

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen des Auf- und Abbaus von Blutgefäßen während der Anbildung, Blüte und Rückbildung des bovinen Gelbkörpers.

Die kontrollierte Blutgefäßneu- und Rückbildung ist essentieller Bestandteil zyklischer Prozesse im Ovar. Eine Imbalance der Regulationsmechanismen kann zahlreiche Störungen und Erkrankungen der weiblichen Reproduktionsorgane wie z.B. polyzystisches Ovarialsyndrom, Follikelatresie, Anovulation und ovarielle Tumore bedingen.

Durch Anwendung verschiedener Methoden wurde der formale Ablauf der Blutgefäßneu- und Rückbildung unter Berücksichtigung des angiogenen Faktors VEGF einschließlich seines Rezeptors Flk-1/KDR und des gefäßdestabilisierenden Faktors Ang-2 untersucht.

Im Verlauf des dreiwöchigen Zyklus reift ein Follikel heran. Im Anschluss an die Ovulation kommt es unter Beteiligung endothelialer Metalloproteinasen zur Degradation der Basalmembran zwischen dem Follikelepithel und der Granulosazellschicht. Durch die durchlässig gewordene Basalmembran gelangen Gefäße in die vormals avaskuläre Granulosazellschicht. Die Migration und Proliferation von Endothelzellen wird von VEGF, einem von Makrophagen, Luteinzellen, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen freigesetzten Mitogen stimuliert (FRASER et al., 2000; SUGINO et al., 2000; DENSCHLAG und KECK, 2002). Mit den einsprossenden Gefäßen gelangen Zellen der Theca folliculi und der Granulosazellschicht in den sich anbildenden Gelbkörper. Zellen der Theca folliculi und der Granulosazellschicht luteinisieren zu Theca- und Granulosaluteinzellen.

Unter dem hormonellen Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ wird der Gelbkörper allmählich zurückgebildet (AROSH et al., 2004). $\text{PGF}_{2\alpha}$ initiiert den apoptotischen Zelluntergang von lutealen Endothelzellen sowie Theca- und Granulosaluteinzellen indem es unter anderem die Freisetzung des Ang-2 stimuliert. Ang-2 leitet die Gefäßregression ein, indem er zur Ablösung von Endothelzellen von der unterlagerten Matrix führt. Ang-2 hemmt außerdem die Sekretion von Progesteron und somit auch die durch das Luteotropin induzierte Expression apoptosehemmender Proteine wie z. B. Bcl-2 (MURDOCH et al., 1998). Gegen Ende des Zyklus ist der Gelbkörper nur noch halb so groß wie der ursprüngliche Blütegelbkörper und wird im Verlauf der sich anschließenden Zyklen weiter zurückgebildet.

5.1 Charakterisierung zyklischer Angiogenese und vaskulärer Regression

Anhand des größten Durchmessers der Querschnittsfläche in cm nach MODLICH (1997) eingeteilt, wurden ein Corpus hämorrhagicum, zwei Corpora rubra, 22 Blütegelbkörper, 11 frühe und fünf späte Regressionsgelbkörper sowie 17 frühe und 19 späte Residualgelbkörper untersucht.

Die geringe Anzahl untersuchter Corpora hämorrhagica und Corpora rubra ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass Kühe unmittelbar nach der Ovulation nur geschlachtet werden, wenn z.B. der Landwirt Anzeichen der Brunst übersieht.

5.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchung des Corpus luteum

5.1.1.1 Corpus hämorrhagicum

Die lichtmikroskopische Untersuchung des Corpus hämorrhagicum zeigte erstmals, dass sich der frühe Anbildungsgelbkörper in drei Zonen gliedert. Das Zentrum des sich anbildenden Gelbkörpers (Zone 1) besteht aus Erythrozyten und Fibrin. Die sich nach außen anschließende Zone 2 ist durch Makrophagen, Erythrozyten und Bindegewebe charakterisiert. In der peripheren Zone 3 bestimmen Luteinzellen, Kapillaren und Arteriolen das Bild. Wie in Untersuchungen von BAUER et al. (2003) waren vereinzelt Arteriolen mit zwei bis vier Lagen glatter Muskelzellen zu sehen.

Die im Corpus hämorrhagicum insbesondere in Zone 2 auftretenden VEGF-positiven Makrophagen stimulieren durch die Freisetzung von VEGF die Migration und Proliferation von Endothelzellen während der frühen lutealen Angiogenese (TAKAYA et al., 1997). VEGF verringert außerdem die Apoptoserate lutealer Endothelzellen und reduziert die Anzahl aktivierter Caspasen-3 während der Gelbkörperanbildung.

Die auch in Untersuchungen von MODLICH (1997) und REIBIGER und SPANEL-BOROWSKI (2000) in unmittelbarer Gefäßnähe beschriebenen eosinophilen Granulozyten setzen Substanzen frei, die die Membran schädigen und tragen so zur Degradation der Basalmembran als eine wichtige Voraussetzung für die luteale Angiogenese bei.

5.1.1.2 Corpus rubrum

Gegenüber den Untersuchungen von MODLICH (1997), die das Corpus rubrum durch blutgefüllte kavernenartige Blutgefäße und zahlreiche, die Luteinzellen umgebende Kapillaren charakterisiert, war das Corpus rubrum in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit außerdem durch Makrophagen mit phagozytierten Blutbestandteilen, Fremdkörperriesenzellen und eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet. Die ergänzende

deutlichere Darstellung von Immunzellen wurde durch die spezielle Färbemethode nach Ladewig ermöglicht.

5.1.1.3 Blütegelbkörper

Wie in den Untersuchungen von MODLICH (1997), zeichnet sich der Blütegelbkörper in den makroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit durch eine gelbe Farbe aus. Die zentrale Blutung ist vollständig organisiert. Die Luteinzellen stehen fast alle in direktem Kontakt zu Gefäßen. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten darüber hinaus wie die Untersuchungen von GOEDE et al. (1998), dass jede Luteinzelle von zwei bis vier Kapillaren umgeben ist. Gegen Ende der frühen lutealen Angiogenese durchzieht ein weitmaschiges Kapillarnetz mit einer durchschnittlichen interkapillären Distanz von 100 µm den Blütegelbkörper. Die maximale Gefäßdichte wird um den neunten Tag erreicht, wobei die Maschenweite des Kapillarnetzes mit 40-60 µm der Größe der Luteinzellen entspricht.

Gegenüber den Untersuchungen von MODLICH (1997), die apoptotische Luteinzellen im späten Blütegelbkörper nur mittels *In-situ*-Markierung nukleosomaler DNA-Fragmente darstellen konnte, waren in den lichtmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit vereinzelt Luteinzellen und Endothelzellen mit morphologischen Charakteristika der Apoptose wie z.B. Kernpyknose und Kernwandhyperchromatose zu sehen. Die Tatsache, dass MODLICH (1997) keine lichtmikroskopische Darstellung von apoptotischen Lutein- und Endothelzellen gelang, liegt möglicherweise an dem nur vereinzelt Auftreten apoptotischer Zellen und dem in ihren Untersuchungen geringeren Stichprobenumfang.

5.1.1.4 Früher und später Regressionsgelbkörper

Wie auch die Untersuchungen von MODLICH (1997) zeigten, sind der frühe und späte Regressionsgelbkörper durch beginnende vakuolige Auflösung der Luteinzellen und Gefäßen mit arteriolärem Aussehen charakterisiert. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren außerdem apoptotische Luteinzellen, eosinophile Granulozyten und Makrophagen zu sehen. Eosinophile Granulozyten setzen zytotoxische Substanzen frei und Makrophagen phagozytieren die infolge apoptotischen oder zytotoxischen Zelltodes zugrunde gegangene Zellen.

5.1.1.5 Früher und später Residualgelbkörper

MODLICH (1997) beschrieb in ihren Untersuchungen, dass der frühe und späte Residualgelbkörper aus eng zusammengedrängten Gefäßen bestehen, zwischen denen sich Bindegewebe befindet. Auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde ein Anstieg der Anzahl dickwandiger Arteriolen festgestellt. Aus arteriolären Gefäßen des sich entwickelnden Gelbkörpers, deren Gefäßwände aus einer Lage glatter Muskelzellen bestehen, entwickeln sich im weiteren Verlauf durch Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen arterioläre Gefäße mit Gefäßwänden, die aus mehreren Lagen glatter Muskelzellen bestehen (BAUER et al., 2003). Wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und die Untersuchungen von WUTTKE et al. (1997) außerdem zeigten, kommt es zur massiven Einwanderung von Makrophagen in das sich zurückbildende Corpus luteum, die TNF α freisetzen. TNF α vermittelt bei Bindung an den TNF-Rezeptor ein apoptotisches Signal auf Endothel- und Luteinzellen im Corpus luteum (Friedman et al., 2000) und initiiert die Caspasenkaskade, die zu dem morphologischen Bild der Apoptose führt.

5.1.2 Lichtmikroskopische Untersuchung des Corpus albicans

Bislang durchgeführte Untersuchungen des Corpus albicans beschränken sich weitgehend auf humane Corpora albicantia aus dem Zeitraum des Klimakteriums (MORALES et al., 2000; MOTTA et al., 2002). MORALES et al. (2000) und MOTTA et al. (2002) fanden, dass humane Corpora albicantia nur wenige Zellen aufweisen. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass zyklisch auftretende bovine Corpora albicantia in zwei Zonen eingeteilt werden können, einer äußeren Zone bestehend aus dichten Bindegewebssträngen mit Fibrozyten und Fibroblasten, die in den früheren Stadien des Corpus albicans weniger Gefäße enthält als in den späteren Stadien und einer inneren Zone aus Bindegewebe, Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Fibrozyten.

5.2 Quantifizierung der Gefäßdichte

Als Marker für die Darstellung von Gefäßendothelien zur Quantifizierung der Gefäßdichte im Corpus luteum in Anbildung, Blüte und Rückbildung wurde Bandeiraea simplicifolia Agglutinin I verwendet. Lektine ermöglichen eine umfassende Darstellung von Gefäßsystemen in verschiedenen Organen und Spezies (JILANI et al., 2003). Darüber hinaus werden sie zur Bestimmung von Regionen mit erhöhter Permeabilität (DEBBAGE et al., 2001) und zur Isolierung von Endothelzellen eingesetzt (KADER et al., 2001; PLENDL et al., 2002).

5.2.1 Quantifizierung der Gefäßdichte im Corpus luteum

Untersuchungen von LEI et al. (1991) ergaben eine stetige Verringerung der Kapillaranzahl im Verlauf der Gelbkörperrückbildung infolge apoptotischen Zelluntergangs (KNICKERBOCKER et al., 1988; GAYTAN et al., 1998).

MODLICH (1997) beobachtete demgegenüber in den späteren Stadien der Gelbkörperrückbildung (Stadien 5-7) einen geringfügigen Anstieg der Gefäßdichte, ohne dass sie zwischen Kapillaren und Arteriolen differenzierte. Den Anstieg der Gefäßdichte führte sie zum einen auf das lichtmikroskopisch festgestellte vermehrte Auftreten von Arteriolen und auf das infolge einer schnellen Gewebedissoziation engere Zusammenrücken von Blutgefäßen zurück.

Diese These konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da mit der Verringerung des Gelbkörpervolumens deutlich mehr Endothelzellen als Luteinzellen apoptotisch zugrunde gehen. Vielmehr konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nach einer Reduktion der Kapillaranzahl von 880 pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche im Blütegelbkörper auf 178 im späten Regressionsgelbkörper im frühen Residualgelbkörper ein signifikanter Anstieg der Kapillarenanzahl auf 359 pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche festgestellt werden.

In diesem Zusammenhang wurde insbesondere im frühen Residualgelbkörper eine deutliche Vergrößerung der Anzahl VEGF-positiver Zellen beobachtet. Es ist anzunehmen, dass die erneute Angiogenesewelle im frühen Residualgelbkörper nicht nur den Abbau des alten Gelbkörpers fördert, sondern auch am Aufbau des neuen Gelbkörpers des nachfolgenden Zyklus beteiligt ist (Abb.82).

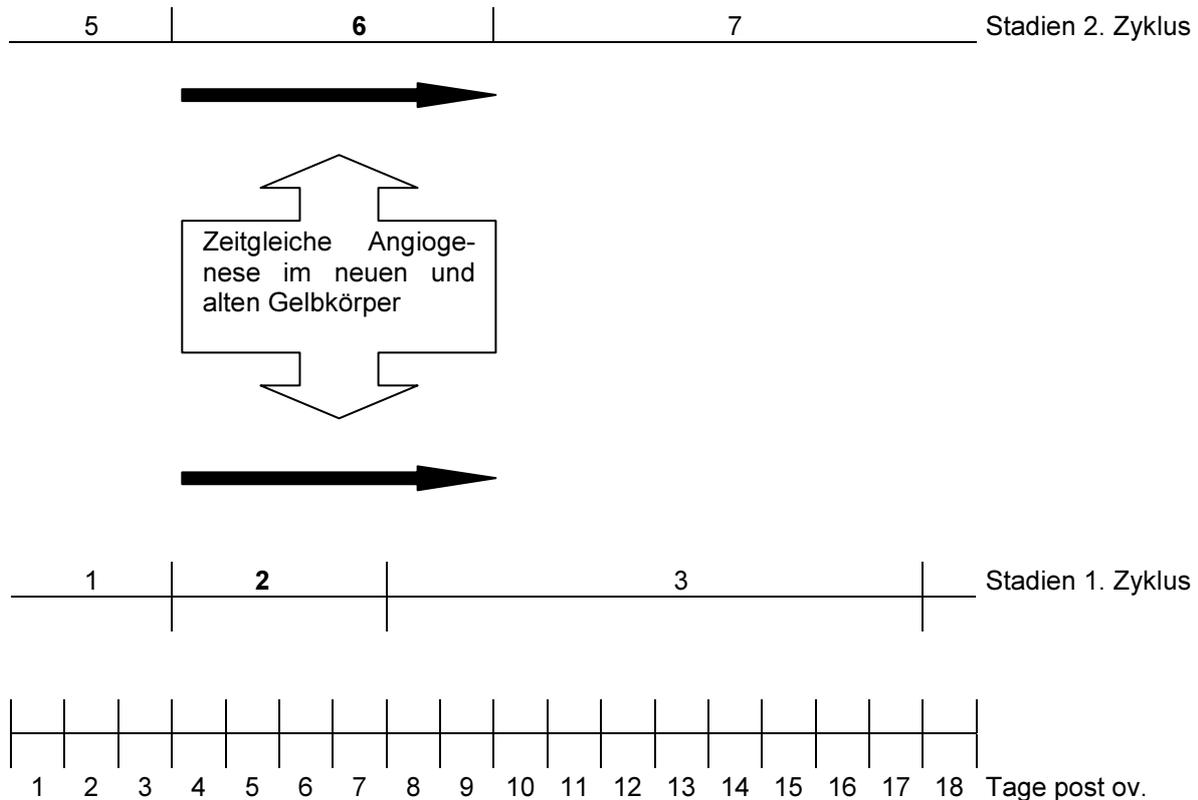


Abb. 82: Zeitgleicher Auf- und Abbau verschiedener Gelbkörperstadien

In den Stadien 1-3 traten so wenige Arteriolen auf, so dass sie nicht mit dem Messprogramm erfasst wurden. Wie auch Untersuchungen von MODLICH (1997) und BAUER et al. (2003) zeigten, steigt die Anzahl arteriolärer Gefäße im Verlauf der Luteolyse.

Zu Beginn der Luteolyse wurde der niedrigste Median gemessen. Im späten Regressionsgelbkörper und frühem Residualgelbkörper stieg die Anzahl der arteriolären Gefäße auf 292 bzw. 354 pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche. Es ist anzunehmen, dass die gesteigerte Anzahl von Arteriolen auf die intensive Proliferation von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen während der Regression zurück geht (MODLICH et al., 1996). Demgegenüber fanden BAUER et al. (2003) proliferierende glatte Muskelzellen nur im Anbildungsgelbkörper. BAUER et al. (2003) postulierten, dass eine Proliferation von glatten Muskelzellen nur auftreten kann, wenn von Endothelzellen freigesetzte mitogene Faktoren vorhanden sind, die sowohl das Wachstum und die Chemotaxis vermitteln. In diesem Zusammenhang konnten in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit im

Rückbildungsgelbkörper VEGF-positive Endothelzellen dargestellt werden. Die Anzahl VEGF-positiver Endothelzellen im frühen Regressionsgelbkörper war doppelt so groß wie im Corpus luteum in Blüte. In Stadium 6 wurde mit Abstand die größte Anzahl mit anti-VEGF markierter Endothelzellen gezählt. Der Anstieg VEGF-positiver Endothelzellen ist Zeichen der erneuten Angiogenesewelle im frühen Residualgelbkörper.

Die Untersuchung des Merkmals „Lumenfläche von Kapillaren in μm^2 “ ergab eine Vergrößerung der kapillären Lumenfläche insbesondere im frühen Residualgelbkörper. Die beobachtete Erweiterung der Kapillarlumina ist möglicherweise auf eine akute Änderung der Funktion intralutealer Kapillaren zurückzuführen mit der ein erneuter Anstieg des Blutflusses verbunden ist, wie von ACOSTA et al. (2003) im Rahmen der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Luteolyse beobachtet. Die Verringerung der Lumenfläche arteriolärer Gefäße geht möglicherweise auf die im Verlauf der Luteolyse festzustellende, schrittweise Kontraktion der Gefäße zurück.

Der prozentuale Flächenanteil der Gefäßlumina beträgt gegenüber dem prozentualen Flächenanteil der kapillären Lumina im Ausbildungs- und Blütegelbkörper mit 12 und 7,6% im frühen Regressionsgelbkörper lediglich 1,5%. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf einen Sauerstoffmangel, der als ein möglicher Auslöser der erneuten Angiogenesewelle insbesondere im frühen Residualgelbkörper angesehen werden kann. Im frühen Residualgelbkörper stieg der prozentuale Flächenanteil der Gefäßlumina auf 5,7%.

Besonders kurze interkapilläre Distanzen von 21 μm wurden im Corpus hämorrhagicum, Corpus rubrum und Corpus luteum in Blüte gemessen. Die kurzen Diffusionstrecken gewährleisten eine optimale Versorgung der hormonproduzierenden Luteinzellen (REYNOLDS et al., 1999). Mit einer Vergrößerung des Kapillarabstandes in den folgenden Stadien sinkt die Nähr- und Sauerstoffversorgung der Zellen. Als Reaktion auf die Sauerstoffunterversorgung exprimieren die Zellen vermehrt VEGF, wie der Anstieg der Anzahl VEGF-positiver Zellen insbesondere im frühen Residualgelbkörper belegen. Mit dem infolgedessen zu beobachtenden Anstieg der Kapillaranzahl im frühen Residualgelbkörper verringert sich der Kapillarabstand auf 18 μm im späten Residualgelbkörper.

5.2.2 Quantifizierung der Gefäßdichte im Corpus albicans

In der Innenzone des Corpus albicans steigt die Anzahl der Kapillaren zunächst von 644 auf 782 pro mm^2 . In den folgenden Stadien ist eine Reduktion der Kapillarenanzahl auf 563 bzw. 578 pro mm^2 zu beobachten. In der Außenzone ist innerhalb der ersten beiden Stadien gleichfalls eine Verringerung der Kapillarenanzahl von 675 auf 491 Kapillaren zu beobachten. Im Gegensatz dazu vergrößert sich die Anzahl der Kapillaren in den

nachfolgenden Stadien auf 682 bzw. 882 pro mm². Ein ähnliches Verhalten zeigt der prozentuale Flächenanteil. In der Innenzone vergrößert sich der prozentuale Flächenanteil der Gefäßlumina zunächst von 4,8 auf 5,66%. Im weiteren Verlauf sinken die Werte auf 5,02 bzw. 3,74%. In der Außenzone hingegen ist in den späteren Stadien ein Anstieg des prozentualen Flächenanteils der Gefäßlumina festzustellen. Diese Ergebnisse, insbesondere der erneute Anstieg der Kapillarenanzahl und des prozentualen Flächenanteils der Gefäßlumina, zeigen erstmals, dass das Corpus albicans von außen nach innen organisiert wird. Die in etwa auf dem gleichen Niveau liegenden Werte des prozentualen Flächenanteils der Gefäßlumina im Corpus albicans und die große Spannweite der Messergebnisse sprechen für einen sehr langsamen Umbau des Corpus albicans. Weiterhin deutet die große Anzahl restlicher Bindegewebsstrukturen im Ovarquerschnitt auf einen langsamen Abbau über mehrere Zyklen hin.

5.3 Nachweis von Apoptosen

Zur Quantifizierung apoptotischer Endothel- und Luteinzellen im Corpus luteum wurde der von GAVRIELI et al. (1992) vorgestellte TUNEL-Test angewandt. Zu den biochemischen Charakteristika der Apoptose gehört die Spaltung der DNA in 180 Basenpaare große Fragmente (KERR, 1972). Der TUNEL-Test ermöglicht die Detektion dieser DNA-Fragmente. Der Nachweis von DNA-Fragmenten wird allgemein zur Identifikation des apoptotischen Zelltodes und Abgrenzung gegenüber der Nekrose genutzt.

5.3.1 Semiquantifizierung von Apoptosen im Corpus luteum

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fanden sich bereits während der Anbildung und Blüte des Gelbkörpers 23 bzw. 29 apoptotische Endothelzellen pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche. Diese Beobachtung ist auf den erhöhten Zellumsatz während der lutealen Angiogenese im Verlauf des Gelbkörperwachstums zurückzuführen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von MODLICH (1997), die im späten Regressionsgelbkörper kaum apoptotische Endothelzellen nachweisen konnte, erreichte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Anzahl Apoptose-positiver Endothelzellen im späten Regressionsgelbkörper ihr Maximum. Dies ist wahrscheinlich eine Reaktion auf das einströmende PGF_{2α}, das die Expression von MCP-1-mRNA in lutealen Endothelzellen stimuliert (PENNY et al., 1998). MCP-1 initiiert die Einwanderung TNF α freisetzender Makrophagen im sich zurückbildenden Gelbkörper (WUTTKE et al., 1997). Endothelzellen

exprimieren TNF-R1 (FRIEDMAN et al., 2000), der durch Bindung von TNF α aktiviert wird. TNF-R1 bindet TRADD (TNFR interacting Death Domain) und rekrutiert dann mittels dieser Domäne FADD und FLICE/Procaspase-8 (HSU et al., 1995). FLICE/Procaspase-8 wird in die aktive Caspase 8 überführt (EARNSHAW et al., 1999), die die Caspasekaskade durch proteolytische Spaltung weiterer Caspasen initiiert. Am Ende der Caspasekaskade stehen aktivierte intrazelluläre Proteine, die zum morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose führen (LAZEBNIK et al., 1994; NICHOLSON et al., 1995; ENARI et al., 1995).

Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Anzahl apoptotischer Endothelzellen im späten Regressionsgelbkörper gehen möglicherweise auf die insgesamt vergleichsweise geringe Anzahl Apoptose-positiver Zellen und den geringeren Stichprobenumfang anderer Untersuchungen zurück.

Im Zuge des verlangsamten Umbaus verringerte sich im frühen und späten Residualgelbkörper die Apoptoserate.

Apoptotische Luteinzellen traten in Verbindung mit einem erhöhten Zellumsatz bereits im Corpus luteum in Blüte auf. Vergleichbar den Ergebnissen bei der Semiquantifizierung apoptotischer Endothelzellen stieg im frühen und späten Regressionsgelbkörper die Anzahl Apoptose-positiver Luteinzellen.

Zu Beginn der Luteolyse einströmendes PGF_{2 α} erhöht die Kalziumkonzentration in den Mitochondrien der Luteinzellen. Cytochrom C wird freigesetzt und stimuliert die Caspasekaskade (SLEE et al., 1999).

Aufgrund der langsameren Rückbildung gegen Ende der Luteolyse sank im frühen und späten Residualgelbkörper die Anzahl apoptotischer Luteinzellen auf 3,5 bzw. 4 apoptotische Luteinzellen.

Den engen Zusammenhang zwischen dem apoptotischen Untergang der lutealen Endothelzellen und der Apoptose von Luteinzellen belegt die Untersuchung der Korrelation zwischen apoptotischen Endothel- und Luteinzellen. Zwischen der Anzahl apoptotischer Endothelzellen pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche und der Anzahl apoptotischer Luteinzellen pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche existiert eine mittlere positive Korrelation. Die zugrunde gegangene endotheliale Zellpopulation und die damit einhergehende Rückbildung von Blutgefäßen führt zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Der Sauerstoff- und Nährstoffmangel ist ein Auslöser der Apoptose von Luteinzellen.

5.3.2 Semiquantifizierung von Apoptosen im Corpus albicans

Die Quantifizierung apoptotischer Zellen ergab in der Innenzone eine stetige Verringerung der Anzahl Apoptose-positiver Zellen, des prozentualen Flächenanteils sowie der Fläche apoptotischer Zellen. In der Außenzone konnte jeweils in Stadium 10 ein Anstieg verzeichnet werden. Diese Ergebnisse stützen die These, dass das Corpus albicans von außen nach innen organisiert wird. MORALES et al. (2000) beschreiben, dass die nicht mittels Apoptose eliminierten Zellen degenerative Veränderungen wie z.B. Zytoplasmavakuolisierung, Akkumulation von Lipofuszinpigmenten und Expression des Lysosom-assoziierten Antigens CD 68 zeigen.

5.4 Immunolokalisation von VEGF, VEGF-R2 und Ang-2 im Corpus luteum

Die immunhistochemische Darstellung von VEGF, VEGF-R2 und Ang-2 in verschiedenen Stadien des Corpus luteum erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Methode. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Proteins Avidin, Biotinmoleküle binden zu können. Gegenüber direkten und indirekten Methoden besitzt diese Technik aufgrund der hohen Affinität des Avidins zum Biotin eine höhere Empfindlichkeit. Auch auf fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material können ausgezeichnete Ergebnisse erzielt werden (BOENISCH, 1989). Aufgrund der hohen Spezifität der negativen und positiven Kontrollen war die Quantifizierung mit anti-VEGF, anti-VEGF-R2 und anti-Ang-2 markierten Zellen sinnvoll. Um auch die Aktivität der mittels Antikörper markierten Zellen erfassen zu können, wurde ein Score entwickelt. Der Score berechnet sich wie folgt: Die Anzahl stark gefärbter Zellen wurde mit dem Faktor 2, die Anzahl mittel gefärbter Zellen mit dem Faktor 1 und die Anzahl schwach gefärbter Zellen mit dem Faktor 0,5 multipliziert.

5.4.1 Semiquantifizierung von VEGF im Corpus luteum

Die immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben wie Untersuchungen von BERISHA et al. (2000), dass VEGF in Luteinzellen und vaskulären glatten Muskelzellen des bovinen Ovars lokalisiert ist. VEGF konnte außerdem in lutealen Endothelzellen dargestellt werden.

Im Corpus luteum in Blüte waren ca. 75% aller Luteinzellen mit anti-VEGF markiert. Wie bereits frühere Untersuchungen zeigten, wird VEGF-Protein unter LH-Einfluss von Luteinzellen synthetisiert (BERISHA et al., 2000; SUGINO et al., 2000; 2001; BOONYAPRAKOB et

al., 2003). VEGF verlängert auf autokrinem Weg die Überlebensdauer boviner Granulosazellen, indem es die Freisetzung anti-apoptotischer Enzyme wie z.B. Bcl-2 stimuliert (ROBERTS et al., 1995; GREENAWAY et al., 2004). Von Luteinzellen freigesetztes VEGF stimuliert die Migration und Proliferation von Endothelzellen und schafft ein angiogenes Milieu, in dem Ang-2 die Ausbildung neuer Gefäßnetze induziert (LOBOV et al., 2002). Aufgrund der intensiven lutealen Angiogenese zählt der Blütegelbkörper zu den am stärksten vaskularisierten Geweben des Körpers (REYNOLDS und REDMER, 1999). Die intensive Vaskularisierung ermöglicht die optimale Versorgung der hormonproduzierenden Luteinzellen mit Metaboliten für die Steroidgenese (DENSCHLAG und KECK, 2002).

Vergleichbar den Ergebnissen der RT-PCR Untersuchungen von BERISHA et al. (2000) sank mit dem Einsetzen der Luteolyse die Anzahl VEGF-positiver Luteinzellen. Ein Grund dafür ist, dass die Sensitivität der Luteinzellen gegenüber LH abnimmt und sie infolgedessen weniger VEGF freisetzen. Ein weiterer Grund ist, dass sich die Anzahl der Luteinzellen durch apoptotische Prozesse verringert (FRASER et al., 1999; GEVA et al., 2000).

Entgegen den Ergebnissen von BERISHA et al. (2000), die gegen Ende der Luteolyse eine weitere Verringerung der VEGF mRNA-Expression auf 2.8 ng/g ermittelten, konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine deutliche Erhöhung der Anzahl VEGF-positiver Zellen insbesondere im frühen Residualgelbkörper beobachtet werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind mit der Tatsache zu erklären, dass in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auch in Zellen gebundenes VEGF berücksichtigt wurde.

Der Anstieg VEGF-positiver Zellen ging in erster Linie auf die gestiegene Anzahl VEGF-positiver vaskulärer glatter Muskelzellen und Endothelzellen zurück. Ein signifikanter Anstieg mit anti-VEGF markierter vaskulärer glatter Muskelzellen war im frühen Residualgelbkörper festzustellen.

Es ist anzunehmen, dass VEGF die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen vermittelt, wie Untersuchungen von BROWN et al. (1997) zeigten. BROWN et al. (1997) fanden, dass glatte Muskelzellen aus dem humanen Uterus über Rezeptoren für VEGF verfügen und nach der Inkubation mit VEGF proliferieren.

Im Gegensatz zu BAUER et al. (2003), die die Dickenzunahme der arteriolen Gefäßwand im Rückbildungsgelbkörper auf eine zunehmende Fibrosierung zurückführen, ist anzunehmen, dass die Verbreiterung der Gefäßwand auch durch Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen vermittelt wird, wie es auch von MODLICH et al. (1996) beschrieben wurde.

Der in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit festgestellte Anstieg VEGF-positiver Endothelzellen steht in engem Zusammenhang mit der beobachteten Vergrößerung der

Kapillarenanzahl pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche im frühen Residualgelbkörper. Das Mitogen VEGF stimuliert auf parakrinen und autokrinen Weg die Proliferation und Migration von Endothelzellen aus bereits bestehenden Gefäßen (DENSCHLAG und KECK, 2002).

5.4.2 Semiquantifizierung von VEGF-R2 im Corpus luteum

VEGF-R2 wurde bislang in Endothelzellen und Luteinzellen aus dem Corpus luteum der Ratte (SUGINO et al., 2001) und des Rindes (KÄBMEYER und PLENDL, 2005) sowie in vaskulären glatten Muskelzellen aus dem Gelbkörpergewebe der Ratte (SUGINO et al., 2001) nachgewiesen. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde VEGF-R2 erstmals in vaskulären glatten Muskelzellen aus dem bovinen Corpus luteum immunhistochemisch dargestellt. Die größte Anzahl VEGF-R2-positiver Zellen wurde im Blütegelbkörper festgestellt.

Während die Anzahl der mittels eines gegen VEGF-R2 gerichteten Antikörper markierten Zellen im frühen und späten Regressionsgelbkörper zurückging, war im frühen Residualgelbkörper ein Anstieg VEGF-R2-positiver Zellen zu verzeichnen. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Anstieg VEGF-positiver Zellen im frühen Residualgelbkörper und belegen die Bedeutung des VEGF-VEGF-R2-Systems im Corpus luteum in Rückbildung, das wie bereits eingangs erwähnt sowohl für die Rückbildung des alten als auch der Anbildung des neuen Gelbkörpers des sich anschließenden Zyklus verantwortlich sein könnte.

Die Anzahl VEGF-R2-positiver Luteinzellen verhält sich tendenziell wie die Anzahl VEGF-positiver Luteinzellen. Für die Lutein- und Endothelzellen gilt, dass im Vergleich zum Liganden VEGF deutlich weniger VEGF-R2 exprimiert wird. Die Anzahl VEGF-R2-positiver vaskulärer glatter Muskelzellen erreichte im frühen Residualgelbkörper das Maximum. Diese Ergebnisse korrelieren mit der festgestellten Vergrößerung der Anzahl VEGF-positiver vaskulärer glatter Muskelzellen in diesem Stadium.

Im Hinblick auf die Anzahl VEGF-positiver Endothelzellen vergrößert sich die Anzahl VEGF-R2-positiver Endothelzellen im frühen Residualgelbkörper gegenüber dem frühen Regressionsgelbkörper nicht mehr. Möglicherweise werden die während der Luteolyse benötigten VEGF-R2-Rezeptoren bereits zu Beginn der Luteolyse ausreichend exprimiert, um auf das im frühen Residualgelbkörper verstärkt freigesetzte VEGF reagieren zu können.

5.4.3 Semiquantifizierung von Ang-2 im Corpus luteum

WULFF et al. (2000) und HATA et al. (2002) gelang es, Ang-1 und Ang-2-mRNA in Luteinzellen und Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum darzustellen.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte Ang-2 erstmals in vaskulären glatten Muskelzellen aus dem bovinen Ovar immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Wie auch Untersuchungen von GALE et al. (2002) und CARMELIET (2003) ergaben, stieg die Konzentration von Ang-2 im Corpus luteum in Rückbildung. Verstärkt im Corpus luteum in Rückbildung freigesetztes Ang-2 verdrängt Ang-1 von Tie-2 und bindet an Tie-2 bindet ohne ein Signal auszulösen. Der chemotaktische Effekt von Ang-1 auf Endothelzellen wird aufgehoben und infolgedessen sinkt die Migrationsrate endothelialer Zellen.

5.5 Elektronenmikroskopische Analysen der Gefäßrückbildung während der Luteolyse

Die ultrastrukturellen Untersuchungen deuten, ähnlich wie bei den Untersuchungen von MODLICH (1997) auf zwei Mechanismen der Gefäßregression während der Luteolyse hin. Während MODLICH (1997) allerdings die These vertritt, dass die Kontraktion und der vollständige Verschluss der Arteriolen in Verbindung mit starker Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen und die Ablösung von Endothelzellen von ihrer Basalmembran mit nachfolgendem physiologischem Zelltod zwei voneinander unabhängige Mechanismen sind, ist nach neueren Erkenntnissen anzunehmen, dass die durch den Verschluss größerer Blutgefäße bedingte Mangeldurchblutung den auslösenden Faktor für den programmierten Zelltod von lutealen Endothelzellen darstellt (ACOSTA et al., 2002).

Die verminderte Durchblutung des Gelbkörpers während der Luteolyse ist bedingt durch die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen und die durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ vermittelte Stimulation der Vasokonstriktoren ET-1 und Ang II (ACOSTA et al., 2002). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass während der Luteolyse dicht beieinander liegende kontrahierte Arteriolen das Bild des Gelbkörpers dominieren. Gegenüber den Untersuchungen von MODLICH (1997), die als Anzeichen des programmierten Zelltodes nur Kernkondensation beobachtete, konnten in den ultrastrukturellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit darüber hinaus die Abrundung der Zelle, die Fragmentierung des Zellkerns als auch Apoptosekörperchen dargestellt werden.

5.6 Quantifizierungen wichtiger Parameter der lutealen Angiogenese bei Hochleistungskühen und Kühen, die Zweinutzungsrasen angehören.

Im Vergleich zu den Zweinutzungsrasen zeigen die im Durchschnitt jünger der Schlachtung zugeführten Hochleistungsmilchkühe eine intensivere Angiogenese. So betrug die Anzahl der Kapillaren pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche bei den Hochleistungsmilchkühen 789 während bei den Tieren, die Zweinutzungsrasen angehören, nur 630 Kapillaren pro mm² Gelbkörperquerschnittsfläche gezählt wurden. Dies kann als ein Hinweis gedeutet werden, dass die bei Hochleistungsmilchkühen auftretenden Störungen der ovariellen Funktionen, wie z.B. dem bovinen Ovarialzystensyndrom ähnlich wie bei dem humanen PCOS, bedingt sind durch eine Hochregulierung angiogener Prozesse oder einen Defekt der Gegenregulation der Angiogenese (Anti-Angiogenese).

Unter dem Begriff bovines Ovarialzystensyndrom fasste HERZOG (2001) diverse Formen zystischer Entartung der Ovarien zusammen, nämlich die Follikel-Theca-Zyste, die Follikel-Luteinzyste, die Corpus-luteum-Zyste sowie die kleinzystische Degeneration.

Ovarialzysten gehen aus anovulatorischen Follikeln, genauer aus einem dominanten Follikel hervor, der weder ovuliert noch atresiert. Die Erscheinungsform kann solitär oder multipel, zentral oder peripher im Ovarialstroma eingebettet sein (ZERBE et al., 1999). Follikelzysten werden als blasige Ovargebilde mit einem Durchmesser von 2,0-3,0 cm definiert (GRUNERT, 1999). Darüber hinaus bestehen eine Beeinträchtigung des Brunstzyklus sowie eine mindestens 14-tägige Persistenz des anovulatorischen Follikels. Die an lebenden Rinderpopulationen ermittelte Häufigkeit von Kühen mit Ovarialzystensyndrom beträgt 9-13% (SCHEDEL, 2002). Das Ovarialzystensyndrom verlängert signifikant das Intervall Abkalbung bis Konzeption und gilt als Hauptfaktor der Sterilität bei Milchkühen. Kühe mit einer überdurchschnittlichen Milchleistung waren regelmäßig am Ovarialzystensyndrom erkrankt (GRÖHN et al., 1994).

Das PCOS der Frau ist durch Hypertrophie und Hypervaskularisierung der Theca interna und des umgebenden Stromas gekennzeichnet (ABBOTT et al., 2002; PAN et al., 2002; FERRARA et al., 2003). Die Konzentration des proangiogenen Faktors VEGF im Serum erkrankter Frauen ist im Vergleich zu gesunden Probandinnen signifikant erhöht (TULANDI et al., 2000). Die Behandlung mit VEGF-Inhibitoren führt zu einer Verringerung der durch Hypervaskularisierung bedingten gesteigerten Gefäßpermeabilität und zur Rückbildung der zystischen Follikel (PARANEZHAD et al., 2003). Ein weiterer proangiogener Faktor in der Pathogenese des PCOS ist der EG-VEGF (TULANDI et al., 2000).

Beim Rind konnten sowohl EG-VEGF in der Theca interna des Ovars (KISLIOUK et al., 2005) als auch eine Hypertrophie und Hypervaskularisierung der Theca interna beobachtet werden. Im Vergleich zu 130 nm bei gesunden Tieren, betrug die Wanddicke der Theca interna am Ovarialzystensyndrom erkrankter Kühe 187 bis 434 nm (SCHEDEL, 2002).

Es ist daher wahrscheinlich, dass der pathogenetische Mechanismus des PCOS auch für das bovine Ovarialzystensyndrom von Bedeutung ist.