

Wirkung von N-Acetylcystein auf die Entstehung einer belegungsinduzierten persistierenden Endometritis bei Stuten mit gestörter uteriner Clearance – eine Pilotstudie

Elisa Melkus^{1,2}, Tanja Semira Witte¹, Katharina Deichsel² und Christine Aurich²

Tierklinik für Fortpflanzung, Freie Universität, Berlin, Deutschland¹ und Besamungs- und Embryotransferstation, Veterinärmedizinische Universität, Wien, Österreich²

Zusammenfassung

Die belegungsinduzierte Endometritis (persistent mating-induced endometritis, PMIE) beim Pferd geht in einer Vielzahl von Fällen mit herabgesetzten Trächtigkeitsraten einher. Die derzeitige Therapie der PMIE besteht in Maßnahmen zur Förderung der uterinen Clearance wie Spülung der Gebärmutter mit 0,9 %iger NaCl-Lösung oder Verabreichung von uterotonischen Substanzen. Die vorliegende Pilotstudie hatte das Ziel, Wirksamkeit einer neuen Therapie der PMIE zu untersuchen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die orale Verabreichung des Mukolytikums N-Acetylcystein (NAC) einen hemmenden Effekt auf das Auftreten der PMIE und positive Effekte auf die Trächtigkeitsraten der davon betroffenen Stuten hat. Für die Studie standen 20 Stuten aus dem Patientengut der Besamungs- und Embryotransferstation der Vetmeduni Wien zur Verfügung, die abwechselnd einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe zugewiesen wurden. Alle Stuten litten vorberichtlich an einer PMIE. Bei Auftreten eines dominanten Rossefollikels erfolgte die Entnahme von Endometriumsproben zur bakteriologischen und zytologischen Untersuchung sowie die Ovulationsinduktion mittels humanem Choriongonadotropin (hCG). Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Stuten zweimal täglich mit dem Uterotonikum Depotocin behandelt. Die Stuten der Behandlungsgruppe erhielten zudem zweimal täglich NAC (10 mg/kg p.o.). Die Stuten wurden mit gekühlt-transportiertem Hengstsamen besamt. Am Tag nach Feststellung der Ovulation wurden wiederum Endometriumsproben zur bakteriologischen und zytologischen Untersuchung entnommen. Die Trächtigkeitsuntersuchung wurde 14-18 Tage nach der Ovulation durchgeführt. Im Mittel enthielten die zytologischen Ausstriche von Stuten der Kontrollgruppe am Tag der hCG-Injektion $1,2 \pm 0,7$ % polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), postovulatorisch wurde mit $1,8 \pm 1,1$ % PMN ein statistisch signifikanter Anstieg nachgewiesen ($p < 0,05$). In der Behandlungsgruppe wurden vor Behandlungsbeginn $3,8 \pm 2,4$ % PMN und postovulatorisch $1,8 \pm 0,9$ % PMN nachgewiesen (n.s.). In der Kontrollgruppe wurden 4 von 10 Stuten als tragend befunden, in der Behandlungsgruppe waren es 7 von 10 Stuten (n.s.). Weitere Untersuchungen an größeren Probandenzahlen erscheinen sinnvoll, um eine positive Wirkung von N-Acetylcystein auf die Entstehung einer belegungsinduzierten persistierenden Endometritis bei Stuten mit gestörter uteriner Clearance zu bestätigen.

Schlüsselwörter: N-Acetylcystein / Stute / Reproduktion / persistierende Endometritis / uterine Clearance / belegungsinduziert

Impact of N-Acetylcystein on fertility of mares suffering from persistent mating induced endometritis

Persistent mating induced endometritis (PMIE) is a major cause of infertility in mares. Routine therapies such as post-breeding uterine lavage with saline or administration of oxytocin or prostaglandin (PGF₂) often fail to eliminate uterine infection. In a pilot study we wanted to investigate the effect of an oral administration of the mucolytic N-Acetylcystein (NAC) as a new treatment for mares with a history of PMIE. Mares (n = 20) were assigned in alternating order to a treatment or a control group. At the beginning of oestrus uterine samples for bacteriology and cytology were collected. Furthermore, mares received human chorion gonadotropin. From this time point, all mares were treated with depotocin twice daily. In addition, mares of the treatment group received NAC (10 mg/kg p.o.) twice daily. Mares were inseminated with cooled-stored semen. A second collection of uterine samples for bacteriology and cytology was performed one day after ovulation. Uterine swabs revealed no bacterial growth. In control mares, the percentage of polymorphnuclear neutrophils (PMN) in cytology was 1.2 ± 0.7 % before AI and 1.8 ± 1.1 % after ovulation (n.s.). In NAC-treated mares, 3.8 ± 2.4 % PMN before AI and 1.8 ± 0.9 % after ovulation were seen (n.s.). At 14-18 days after ovulation, 4 of 10 mares in the control group and 7 of 10 mares in the treatment group were pregnant. Further studies should be performed to verify the positive effect of N-Acetylcystein on fertility of mares suffering from persistent mating induced endometritis.

Keywords: N-Acetylcystein / mare / reproduction / persistent endometritis / mating induced / uterine clearance / infertility

Einleitung

Eine vorübergehende Entzündungsreaktion des Uterus nach der Besamung stellt eine physiologische Reaktion dar (Watson et al. 2001). Überschüssige Spermien, Bakterien, Seminalplasma und Verdünner werden durch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (PMN) und Kontraktionen des Myometriums bei offener Zervix eliminiert, was man als uterine Clearance bezeichnet. Dauert diese Entzündungsreaktion jedoch länger als 48 h nach der Insemination an, besteht der Verdacht, dass die Stute an einer belegungsinduzierten Endometri-

tis (persistent mating induced endometritis, PMIE; Troedsson 1999, Causey 2006, LeBlanc 2010) leidet. Durch eine verminderte Aktivität des Myometriums, eine zu geringe Öffnung der Zervix und einen erhöhten Einstrom von PMN neigen betroffene Stuten zu einer Retention von Flüssigkeit und Fremdmaterial in der Gebärmutter (Troedsson 1999, Causey 2006, LeBlanc und Causey 2009). Die PMIE stellt ein wesentliches Problem in der Reproduktionsmedizin der Stute dar (Gores-Lindholm et al. 2009). Dieser Zustand trägt zu verminderten Trächtigkeitsraten bei, denn eine erhöhte Flüssig-

keits- und Mukusmenge im Uterus führt zu einer verzögerten Spermienpassage zum Eileiter, einer Reizung des Endometriums und einem erhöhten Infektionsrisiko (Causey 2007, LeBlanc und Causey 2009). Die Trächtigkeitsraten bei Stuten, die 48 h nach der Besamung intrauterine Flüssigkeit aufweisen, liegen bei 49 %. Dagegen beträgt sie bei Stuten ohne intrauterine Flüssigkeit nach der Besamung 69 % (Newcombe 1997).

Derzeit gibt es keine spezifische Behandlung der PMIE. Routinemäßig angewandte Behandlungen bestehen aus wiederholten Uterusspülungen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung und mehrmaligen Verabreichungen von uterotonischen Substanzen wie Oxytocin oder Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), um die Kontraktilität des Uterus steigern. Allerdings erzielen diese Therapien in vielen Fällen keinen ausreichenden Erfolg. Um bessere Heilungs- und damit Trächtigkeitsraten zu erzielen, könnte eine mukolytische Therapie zielführend sein. N-Acetylcystein (NAC) ist eine Substanz, die Disulfidbrücken spaltet und somit zur Mukolyse führt (Sheffner 1963, Gores-Lindholm et al. 2009). Es wird bereits als zugelassenes orales Präparat (Equipucin®, Cp-Pharma, Burgdorf, Deutschland) erfolgreich bei der sekretolytischen Therapie von chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen beim Pferd eingesetzt (Breuer und Becker 1983, Keller et al. 2001) und hat zudem antioxidative Eigenschaften (Ollivier et al. 2003, Rötting et al. 2003, Haffner et al. 2003). Auch intrauterin angewendetes NAC weist bei Stuten eine gute Verträglichkeit auf (Melkus et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

In der vorliegenden Pilotstudie wurde die Wirkung von oral verabreichtem NAC auf den Uterus von Stuten, die an PMIE leiden, analysiert. Unsere Hypothese lautete, dass die orale Gabe von NAC die Entzündungsreaktion des Uterus nach der Belegung reduziert und zudem die Trächtigkeitsraten von Stuten mit PMIE erhöht. Um die Reaktion des Uterus auf die Besamung nach NAC-Gabe zu untersuchen, wurde die Anzahl der PMN im zytologischen Ausstrich, das intrauterine Keimwachstum mittels Uterustupfer sowie das Vorhandensein von intrauteriner Flüssigkeit im Ultraschall analysiert. Außerdem wurden die Trächtigkeitsraten der Stuten erfasst.

Material und Methoden

Tiere

Zwanzig Stuten, die vorherichtlich an einer PMIE leiden, wurden zur künstlichen Besamung und zum Embryotransfer an der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorgestellt (11 Warmblutpferde, 3 Quarter Horses, 3 Haflinger und 3 Ponys). Diese Stuten hatten in vorhergehenden Rossen, in denen sie besamt wurden, ultrasonographisch nachweisbare Flüssigkeitsansammlungen im Uterus nach der Besamung gezeigt, während eine bakteriologische Kultur aus dem Uterus vor der Belegung negativ war. Alle Stuten waren ansonsten geschlechtsgesund und wurden abwechselnd einer Behandlungs- oder Kontrollgruppe zugeordnet.

Versuchsaufbau

Die Feststellung der Rosse erfolgte mittels regelmäßiger rektaler Palpation und transrektaler Ultrasonographie (7.0 MHz

Ultraschall, DP-6600Vet, Mindray, Shenzhen, China). In der Rosse erfolgten die Follikelkontrollen täglich, um intrauterine Flüssigkeit sowie Follikelgröße und ödematöse Struktur des Uterus festzustellen. Der Besamungszeitpunkt wurde durch das erste Auftreten eines dominanten Rossefollikels von 35 mm Durchmesser sowie eines endometrialen Ödems bestimmt. Sobald dieser Befund eingetreten war, erfolgten eine Entnahme von endometrialen Proben (Uterustupfer und Zytobrush, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) sowie die Ovulationsinduktion mittels Applikation von humanem Choriongonadotropin (hCG; Chorulon, Intervet, Wien; 1500 IE i.v.). Außerdem wurden die Stuten der Behandlungs- und Kontrollgruppe ab diesem Zeitpunkt bis zur ultrasonographischen Feststellung der Ovulation zwecks Förderung der uterinen Clearance unabhängig vom Auftreten klinischer Entzündungssymptome zweimal täglich mit dem Uterotonikum Depotocin (1 ml i.m.; Veyx-Pharma, Schwarzenborn, Deutschland) behandelt. Die Stuten der Behandlungsgruppe erhielten zudem ab diesem Tag zweimal täglich NAC (10 mg Acetylcystein/kg p.o.). Die Depotocingabe erfolgte bis Tag 1, die NAC-Gabe bis Tag 2 nach der ultrasonographisch festgestellten Ovulation. Die Besamung mit Samen eines geschlechtsgesunden Hengstes (500 Mio. vorwärtsbewegliche Spermien in ca. 14 ml Volumen) wurde 24 h nach hCG-Injektion durchgeführt. Falls 48 h nach der ersten Besamung keine Ovulation stattfand, wurde die Besamung im 48 h Intervall wiederholt. Die Auswahl der Hengste erfolgte jeweils durch den Besitzer. Es kam 13 Mal Versandsamen und 7 Mal Frischsamen zum Einsatz. Alle Inseminationsdosen erfüllten die von der World Breeding Association for Sport Horses definierten Kriterien (WBFSH 2010). Einen Tag nach der Ovulation erfolgte eine zweite Entnahme von endometrialen Proben (Uterustupfer und Zytobrush) für die bakteriologische und zytologische Untersuchung. Anschließend kehrten die Stuten in die Ställe ihrer Besitzer zurück, 14-18 Tage nach der Ovulation wurde per rektaler Palpation sowie transrektaler Ultrasonographie eine Trächtigkeitsuntersuchung durchgeführt.

Beurteilung des Behandlungserfolges

Das endometriale Ödem wurde an der Basis des rechten uterinen Horns ultrasonographisch dargestellt und als nicht vorhanden (0), geringgradig (1), mittelgradig (2) oder hochgradig (3) eingestuft. Bei Feststellung von intrauteriner Flüssigkeit wurde ihr maximaler Durchmesser mittels Ultraschall ausgemessen und als geringgradig (1: $\leq 1,5 \text{ cm}^2$), mittelgradig (2: $\leq 1.5-3,0 \text{ cm}^2$) oder hochgradig (3: $>3 \text{ cm}^2$) eingestuft.

Die Probenentnahme aus dem Uterus erfolgte mittels Spreizspekulum nach Polansky und Zervixfasszange (beides Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland), um eine Kontamination zu minimieren. Als erstes wurde der doppelt behüllte Tupfer durch die Zervix in den Uterus und das linke oder rechte Horn vorgeschoben und dabei an der Schleimhaut gerollt. Danach wurde der innere Stab mit dem Tupfer aus der Stute entnommen und das einfach behüllte Zytobrush durch die äußere Hülle des Tupfers geschoben. Durch Rollen des Zytobrush an der Hornbasis sowie am rechten oder linken Horn wurde zelluläres Material gewonnen. Der Tupfer wurde in Amies Medium gegeben (Transwab, Medical Wire Equipment, Corsham, UK) und direkt anschließend für die weitere Untersuchung (Aurich et al. 2003) in das Institut für Mikrobiologie der

Veterinärmedizinischen Universität Wien transportiert. Das Zytobrush wurde auf zwei Objektträgern ausgerollt, luftgetrocknet, fixiert (Merckofix Spray für Zytodiagnostik, Merck, Darmstadt, Deutschland), und innerhalb einer Stunde gefärbt (Haema-Schnellfärbung, Biomed Labordiagnostik, Oberschleißheim, Deutschland). Eine Gesamtzahl von 200 Zellen wurde bei einer 40-fachen Vergrößerung gezählt und differenziert. Abhängig von der Anzahl von PMN wurden die uterinen Zytologiebefunde unterteilt in nicht entzündlich (0: <5 %), geringgradig (1: 5-15 %), mittelgradig (2: 15-30 %) und hochgradig (3: >30 %) entzündlich (Card 2005).

Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mittels Wilcoxon Test (innerhalb der Gruppen) bzw. Mann-Whitney-U Test (zwischen den Gruppen) mit dem PASW Statistikprogramm (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft. Die Werte geben Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) an.

Ergebnisse

Klinische Daten

Das durchschnittliche Alter der Stuten betrug in der Kontrollgruppe $12,2 \pm 4,8$ Jahre ($n=10$) und in der Behandlungsgruppe $13,6 \pm 3,2$ Jahre ($n=10$). Die durchschnittliche Zeit von der hCG-Injektion (=Beginn der Behandlung) bis einen Tag nach der Ovulation (=Ende der Behandlung) lag in der Kontrollgruppe bei $3,8 \pm 1,0$ und in der Behandlungsgruppe bei $4,2 \pm 1,3$ Tage (n.s.). Die Anzahl der Tage von der letzten Besamung bis zur Ovulation betrug in der Kontrollgruppe $0,9 \pm 0,8$ und in der Behandlungsgruppe $1,4 \pm 0,5$ und somit bis zur zweiten endometrialen Probenentnahme $1,9 \pm 0,8$ Tage in der Kontroll- und $2,2 \pm 0,6$ in der Behandlungsgruppe (n.s.). Die Stuten der Kontrollgruppe wurden durchschnittlich $1,3 \pm 0,6$ Mal besamt, die der Behandlungsgruppe $1,4 \pm 0,5$ Mal (n.s.). In der Kontrollgruppe wurden 8 Stuten einmal, eine Stute zweimal und eine Stute dreimal besamt, in der Behandlungsgruppe waren es 6 Stuten, die ein Mal und 4 Stuten, die zwei Mal besamt wurden. Bei der Trächtigkeituntersuchung 14-18 Tage nach der Ovulation wurden 4 von 10 Stuten in der Kontrollgruppe und 7 von 10 Stuten in der Behandlungsgruppe als tragend befunden (n.s.).

Belegungsinduzierte Endometritis

Am Tag der ersten Probenentnahme wiesen alle Stuten beider Behandlungsgruppen ein ausgeprägtes endometriales Ödem auf, welches einen Tag nach der Ovulation signifikant ($p < 0,05$) zurückging. Fünf Stuten der Kontroll- und 3 Stuten der Behandlungsgruppe zeigten am Tag der hCG-Injektion gering- bis mittelgradige Flüssigkeitsmengen im Uterus (Score Kontrollgruppe: $1,1 \pm 1,3$; Score Behandlungsgruppe: $0,5 \pm 0,9$). Am Tag nach der Ovulation wurde in der Kontrollgruppe bei keiner Stute intrauterine Flüssigkeit festgestellt, in der Behandlungsgruppe wurde bei 3 Stuten eine geringgradige Menge (Score $0,3 \pm 0,4$) gefunden (n.s.). Zu keinem Zeitpunkt wiesen die entnommenen Uterustupferproben ein positives Keimwachstum auf. Im zytologischen Ausstrich von Stuten der Kontrollgruppe wurden am Tag der hCG-Injektion

$1,2 \pm 0,7$ % PMN festgestellt, wohingegen einen Tag nach Ovulation mit $1,8 \pm 1,1$ % PMN ein signifikanter Anstieg festgestellt wurde ($p < 0,05$). In der Behandlungsgruppe lagen vor der Besamung $3,8 \pm 2,4$ % PMN und einen Tag nach Feststellung der Ovulation $1,8 \pm 0,9$ % PMN vor (n.s.). Zu keinem Untersuchungszeitpunkt lag ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zahl an PMN zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe vor.

Diskussion und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Pilotstudie konnten keine negativen Effekte einer oralen Behandlung mit NAC auf die Geschlechtsgesundheit von Stuten mit belegungsinduzierter Endometritis nachgewiesen werden: Während es in der Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Anzahl der PMN des zytologischen Ausstrichs nach der Ovulation kam, lag ein solcher Anstieg bei den Stuten der Behandlungsgruppe nicht vor, was auf einen anti-inflammatorischen Effekt von NAC zurückzuführen sein könnte. Ein deutlicher entzündungshemmender Effekt konnte bei intrauteriner Behandlung von östrischen Stuten in einer Vorstudie bereits gezeigt werden (Melkus et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Anti-inflammatorische Eigenschaften von NAC könnten in direkter Beziehung zu anti-oxidativen Eigenschaften dieser Substanz (Rötting et al. 2003, Ollivier et al. 2003) stehen. Interessant ist, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen der aktuellen Studie bei Behandlung von Stuten mit belegungsinduzierter Endometritis mit dem oral verfügbaren nicht-steroidalem Antiphlogistikum Vedaprofen keine unmittelbar entzündungshemmenden Effekte trotz verbesserter Trächtigkeitsrate nachweisbar waren (Rojer und Aurich 2010).

In der vorliegenden Studie wurden sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe eine Abnahme der intrauterinen Flüssigkeitsmenge festgestellt. Die orale Behandlung mit NAC konnte hier keine positiven Effekte zeigen, im Gegensatz zur Kontrollgruppe wiesen hier sogar nach Ovulation noch 3 Stuten eine geringgradige Menge an Flüssigkeit im Uterus auf. Eine Verbesserung der Flüssigkeitselimination konnte daher in dieser kleinen Feldstudie nicht nachgewiesen werden.

Grundsätzlich ist positiv zu bewerten, dass in der Behandlungsgruppe bei 7 und in der Kontrollgruppe bei 4 von jeweils 10 Stuten eine Trächtigkeit etabliert werden konnte. Dies zeigt auf jeden Fall, dass eine orale Behandlung mit NAC keine negativen Effekte auf die Konzeption und Entwicklung der Frühträchtigkeit zu haben scheint. Potentiell positive Effekte können derzeit aufgrund der kleinen Tierzahlen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Studie wies die orale Anwendung von NAC bei Stuten, die zur belegungsinduzierten Endometritis neigen, einen hemmenden Effekt auf die Anzahl der Entzündungszellen (PMN) nach der Besamung auf. Unterschiede hinsichtlich der Trächtigkeitsrate konnten zwischen den beiden Gruppen jedoch nicht festgestellt werden. Erst durch den Einsatz von NAC an größeren Patientenzahlen wird sich klären lassen, ob bei Stuten mit Neigung zur PMIE eine Verbesserung der Fruchtbarkeit durch eine orale Behandlung mit NAC erreicht werden kann.

Danksagung

Die Autoren danken der CP Pharma Handelsgesellschaft, Burgdorf, für die Unterstützung der Untersuchungen.

Literatur

- Aurich C., Spergser J., Nowotny N., Rosengarten R. und Aurich J. E. (2003) Vorkommen von Deckinfektionen und klinisch relevanten, bedingt genitalpathogenen Bakterien bei österreichischen Norikerhengsten. Wiener Tierärztl. Mschrift. 90, 124-130
- Breyer D. und Becker M. (1983) Acetylcysteine (Fluimucil) in the treatment of COPD of the horse. Tierärztl. Prax. 11, 209-212
- Card C. (2005) Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. Theriogenology 64, 580-588
- Causey R. C. (2006) Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. Vet. J. 172, 405-421
- Causey R. C. (2007) Mucus and the mare: how little we know. Theriogenology 68, 386-394
- Gores-Lindholm A., Ahlschwede S., Causey R., Calderwoods-Mays M. und LeBlanc M. M. (2009) Effect of Intra-Uterine Infusion of Diluted N-Acetylcysteine on Equine Endometrium. AAEP Proceedings 55, 326
- Haffner J. C., Fecteau K. A. und Eiler H. (2003) Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine. Vet. Ophthalmol. 6, 67-72
- Keller H., Faulstich A., Elker M., Grell M., Wuschko S. und Rehders J.H. (2001) Klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von N-Acetylcystein bei der Behandlung der COB/COPD des Pferdes. Prakt. Tierarzt 82, 108-117
- LeBlanc M. M. (2010) Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. Reprod. Domest. Anim. 45 Suppl 2, 21-27
- LeBlanc M. M. und Causey R. C. (2009) Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. Reprod. Domest. Anim. 44 Suppl 3, 10-22
- Newcombe J. R. (1997) The effect of the incidence and depth of intra-uterine fluid in early dioestrus on pregnancy rates in mares. Pferdeheilkunde 13, 545
- Ollivier F. J., Brooks D. E., Kallberg M. E., Komaromy A. M., Lassaline M. E., Andrew S. E., Gelatt K. N., Stevens G. R., Blalock T. D., van Setten G. B. und Schultz G. S. (2003) Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. Am. J. Vet. Res. 64 1081-1087
- Rojer H. und Aurich C. (2010) Treatment of persistent mating-induced endometritis in mares with the non-steroid anti-inflammatory drug vedaprofen. Reprod. Domest. Anim. 45 458-460
- Rötting A. K., Freeman D. E., Eurell J. A., Constable P. D. und Wallig M. (2003) Effects of acetylcysteine and migration of resident eosinophils in an in vitro model of mucosal injury and restitution in equine right dorsal colon. Am. J. Vet. Res. 64, 1205-1212
- Sheffner A. L. (1963) The reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. Ann. N. Y. Acad. Sci. 106, 298-310
- Troedsson M. H. (1999) Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. Theriogenology 52, 461-471
- Watson E. D., Barbacini S., Berrocal B., Sheerin O., Marchi V., Zavgaglia G. und Necchi D. (2001) Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. Theriogenology 56, 123-131
- World breeding association for sport horses (2010): Semen standards. <http://www.wbfs.org/files/Semen%20standards.pdf>, 17.6.2010

Prof. Christine Aurich
Besamungs- und Embryotransferstation
Veterinärmedizinische Universität
Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich
christine.aurich@vetmeduni.ac.at