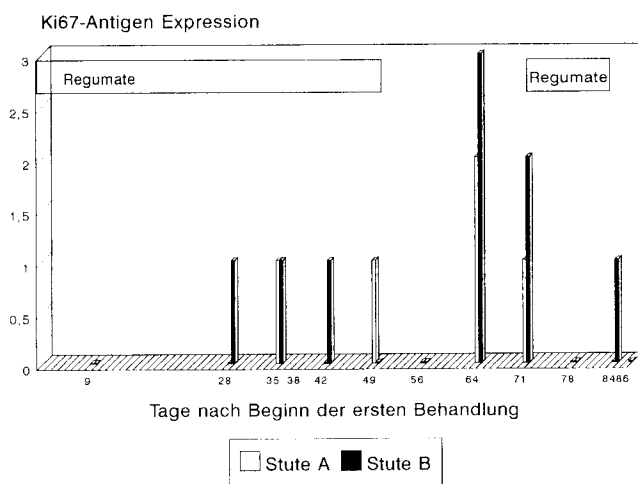
Immunohistology of progesterone receptors moderate reactivity of the glandular epithelia, numerous nuclei show a moderate staining intensity. (Progesterone receptor, PAP technique magnification 120 x)

Die Expression des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen (Abb. 8a und 8b) zeigt einen deutlichen behandlungsassoziierten Verlauf: während des ersten Therapieintervalls reagieren die Drüsen negativ bzw. geringgradig positiv (Abb. 9). Nach Absetzen des Regumate® sind unterschiedliche Intensitäten nachzuweisen: während bei drei Stuten eine deutliche bis sehr deutliche Expression um den Ovulationstermin zu erkennen ist, bleibt Stute C negativ. Die Stuten A



**Abb. 6a:** Immunhistologischer Progesteronrezeptorstatus (IRS) der Drüsenepithelien der Stuten A und B.

Immunohistological progesterone receptor status (IRS) of the glandular epithelia (mares A and B).



**Abb. 6b:** Immunhistologischer Progesteronrezeptorstatus (IRS) der Drüsenepithelien der Stuten C und D.

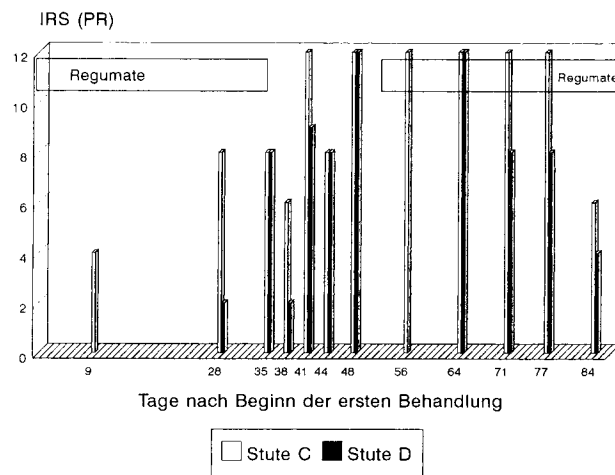
Immunohistological progesterone receptor status (IRS) of the glandular epithelia (mares C and D).

und B besitzen während des zweiten Therapieintervalls keine positiven Zellen, C und D dagegen weisen anfangs gering- bis mittelgradige Aktivitäten auf.

**Diskussion**

Die suppressive Wirkung des progestagenen Regumate® auf das Geschlechtsverhalten war eindeutig und bestätigt sowohl Ergebnisse aus eigener Beobachtung als auch aus Literaturberichten (Webel und Squires, 1982; Paul et al. 1995). Es ist somit ein geeignetes Verfahren zur Manipulation der äußeren Rossesymptomatik mit dem gleichzeitigen Vorteil jedes beliebigen Entzugs.

Die initiale Reduzierung des Ovar-Scores ist auffällig und dürfte in erster Linie durch graduelle Regression der mittel-

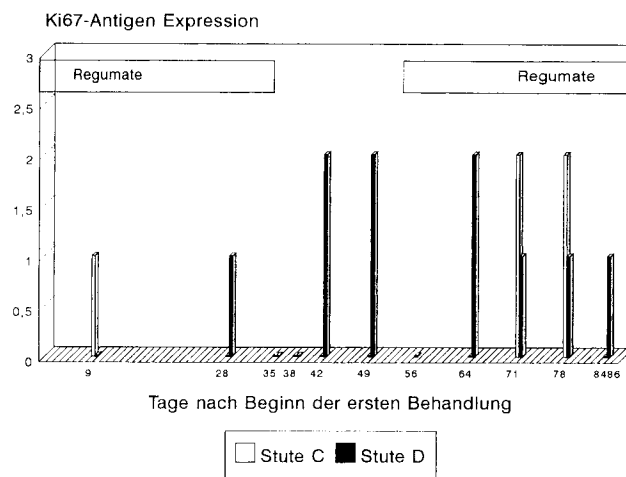


**Abb. 8a:** Expression des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen in den Drüsenepithelien der Stuten A und B - Immunhistologie.

(0 = negativ; 1 = geringgradig positiv; 2 = mittelgradig positiv; 3 = hochgradig positiv)

Glandular epithelia expression of the proliferation marker Ki67 antigen (mares A and B).

(0 = negativ; 1 = low reactivity; 2 = moderate activity; 3 = high reactivity)



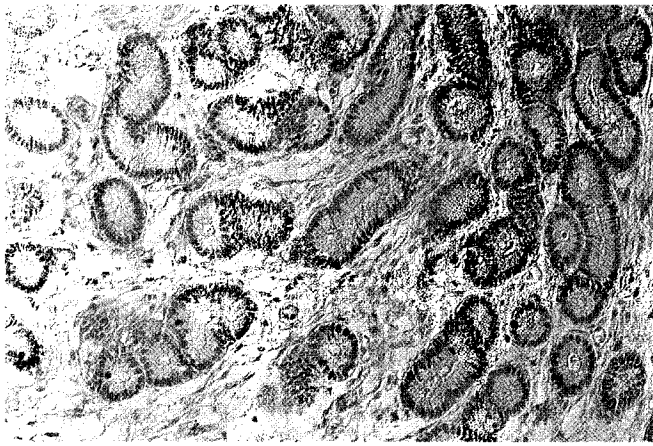
**Abb. 8b:** Expression des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen in den Drüsenepithelien der Stuten C und D - Immunhistologie.

(0 = negativ; 1 = geringgradig positiv; 2 = mittelgradig positiv; 3 = hochgradig positiv)

Glandular epithelia expression of the proliferation marker Ki67 antigen (mares C and D).

(0 = negativ; 1 = low reactivity; 2 = moderate activity; 3 = high reactivity)

großen Ovarfollikel-Population infolge der progestagen-induzierten Blockade des Hypothalamus-Hypophysen-Komplexes und dem damit verbundenen Sistieren des zirkulierenden gonadotropen Luteinisierungshormon LH bedingt sein. Da Progestagene keinen nennenswerten inhibitorischen Effekt auf FSH besitzen und die Probandinnen zu Behandlungsbeginn über mittelgroße bis große Follikel verfügten, kann die Blockade nur über die Hemmung von LH



**Abb. 9:** Immunhistologischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen; lediglich einzelne glanduläre Epithelien besitzen positiv reagierende Kerne. (Ki67 Antigen Expression, PAP-Technik, Gerätevergrößerung 120 x)

Immunohistological expression of the proliferation marker Ki67 antigen; only a few epithelial nuclei react positively. (Expression of Ki67 antigen, PAP technique magnification 120 x)

im Sinne des Ausbleibens der finalen Follikelreifung, die in die Follikelatresie führen kann.

Behandlungssynchron sind nur niedrige Progesteronwerte bei den Stuten beider Behandlungsregime gemessen worden. Da Regumate® nicht mit endogenem Progesteron interagiert (Squires et al. 1979) dürfte es sich um eine behandlungsbedingte Suppression endogenem Progesterons handeln, die dem natürlichen Progesteron gleichkommt (Stabenfeld et al. 1975). Auffallend ist auch die zeitkorrelierte Östrogenniedrigphase zur Regumate®-Applikation. Sofort nach Absetzen des Präparates steigen die Östradiolwerte signifikant an, um dann mit der Ovulation folgerichtig abzufallen. Hier ist zu vermuten, daß die Ovarfollikel durch das Medikament über die LH-Hemmung in ihrer Entwicklung sistieren und nicht atresieren, sondern unter Wegfall des negativen Feedbacks im Reifungsprozess sehr schnell voranschreiten und zur Östrogensynthese befähigt werden. Bei den Stuten C und D gipfelt die Östradiolkurve ein zweites Mal bereits unter erneuter Regumate®-Behandlung. Dieser Wert ist durch eine Zweitfollikelbildung dieser Stuten bedingt, die noch im Behandlungsintervall einen weiteren dominierenden Follikel entwickelten und zu Beginn der zweiten Regumate®-Behandlung noch aufwiesen und auch ovulierten. Diese Stuten zeigten jedoch keinerlei äußere Rossesymptomatik. Es ist bekannt, daß exogen zugeführte Progestagene nicht immer die finale Follikelentwicklung einschließlich Ovulation unterdrücken können (Lübbecke 1992).

Die Effekte der hormonellen Intervention auf die Funktionsmorphologie des Endometriums erweisen sich, im Gegensatz zu den klinischen und endokrinologischen Befunden, als derzeit schwer interpretierbar. Die Gründe hierfür dürften in mehreren Tatsachen begründet sein:

Es handelt sich um ein sehr kleines Untersuchungsmaterial, wobei die bei der Stute vorkommenden großen individuellen Schwankungen besonders ins Gewicht fallen.

Es ergeben sich überlagernde Effekte durch die Therapie zum Zeitpunkt des Übergangs Winteranöstrus – physiologische Decksaison. Während dieser sog. „Übergangszyklen“ wird bereits physiologischerweise eine Irregularität hinsichtlich der endometrialen Differenzierung beobachtet (Schoon et al. 1994).

Seitens der Literatur können, aufgrund der für das Pferd neu etablierten immunhistologischen Methoden (Aupperle et al. 1997), keine direkt vergleichbaren Arbeiten herangezogen werden.

Nur wenige Informationen liegen zum physiologischen endometrialen Rezeptorstatus bei der Stute vor. Die Ergebnisse sind darüber hinaus aufgrund unterschiedlicher analytischer Verfahren nicht oder nur bedingt vergleichbar (Brunckhorst et al. 1991: nukleäre Östrogenrezeptoren, Immunhistologie, ER-ICA; Tomanelli et al. 1991: lösliche zytosolische Östrogen-/Progesteronrezeptorfraction, modif. DCC-Technik; Watson et al. 1992: nukleäre Östrogen-/Progesteronrezeptoren, Immunhistologie, ER-ICA, Vectastain; Badino und Novelli 1995: lösliche zytosolische Östrogen-/Progesteronrezeptorfraction, modif. DCC-Technik; Grünig und Atczak 1995: nukleäre Östrogen-/Progesteronrezeptoren, ABC-Technik). Für die Beurteilung der equinen endometrialen Proliferationskinetik wurden erst durch die eigene Arbeitsgruppe entsprechende Normwerte für den ungestörten Zyklus erarbeitet (Aupperle et al. 1997, Raila et al. 1997). Ausschließlich auf morphometrischer Basis liegen Angaben zum Effekt einer Hormontherapie mit Östrogen und Progesteron auf die Differenzierung des equinen Endometriums vor, allerdings nur bei ovariektomierten Stuten (Strankmeyer 1993).

Beim Pferd wird, da die Auswirkungen hormoneller Interventionen auf der Rezeptorebene bisher so gut wie nicht untersucht wurden, somit methodisch-inhaltliches Neuland beschritten. Analogieschlüsse von anderen Spezies sind aufgrund der biologischen Variabilität nur eingeschränkt möglich.

So scheinen auch die beim Menschen beschriebenen quantitativ variablen, jedoch qualitativ identischen zeitabhängigen Effekte einer Gestagenapplikation (Übersicht: Dallenbach-Hellweg 1987) für die Stute nur eingeschränkt zuzutreffen: Nur die für eine Dauer von <4 Wochen als typisch angesehene „persistierende Sekretionsphase mit Unterdrückung der Proliferation“ kommt vor, nicht jedoch die weiteren Effekte einer längeren Therapie: „arrested“ Proliferation mit herabgesetzter Sekretionsaktivität, progressive Atrophie und „starre“ Sekretion (>3Mon. Dauerapplikation) bis hin zur irreversiblen endometrialen Atrophie. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, erwiesen sich selbst die Folgen einer viermonatigen Therapie (Chlormadinonazetat, gefolgt von Allyltrenbulon) bei Stuten als noch reversibel.

Regumate® führt, unabhängig vom Therapieschema, zu einer irregulären glandulären Differenzierung mit kontinuierlich ausgeprägter Sekretionsmorphologie und geringradiger Proliferationsaktivität. Letztere ist hinsichtlich ihrer Ausprägung den Befunden im Interöstrus (Tag 9–13) während des physiologischen Zyklus vergleichbar (Aupperle et al. 1997).



Die Progestagen-Applikation führt auf Rezeptorebene nicht zu einem Bild, welches dem des physiologischen Östrus (Aupperle et al. 1997) sowie einer Frühgravidität (d15, d14) vergleichbar wäre (Tomanelli et al. 1991, Watson et al. 1992), auch nicht späteren Phasen der Trächtigkeit (d38–87), die durch eine deutlichere nukleäre Expression von Progesteronrezeptoren gekennzeichnet sind (Grüning und Antczak 1995). Die Ergebnisse von Grüning und Antczak (1995) widersprechen jedoch denen von Bracher (1992). Sie wies, allerdings mittels anderer Verfahren, eine um das Fünf–Sechsfache gegenüber den Werten des Östrus reduzierte Konzentration der Progesteronrezeptoren aus einem endometrialen Zytosolextrakt von tragenden Stuten zwischen dem 30. und 100. Tag nach. Im eigenen Versuchsansatz treten statt dessen während des ersten Behandlungszyklus starke Schwankungen auf, die ihr morphologisches Äquivalentbild in einer irregulären glandulären Differenzierung finden.

Während der Therapiepause erweist sich das Endometrium, phasensynchron zum Anstieg des 17beta-Östradiols, zwar als reaktiv mit einer erhöhten Proliferationsaktivität sowie entsprechenden Peaks der Steroidhormonrezeptoren, ist jedoch hinsichtlich der Morphologie dem physiologischen Zyklus im Östrus nur bedingt vergleichbar.

Während des zweiten Behandlungsintervalls kommt es zu einem kurzfristig stimulierenden Effekt sowohl auf die Proliferation als auch auf die Expression der Östrogenrezeptoren der Stuten C und D, darüber hinaus in beiden Gruppen auf die Expression der Progesteronrezeptoren. Diese Phase wird abgelöst von einer insgesamt herabgesetzten Aktivität aller Parameter zum Therapieende.

Zwei Stuten (je eine pro Gruppe) zeigen auch drei Monate nach Therapieende eine irreguläre glanduläre Differenzierung, deren Fertilitätsrelevanz jedoch derzeit nicht abschließend beurteilt werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Regumate®-Applikation eine erhebliche Beeinflussung der endometrialen Funktionsmorphologie bewirkt, die sich nur bei zwei Patientinnen während des Untersuchungszeitraumes, unabhängig vom Behandlungsregime, als reversibel erweist. Sie ist gekennzeichnet durch eine irreguläre, keinem physiologischen Zyklusstand zuzuordnende Differenzierung. Diese Studie verdeutlicht die Sensitivität histopathologischer Untersuchungen von Biopsieproben auch für die Diagnostik von Funktionsanomalien und Differenzierungsstörungen. Diese komplementäre Untersuchungstechnik erfüllt somit auch die Bedingungen eines empfindlichen „Bio-Essays“, mit deren Hilfe es möglich ist, die Hormonwirkung am Zielorgan zuverlässig zu diagnostizieren (Dallenbach-Hellweg 1987). Dies gelingt besonders dann, wenn histologische und immunhistologische Verfahren, auch für die Routine, kombiniert einsetzbar zur Verfügung stehen.

Von besonderem klinischen Interesse ist die Entwicklung der subklinischen Endometritis, die sich bei allen Stuten initial einstellte und dann spontan verschwand. Es dürfte sich hierbei um eine intrauterine Präsentation und Mobilisierung latent vorhandener Keime unter dem exogen zugefügten zugeführten Progestagen handeln, auf die die Abwehrme-

chanismen des Endometriums reagieren. Es ist nach den Untersuchungen von Colbern et al. (1987) die zeitliche Korrelation von Progesteronphase und Keimanwesenheit dokumentiert. Hier bietet sich möglicherweise ein empfindliches Modell zur Überprüfung latenter uteriner Keimbeseidlung an. Eine Langzeitapplikation mit dem geprüften Präparat sollte bei Zuchtstuten nur unter endometrio-histologischer Kontrolle durchgeführt oder durch regelmäßige behandlungsfreie Intervalle unterbrochen werden.

## Literatur

- Alexander, S. L. and C. H. G. Irvine (1991): Control of onset of breeding season in the mare and its artificial regulation by progesterone treatment. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44, 307–319
- Allen, W. R. (1984): Is your progesterone therapy really necessary? *Equine Vet. J.*, 16, 496–498
- Allen, W. R., V. Urwin, D. J. Simpson, R. E. S. Greenwood, R. C. Crowhurst, D. R. Ellis, S. W. Ricketts, M. D. N. Hunt and N. J. Wingfield Digby (1980): Preliminary studies on the use of oral progestogen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares. *Equine Vet. J.* 12, 141–145
- Aupperle, H., A. Tannapfel, S. Özgen und H.-A. Schoon (1997): Immunhistologischer Nachweis des Proliferationsmarkers ki-67 und von Hormonrezeptoren im Endometrium der Stute. DVG-Fachgruppe „Allgemeine und Spezielle Pathologie“, 40. Tagung, 20. Mai 1997, Berlin, Zusammenfassung: Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.: im Druck
- Badino, G.R.P. and A. Novelli (1995): Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. *Res. vet. Sci.* 59, 214–218
- Ball, B. A., T. V. Little, R. B. Hillman and G. L. Woods (1986): Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology*, 26, 611–619
- Bracher, V. (1992): Equine endometritis. Cambridge, U.K., PhD Thesis
- Bristol, F., K. A. Jacobs and V. Pawlyshyn (1983): Synchronization of estrus on post-partum mares with progesterone and estradiol-17β. *Theriogenology*, 19, 779–785
- Bristol, F. (1981): Studies on estrous synchronization in mares. *Proc. Soc. Theriogenology*, 258–264
- Brunckhorst, D., H.-A. Schoon, H. Bader und H. Sieme (1991): Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität*, 7, 44–51
- Colbern, G. T., J. L. Voss, E. L. Squires, R. P. Elli, R. K. Shideler and A. E. McChesney (1987): Development of a model to study endometritis in mares. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 73–76
- Dallenbach-Hellweg, G. (1987): Histopathology of the endometrium. Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 4. Auflage
- Ginther, O. J. (1985): Embryonic loss in mares: Incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. *Theriogenology* 23, 77–89
- Ginther, O. J., D. R. Bergfeld, G. S. Leith and S. T. Scraba (1985): Embryonic loss in mares: Incidence and ultrasonic morphology. *Theriogenology*, 24, 73–86
- Grüning, G. and D. F. Antczak (1995): Progesterone receptors are differentially expressed by the glandular epithelium in the endometrium and the endometrial cups of the mare. *Biol. Reprod. Mono.* 1, Equine Reproduct. VI, 1, 191–199
- Grüninger, Ulrike (1996): Zur Pathogenese von Angiopathien im Endometrium der Stute – Morphologisch-funktionelle Untersuchungen. Univ. Leipzig, Vet. Med. Diss.
- Günzel, A. and H. Merkt (1979): Oestrus and Fertility Following Progestagen Treatment of Mares showing Clinical Evidence of Early Pregnancy Failure. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27, 453–455
- Hinrichs, K., P. L. Sertich, M. R. Cummings and R. M. Kenney (1985): Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. *Equine Vet. J. Suppl.* 3, 74–75



- Jackson, S. A., E. L. Squires and T. M. Nett (1986): The effect of exogenous progesterone on endogenous progesterone secretion in pregnant mares. *Theriogenology* 25, 275–279
- Loy, R. G., M. J. Pemstein and T. B. Taylor (1982): Effect of injected ovarian steroids on reproductive patterns and performance in post-partum mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32, 199–204
- Lübbecke, M. (1992): Untersuchungen zur Ovulationssynchronisation bei der Stute. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Lübbecke, M., E. Klug, H. O. Hoppen and W. Jöchle (1994): Attempts to Synchronize Estrus and Ovulation in Mares Using Progesterone (CIDR-B) and GnRH-Analog Deslorelin. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 395–314
- McKinnon, A. O., E. L. Squires, E. M. Carnevale and M. S. Hermet (1988): Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestin in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, 29, 1055–1063
- Merkt, H. (1974): Probleme der Fruchtbarkeit beim Pferd. *Tierärztliche Umsch.*, 29, 112–116
- Nitschelm und van der Horst (1976): Hormonal pattern in the blood of eight mares during the first weeks of pregnancy. *Tijdsch. Diergesk.*, 101, 83–89
- Noden, Patricia A., W. D. Oxender and H. D. Hafs (1975): The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 23, 189–192
- Palmer, E. (1979): Reproductive management of mares without detection of oestrus. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27, 263–270
- Pary-Weeks, L. D. and D. W. Holtan (1987): Effect of altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronized equine embryo recipients. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 35; 433–438
- Paul, W. P., J. R. Rains and F. D. Lehman (1995): The Use and Misuse of Progestins in the mare. *Equine Practice* 17, 21
- Raila, G., H.-A. Schoon, D. Schoon, S. Özgen, H. Aupperle, E. Klug and O. Strankmeyer (1997): The equine endometrial cycle: a morphometrical, ultrastructural, enzyme- and immunohistological investigation. *Am. Soc. Anim. Sci. (ASAS), Annual meeting*, 29. Juli-1. August 1997, Nashville, Tennessee, USA; Zusammenfassung: Proceedings, im Druck
- Remmele, W. und H. E. Stegner (1987): Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe – Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Frauenarzt* 2, 41–43
- Runge, A. (1995): Zur Repräsentanz histopathologischer Untersuchungsbefunde an Uterusbiopsieproben bei der Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute. Leipzig, Vet. med. Diss.
- Schoon, H. A., D. Schoon und E. Klug (1992): Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* 8, (6), 355–362
- Schoon, H.-A., D. Schoon und E. Klug (1994): Klinische Pathologie, Diagnostik und Terminologie endometrial bedingter Fertilitätsstörungen beim Pferd. *DVG-Tagungsbericht*, 13. Arbeitstagung „Fachgruppe Pferdekrankheiten“, Wiesbaden, 1–16
- Shideler, R. K., E. L. Squires, J. L. Voss, D. J. Eickenberry and B. W. Pickett (1982): Progestagen therapy of ovariectomized mares. *J. Reprod. Fert.* 32, 459–464
- Shideler, R. K., E. L. Squires, J. L. Voss, D. J. Eickenberry and B. W. Pickett (1982): Progestagen therapy ovariectomized pregnant mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32, 459–464
- Squires, E. L., W. B. Stevens, D. E. McGlothlin and B. W. Pickett (1979): Effect of an oral progestin on the estrous cycle and fertility of mares. *J. Anim. Sci.* 49, 729–735
- Stabenfeldt, G. H., J. P. Hughes, J. W. Evans and I. I. Geschwind (1975): Unique aspects of the reproductive cycle of the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23, 155–160
- Stolla, R. und W. Leidl (1979): Zur Progesteronsubstitution während der Frühgravidität der Stute am Modell des PGF2alpha-induzierten Fruchttodes. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 92, 309–312
- Strankmeyer, O. (1993): Morphometrische Untersuchungen am Endometrium zyklischer und ovariektomierter, hormonbehandelter Stuten. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.
- Tomanelli, R. N., P. L. Sertich and E.D. Watson (1991): Soluble oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* 44, 267–273
- Washburn, S. M., P. H. Klesius, V. K. Ganjam and B. G. Brown (1982): Effect of estrogen and progesterone on the phagocytic response of ovariectomized mares infected in utero with B-hemolytic *Streptococci*. *Am. J. Vet. Res.*, 43, 1367–1375
- Watson, E. D., S. B. Skolnik and H. G. Zanecosky (1992): Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* 38, 575–580
- Webel, S. K. (1975): Estrous control in horses with a progestin. *J. Anim. Sci.* 41, 385
- Webel, S. K. and E. L. Squires (1982): Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32, 193–198

E. Klug  
C.P. Bartmann  
A. Schöning

Klinik für Pferde  
Tierärztliche Hochschule Hannover  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover

Tel. 0511-856 7589  
Fax 0511- 856-7681

Doris Schoon  
H. A. Schoon

Institut für Veterinär-Pathologie  
Universität Leipzig  
Margarete Blank Str. 4  
04103 Leipzig

Tel. 0341- 97 38 270  
Fax 0341- 97 38 299