

6 Diskussion

6.1 Methodik

6.1.1 Validierung der Probengewinnung an Schlachthofmaterial

Der erste Teil der Studie diente als Vorversuch, um die Probenentnahme zu validieren. Es wurde anhand von Schlachthofmaterialien überprüft, ob es möglich ist, mittels der Cytobrush[®]-Methode ausreichend Zellmaterial für eine Untersuchung der mRNA-Expression zu gewinnen. Um die RNA zu konservieren, wurden die Endometriumszellen in ein mit RNAlater[®] gefülltes Reaktionsgefäß eingerieben. Diese Vorgehensweise war leicht zu handhaben und somit auch auf einem Milchviehbetrieb durchführbar. Von allen Proben konnte eine ausreichende Menge RNA für die nachfolgenden Expressionsexperimente isoliert werden, so dass diese Methode als zuverlässig bewertet werden kann.

Zudem stellte sich die Frage, ob der Ort der Probenentnahme (ipsilaterales und contralaterales Horn, Corpus) das Ergebnis beeinflusst. In einer neueren Studie von Bauersachs et al. (2005) wurde zwar gezeigt, dass der Entnahmeort von Endometriumszellen für die Expressionsanalytik von Bedeutung sein kann (UTMP-Protein), doch konnten bei der überwiegenden Anzahl der untersuchten Proteine keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden auf dem Schlachthof von den ersten 16 Tieren jeweils zwei Proben vom ipsilateralen und contralateralen Horn sowie vom Corpus entnommen. Bei allen hier untersuchten Entzündungsmediatoren ließen sich aber keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den beiden Proben einer Entnahmestelle nachweisen, so dass bei den folgenden 16 Tieren nur noch eine Probe pro Region gewonnen wurde. Die mRNA-Expression im ipsilateralen und contralateralen Horn sowie im Corpus wurde bei allen Faktoren miteinander verglichen, doch konnten ebenso keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Entnahmeorte lassen darauf schließen, dass es von untergeordneter Bedeutung ist, ob die Proben vom ipsilateralen, contralateralen Horn oder aus dem Corpus entnommen werden. Für die Zellgewinnung beim lebenden Tier ergeben sich daraus klare Vorteile, da es unter rektaler Kontrolle schwierig ist, den Ort der Probenentnahme genau zu lokalisieren.

Eine Vielzahl von Autoren beschränkte sich auf eine makroskopische Beurteilung des

Schlachthofmaterials (Murakami et al., 2001; Arosh et al., 2002; Okuda et al., 2004). Subklinische Endometritiden können dadurch jedoch nicht hinreichend ausgeschlossen werden, so dass in der vorliegenden Arbeit zusätzlich von jedem Tier ein zytologisches Präparat angefertigt wurde. Alle Studientiere, welche im Schlachthof ausgewählt worden waren, konnten aufgrund des PMN-Gehaltes von unter 5% als klinisch gesund eingestuft werden. Ebenso waren pathologisch veränderte Uteri von der Studie ausgeschlossen worden. Insgesamt kann anhand der vom Schlachthof gewonnenen Ergebnisse geschlossen werden, dass es sich bei der Cytobrush[®]-Entnahme um eine zuverlässige Methode handelt, die auch für die Untersuchung der Gen-Expression in der Praxis am lebenden Tier geeignet erscheint.

6.1.2 Cytobrush[®]-Methode am lebenden Tier

Auf dem Milcherzeugerbetrieb sowie bei den Erstkalbinnen erfolgte die Probenentnahme mittels Cytobrush[®]. Kürzlich wurde in einer Studie von Kasimanickam et al. (2005a) die Cytobrush[®]-Methode der Uterus-Lavage gegenübergestellt. Da bei der Lavage ein größerer Bereich der Oberfläche des Uterus erfasst wird, bietet sie theoretisch den Vorteil eines repräsentativeren Probenmaterials. Dennoch wurden auch Nachteile dieser Technik aufgezeigt: Einerseits befand sich in der Spülflüssigkeit eine große Anzahl an Erythrozyten, die auf iatrogen entstandene Traumata zurückgeführt wurden. Weiterhin konnte bei einigen Tieren keine Spülflüssigkeit zurückgewonnen werden. Zudem war der zeitliche Aufwand sehr hoch. Im Gegensatz dazu konnten die Endometriumszellen mittels Cytobrush[®] schnell und zuverlässig gewonnen werden. Zusätzlich handelte es sich um die sensitivere Methode zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden, wobei über die Spezifität der Methode jedoch keine Aussage gemacht wurde. Mittels Cytobrush[®] konnte ein signifikant höherer prozentualer Anteil an PMN ermittelt werden als mit Hilfe der Lavage. Es wurde vermutet, dass bei der Uterus-Lavage die lange Zeitspanne von der Gewinnung des Zellmaterials bis zur Anfertigung des zytologischen Präparates für eine Verzerrung des Zellbildes verantwortlich ist. Obwohl andere Autoren die Uterus-Lavage ebenfalls für geeignet halten, um subklinische Endometritiden zu diagnostizieren (Gilbert et al., 2005), wurde die Cytobrush[®]-Methode in eben dieser Studie von Kasimanickam et al. (2005a) als effizienter zur Gewinnung von Endometriumszellen bewertet. Die Cytobrush[®]-Methode stellt zudem im Gegensatz zur Biopsie (Bonnett et al., 1991) eine weniger invasive Möglichkeit zur Zellgewinnung dar.

Insgesamt muss kritisch betrachtet werden, dass es bislang keine einheitliche Definition für subklinische Endometritiden gibt. Zwar wird die subklinische Endometritis von mehreren Autoren anhand von neutrophilen Granulozyten diagnostiziert, der Grenzwert sowie der postpartale Untersuchungszeitpunkt variieren jedoch. Kasimanickam et al. (2004) untersuchten die Tiere 20-33 Tage post partum und konnten ab einem Anteil an PMN von über 18% eine verminderte Konzeptionsrate der Tiere als Kriterium für einen Effekt der subklinischen Endometritis feststellen. Gilbert et al. (2005) legten den Grenzwert von PMN bei 5% fest und untersuchten die Kühe 40-60 Tage nach der Kalbung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Studientiere ebenfalls als subklinisch erkrankt eingestuft, wenn der Anteil an PMN über 5% betrug. Die Milchkühe wurden allerdings bereits zwischen dem 21. und 27. Tag post partum untersucht. Diese Definition der subklinischen Endometritis stützt sich auf eine Studie von Raab (2004), die bei Überschreitung dieses Grenzwertes eine verminderte Fruchtbarkeitsleistung der betroffenen Tiere nachweisen konnte. Der Anteil der trächtigen Kühe war bis zum 200. Tag nach der Kalbung in der Gruppe der subklinisch erkrankten Tiere signifikant geringer als in der Gruppe der gesunden Tiere. Zudem stellte die Autorin fest, dass die Abgangsrate von Kühen mit subklinischer Endometritis signifikant höher lag als die Abgangsrate bei gesunden Tieren.

Bei den fünf Tieren der Tierklinik für Fortpflanzung handelte es sich um Erstkalbinnen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass diese Tiere bereits zu einem früheren Zeitpunkt an einer Endometritis erkrankt waren. Der ursprüngliche Versuchsaufbau sah vor, die Erstkalbinnen im Verlauf des Puerperiums sowie über zwei Sexualzyklen hinweg zu untersuchen. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob sich die anhand von Schlachthofmaterialien gewonnenen Ergebnisse auf das lebende Tier übertragen lassen. In der Lutealphase war es jedoch aufgrund der geschlossenen Zervix technisch nicht möglich, Endometriumzellen mittels Cytobrush[®] zu gewinnen.

Da die Tiere wöchentlich untersucht und zudem von jeder Erstkalbin drei Proben benötigt wurden, stellt sich die Frage nach iatrogen bedingten Entzündungen. Um das Risiko von Traumata möglichst gering zu halten, wurde eine Spezialanfertigung des Entnahmegerätes entwickelt. Auf diese Weise musste das äußere Metallrohr nur einmalig durch die Zervix bis in den Uterus vorgeschoben werden. Es verblieb während der Probenentnahme im Uterus und diente als Führungsschiene für die inneren Metallrohre samt Cytobrush[®] (siehe Kapitel 4.2.2.3). Eine iatrogen entstandene Endometritis konnte anhand der zytologischen Präparate

ausgeschlossen werden. Alle Tiere wiesen ab dem 31. Tag post partum einen Anteil an neutrophilen Granulozyten von unter 5% auf. Nur ein Tier zeigte 45 Tage nach der Kalbung einen Anstieg an PMN.

6.1.3 Progesteron- und Östradiolbestimmung

Da Entzündungsmediatoren zyklisch reguliert sein können (Arici et al., 1998b; Arosh et al., 2002), wurden von den Kühen vom Milcherzeugerbetrieb sowie von den Erstkalbinnen Blutproben zur Bestimmung der Progesteron- und Östradiolwerte gewonnen. Bei 12 Kühen des Milcherzeugerbetriebes wurde ein erhöhter Progesteronspiegel als Anzeichen eines vorhandenen Corpus luteum gemessen. Auswirkungen auf die Expressionshöhe der Faktoren konnten bei diesen Tieren nicht festgestellt werden, wobei sich keines der Tiere im Östrus befand.

Bei den Erstkalbinnen wurden Blutproben zu jedem Untersuchungszeitpunkt entnommen. Durch die niedrigen Progesteron- und Östrogenwerte konnte ein Zyklusgeschehen im Untersuchungszeitraum ausgeschlossen werden.

6.2 Entzündungsmediatoren

6.2.1 Bovines granulozytäres chemotaktisches Protein 2 (bGCP-2)

Die auf dem Milcherzeugerbetrieb gewonnenen Daten belegen, dass die bGCP-2 mRNA-Expression zwischen den drei Tiergruppen variierte. Subklinisch und klinisch erkrankte Tiere expremierten das Chemokin signifikant höher als die gesunden Milchkühe. Somit konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der bGCP-2-Expression und dem Vorkommen von Endometritiden nachgewiesen werden. Eine erhöhte bGCP-2-Expression wurde von verschiedenen Autoren auch bei anderen bakteriell bedingten Infektionen beobachtet. In einer Studie von Santos et al. (2002) wurde die experimentell induzierte Infektion des Darms mit *Salmonella typhimurium* bei neonatalen Kälbern beschrieben. Neben einem vermehrten Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsgebiet, konnte ein Anstieg der bGCP-2-Expression nachgewiesen werden. Beim Menschen wurde die GCP-2-Expression im chronisch entzündeten Darm untersucht. Anhand von Biopsien aus dem Intestinaltrakt konnte eine erhöhte Expression des Chemokins detektiert werden (Gijsbers et al., 2004). Ebenso wurde bei an Tonsillitis erkrankten Patienten eine hohe GCP-2-Konzentration in den Tonsillen festgestellt (Rudack et al., 2004). Neben seiner Funktion im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen, fördert das Chemokin durch Induzierung der Angiogenese das Tumorwachstum (Van Coillie et al., 2001).

Um bGCP-2 als potentieller Marker-Gen für subklinische Endometritiden in Betracht ziehen zu können, müssen seine physiologischen Funktionen im Endometrium Beachtung finden. Die von den Erstkalbinnen gewonnenen Daten belegen, dass bGCP-2 im Verlauf des Puerperiums signifikant unterschiedlich zwischen den Untersuchungszeitpunkten expremiert wurde. Am 17. Tag post partum konnte eine signifikant höhere bGCP-2-Expression als am 31. Tag nachgewiesen werden. Ab dem 31. Tag nahm die Konzentration des Chemokins bei allen Tieren ab und blieb weitgehend konstant oder war nicht mehr messbar. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass etwa 90% der Kühe nach der Kalbung eine nicht-pathologische Endometritis entwickeln (Lewis, 1997; Bondurant, 1999). Nach der Geburt ist die Zervix, die als physikalische Barriere dient, weit geöffnet. Somit wird die Kontamination des Uterus mit Bakterien erleichtert. Im Puerperium wird dieser Prozess als physiologisch bewertet. Gesunde Tiere können die Erreger hauptsächlich über die Rekrutierung von PMN

innerhalb von zwei bis drei Wochen eliminieren (Sheldon, 2004). Die erhöhte bGCP-2-Expression am 17. Tag post partum könnte somit als Abwehrreaktion gegen eingedrungene Bakterien verstanden werden. Mit diesem Ergebnis korrelieren die PMN-Gehalte im Endometrium der Erstkalbinnen, da alle Tiere am 17. Tag post partum einen Anteil an PMN von über 5% aufwiesen.

Anhand der auf dem Schlachthof gewonnenen Proben ließen sich signifikante Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Zyklusphase feststellen. Die mRNA des Chemokins wurde im bovinen Endometrium vorwiegend zum Zeitpunkt um die Ovulation expremiert, während es in der frühen und späten Lutealphase nicht detektiert werden konnte. Die Hochregulierung des Chemokins vor und nach der Ovulation könnte in seiner Eigenschaft begründet liegen, neutrophile Granulozyten anzulocken (Williams et al., 1999). In der Literatur wird diskutiert, dass das Endometrium des Rindes zum Zeitpunkt um die Ovulation physiologisch mit Entzündungszellen infiltriert ist (Butt et al., 1991; Cobb und Watson, 1995). Butt et al. (1991) gewannen endometriales Zellmaterial acht Stunden nach der Hochbrunst mittels einer Uterus-Lavage. Es wurde ein Anteil an PMN zwischen 2,7 und 3% festgestellt. Ebenso konnte 2 bis 8 Tage nach der Ovulation ein erhöhter Anteil an PMN im Endometrium nachgewiesen werden (Klucinski et al., 1990b; Klucinski et al., 1990a). Da die Zervix des Rindes zum Zeitpunkt um die Ovulation geöffnet ist, wird das Eindringen von Erregern in den Uterus, beispielsweise beim Deckakt, erleichtert. Vor diesem Hintergrund ließe sich die Infiltration von Entzündungszellen, vorwiegend PMN, als erste zelluläre Abwehr erklären. Zusätzlich wird bGCP-2 als wichtiger Mediator hinsichtlich der embryo-maternalen Kommunikation diskutiert. Beim Rind konnte in vitro mit Hilfe von Western Blots festgestellt werden, dass der Trophoblast die bGCP-2-Synthese stimuliert (Teixeira et al., 1997; Austin et al., 1999). Es wurde vermutet, dass bGCP-2 in Prozesse wie Wachstum, Differenzierung sowie Einnistung des Embryos involviert ist. Die Hochregulierung des Chemokins könnte somit auch als Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation verstanden werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass bGCP-2 potentiell zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden geeignet ist. Dabei muss beachtet werden, dass das Chemokin zyklisch reguliert wird. Eine Untersuchung der Gen-Expression ab dem 24. Tag post partum erscheint unter diesen Voraussetzungen sinnvoll.

6.2.2 Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1/COX-2)

Eine mRNA-Expression der Cyclooxygenasen 1 und 2 konnte bei gesunden Kühen sowie bei Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis anhand der auf dem Milcherzeugerbetrieb gewonnenen Proben immer nachgewiesen werden. Doch signifikante Expressions-Unterschiede bestanden zwischen den drei Tiergruppen nicht. Im Gegensatz dazu konnte eine Vielzahl von Autoren eine erhöhte COX-Expression bei verschiedenen Erkrankungen nachweisen. Eine Hochregulierung des Enzyms COX-2 wurde beim Menschen im Zusammenhang mit Arthritiden (Warner und Mitchell, 2004), Endometriose sowie uterinen Karzinomen beschrieben (Sales und Jabbour, 2003). Ebenso konnten gesteigerte COX-2-Konzentrationen in den Zellen der Milch, jedoch nicht im Eutergewebe von Kühen nachgewiesen werden, die einen erhöhten Zellgehalt aufwiesen. So wurde berichtet, dass COX-1 in den Zellen der Milch und im Gewebe auf gleich bleibendem Niveau expremiert sein soll (Pfaffl et al., 2003). Insgesamt wird COX-2 im Entzündungsgeschehen vorwiegend mit der Auslösung von Schmerz und Fieber in Verbindung gebracht (Simmons et al., 2004). Diese Symptome sind nicht mit subklinischen Endometritiden assoziiert. Möglicherweise lässt sich dadurch erklären, warum eine Hochregulierung der COX-1/-2 mRNA-Expression bei subklinisch und klinisch erkrankten Tieren nicht beobachtet wurde.

Im Verlauf des Puerperiums konnten im Gegensatz zu COX-2 keine signifikanten Unterschiede in der COX-1 mRNA-Expression nachgewiesen werden. COX-2 wurde überwiegend am 10. und 17. Tag höher expremiert als an den übrigen Untersuchungszeitpunkten. Die Hochregulierung des Enzyms zu diesem Zeitpunkt könnte sich damit erklären lassen, dass COX-2 über die Produktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ an der Auslösung von Uteruskontraktionen beteiligt ist (Simmons et al., 2004). In den ersten drei Wochen nach der Kalbung werden einerseits die Lochien ausgestoßen, andererseits verkürzen sich die Muskelzellen und der Uterus erlangt wieder seine ursprüngliche Größe (Bondurant, 1999). Eine Beteiligung von COX-2 an diesen Prozessen wäre vorstellbar. Im weiteren Verlauf nahm die COX-2-Expression ab und blieb weitgehend konstant auf niedrigem Niveau.

Bezogen auf den Sexualzyklus wurde eine auffällige mRNA-Expression der Cyclooxygenasen im bovinen Endometrium nachgewiesen. Im Gegensatz zu Arosh et al. (2002) wurde nicht nur eine mRNA-Expression von COX-2, sondern auch von COX-1 detektiert. Diese abweichenden Ergebnisse können möglicherweise auf die methodische

Vorgehensweise zurückgeführt werden, da die Real-time PCR eine sensitivere Nachweismethode darstellt als der in der zitierten Arbeit eingesetzte Northern Blot. Signifikante Expressions-Unterschiede konnten im Verlauf der einzelnen Zyklusphasen nicht festgestellt werden. Dennoch wurde COX-2 ebenso wie bei Mensch (Maia et al., 2005), Affe (Sun et al., 2004) und Schaf (Charpigny et al., 1997) überwiegend in der frühen (Tag 6-12) und späten (Tag 13-18) Lutealphase expremiert. Eine mögliche Ursache könnte in der Regulation des Enzyms begründet liegen, da bekannt ist, dass Progesteron die Prostaglandin-Synthese steigert (Xiao et al., 1998). Arosh et al. (2002) wiesen im Endometrium des Rindes eine Hochregulierung von COX-2 zwischen Tag 13 und 21 nach. Möglicherweise ist die unterschiedliche Vorgehensweise hinsichtlich der Zellgewinnung für unser abweichendes Ergebnis verantwortlich. Die Probenentnahme erfolgte bei Arosh et al. (2002) nicht mittels Cytobrush[®], sondern anhand eines Skalpells. Es wäre vorstellbar, dass Zellmaterial aus tieferen Gewebeschichten gewonnen wurde wie beispielsweise aus dem Myometrium. Die COX mRNA-Expression in allen Zyklusphasen lässt sich anhand der Prostaglandin-Synthese erklären. Während PGE₂ für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit in der Lutealphase von Bedeutung ist, leitet PGF_{2α} die Luteolyse ein (Simmons et al., 2004). Zusätzlich wird COX als wichtiger Faktor hinsichtlich der Implantation diskutiert. Es wurde beobachtet, dass die Cyclooxygenasen von unterschiedlicher physiologischer Bedeutung sind. In zahlreichen Studien konnte eine Reduzierung der Fruchtbarkeit bei COX-2 defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Lim et al., 1997; Reese et al., 2001). COX-1-Knock-out-Mäuse zeigten keinen Effekt auf die Fruchtbarkeit. Bei COX-2 defizienten Tieren konnte hingegen ein negativer Einfluss auf die Ovulation und die Implantation festgestellt werden. Im Endometrium von fertilen Mäusen wurde COX-2 direkt an der Implantationsstelle des Embryos expremiert (Lim et al., 1997).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Cyclooxygenasen physiologisch im Puerperium sowie während des normalen Sexualzyklus expremiert werden. Für die Diagnostik von subklinischen Endometritiden sind die Expressionsmuster dieser Enzyme aber ungeeignet.

6.2.3 Haptoglobin

Haptoglobin mRNA konnte im bovinen Endometrium anhand der auf dem Milcherzeugerbetrieb gewonnenen Daten bei allen drei Tiergruppen nachwiesen werden. So

wurde diskutiert, dass der Grad der bakteriellen Uteruskontamination mit dem Haptoglobin-Spiegel im Plasma korrelieren könnte (Sheldon et al., 2001; Petersen et al., 2004). Im Gegensatz dazu variierte die mRNA-Expression dieses Akute Phase Proteins im Endometrium von gesunden, subklinisch und klinisch erkrankten Kühen nicht. Die abweichenden Ergebnisse könnten darin begründet liegen, dass die Plasmakonzentration möglicherweise durch entzündliche Prozesse in anderen Organsystemen ausgelöst wurde, die bei der klinischen Untersuchung nicht mit einbezogen worden waren. Hirvonen et al. (1999) und Chan et al. (2004) konnten erhöhte Haptoglobin-Konzentrationen im Plasma von an postpartaler Metritis erkrankten Kühen nachweisen. Die untersuchten Tiere wiesen jedoch Symptome einer akuten Entzündung wie beispielsweise Fieber und gestörtes Allgemeinbefinden auf. Bei Kühen, deren Allgemeinbefinden ungestört war, konnte kein erhöhter Plasma-Spiegel des Akute Phase Proteins festgestellt werden (Hirvonen et al., 1999). Gronlund et. al (2005) untersuchten die Haptoglobin-Konzentration in der Milch bei Kühen mit subklinischer Mastitis, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu gesunden Tieren nachweisen. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich Haptoglobin als Marker für akute Entzündungsprozesse eignet, zur Diagnostik von chronischen und subklinischen Erkrankungen aber nicht in Betracht gezogen werden sollte. Bei den Studientieren der vorliegenden Arbeit lag kein offensichtliches akutes Entzündungsgeschehen vor. Somit ließe sich begründen, dass die Haptoglobin-Expression zwischen den Tiergruppen nicht signifikant verschieden war.

Doch im Verlauf des Puerperiums konnten bei den fünf Erstkalbinnen signifikante Unterschiede in der Haptoglobin mRNA-Expression zwischen den Untersuchungszeitpunkten beobachtet werden. Da Haptoglobin mit Gewebeschäden assoziiert ist (Petersen et al., 2004), könnte die erhöhte Expression ein Indiz für zelluläre Umbauprozesse im Endometrium sein. Nach der Kalbung nekrotisieren die Karunkeln und lösen sich etwa ab dem 12. Tag. Die Regeneration des Endometriums ist mit dem 25. Tag abgeschlossen (Sheldon, 2004). Am 31. Tag post partum wurde Haptoglobin von allen Erstkalbinnen nur noch in geringer Konzentration expremiert, wobei die erhöhte Haptoglobin mRNA-Expression am 17. Tag post partum somit als physiologisch bewertet werden kann.

Zudem belegen die anhand von Schlachthofmaterialien gewonnenen Daten, dass Haptoglobin physiologisch während des Sexualzyklus von Bedeutung ist. Ebenso wie beim Menschen (Berkova et al., 2001) und Kaninchen (Herrler et al., 2004) konnte die mRNA-Expression des

Akute Phase Proteins auch im bovinen Endometrium festgestellt werden. Im humanen Endometrium wurde Haptoglobin mittels Immunhistochemie in Stroma- und Epithelzellen nachgewiesen (Berkova et al., 2001). Doch zwischen den vier Zyklusphasen bestanden beim Rind im Gegensatz zum Menschen keine Expressionsunterschiede. Aufgrund der Eigenschaft des Akute Phase Proteins, die Angiogenese zu stimulieren (Petersen et al., 2004), könnte es im Zusammenhang mit der Vaskularisation des Endometriums eine Rolle spielen. Zudem wird Haptoglobin als wichtiger Mediator hinsichtlich der Implantation des Embryos diskutiert (Berkova et al., 1997; Berkova et al., 2001). Oh et al. (1990) konnten nachweisen, dass Haptoglobin über immunsuppressive Eigenschaften verfügt. Das Akute Phase Protein ist in der Lage, mit Immunzellen wie natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten zu interagieren. Es wird diskutiert, dass Haptoglobin auf diese Weise die maternale Immunantwort in der frühen Phase der Trächtigkeit unterdrückt. Möglicherweise ist das Akute Phase Protein somit an einer erfolgreichen Implantation bzw. embryo-maternalen Kommunikation beteiligt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Haptoglobin physiologisch im Puerperium sowie im Sexualzyklus expremiert wird. Zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden ist es aber ungeeignet.

6.2.4 Interleukin 1 beta (IL-1 β)

In der Literatur wird eine erhöhte IL-1 β -Expression im Zusammenhang mit verschiedenen bakteriellen Infektionen beschrieben. Lee et al. (2001) untersuchten die Interleukin-Expression im Darm von Rindern, die experimentell mit *Mycobacterium paratuberculosis* infiziert wurden. Infizierte Tiere expremierten IL-1 β im Ileum signifikant höher als die gesunden Kontrolltiere. Eine weitere Studie beschreibt die experimentelle Infektion des Euters von Rindern mit *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. Bei Tieren mit klinischer Mastitis konnten in der Milch erhöhte IL-1 β -Konzentrationen gemessen werden (Bannerman et al., 2004). Ebenso wurde in der hier vorliegenden Studie eine Hochregulierung des Interleukins bei an Endometritis erkrankten Kühen beobachtet. Im Endometrium von Milchkühen des Milcherzeugerbetriebs konnten sehr wohl Expressions-Unterschiede zwischen den drei Tiergruppen nachgewiesen werden. Die subklinisch und klinisch erkrankten Tiere expremierten IL-1 β signifikant höher als die gesunden Tiere.

Um IL-1 β als Marker-Gen für subklinische Endometritiden in Betracht zu ziehen, müssen die physiologischen Funktionen des Zytokins beachtet werden. Im Verlauf des Puerperiums der Erstkalbinnen konnten signifikante Expressions-Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden. Die Hochregulierung des Interleukins 17 Tage nach der Kalbung lässt sich als Immunantwort auf bakterielle Erreger im Uterus verstehen, da die IL-1 β -Synthese hauptsächlich durch Lipopolysaccharide stimuliert wird (Dinarello, 2005). Aufgrund seiner Eigenschaft, die Produktion von IL-8 und bGCP-2 hochzuregulieren (Van Damme et al., 1997; Baggiolini, 2001), könnte IL-1 β zu diesem Zeitpunkt auch indirekt an der Rekrutierung von PMN beteiligt sein. Das Tier Nr. 3 expremierte am Tag 17 neben IL-1 β auch die Interleukine 6 und 8 sowie Haptoglobin in einer höheren Konzentration als die übrigen Erstkalbinnen. Zudem wies es zum Untersuchungszeitpunkt eitrigen vaginalen Ausfluss auf. Daraus lässt sich schließen, dass dieses Tier einer besonders hohen Keimbelastung ausgesetzt war. Insgesamt kann die IL-1 β -Synthese zu diesem Zeitpunkt als physiologisch bewertet werden, da 90% der Kühe nach der Kalbung eine nicht-pathologische milde Endometritis entwickeln (siehe Kapitel 6.2.1) (Lewis, 1997; Bondurant, 1999).

Im Sexualzyklus konnte im bovinen Endometrium eine erhöhte IL-1 β -Expression zum Zeitpunkt um die Ovulation detektiert werden. In der frühen und späten Lutealphase wurde IL-1 β von der überwiegenden Anzahl der Tiere nicht expremiert. Dieses Ergebnis kann im Zusammenhang mit der bGCP-2 mRNA-Expression diskutiert werden. IL-1 β stimuliert die bGCP-2-Synthese (Van Damme et al., 1997) und könnte somit indirekt an der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Endometrium beteiligt sein. Zudem wird IL-1 β in der Literatur als wichtiger Mediator hinsichtlich der Implantation diskutiert (Kauma, 2000; Dimitriadis et al., 2005). Folglich könnte die mRNA-Expression des Interleukins vor und nach der Ovulation ein Hinweis darauf sein, dass IL-1 β an der Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation des Embryos beteiligt ist.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass IL-1 β potentiell zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden geeignet ist. Es muss berücksichtigt werden, dass IL-1 β physiologisch im Puerperium sowie im Sexualzyklus unterschiedlich expremiert wird. Eine Untersuchung der Tiere am 24. Tag post partum unter Beachtung der Zyklusphase erscheint sinnvoll.

6.2.5 Interleukin 6 (IL-6)

Obwohl IL-6 mRNA im bovinen Endometrium von gesunden, subklinisch und klinisch erkrankten Milchkühen nachgewiesen werden konnte, bestanden keine Expressions-Unterschiede zwischen den drei Tiergruppen. Eine Hochregulierung des Interleukins im Zusammenhang mit Endometritiden konnte somit nicht postuliert werden. Im Gegensatz dazu werden in der Literatur verschiedene bakteriell bedingte Infektionen mit erhöhten IL-6-Konzentrationen diskutiert. Im Darm von Rindern, die experimentell mit *Mycobacterium paratuberculosis* infiziert wurden, konnte im Vergleich zu gesunden Tieren eine erhöhte IL-6-Expression festgestellt werden (Lee et al., 2001). Ebenso konnten bei an Mastitis erkrankten Kühen erhöhte IL-6-Konzentrationen im Serum und in der Milch nachgewiesen werden (Hagiwara et al., 2001). Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich hierbei um akute Entzündungen handelte, die mit einer Störung des Allgemeinbefindens der betroffenen Tiere einhergingen. IL-6 konnte möglicherweise bei den akut erkrankten Kühen in hoher Konzentration detektiert werden, da es an der Auslösung von Fieber beteiligt ist (Dinarello, 2004). Weiterhin wurden Endometritiden mit einem erhöhten IL-6-Spiegel im Plasma in Verbindung gebracht (Ishikawa et al., 2004). Fraglich ist, inwieweit dieses Ergebnis Allgemeingültigkeit besitzt, da es auf einer sehr geringen Anzahl an Tieren ($n = 3$) basiert. Zudem wäre es möglich, dass Erkrankungen anderer Organsysteme die Plasma-Konzentration des Interleukins beeinflusst haben könnten. Insgesamt lässt sich feststellen, dass IL-6 als Marker für akute Entzündungsprozesse geeignet ist, für die Diagnostik von subklinischen Endometritiden jedoch nicht in Betracht gezogen werden kann.

Im Verlauf des Puerperiums der fünf Erstkalbinnen konnten signifikante Expressions-Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten festgestellt werden. Verglichen mit dem 31. Tag post partum wurde IL-6 am 17. Tag signifikant höher expremiert. Dieses Ergebnis kann im Zusammenhang mit der Haptoglobin mRNA-Expression diskutiert werden. Es besteht insofern eine Verbindung zwischen beiden Entzündungsmediatoren, da IL-6 die Bildung der Akute Phase Proteine induziert (Sheldon et al., 2001; Saadeddin et al., 2002). So konnte eine signifikante Korrelation zwischen IL-6 und Haptoglobin nachgewiesen werden, da beide in der vorliegenden Arbeit ein ähnliches Expressions-Muster aufwiesen. Im Zusammenhang mit Endometritiden konnten keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Somit stellt sich die Frage, warum beide Entzündungsmediatoren im

Puerperium am 10. und 17. Tag deutlich erhöht expremiert wurden. Möglicherweise kann die Expression zu diesem Zeitpunkt auf Gewebeschäden des Endometriums zurückgeführt werden, da die Karunkeln nekrotisieren und sich lösen (Sheldon, 2004). Da Haptoglobin als Antwort auf traumatische Prozesse sezerniert wird (Petersen et al., 2004), könnte IL-6 indirekt durch die Induktion des Akute Phase Proteins an der Wundheilung beteiligt sein. Zusätzlich konnte bei Affen nach einer IL-6-Injektion die Hochregulierung zahlreicher Faktoren des Gerinnungssystems beobachtet werden, die die Wundheilung fördern (Mestries et al., 1994). Im Sexualzyklus konnte eine mRNA-Expression des Interleukins in allen Zyklusphasen detektiert werden, doch ohne signifikante Expressions-Unterschiede. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten Leung et al. (2000) weder im zyklischen noch im trächtigen bovinen Uterus eine IL-6-Expression feststellen. Dies könnte sich auf die methodische Vorgehensweise zurückführen lassen, da nicht nur Endometriumszellen, sondern Gewebestücke bestehend aus allen Schichten des Uterus untersucht worden waren. Zudem ist die Real-time PCR möglicherweise eine sensitivere Methode zur Untersuchung der Gen-Expression als die in der zitierten Arbeit angewendete konventionelle PCR. Beim Menschen konnte IL-6 in vitro in endometrialen Epithelzellen nachgewiesen werden. Das Interleukin wurde mittels ELISA in der Proliferations- und Sekretionsphase detektiert (Perrier d'Hauterive et al., 2005). Im Endometrium der Sau wurde eine konstante IL-6 mRNA-Expression während des Sexualzyklus beobachtet. Zusätzlich wurde das Interleukin am Tag 11 der Trächtigkeit nachgewiesen (Anegon et al., 1994). In der Literatur wird IL-6 als wichtiger Mediator hinsichtlich der Implantation diskutiert (Rahman et al., 2004; Dimitriadis et al., 2005). Bei Mensch und Maus konnte in endometrialen Epithelzellen eine durch Spermien ausgelöste Hochregulierung des Interleukins beobachtet werden (Robertson, 2005). Es wurde vermutet, dass IL-6 am Wachstum und der Differenzierung der Blastozyste sowie der Ausbildung einer maternalen Immuntoleranz beteiligt ist. Somit ist das Interleukin möglicherweise in die Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation des Embryos involviert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IL-6 physiologisch im Sexualzyklus sowie im Puerperium expremiert wird. Zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden ist es nach den vorliegenden Ergebnissen aber ungeeignet.

6.2.6 Interleukin 8 (IL-8)

Mit Hilfe der Real-time PCR konnte eine IL-8 mRNA-Expression im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis nachgewiesen werden. Es bestanden signifikante Expressions-Unterschiede zwischen der Gruppe der gesunden und der klinisch erkrankten Tiere. Zwischen der Gruppe der gesunden und der Gruppe der subklinisch erkrankten Tiere bestanden zwar numerische Unterschiede, die sich statistisch aber nicht absichern ließen ($p = 0,052$). In der Literatur wird die IL-8-Expression im Zusammenhang mit verschiedenen Infektionskrankheiten diskutiert. So konnte im Rahmen von Mastitiden eine erhöhte IL-8-Konzentration in den Zellen der Milch bei Kühen detektiert werden, die experimentell mit *Escherichia coli* infiziert wurden (Bannerman et al., 2004). Weiterhin wurde eine Hochregulierung des Interleukins im Darm von Kälbern beobachtet, die experimentell mit *Salmonella typhimurium* infiziert wurden (Santos et al., 2002). Rudack et al. (2004) wiesen bei an Tonsillitis erkrankten Patienten eine hohe IL-8-Expression im Gewebe nach. Insgesamt kann das Interleukin als sensitives Marker-Gen hinsichtlich entzündlicher Prozesse betrachtet werden. Dass die mRNA-Expression zwischen gesunden und subklinisch erkrankten Kühen keine signifikanten Unterschiede aufwies, lässt sich möglicherweise auf die geringe Tierzahl ($n=9$) zurückführen.

Im Verlauf des Puerperiums wurde IL-8 im Endometrium der Erstkalbinnen vor allem am Tag 17 nach der Kalbung expremiert. Die erhöhte Immunantwort zu diesem Zeitpunkt könnte als physiologischer Selbstreinigungsprozess des Uterus verstanden werden (Lewis, 1997; Bondurant, 1999). Dieses Ergebnis korreliert mit dem PMN-Gehalt der Erstkalbinnen, da alle Tiere am 17. Tag post partum einen Anteil an neutrophilen Granulozyten von über 5% aufwiesen. Ab dem 24. Tag post partum konnte das Interleukin bei vier Tieren nicht mehr detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die entzündlichen Prozesse zu diesem Zeitpunkt abgeklungen waren. Dieses Ergebnis deckt sich mit der adspektorischen sowie vaginoskopischen Untersuchung der Erstkalbinnen, da am 31. Tag post partum erstmalig bei allen Tieren kein eitriger vaginaler Ausfluss mehr festgestellt werden konnte.

Die auf dem Schlachthof erhobenen Daten belegen ebenfalls, dass IL-8 physiologisch im bovinen Reproduktionstrakt von Bedeutung sein könnte. Im Sexualzyklus konnte das Interleukin vorwiegend zum Zeitpunkt um die Ovulation detektiert werden. In der frühen und späten Lutealphase wurde IL-8 von der überwiegenden Anzahl der Tiere nicht expremiert.

Das Ergebnis lässt sich im Zusammenhang mit der bGCP-2-Expression im Endometrium diskutieren, da IL-8 ebenso wie bGCP-2 an der Rekrutierung von PMN beteiligt ist (Hoch et al., 1996). Die Einwanderung von PMN in das Endometrium vor und nach der Ovulation wird als physiologisch gewertet (Butt et al., 1991; Cobb und Watson, 1995; Klucinski et al., 1995) und kann als zellulärer Abwehrmechanismus gegen potentiell durch die geöffnete Zervix eindringende Erreger verstanden werden. Ein weiterer Erklärungsansatz stützt sich auf die in dieser Zyklusphase ablaufenden strukturellen Veränderungen des Endometriums. IL-8 wurde ebenso wie im humanen Endometrium (Arici et al., 1998b) vorwiegend in der Proliferationsphase exprimiert. Das Interleukin könnte in dieser Zyklusphase die Zellproliferation sowie die Angiogenese stimulieren (Arici et al., 1998a; Mukaida et al., 1998). Zudem wird diskutiert, dass IL-8 bei der Implantation des Embryos von Bedeutung ist. In vitro konnte bei Menschen und Mäusen nachgewiesen werden, dass Spermien die IL-8-Expression in endometrialen Epithelzellen stimulieren (Robertson, 2005). Es wurde vermutet, dass IL-8 über die Rekrutierung von T-Lymphozyten an der Ausbildung der maternalen Immuntoleranz beteiligt ist.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass IL-8 potentiell zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden geeignet ist. Dazu muss beachtet werden, dass IL-8 physiologisch im Puerperium sowie in den einzelnen Phasen des Sexualzyklus exprimiert wird. Eine Untersuchung der Tiere am 24. Tag nach der Kalbung unter Berücksichtigung der Zyklusphase erscheint für diesen Faktor sinnvoll.

6.2.7 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α)

TNF α wird im Zusammenhang mit verschiedenen bakteriell bedingten Infektionen diskutiert. Bei Kühen, deren Euter experimentell mit *Escherichia coli* infiziert wurde, konnten erhöhte TNF α -Konzentrationen in den Zellen der Milch nachgewiesen werden (Bannerman et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Ergebnisse im Zusammenhang mit Endometritiden erzielt. Anhand der Daten vom Milcherzeugerbetrieb konnte eine TNF α mRNA-Expression im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis nachgewiesen werden. Der Expressions-Unterschied zwischen der Gruppe der gesunden Tiere und der Gruppe der subklinisch und klinisch erkrankten Tiere war signifikant. Da Endometritiden neben grampositiven Bakterien auch mit gramnegativen

Erregern wie *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* und *Prevotella ssp.* assoziiert sind (Dohmen, 1995; Dhaliwal et al., 2001; Sheldon, 2004; Sheldon und Dobson, 2004), könnten Lipopolysaccharide für die erhöhte TNF α -Expression verantwortlich sein (Henderson und Wilson, 1996).

Im Verlauf des Puerperiums der fünf Erstkalbinnen wurde TNF α vorwiegend am 17. Tag post partum expremiert. Die erhöhte Immunantwort zu diesem Zeitpunkt kann im Einklang mit den übrigen Entzündungsmediatoren als Teil des physiologischen Selbstreinigungsprozesses des Uterus verstanden werden (siehe Kapitel 6.2.1) (Lewis, 1997; Bondurant, 1999; Sheldon, 2004; Sheldon und Dobson, 2004). Eine Woche später expremierten die Tiere das Zytokin nur noch in geringer Konzentration. Dies deutet darauf hin, dass die entzündlichen Prozesse zu diesem Zeitpunkt bereits abgeklungen waren. Ein Tier wies am 24. Tag post partum eine höhere TNF α mRNA-Expression auf als die übrigen Tiere. Diese Erstkalbin expremierte die Interleukine 1 β und 8 sowie Haptoglobin ebenfalls zu diesem Untersuchungszeitpunkt in höherer Konzentration. Hier könnte insofern ein Zusammenhang bestehen, da TNF α die Synthese von IL-1 β , IL-8 sowie Haptoglobin stimuliert (Jawa et al., 1999; Sheldon et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten signifikante Korrelationen zwischen TNF α und IL-1 β sowie IL-8 festgestellt werden.

Die auf dem Schlachthof erhobenen Daten belegen, dass TNF α physiologisch im bovinen Endometrium von Bedeutung ist. Eine mRNA-Expression des Zytokins konnte in allen Phasen des Sexualzyklus nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Mensch und Maus (Hunt, 1993; Roby und Hunt, 1994; Hunt et al., 1996) konnten jedoch keine Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Zyklusphase festgestellt werden. Im humanen Endometrium wurde das Zytokin in Epithel- und Stromazellen nachgewiesen. Im Verlauf des Sexualzyklus konnte mittels Northern Blot ein biphasisches Expressionsmuster beobachtet werden. Die TNF α mRNA-Expression war in der Proliferationsphase erhöht, nahm in der frühen Sekretionsphase ab und stieg in der mittleren bis späten Sekretionsphase erneut an (Hunt, 1993; Terranova et al., 1995). Dieses abweichende Ergebnis im Vergleich zur TNF α -Expression im bovinen Zyklus lässt sich möglicherweise auf speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich der Funktion des Zytokins zurückführen. Die konstante mRNA-Expression im Endometrium des Rindes könnte damit erklärt werden, dass TNF α in der Lutealphase an der Aufrechterhaltung des Gelbkörpers (Murakami et al., 2001) und in der Follikelphase an der Luteolyse beteiligt ist (Miyamoto et al., 2000).

Insgesamt scheint sich TNF α als Marker-Gen für subklinische Endometritiden zu eignen. Es muss berücksichtigt werden, dass TNF α 17 Tage post partum physiologisch erhöht expremiert wird, so dass eine Untersuchung der Gen-Expression ab dem 24. Tag nach der Kalbung sinnvoll erscheint, um subklinische Vorgänge zu charakterisieren.

6.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Cytobrush[®]-Methode eine zuverlässige Möglichkeit darstellt, um ausreichend Zellmaterial für die Untersuchung der mRNA-Expression mittels Real-time PCR zu gewinnen. Die Konservierung der zellulären RNA in RNAlater[®] war leicht und schnell durchführbar und eignete sich gut für die Probengewinnung auf dem Milchviehbetrieb. So konnte bei den untersuchten Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden, dass es von untergeordneter Bedeutung ist, ob das Zellmaterial vom ipsilateralen, contralateralen Horn oder Corpus entnommen wird. Damit vereinfacht sich die Gewinnung von Endometriumszellen am lebenden Tier erheblich.

Spezifische Nachweisverfahren für bGCP-2, COX-1/-2, Haptoglobin, IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α mRNAs wurden als quantitatives RT-PCR-System entwickelt und für das bovine Endometrium validiert. Die mRNA-Expression der untersuchten Entzündungsmediatoren konnte im bovinen Endometrium im Sexualzyklus und im Verlauf des Puerperiums erfolgreich nachgewiesen werden. Ebenso erfolgte ein Nachweis der Mediatoren im Endometrium von gesunden Kühen sowie Kühen mit subklinischer und klinischer Endometritis. Verglichen mit gesunden Tieren, wurden bGCP-2, IL-1 β , TNF α und potentiell auch IL-8 im Endometrium von subklinisch erkrankten Milchkühen signifikant höher expremiert. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bGCP-2, IL-1 β und IL-8 zyklisch reguliert werden. Eine erhöhte Expression wurde zum Zeitpunkt um die Ovulation festgestellt. Zudem wurden sie am 17. und 24. Tag nach der Kalbung physiologisch erhöht expremiert.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass sich die in der vorliegenden Arbeit verwendete quantitative RT-PCR Methode für die Diagnostik von subklinischen Endometritiden eignet. Unter Beachtung der Zyklusphase sollte eine Untersuchung der Gen-Expression etwa ab dem 24. Tag post partum erfolgen.

Eine weitergehende Untersuchung der Expression von Entzündungsmediatoren könnte neben der Diagnostik neue therapeutische Ansätze für die Behandlung von subklinischen

Endometritiden erschließen. So wäre eine Therapie mit anti-inflammatorischen Substanzen zukünftig vorstellbar. In dieser Hinsicht ist weiterer Forschungsbedarf zu erkennen, um Subfertilitäten erfolgreicher behandeln zu können.