

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression von den Entzündungsmediatoren bGCP-2, COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie TNF $\alpha$  im Endometrium von Milchkühen untersucht. Die Expressionsuntersuchungen wurden an drei unterschiedlichen Tiergruppen durchgeführt: 1. Schlachttiere, 2. Kühe eines kommerziellen Milcherzeugerbetriebes, 3. Erstkalbinnen. Im ersten Teil der Studie wurde die mRNA-Expression anhand von Schlachthofmaterialien in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) sowie vier verschiedenen Zyklusphasen (Tag 1-5, 6-12, 13-18 und 19-21) ermittelt (n = 8 pro Zyklusphase). Zusätzlich wurde pro Tier ein zytologisches Präparat des Endometriums angefertigt und der prozentuale Anteil an PMN bestimmt. Bei den Kühen des Milcherzeugerbetriebes wurde die mRNA-Expression der Mediatoren bei gesunden Tieren mit der Expression von an subklinischer und klinischer Endometritis erkrankten Kühen (jeweils n = 9) verglichen. Von jedem Tier wurden Blutproben zur Progesteron- und Östradiolbestimmung gewonnen. Die Bestimmung des PMN-Gehaltes im Endometrium erfolgte anhand zytologischer Präparate. Im dritten Teil der Studie wurde die mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n = 5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten nach der Kalbung (Tag 10, 17, 24, 31, 38, 45) untersucht. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt erfolgte eine Blutentnahme zur Progesteron- und Östradiolbestimmung. Zusätzlich wurde bei jedem Tier der prozentuale Anteil an PMN in einem zytologischen Präparat des Endometriums ermittelt. Die Ergebnisse sind im Folgenden für jeden Teil der Studie getrennt dargestellt.

### 5.1 Schlachthof

#### 5.1.1 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Von allen auf dem Schlachthof gewonnenen Uteri wurde ein zytologisches Präparat des Endometriums angefertigt und der PMN-Gehalt bestimmt. Von 32 Tieren wiesen 29 einen Anteil an PMN von 0% auf. Bei zwei Kühen betrug der PMN-Gehalt 1,4%, bei einem Tier 0,7%. Damit wurden alle Tiere dieser Untersuchungsgruppe als klinisch gesund eingestuft.

### 5.1.2 18S ribosomale RNA

Abbildung 9 zeigt die Expression der ribosomalen 18S rRNA im bovinen Endometrium in Abhängigkeit von den vier Zyklusphasen. Mit Hilfe der Real-time PCR konnte die 18S rRNA-Konzentration in einer Größenordnung von  $3,6 \times 10^6$  bis  $4,8 \times 10^6$  fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigte die durch OD-Messung anfangs vorgelegte relativ ausgeglichene mRNA-Konzentration. Bei der Überprüfung des PCR-Produkts konnte eine 100%ige Übereinstimmung mit der bekannten bovinen 18S rRNA-Sequenz festgestellt werden. Alle anhand von Schlachthofmaterialien untersuchten Entzündungsmediatoren wurden mittels der ribosomalen 18S rRNA normalisiert.

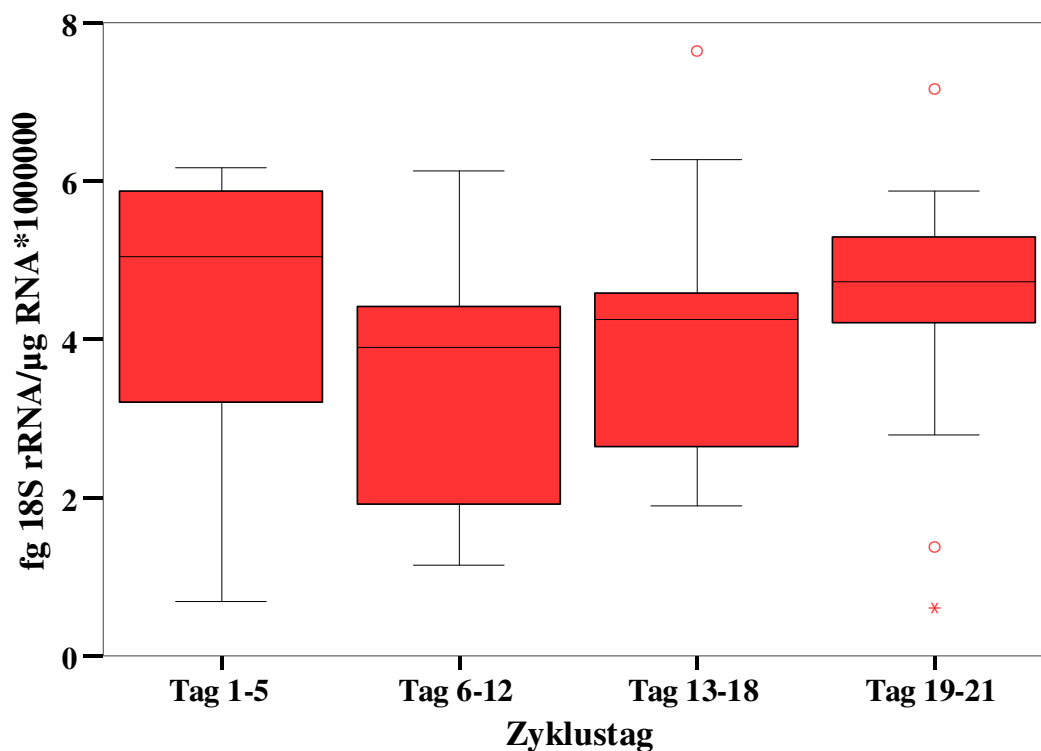


Abbildung 9: 18S rRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

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

In Abbildung 10 ist die bGCP-2 mRNA-Expression im Endometrium in Abhängigkeit von der Entnahme-Region des Uterus (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag dargestellt. bGCP-2 wurde in einer Größenordnung von durchschnittlich 1,2 bis 60 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Zwischen den zwei RNA-Proben eines Entnahmeortes konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die bGCP-2 mRNA wurde im ipsilateralen und contralateralen Horn sowie im Corpus in ähnlich hoher Konzentration expremiert. Der Ort der Probenentnahme hatte somit keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die Überprüfung des PCR-Produkts ergab eine 100%ige Homologie zur bekannten bovinen bGCP-2-Sequenz.

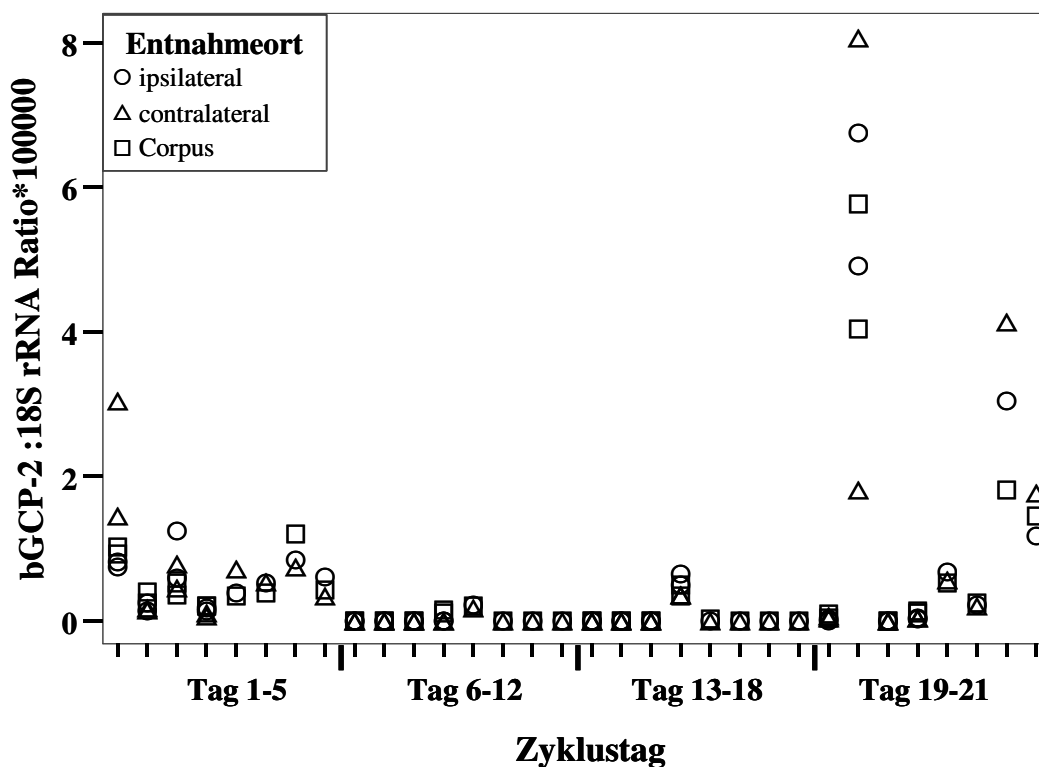


Abbildung 10: Relative bGCP-2 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

Zwischen den Zyklusphasen konnten signifikante Expressionsunterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 11). bGCP-2 wurde vor allem zum Zeitpunkt um die Ovulation (Tag 1-5 und Tag 19-21) höher expremiert als in der Lutealphase. Während der prä-ovulatorischen Phase (Tag 19-21) war die mRNA-Expression durchschnittlich doppelt so hoch wie in der post-ovulatorischen Phase (Tag 1-5). In der frühen (Tag 6-12) und späten Lutealphase (Tag 13-18) lag die bGCP-2 Transkript-Konzentration bei der überwiegenden Anzahl der Tiere unter der Nachweisgrenze. Am Tag 6-12 war bei 6 von 8 Tieren keine bGCP-2-Expression nachweisbar. In der späten Lutealphase expremierten 7 von 8 Tieren das Chemokin nicht.

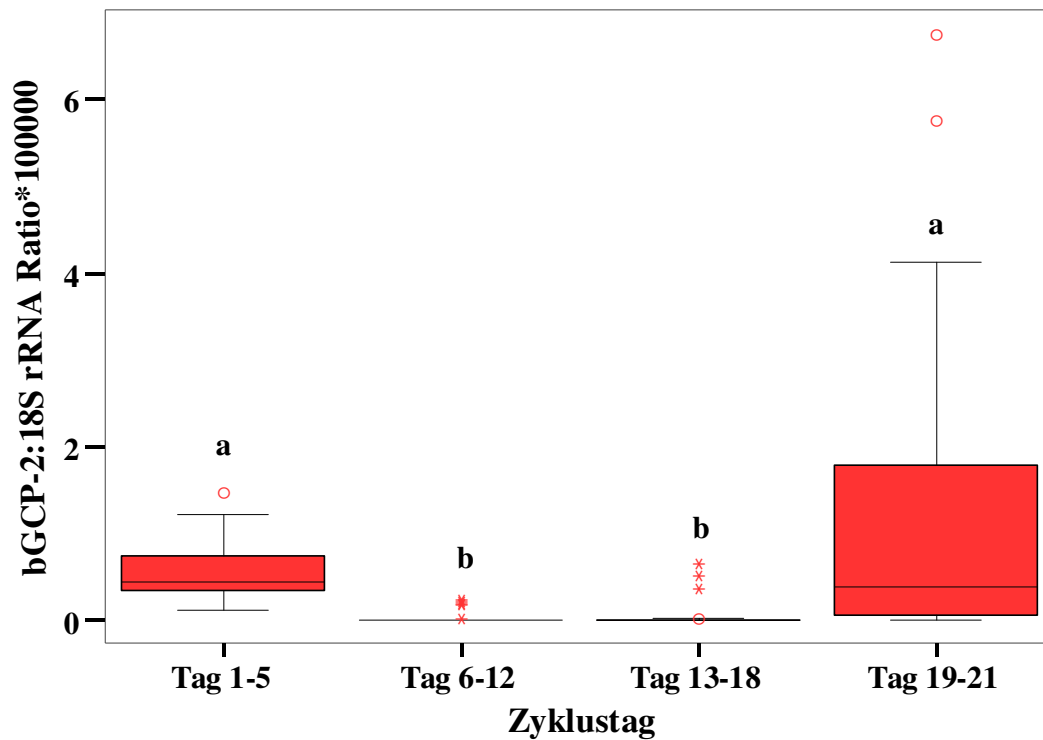


Abbildung 11: Relative bGCP-2 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag (n = 8 pro Zyklusphase). a, b: p < 0,05.

### 5.1.4 Cyclooxygenase 1 (COX-1)

Mit Hilfe der Real-time PCR konnte eine COX-1 mRNA-Expression im Endometrium von Milchkühen in Abhängigkeit von der Zyklusphase nachgewiesen werden (Abbildung 12). COX-1 wurde in einer Größenordnung von 1,8 bis 6 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Zusätzlich ist die mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) dargestellt. Die mRNA von zwei Proben eines Entnahmeortes konnte in ähnlich hoher Konzentration gemessen werden. Signifikante Expressionsunterschiede traten nicht auf. Es konnten keine Expressionsunterschiede zwischen den Proben vom ipsilateralen und vom contralateralen Horn sowie vom Corpus nachgewiesen werden. Bei einem Vergleich der Zyklusphasen untereinander wurden keine signifikanten Unterschiede in der COX-1 mRNA-Expression festgestellt. Das PCR-Produkt wurde überprüft und stimmte zu 100% mit der bekannten bovinen COX-1-Sequenz überein.

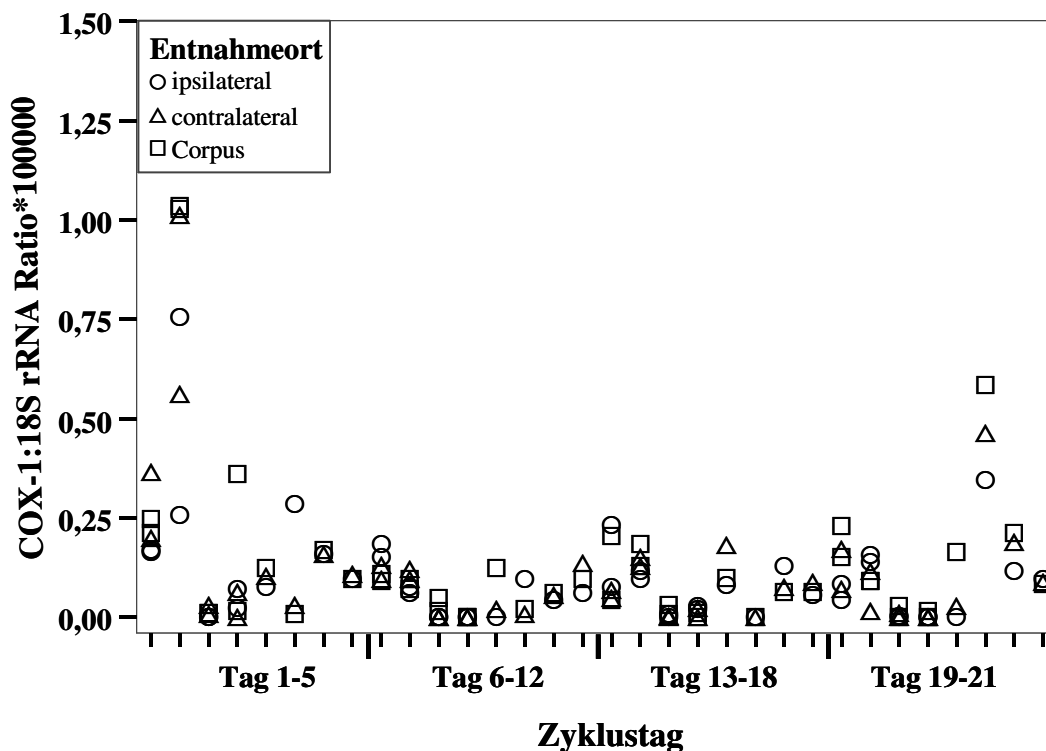


Abbildung 12: Relative COX-1 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

### 5.1.5 Cyclooxygenase 2 (COX-2)

Abbildung 13 zeigt die COX-2 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit von der Entnahme-Region und dem Zyklustag. Es konnte eine COX-2-Expression in der prä- und post-ovulatorischen Phase sowie in der frühen und späten Lutealphase nachgewiesen werden. COX-2 wurde in einer Größenordnung von 30 bis 510 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Die mRNA-Expression beider Proben eines Entnahmeortes wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die COX-2 mRNA wurde im ipsilateralen und contralateralen Horn sowie im Corpus in ähnlich hoher Konzentration expremiert. Obwohl COX-2 vorwiegend in der Lutealphase expremiert wurde, konnten im Vergleich zur prä-ovulatorischen und post-ovulatorischen Zyklusphase keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich zu COX-1 wurde COX-2 in einer ca. 10fach höheren absoluten Konzentration expremiert. Es lag eine 100%ige Übereinstimmung des PCR-Produkts mit der bekannten bovinen COX-2-Sequenz vor.

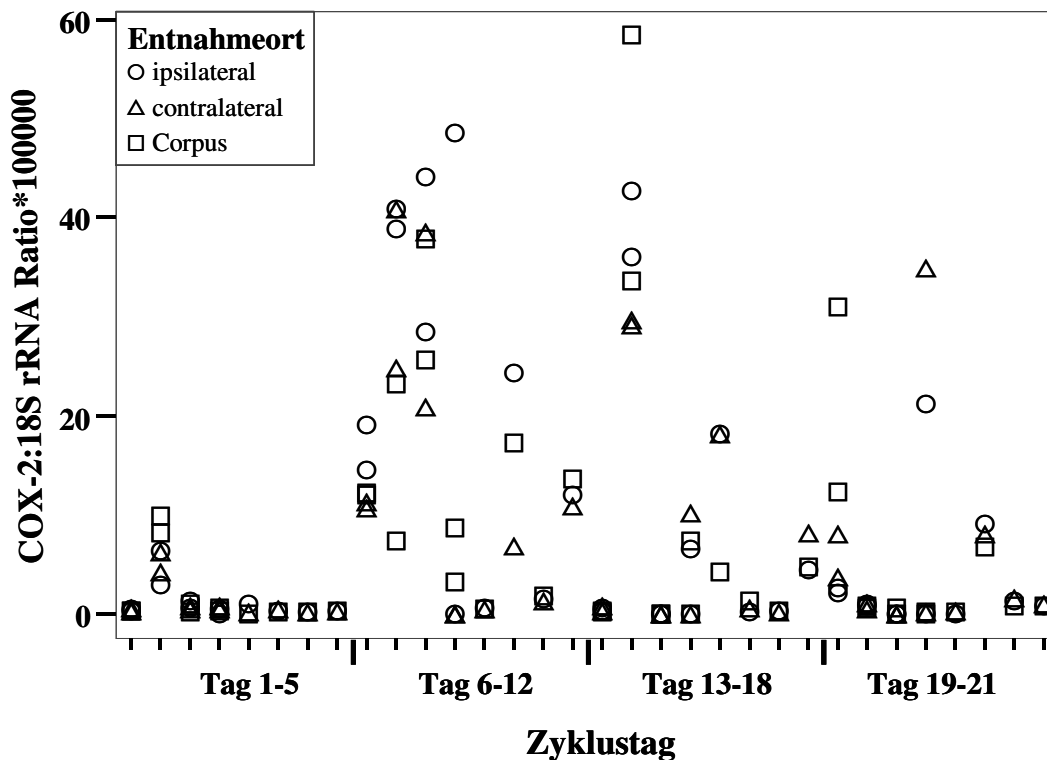


Abbildung 13: Relative COX-2 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

### 5.1.6 Haptoglobin

Eine haptoglobinspezifische mRNA-Expression konnte im bovinen Endometrium in der prä- und post-ovulatorischen Phase (Tag 19-21 und Tag 1-5) sowie in der frühen und späten Lutealphase (Tag 6-12 und Tag 13-18) nachgewiesen werden (Abbildung 14). Haptoglobin wurde in einer Größenordnung von 2,4 bis 7,8 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Die mRNA-Expression von zwei Proben eines Entnahmeortes wies keine signifikanten Unterschiede auf. Ebenso wurde Haptoglobin im ipsilateralen und contralateralen Horn sowie im Corpus in ähnlich hoher Konzentration expremiert. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Entnahmeorten konnten nicht festgestellt werden. Auch bei einem Vergleich der Zyklusphasen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede erfasst werden. Die Überprüfung des PCR-Produkts ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der bekannten bovinen Haptoglobin-Sequenz.

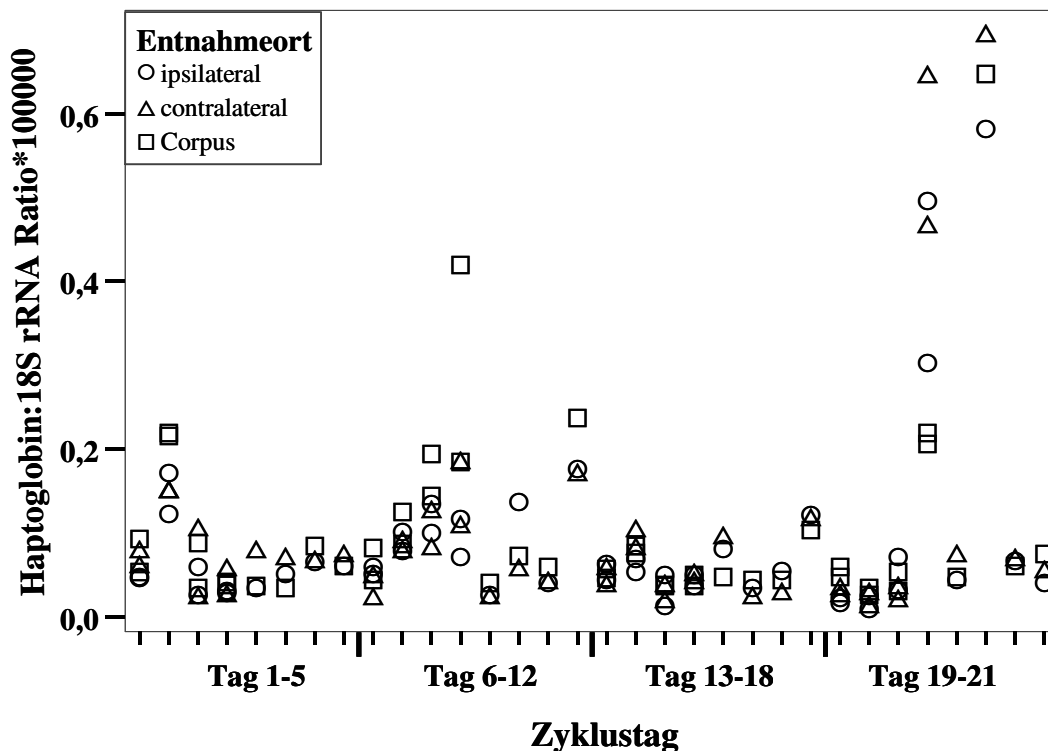


Abbildung 14: Relative Haptoglobin mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

### 5.1.7 Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )

Die IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im Endometrium ist in Abhängigkeit von dem Entnahmeort des Uterus (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und der Zyklusphase in Abbildung 15 dargestellt. Mit Hilfe der Real-time PCR wurde IL-1 $\beta$  in einer Größenordnung von 1,8 bis 12 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Ein Vergleich der mRNA-Expression beider RNA-Proben eines Entnahmeortes ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede. Nach Vergleich der mRNA-Expression zwischen ipsilateralem, contralateralem Horn und Corpus wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede gemessen. Der Ort der Probenentnahme hatte somit keinen Einfluss auf das Ergebnis. Das PCR-Produkt wurde überprüft und stimmte zu 100% mit der bekannten bovinen IL-1 $\beta$ -Sequenz überein.

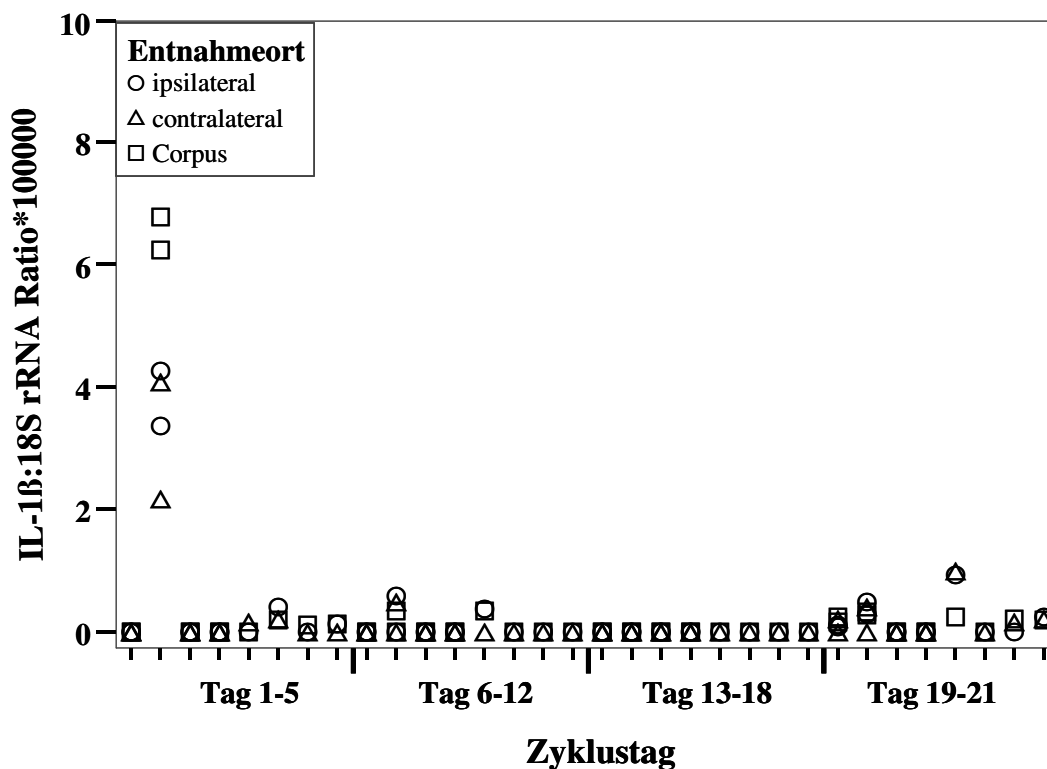


Abbildung 15: Relative IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).



Für den Faktor Zyklustag ergaben sich aber aufgrund der Varianzanalyse signifikante Expressionsunterschiede (Abbildung 16). Bei einem Vergleich der Zyklusphasen untereinander mittels Post-hoc-Test (Dunnett-T3-Test) konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. IL-1 $\beta$  wurde im bovinen Endometrium vorwiegend in der prä- und post-ovulatorischen Phase (Tag 1-5 und Tag 19-21) exprimiert. Bei der überwiegenden Anzahl der Tiere konnte in der frühen (Tag 6-12) und späten (Tag 13-18) Lutealphase keine Expression der mRNA festgestellt werden. In der frühen Lutealphase wurde eine IL-1 $\beta$  mRNA-Expression bei 6 von 8 Tieren nicht nachgewiesen.

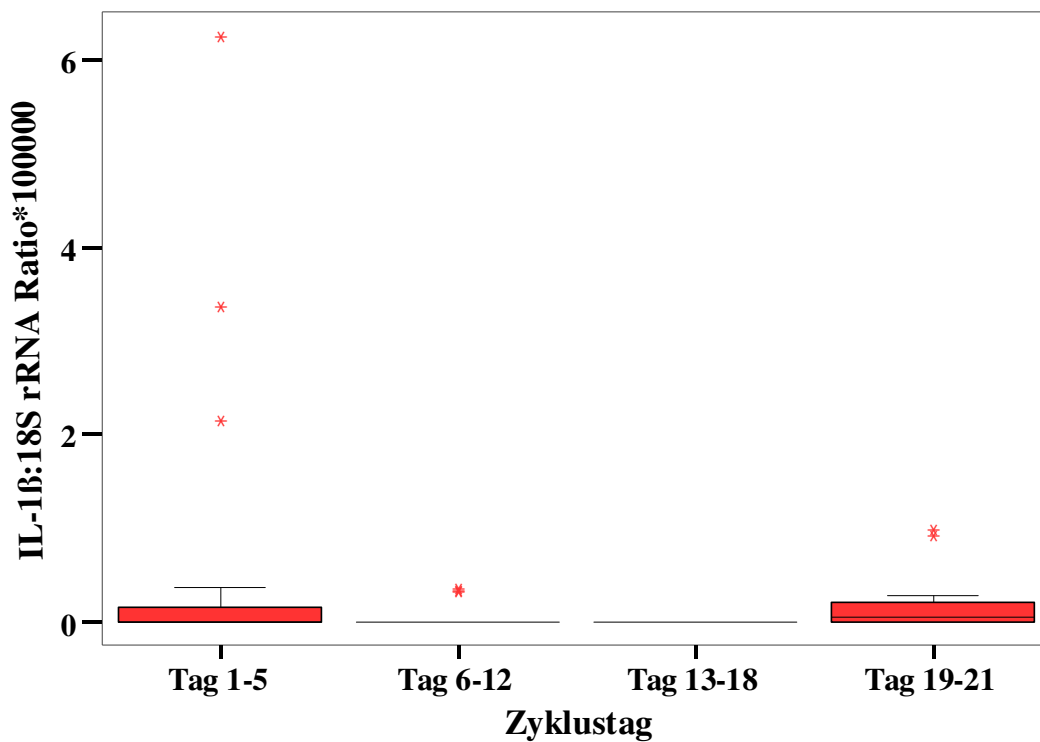


Abbildung 16: Relative IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag (n = 8 pro Zyklusphase).

### 5.1.8 Interleukin 6 (IL-6)

Anhand der vom Schlachthof gewonnenen Endometriumszellen konnte eine IL-6 mRNA-Expression in den einzelnen Phasen des Sexualzyklus nachgewiesen werden (Abbildung 17). IL-6 wurde in einer Größenordnung von 0,18 bis 0,78 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Zusätzlich ist die mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) dargestellt. Die mRNA von zwei Proben eines Entnahmeortes zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede. Ebenso konnten keine Expressionsunterschiede zwischen den Proben vom ipsilateralen und contralateralen Horn sowie vom Corpus nachgewiesen werden. Zwischen den Zyklusphasen wurden keine Unterschiede in der IL-6 mRNA-Expression festgestellt. Das PCR-Produkt wurde überprüft und stimmte zu 100% mit der bekannten bovinen IL-6-Sequenz überein.

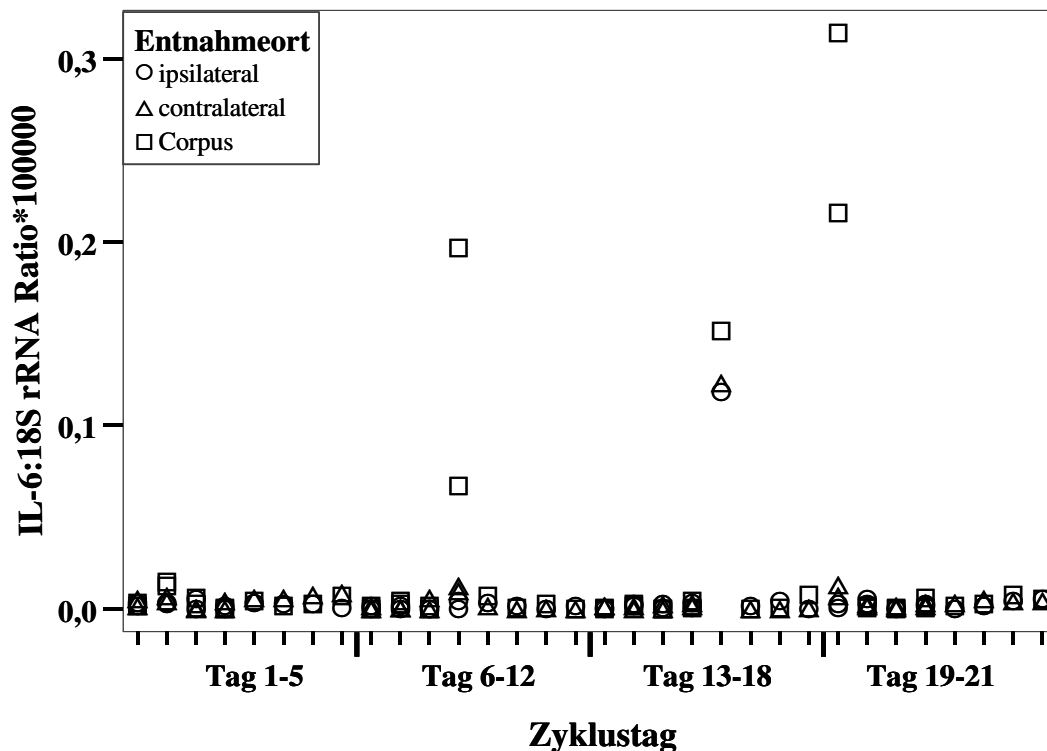


Abbildung 17: Relative IL-6 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

### 5.1.9 Interleukin 8 (IL-8)

In bovinen Endometriumszellen ließ sich eine mRNA-Expression des Chemokins IL-8 nachweisen. Abbildung 18 zeigt die IL-8 mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Entnahme-Region des Uterus (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag. Mit Hilfe der Real-time PCR wurde IL-8 im bovinen Endometrium in einer Größenordnung von 0,18 bis 12 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Die IL-8-Expression beider Proben eines Entnahmeortes wurde miteinander verglichen und ein signifikanter Expressionsunterschied nicht festgestellt. IL-8 wurde im ipsilateralen und contralateralen Horn sowie im Corpus in ähnlich hoher Konzentration expremiert. Der Ort der Probenentnahme hatte somit keinen Einfluss auf das Ergebnis. Bei der Überprüfung des PCR-Produkts ergab sich eine 100%ige Übereinstimmung mit der bekannten bovinen IL-8-Sequenz.

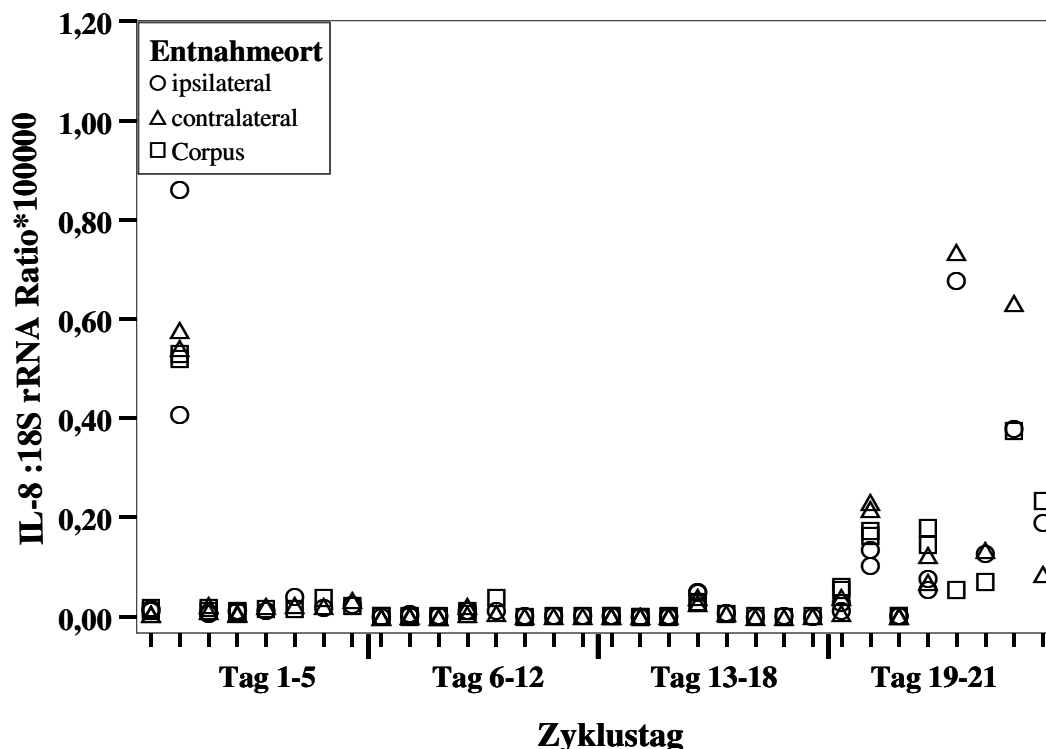


Abbildung 18: Relative IL-8 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

Bei einem Vergleich der vier Zyklusphasen ergab sich ein signifikanter Unterschied (Abbildung 19). IL-8 konnte im bovinen Endometrium vorwiegend zum Zeitpunkt um die Ovulation in einer höheren Konzentration detektiert werden. Die mRNA-Expression in der prä-ovulatorischen Phase (Tag 19-21) war etwa 3fach höher als in der post-ovulatorischen Phase (Tag 1-5). In der frühen und späten Lutealphase (Tag 6-12 und Tag 13-18) wurde IL-8 von der überwiegenden Anzahl der Tiere nicht expremiert. Bei 6 von 8 Tieren konnte in der frühen Lutealphase keine IL-8-Expression nachgewiesen werden. Ebenso wurde bei 6 von 8 Tieren keine Expression des Chemokins in der späten Lutealphase festgestellt.

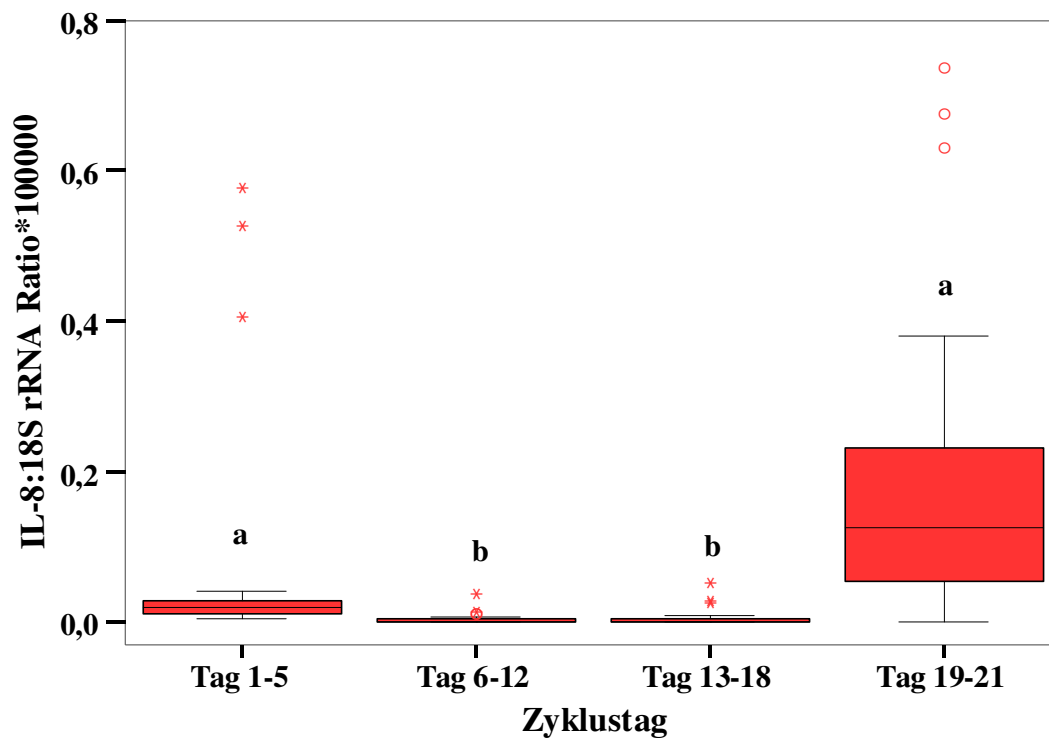


Abbildung 19: Relative IL-8 mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklustag (n = 8 pro Zyklusphase). a, b : p < 0,05.

### 5.1.10 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ )

Eine TNF $\alpha$  mRNA-Expression konnte im bovinen Endometrium in allen Zyklusphasen nachgewiesen werden (Abbildung 20). TNF $\alpha$  wurde in einer Größenordnung von 3 bis 12 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Zwischen zwei Proben eines Entnahmeortes konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. TNF $\alpha$  wurde im ipsi- und contralateralen Horn sowie im Corpus in ähnlich hoher Konzentration expremiert. Der Ort der Probenentnahme hatte somit keinen Einfluss auf das Ergebnis (Fischer et al., 2005). Auch in Abhängigkeit von der Zyklusphase konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression erfasst werden. Abweichend von den übrigen Tieren wurde TNF $\alpha$  im Endometrium von zwei Kühen am Tag 1-5 in einer etwa 3fach höheren Konzentration expremiert. Ebenso konnte am Tag 19-21 bei zwei Tieren eine etwa 3fach höhere TNF $\alpha$ -Expression detektiert werden. Das PCR-Produkt wurde überprüft und stimmte mit der bekannten bovinen TNF $\alpha$ -Sequenz zu 100% überein.

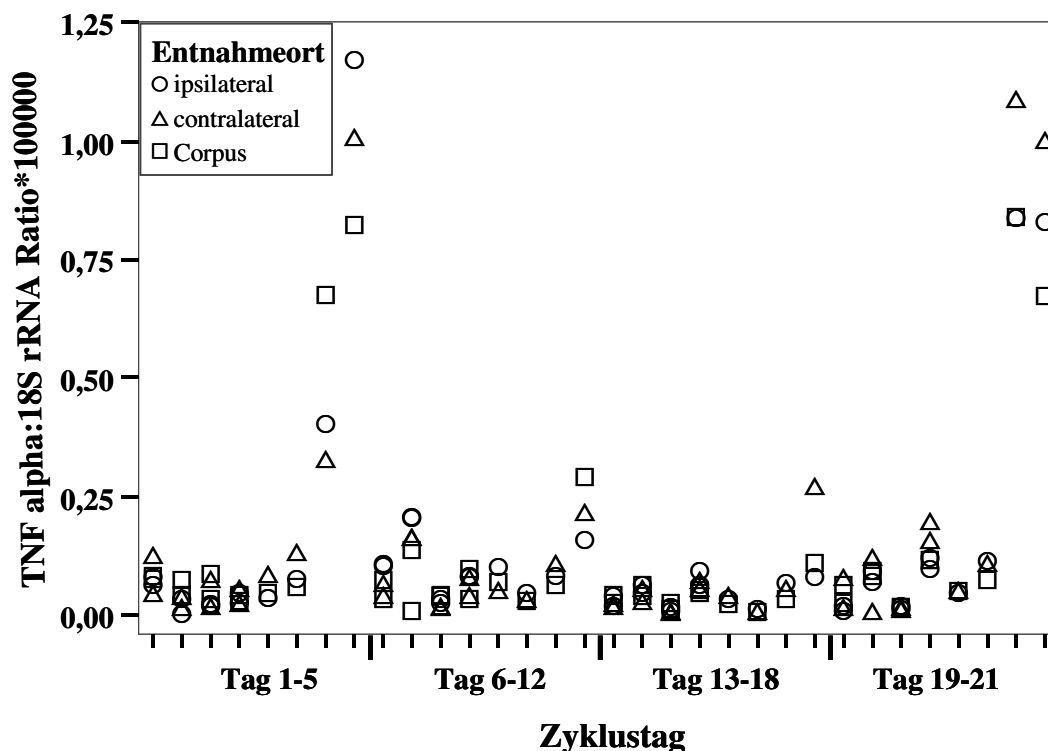


Abbildung 20: Relative TNF $\alpha$  mRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Entnahmeort (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) und dem Zyklustag (n=8 pro Zyklusphase).

### 5.1.11 Ergebniszusammenfassung

Im ersten Teil der Studie wurde zunächst die mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren bGCP-2, COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  anhand von Schlachthofmaterialien im Endometrium von Milchkühen untersucht. Die Expressionsanalyse erfolgte hinsichtlich drei verschiedener Entnahmeorte (ipsilaterales, contralaterales Horn und Corpus). Von der Hälfte der Tiere wurden zudem je Entnahmeort zwei RNA-Proben gewonnen und die Expression miteinander verglichen. Zusätzlich wurde das Expressionsmuster der Entzündungsmediatoren in Abhängigkeit der Zyklusphase (Tag 1-5, 6-12, 13-18 und 19-21) untersucht. Pro Zyklusphase wurden 8 Tiere in die Studie mit aufgenommen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei keinem der untersuchten Mediatoren signifikante Expressionsunterschiede in Abhängigkeit des Entnahmeortes festgestellt werden konnten. Die mRNA der jeweiligen Faktoren wurde im ipsi- und contralateralen Horn sowie im Corpus in ähnlich hoher Konzentration expremiert. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Proben einer Entnahmestelle beobachtet werden. Bei einem Vergleich der mRNA-Konzentration während der vier Zyklusphasen wiesen COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-6 und TNF $\alpha$  keine signifikanten Unterschiede auf. bGCP-2, IL-1 $\beta$  sowie IL-8 wurden hingegen vorwiegend in der prä- und post-ovulatorischen Phase expremiert. Aufgrund der im Endometrium bestimmten PMN-Gehalte von unter 5% konnten alle Tiere als klinisch gesund beurteilt werden.

## 5.2 Milcherzeugerbetrieb

### 5.2.1 Neutrophile Granulozyten (PMN) und Steroidgehalte

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Progesteron- und Östradiolwerte (ng/ml) der Studientiere, deren PMN-Gehalte (%) sowie die klinischen Befunde. Bei allen Kühen war der Östradiolwert gering. Bei zwölf Tieren konnte ein erhöhter Progesteronspiegel von über 1 ng/ml im Blut nachgewiesen werden. Die gesunden Tiere wiesen einen PMN-Gehalt von unter 5% auf, die subklinisch erkrankten Kühe von über 5%. Die klinisch erkrankten Kühe zeigten eitrigen Vaginalausfluss. Bei diesen Tieren wurde der PMN-Gehalt nicht bestimmt (n.b.).

Tabelle 16: Progesteron- und Östradiolwerte (ng/ml), PMN-Gehalte (%) sowie klinische Befunde der untersuchten Studentiere

Tier-Nr.	Progesteron (ng/ml)	Östradiol (ng/ml)	PMN (%)	Klinische Befunde
1	0,26	0,02	< 5%	o.b.B.
2	1,2	0,04	< 5%	o.b.B.
3	< 0,2	0,03	< 5%	o.b.B.
4	5,6	< 0,02	< 5%	o.b.B.
5	0,25	< 0,02	< 5%	o.b.B.
6	3,2	< 0,02	< 5%	o.b.B.
7	0,23	< 0,02	< 5%	o.b.B.
8	4,4	< 0,02	< 5%	o.b.B.
9	2,0	0,02	< 5%	o.b.B.
10	1,7	0,02	> 5%	o.b.B.
11	< 0,2	< 0,02	> 5%	o.b.B.
12	2,8	< 0,02	> 5%	o.b.B.
13	0,22	0,03	> 5%	o.b.B.
14	0,29	< 0,02	> 5%	o.b.B.
15	3,5	< 0,02	> 5%	o.b.B.
16	0,3	0,02	> 5%	o.b.B.
17	< 0,2	< 0,02	> 5%	o.b.B.
18	< 0,2	0,02	> 5%	o.b.B.
19	< 0,2	0,05	n.b.	schleimig-eitriger Ausfluss
20	< 0,2	0,02	n.b.	schleimig-eitriger Ausfluss
21	2,6	< 0,02	n.b.	eitriger Ausfluss
22	< 0,2	0,02	n.b.	eitriger Ausfluss
23	< 0,2	0,02	n.b.	eitriger Ausfluss
24	3,1	0,04	n.b.	eitriges Flocken
25	< 0,2	< 0,02	n.b.	eitriger Ausfluss
26	1,7	< 0,02	n.b.	eitriger Ausfluss
27	1,7	< 0,02	n.b.	eitriges Flocken

o.b.B. = ohne besonderen Befund

### 5.2.2 18S ribosomale RNA

Abbildung 21 zeigt die 18S rRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit des Gesundheitsstatus der untersuchten Studientiere. Mit Hilfe der Real-time PCR konnte die Expression der ribosomalen RNA in einer Größenordnung von durchschnittlich  $3,4 \times 10^6$  bis  $4,8 \times 10^6$  fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert werden. Durch dieses Ergebnis ließ sich der mittels OD-Messung anfangs vorgelegte relativ ausgeglichene RNA-Gehalt bestätigen. Die auf dem Milcherzeugerbetrieb erhobenen weiteren Transkript-Daten wurden anhand der 18S rRNA normalisiert.

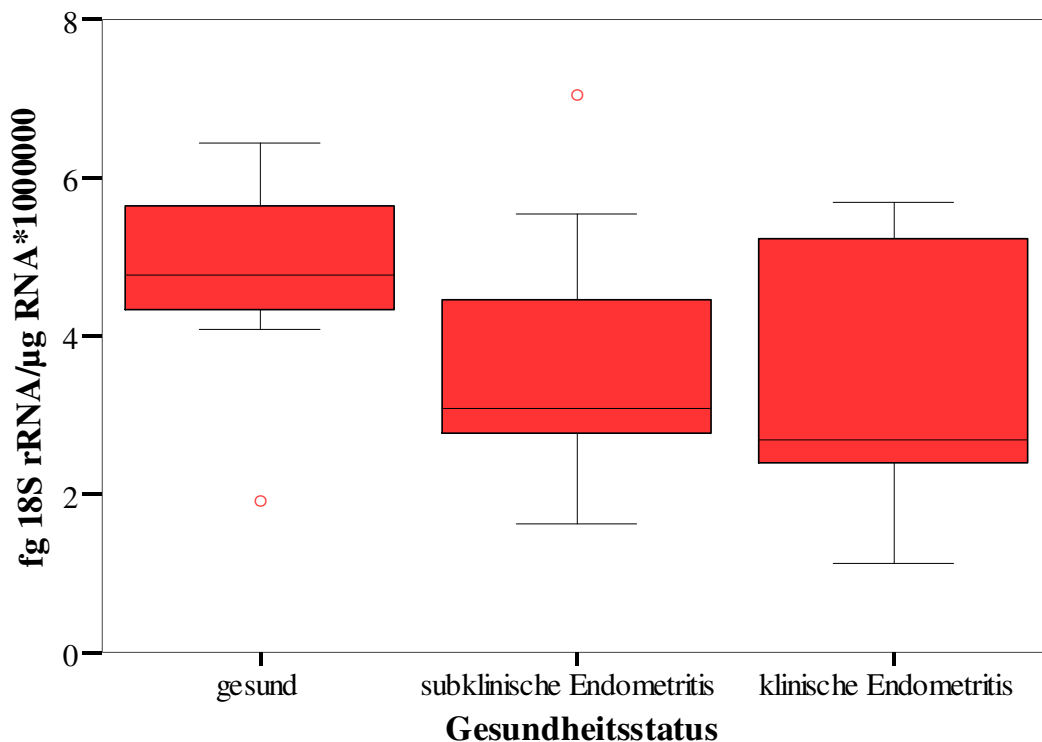


Abbildung 21: 18S rRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9).



### 5.2.3 Bovines granulozytäres Protein 2 (bGCP-2)

Eine bGCP-2 mRNA-Expression konnte im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis nachgewiesen werden (Abbildung 22). bGCP-2 wurde in einer Größenordnung von 32 bis 96 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Die subklinisch und klinisch erkrankten Tiere wiesen im Mittelwert eine etwa 6fach höhere bGCP-2-Konzentration auf als die gesunden Tiere. Signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression bestanden zwischen gesunden Tieren und Tieren mit subklinischer Endometritis sowie zwischen gesunden und klinisch erkrankten Tieren.

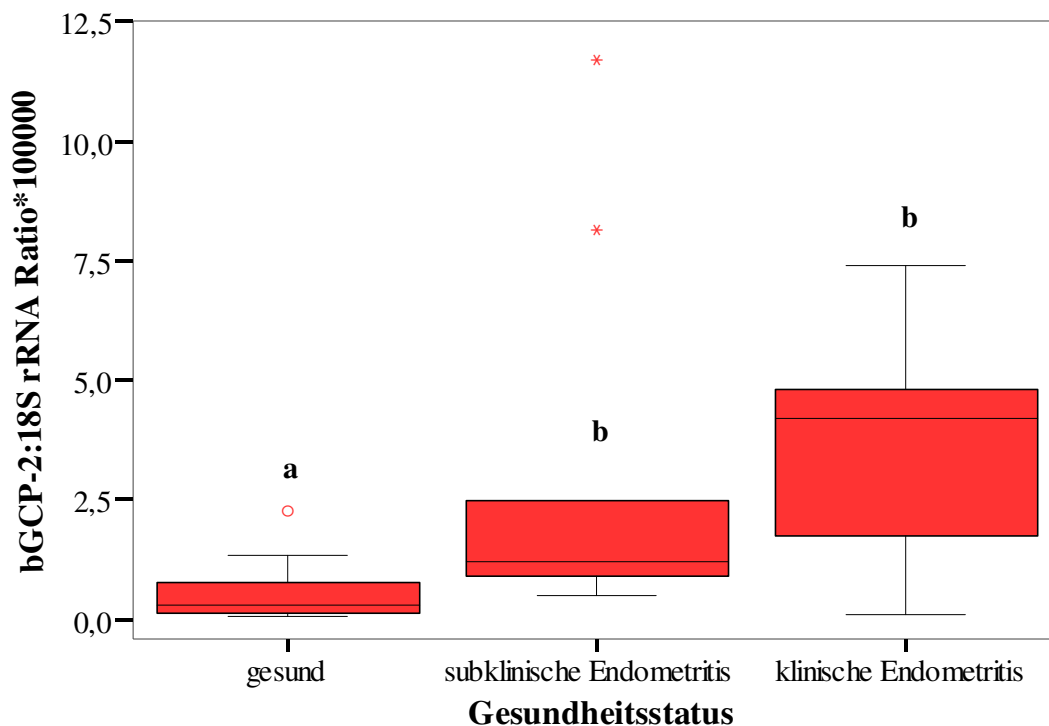


Abbildung 22: Relative bGCP-2 mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). a, b :  $p < 0,05$ .

### 5.2.4 Cyclooxygenase 1 (COX-1)

In Abbildung 23 ist die COX-1 mRNA-Expression im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis dargestellt. Bei allen Kühen der drei Tiergruppen konnte eine COX-1 mRNA-Expression im Endometrium nachgewiesen werden. COX-1 wurde in einer Größenordnung von 1,6 bis 2,4 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression konnten zwischen den drei Gruppen nicht festgestellt werden.

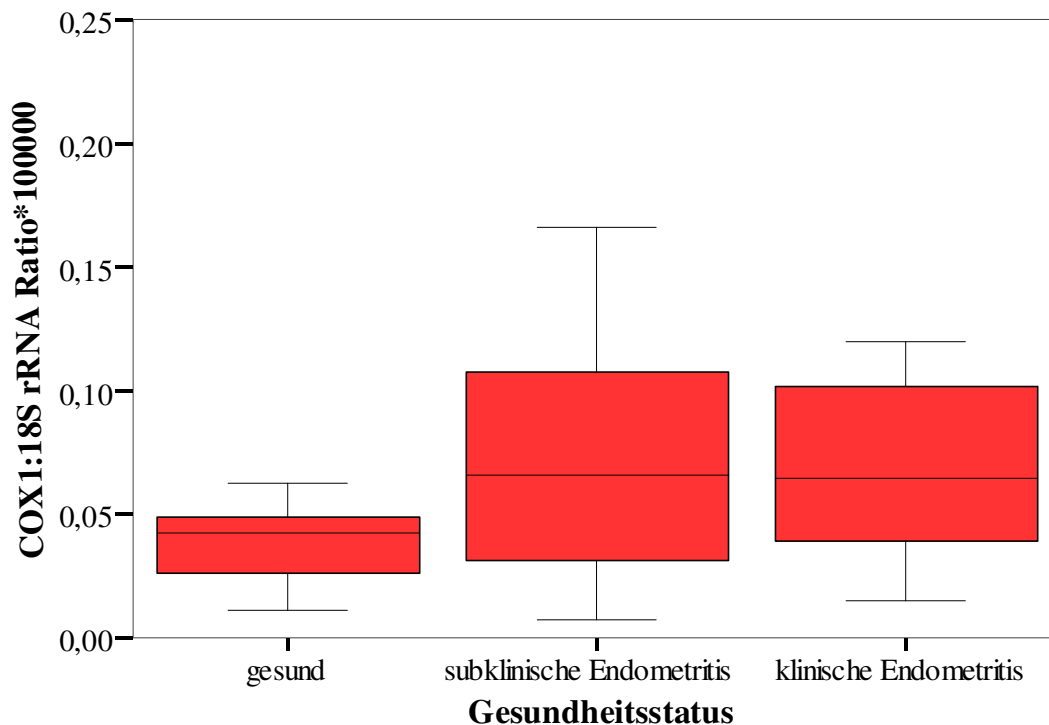


Abbildung 23: Relative COX-1 mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9).

### 5.2.5 Cyclooxygenase 2 (COX-2)

Abbildung 24 zeigt die COX-2 mRNA-Expression im Endometrium von Milchkühen in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus. COX-2 wurde im Endometrium von gesunden Tieren sowie subklinisch und klinisch erkrankten Tieren nachgewiesen. Mit Hilfe der Real-time PCR konnte COX-2 in einer Größenordnung von 160 bis 440 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert werden. Ein einzelner Extremwert (114,23) aus der Gruppe der subklinisch erkrankten Tiere ist in der Abbildung nicht dargestellt. Signifikante Expressionsunterschiede wurden zwischen den drei Tiergruppen nicht erfasst.

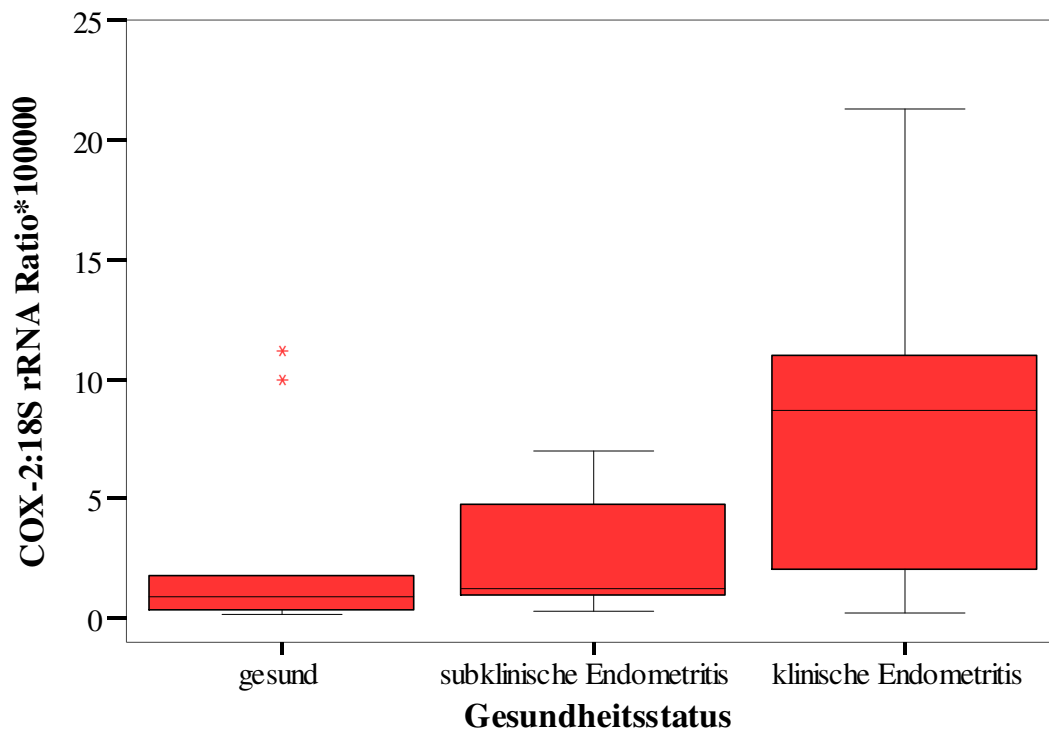


Abbildung 24: Relative COX-2 mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). Ein Extremwert (114,23) aus der Gruppe der subklinisch erkrankten Tiere ist nicht dargestellt.

### 5.2.6 Haptoglobin

Bei den untersuchten Studientieren des Milcherzeugerbetriebes ließ sich eine mRNA-Expression des Akute Phase Proteins Haptoglobin im Endometrium nachweisen wie in Abbildung 25 dargestellt. Das Akute Phase Protein wurde von Kühen aller drei Gruppen expremiert. Ein Extremwert aus der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere lag bei 1,48 und wurde in der grafischen Darstellung nicht berücksichtigt. Die Größenordnung bewegte sich in einem Bereich von 5,6 bis 7,2 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den drei Gruppen konnten nicht nachgewiesen werden.

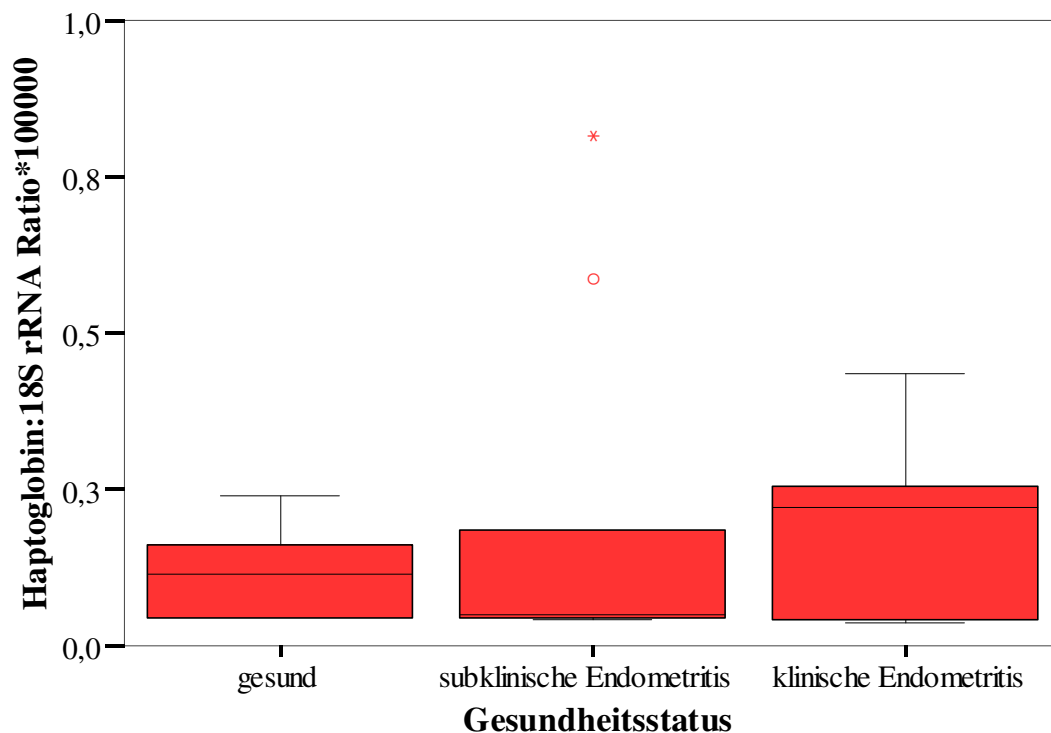


Abbildung 25: Relative Haptoglobin mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). Ein Extremwert (1,48) aus der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere ist nicht dargestellt.

### 5.2.7 Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )

Anhand des auf dem Milcherzeugerbetrieb gewonnenen Zellmaterials ließ sich eine IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis nachweisen (Abbildung 26). IL-1 $\beta$  wurde in einer Größenordnung von 24 bis 2.560 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Ein Extremwert (551,3) aus der Gruppe der Tiere mit klinischer Endometritis ist in der Abbildung nicht dargestellt. Die subklinisch erkrankten Tiere wiesen im Mittelwert eine etwa 8fach höhere IL-1 $\beta$  mRNA-Konzentration auf als die gesunden Kühe. Klinisch erkrankte Kühe expremierten IL-1 $\beta$  etwa 25fach höher als die subklinisch erkrankten Tiere und in einer 200fach höheren Konzentration als die gesunden Kühe. Signifikante Expressionsunterschiede ließen sich zwischen gesunden und subklinisch erkrankten Tieren sowie zwischen gesunden Kühen und Kühen mit klinischer Endometritis nachweisen.

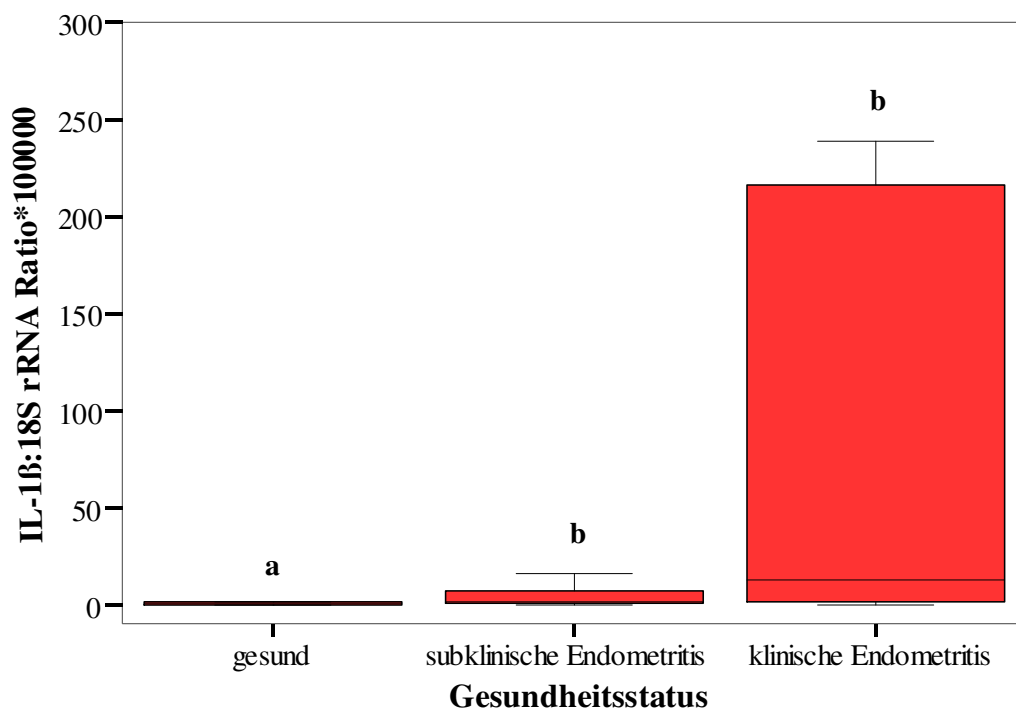


Abbildung 26: Relative IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). Ein Extremwert (551,3) aus der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere ist nicht dargestellt. a, b :  $p < 0,05$ .

### 5.2.8 Interleukin 6 (IL-6)

Im bovinen Endometrium konnte die IL-6 mRNA-Expression sowohl bei gesunden Tieren, als auch bei Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis detektiert werden (Abbildung 27). IL-6 wurde in einer Größenordnung von 1,6 bis 6,4 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Ein Extremwert (1,24) aus der Gruppe der Tiere mit klinischer Endometritis ist in der Abbildung nicht dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Tiergruppen ergaben sich nicht.

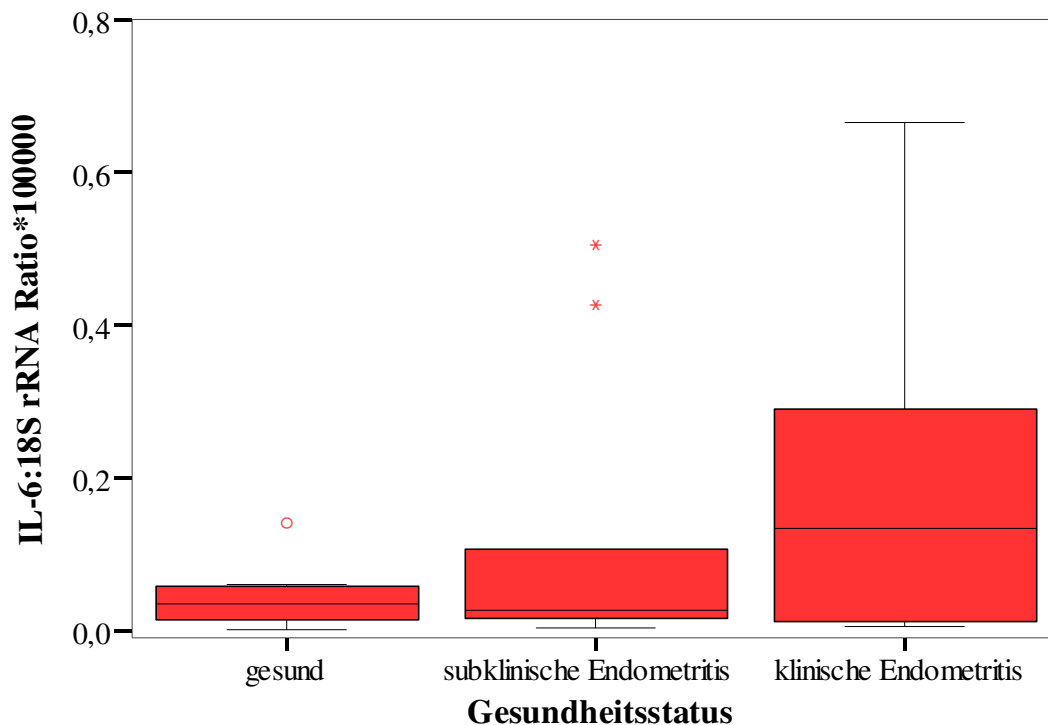


Abbildung 27: Relative IL-6 mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). Ein Extremwert (1,24) aus der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere ist nicht dargestellt.

### 5.2.9 Interleukin 8 (IL-8)

Die mRNA-Expression des Chemokins IL-8 wurde im bovinen Endometrium in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus untersucht (Abbildung 28). Eine IL-8-Expression konnte im Endometrium von gesunden Kühen sowie von Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis in einer Größenordnung von 80 bis 1.920 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA nachgewiesen werden. IL-8 wurde von den subklinisch erkrankten Kühen im Mittelwert etwa 8fach höher expremiert als von den gesunden Tieren. Bei den klinisch erkrankten Milchkühen konnte im Endometrium eine durchschnittlich 6fach höhere Expression als bei den subklinisch erkrankten Tieren sowie eine 50fach höhere Konzentration verglichen mit den gesunden Tieren gemessen werden. Signifikante Expressionsunterschiede ergaben sich zwischen gesunden Tieren und Tieren mit klinischer Endometritis. Die numerischen Unterschiede zwischen der Gruppe der gesunden Tiere und der Gruppe der subklinisch erkrankten Tiere ließen sich statistisch nicht absichern ( $p = 0,052$ ).

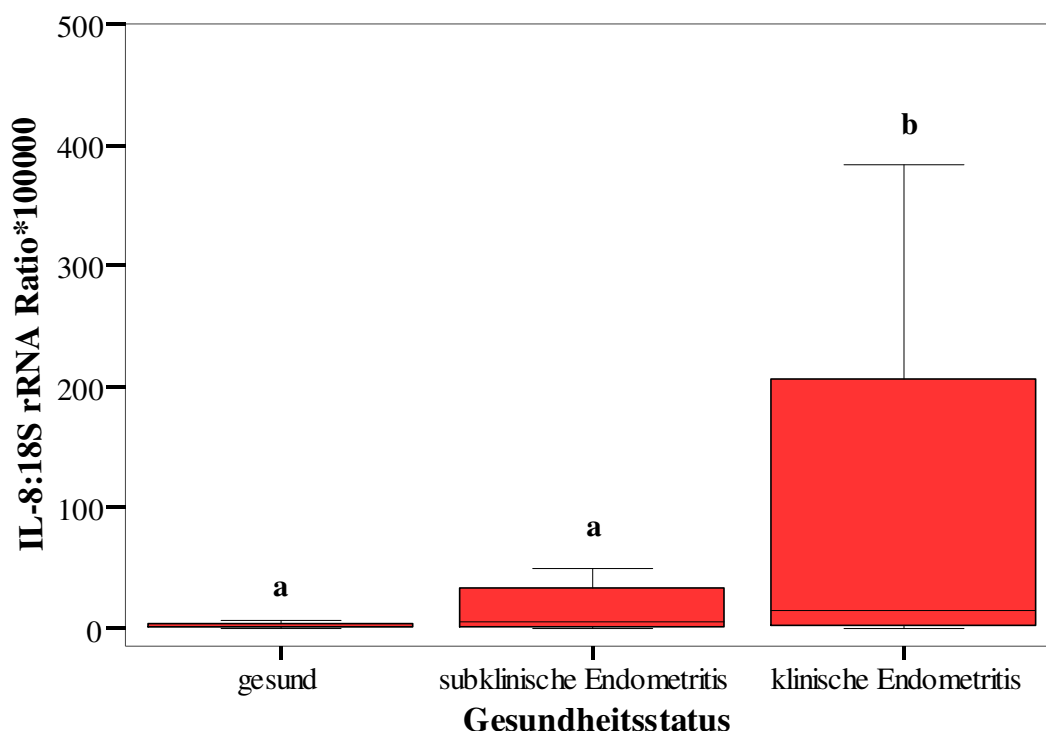


Abbildung 28: Relative IL-8 mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils  $n=9$ ). a, b :  $p < 0,05$ .

### 5.2.10 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ )

TNF $\alpha$  konnte im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis nachgewiesen werden (Abbildung 29). Mit Hilfe der Real-time PCR wurde TNF $\alpha$  in einem Bereich von 3,2 bis 9,6 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Die subklinisch erkrankten Tiere exprimierten TNF $\alpha$  durchschnittlich doppelt so hoch wie die gesunden Tiere. Bei den Kühen mit klinischer Endometritis konnte im Mittelwert eine etwa 4fach höhere mRNA-Expression gemessen werden als bei den subklinisch erkrankten Tieren. Im Vergleich zu gesunden Kühen wiesen die klinisch erkrankten Tiere durchschnittlich eine 6,5fach höhere mRNA-Konzentration auf. Signifikante Expressionsunterschiede ergaben sich zwischen der Gruppe der gesunden und der Gruppe der subklinisch erkrankten Tiere. Ebenso konnten zwischen der Gruppe der gesunden und der klinisch erkrankten Kühe signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression nachgewiesen werden.

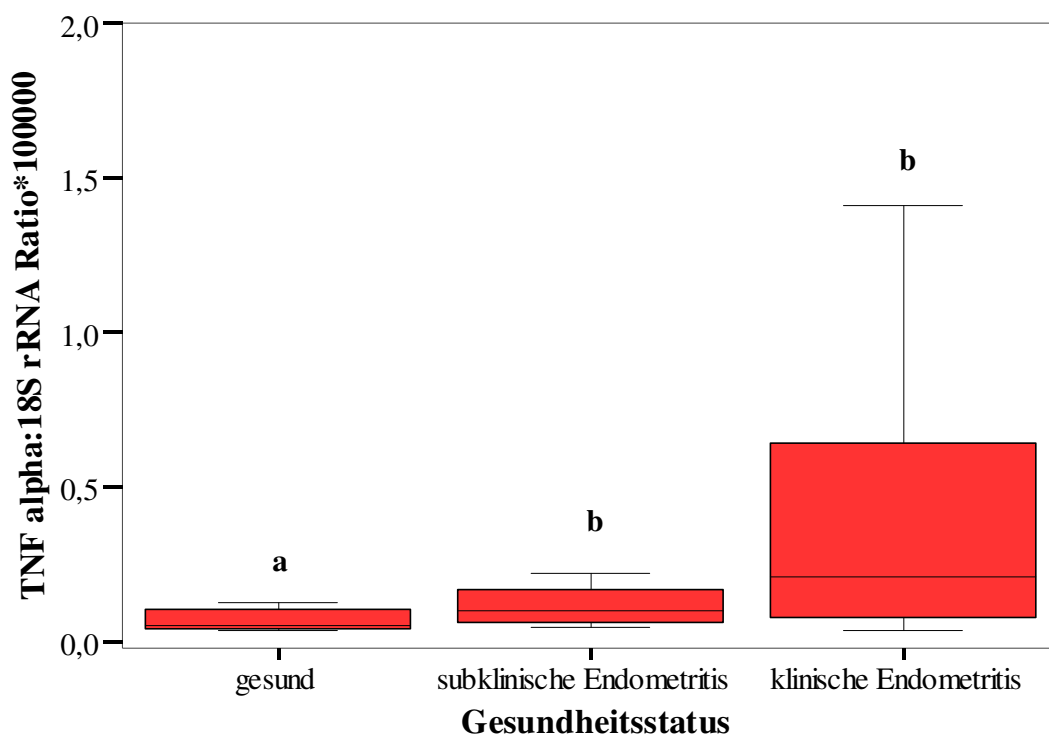


Abbildung 29: Relative TNF alpha mRNA-Expression im bovinen Endometrium von gesunden Tieren sowie Tieren mit subklinischer und klinischer Endometritis (jeweils n=9). a, b : p < 0,05.



### 5.2.11 Ergebniszusammenfassung

Im zweiten Teil der Studie wurde die mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren bGCP-2, COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  im Endometrium von Milchkühen in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus der Tiere untersucht. Die Kühe wurden aufgrund der klinischen Befunde und dem prozentualen Anteil an PMN im Endometrium in drei Gruppen eingeteilt: gesunde Tiere, Tiere mit subklinischer und klinischer Endometritis. Pro Gruppe wurden 9 Tiere in die Studie mit aufgenommen. COX-1, COX-2, Haptoglobin und IL-6 wurden von allen Kühen der drei Gruppen in ähnlich hoher Konzentration expremiert, so dass keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Im Endometrium von subklinisch und klinisch erkrankten Tieren konnte hingegen eine signifikant höhere mRNA-Expression der Mediatoren bGCP-2, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  im Vergleich zu gesunden Kühen nachgewiesen werden. IL-8 wurde von klinisch erkrankten Tieren signifikant höher expremiert als von gesunden Kühen, die Unterschiede zwischen der Gruppe der gesunden Tiere und der Gruppe der subklinisch erkrankten Milchkühe ließen sich statistisch jedoch nicht absichern ( $p = 0,052$ ). Zusätzlich wurden allen Tiere Blutproben zur Progesteron- und Östrogenbestimmung entnommen. Bei zwölf Tieren wurde ein Progesteronwert von über 1 ng/ml bestimmt, der als Indiz für die Lutealphase gewertet werden kann. Keines der Tiere befand sich in der prä- oder post- ovulatorischen Phase, da der Östrogenspiegel bei allen Kühen unter 0,1 ng/ml betrug.

### 5.3 Erstkalbinnen der Tierklinik für Fortpflanzung

#### 5.3.1 Neutrophile Granulozyten (PMN) und Steroidgehalte

In Abbildung 30 ist der prozentuale Anteil an PMN im Endometrium von Erstkalbinnen in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum dargestellt. Pro Tier und Tag wurden jeweils zwei zytologische Präparate angefertigt und aus den Ergebnissen der Mittelwert errechnet. Alle Erstkalbinnen wiesen 17 Tage post partum einen Anteil an PMN von über 5% auf. Bei einem Tier (Nr. 4) ließ sich das zytologische Präparat am 17. Tag nach der Kalbung aus technischen Gründen nicht auswerten. Der Anteil an neutrophilen Granulozyten sank ab dem 31. Tag post partum in allen Präparaten unter 5%. Nur ein Tier wies 45 Tage nach der Kalbung im Ausstrich einen erhöhten Anteil an PMN von etwa 60% auf.

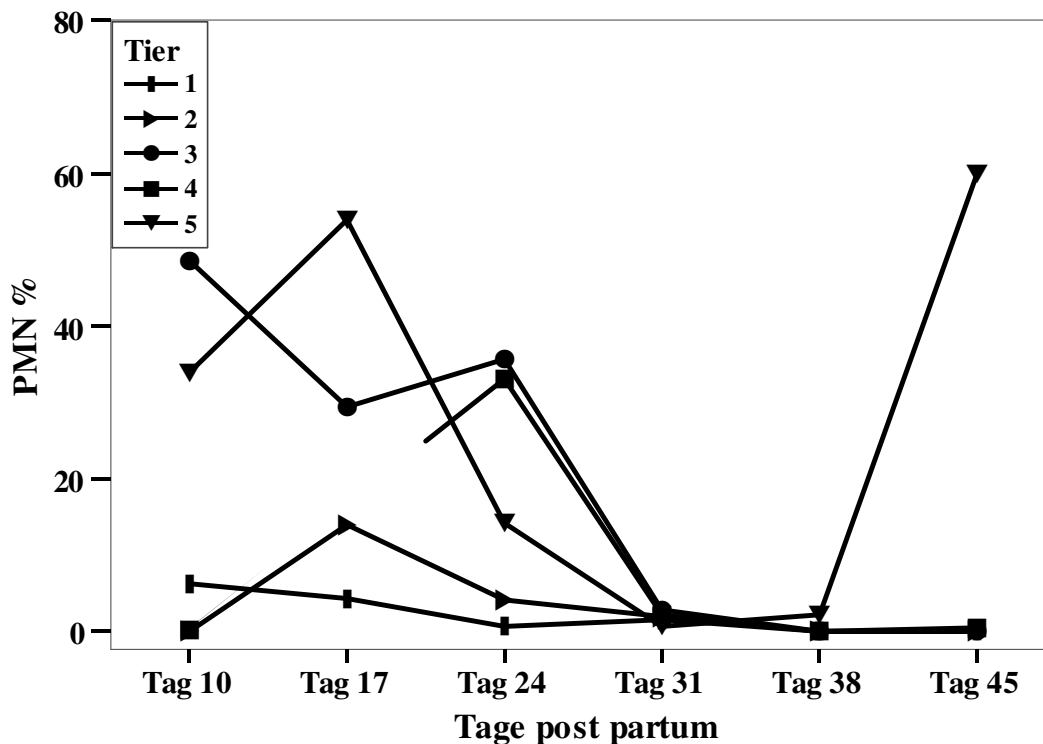


Abbildung 30: Prozentualer Anteil an PMN im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

Tabelle 17 gibt einen Überblick über die Progesteron- und Östradiolwerte (ng/ml) sowie die klinischen Besonderheiten der fünf Studientiere zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt post partum. Tier 1, 3 und 5 wiesen am 10. Tag vermehrt Lochialfluss auf. Bei einer Erstkalbin (Nr. 3) konnte am 17. und 24. Tag eitriger Vaginalausfluss festgestellt werden. Tier 5 zeigte am 17. Tag eitrigem Ausfluss. Bis zum 38. Tag waren bei diesem Tier schleimig-eitriges Flöckchen nachweisbar.

Tabelle 17: Progesteron- und Östradiolwerte (ng/ml) sowie klinische Befunde

<b>Tier-Nr.</b>	<b>Tag</b>	<b>Progesteron (ng/ml)</b>	<b>Östradiol (ng/ml)</b>	<b>Klinische Befunde</b>
1	10	< 0,2	0,42	Lochialfluss (rot-braun)
	17	< 0,2	0,06	o.b.B.
	24	< 0,2	0,03	o.b.B.
	31	< 0,2	0,06	o.b.B.
	38	< 0,2	0,06	o.b.B.
	45	< 0,2	0,02	o.b.B.
2	10	0,36	0,06	o.b.B.
	17	< 0,2	0,04	o.b.B.
	24	< 0,2	0,05	o.b.B.
	31	< 0,2	0,04	o.b.B.
	38	< 0,2	0,02	o.b.B.
	45	1,5	0,04	o.b.B.
3	10	< 0,2	0,1	Lochialfluss (rot-braun, eitrig)
	17	< 0,2	0,07	eitrigem Ausfluss
	24	< 0,2	0,07	eitrigem Ausfluss
	31	< 0,2	0,05	o.b.B.
	38	< 0,2	0,04	o.b.B.
	45	< 0,2	0,05	o.b.B.
4	10	< 0,2	0,08	o.b.B.
	17	< 0,2	0,08	o.b.B.
	24	< 0,2	0,07	trüber Ausfluss
	31	< 0,2	0,1	o.b.B.
	38	1,2	0,1	o.b.B.

Fortsetzung von Tabelle 17

<b>Tier-Nr.</b>	<b>Tag</b>	<b>Progesteron (ng/ml)</b>	<b>Östradiol (ng/ml)</b>	<b>Klinische Befunde</b>
5	45	< 0,2	0,1	o.b.B.
	10	< 0,2	0,1	Lochialfluss (rot-braun)
	17	< 0,2	0,06	eitriger Ausfluss
	24	< 0,2	0,04	schleimig-eitriges Flöckchen
	31	< 0,2	0,06	schleimig-eitriges Flöckchen
	38	< 0,2	0,08	schleimig-eitriges Flöckchen
	45	< 0,2	0,1	o.b.B.

o.b.B. = ohne besonderen Befund

### 5.3.2 18S ribosomale RNA

Abbildung 31 zeigt die 18S rRNA-Expression im bovinen Endometrium in Abhängigkeit der Untersuchungszeitpunkte nach der Kalbung. Mit Hilfe der Real-time PCR konnte das Haushalts-Gen durchschnittlich in einer Größenordnung von  $2 \times 10^6$  bis  $4,3 \times 10^6$  fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigte die durch OD-Messung anfangs vorgelegte relativ ausgeglichene mRNA-Konzentration. Die von den Erstkalbinnen der Tierklinik für Fortpflanzung gewonnenen Daten wurden anhand der 18S rRNA-Expression normalisiert.

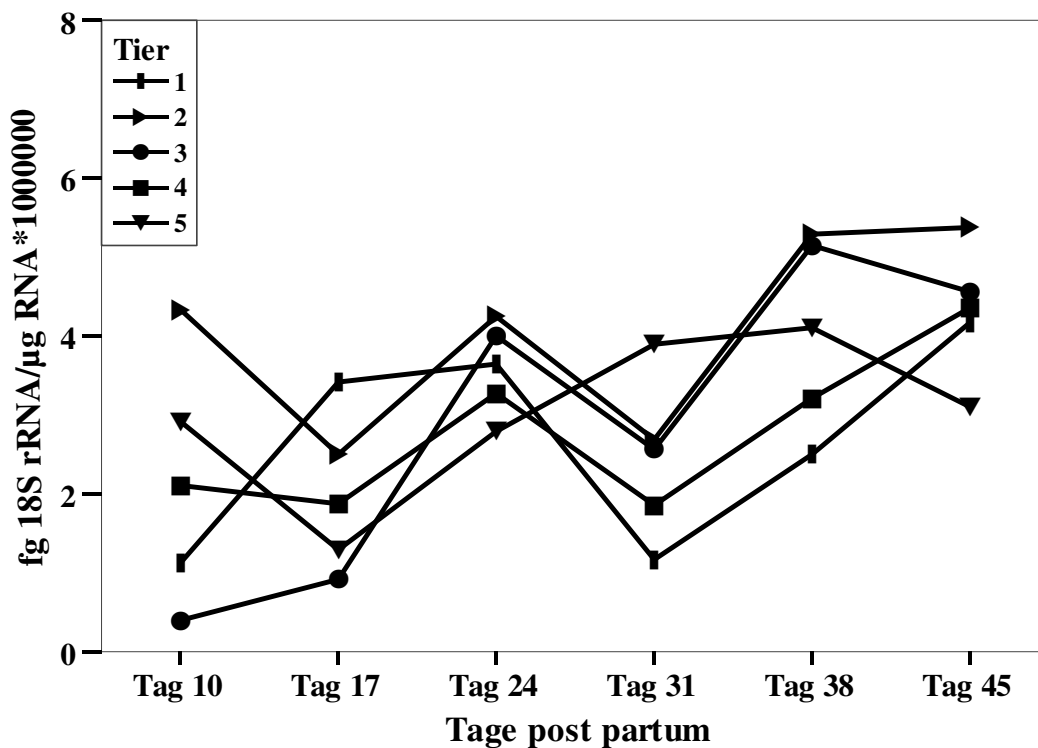


Abbildung 31: 18S rRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.3 Bovines granulozytäres Protein 2 (bGCP-2)

Abbildung 32 zeigt die relative bGCP-2 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum. bGCP-2 wurde in einer Größenordnung von 64 bis 280 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede festgestellt werden. Verglichen mit der mRNA-Expression am 31. Tag war die bGCP-2-Konzentration am 17. Tag signifikant höher. Alle Tiere expremierten bGCP-2 am 10. Tag nach der Kalbung in geringer Konzentration. Bei 4 Tieren konnte die höchste mRNA-Expression 17 Tage, bei einem Tier 24 Tage post partum detektiert werden. Tier 4 expremierte bGCP-2 17 Tage post partum in einer etwa 4fach höheren Konzentration als die übrigen Tiere. Im weiteren Verlauf des Puerperiums nahm die bGCP-2-Expression weitgehend ab oder war nicht mehr messbar.

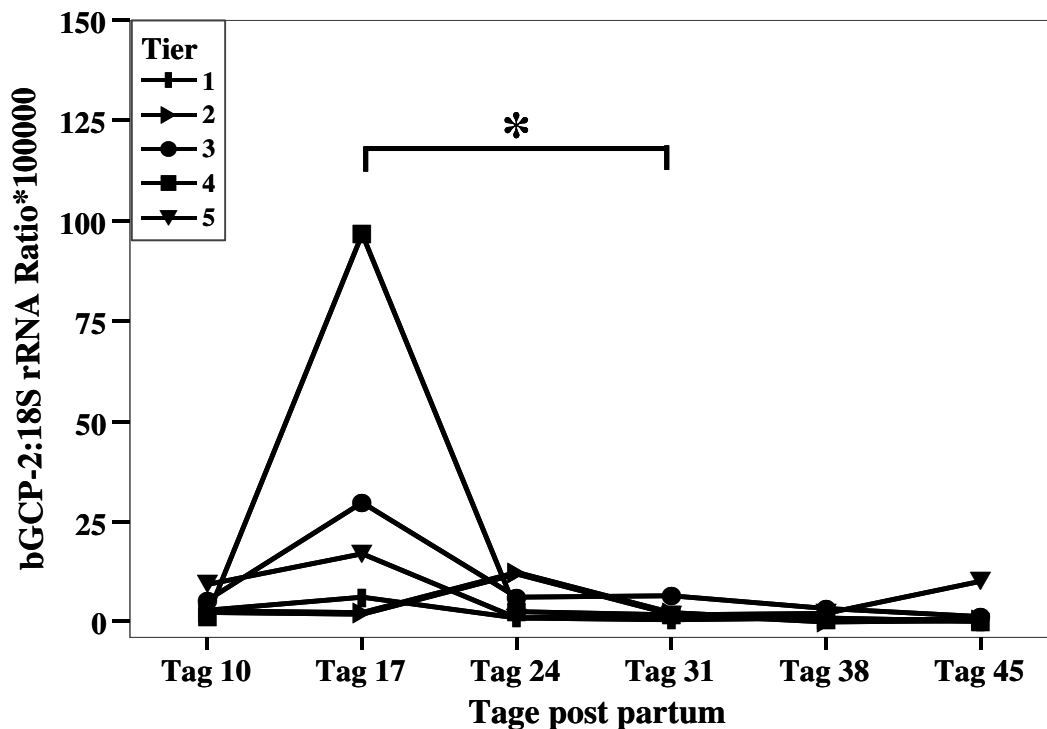


Abbildung 32: Relative bGCP-2 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.4 Cyclooxygenase 1 (COX-1)

Eine COX-1 mRNA-Expression konnte im Endometrium von Erstkalbinnen zu allen Untersuchungszeitpunkten nach der Kalbung nachgewiesen werden (Abbildung 33). Mit Hilfe der Real-time PCR wurde COX-1 in einer Größenordnung von 1,6 bis 4 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Im Verlauf des Puerperiums ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede. COX-1 wurde bei den einzelnen Tieren nicht auf gleich bleibendem Niveau expremiert und es ließ sich kein einheitliches Muster feststellen. Bei 4 von 5 Erstkalbinnen konnte 10 Tage nach der Kalbung eine niedrige COX-1-Konzentration gemessen werden. Ein Tier (Nr. 4) expremierte COX-1 ebenso wie bGCP-2 zu diesem Untersuchungszeitpunkt in einer 4fach höheren Konzentration. Im weiteren Verlauf des Puerperiums wies die mRNA-Expression bei den Tieren unterschiedliche Schwankungen auf und blieb ab dem 38. Tag weitgehend konstant niedrig.

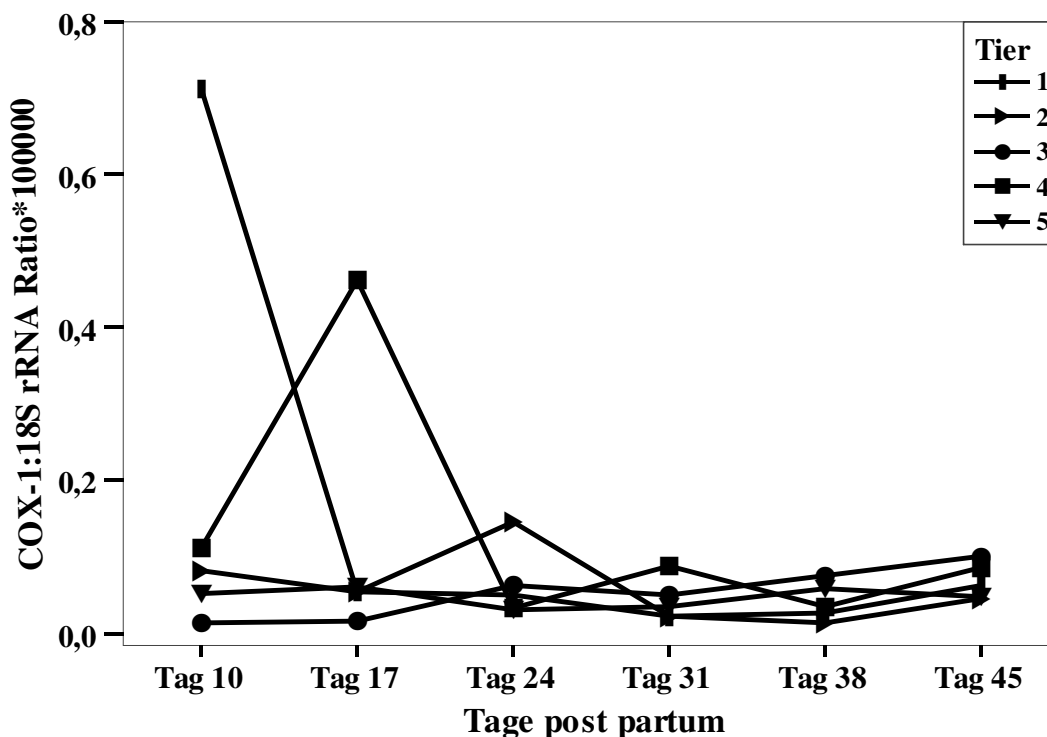


Abbildung 33: Relative COX-1 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.5 Cyclooxygenase 2 (COX-2)

In Abbildung 34 ist die relative COX-2 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum dargestellt. COX-2 wurde in einem Bereich von 160 bis 800 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die COX-2-Expression am 17. Tag wurde mit der Expression am 31. Tag nach der Kalbung verglichen und ergaben signifikante Unterschiede. Bei 2 Tieren konnten am Tag 17, bei 2 Tieren am Tag 24 erhöhte mRNA-Konzentrationen gemessen werden. Im weiteren Verlauf des Puerperiums nahm die COX-2-Expression ab und blieb weitgehend konstant niedrig. Nur eine Erstkalbin (Tier 4) wies am Tag 45 nach der Kalbung eine deutlich erhöhte COX-2-Konzentration auf. Eine Übereinstimmung mit dem PMN-Gehalt zu diesem Zeitpunkt konnte bei diesem Tier nicht festgestellt werden.

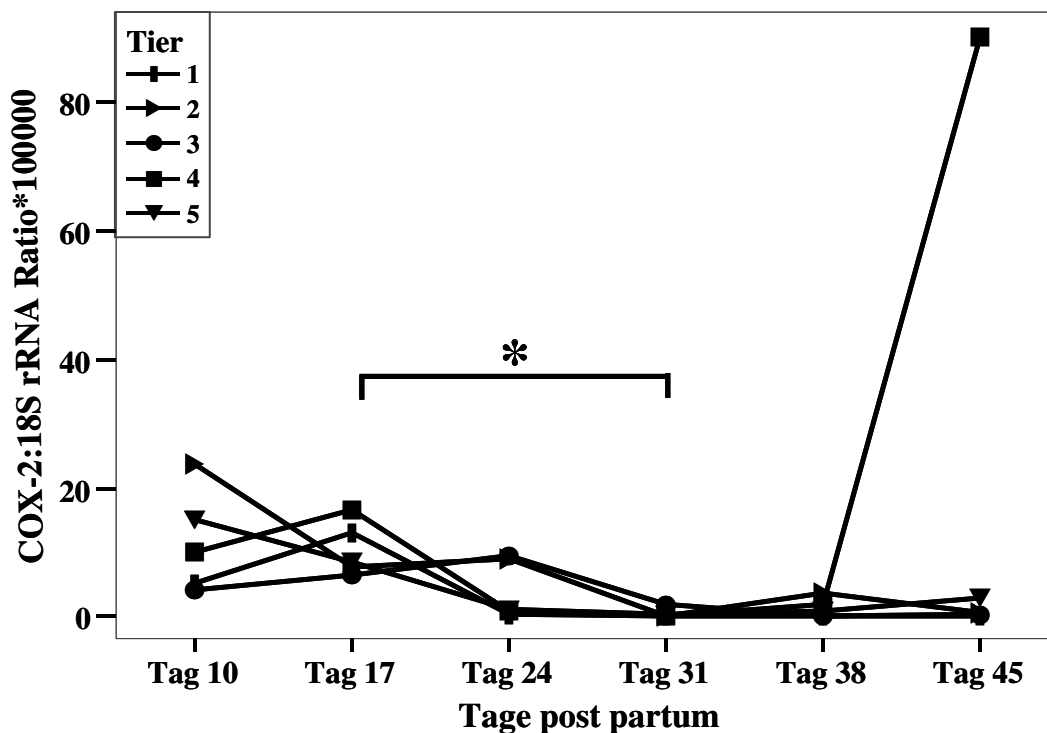


Abbildung 34: Relative COX-2 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.



### 5.3.6 Haptoglobin

Bei den untersuchten Studientieren konnte eine mRNA-Expression des Akute Phase Proteins Haptoglobin im Endometrium zu allen Untersuchungszeitpunkten nach der Kalbung nachgewiesen werden (Abbildung 35). Haptoglobin wurde in einer Größenordnung von 4 bis 16 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede festgestellt werden: am 17. Tag post partum war die mRNA-Expression signifikant höher als am 31. Tag. Bei 4 Tieren konnte die höchste Haptoglobin-Expression am Tag 17 post partum gemessen werden. Tier 3 wies zu diesem Zeitpunkt im Vergleich mit den übrigen Erstkalbinnen eine durchschnittlich doppelt so hohe Haptoglobin-Konzentration auf. Ebenso konnte bei diesem Tier eine etwa 4fach höhere IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 mRNA-Expression festgestellt werden (Abb. 36, 37, 38). Eine Erstkalbin (Tier 2) expremierte Haptoglobin verstärkt 24 Tage nach der Kalbung. Bei allen Erstkalbinnen nahm die mRNA-Expression im weiteren Verlauf des Puerperiums weitgehend ab.

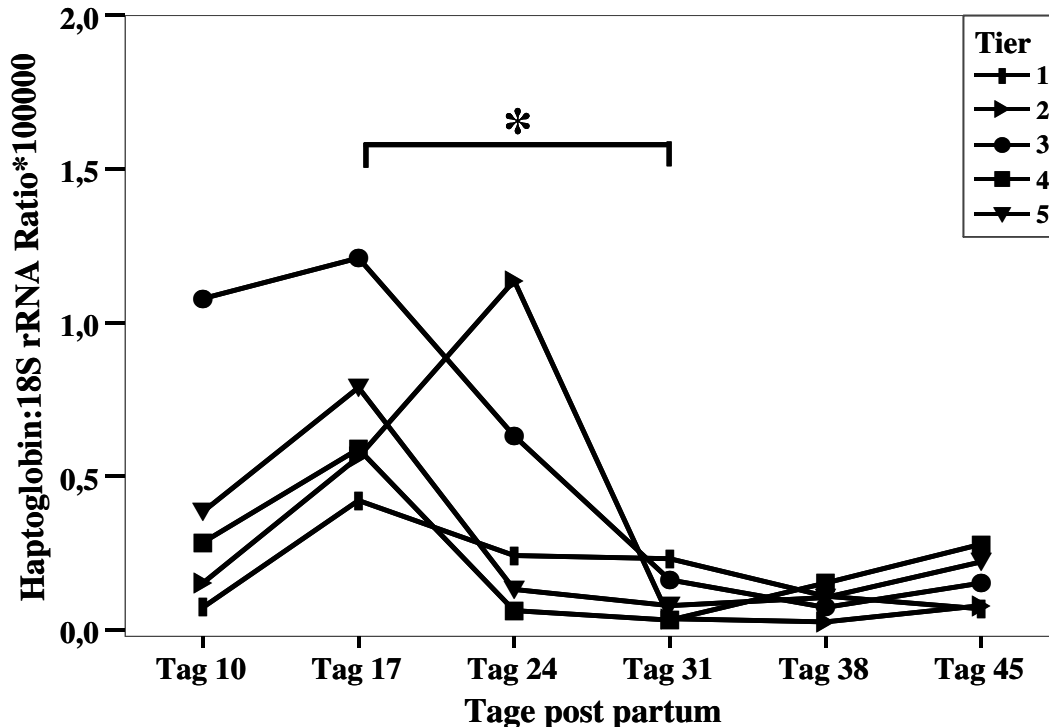


Abbildung 35: Relative Haptoglobin mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.7 Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )

Die relative IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im Endometrium der fünf Studientiere ist in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum dargestellt (Abbildung 36). IL-1 $\beta$  wurde in einem Bereich von 80 bis 400 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Am Tag 17 war die IL-1 $\beta$  mRNA-Expression signifikant höher als am 31. Tag post partum. Alle Tiere wiesen am 17. Tag nach der Kalbung die höchste IL-1 $\beta$ -Konzentration auf, wobei eine Erstkalbin (Tier 3) IL-1 $\beta$  etwa 4fach höher expremierte als die übrigen Tiere. Die Erstkalbin wies zu diesem Zeitpunkt im Vergleich mit den übrigen Erstkalbinnen ebenso eine höhere Haptoglobin sowie IL-6 und IL-8 mRNA-Expression auf. Ab dem 31. Tag konnte die Expression des Interleukins bei allen 5 Erstkalbinnen nicht mehr detektiert werden.

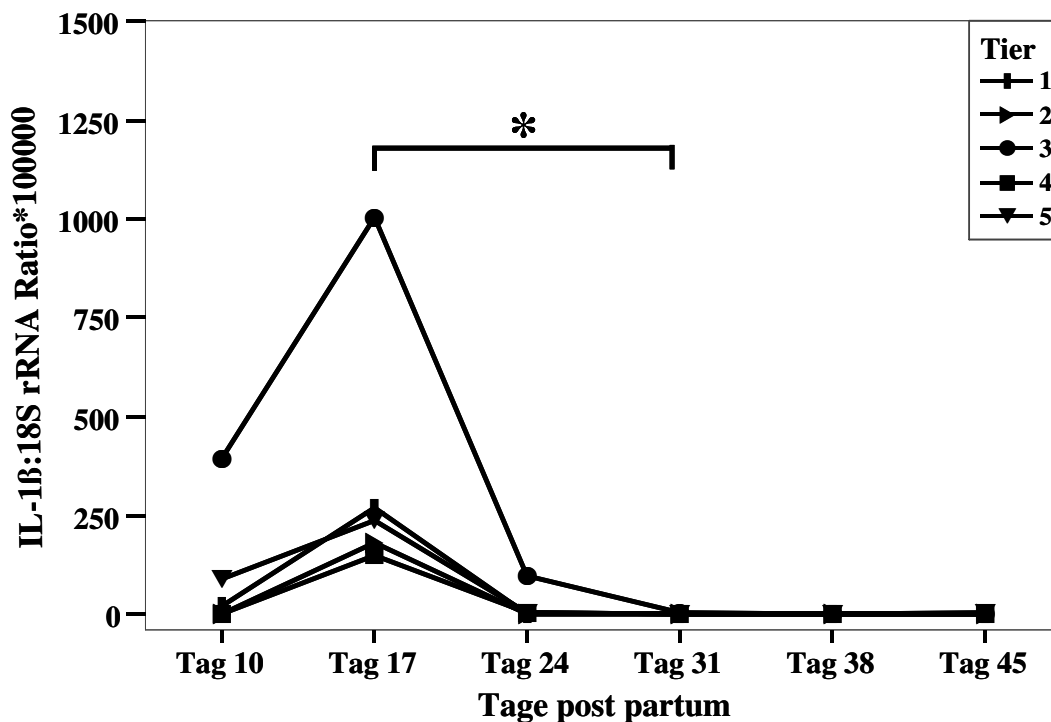


Abbildung 36: Relative IL-1 $\beta$  mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.8 Interleukin 6 (IL-6)

Bei allen Erstkalbinnen konnte eine IL-6 mRNA-Expression im Endometrium nachgewiesen werden (Abbildung 37). IL-6 wurde in einer Größenordnung von 4 bis 80 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede festgestellt werden. Nach Vergleich der mRNA-Expression am Tag 17 mit der Konzentration am Tag 31 traten signifikante Unterschiede auf. Bei drei Erstkalbinnen konnte am 10. Tag, bei zwei Erstkalbinnen am 17. Tag post partum die höchste IL-6-Konzentration gemessen werden. Eine Erstkalbin (Tier 3) expremierte IL-6 17 Tage post partum in einer etwa 4fach höheren Konzentration als die übrigen Tiere. Im weiteren Verlauf des Puerperiums nahm die Expression des Interleukins ab und war bei drei Tieren nicht mehr detektierbar. Zwei Erstkalbinnen (Tiere 3 und 4) wiesen 45 Tage nach der Kalbung eine erhöhte IL-6-Expression auf. Erhöhte PMN-Gehalte konnten bei diesen Tieren zu dem Zeitpunkt jedoch nicht nachgewiesen werden. Tier 4 expremierte COX-2 am 45. Tag nach der Kalbung in ähnlich hoher Konzentration.

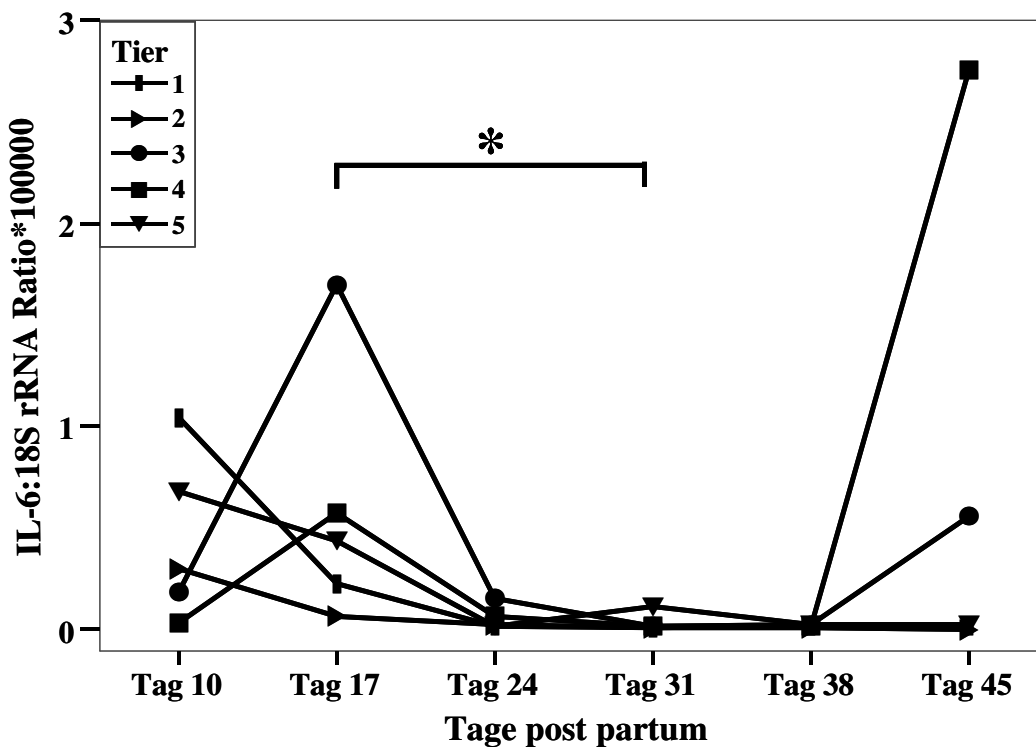


Abbildung 37: Relative IL-6 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.9 Interleukin 8 (IL-8)

Die mRNA-Expression des Chemokins IL-8 wurde im Endometrium von Erstkalbinnen in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum untersucht (Abbildung 38). IL-8 wurde in einer Größenordnung von 400 bis 2.000 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA expremiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede festgestellt werden. Verglichen mit dem 31. Tag post partum war die IL-8 mRNA-Expression am 17. Tag signifikant höher. Bei allen Tieren wurde die höchste IL-8-Konzentration am 17. Tag nach der Kalbung gemessen. Eine Erstkalbin (Tier 3) expremierte das Interleukin etwa 4fach höher als die übrigen Tiere. Tier 3 wies ebenso eine 4fach höhere Haptoglobin, IL-1 $\beta$  und IL-6-Expression auf. Ab dem 31. Tag post partum wurde IL-8 im bovinen Endometrium nicht mehr detektiert.

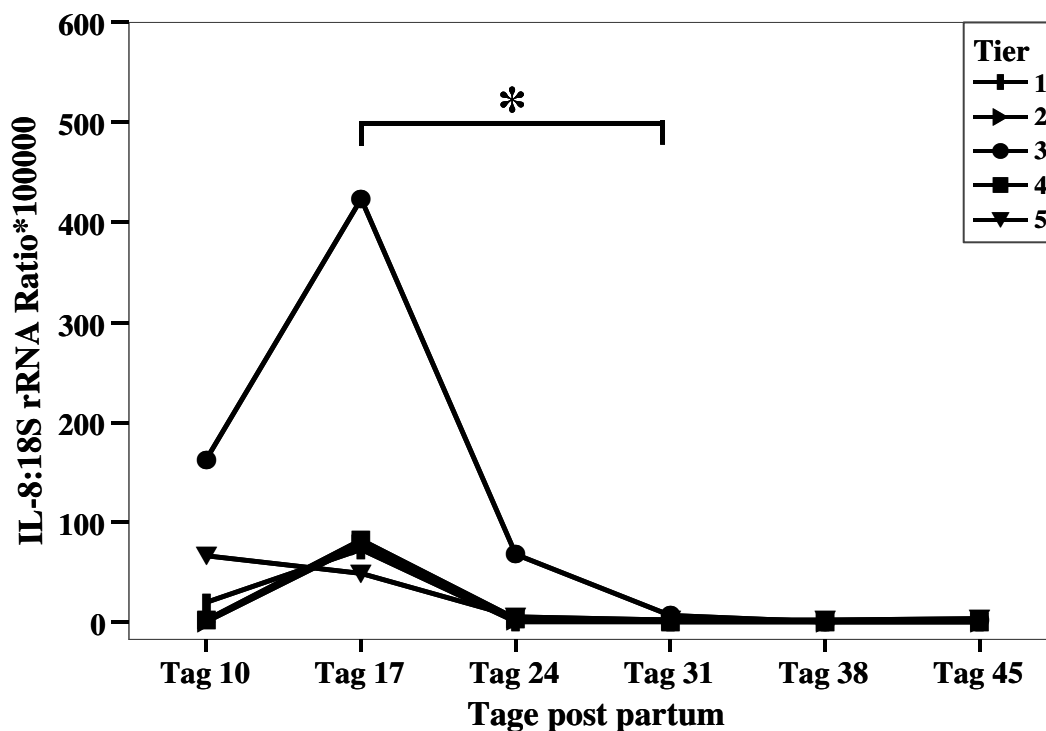


Abbildung 38: Relative IL-8 mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.10 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ )

Alle Erstkalbinnen wiesen eine TNF $\alpha$  mRNA-Expression im Endometrium auf. Abbildung 39 zeigt die mRNA-Konzentration des Zytokins in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum. Mit Hilfe der Real-time PCR wurde TNF $\alpha$  in einer Größenordnung von 40 bis 160 fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA detektiert. Im Verlauf des Puerperiums konnten signifikante Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die mRNA-Expression am 17. Tag post partum wurde mit der Konzentration am 31. Tag verglichen. Zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten bestanden signifikante Unterschiede. Bei allen Tieren wurde am 17. Tag nach der Kalbung eine erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentration im Endometrium gemessen. Bei einer Erstkalbin (Tier 1) konnte eine etwa 2,5fach höhere mRNA-Expression festgestellt werden als bei den übrigen Tieren. Im weiteren Verlauf des Puerperiums nahm die Konzentration ab und blieb weitgehend konstant.

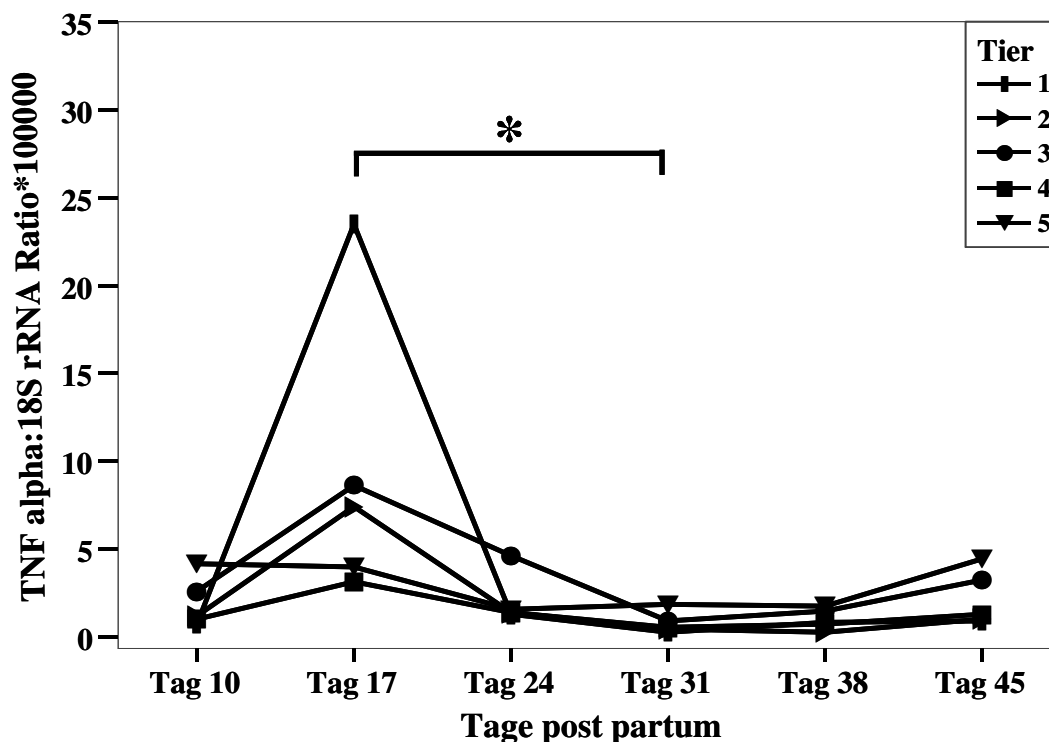


Abbildung 39: Relative TNF $\alpha$  mRNA-Expression im Endometrium von Erstkalbinnen (n=5) in Abhängigkeit von sechs Untersuchungszeitpunkten post partum.

### 5.3.11 Ergebniszusammenfassung

Im dritten Teil der Studie wurde die mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren bGCP-2, COX-1, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie TNF $\alpha$  im Endometrium von fünf Erstkalbinnen in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt untersucht. Die Probenentnahme erfolgte 10, 17, 24, 31, 38 und 45 Tage post partum. Die mRNA-Konzentration der Mediatoren wurde jeweils am Tag 17 und am Tag 31 miteinander verglichen. bGCP-2, COX-2, Haptoglobin, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  wurden 17 Tage nach der Kalbung signifikant höher expremiert als am 31. Tag. COX-1 wies hingegen keine signifikanten Expressionsunterschiede im Verlauf des Puerperiums auf. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an PMN im Endometrium ermittelt. 17 Tage post partum wiesen alle Studientiere einen Anteil an neutrophilen Granulozyten von über 5% auf. Ab dem 31. Tag sank der Anteil an PMN unter 5%. Für die Bestimmung der Progesteron- und Östrogengehalte wurden den Erstkalbinnen zu jedem Untersuchungszeitpunkt Blutproben entnommen. Ein Einfluss des Sexualzyklus im Untersuchungszeitraum konnte aufgrund der Steroidwerte ausgeschlossen werden.

### 5.4 Korrelationen

In Tabelle 18 sind signifikante Korrelationen zwischen den einzelnen Entzündungsmediatoren dargestellt. Bei den auf dem Milcherzeugerbetrieb und von den Erstkalbinnen gewonnenen Proben bestanden Korrelationen zwischen den Datenpaaren IL-1 $\beta$  und IL-8, IL-1 $\beta$  und IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Haptoglobin, IL-8 und Haptoglobin sowie IL-8 und TNF $\alpha$ . Zusätzlich konnten bei den Daten vom Milcherzeugerbetrieb Korrelationen zwischen IL-6 und Haptoglobin sowie IL-6 und TNF $\alpha$  ermittelt werden. Bei den Daten der Erstkalbinnen bestanden zudem Korrelationen zwischen IL-8 und dem Anteil an PMN sowie bGCP-2 und dem Anteil an PMN.

Tabelle 18: Signifikante Korrelationen einzelner Entzündungsmediatoren (r = Korrelationskoeffizient)

Entzündungsmediatoren	Milcherzeugerbetrieb (r)	Erstkalbinnen (r)
IL-1 $\beta$ /IL-8	0,767	0,984
IL-1 $\beta$ /IL-6	0,870	0,401
IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$	0,973	0,492
IL-1 $\beta$ /Haptoglobin	0,761	0,731
IL-6/Haptoglobin	0,910	nicht signifikant
IL-6/TNF $\alpha$	0,867	nicht signifikant
IL-8/Haptoglobin	0,412	0,720
IL-8/TNF $\alpha$	0,791	0,420
IL-8/PMN	nicht signifikant	0,414
bGCP-2/PMN	nicht signifikant	0,568

Abbildung 40 gibt einen vereinfachten schematischen Überblick über signifikante Korrelationen, die in der vorliegenden Arbeit zwischen den untersuchten Entzündungsmediatoren festgestellt werden konnten. Inhaltliche Zusammenhänge werden in der Diskussion im jeweiligen Kapitel der einzelnen Mediatoren näher erläutert.

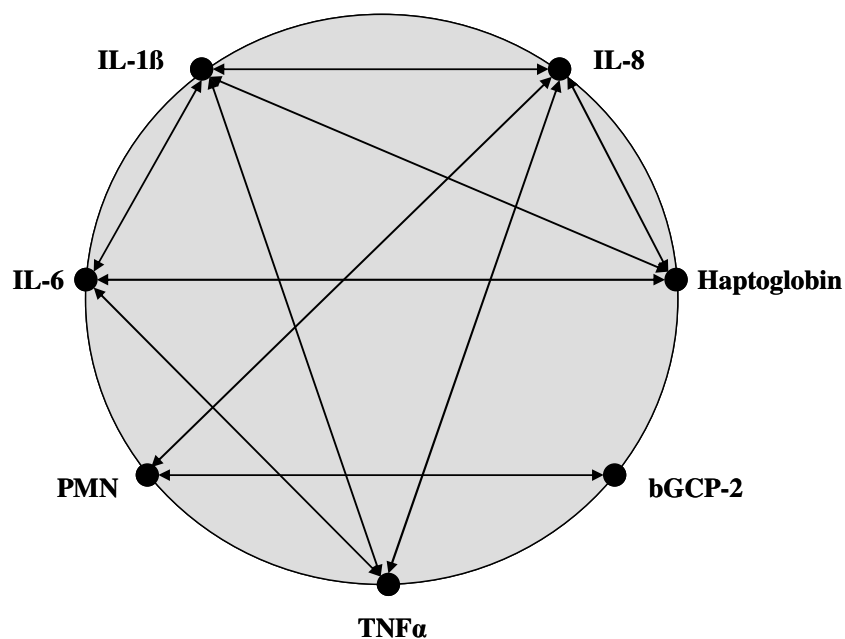


Abbildung 40: Signifikante Korrelationen einzelner Entzündungsmediatoren

## 5.5 Größenordnung der untersuchten Entzündungsmediatoren

Tabelle 19 gibt einen Überblick über die absoluten mRNA-Konzentrationen bezogen auf den eingesetzten RNA-Gehalt (fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA) der untersuchten Entzündungsmediatoren. Die Größenordnung ist jeweils im Vergleich mit den anhand von Schlachtorganen erhobenen Daten, den Daten vom Milcherzeugerbetrieb sowie den von den Erstkalbinnen gewonnenen Daten dargestellt. Die Werte stimmen weitestgehend überein, d. h. die ermittelten Dimensionen ähneln sich.

Tabelle 19: Größenordnung der untersuchten Entzündungsmediatoren als Mittelwert (alle Angaben in fg/ $\mu$ g Gesamt-RNA)

Entzündungsmediator	Schlachthof	Milcherzeugerbetrieb	Erstkalbinnen
bGCP-2	1,2 bis 60	32 bis 96	64 bis 280
COX-1	1,8 bis 6	1,6 bis 2,4	1,6 bis 4
COX-2	30 bis 510	160 bis 440	160 bis 800
Haptoglobin	2,4 bis 7,8	5,6 bis 7,2	4 bis 16
IL-1 $\beta$	1,8 bis 12	24 bis 2.560	80 bis 400
IL-6	0,18 bis 0,78	1,6 bis 6,4	4 bis 80
IL-8	0,18 bis 12	80 bis 1.920	400 bis 2.000
TNF $\alpha$	3 bis 12	3,2 bis 9,6	40 bis 160
18S rRNA	3,6 x 10 <sup>6</sup> bis 4,8 x 10 <sup>6</sup>	3,4 x 10 <sup>6</sup> bis 4,8 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>6</sup> bis 4,3 x 10 <sup>6</sup>