

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Histologie des bovinen Uterus**

Histologisch gliedert sich die Wand des Uterus in das Endometrium, das die lumenseitige Schleimhautauskleidung bildet, das Myometrium, welches aus einer zirkulären und longitudinalen Muskelschicht besteht und das Perimetrium, ein außen anliegendes, einschichtiges Epithel. Dem Myometrium liegt außen eine Gefäßschicht mit Arterien, Venen und Lymphgefäßen an. Von dieser Schicht ziehen Gefäße sowie Nervenfasern ins Endometrium. Das Endometrium setzt sich aus dem Oberflächenepithel und der Lamina propria mucosae zusammen. Grundsätzlich ist das Oberflächenepithel einschichtig und hochprismatisch, es kann jedoch beim Rind stellenweise auch mehrreihig sein (Liebich, 1998). Endometriumszellen tragen oberflächlich Kinozilien (Flimmerzelle) oder Mikrovilli (sezernierende Zelle) (Krzymowski und Stefanczyk-Krzymowska, 2004). Die Lamina propria mucosae ist aus Bindegewebe aufgebaut und enthält eine große Zahl tubulär verzweigter Uterindrüsen. Daneben befinden sich in Abhängigkeit von der Zyklusphase im Bindegewebe Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten (Klucinski et al., 1990b; Butt et al., 1991; Cobb und Watson, 1995). Eine Besonderheit stellen beim Rind die Karunkeln dar. Dies sind knopfförmige Vorwölbungen, die sich aus der Lamina propria entwickeln. Sie dienen der Verbindung zwischen maternaler Schleimhaut und fetaler Fruchthülle (Lee und DeMayo, 2004).

### **2.2 Einfluss des Sexualzyklus auf den Uterus und das Endometrium**

Das Rind ist ganzjährig polyöstrisch mit einer Zyklusdauer von durchschnittlich 21 Tagen (Garverick und Smith, 1993). Definitionsgemäß beginnt der Zyklus am Tag 1 mit der Ovulation und lässt sich in vier Phasen gliedern: Proöstrus, Östrus, Postöstrus und Interöstrus. In Abhängigkeit von der jeweiligen Phase lassen sich an Uterus und Endometrium zyklische Veränderungen feststellen. Im Proöstrus bzw. der prä-ovulatorischen Phase (Tag 19 bis 21) beginnt unter dem Einfluss von Östrogenen die Proliferationsphase. Die Schleimhaut ödematisiert und das Oberflächenepithel nimmt an Höhe zu. Die Uterindrüsen sind in dieser Phase gestreckt und beginnen mit dem Wachstum. Zusätzlich nimmt die Vaskularisation zu.

Im Östrus (Dauer ca. 1 Tag) setzt sich die Proliferationsphase fort. Epithel- und Drüsenzellen geben Sekrete ab, die Proteine, Enzyme sowie Glucose enthalten und als Uterinmilch bezeichnet werden (Williams et al., 1992; Gray et al., 2001). Die Zervix produziert vermehrt Brunstschleim. Der Postöstrus bzw. die post-ovulatorische Phase dauert ca. 3 bis 4 Tage und steht unter dem Einfluss des vom Corpus luteum synthetisierten Progesterons. Er zeichnet sich durch einen Übergang von der Proliferations- in die Sekretionsphase aus. Die Uterindrüsen zeigen in dieser Zyklusphase ihre stärkste Ausbildung bzw. Schlängelung (Krzymowski und Stefanczyk-Krzymowska, 2004) und steigern während dieser Phase ihre Sekretion. Im Interöstrus bzw. der Lutealphase (Dauer 13 Tage) ist die Uterusschleimhaut für die Implantation der Blastozyste vorbereitet. Fand keine Plazentation statt, wird vom Endometrium  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthetisiert, welches etwa ab dem 16. Zyklustag (Thatcher et al., 2001) die Luteolyse einleitet (Garverick und Smith, 1993). Im weiteren Verlauf erlischt die sekretorische Tätigkeit der Uterindrüsen und die Schlängelung wird zurückgebildet (Krzymowski und Stefanczyk-Krzymowska, 2004).

### 2.3 Endometritis

Bei der Endometritis handelt es sich patho-histologisch um eine Entzündung der Uterusschleimhaut (Lewis, 1997). Zur Entstehung dieser Erkrankung kommt es häufig nach der Kalbung, da die geöffnete Zervix das Eindringen von Keimen erleichtert. Verletzungen des Uterus, die durch Schweregeburten, geburtshilfliche Eingriffe, Totgeburten, Zwillingsgeburten sowie Nachgeburtsverhaltungen hervorgerufen werden können, stellen Risikofaktoren für uterine Infektionen dar (Sheldon und Dobson, 2004; Han und Kim, 2005). Mangelnde Geburtshygiene und stoffwechselbedingte Erkrankungen wie Milchfieber oder Ketose begünstigen ebenfalls die Entstehung einer Endometritis. Letztlich entscheidet die Balance zwischen der Pathogenität der Erreger und der Leistungsfähigkeit des Immunsystems, ob das Tier erkrankt (Sheldon und Dobson, 2004). Häufig lässt sich gerade nach der Kalbung eine herabgesetzte Aktivität der zellulären Abwehr feststellen. Die phagozytierende Eigenschaft der neutrophilen Granulozyten (PMN) ist zu diesem Zeitpunkt eingeschränkt (Zerbe et al., 2001) (siehe Kapitel 2.3.2.2). Hinsichtlich des Erregerspektrums werden vor allem *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Prevotella ssp.* sowie *Staphylo-* und *Streptococccen* als pathogene Keime diskutiert (Bonnett et

al., 1991; Dohmen, 1995; Dohmen et al., 2000; Dhaliwal et al., 2001; Sheldon und Dobson, 2004). Dabei fördern die genannten Erreger ihr Wachstum zum Teil gegenseitig. *Arcanobacterium pyogenes* produziert beispielsweise Wachstumsfaktoren für *Fusobacterium necrophorum* (Sheldon, 2004). Hinsichtlich der verschiedenen Verlaufsformen und der unterschiedlichen klinischen Bilder lassen sich akute von chronischen und subklinischen Gebärmutterentzündungen unterscheiden.

### **2.3.1 Akute Metritis und chronische Endometritis**

Die akute Metritis tritt innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Kalbung auf und wird von einem gestörtem Allgemeinbefinden der Tiere sowie einer erhöhten Körpertemperatur ( $>39,5^{\circ}\text{C}$ ) begleitet. Ein charakteristisches Symptom stellt der vaginale Ausfluss dar, der meist wässrig, rötlich-braun, trüb und übelriechend ist (Sheldon et al., 2006). Die meisten akuten Metritiden gehen ab dem 14. Tag post partum in chronische Endometritiden über (Drillich et al., 2001). In der Regel ist das Allgemeinbefinden der betroffenen Tiere im chronischen Verlauf ungestört. Als klinisches Symptom ist vaginaler Ausfluss zu nennen, der von unterschiedlicher Qualität sein kann. In Abhängigkeit von dem Anteil an eitrigen Beimengungen ist er schleimig-eitrig bis eitrig-übelriechend (Sheldon et al., 2006). Bezüglich der diagnostischen Möglichkeiten lassen sich chronische Endometritiden adspektorisch anhand des vaginalen Ausflusses erkennen. Zudem können mit Hilfe der rektalen Palpation Flüssigkeitsansammlungen im Uterus erkannt werden. Ein drittes diagnostisches Hilfsmittel ist die Vaginoskopie (Gilbert, 1992; LeBlanc et al., 2002). Dabei stellen sowohl die rektale Palpation (Drillich et al., 2002), als auch die Vaginoskopie (LeBlanc et al., 2002) im Vergleich zur alleinigen Adspektion sensitivere Methoden dar. Die Vaginoskopie wiederum ist der rektalen Palpation vorzuziehen (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006). Hinsichtlich der Therapie von chronischen Endometritiden wird die intrauterine Verabreichung von lokal wirkenden Antibiotika (Gilbert, 1992; LeBlanc et al., 2002; Sheldon, 2004) oder die Behandlung mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und seiner Analoga empfohlen (Tenhagen und Heuwieser, 1999; Heuwieser et al., 2000; Knutti et al., 2000; Lewis, 2003; Drillich et al., 2005).

Zahlreiche Studien belegen, dass sich uterine Infektionen bzw. Endometritiden negativ auf die Fruchtbarkeit der Milchviehherde auswirken (Lucy, 2001; Drillich et al., 2002; LeBlanc et al.,

2002; Mateus et al., 2002; Sheldon et al., 2002). Insgesamt zählen sie zu den häufigsten Abgangsursachen (Rajala-Schultz und Grohn, 1999). Der prozentuale Anteil der aufgrund von Fruchtbarkeitsstörungen geschlachteten Tiere liegt bei etwa 30 bis 40% (Esslemont und Kossaibati, 1997; Kubar und Jalakas, 2002). Für den Landwirt ist eine verminderte Reproduktionsleistung der Tiere mit hohen finanziellen Einbußen verbunden. Nach Esslemont und Peeler (1993) liegen die Kosten pro erkrankter Kuh bei etwa € 210. Verluste entstehen hauptsächlich durch erhöhte Behandlungs- und Besamungskosten sowie durch verlängerte Zwischenkalbezeiten und eine reduzierte Milchleistung der Kühe (Lewis, 1997).

### 2.3.2 Subklinische Endometritis

Die subklinische Endometritis ist durch das Fehlen klinisch apparenter Symptome gekennzeichnet. Die betroffenen Tiere zeigen weder ein gestörtes Allgemeinbefinden oder Fieber, noch eitrigen vaginalen Ausfluss (Sheldon et al., 2006). Als einziges indirektes Symptom ist das Umrindern zu nennen. Aufgrund des fehlenden vaginalen Ausflusses kann sie im Gegensatz zur chronischen Endometritis weder adspektorisch, palpatorisch noch vaginoskopisch diagnostiziert werden. Mit Hilfe eines zytologischen Abstriches von Endometriumzellen kann das vermehrte Vorkommen von neutrophilen Granulozyten einen Hinweis auf entzündliche Veränderungen im Uterus geben (Kasimanickam et al., 2004; Raab, 2004; Gilbert et al., 2005). Ebenso ist es möglich, subklinische Endometritiden sonographisch durch den Nachweis intrauteriner Flüssigkeitsansammlungen festzustellen (Kasimanickam et al., 2004; Lenz, 2004). Versuche, subklinische Endometritiden anhand von Blut-Parametern zu diagnostizieren schlugen bislang fehl. Obwohl in der Literatur diskutiert wird, dass Endometritiden mit erhöhten Plasma-Konzentrationen von 13,14-Dihydro,15-keto-PGF<sub>2α</sub> (PGFM) assoziiert sind (Seals et al., 2002), gelang es nicht, subklinische Endometritiden anhand dieses stabilen PGF<sub>2α</sub>-Metaboliten zu diagnostizieren (Archbald et al., 1998).

Durch frühes Erkennen und Behandeln von subklinischen Endometritiden könnte sich der fruchtbarkeitsreduzierende Effekt der Erkrankung vermeiden lassen. Hierzu wurden in einer Studie von Kasimanickam et al. (2005b) zwei verschiedene therapeutische Ansätze miteinander verglichen. Kühe, bei denen nach der Kalbung mittels endometrialer Zytologie und sonographischer Untersuchung eine subklinische Endometritis diagnostiziert werden konnte, wurden entweder intrauterin mit Antibiotika (500 mg Cephapirin) oder systemisch

mit PGF<sub>2α</sub> (500 µg Cloprostenol) behandelt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, wiesen alle behandelten Tiere eine deutlich verbesserte Reproduktionsleistung auf. Im Gegensatz dazu zeigte in einer weiteren Studie die Behandlung subklinisch erkrankter Tiere mit Enzymen sowie PGF<sub>2α</sub> keinen positiven Effekt auf die Fruchtbarkeitsrate (Lincke, 2006). Gilbert et al. (2004) konnten bei multiparen Kühen eine verbesserte Reproduktionsleistung nach Behandlung mit PGF<sub>2α</sub> feststellen, nicht jedoch bei Erstkalbinnen. Die Prävalenz von subklinischen Endometritiden liegt in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitraum post partum sowie der diagnostischen Methode in einem Bereich von etwa 40-50% (Kasimanickam et al., 2004; Raab, 2004; Gilbert et al., 2005). Als Folgen subklinischer Endometritiden werden reduzierte Konzeptionsraten (Kasimanickam et al., 2004), verlängerte Günstzeiten (Gilbert et al., 2005) und erhöhte Abgangsraten (Raab, 2004) der betroffenen Tiere beschrieben.

### **2.3.2.1 Die zytologische Untersuchung des Endometriums mittels Cytobrush® und seine Anwendung in der Diagnostik**

Die zytologische Untersuchung mittels Cytobrush® wurde Ende der 70iger Jahre in Schweden zur Gewinnung von Zellen entwickelt. Ursprünglich diente sie zur Diagnostik von malignen Zellentartungen im Zervikalkanal der Frau. Mittlerweile wird die Cytobrush®-Methode routinemäßig in der Humangynäkologie eingesetzt (Fejgin et al., 2001; Cioni et al., 2003). Inzwischen wird das Bürstchen auch in der Veterinärmedizin zur Zellgewinnung verwendet. Es lässt sich nicht nur in der Gynäkologie, sondern ebenfalls im Bereich der Ophthalmologie einsetzen. So dient es bevorzugt bei an Keratitis oder Konjunktivitis leidenden Katzen zur Diagnostik von viral bedingten Erkrankungen (Allgoewer et al., 2001; Volopich et al., 2005). Beim Rind findet das Cytobrush® in der Gynäkologie seine Anwendung und trägt beispielsweise zur Identifizierung von genitalen Infektionen mit Chlamydien bei (DeGraves et al., 2003; Jee et al., 2004). Es wird auch bei Milchkühen zur Diagnose von postpartalen Endometritiden eingesetzt (Kasimanickam et al., 2004; Raab, 2004). Insgesamt stehen vier verschiedene Verfahren zur Gewinnung von endometrialen Entzündungszellen zur Verfügung. Neben der Cytobrush®-Methode (Bourke et al., 1997) lässt sich mittels Baumwolltupfern, uteriner Biopsie (Bonnett et al., 1991) oder Uterusspülung (Gilbert et al., 2005) Probenmaterial für eine histologische Untersuchung gewinnen. In einem Vergleich mit der Uterusspülung erwies sich die Cytobrush®-Methode als sensitivere Methode zur

Diagnostik von subklinischen Endometritiden (Kasimanickam et al., 2005a).

### **2.3.2.2 Bedeutung und Funktion der neutrophilen Granulozyten im Uterus**

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind Zellen, die dem unspezifischen Abwehrsystem zugerechnet werden. Ihre Bildung erfolgt im Knochenmark. Ein charakteristisches Kennzeichen ist der stark segmentierte Kern, der etwa drei bis fünf Segmente aufweist sowie eine Vielzahl an zytoplasmatischen Granula. Als eine der wichtigsten Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten ist die Phagozytose von Erregern zu nennen, so dass sie als eine erste Abwehr gegen bakterielle Infektionen fungieren. So konnte hinsichtlich entzündlicher Vorgänge im bovinen Uterus eine gesteigerte Migration der PMN zum Infektionsherd hin festgestellt werden (Klucinski et al., 1990b; Klucinski et al., 1990a). Um zum Infektionsort zu gelangen, verlassen die Zellen die Blutbahn und können, einem chemischen Gradienten folgend, in das Entzündungsgebiet einwandern. Dieser als Chemotaxis bezeichnete Vorgang wird durch lösliche Faktoren, wie beispielsweise das Interleukin 8 vermittelt (Kelly et al., 2002). Durch die Vielzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche können PMN opsonierte Bakterien erkennen, aufnehmen und anhand von Enzymen (z.B. Lysozyme, Proteasen, Hydrolasen) zerstören. Beim Rind konnte nach einer intrauterinen Infusion mit *Arcanobacterium pyogenes* eine gesteigerte Antikörper-Produktion nachgewiesen werden. Vor allem die Immunglobuline A und G<sub>2</sub> wurden im Uterus lokal synthetisiert, um die Opsonierung der Erreger zu gewährleisten und somit die Phagozytose zu beschleunigen (Watson et al., 1990). Neben ihrer phagozytierenden Eigenschaft ist es den PMN möglich, toxische Sauerstoff-Radikale zu bilden (respiratory burst) und somit Mikroorganismen durch Oxidation zu töten (Baggiolini et al., 1993; Paape et al., 2003). Stimuliert wird die phagozytierende Aktivität der Granulozyten durch verschiedene Zytokine, wie die Interleukine 1, 6 und 8 sowie den Tumor Nekrose Faktor alpha. Neutrophile Granulozyten sind jedoch nicht nur im Rahmen entzündlicher Prozesse von Bedeutung, sondern sie übernehmen im Puerperium auch physiologische Aufgaben. Sie sind vor allem etwa am Tag 20 im vormals graviden Uterushorn vermehrt vorhanden, wobei die Zellzahl im weiteren Verlauf des Puerperiums (Tag 40) wieder abnimmt (Bonnett et al., 1991; Gilbert et al., 2005). Trotz der massiven zellulären Abwehr kommt es häufig nach der Kalbung bzw. im Puerperium zur Ausbildung einer Endometritis. Dies könnte mit einer beeinträchtigten

Funktion der neutrophilen Granulozyten zusammenhängen (Zerbe et al., 2001). Ein Erklärungsansatz (Burton et al., 2005) macht die unter der Geburt rapide ansteigende Konzentration von Glukokortikoiden für eine veränderte granulozytäre Aktivität verantwortlich. Erhöhte Kortisol-Konzentrationen im Blut während der Geburt lösen eine vermehrte Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark aus. Diese werden im Reproduktionstrakt benötigt, um beispielsweise durch die Synthese von Kollagenasen und Elastasen den Geburtsweg zu weiten. Diese zusätzliche Aufgabe der PMN könnte ihre Funktion hinsichtlich der bakteriellen Abwehr überlagern und somit zu einer erhöhten Empfänglichkeit des Uterus für Infektionen beitragen. Es werden in der Literatur jedoch noch weitere Ursachen für eine verminderte Leistung der PMN diskutiert. Während sich einerseits das Alter der Tiere negativ auf die Phagozytose-Aktivität der PMN auswirkt (Gilbert et al., 1993), sind einige Erreger in der Lage, deren bakterizide Fähigkeit zu schwächen (Klucinski et al., 1995). Vor allem *Escherichia coli* unterdrückt die Phagozytose-Aktivität der neutrophilen Granulozyten und begünstigt somit die Koinfektion mit anderen Erregern wie beispielsweise *Arcanobacterium pyogenes* (Zerbe et al., 2001). Dabei wird die geminderte Funktion der PMN jedoch nicht nur durch Bakterien ausgelöst, sondern hängt auch vom uterinen Milieu ab. So konnte nachgewiesen werden, dass die lochiale Sekretion von infizierten Uteri einen negativen Einfluss auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten hat (Zerbe et al., 2002). Unabhängig davon scheint die Jahreszeit einen Einfluss auf die unspezifische Abwehr auszuüben. Kühe, die im Winter kalbten, zeigten im Vergleich zu Tieren, deren Kalbung im Sommer stattfand, eine deutlich verminderte Phagozytose-Aktivität der neutrophilen Granulozyten (Gugushvili, 2003).

## 2.4 Entzündung

Die akute Entzündung wird durch fünf Kardinalsymptome charakterisiert: Rötung (rubor), Wärme (calor), Schwellung (tumor), Schmerz (dolor) und Funktionsstörung (functio laesa). Bakterielle und virale Infektionen werden häufig von einer lokalen Sekretion chemischer Vermittlersubstanzen begleitet. Diese sogenannten Entzündungsmediatoren induzieren und steuern die im Rahmen einer Entzündung ablaufenden Vorgänge. Sie sind beispielsweise für die Veränderung des Gefäßdurchmessers, die Erhöhung der Gefäßpermeabilität sowie für die Adhäsion, Emigration und Chemotaxis von Leukozyten verantwortlich. Die Entzündungsmediatoren sind entweder bereits in aktiver Form in Zellen gespeichert oder werden erst nach Stimulation durch die Entzündungsnexe gebildet (Stünzi, 1990). In Abbildung 1 ist die Interaktion ausgewählter Entzündungsmediatoren in einem vereinfachten Schema dargestellt.

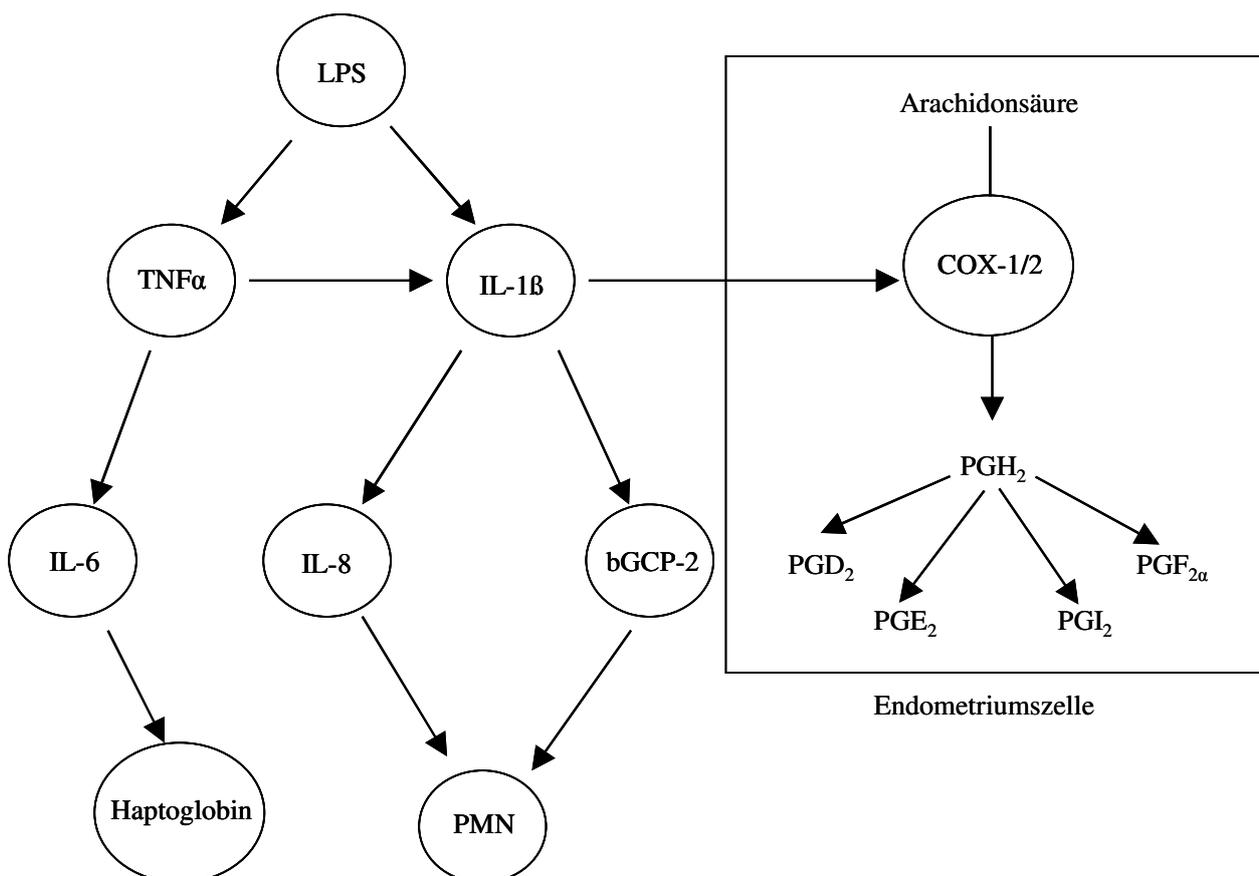


Abbildung 1: Vereinfachter schematischer Überblick über die Interaktionen ausgewählter Entzündungsmediatoren im Endometrium. LPS: Lipopolysaccharid, TNF: Tumor Nekrose Faktor, IL: Interleukin, bGCP: bovines granulozytäres chemotaktisches Protein, COX: Cyclooxygenase, PG: Prostaglandin, PMN: polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt.

## 2.5 Entzündungsmediatoren

### 2.5.1 Bovines granulozytäres chemotaktisches Protein 2 (bGCP-2)

Das bovine granulozytäre chemotaktische Protein 2 (bGCP-2) ist ein 5-6 kDa großes Protein und gehört zur Familie der Chemokine. Anhand ihrer Cysteinreste unterteilt man die Gruppe der Chemokine in zwei Unterfamilien. Bei den C-C Chemokinen liegen die ersten beiden Cysteinreste direkt nebeneinander, während die Cysteinreste der C-X-C Chemokine durch eine andere Aminosäure getrennt werden. Das bGCP-2 wird der Familie der C-X-C Chemokine zugeordnet (Proost et al., 1993).

Im Entzündungsgeschehen spielt das proinflammatorische Protein aufgrund seiner chemotaktischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Phagozytose von Erregern (Struyf et al., 2005). Vorwiegend von Monozyten und Makrophagen synthetisiert, ist das bGCP-2 hauptsächlich für die Anlockung und Steuerung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich. Die Signalvermittlung erfolgt über die beiden Rezeptoren C-X-C R1 und C-X-C R2 (Wolf et al., 1998; Williams et al., 1999). Zusätzlich wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass GCP-2 die Hämostase von zirkulierenden Leukozyten beeinflusst. Bei Mäusen, die eine Leukopenie aufwiesen, konnte nach systemischer Gabe von GCP-2 ein signifikanter Anstieg von zirkulierenden Leukozyten im Blut beobachtet werden (Starckx et al., 2002).

Beim Rind ist bGCP-2 nicht nur bei entzündlichen Prozessen, sondern auch während der Trächtigkeit von Bedeutung. In der frühen Phase der Trächtigkeit sezerniert der Trophoblast unter anderem Interferon tau ( $\text{IFN}\tau$ ) und das sogenannte pregnancy-specific-protein B (PSPB). In vitro wurde im bovinen Endometrium als Antwort auf  $\text{IFN}\tau$  (Teixeira et al., 1997; Staggs et al., 1998) und auf PSPB (Austin et al., 1999) die Synthese von bGCP-2 induziert.

In vitro konnte eine Stimulation der GCP-2-Synthese in humanen endometrialen Stromazellen durch Interleukin-1 beta, den Tumor Nekrose Faktor alpha sowie Lipopolysaccharide beobachtet werden (Van Damme et al., 1997; Mine et al., 2003). Hinsichtlich der Erforschung der Regulation dieses Proteins im bovinen Endometrium mangelt es bislang an Studien.

## 2.5.2 Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1/COX-2)

Die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1/-2) sind Enzyme mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 70 bis 74 kDa (Kniss, 1999; Tanabe und Tohnai, 2002). Sie werden in nahezu allen Gewebearten expremiert (Simmons et al., 2004). Beide Enzyme katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin (PG)  $H_2$ .  $PGH_2$  ist die Vorstufe der Prostaglandine  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$  und  $PGF_{2\alpha}$  (Sales und Jabbour, 2003). COX-1 wird als konstitutives Enzym beschrieben, d.h. es wird kontinuierlich auf gleich bleibendem Niveau synthetisiert. Somit ist es über die Prostaglandin-Produktion an der Ausführung wichtiger alltäglicher Aufgaben in der Zelle beteiligt, wie z.B. der Kontraktion der Muskulatur. COX-2 ist dagegen induzierbar und spielt eine wichtige Rolle in physiologischen und pathologischen Vorgängen im Körper (Smith et al., 1996).

Im Entzündungsgeschehen ist überwiegend COX-2 von Bedeutung. Die von diesem Enzym synthetisierten Prostaglandine dienen als Vermittler von entzündlichen Reaktionen. Vor allem die Prostaglandine  $E_2$  und  $I_2$  spielen eine übergeordnete Rolle. Sie modulieren die mit dem Schmerzempfinden verbundene Signaltransmission, können aber auch Fieber hervorrufen ( $PGE_2$ ). Die COX-2-Expression wird in diesen Prozessen durch Lipopolysaccharide und Interleukin 1 stimuliert (Simmons et al., 2004).

Während des Sexualzyklus und in der frühen Phase der Trächtigkeit wurde eine Expression der Cyclooxygenasen im Endometrium der Frau (Maia et al., 2005), des Affen (Sun et al., 2004), des Schafs (Charpigny et al., 1997) und der Ratte detektiert (Dong et al., 1996). Beim Rind konnte eine COX-1-Expression im Zyklusverlauf im Endometrium nicht gemessen werden, während die COX-2-Expression zyklischen Schwankungen unterlag. In der postovulatorischen und der frühen Lutealphase wurde COX-2 nur in geringem Umfang expremiert. In der späten Lutealphase und der präovulatorischen Phase war die Konzentration hingegen deutlich erhöht. Dies deutet darauf hin, dass vor allem COX-2 für die Prostaglandin-Synthese im Endometrium verantwortlich ist (Arosh et al., 2002). Bezüglich der Regulation im Zyklusverlauf zeigten mit Arachidonsäure und Oxytocin stimulierte Epithelzellen *in vitro* eine deutlich gesteigerte COX-2-Produktion (Parent et al., 2003). Auf die COX-1-Expression übte Oxytocin jedoch keinen Effekt aus (Asselin et al., 1997). Auch Östradiol und Progesteron regulieren die Prostaglandinsynthese während des Sexualzyklus. Östradiol senkt die COX-2-Expression sowie die  $PGF_{2\alpha}$ -Synthese in den Epithelzellen des Endometriums,

während Progesteron die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion in den Epithelzellen steigert. Obwohl COX-2 ebenso in endometrialen Stromazellen für die Prostaglandin-Produktion verantwortlich ist, konnte kein regulatorischer Effekt der Steroidhormone auf die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese in Stromazellen festgestellt werden (Xiao et al., 1998).

Im trächtigen Uterus sind COX-1 und COX-2 von Bedeutung, da die von ihnen synthetisierten Prostaglandine einerseits für die Aufrechterhaltung ( $\text{PGE}_2$ ), andererseits für die Beendigung der Trächtigkeit bzw. für die Einleitung der Geburt durch Auslösung von Uteruskontraktionen mittels  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sorgen (Simmons et al., 2004). Um eine Luteolyse in der frühen Phase der Trächtigkeit zu verhindern und die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit zu gewährleisten, senkt Interferon tau die COX-2-Expression und somit auch die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese (Xiao et al., 1999; Wolf et al., 2003). Oxytocin hingegen wird als ein wichtiger Faktor hinsichtlich der COX-2-Induktion und der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung am Ende der Trächtigkeit und während der Geburt diskutiert (Fuchs et al., 1999).

### **2.5.3 Haptoglobin**

Haptoglobin besitzt ein Molekulargewicht von 125 kDa und wird vorwiegend von den Hepatozyten in der Leber gebildet (Eckersall, 1995). Die Synthese der Akuten Phase Proteine wird über die vermehrte Freisetzung von Zytokinen, wie beispielsweise die Interleukine 1 und 6 sowie den Tumor Nekrose Faktor alpha reguliert (Henderson und Wilson, 1996; Sheldon et al., 2001).

Als Protein der akuten Phase ist es an der frühen unspezifischen Abwehr bei Entzündungen, Infektionen und Traumen beteiligt (Petersen et al., 2004). Eine seiner wichtigsten Eigenschaften ist die Bildung von stabilen Komplexen mit freiem Hämoglobin im Blut (Van Vlierberghe et al., 2004; Fagoonee et al., 2005), um den Verlust von Eisen zu verhindern (Petersen et al., 2004). Aufgrund dieser Fähigkeit wird die Verfügbarkeit von freiem Eisen begrenzt, welches für das Wachstum von Bakterien notwendig wäre. Dadurch wird ein bakteriostatischer Effekt erzielt. Daneben stimuliert Haptoglobin im Entzündungsgeschehen die Angiogenese (de Kleijn et al., 2002) und besitzt immunsuppressive Eigenschaften (Murata und Miyamoto, 1993; Jacobsen et al., 2004). Beim Rind ist die Haptoglobin-Konzentration im Serum vor allem bei entzündlichen (Nielsen et al., 2004; Grell et al., 2005) und traumatischen (Fisher et al., 1997; Earley und Crowe, 2002; Ting et al., 2003) Prozessen erhöht. In

Kombination mit Serum-Amyloid A eignet es sich beim Rind zur Unterscheidung von akuten und chronischen Entzündungen. Diesbezüglich wurden die Konzentrationen der beiden Akute Phase Proteine im Serum von Kühen verglichen, die an einer akuten bzw. chronischen Entzündung litten. Akut erkrankte Tiere wiesen einen deutlich höheren Serum-Amyloid A- bzw. Haptoglobin-Spiegel im Serum auf. Serum-Amyloid A erwies sich dabei als sensitiverer Marker (Horadagoda et al., 1999).

Haptoglobin ist sowohl im Zusammenhang mit bakteriellen Kontaminationen des Uterus, als auch mit einer Hemmung der uterinen Involution assoziiert (Petersen et al., 2004). Über die Möglichkeiten, dieses Protein in der Diagnostik einzusetzen, gibt es in der Literatur verschiedene Auffassungen. Einerseits könnte ein Monitoring der Akute Phase Proteine hilfreich bei der Überprüfung der Tiergesundheit sein (Eckersall, 1995; Skinner, 2001), da ein Zusammenhang zwischen dem Grad der postpartalen bakteriellen Uteruskontamination und der Haptoglobin-Konzentration im Plasma zu bestehen scheint (Sheldon et al., 2001). Andererseits besitzt Haptoglobin bei postpartalen Metritiden beim Milchrind keinen übergeordneten diagnostischen Wert, da nur die besonders schwerwiegend erkrankten Tiere eine erhöhte Haptoglobin-Konzentration im Plasma aufweisen. Aus diesem Grund lässt sich nur bei diesen Tieren eine ungünstige Prognose bezüglich einer erneuten Trächtigkeit stellen (Hirvonen et al., 1999).

Ob Haptoglobin im bovinen Endometrium eine Rolle spielt, ist bislang nicht geklärt. Beim Kaninchen hingegen konnte die Haptoglobin mRNA-Expression im Endometrium in der frühen Phase der Trächtigkeit am Tag 5 und 6 nachgewiesen werden, so dass das Akute Phase Protein hinsichtlich einer erfolgreichen Implantation von Bedeutung ist (Herrler et al., 2004). Im humanen Endometrium wurde Haptoglobin ebenfalls detektiert (Beier und Beier-Hellwig, 1998). Das Protein wird im trächtigen und im nichtträchtigen Endometrium expremiert. Während des Sexualzyklus konnte es verstärkt in der Sekretionsphase und vermindert in der Proliferationsphase nachgewiesen werden (Berkova et al., 2001).

#### **2.5.4 Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )**

Interleukine werden als von Leukozyten sezernierte Kommunikationsproteine der Immunregulation definiert. Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa (Fantuzzi, 2001). Die Signalvermittlung erfolgt über die

beiden Rezeptoren Typ 1 (IL-1R1) und Typ 2 (IL-1R2) (Saadeddin et al., 2002).

Bei entzündlichen Prozessen wird IL-1 $\beta$  vor allem als Antwort auf Infektionen mit gramnegativen Bakterien synthetisiert (van Miert, 1995). Nach Stimulation durch bakterielle Endotoxine werden hauptsächlich Monozyten und Makrophagen zur Produktion von IL-1 $\beta$  angeregt (Dinarello, 2005). Das Interleukin ist in der Lage, die Proliferation und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten positiv zu beeinflussen (Kauma, 2000). Es induziert die Synthese der Akute Phase Proteine und steigert die Prostaglandin-Produktion (Gerard et al., 2004). Zusätzlich aktiviert IL-1 $\beta$  das Gefäßendothel und sorgt durch lokale Zerstörung von Gewebe für einen verbesserten Zugang der Effektorzellen (Dinarello, 2002).

Interleukine sind nicht nur im Rahmen pathologischer Vorgänge von Bedeutung, sondern spielen auch bei physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Bislang wurde IL-1 $\beta$  im humanen und bovinen Endometrium detektiert. Bei der Frau wird es vorwiegend in der Lutealphase des Sexualzyklus sowie während der Schwangerschaft exprimiert (Kauma, 2000). Im Sexualzyklus des Rindes wird das Interleukin über den gesamten Zyklus hinweg von Epithel- und Stromazellen des Endometriums synthetisiert und ist an der Regulation endometrialer Funktionen beteiligt (Paula-Lopes et al., 1999). IL-1 $\beta$  übt einen stimulatorischen Effekt auf die Epithelzellen des Endometriums aus und steigert auf diese Weise die Sekretion der Prostaglandine E<sub>2</sub> und F<sub>2 $\alpha$</sub>  (Betts und Hansen, 1992; Davidson et al., 1995). Die Prostaglandin-Synthese wird über eine Induktion des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2) stimuliert (Kniss et al., 1997). In der Trächtigkeit ist das Interleukin 1 $\beta$  am Wachstum des Embryos in der frühen Phase der Entwicklung (Blastozystenstadium) beteiligt und ist somit hinsichtlich der Implantation von Bedeutung (Paula-Lopes et al., 1998).

### **2.5.5 Interleukin 6 (IL-6)**

Das Glykoprotein Interleukin 6 (IL-6) besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 22 bis 29 kDa. Die Signalvermittlung erfolgt über den IL-6 Rezeptorkomplex (IL-6R) (Saadeddin et al., 2002).

Im Entzündungsgeschehen wird es vor allem von Monozyten und Makrophagen als Antwort auf bakterielle Lipopolysaccharide, Viren, Interleukin 1 und den Tumor Nekrose Faktor alpha synthetisiert (Bell et al., 2004). Die Hauptwirkung des Interleukins besteht in einer Induktion der Bildung von Proteinen der akuten Phase (Saadeddin et al., 2002). Zusätzlich ist IL-6

maßgeblich an der Aktivierung von T-Lymphozyten sowie an der Auslösung von Fieber beteiligt (Dinarello, 2004). Praktische Relevanz könnte IL-6 im Milchviehbereich insofern erlangen, da die Plasmakonzentration dieses Interleukins bereits vor der Geburt Aufschluss über nachfolgende Endometritiden sowie Nachgeburtsverhaltungen geben kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte IL-6-Werte im Blut auf postpartale Endometritiden, erniedrigte IL-6-Werte auf Nachgeburtsverhaltungen hindeuten (Ishikawa et al., 2004).

Inwieweit das Interleukin 6 im bovinen Endometrium an physiologischen Vorgängen beteiligt ist, wurde bislang nicht eindeutig geklärt. Beim Rind konnte zumindest in der frühen Phase der Trächtigkeit keine IL-6 mRNA-Expression im Endometrium festgestellt werden (Leung et al., 2000). Ebenso wenig hat das Interleukin einen Einfluss auf die endometriale Prostaglandin-Synthese im bovinen Sexualzyklus (Leung et al., 2001). Im humanen Endometrium ist das Interleukin für die Implantation des Embryos von Bedeutung. Hierzu sind jedoch in der Literatur unterschiedliche Angaben zu finden. Einerseits ist eine erniedrigte IL-6 mRNA-Expression im Endometrium an der Auslösung von Fehlgeburten beteiligt (Laird et al., 2003), andererseits wird das Interleukin physiologisch während der Schwangerschaft unterdrückt. Vor allem das von der Plazenta gebildete humane Choriongonadotropin (hCG), aber auch Wachstumsfaktoren wie der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) reduzieren die endometriale Sekretion von IL-6 (Perrier d'Hauterive et al., 2004; Perrier d'Hauterive et al., 2005). Im Endometrium der Sau konnte die mRNA-Expression des Interleukins am Tag 11 der Trächtigkeit detektiert werden (Anegon et al., 1994).

### **2.5.6 Interleukin 8 (IL-8)**

Interleukin 8 (IL-8) besitzt ein Molekulargewicht von 8 kDa und gehört zur Gruppe der C-X-C-Chemokine. Als chemotaktischer Faktor wird es von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet, hauptsächlich jedoch von T-Lymphozyten und Monozyten (Monaco et al., 2004).

Bei entzündlichen Reaktionen besteht seine Hauptwirkung darin, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und zum Infektionsort zu locken (Hoch et al., 1996; Proost et al., 1996). IL-8 ist an der Degranulation der neutrophilen Granulozyten bzw. der Freisetzung von Lysozymen beteiligt (Juffrie et al., 2000) und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf deren Oberfläche (Mukaida, 2000). Die Synthese des Interleukins wird vor allem durch Lipopolysaccharide, Interleukin 1 sowie den Tumor Nekrose Faktor alpha stimuliert (Jawa et

al., 1999; Baggiolini, 2001). Gehemmt wird die IL-8-Freisetzung über die Interleukine 4, 10 und 13 (Mukaida et al., 1998). Praktische Relevanz könnte IL-8 beim Rind im Zusammenhang mit Nachgeburtsverhaltungen erlangen. Im Vergleich zu gesunden Tieren wiesen erkrankte Kühe deutlich niedrigere IL-8-Konzentrationen im Blut auf (Kimura et al., 2002). Bei an Endometriose erkrankten Frauen konnten hingegen erhöhte IL-8-Werte in der Peritonealflüssigkeit festgestellt werden (Garcia-Velasco und Arici, 1999).

IL-8 ist nicht nur für pathologische Prozesse von Bedeutung, sondern übernimmt ebenfalls verschiedene physiologische Aufgaben im weiblichen Reproduktionstrakt. Welche Rolle das Interleukin 8 im bovinen Endometrium spielt, ist bislang nicht bekannt. Im Sexualzyklus der Frau konnte eine erhöhte mRNA-Expression des Chemokins in der frühen und mittleren proliferativen Phase (Tag 1-5 bzw. Tag 6-10) sowie in der sekretorischen Phase (Tag 24-28) im Endometrium nachgewiesen werden (Arici et al., 1998b; Kayisli et al., 2004). Zudem wird diskutiert, dass IL-8 die Proliferation endometrialer Stromazellen induziert und somit eine Rolle als autokriner Wachstumsfaktor spielt (Arici et al., 1998a). Unter der Geburt ist es bei der Frau an der Weitung des Geburtsweges bzw. der Zervix durch Stimulation der Kollagenase-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten mitbeteiligt (Kelly, 1996).

### **2.5.7 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ )**

Der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) ist ein 26 kDa großes Protein und gehört zur Gruppe der Zytokine. Er besteht aus drei identischen Polypeptidketten. Die Signalvermittlung erfolgt vor allem parakrin über die beiden Rezeptoren Typ 1 (60 kDa) und Typ 2 (80 kDa). Typ 1 ist hauptsächlich für die Auslösung der Apoptose sowie die proinflammatorischen Eigenschaften verantwortlich, wohingegen Typ 2 die Aktivität von Typ 1 potenziert (Ksontini et al., 1998). TNF $\alpha$  wird vorwiegend von Monozyten und Makrophagen synthetisiert (Petersen et al., 2004).

Im Zusammenhang mit entzündlichen Reaktionen spielt TNF $\alpha$  eine wichtige Rolle bei bakteriellen Infektionen und akuten Entzündungen (Ksontini et al., 1998). Neben seiner Fähigkeit, die Bildung der Akuten Phase Proteine zu stimulieren, besitzt TNF $\alpha$  die Eigenschaft, die Körpertemperatur hochzuregulieren (Holtmann und Neurath, 2004). Lokale Effekte bestehen vorwiegend aus der Aktivierung des Gefäßendothels und einer Erhöhung der Permeabilität der Gefäßwände (Norrby, 2002). Dies führt zu einem vermehrten Einstrom von

Immunglobulin G (IgG), Komplement und phagozytierenden Zellen sowie einer verbesserten Lymphdrainage. Insgesamt ist TNF $\alpha$  dafür verantwortlich, die Infektion örtlich zu begrenzen. Die Synthese des Zytokins wird hauptsächlich von Lipopolysacchariden stimuliert (Henderson und Wilson, 1996).

Im Verlauf des Sexualzyklus konnte das Zytokin bei verschiedenen Spezies im Endometrium nachgewiesen werden. Im humanen Endometrium wurde TNF $\alpha$  vor allem in der Proliferations- sowie in der mittleren bis späten Sekretionsphase detektiert (Hunt, 1993; Terranova et al., 1995). Bei der Maus wird das Zytokin von den endometrialen Zellen in der späten Lutealphase exprimiert (Roby und Hunt, 1994). Im Uterus trächtiger Mäuse konnte ein negativer Einfluss des Tumor Nekrose Faktors auf das Blastozystenstadium festgestellt werden: TNF $\alpha$  behinderte die embryonale Entwicklung noch vor der Implantation (Tabibzadeh, 1998; Glabowski et al., 2005).

In den einzelnen Phasen des Sexualzyklus übernimmt TNF $\alpha$  verschiedene Funktionen bei der Regulation der Sekretion im bovinen Endometrium. Einerseits bewirkt TNF $\alpha$  über eine PGE<sub>2</sub>-Stimulation in der Lutealphase die Aufrechterhaltung des Gelbkörpers (Murakami et al., 2001). Andererseits sorgt das Zytokin durch Induktion der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Synthese für die Luteolyse (Miyamoto et al., 2000). Die stimulierende Wirkung auf die PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Sekretion beschränkt sich beim Rind allerdings nur auf die Stromazellen des Endometriums. Der positive Effekt wird dabei über eine Induktion der Stickoxid-Synthese vermittelt. Stickoxid wiederum beeinflusst die Aktivität verschiedener Enzyme wie beispielsweise der Cyclooxygenase (Skarzynski et al., 2000). Die Wirkungsweise des Zytokins ist beim Rind dosisabhängig. Niedrige TNF $\alpha$ -Konzentrationen leiten die Luteolyse ein und verkürzen die Zyklusdauer, wohingegen höhere Dosen für eine Aufrechterhaltung des Corpus luteum sorgen und die Dauer des Sexualzyklus verlängern (Skarzynski et al., 2003). Wie die Regulation des Zytokins in den einzelnen Phasen des Sexualzyklus erfolgt, ist bislang nicht bekannt. In vitro wurde in bovinen endometrialen Stromazellen nachgewiesen, dass das vom Embryo sezernierte Interferon tau als Inhibitor des Tumor Nekrose Faktors dient und somit auf diesem Weg die Einleitung der Luteolyse zu Beginn der Trächtigkeit verhindert werden kann (Okuda et al., 2004).