



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2006

Immunhistochemische Untersuchung der Kollagentypen I, III und IV sowie von -Aktin in der Urethra von kastrierten und sexuell intakten Hündinnen

Oswald, Marianne Barbara

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-163523>

Dissertation

Published Version

Originally published at:

Oswald, Marianne Barbara. Immunhistochemische Untersuchung der Kollagentypen I, III und IV sowie von -Aktin in der Urethra von kastrierten und sexuell intakten Hündinnen. 2006, University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

Veterinär-Anatomisches Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktor ad interim: Prof. Dr. B. Spiess)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. H. Augsburg

**Immunhistochemische Untersuchung der
Kollagentypen I, III und IV sowie von α -Aktin in der
Urethra von kastrierten und sexuell intakten
Hündinnen**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von Marianne Oswald
Tierärztin
von Rüti ZH

Genehmigt auf Antrag von
PD Dr. H. Augsburg, Referent
Prof. Dr. S. Arnold, Korreferentin

Zürich 2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung.....	3
2.	Summary.....	4
3.	Einleitung.....	5
4.	Grundlagen der Anatomie und Histologie.....	7
4.1.	Makroskopische Anatomie der Urethra	7
4.2.	Mikroskopische Anatomie der Urethra	8
4.3.	Kollagen	8
4.3.1.	Zusammensetzung und Struktur	8
4.3.2.	Synthese und Abbau	10
4.4.	Aktin der glatten Muskulatur	11
5.	Material und Methoden.....	12
5.1.	Tiere	12
5.2.	Entnahme und Präparation der Proben	12
5.3.	Fixation	13
5.4.	Herstellung der Paraffinschnitte	13
5.5.	Färbungen	13
5.6.	Immunhistochemische Untersuchungen	14
5.7.	Reaktionsprotokoll	16
5.7.1.	Antikörper	16
5.7.2.	Protokoll	16
5.7.3.	Demaskierungszeiten und Verdünnungen	17
6.	Resultate.....	18
6.1.	Histomorphologische Untersuchung	18
6.2.	Immunhistochemische Untersuchung	19
6.2.1.	Kollagen Typ I und III	19
6.2.2.	Kollagen Typ IV	20
6.2.3.	α -Aktin	21
7.	Diskussion.....	24
7.1.	Methodik	24
7.2.	Resultate	27
7.2.1.	Kollagen I und III	27
7.2.2.	Kollagen IV	28
7.2.3.	α -Aktin	29
7.3.	Inkontinenz und Kollagengehalt	30
7.4.	Schlussfolgerungen	32
8.	Literatur.....	33
9.	Dank.....	41

1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer Ovariectomie auf den Gehalt und das Verteilungsmuster von Kollagen Typ I, III und IV sowie α -Aktin in den verschiedenen Kompartimenten der Harnröhre vom Hund immunhistochemisch zu analysieren.

Dazu wurden Querschnitte der Harnröhren von je einer homogenen Gruppe von 6 ovariectomierten und 6 sexuell intakten Beagle-Hündinnen immunhistochemisch untersucht.

Die immunhistochemischen Reaktionen wurden an Paraffinschnitten mittels der StreptAvidin-Biotin-Complex-Methode (SABC-Methode) durchgeführt.

Die immunhistochemischen Reaktionen von Kollagen I und III brachten die kollagenen Bindegewebsfasern des urethralen Stromas gleichermassen zur Darstellung und zeigten eine weitgehend identische Lokalisation beider Kollagentypen. Das gesamte Bindegewebe zeigte eine positive Reaktion, welche sich in der Umgebung von den Basalmembranen des Epithels, der Blutgefässe und der Zellen der glatten Muskulatur meist etwas deutlicher zeigte als in den übrigen Regionen. Die Reaktionsintensität von Kollagen III war in der Regel stärker als jene von Kollagen I. Dies lässt auf einen höheren Anteil von Kollagen III in den aus Hybridfibrillen zusammengesetzten Kollagenfasern schliessen.

Kollagen Typ IV liess ausschliesslich die Basalmembranen des Übergangsepithels der Harnröhre, der Sinusoide, Venen und Arterien sowie der glatten und quergestreiften Muskelfasern in Erscheinung treten.

Die Antikörper für α -Aktin markierten die zirkuläre und longitudinale glatte Muskulatur sowie die glatten Muskelzellen in der Tunica media der Arterienwände. Das Reaktionsprodukt zeigte eine granulierte Struktur.

Zwischen kastrierten und sexuell intakten Hündinnen bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich Verteilung, Lokalisation und Reaktionsintensität von Kollagen Typ I, III und IV sowie α -Aktin.

2. Summary

The aim of this study was to examine the effect of an ovariectomy on the content, localization and distribution of collagen type I, III and IV and α -actin in the different compartments of the canine urethra.

For this purpose cross sections of the urethra of homogenous groups of 6 spayed and 6 sexual intact bitches were examined immunohistochemically.

The immunohistochemical reactions were visualized on paraffin sections using the streptavidin-biotin-complex-method (SABC-method).

The immunohistochemical reactions of both collagens I and III delineated the collagen fibres of the urethral stroma and showed almost identical distribution patterns.

The connective tissue of all urethral compartments showed a positive reaction, which was usually stronger in the surroundings of the basement membranes of the urethral epithelium, the vessels and the cells of the smooth musculature. The immunoreactivity of collagen III was generally stronger than that of collagen I. This suggested a higher collagen III content in the connective tissue fibres composed of hybrid fibrils of both collagen types.

The collagen IV reaction depicted the basement membranes of the urethral epithelium, the sinusoids, the veins and arteries as well as of the smooth and striated muscle fibres.

The antibodies of α -actin marked the circular and longitudinal smooth musculature as well as the smooth muscle cells of the tunica media of the arterial walls. The reaction product showed a granulated structure.

Between spayed and sexual intact bitches no significant differences concerning the distribution, localization and reaction intensity of collagen I, III and IV as well as α -actin could be observed.

3. Einleitung

Die Harninkontinenz der kastrierten Hündin stellt ein unangenehmes und leider häufiges Problem dar. Vor allem Tiere grosser Rassen sind gefährdet. Hündinnen über 20 kg sind mit bis zu 30% Wahrscheinlichkeit betroffen. Bei gewissen Rassen liegt die Quote sogar noch höher (*Arnold et al. 1989*). Der unfreiwillige Harnverlust tritt unterschiedlich stark auf, von einem gelegentlichen Tropfen im Schlaf bis zu permanentem Harnverlust auch in Bewegung ist alles möglich. Für Besitzer und Hund ist dies gleichermassen belastend. Die Inkontinenz kann sofort nach der Kastration beginnen oder erst Jahre später auftreten. Eine Verminderung des urethralen Verschlussdrucks innerhalb von 12 Monaten nach der Kastration wurde auch bei kontinenten Hündinnen beobachtet (*Arnold 1997*). Die genauen Ursachen für diese „Sphinkter-Inkompetenz“ sind nicht bekannt. Die Suche danach gestaltet sich schwierig, weil der Verschlussmechanismus der Harnröhre durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren zustande kommt. Es ist ein Zusammenwirken von glatter Muskulatur, Bindegewebe, Blutgefässplexus und M. urethralis. Auch die Mm. levator ani und coccygeus spielen eine Rolle (*Augsburger et al. 1993, Augsburger und Cruz-Orive 1994*).

Leidet eine Hündin an Harninkontinenz, muss zuerst abgeklärt werden, ob zum Beispiel eine angeborene Missbildung oder eine Entzündung als Ursache in Frage kommt. Bei inkontinenten kastrierten Hündinnen können solch konkrete Ursachen häufig ausgeschlossen werden. Durch eine Kastration vor der ersten Läufigkeit wird im Vergleich zu einer später erfolgenden Operation die Gefahr einer Inkontinenz herabgesetzt (*Stocklin-Gautschi et al. 2001*). Dem veränderten Hormonspiegel nach einer Ovariectomie könnte also eine bedeutende Rolle zukommen.

Heute wird die Inkontinenz der Hündin meist mit Ephedrin oder Phenylpropanolamin, beides α -Adrenergika, behandelt. Schlägt die Therapie nicht an, werden Oestrogene eingesetzt oder wird allenfalls ein chirurgischer Eingriff mit endoskopischer Injektion von Kollagen in die Submukosa der proximalen Urethra in Betracht gezogen (*Arnold et al. 1996, Barth et al. 2005*).

Auch bei Frauen ist das Problem der Harninkontinenz bekannt. Bei postmenopausalen Frauen mit Beckenbodensenkung mit oder ohne Inkontinenz fand man

einen signifikant niedrigeren Anteil an Kollagen I, III und VI im periurethralen Gewebe (*Goepel et al. 2003*). Bei inkontinenten Frauen egal welchen Alters wurde ein verminderter Kollagen-Gehalt in der pubocervicalen Fascie gefunden (*Rechenberger et al. 1998*). Ein Vergleich mit der Frau ist allerdings nur bedingt aussagekräftig; die Inkontinenz der Frau tritt häufig nach einer vaginalen Geburt und in Stresssituationen auf (*Goldberg et al. 2003*), während die Inkontinenz der Hündin unabhängig von der Anzahl Geburten und dazu beim ruhenden Tier in Erscheinung tritt. Es sind jedoch unzweifelhaft Parallelen vorhanden, vor allem der erniedrigte Verschlussdruck der Urethra nach der Menopause bzw. der Kastration. Wie die Ovariectomie der Hündin führt auch die Menopause der Frau zu einem veränderten Spiegel an Geschlechtshormonen.

In einer stereologischen Studie an perfusionsfixierten Harnröhren (*Augsburger und Cruz-Orive 1995*) wurde festgestellt, dass ovariectomierte Hündinnen gegenüber sexuell intakten Tieren geringere Volumina von glatter Muskulatur und Bindegewebe sowie ein signifikant erhöhtes Volumen des Gefäßplexus aufweisen.

Zweck dieser Arbeit war es, die Expression und das Verteilungsmuster der Kollagentypen I, III und IV sowie von α -Aktin in den unterschiedlichen Schichten und Abschnitten der Urethra immunhistochemisch zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren allfällige Unterschiede zwischen sexuell intakten und kastrierten Hündinnen bezüglich Kollagengehalt und -verteilung. Damit könnte allenfalls ein Zusammenhang zwischen Kollagensynthese bzw. -abbau und hormonellem Status hergestellt werden.

4. Grundlagen der Anatomie und Histologie

4.1. Makroskopische Anatomie der Urethra

Die Harnröhre bildet den Endabschnitt des Harnweges. Ihre Funktion liegt einerseits im Ableiten des Harns und andererseits im Verhindern eines ungewollten Harnverlustes.

Die Urethra der Hündin ist stark dehnbar und im Vergleich zu jener anderer Tierarten und des Menschen relativ lang. Das kraniale Ende der Harnröhre liegt an der Stelle, wo sich die bilateralen Plicae uretericae der Harnblase zur unpaaren Crista urethralis vereinigen (*Nickel et al. 1999*). Das kaudale Ende der Urethra stellt die schlitzförmige Öffnung unmittelbar kaudal des Hymenalringes ins Vestibulum dar, welche von zwei Schleimhautfalten flankiert wird. Die Urethra liegt grösstenteils retroperitoneal zwischen Vagina und Beckenboden auf der Symphysis pelvina. Im Querschnitt ist die Harnröhre kranial rundlich, kaudal eher queroval. Sie wird im kaudalen Drittel ventral und seitlich vom quergestreiften M. urethralis umfasst, welcher in die Konstriktionsmuskulatur von Vagina und Vestibulum übergeht. Der M. urethralis wird auch M. sphincter urethrae externum genannt, wobei er anatomisch gesehen kein echter Sphinkter ist, sondern Sphinkter-Funktion übernimmt (*Augsburger et al. 1993*).

Dieser „funktionelle Sphinkter“ ist vor allem wichtig, um die Kontinenz in Stress-situationen aufrechtzuerhalten, da er hauptsächlich aus sich schnell kontrahierenden Typ II Fasern besteht (*Augsburger und Cruz-Orive 1994*).

Die gesamte Harnröhre ist vor allem in Längsrichtung sehr elastisch. Bei starker Füllung der Harnblase kann sich diese nach kranial somit noch weiter ins Abdomen verlagern.

Die Blutversorgung wird durch die Rami urethrales der A. vesicalis caudalis und der A. vaginalis, sowie durch die A. urethralis, welche aus der A. pudenda interna entspringt, gewährleistet (*Augsburger und Müller 2000*). Die Lymphe wird hauptsächlich zu den Lnn. sacrales geleitet.

Die vegetative Innervation erfolgt über den Plexus pelvinus, sympathisch hauptsächlich durch den N. hypogastricus, parasympathisch durch die Nn. pelvini. Der M. urethralis wird motorisch durch den N. pudendus innerviert. Viszeroafferente

bzw. sensible Fasern verlaufen in den entsprechenden Nerven Richtung Rückenmark (*Bradley und Timm 1974, Chew und DiBartola 1986*).

4.2. Mikroskopische Anatomie der Urethra

Von aussen nach innen besteht die Harnröhre aus der Tunica adventitia, Tunica muscularis und Tunica mucosa. Die Tunica adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe, das die Urethra mit der Umgebung verbindet. Im kaudalen Bereich verwächst sie fest mit der Symphysis pelvina. Die Tunica muscularis besteht aus glatter Muskulatur und setzt sich aus der inneren Ringmuskulatur und der äusseren longitudinalen Muskulatur zusammen, wobei die Ringmuskulatur kräftiger ist als die longitudinale (*Augsburger und Cruz-Orive 1995*).

Die Propria der Tunica mucosa wird von einem Blutgefässplexus durchzogen. Dieser besteht aus parallel zu Längsachse angeordneten Sinusoiden (nur Endothel und Adventitia), in welche kleine Arterien einmünden. Der Gefässplexus stellt somit eine Art Schwellgewebe dar und spielt als Kontinenzfaktor eine wichtige Rolle im komplexen Harnröhrenverschlussmechanismus (*Augsburger und Müller 2000*). Das Übergangsepithel geht gegen kaudal in ein mehrschichtiges Plattenepithel über, das wie das Vaginalepithel auf hormonelle Veränderungen reagiert und unter Oestrogen-Einfluss stark proliferiert und verhornt.

4.3. Kollagen

4.3.1. Zusammensetzung und Struktur

Kollagen (griech. Kolla = Leim) ist ein wesentlicher Bestandteil aller Binde- und Stützgewebe und somit das häufigste Strukturprotein des Körpers. Der Anteil von Kollagen am körpereigenen Protein beträgt bei Säugetieren etwa ein Drittel (*Mandl 1972*). Es ist vor allem in mechanisch beanspruchtem Gewebe wie Haut, Sehnen, Knorpel, Knochen und Zähnen von grosser Wichtigkeit. Bislang sind mindestens 27 verschiedene Kollagentypen bekannt (*Eyre et al. 2004*).

Kollagen besteht zu 30% aus Glycin, daneben aus den anderen Aminosäuren Alanin, Hydroxyprolin und Prolin. Das makromolekulare Monomer heisst Tropokollagen und besteht aus drei α -Ketten. Diese α -Ketten sind linksgängige spiralige Polypeptidketten, bei welchen jede dritte Aminosäure Glycin ist. Die Aminosäuren sind helixartig und rechtsgängig um eine zentrale Achse angeordnet und durch Wasserstoffbrücken zwischen Prolin und Glycin verbunden. Eine solche Tripelhelix ist 300 nm lang bei einem Durchmesser von nur gerade 1.5 nm (*Junqueira et al. 2002*).

Es sind viele verschiedene α -Ketten bekannt (zur Zeit ca. 38), die sich jeweils zu dritt zusammenfügen können. Daraus ergeben sich die verschiedenen Kollagentypen, die auch verschiedene Aufgaben in den Geweben übernehmen.

Neben den Fibrillen bildenden (z.B. Typ I, II, III) gibt es auch nicht Fibrillen bildende Kollagenformen (z.B. Typ IV, V). Die wichtigsten und häufigsten sind die Kollagentypen I-IV (*Eyre et al. 2004*).

Kollagen Typ I: macht etwa 90% des gesamten Körperkollagens aus und kommt hauptsächlich in Sehnen, Faszien, Knochen und im Stroma aller Organe sowie in Organkapseln, Dentin, Kornea und grossen Gefässen vor.

Kollagen Typ II: bildet Fibrillen im hyalinen Knorpel, im Faserknorpel und im Glaskörper des Auges.

Kollagen Typ III: bildet Retikulinfasern und kann mit anderen Kollagentypen kopolymerisieren. Kommt in einigen Geweben als Lamina fibroreticularis unter der Basallamina, in lymphatischen Organen, Haut, Herzklappen, Gingiva, Darm, grossen Gefässen und Uteruswand vor.

Kollagen Typ IV: bildet das Gerüst aller Basalmembranen (Basallaminae).

Die Kollagenfaserbündel sind in Ruhe leicht gewellt und strecken sich unter Zug. Sie sind vorwiegend in Zugrichtung ausgerichtet und tolerieren Zugbelastungen sehr viel besser als Druckbelastungen.

4.3.2. Synthese und Abbau

Fibroblasten, Chondro- und Osteoblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fettzellen können in membrangebundenen Ribosomen Prokollagen synthetisieren. Dieses besitzt am N- und am C-terminalen Ende ein zusätzliches globuläres Proteinsegment, ein Telopeptid, welches später im Extrazellulärraum abgespalten wird (*Junqueira et al. 2002*). In den Zysternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums kommt es zur Hydroxylierung von Prolin und Lysin, wofür es Ascorbinsäure als wichtigen Kofaktor braucht. Ein Mangel an Vitamin C (Skorbut) führt zu einer gestörten Kollagensynthese mit den bekannten Folgen wie Haar- und Zahnausfall.

Nach der Hydroxylierung werden Zuckerbestandteile angeheftet (Glykosylierung) und das Prokollagen wird via Golgi-Apparat in den Extrazellulärraum sezerniert (*Junqueira et al. 2002*). Hier werden nicht-helikale Anteile am C- und N-terminalen Ende abgespalten und es entsteht Tropokollagen, welches sich zu Mikrofibrillen zusammenlagert. Diese vernetzen sich nach Oxidation der Lysinreste zu Kollagenfibrillen (Durchmesser ca. 75 nm). Darin ist das Tropokollagen parallel, aber versetzt angeordnet. Die im Elektronenmikroskop sichtbare Querstreifung entsteht durch die Anlagerung von Schwermetallen an die nicht-helikalen Anfangs- und Endstücke des Tropokollagens (*Junqueira et al. 2002*). Im Lichtmikroskop sichtbar sind Kollagenfasern von unterschiedlichem Durchmesser.

Das quervernetzte, „fertige“ Kollagen ist gegen Proteasen resistent und kann nur von spezifischen Kollagenasen abgebaut werden.

Der Abbau geschieht nicht, wie sonst häufig bei Proteinen, indem das Kollagen fragmentiert wird, sondern durch das „Anknabbern“ der Fibrillen von aussen durch Kollagenasen, so dass Faserdurchmesser, -volumen und -oberfläche immer kleiner werden (*Langsjö et al. 2002*).

4.4. Aktin der glatten Muskulatur

Die glatte Muskulatur besteht aus spindelförmigen Zellen ohne Querstreifung, die Aktin-, Myosin- und Intermediärfilamente sowie einen zentral gelegenen länglichen Kern enthalten.

Aktinfilamente sind ca. 1 μm lang und 3-8 nm dick und gehören zu den kontraktile Elementen der glatten Muskelzelle (*Mosimann und Kohler 1990*).

Anders als das Aktin der quergestreiften Muskulatur besitzt das Aktin der glatten Muskulatur kein Troponin (*Junqueira et al. 2002*). Zusätzlich haftet es statt an Z-Streifen an sogenannten „Dense bodies“ aus Aktinin und verbindet diese gemeinsam mit Myosinfilamenten gitterartig. Ähnlich wie bei der Skelettmuskulatur gleitet das Aktin bei der Kontraktion unter Verbrauch von ATP zwischen die Myosinfilamente (Sliding-filament-Mechanismus), dies jedoch wesentlich langsamer.

Im Gegensatz zu der quergestreiften Muskulatur ist eine Vergrößerung der glatten Muskulatur durch Teilung von Muskelzellen möglich. Es kann somit zu einer Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) wie auch zu einer Hypertrophie (Vergrößerung durch vermehrten Aufbau von Myofibrillen) der glatten Muskulatur kommen (*Junqueira et al. 2002*).

5. Material und Methoden

5.1. Tiere

Die Untersuchungen wurden an einer homogenen Gruppe von 12 Beagle-Hündinnen durchgeführt. Die Tiere waren alle zwischen zwei und vier Jahre alt, zwischen 8 und 14.1 kg schwer und klinisch gesund. Keines der Tiere war je trächtig gewesen. Eine zufällig ausgewählte Gruppe von 6 Tieren wurde ein bis zwei Jahre vor der Euthanasie ovariektomiert. Die Euthanasie erfolgte mit 7 ml Vetanarcol® i.v. (Veterinaria AG, Zürich).

Verschiedene Organe der Hündinnen wurden bereits für andere Studien verwendet (Augsburger und Kürzi 2003; Augsburger und Eggenberger 2005).

5.2. Entnahme und Präparation der Proben

Der Zugang erfolgte von ventral durch den Beckenboden. Die am Beckenboden entspringende Gliedmassenmuskulatur wurde grob entfernt und der Ramus cranialis ossis pubis sowie die Tabula ossis ischii beidseits der Symphysis pelvina mit einer Knochenzange durchtrennt. Darauf konnte das lose Knochenstück entfernt und die Harnröhre mit Harnblase, Vestibulum vaginae, Vagina und Zervix aus der Beckenhöhle herauspräpariert werden. Vagina und Urethra konnten bis auf den hintersten Viertel der Harnröhre stumpf voneinander getrennt werden. Der Uterus und der grösste Teil der Vagina wurden daraufhin abgesetzt und das Vestibulum sowie der kaudale Rest der Vagina dorsal aufgeschnitten, um die Ausgangsöffnung der Harnröhre freizulegen. So konnte die Harnröhre vom Ostium urethrae internum bis zum Ostium urethrae externum herausgetrennt werden.

Die Urethra wurde danach in 4 gleich lange Teile zerlegt, wobei der an die Harnblase anschliessende Teil als 1. Viertel und der sich ins Vestibulum vaginae öffnende Teil als 4. Viertel gekennzeichnet wurde.

5.3. Fixation

Es wurden immersions- und perfusionsfixierte Harnröhren untersucht, wobei die Fixationsdauer insgesamt je 20 bis 24 Stunden betrug.

Als Fixationsmittel verwendete man frisch angesetztes 3.7%iges Paraformaldehyd in 0.1 M Calciumacetat (*Lillie 1965*) mit einem pH-Wert von 7.1 (1450 mOsmol).

5.4. Herstellung der Paraffinschnitte

Die Präparate wurden in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom (Leica RM 2165) in einer Schichtdicke von 5 μm senkrecht zur Längsachse der Harnröhre geschnitten. Danach wurden die Schnitte auf SuperFrost®plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen.

5.5. Färbungen

Von jedem Hund wurden Präparate aus dem ersten und dem dritten Viertel der Urethra untersucht.

Zur Übersicht wurde eine HE-Färbung mit alkoholischem Eosin durchgeführt.

Zur besseren Darstellung des Bindegewebes und zur zusätzlichen Absicherung der Spezifität der Immunhistochemie wurden einige Präparate einer Trichromfärbung nach Gomori unterzogen (*Romeis 1968*):

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte 1 Stunde bei 56°C in Bouinsche Lösung (*Romeis 1968*) eingestellt und die gelbe Farbe nach dem Abkühlen der Lösung unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Die Zellkerne wurden 10 min. mit Weigertschem Eisenhämatoxylin gefärbt, die Präparate danach 10 min. unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Darauf wurden die Objektträger 10 min. in die Trichrom-Färbelösung verbracht und 2 min. in 0.5%iger Essigsäure gespült.

Danach wurden die Präparate in 96%igem Alkohol entwässert und über Ethanol und HistoClear® (Raymond A Lamb, Eastbourne, UK) schliesslich mit Pertex®

(Medite GmbH, Burgdorf, D) eingedeckt. Die histologische Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Marke Leitz (Dialux 22).

5.6. Immunhistochemische Untersuchungen

Da keine spezies-spezifischen Antikörper gegen Kollagen vom Hund erhältlich waren und die vorhandenen Antikörper zumeist noch nicht an Hunden getestet wurden, mussten zuerst verschiedene monoklonale und polyklonale Antikörper auf ihre Eignung geprüft werden. Alle Antikörper waren human-spezifisch. Jeder Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen von 1:50 bis 1:1000 getestet. Die Inkubationszeiten wurden zwischen 1 und 2 Stunden variiert. Für die Demaskierung der Präparate mit Pepsin wurden Zeiten zwischen 15 und 120 Minuten eingesetzt.

Je nach verwendetem Antikörper zeigte sich eine unspezifische Bindung bzw. gar keine Reaktion ausser bei der Positivkontrolle. Nach einigem Suchen konnten aber Antikörper gefunden werden, die zu einer positiven Reaktion des gewünschten Substrates führten.

Als Positivkontrollen dienten Schnitte von Menschenhaut sowie von Affeniere. Negativkontrolle war jeweils ein Urethrapräparat, das statt mit dem Primärantikörper mit einer unspezifischen polyklonalen Immunglobulinlösung, je nach Primärantikörper gegen Kaninchen oder Maus (Rabbit bzw. Mouse isotype control von Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA), inkubiert wurde.

Alle Färbungen wurden bei Raumtemperatur (24°C) durchgeführt.

Als Feuchtkammer diente das Magnetic Immuno Staining Tray (CellPath, Newtown, UK).

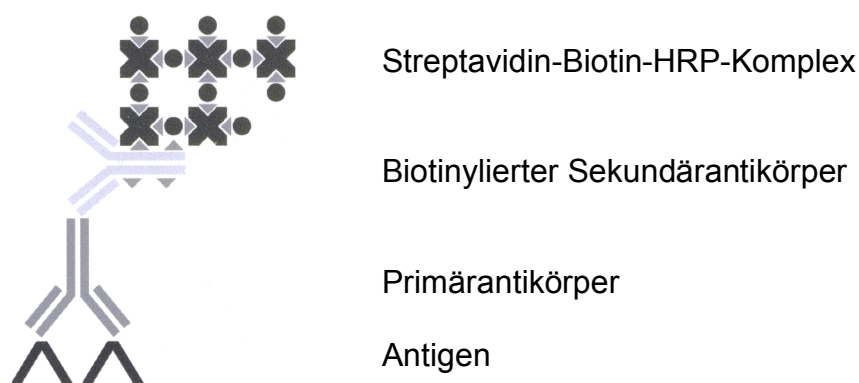
Um die immunhistochemische Reaktion überhaupt zu ermöglichen, mussten die Schnitte zunächst mit Xylol und Ethanol in abnehmender Konzentration entparaffiniert werden. Danach wurden die Antigene mit Pepsin-HCl bei 37°C demaskiert, um die durch die Fixierung verursachte Beeinträchtigung der Immunreaktivität bestmöglich aufzuheben.

Die Färbung der Präparate erfolgte mittels einer indirekten 2-Schritte-Methode, bei der zuerst ein spezifischer, unmarkierter Primärantikörper an das demaskierte Epitop bindet und danach ein enzymmarkierter Sekundärantikörper mit dem

Primärantikörper reagiert. Um die Antigen-Antikörper-Verbindung sichtbar zu machen erfolgt anschliessend eine Substrat-Chromogen-Reaktion. Der Vorteil dieser Methode besteht in der hohen Sensitivität (Bönisch, 2003).

Gefärbt wurde nach der SABC-Methode (StreptAvidin-Biotin-Complex) mit dem Dako Duet-Kit (DakoCytomation, Glostrup, DK), das mit Antikörpern von Maus und Kaninchen gleichermassen reagiert. Die Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin. Hierbei wird ein unkonjugierter Primärantikörper von einem biotinylierten Sekundärantikörper markiert. Da dieser von der Ziege stammte, wurden die Proben vor dem Auftragen des Primärantikörpers mit Normal Goat Serum (NgtS) von der Firma Kirkegaards & Perry Laboratories (Gaithersburg, USA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Nach dem Sekundärantikörper erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase(HRP)-Komplex. Dieser sollte mindestens 30 min. vorher gemischt werden, um der Komplexbildung Zeit zu lassen. Dieser Peroxidasekomplex bindet nach dem Auftragen via das Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das HRP sorgt schliesslich für die Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), indem ein farbloses Chromogen in ein braunes und unlösliches Endprodukt verwandelt wird. Damit bei diesem Vorgang die endogene Peroxidase nicht zu unspezifischen Färbungen führt, wird sie vorher mittels Wasserstoffperoxid (H_2O_2) deaktiviert.



Grafik 1: Schematische Darstellung der SABC-Methode

5.7. Reaktionsprotokoll

5.7.1. Antikörper

Collagen Typ I:	Rabbit anti-Collagen I, polyklonal (600-401-103, Rockland, Philadelphia, USA)
Collagen Typ III:	Mouse anti-Collagen III, monoklonal (031510301, Quartett, Berlin, D)
Collagen Typ IV:	Rabbit anti-Collagen IV, polyklonal (031502601, Quartett, Berlin, D)
α -Actin:	Mouse anti-smooth muscle actin (M 0851, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

5.7.2. Protokoll

- | | | |
|-----|--|-----------|
| 1) | Entparaffinierung: Xylol | 10 min |
| | Ethanol 100% | 5 min |
| | Ethanol 96% | 3 min |
| | Ethanol 70% | 3 min |
| 2) | Aqua dest. | 5 min |
| 3) | Demaskierung
(0.25% Pepsin in 10 mM HCl bei 37°C) | 15-60 min |
| 4) | Reaktion stoppen mit Aqua dest., 4°C | 10 min |
| 5) | Blockierung der endogenen Peroxidase
mit 0.5% H ₂ O ₂ in Methanol | 20 min |
| 6) | Waschen mit Tris buffered saline (TBS) | 5 min |
| 7) | Präinkubation mit 10% NgTS-TBS | 20 min |
| 8) | Flüssigkeit abtupfen | |
| 9) | Inkubation mit Primärantikörper verdünnt
in 1% NgTS-TBS bei 24°C | 60 min |
| | Negativkontrolle: rabbit-/mouse isotype control | |
| 10) | Waschen mit TBS | |
| 11) | Inkubation mit Sekundärantikörper (Lsg. C, Dako Duet) | |

- 1:100 in 1% NgTS-TBS 30 min
- 12) Waschen mit TBS
- 13) Inkubation mit Strept/HRP (Lsg. A+B, Dako Duet)
1: 100 in TBS 30 min
- 14) Waschen mit TBS
- 15) Inkubation mit DAB 2 min.
- 16) Waschen mit Aqua dest. 2x5 min.
- 17) Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Dako S 3301) 3 min.
- 18) Waschen mit Leitungswasser 5 min.
- 19) Dehydratation
Ethanol 70% 2 min.
Ethanol 96% 3 min.
Ethanol 100% 5 min.
HistoClear® 5 min
- 20) Objektträger eindecken mit Pertex® (Medite GmbH, Burgdorf, D) mit
Eindeckautomat „Promounter“ (Medite GmbH, Burgdorf, D)

5.7.3. Demaskierungszeiten und Verdünnungen

Antikörper	Demaskierung mit Pepsin-HCl	Verdünnung mit NgTS-TBS
Kollagen I	60 min	1:200
Kollagen III	120 min	1:50
Kollagen IV	15 min	1:50
Aktin	Keine	1:100

6. Resultate

Die Präparate wurden systematisch durchgemustert und hinsichtlich histologischer Strukturerhaltung, Intensität der immunhistochemischen Reaktion sowie Lokalisation und Verlauf der positiv markierten Bindegewebsfasern bzw. der glatten Muskelzellen untersucht. Verglichen wurden die Reaktionen sowohl zwischen dem ersten und dritten Harnröhrenviertel innerhalb einer Gruppe als auch zwischen sexuell intakten und kastrierten Hündinnen.

6.1. Histomorphologische Untersuchung

Die Trichrom-Färbung diente der histologischen Unterscheidung von Bindegewebe und Muskulatur. Epithel sowie glatte und quergestreifte Muskulatur wurden bei der Färbung nach Gomori rot, das Bindegewebe grün angefärbt. Die Strukturerhaltung war bei den perfusionsfixierten Präparaten tendenziell besser.

Im dritten Viertel war der Harnröhren-Aussendurchmesser grösser sowie die Wanddicke stärker als im ersten Viertel.

Das Übergangsepithel war meist drei- bis vierschichtig. Vor allem im dritten Harnröhrenviertel zeigten sich vereinzelte Abschnitte mit deutlich höherem Epithel, das bis zu acht Schichten erreichte und als mehrschichtiges Plattenepithel identifiziert wurde. Eine Verhornung des Epithels war jedoch nicht erkennbar.

Die Lamina propria enthielt kleine Venolen direkt unter dem Epithel und wurde vom ausgedehnten Gefässplexus durchzogen. Dessen Sinusoide setzten sich aus einem Endothel und einer Adventitia zusammen. Im ersten Viertel stellten sich die Sinusoide als grosslumige Gefässe eingebettet in Bindegewebe dar. Sie waren vor allem in den perfusionsfixierten Präparaten gut entfaltet. Im dritten Viertel erschienen die Sinusoide kleiner und zahlreicher, wobei das dazwischenliegende Bindegewebe entsprechend massiver ausgebildet war. In unmittelbarer Nähe der Sinusoide waren häufig kleine Arterien anzutreffen.

Die glatte Muskulatur war dank der Trichromfärbung nach Gomori gut vom Bindegewebe zu unterscheiden. Sie war stark mit Bindegewebe durchwoben. Die longitudinale und die zirkuläre Muskelschicht waren nicht deutlich voneinander

abzugrenzen. Im peripheren Bereich des Gefäßplexus waren insbesondere im ersten Harnröhrenviertel zwischen den Sinusoiden einzelne longitudinale Muskelfaserbündel zu erkennen. Die zirkuläre Muskelschicht war im ersten Viertel stärker entwickelt als im dritten. Im letzteren dominierten hingegen die äusseren longitudinalen Muskelfaserzüge.

Nur im dritten Harnröhrenviertel fanden sich peripher der glatten Muskulatur quergestreifte Muskelfaserbündel. Sie verliefen als kraniale Ausläufer des M. urethralis sowohl longitudinal als auch zirkulär.

Zwischen kastrierten und sexuell intakten Tieren konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

6.2. Immunhistochemische Untersuchung

6.2.1. Kollagen Typ I und III

Die immunhistochemischen Reaktionen von Kollagen I und III brachten die kollagenen Bindegewebsfasern des urethralen Stromas gleichermassen zur Darstellung. Das Bindegewebe aller urethralen Kompartimente (Propria, glatte und quergestreifte Muskulatur, Adventitia) reagierte positiv und war gut erkennbar. Beide Kollagentypen zeigten eine weitgehend identische Lokalisation der Reaktionsprodukte, wobei jedoch die Reaktionsintensität von Kollagen III in der Regel stärker war. Dies war vor allem im feinen Fasernetzwerk direkt unter dem Epithel gut sichtbar (Abb. 1a, b). Die insgesamt stärkere Reaktion von Kollagen Typ III beruhte auf den besonders intensiv markierten Konturen der kollagenen Bindegewebsfasern (Abb. 1c), was dem Bindegewebe in der Übersicht generell ein eher „faseriges“ Aussehen verlieh. Die Kollagenfasern zeigten variable Durchmesser und formten ein dichtes Netzwerk unter dem Epithel und um die Sinusoide des Gefäßplexus. Die direkt subepithelialen Fasern erschienen dabei feiner als jene im Bereich der Sinusoide.

Im Kompartiment der glatten Muskulatur reagierte ein lockeres Netz feiner Bindegewebsfasern sowohl auf Kollagen I als auch auf Kollagen III positiv. Diese feinen Kollagenfasern umgaben die einzelnen glatten Muskelzellen als Endomysium

und begrenzten verschieden grosse Muskelfaserbündel als Perimysium (Abb. 1d). Auch zwischen den quergestreiften Muskelfaserbündeln, ausschliesslich in der distalen Hälfte der Urethra lokalisiert, waren diese Kollagenfasern erkennbar (Abb. 1e). Das kollagene Fasernetzwerk zwischen den quergestreiften Muskelfaserbündeln war jedoch dichter im Vergleich zu jenem der glatten Muskulatur. Das Endomysium von glatter und quergestreifter Muskulatur sah sich sehr ähnlich, während sich das Perimysium unterschiedlich präsentierte. Das Perimysium der quergestreiften Muskulatur bestand aus dickeren Kollagenfasern als jenes der glatten Muskulatur, was ihm ein ‚gröberes‘ Aussehen verlieh. Die Adventitia stellte sich als loses Netzwerk von Kollagenfasern verschiedenen Kalibers dar.

Zwischen kastrierten und sexuell intakten Tieren konnten weder in der Stärke der Immunreaktion noch im Verteilungsmuster der Reaktionsprodukte Unterschiede festgestellt werden.

6.2.2. Kollagen Typ IV

Das Verteilungsmuster dieser Reaktion unterschied sich grundlegend von jenem für Kollagen I und III. Das Vorkommen von Kollagen Typ IV war deutlich auf die Basalmembranen begrenzt.

In der Übersicht traten die Basalmembranen der Sinusoide und Muskelzellen bzw. -fasern stärker hervor als jene des Harnröhrenepithels. Die Basalmembran des Epithels zeichnete sich als sehr feine schwach reagierende Linie ab (Abb. 1g). Die Basalmembranen der Sinusoide traten ebenfalls als feine Linien in Erscheinung, waren jedoch generell intensiver angefärbt als die Basalmembran des Harnröhrenepithels (Abb. 1g). Auch die Basalmembranen der glatten Muskelzellen in der Tunica media der Arterien zeigten eine stark positive Reaktion.

Die Basalmembranen der glatten Harnröhrenmuskulatur hoben sich stark hervor; sie erschienen im Längsschnitt sehr fein längs gestreift und im Querschnitt zeigten sie analog zu den immunhistochemischen Reaktionen von Kollagen I und III jene typische Struktur, die als netz- oder wabenartig beschrieben werden kann (Abb. 1h).

Die Basalmembranen der quergestreiften Muskelfasern reagierten im Querschnitt ebenfalls in Form von feinen dunklen Linien (Abb. 1h).

Eine schwache Hintergrundfärbung des Epithels sowie des Bindegewebes war gelegentlich vorhanden. Sie war jedoch gut von den positiv markierten Strukturen, welche sich deutlich abhoben, zu unterscheiden.

Die Kollagen IV-Verteilung und die Reaktionsintensität bei den kastrierten Hündinnen entsprachen jener der sexuell intakten.

6.2.3. α -Aktin

Die glatte Muskulatur trat nach der Aktin-Reaktion deutlich in Erscheinung und war sehr gut von Bindegewebe und quergestreifter Muskulatur abgrenzbar. Ebenfalls positiv markiert waren, durch die reagierenden glatten Muskelzellen der Tunica media, die Wände der Arterien. Tunica intima und Adventitia zeigten dabei keine Antikörperbindung. Auch die Wände der Sinusoide, welche nur aus Endothel und Adventitia bestanden, blieben negativ. Dagegen reagierten die zirkuläre sowie die longitudinale glatte Muskulatur stark positiv. Das Aktin-Reaktionsprodukt erschien insbesondere im Querschnitt durch die Muskelfaserbündel unregelmässig granuliert (Abb. 1f).

Die quergestreiften Muskelfasern des M. urethralis im dritten Viertel waren jedoch vollständig negativ.

Keine Unterschiede in der immunhistochemischen Reaktion der Proben der beiden Versuchsgruppen waren erkennbar.

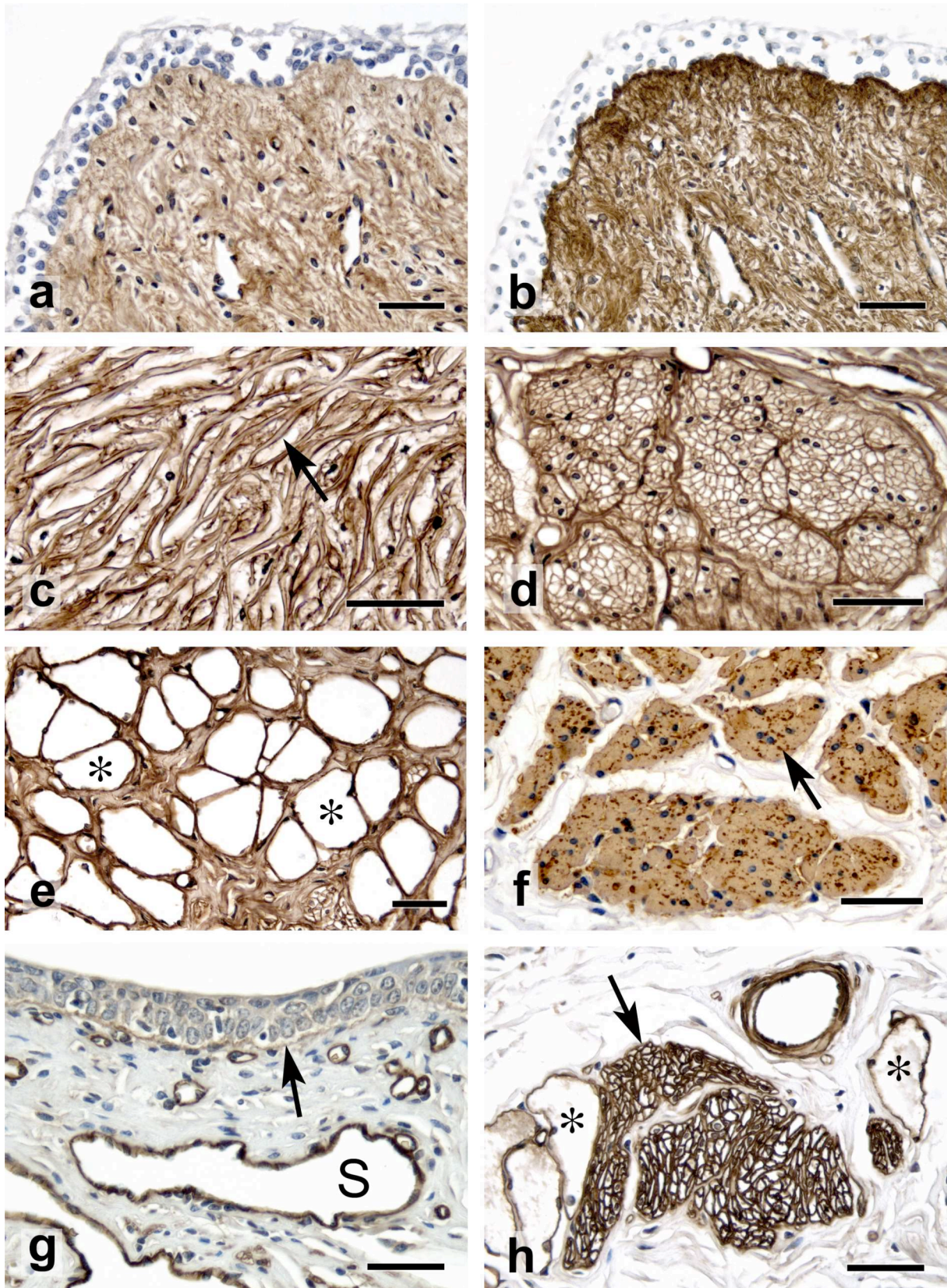


Abb. 1: Immunhistochemische Reaktionen von Kollagen Typ I, III und IV sowie von α -Aktin in der Urethra von sexuell intakten (co) und ovariectomierten (ox) Beaglen. Skalierung 50 μ m.

Abbildung 1: Immunhistochemische Reaktionen von Kollagen Typ I, III und IV sowie von α -Aktin in der Urethra von sexuell intakten (co) und ovariectomierten (ox) Beaglen. Skalierung 50 μ m.

- 1a** Kollagen I (co), feines subepitheliales Fasernetzwerk
- 1b** Kollagen III (co), das feine subepitheliale Fasernetzwerk mit einer höheren Reaktionsintensität als Kollagen I
- 1c** Kollagen III (ox), intensive Reaktion der Faserkonturen (\rightarrow)
- 1d** Kollagen I (co), das Endo- und Perimysium der glatten Muskulatur
- 1e** Kollagen I (ox), das Endo- und Perimysium der quergestreiften Muskulatur
- 1f** α -Aktin (ox), granuliertes Muster des Reaktionsproduktes in der glatten Muskulatur
- 1g** Kollagen IV (co), schwache Reaktion der subepithelialen (\rightarrow) und stärkere Reaktion der vaskulären Basalmembran (\star , Sinusoid)
- 1h** Kollagen IV (ox), Reaktion der Basalmembranen von glatten Muskelzellen (\rightarrow) und quergestreiften Muskelfasern (\star)

7. Diskussion

Die histomorphologischen Befunde stimmten mit den Ergebnissen anderer Autoren (z.B. *Junqueira et al. 2002*) überein. Eine ausführliche Untersuchung der Urethra der Hündin findet sich bei *Augsburger und Cruz-Orive (1994)*.

7.1. Methodik

Die Immunhistochemie ist eine genaue Methode, um antigene Substanzen in einem Gewebe nachzuweisen und zu lokalisieren. Die Menge eines bestimmten Antigens kann damit zwar nicht genau bestimmt werden, aber deutliche Unterschiede in der Expressionsintensität und im Verteilungsmuster zwischen verschiedenen Präparaten können durchaus semiquantitativ erfasst werden. So konnte beispielsweise *Boos (2000)* verschiedene Kollagentypen und deren unterschiedliche Expression und Verteilung im Uterus des Rindes während des Zyklus nachweisen.

Um eine ausreichende Haftung der Paraffinschnitte auf dem Objektträger zu erreichen und ein Abschwemmen zu verhindern, wurden Superfrost®plus Objektträger verwendet. Diese weisen an der Oberfläche eine elektrische Ladung auf, die mit der Ladung der Präparate interagiert und so eine gute Haftung der Schnitte gewährleistet. Die immunhistochemischen Reaktionen wurden dadurch nicht beeinträchtigt.

Als Feuchtkammer diente das Magnetic Immuno Staining Tray, das für kleinere Chargen, wie sie für diese Arbeit benötigt wurden, zur Arbeitserleichterung empfehlenswert ist.

Klare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten ist in der Immunhistochemie nicht selbstverständlich. Eine exakte Arbeitsweise und konstante äussere Bedingungen für jede zu färbende Charge sind absolut unabdingbar. Andernfalls sind Unterschiede in der Intensität der Reaktionen bei den verschiedenen Präparaten vorprogrammiert. Trotz exakter Arbeitsweise kommt es vor, dass sich Präparate im selben Arbeitsgang unterschiedlich stark bzw. unregelmässig anfärben und Hintergrundfärbungen auftreten. Dies ist ein bekanntes Problem von immunhistochemischen Untersuchungen (*Bönisch 2003*). Die bei einigen Präparaten beobachtete schwache

Anfärbung des Epithels und anderer nicht-kollagener Strukturen war auch in unserer Studie anfangs ein Problem.

Folgende Ansätze zu dessen Behebung wurden verfolgt.

- In wässrigen Medien treten zwischen Makromolekülen hydrophobe Wechselwirkungen auf, wenn ihre Oberflächenspannung geringer ist als die des Wassers. Es entstehen Van-der-Waals-Kräfte (*Mariuzza et al. 1987*). Die meisten Proteine sind von Natur aus hydrophob. Bei den Gewebeproteinen wird diese Eigenschaft durch die Fixierung mit aldehydhaltigen Fixativen wie Formalin oder Glutaraldehyd und abhängig von Zeit, Temperatur und pH-Wert noch verstärkt. Vor allem Bindegewebe, Plattenepithelien und Fettzellen neigen verstärkt zu Hintergrundfärbung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Aber auch die Immunglobuline sind besonders hydrophob, was das Risiko für eine unspezifische Färbung (vor allem nach Lagerung der Immunglobuline) ebenfalls erhöht.

Die am häufigsten benutzte Methode zur Verhinderung dieser Art von Hintergrundfärbung, die auch hier angewendet wurde, ist der Einsatz eines blockierenden Proteins (10% Normal Goat Serum), welches mit den hydrophoben Bindungsstellen im Gewebe konkurriert. Die Präparate werden unmittelbar vor dem Auftragen des Primärantikörpers damit inkubiert und die Lösung wird danach lediglich abgekippt und nicht abgespült.

- Ionen- und elektrostatische Bindungen sind die Hauptkräfte, die Wechselwirkungen zwischen Antigenen und ihren korrespondierenden Antikörpern bestimmen (*Bowles et al. 1990*). Sie können jedoch auch wesentlich zu unspezifischen Hintergrundfärbungen beitragen, da bei dem für Verdünnungspuffer üblichen pH-Wert bei den Antikörpern negative oder positive Ladungen an ihrer Oberfläche überwiegen. Je näher der pH des Puffers dem isoelektrischen Punkt des biotinylierten sekundären Antikörpers ist, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung desselben (*Wadsley et al. 1987*).

Da die meisten unspezifischen Hintergrundfärbungen auf eine Kombination hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen zurückzuführen sind und Massnahmen gegen die eine wiederum die andere fördert, ist es schwierig, diese Art der Hintergrundfärbung ganz auszuschliessen.

- Die endogene Peroxidase bewirkt eine Freisetzung molekularen Sauerstoffs aus Peroxiden und ist in allen Hämproteinen enthalten. Also in Hämoglobin (Erythrozyten), Myoglobin (Muskelzellen), Cytochrom (Granulozyten, Monozyten) und Katalase (Leber, Niere). Im Interstitium kann eine Peroxidaseaktivität durch Diffusion von Blut vor der Fixierung entstehen. Die am häufigsten verwendete Methode zur Unterdrückung endogener Peroxidaseaktivität ist eine Inkubation der Präparate mit einer H₂O₂-Lösung, in unserem Fall mit 0.5% H₂O₂ in Methanol (*Streefkerk 1972*).
- Durch umweltbedingte Stimulation des Immunsystems eines Tieres (z.B. durch Eindringen von Fremdkörpern) können natürliche Antikörper, z.B. gegen Cyto-keratine, auftreten und zu „spezifischer“ Hintergrundfärbung führen (*Streicher et al. 1998*). Auch Antikörper gegen biotinylierte Proteine sind bekannt (*Dale et al. 1994*). Ebenso kommen in polyklonalen Seren kontaminierende Antikörper vor, die durch Verunreinigungen der zur Immunstimulation verwendeten Antigene entstehen. Natürliche und kontaminierende Antikörper kommen jedoch gemäss Hersteller nur in geringen Konzentrationen und nur bei polyklonalen Seren vor. Wenn die Primär-antikörper ausreichend verdünnt werden, treten darum meist keine Probleme auf. Kollagen I wurde mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen und es trat eine „spezifische“ Hintergrundfärbung des Epithels auf, dies auch bei der aus menschlicher Haut bestehenden Positivkontrolle. So liegt der Verdacht nahe, dass es sich um diese Art von Hintergrundfärbung handeln könnte. Eine höhere Verdünnung (1:200) des Primärantikörpers brachte denn auch Reaktionen mit deutlich geringerer Anfärbung des Epithels. Mit einem monoklonalen Antikörper könnte man dieses Problem umgehen. Der getestete monoklonale Antikörper von Quartett (031510101) brachte jedoch auch in einer Verdünnung von 1:50 und mit einer vorausgehenden Demaskierung mit Pepsin von 2 h keine befriedigenden Ergebnisse.
- Die auf endogenes Biotin zurückzuführende endogene Streptavidin-Bindungsaktivität ist ein Problem aller biotinbasierter Nachweistechiken. Da Biotin vor allem in Leber, Niere, Lymphgewebe, ZNS und Fettgewebe vorkommt und die Hintergrundfärbungen vor allem bei Gefrierschnitten beobachtet wurden (*Zhou et al. 2002*), ist es nicht wahrscheinlich, dass endogenes Biotin die

Hintergrundfärbung unserer Schnitte verursachte. Ein Avidin/Biotin-Block ist vor allem für Gefrierschnitte sinnvoll (*Banerjee und Pettit 1984*).

- Physikalische Verletzung des Gewebes, Austrocknung des Gewebes vor der Fixierung sowie eine unvollständige Infiltration des Gewebes mit dem Fixativ kommen auch als Ursache für eine Hintergrundfärbung in Frage. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die für diese Studie verwendeten Präparate fachgerecht entnommen und fixiert worden waren.
- Auch eine unvollständige Entparaffinierung und daraus resultierende Rückstände des Einbettungsmediums kann eine Ursache für Hintergrundfärbung sein. Durch eine sorgfältige Entparaffinierung wurde dieses Risiko praktisch ausgeschlossen.
- Eine zu starke Gegenfärbung kann spezifische Färbesignale überdecken und die Auswertung erschweren. Zum Teil wurde daher bei einigen Präparaten auf eine Gegenfärbung verzichtet. Sie erwies sich nicht als Ursache der Hintergrundfärbung.

Da keine kaninen Kollagen-Antikörper erhältlich waren, musste auf humane Immunglobuline zurückgegriffen werden. Verschiedene Antikörper wurden mit dem ausgearbeiteten Laborprotokoll getestet. Dabei wurden Antikörper geprüft, die gar keine oder nur eine leichte und unspezifische Reaktion zeigten. Schliesslich wurden jene Antikörper in jener Verdünnung benutzt, die eine optimale Spezifität bei möglichst schwacher Hintergrundfärbung ergaben.

7.2. Resultate

7.2.1. Kollagen I und III

Das nahezu identische Verteilungsmuster von Kollagen I und III ist auf eine Kopolymerisation der beiden Kollagentypen zurückzuführen (*Junqueira et al. 2002*). In verschiedenen Zellen werden beide Proteine gleichzeitig synthetisiert, was zur Entstehung sogenannter Hybridfibrillen führt, welche schon in diversen Geweben nachgewiesen wurden (*Fleischmajer et al. 1990*). Die in der Regel intensivere Reaktion der Fasern beim Nachweis von Kollagen III im Vergleich zu Kollagen I weist auf einen hohen Anteil von Kollagen III in den Hybridfibrillen hin. Retikuläre Fasern

sind Hybridfibrillen, die unter anderem an der Grenzfläche zwischen Epithel und Bindegewebe feine Netzwerke bilden, welche sehr flexibel sind und sich Formveränderungen gut anpassen können. Ihre Funktion besteht in der Strukturhaltung von Organen, die eine starke morphologische Flexibilität erfordern (*Junqueira et al. 2002*).

Für die Funktion der Urethra ist neben der Flexibilität auch die Zugfestigkeit wichtig. Kollagenfasern sind immer in Zugrichtung einer Belastung angeordnet, da sie sehr widerstandsfähig gegenüber Zug sind. Die teilweise netzartige Anordnung der Kollagenfasern reflektiert die Belastungen, denen die Urethra ausgesetzt ist. Bei starker Füllung und entsprechendem Gewicht der in der Bauchhöhle liegenden Harnblase wird die Harnröhre in Längsrichtung gedehnt; dabei werden die in Längsrichtung der Urethra angeordneten elastischen Fasern belastet (*Augsburger 1997*) und die Kollagenfasern gedehnt. Bei der Miktion ist Flexibilität der Harnröhrenwand notwendig, um den Durchfluss des Harnes zu ermöglichen. Wenn der Druck aus der Harnblase nachlässt, muss sich das Lumen der Harnröhre sofort wieder schliessen. Diese benötigte Elastizität bei gleichzeitiger Zähigkeit ist eine Eigenschaft der Kollagenfasern, insbesondere jener die Kollagen III enthalten. So trägt die Schicht der zirkulär angeordneten Fasern einen Teil zum Verschlussmechanismus der Urethra und somit zur Aufrechterhaltung der Kontinenz bei.

Im Hinblick auf das typische Abbauverfahren für Kollagene, die von Kollagenasen regelrecht „angeknabbert“ und somit immer dünner und feiner werden, ist das Augenmerk besonders auf die Dicke der Fasern zu richten. Da keine Unterschiede im Kaliber der Kollagenfasern zwischen kastrierten und sexuell intakten Tieren gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass nach der Kastration und der darauf folgenden Veränderung des Sexualhormon-Blutspiegels keine sichtbare Veränderung des Kollagen-Metabolismus stattfindet.

7.2.2. Kollagen IV

Zusammen mit nicht kollagenen Bestandteilen wie Proteoglykanen und Glykoproteinen bildet Kollagen IV die Basallamina; ein dünnes, zähes Blatt, welches alle Epithelien unterlagert und sowohl das Endothel von Blut- und Lymphgefäßen als

auch glatte Muskelzellen und quergestreifte Muskelfasern umgibt (*Ham und Cormack 1979*).

Die nötige Flexibilität und Widerstandsfähigkeit erhält die Basallamina durch ein zweidimensionales Netzwerk von Kollagen IV (*Lodish et al. 2000*).

In der Regel besteht die Basallamina aus den beiden Schichten Lamina rara und Lamina densa. Zum Teil und insbesondere bei mehrschichtigen Epithelien wird die Basallamina durch eine Lamina fibroreticularis mit dem angrenzenden Bindegewebe verbunden (*Evans et al. 2000*). Die drei Schichten bilden zusammen die lichtmikroskopisch sichtbare Basalmembran, wobei die genaue Zusammensetzung der Basallamina von Gewebe zu Gewebe variiert (*Alberts et al. 1994*). Diese Variabilität der Zusammensetzung erklärt auch die unterschiedliche Immunreaktivität der Basalmembranen des Übergangsepithels im Vergleich zu jenen der Gefäße und Muskelzellen.

Die Expression von Kollagen IV zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Präparaten der kastrierten Tiere verglichen mit jenen der sexuell intakten Hündinnen.

7.2.3. α -Aktin

Als Bestandteil von glatten Muskelzellen kommt α -Aktin in der Urethra in der longitudinalen und zirkulären glatten Muskulatur sowie in der Tunica media der Arterienwände vor, welche eine entsprechende positive Reaktion zeigten.

Die festgestellte granulierte Struktur des Aktin-Reaktionsproduktes wurde bereits in anderen Studien beobachtet (*Ito und Ger 1984, Nagamoto et al. 2000*). Sie dürfte Ausdruck der Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente in der glatten Muskelzelle sein. Im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur sind hier die Filamente nicht regelmässig parallel und versetzt, sondern eher gitterartig angeordnet (*Junqueira et al. 2002*). Das Aktin ist somit auch nicht an jedem Punkt in der Zelle gleich konzentriert, was das erwähnte granulierte Erscheinungsbild des Reaktionsproduktes erklären könnte.

Nach *Zimmermann et al. (2004)* gewährleistet Aktin die Kontraktionskraft der Harnblase. In der Harnröhre sorgt es neben anderen Faktoren für den Verschluss der Urethra zwischen den Miktionen.

Die Aktin-Reaktion zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen kastrierten und nicht kastrierten Hündinnen.

7.3. Inkontinenz und Kollagengehalt

Verschiedene Untersuchungen zeigten quantitative oder qualitative Veränderungen von Kollagenen bei inkontinenten gegenüber kontinenten Frauen.

Liapis et al. (2000) befassten sich mit der pubocervicalen Fascie inkontinenter Frauen mit und ohne Beckenbodensenkung. Kollagen Typ I war bei den inkontinenten Frauen im Vergleich zu der kontinenten Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Goepel et al. (2003) untersuchten das periurethrale Bindegewebe von kontinenten und inkontinenten postmenopausalen Frauen mit Beckenbodensenkung. Die Untersuchung mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen verschiedene Kollagentypen ergab eine signifikant schwächere Reaktion (Extinktion) von Kollagen Typ I, III und VI bei den inkontinenten Frauen. Die Autoren interpretieren diesen Befund mit einem erhöhten Metabolismus des periurethralen Bindegewebes bei den inkontinenten Frauen.

Eine andere Studie (*Falconer et al. 1996*) befasste sich ebenfalls mit dem Kollagengehalt des periurethralen Bindegewebes, allerdings bei gesunden prä- und postmenopausalen kontinenten Frauen. Die Kollagenkonzentration der postmenopausalen Frauen war dabei signifikant grösser als jene der prämenopausalen Frauen. Postmenopausale Frauen unter Oestrogen-Behandlung wiederum zeigten tiefere Kollagenkonzentrationen als die unbehandelten. Eine Therapie mit Oestrogen scheint demzufolge zu einem verminderten Kollagengehalt des periurethralen Bindegewebes zu führen. Allerdings wird in dieser Studie nicht zwischen den verschiedenen Kollagentypen unterschieden.

Falconer et al. (1998) untersuchten das periurethrale Bindegewebe von postmenopausalen Frauen mit und ohne Inkontinenz sowie in beiden Gruppen von Frauen mit und ohne Oestrogen-Behandlung. Zwischen kontinenten und inkontinenten Frauen wurden keine Unterschiede bezüglich des Kollagengehaltes festgestellt. Oestrogen-Therapie führte jedoch in beiden Gruppen zu einer verminderten Kollagenkonzentration des periurethralen Bindegewebes.

In einer Studie von *Dundar et al. (2002)* konnte jedoch bei Ratten kein Effekt einer Oestrogen-Behandlung auf den Kollagengehalt im urethralen Bindegewebe von ovariectomierten Tieren nachgewiesen werden.

In anderen Untersuchungen wurde ein signifikant kleineres Kollagen/Muskel-Volumenverhältnis in der Harnblase sowie dem Detrusormuskel nach Behandlung

mit Oestrogen festgestellt (*Fleischmann et al. 2002, Sartori et al. 2001*). Auch *Rizk et al. (2003)* wiesen einen Effekt von Oestrogen und Progesteron auf den Kollagengehalt in der urethralen Submukosa nach. So zeigten ovariektomierte Ratten nach einer Progesteron-Applikation von 28 Tagen Dauer den höchsten Anstieg des Gehalts an Kollagen I und III, gefolgt von jenen mit einer kombinierten Oestrogen/Progesteron-, bzw. einer alleinigen Oestrogen-Behandlung.

Die Resultate der verschiedenen Studien sind teilweise widersprüchlich und werden kontrovers diskutiert. Dies dürfte in erster Linie darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche und inhomogene Gruppen einander gegenübergestellt und verglichen wurden sowie verschiedene Untersuchungsmethoden zur Anwendung kamen.

Bezüglich der ursächlich beteiligten Faktoren unterscheidet sich die Harninkontinenz der Hündin von jener der Frau. Während die Inkontinenz bei der Hündin meist auf eine vorangegangene Kastration zurückgeführt werden kann, kommt es bei Frauen nicht selten nach einer vaginalen Geburt und einer dabei entstehenden Schädigung der Beckenbodenmuskulatur, insbesondere des M. levator ani, zur Stressinkontinenz (*Goldberg et al. 2003*).

Bei der Hündin konnte jedoch auch nach mindestens 7 Trächtigkeiten und natürlichen Geburten keine Schädigung oder Denervation des M. levator ani nachgewiesen werden (*Augsburger und Eggenberger 2005*). Diese Diskrepanz lässt sich unter anderem durch die unterschiedliche topographische Anatomie der Hündin und der Frau erklären. Das Gewicht der Abdominalorgane sowie des allfällig graviden Uterus liegt bei der Hündin vor allem auf der Bauchwand, bei der Frau hingegen lastet das gesamte Gewicht auf dem durch eine vorangegangene Geburt eventuell schon vorgeschädigten Beckenboden.

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen einer Veränderung im Hormonhaushalt und der Inkontinenz gibt es jedoch Parallelen. Häufig werden Frauen erst nach der Menopause inkontinent, wenn der Sexualzyklus sistiert. Die Inkontinenz der Hündin nach der Kastration ist am ehesten mit der Inkontinenz postmenopausaler Frauen vergleichbar. Sowohl bei inkontinenten postmenopausalen Frauen als auch bei inkontinenten kastrierten Hündinnen wurden erniedrigte Sexualhormon-Blutspiegel und ein erniedrigter Harnröhrenverschlussdruck festgestellt. In beiden Fällen könnten

also unter anderem Veränderungen des Sexualhormonhaushaltes eine Rolle spielen, lassen sich doch sowohl in der Beckenbodenmuskulatur als auch in den ableitenden Harnwegen der Frau Oestrogenrezeptoren nachweisen (*Smith et al. 1993, Morley et al. 1996*). Auch beim Kaninchen konnten in den ableitenden Harnwegen Oestrogenrezeptoren gefunden werden (*Batra 1986*). Hormonelle Veränderungen könnten daher die Funktion der Beckenbodenmuskulatur und der Urethra beeinflussen und sich so auf den Verschlussmechanismus der Urethra auswirken (*Morley et al. 1996*).

7.4. Schlussfolgerungen

1. Das weitgehend identische immunhistochemische Verteilungsmuster von Kollagen Typ I und III weist auf Hybridfibrillen zusammengesetzt aus diesen beiden Kollagentypen hin. Aus diesen Hybridfibrillen bestehende kollagene Bindegewebsfasern bilden die Grundlage des Harnröhrenstromas. Die stärkere Expression von Kollagen III in den kollagenen Bindegewebsfasern lässt auf einen höheren Anteil an Kollagen III in den Hybridfibrillen schliessen.
2. Bei kastrierten und sexuell intakten Hündinnen bestehen in der Urethra bezüglich Verteilung, Lokalisation und Reaktionsintensität von Kollagen Typ I, III und IV und α -Aktin keine signifikanten Unterschiede.

8. Literatur

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994)

Molecular biology of the cell.

Garland Publishing Inc, New York, 988-92.

Arnold S, Arnold P, Hubler M, Casal M, Rüschi P (1989)

Urinary incontinence in spayed female dogs: frequency and breed disposition.

Schweiz Arch Tierheilk 131, 259-63.

Arnold S, Hubler M, Lott-Stolz G, Rüschi P (1996)

Treatment of urinary incontinence in bitches by endoscopic injection of glutaraldehyde cross-linked collagen.

J Small Anim Pract 37, 163-8.

Arnold S (1997)

Urinary incontinence in castrated bitches. Part 1: significance, clinical aspects and etiopathogenesis.

Schweiz Arch Tierheilk 139, 271-6.

Augsburger HR, Cruz-Orive LM, Arnold S (1993)

Morphology and stereology of the female canine urethra correlated with the urethral pressure profile.

Acta Anat 148, 197-205.

Augsburger HR, Cruz-Orive LM (1994)

Morphological, histochemical and stereological analysis of the female canine M. urethralis.

Histochemistry 102, 373-82.

Augsburger HR, Cruz-Orive LM (1995)

Stereological analysis of the urethra in sexually intact and spayed female dogs.

Acta Anat 154, 135-42.

Augsburger HR (1997)

Elastic fibre system of the female canine urethra. Histochemical identification of elastic, elaunin and oxytalan fibres.

Anat Histol Embryol 26, 297-302.

Augsburger HR, Müller U (2000)

Investigation of the female canine urethral vascular plexus using light and scanning electron microscopy: a contributing factor to urinary continence.

Cells Tissues Organs 167, 239-46.

Augsburger HR, Eggenberger M (2005)

Histochemical and stereological analysis of the levator ani (pubocaudal) muscle in nulliparous and multiparous beagles.

Theriogenology 64, 144-54.

Banerjee D, Pettit S (1984)

Endogenous avidin-binding activity in human lymphoid tissue.

J Clin Pathol 37, 223-5.

Barth A, Reichler IM, Hubler M, Hässig M, Arnold S (2005)

Evaluation of long-term effects of endoscopic injection of collagen into the urethral submucosa for treatment of urethral sphincter incompetence in female dogs: 40 cases (1993-2000).

J Am Vet Med Assoc 226, 73-6.

Batra S (1986)

Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract.

Eur J Pharmacol 127, 37-42.

Boenisch T. (2003)

Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.

DakoCytomation Corp. Carpinteria, CA, USA

Boos A (2000)

Immunohistochemical assessment of collagen types I, III, IV and VI in biopsy samples of the bovine uterine wall collected during the oestrus cycle.

Cells Tissues Organs 167: 225-38.

Bowles MR, Pond SM (1990)

The importance of electrostatic interactions in the binding of paraquat to its elicited monoclonal antibody.

Mol Immunol 27, 847-52.

Bradley WE, Timm GW (1974)

Physiology of micturition.

Vet Clin North Am 4, 487-500.

Chew DJ, DiBartola SP (1986)

Manual of small animal nephrology and urology.

Churchill Livingstone, New York, 267-79.

Dale GI, Gaddy P, Pikul FJ (1994)

Antibodies against biotinylated proteins are present in normal human serum.

J Lab Clin Med 123, 365-71.

Dundar M, Kocak I, Erkus M, Celasun B (2002)

Changes in urethral connective tissue after estrogen replacement therapy in ovariectomized rats.

Scand J Urol Nephrol 36, 173-6.

Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Luck EC, Sannes PL, Plopper CG (2000)

Three-dimensional organization of the lamina reticularis in the rat tracheal basement membrane zone.

Am J Respir Cell Mol Biol 22, 393-7

Eyre DR, Eyre D, Schurmann DJ (2004)
Collagens and cartilage matrix homeostasis.
Clin Orthop 427, 118-22.

Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Ulmsten U, Westergren-Thorsson G, Barchan K, Malmstrom A (1996)
Changes in paraurethral connective tissue at menopause are counteracted by estrogen.
Maturitas 24, 197-204.

Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Blomgren B, Johansson O, Ulmsten U, Westergren-Thorsson G, Malmstrom A (1998)
Paraurethral connective tissue in stress-incontinent women after menopause.
Acta Obstet Gynecol Scand 77, 95-100.

Fleischmann N, Christ G, Sclafani T, Melman A (2002)
The effect of ovariectomy and long-term estrogen replacement on bladder structure and function in the rat.
J Urol 168, 1265-8.

Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R (1990)
Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis.
Am NY Acad Sci 580, 161-75.

Goepel C, Hefler L, Methfessel HD, Koelbl H (2003)
Periurethral connective tissue status of postmenopausal women with genital prolapse with and without stress incontinence.
Acta Obstet Gynecol Scand 82, 659-64.

Goldberg RP, Kwon C, Gandhi S, Atkuru LV, Sorensen M, Sand PK (2003)
Urinary incontinence among mothers of multiples: the protective effect of cesarean delivery.
Am J Obstet Gynecol 188, 1447-53.

Ito K, Ger YC (1984)

Distribution of actin in mesangial cell of rat glomerulus.

Acta Pathol Jpn 34, 1267-76.

Ham AW, Cormack DH (1979)

Histology (8th edn).

J.B. Lippincott Company, Toronto, 607.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (2002)

Histologie.

Springer Verlag, Berlin, 58-63, 158-61, 346.

Langsjö TK, Rieppo J, Pelttari A, Oksala N, Kovanen V, Helminen HJ (2002)

Collagenase-induced changes in articular cartilage as detected by electron-microscopic stereology, quantitative polarized light microscopy and biochemical assays.

Cells Tissues Organs 172, 265-75.

Liapis A, Bakas P, Pafiti A, Hassiakos D, Frangos-Plemenos M, Creatsas G (2000)

Changes in the quantity of collagen type I in women with genuine stress incontinence.

Urol Res 28, 323-26.

Lillie RD (1965)

Histopathologic technique and practical histochemistry (3rd edn).

McGraw-Hill Book Company, New York, 32-60.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000)

Molecular cell biology (4th edn).

WH Freeman & Company, New York, 979-85.

Mandl I (1972)

Collagenase.

Gordon and Breach, New York, 1-15.

Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ (1987)

The structural basis of antigen-antibody recognition.

Ann Rev Biophys Chem 16, 139-59.

Morley R, Cumming J, Weller R (1996)

Morphology and neuropathology of the pelvic floor in patients with stress incontinence.

Int Urogynecol J 7, 3-12.

Mosimann W, Kohler T (1990)

Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.

Paul Parey Verlag, Berlin, 66.

Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC (2000)

Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci 41, 1122-9.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1999)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd II (8. Aufl.); Frewein J,

Gasse H, Leiser R, Roos H, Thomé H, Vollmerhaus B, Waibl H (Hrsg.).

Paul Parey Verlag, Berlin, 323-4.

Rechenberger T, Postawski K, Jakowicki J, Gunja-Smith Z, Woessner J (1998)

Role of fascial collagen in stress urinary incontinence.

Am J Obstet Gynecol 179, 1511-4.

Rizk DE, Mensah-Brown EP, Chandranath SI, Ahmed I, Shafiullah M, Patel M, Al-Haj M, Adem A (2003)

Effects of ovariectomy and hormone replacement on collagen and blood vessels of the urethral submucosa of rats.

Urol Res 31, 147-51.

Romeis (1968)

Mikroskopische Technik, 17. Aufl.

Urban & Schwarzenberg, München, 503.

Sartori MG, Girao MJ, De Jesus Simoes M, Sartori JP, Baracat EC, Rodrigues de Lima G (2001)

Quantitative evaluation of collagen and muscle fibers in the lower urinary tract of castrated and under-hormone replacement female rats.

Clin Exp Obstet Gynecol 28, 92-6.

Smith P, Heimer G, Norgren A, Ulmsten U (1993)

Localization of steroid hormone receptors in the pelvic muscles.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 50, 83-5.

Stocklin-Gautschi NM, Hässig M, Reichler IM, Hubler M, Arnold S (2001)

The relationship of urinary incontinence to early spaying in bitches.

J Reprod Fertil Suppl 57, 233-6.

Streefkerk JG (1972)

Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol.

J Histochem Cytochem 20, 829-31.

Streicher J, Fabian B, Herkner K, Pointner H, Bayer PM (1998)

Anticytokeratins are a potential source of false-positive indirect immunofluorescence assays for C-ANCA.

J Clin Lab Anal 12, 54-9.

Wadsley JJ, Watt RM (1987)

The effect of pH on the aggregation of biotinylated antibodies and on the signal-to-noise observed in immunoassays utilizing biotinylated antibodies.

J Immunol Methods 103, 1-7.

Zhou X, Wang P, Li M, Liu L, Zhang Y, Zhang S, Chen G, Zhang C, Huang S (2002)
The influence of heat-induced epitope retrieval on endogenous avidin-binding activity
(EABA) and blocking of EABA in immunohistochemistry.
Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 31, 491-6.

Zimmermann RA, Tomasek JJ, McRae J, Haaksma CJ, Schwartz RJ, Lin HK, Cowan
RL, Jones AN, Kropp BP (2004)
Decreased expression of smooth muscle alpha-actin results in decreased contractile
function of the mouse bladder.
J Urol 172, 1667-72.

8. Dank

Herzlichen Dank an alle die mich während der Zeit dieser Arbeit fachlich und persönlich unterstützt haben!

Besonderen Dank gebührt:

Herrn PD Dr. H. Augsburg für das Überlassen des Themas, die Übernahme des Referats und die fachliche Beratung während der Durchführung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. S. Arnold für die Übernahme des Korreferats.

Frau J. Leclerc für die jederzeit geduldige Hilfe und moralische Unterstützung im Labor.

Frau A. Marcantonio von der Firma Novartis für die Einführung in die Geheimnisse der Immunhistochemie.

Meinem Sohn Nils fürs geduldige Spielen während Mami am Computer sass.

Meinem Partner Manuel für die jederzeit gewährte Hilfe bei Computer- und Motivationsproblemen.

Meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und das Babysitten während der Doktorarbeit.

Lebenslauf

Name	Marianne Barbara Oswald
Geburtsdatum	22. November 1976
Geburtsort	Rüti (ZH)
Nationalität	CH
Heimatort	Rüti ZH
1983 – 1989	Primarschule in Rüti ZH
1989 – 1991	Sekundarschule in Rüti ZH
1991 – 1996	Kantonsschule Zürcher Oberland, Wetzikon
1996	Mittelschulabschluss, Maturität Typus D
1996 – 2001	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich, Schweiz
1999	Austauschsemester an der Università degli studi di Parma, Italien
2001	Eidgenössisches Diplom der Veterinärmedizin an der Universität Zürich, Schweiz
2002 – 2004	Assistentin in der Gross- und Kleintierpraxis Dr. Nussbaumer, Unterägeri (ZG)
Seit 2006	Assistentin in der Kleintierpraxis Dr. Rey in Pfäffikon (ZH)
2006	Dissertation am Veterinär-Anatomischen Institut Vetsuisse-Fakultät Zürich
1. Oktober 2006	