

Uterussekret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der
chronischen Endometritis beim Rind

von Maren Anna Elise Hillmer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Uterussekret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der
chronischen Endometritis beim Rind

von Maren Anna Elise Hillmer

aus Hannover

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.- Prof. Dr. Holm Zerbe

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Reinhard Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Tag der Promotion: 10.02.2018

Meiner Familie

Hypothesen sind Netze; nur der wird fangen, der auswirft.

(Novalis)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Bedeutung und Ätiologie von Gebärmutterentzündungen beim Rind .	3
2.	Definition und Einteilung der Gebärmutterentzündung des Rindes	5
2.1.	Akute Gebärmutterentzündung bis drei Wochen post partum	5
2.2.	Chronische Gebärmutterentzündungen ab drei Wochen post partum.....	6
2.2.1.	Klinische Endometritis	6
2.2.2.	Subklinische Endometritis.....	7
2.2.3.	Pyometra.....	8
2.3.	Diagnostik chronischer Gebärmutterentzündungen	8
2.3.1.	Adspektion und Palpation	8
2.3.2.	Sonographie.....	8
2.3.3.	Uterusspülung.....	9
2.3.4.	Zytobrush-Technik	9
2.3.5.	Uterusbiopsie.....	9
3.	Die Infektionsabwehr des bovinen Uterus	10
3.1.	Das bovine Endometrium: Aufbau und Struktur.....	11
3.2.	Das Uterussekret	13
3.2.1.	Zyklusbedingte uterine Sekretionsmechanismen	13
3.2.2.	Entzündungsbedingte uterine Sekretionsprozesse	13
3.3.	Uterine Epithelzellen (UEZ) als erste Barriere gegen Pathogene beim Rind und ihre Rolle bei uterinen Entzündungen.....	15
3.4.	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) als wichtige uterine Abwehrzellen der unspezifischen Immunantwort.....	16
3.4.1.	Morphologie und Funktion.....	16
3.4.2.	Die Rolle der PMN innerhalb verschiedener Entzündungsformen.....	18
3.4.3.	PMN: Migration, Phagozytose und <i>Killing</i>	19
3.4.4.	Modulation der mRNA-Expression bei PMN-Aktivierung	20
III.	MATERIAL UND METHODEN	23
1.	Geräte und Materialien	23
1.1.	Geräte	23

1.2.	Material für Zellkultur.....	25
1.3.	Material für das Probenentnahme-Instrumentarium	26
1.4.	Material für Stimulationsversuche und molekularbiologische Untersuchungen.....	27
1.5.	Reagenzien	28
1.6.	Lösungen und Medien.....	30
2.	Methoden.....	33
2.1.	Zellkulturarbeiten	33
2.1.1.	Gewinnung primärer boviner Uterusepithelzellen (pbUEZ).....	33
2.1.2.	Kultivierung der pbUEZ.....	34
2.1.3.	Kontrolle der Zellidentität.....	34
2.1.4.	Kryokonservierung der pbUEZ.....	34
2.2.	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN).....	35
2.2.1.	Blutentnahme	35
2.2.2.	Isolation von PMN aus dem Blut	35
2.3.	Probenentnahme-Instrumentarium	36
2.4.	Histologische Untersuchungen.....	39
2.4.1.	Beprobung von Schlachtuteri zur Evaluierung der Beurteilbarkeit entzündlicher endometrialer Alterationen in Minibiopaten (Vorversuch 1)	40
2.4.2.	Untersuchungen über die Verteilung von endometrialen entzündlichen Alterationen im Gesamtorgan mittels Minibiopaten und Organquerschnitten (Vorversuch 2).....	40
2.5.	Voruntersuchung und Gruppeneinteilung der Tiere am Schlachthof.....	42
2.6.	Anwendung des neuen Probenentnahme-Instrumentariums	43
2.6.1.	Probengewinnung und-aufbereitung am Schlachthof	43
2.6.2.	Probenaufarbeitung im Labor.....	45
2.7.	Zytologische Untersuchungen.....	46
2.8.	Bakteriologische Untersuchungen.....	46
2.9.	Stimulationsversuche mit Uterussektret.....	47
2.9.1.	pbUEZ-Stimulationsversuch	47
2.9.2.	PMN-Stimulationsversuch	48
2.10.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	50
2.10.1.	tRNA-Extraktion	50

2.10.1.1.	tRNA-Extraktion der UEZ	50
2.10.1.2.	tRNA-Extraktion der PMN	50
2.10.1.3.	RNA-Integritätsprüfung	51
2.10.2.	Gewinnung der cDNA durch Reverse Transkription	51
2.10.3.	Quantitative Real-Time PCR	52
2.11.	Statistische Analyse.....	56
IV.	ERGEBNISSE	59
1.	Praktikabilität des Probenentnahme-Instrumentariums für die Endometritisdiagnostik.....	59
1.1.	Praktikabilität und Effektivität der Uterussekretentnahme	59
1.2.	Praktikabilität des Instrumentariums.....	59
1.3.	Zytologische Auswertbarkeit der mittels Minizytobrush-Technik gewonnenen Endometriumsproben im Hauptversuch.....	60
1.4.	Histologische Untersuchungen zu entzündlichen Veränderungen am Endometrium.....	63
1.4.1.	Anhand von minimierten Uterusbiopstatproben charakterisierbare endometriale Strukturen und die Eignung der Minibiopate für die Beurteilung entzündlicher endometrialer Alterationen (Vorversuch 1).....	63
1.4.2.	Gleichmäßige Verteilung von endometrialen Läsionen im bovinen Endometrium beim Vergleich von Uterusgewebeproben unterschiedlicher Lokalisation (Vorversuch 2).....	64
1.4.3.	Histologische Beurteilung der Minibiopate im Hauptversuch.....	67
1.5.	Bakteriologische Untersuchungen.....	69
1.6.	Einteilung der beprobten Tiere in die Versuchsgruppen für die Folgeversuche.....	69
2.	Gewinnung von Uterussekret und seine Verwendung als Stimulanz in funktionellen und molekularbiologischen Untersuchungen.....	73
2.1.	Auswahl der zu beprobenden Tiere am Schlachthof.....	73
2.2.	Uterussekretgewinnung und Bestimmung des Uterussekretvolumens	74
2.3.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	76
2.3.1.	Stimulationsversuch mit isolierten Uterusepithelzellen	76
2.3.2.	Große Variabilität der cDNA-Produktmenge im UEZ-Stimulationsversuch	77
2.3.3.	mRNA-Expressionsmodulation uteriner Uterusepithelzellen durch	

	Stimulation mit Uterussekret.....	79
2.3.4.	Stimulationsversuch mit isolierten peripheren PMN	83
2.3.5.	Große Variabilität der cDNA-Produktmenge im PMN-Stimulationsversuch	83
2.3.6.	mRNA-Expressionsmodulation isolierter peripherer PMN	86
V.	DISKUSSION	91
1.	Konzeptionelle Überlegungen	91
1.1.	Merocel®-Schwämmchenmaterial für die Entnahme von bovinen Uterussekretproben.....	93
1.2.	Kombinierte Endometriumsdiagnostik mit dem neu etablierten Probenentnahme-Instrumentarium	95
2.	Modulation der mRNA-Genexpression von UEZ und PMN durch Uterussekret von Kühen mit und ohne Endometritis	98
2.1.	Exposition von UEZ mit Uterussekret	98
2.1.1.	Signifikante mRNA-Expressionssteigerung der pro-inflammatorischen Zytokine CXCL8 und IL6	98
2.1.2.	Signifikanter Unterschied in der IL10-Expression zwischen Tieren mit und ohne Endometritisbefund	100
2.2.	Uterussekret bedingt eine mRNA-Expressionssteigerung der pro- inflammatorischen Zytokinen CXCL5, CXCL8 und IL1b bei PMN.....	101
3.	Ausblick: Uterussekret als vielversprechendes Medium für Diagnostik und Forschung.....	103
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	105
VII.	SUMMARY.....	109
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	111
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	127
X.	TABELLENVERZEICHNIS	128
XI.	ANHANG	129
XII.	DANKSAGUNG	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua tridest.	Aqua tridestillata
a.p.	ante partum
a.U.	andere Ursache
AMP	antimikrobielle Proteine
BoHV-4	Bovines Herpesvirus 4
BU	Bakteriologische Untersuchung
CCL	CC-chemokine ligand/ monocyte chemotactic protein
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
Ct	Cycle Threshold
CXCL	CXC-chemokine ligand/ granulocyten chemotaktisches Protein
DAMPs	damage-associated molekular patterns
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotide Triphosphates
dsDNA	Doppelstrang- DNA
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Endometritis
E-neg	Endometritis negativ
E-pos	Endometritis positiv
F. necrophorum	Fusobacterium necrophorum
F. nucleatum	Fusobacterium nucleatum
FCS	foetales Kälberserum
g	Gramm
ggr./mgr./hgr.	geringgradig/mittelgradig/hochgradig
IF	Infertil
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IκB	kappaB Inhibitor
LPS	Lipopolysaccharid
lympl.	lymphoplasmazellulär

M	Mol
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
Min/Max	Minimum/Maximum
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NETs	neutrophil extracellular traps
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
o.b.B.	ohne besonderen Befund
o.Gr.	ohne Gruppe
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.p.	post partum
PAF	Platelet activating factor
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
pbUEZ	primäre bovine uterine Epithelzellen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEM	EDTA-Puffer zum Ablösen von Zellen
PGF 2α	Prostaglandin F 2α
pH	Wasserstoffionen-Exponent
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRRs	pattern recognition receptors
rsp.	respektive
PVA	Polyvinylacetat
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffmetaboliten
RQI	RNA Quality Index
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SF	Subfertil
spp.	species
Str. compactum	Stratum compactum
Str. spongiosum	Stratum spongiosum

TLR	Toll-like Rezeptor
Treg-Zellen	regulatorische T-Zelle
tRNA	totalRNA
T. pyogenes	Tryperella pyogenes
UEZ	Uterusepithelzellen
VF	Verdünnungsfaktor
vgl	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Die Reproduktionsleistung des Einzeltieres ist in der intensiven Tierhaltung ein maßgeblicher Faktor für die Wirtschaftlichkeit im Milchbetrieb. Kühe mit mangelhafter Fruchtbarkeit stellen einen bedeutenden Kostenfaktor für den Landwirt dar. Die verlängerte Gützeit bedeutet stets einen Gewinnverlust. Insbesondere entzündliche Erkrankungen des Uterus sind ein häufiger Grund für einen schlechten Besamungserfolg. Diese initial akuten Metritiden beruhen überwiegend auf intra- und kurz postpartalen Infektionen des Uterus, die oftmals nicht ausheilen. So entwickeln ca. 20% der Kühe bis drei Wochen post partum eine chronische klinische Endometritis und bis zu 30% eine chronische subklinische Endometritis (LINCKE et al., 2007; SHELDON et al., 2009a). Ätiologie und Pathogenese der Gebärmutterentzündung beim Rind sind noch nicht vollständig geklärt. Speziell die subklinisch-chronische Verlaufsform ist für Landwirt und Tierarzt problematisch, da sie häufig unerkannt bleibt. Die große Bedeutung der subklinischen Endometritis zeigt sich auch dadurch, dass sie seit einiger Zeit Thema vieler Studien und Forschungsarbeiten ist.

Die Diagnostik der subklinischen Endometritis erfolgt meistens histologisch über Endometriumsbiopsien oder die zytologische Auswertung von Bürstenabstrichen (Zytobrush) des Endometriums. Bestimmt wird der prozentuale Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) (KASIMANICKAM et al., 2005; CHAPWANYA et al., 2010; BARANSKI et al., 2012). Trotz der relativ aufwendigen und invasiven Methoden können beide Diagnostikverfahren jeweils allein nicht sicher alle subklinischen Endometritiden erfassen und unterscheiden sich teilweise stark in ihren Befunden (RODENBUSCH, 2011; WAGENER et al., 2017).

Uterussekt war bisher kaum Gegenstand der Endometritis-Forschung beim Rind. Dieses Produkt endometrialer Drüsen und Epithelzellen ist ein über das Gesamthohlorgan kommunizierendes Körpersekret (KRZYMOWSKI & STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, 2004) und wird in seiner Zusammensetzung durch entzündliche endometriale Prozesse beeinflusst (KIM et al., 2014; TURNER et al., 2014; BRODZKI et al., 2015a). So ist davon auszugehen, dass sich das Uterussekt von Kühen mit oder ohne Endometritis in der

Zusammensetzung immunologischer Komponenten unterscheidet.

Ziel dieser Studie war einerseits die Etablierung einer Methode zur Gewinnung von Uterussekret beim Rind. Andererseits sollte das Uterussekret als potentiell Medium für weiterreichende Forschungsarbeiten zur Pathogenese der Endometritis und zur Identifizierung von diagnostischen Markern für die subklinische Endometritis evaluiert werden.

Das Endometrium unterliegt in seiner immunologischen Reaktivität zyklisch bedingten Schwankungen. Um innerhalb der Versuchsgruppen möglichst vergleichbare Uterussekretproben gewinnen zu können, sollten Uteri von diöstrischen Rindern beprobt werden. Für die Beprobung bei relativ fest geschlossener Cervix uteri müssen die verwendeten Geräte spezielle Anforderungen erfüllen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Konzeption, Konstruktion und Evaluierung eines entsprechenden Probenentnahme-Instrumentariums. Dieses sollte eine zuverlässige Sekretprobengewinnung für die anschließende Untersuchung auf entzündliche endometriale Veränderungen ermöglichen.

Im in-vitro-Teil der Arbeit sollte die immunologische Wirksamkeit des entnommenen Uterussekretes erstens auf kultivierte Uterusepithelzellen (UEZ) und zweitens auf aus dem Blut isolierte PMN analysiert werden. Die Zellreaktion wurde dabei über eine mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Kandidatengene untersucht. Ziel war es, die immunologische Wirksamkeit von Uterussekret von Kühen mit und ohne subklinische Endometritis zu vergleichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Bedeutung und Ätiologie von Gebärmutterentzündungen beim Rind

Durch die intensive Tierhaltung und Zucht von Hochleistungsmilchkühen gewinnen Reproduktionsstörungen als Krankheitskomplex und Abgangsursache stetig an Bedeutung für Landwirt und Tierarzt. Erkrankungen des Uterus stellen eine der Hauptursachen für Unfruchtbarkeit dar und wirken sich negativ auf das Wohlbefinden des Tieres und die Ökonomie des Milchviehbetriebes aus (SHELDON et al., 2009a).

Durchschnittlich 20-40% der Milchkühe entwickeln in der ersten Woche nach der Abkalbung (post partum; p.p.) eine akute Metritis; 20% zeigen nach drei Wochen p.p. eine chronische klinische Endometritis, und bis zu 30% entwickeln eine chronische subklinische Endometritis (LINCKE et al., 2007; SHELDON et al., 2009a).

Bakterielle Kontaminationen unter der Geburt werden als physiologisch angesehen und betreffen nahezu jede Milchkuh (SHELDON et al., 2008; POTTER et al., 2010; BORGES et al., 2012). Bis zu zwei Wochen p.p. lassen sich bei den meisten Kühen Bakterien in uterinen Proben nachweisen (SHELDON et al., 2006). Der trächtige Uterus ist durch den Schutz der geschlossenen Zervix als steril zu betrachten, intra partum (i.p.) und p.p. können jedoch Erreger über die Vagina und die offene Zervix uteri in den Uterus aufsteigen. Hierbei handelt es sich meist um eine Mischflora aus Gram-positiven und Gram-negativen Aerobiern und Anaerobiern (SHELDON & DOBSON, 2004; AZAWI, 2008). Nach bakterieller Kontamination kann es entweder zu einer Infektion oder zu einer Elimination der Keime kommen, in Abhängigkeit vom Erregerspektrum sowie von der lokalen Abwehrkapazität des Tieres. Nicht jede Kontamination führt somit zwangsläufig zu einer Erkrankung. Um eine Infektion auszulösen, muss es zu einer Anhaftung der Pathogenen an die Mukosa, einer Kolonisation oder Penetration des Epithels und/oder einer Freisetzung von Toxinen kommen (SHELDON et al., 2006). Infektionsbegünstigend wirkt die Schädigung des Oberflächenepitheliums des Uterus p.p., das mit Uterusflüssigkeit, Pathogenen und Zelldebris in Kontakt steht (KONIGSSON et al., 2001; AZAWI, 2008).

Weitere begünstigende Faktoren für eine Uterusinfektion sind zum Beispiel Nachgeburtsverhaltung oder Traumata während der Geburt (SHELDON et al., 2009a).

Häufig mit Endometritis assoziierte Bakterien sind *Escherichia coli* (*E. coli*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*) und *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), wobei *T. pyogenes*, *F. necrophorum* und *Prevotella* synergistisch wirken können (GRIFFIN et al., 1974; BONNETT et al., 1991). *F. necrophorum* produziert ein Leukotoxin, *Prevotella melaninogenicus* eine die Phagozytose inhibierende Substanz, und *T. pyogenes* synthetisiert einen Wachstumsfaktor für *F. necrophorum* (SHELDON et al., 2009a). *E. coli*-Infektionen wirken wegbereitend für weitere Bakterien oder Viren (DOHMEN et al., 2000) und beeinflussen die Ovarfunktion, die Hypothalamus-Hypophysen-Achse und den generellen Gesundheitsstatus des Rindes negativ (WILLIAMS et al., 2007). Infektionen mit *T. pyogenes* führen zu den schwerwiegendsten endometrialen Schädigungen. Dieses Bakterium produziert Pyolysin, ein Cholesterol-abhängiges Zytotoxin, das die cholesterolreichen Domänen der Zellmembranen angreift, hier eine Porenbildung bewirkt und so zum osmotischen Tod der Zelle führt (JOST & BILLINGTON, 2005).

Bakterien können auch aus dem Uterus von Tieren isoliert werden, die keine klinischen Krankheitsanzeichen zeigen (SHELDON et al., 2009a). Williams et al. (2005) zeigten, dass das Risiko an Endometritis zu erkranken, bei intrauteriner Nachweisbarkeit von Koagulase-negativen Staphylokokken und alpha-haemolytischen Streptokokken reduziert ist.

Bei dem nach derzeitigen Kenntnisstand einzigen mit Erkrankungen des Uterus assoziierten Virus handelt es sich um das *Bovine Herpesvirus 4* (BoHV-4) (ACKERMANN, 2006). Wie andere Herpesviren ist es in der Lage, latente Infektionen durch intrazelluläre Persistenz, hier vornehmlich in Makrophagen, zu verursachen (SHELDON et al., 2009a). Das Virus ist hoch topisch für endometriale Zellen des Rindes, schnell replizierend und wirkt zytopathogen auf Endometriums- und Stromazellen (DONOFRIO et al., 2007).

Durch die mit Immunreaktionen und lokaler Entzündung einhergehenden Regenerationsprozesse im Uterus ist im gesunden Tier innerhalb von bis zu drei

Wochen p.p. eine komplette Keimelimination die Regel. Bis zur vierten Woche p.p. ist so eine vollständige Wiederherstellung der endometrialen Strukturen mit Aufnahme des ovariellen Zyklus und ca. ab der sechsten Woche p.p. eine erneute Trächtigkeit möglich (SHELDON et al., 2009a). Im Zuge dieses Prozesses kommt es zu einer schnellen Involution des Uterus und der Cervix uteri mit Abfluss von uterinem Inhalt und Aktivierung der Immunabwehr (AZAWI, 2008). Bei gestörtem Regenerationsvermögen des Uterus bleibt die Entzündung länger als drei Wochen bestehen, und es entwickelt sich, meist nach initialer Ausbildung einer akuten Metritis, eine chronischen Endometritis. Hiervon sind annähernd die Hälfte aller Milchkühe betroffen (SHELDON et al., 2008).

2. Definition und Einteilung der Gebärmutterentzündung des Rindes

Die Gebärmutterentzündung des Rindes wird nach klinischen, zytologischen, histologischen und pathologisch-anatomischen Kriterien in verschiedene Entzündungsformen eingeteilt. Die Definition der einzelnen Formen variiert mit der verwendeten Literatur, wobei die Übergänge zwischen den Entzündungsformen häufig fließend sind (GRUNERT, 1993; SHELDON et al., 2006). Besonders der Begriff Endometritis umfasst vielfach weitere Entzündungsformen (LEWIS, 1997; SHELDON et al., 2006). Die Einteilung erfolgt größtenteils in Endometritis, Metritis, Perimetritis und Pyometra (GRUNERT, 1993; BONDURANT, 1999). In der vorliegenden Arbeit wird die Definition nach Sheldon et al. verwendet (SHELDON et al., 2006; SHELDON et al., 2009a).

2.1. Akute Gebärmutterentzündung bis drei Wochen post partum

Bei der akuten Gebärmutterentzündung wird die puerperale Metritis von der klinischen Metritis unterschieden. Die puerperale Metritis tritt meist innerhalb der ersten zehn Tage bis spätestens drei Wochen p.p. auf. Dabei handelt es sich um eine schwere uterine Entzündung mit deutlichen akuten systemischen Krankheitszeichen am Tier. Hauptmerkmal ist ein wässriger, übelriechender, rötlich-brauner bis viskös-weißlicher uteriner Ausfluss. Bei der rektalen Palpation lässt sich ein großer, fluktuierender Uterus palpieren, da die Entzündung zu einer

verzögerten Involution führt. Je nach Schwere der Erkrankung treten weitere systemische Symptome wie Fieber, verringerte Milchleistung, Schwäche oder Inappetenz auf (SHELDON et al., 2006). Die klinische Metritis hingegen ist eine akute lokale Entzündung des Uterus ohne systemische Erkrankung des Tieres in den ersten drei Wochen p.p.. Die Klinik beschränkt sich auf einen vergrößerten Uterus und pathologischen, meist purulenten uterinen Ausfluss.

Weitere Formen der akuten Gebärmutterentzündung sind Para- und Perimetritis. Die Perimetritis ist eine Entzündung des peritonealen Überzuges des Uterus und der subserösen Schichten. Ursache ist meist eine geburtshilfliche Operation oder Nachgeburtsabnahme mit mechanischer Reizung der Serosa. Isolierte Entzündungen der Serosa sind selten und meist mit progressiven Metritiden vergesellschaftet (GRUNERT, 1993). Als Folge einer Perimetritis können Verklebungen und Verwachsungen mit umgebenden Geweben und Organen, in der Regel ohne Störung des Allgemeinbefindens auftreten (Berchtold, 1982; McEntee, 1985). Die Parametritis bezeichnet eine Entzündung des Uterusgekröses und entsteht zumeist in Folge von schweren Metritiden durch sich ausbreitende phlegmonöse Prozesse (GRUNERT, 1993).

2.2. Chronische Gebärmutterentzündungen ab drei Wochen post partum

Als chronisch wird eine Gebärmutterentzündung bezeichnet, wenn sie über die dritte Woche p.p. hinaus besteht. Es lassen sich verschiedene Formen der chronischen Gebärmutterentzündung unterscheiden (SHELDON et al., 2006).

2.2.1. Klinische Endometritis

Bei der Endometritis handelt es sich aus pathologisch-histologischer Sicht um eine Entzündung der Gebärmutter Schleimhaut (LEWIS, 1997). Eine klinische Endometritis nach Sheldon et al. (2006) liegt vor, wenn nach dem 21. Tag p.p. vaginaler purulenter Ausfluss (>50% Eiter), ein zervikaler Durchmesser von >7,5 cm oder nach dem 26. Tag p.p. vaginaler mucopurulenter Ausfluss (bis zu 50% Eiter und 50% Mukus) aufzufinden ist. Dabei liegt keine Störung des Allgemeinbefindens vor. Der Schweregrad der Entzündung ist abhängig vom Vorhandensein entzündungs-assoziiierter Pathogene. Nach dieser Definition liegt die Inzidenz der klinischen Endometritis im Milchviehbereich bei 17% (SHELDON et al., 2006).

2.2.2. Subklinische Endometritis

Bei der subklinischen Endometritis handelt es sich um eine Entzündung des Endometriums die ohne klinische Krankheitssymptome am Tier, also auch ohne purulenten Vaginalausfluss, auftritt. Die oberflächlichen inflammatorischen Prozesse erstrecken sich bis in das Stratum spongiosum, ohne Beeinträchtigung der tiefer liegenden Gebärmutterschichten (BONDURANT, 1999). Definiert wird die subklinische Endometritis nach Sheldon et al. (2006) über den prozentualen Gehalt von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus Uterusspülproben oder Uterusabstrichen mittels Zytobrush in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Abkalbung und Probennahme. Die Grenzwerte nach Sheldon et al. (2006) liegen für die Diagnose „subklinische Endometritis“ bei >18% PMN an den Tagen 21-33 p.p., >10% PMN an den Tagen 34-47 p.p. und >5% PMN an den Tagen 40-60 p.p. Die Schwellenwerte für den PMN-Gehalt sind jedoch nicht allgemeingültig, sondern unterscheiden sich zwischen verschiedenen Studien (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Beispiele für verwendete Schwellenwerte des PMN-Gehaltes im Rahmen der Endometritisdiagnostik

Methoden	Schwellenwert (%) ¹	Zeitraum	Quelle
Zytobrush	>5	21-27 Tage p.p.	(FISCHER et al., 2010)
Low-volume uterine lavage	>5	40-60 Tage p.p.	(GILBERT et al., 2005)
Zytobrush	>18	28-41 Tage p.p.	(GHASEMI et al., 2012)
Low-volume lavage oder Zytobrush	>18	21-33 Tage p.p.	(SHELDON et al., 2006)
	>10	34-47 Tage p.p.	
	>5	40-60 Tage p.p.	
Zytobrush	>18	4. Woche p.p.	(BARANSKI et al., 2012)

¹ PMN-Gehalt in Prozent am Gesamtzellgehalt, Abkürzung: p.p.: post partum

2.2.3. Pyometra

Als Pyometra wird eine Sonderform der Gebärmutterentzündung bezeichnet. Bei dieser Form kommt es zu einer Ansammlung von Eiter und Mukus im Lumen eines ausgedehnten Uterus bei mehr oder weniger geschlossener Cervix uteri und bei Vorhandensein eines aktiven Corpus luteum. Bei unvollständig geschlossenem Gebärmutterhals kann auch in der Vagina eitriger Ausfluss sichtbar werden (GRUNERT, 1996). Sonographisch stellt sich die Pyometra als uterine Ansammlung von Flüssigkeit unterschiedlicher Echogenität bei nachweisbarem Corpus luteum dar (SHELDON et al., 2006).

2.3. Diagnostik chronischer Gebärmutterentzündungen

Es existieren verschiedene Methoden zur Diagnostik der chronischen Gebärmutterentzündungen (Endometritis) beim Rind. Neben der klinischen Befunderhebung haben sich besonders die Zytobrush-Technik und die histologische Untersuchung von Endometriumbiopsaten etabliert (KASIMANICKAM et al., 2005; BARLUND et al., 2008; CHAPWANYA et al., 2010).

2.3.1. Adspektion und Palpation

Die rektale Palpation des Uterus stellt zusammen mit der adspektorischen Feststellung von Vaginalausfluss die Basis der Endometritisdiagnostik dar (GILBERT et al., 2005). Dabei werden Uterusgröße, Kontraktilität, Symmetrie und Fluktuation der Uterushörner beurteilt. Limitierend handelt es sich hier um eine sehr subjektive Methode, die nach Meinung einiger Autoren nicht ausreicht um alle Tiere mit Störungen des Puerperiums zu erfassen (GILBERT et al., 2005). Eine Möglichkeit der adspektorischen Beurteilung stellt die Vaginoskopie dar. Hier werden Form, Farbe und Öffnungsgrad des äußeren Muttermundes sowie Quantität und Qualität von Vaginalsekret beurteilt. Einer reinen Beurteilung der vaginalen Flüssigkeit dient die Metricheck-Methode: Dabei handelt es sich um einen ca. 50 cm langen Metallstab mit Kappe, der in die Vagina eingeführt wird. Beim Herausziehen sammelt sich etwaiger Schleim in der Kappe und kann beurteilt werden (PLETICHA et al., 2009).

2.3.2. Sonographie

Die Ultraschalldiagnostik gewinnt in der Nutztiermedizin immer mehr an Bedeutung und wird auch in der Endometritisdiagnostik verwendet. Als Kriterium

werden die Gebärmutterwanddicke und –echostruktur, Gesamtgröße des Organs sowie die Nachweisbarkeit einer Flüssigkeitsansammlung im Uteruslumen herangezogen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass mittels Sonographie dargestellte intrauterine Flüssigkeitsansammlungen als Anzeichen für eine Endometritis gewertet werden können (KASIMANICKAM et al., 2004; LENZ et al., 2007; MEE et al., 2009).

2.3.3. Uterusspülung

Bei der Uterusspülung (Low-volume-Uteruslavage) werden 20 bis 40 ml einer sterilen Kochsalzlösung über einen Katheter in den Uterus infundiert, das Organ massiert und ein Teil der Flüssigkeit durch Aspiration zurückgewonnen. Nach Zentrifugation wird aus dem gewonnenen Zellpellet ein zytologischer Ausstrich angefertigt und gefärbt. Die Auswertung des zytologischen Ausstrichs erfolgt mikroskopisch, wobei der prozentuale Anteil von PMN an der Gesamtzellzahl bestimmt und entsprechend des gewählten PMN-Schwellenwertes bewertet wird (GILBERT et al., 2005).

2.3.4. Zytobrush-Technik

Die Zytobrush-Methode wird wie die Uteruslavage zur Auswertung des PMN-Gehalts an der Gesamtzellzahl verwendet. Ein durch eine Hülse geschütztes Bürstchen wird in den Uterus eingebracht, intrauterin an der Uteruswand entlanggerollt und in der Hülse geschützt zurückgezogen. Durch das Ausstreichen der Bürste auf einem Objektträger mit anschließender Färbung können so Proben für eine zytologische Auswertung gewonnen und analysiert werden (PLONTZKE et al., 2010).

Zytobrush und Uteruslavage dienen vornehmlich der quantitativen Beurteilung der zytologischen Zusammensetzung im Endometrium bzw. im Uterus, insbesondere der Beurteilung des PMN-Gehalts. Sie finden ihren Einsatz in der wissenschaftlichen Einteilung von Endometritiden (SHELDON et al., 2009a), siehe auch Tabelle 1).

2.3.5. Uterusbiopsie

Für die histologische Untersuchung des Uterus besteht intra vitam die Möglichkeit einer diagnostischen Biopsie. Hierzu wird eine Biopsiezange in den Uterus eingeführt und unter transrektaler palpatorischer Kontrolle eine Gewebeprobe

entnommen. Das Gewebestück wird dann in das der Aufbereitungsmethode entsprechende Medium überführt. Die weitere Beurteilung erfolgt an histologischen Schnitten. Untersuchungskriterien sind hierbei Entzündungsinfiltrate, Vaskularisation und Gewebemorphologie (BONNETT et al., 1991; CHAPWANYA et al., 2010). Dabei wird eine Endometritis als eine oberflächliche Entzündung des Endometriums, einschließlich aller Endometriumsschichten bis zum Stratum spongiosum, definiert (BONDURANT, 1999). Die histologische Untersuchung über Biopatientnahme gilt als Goldstandard der Endometriums- und Endometritisdiagnostik (SHELDON et al., 2006).

3. Die Infektionsabwehr des bovinen Uterus

Die uterine Infektionsabwehr beruht auf einem Zusammenspiel von anatomischen, chemischen und immunologischen Komponenten (AZAWI, 2008).

Die erste Barriere für aufsteigende Infektionserreger des Uterus stellen die speziellen anatomischen Gegebenheiten dar. Dazu zählen die Vagina, das Vestibulum mit Sphinkteren sowie die Zervix mit kollagenen Ringen (BONDURANT, 1999). Zusätzlich kann der zervikal-vaginale Mukus, insbesondere innerhalb der Lutealphase, als physikalische Barriere wirken (SHELDON & DOBSON, 2004). Die zirkuläre und longitudinale Fältelung der uterinen Muskulatur erschwert ein Aufsteigen von partikulärem Material sowie Mikroorganismen (HERATH et al., 2006). Die intrauterine primäre Abwehrlinie bilden die Epithelzellen (WIRA et al., 2005). Der geschlossene Zellverband mit interzellulären *Tight junctions* und die Fähigkeit zelluläre und immunologische Botenstoffe wie Zytokine zu sezernieren, stellt eine wichtige Brücke zwischen anatomischen und immunologischen Abwehrmechanismen dar (WIRA et al., 2005; TURNER et al., 2014).

Die Pathogenerkennung und die initiale uterine Abwehr beruht vor allem auf Mechanismen des angeborenen Immunsystems, die Erregererkennung dabei auf den sogenannten Pattern Recognition Receptors (PRRs). Das Endometrium exprimiert diese PRRs; die Hauptvertreter der PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (SHELDON et al., 2009a). Ihre Aktivierung bewirkt die Synthese und Freisetzung von Chemokinen sowie Interleukinen (IL), wobei Chemokine chemotaktisch auf weitere Entzündungszellen wirken (JANEWAY, 2002; ZERBE

et al., 2003; FISCHER et al., 2010). Auch die Bildung von antimikrobiellen Peptiden und Akut-Phase-Proteinen durch endometriale Epithelzellen spielt eine wichtige Rolle (WIRA et al., 2005).

3.1. Das bovine Endometrium: Aufbau und Struktur

Das Endometrium stellt die innerste Schicht der Gebärmutterwand dar und kann funktionell und morphologisch in zwei Abschnitte unterteilt werden: die Pars basalis und die Pars funktionalis (SINOWATZ, 2006) (siehe Abbildung 1). Die Pars basalis liegt dem Myometrium an und enthält die Endabschnitte der uterinen Drüsen. Die Pars funktionalis umfasst das luminale Epithel, das Stratum compactum (Str. compactum) und das Stratum spongiosum (Str. spongiosum). Diese Schicht wird im Rahmen der zyklischen Veränderungen des Endometriums auf- und abgebaut. Das Str. compactum liegt unterhalb der Epithelschicht und enthält die Halsteile der uterinen Drüsen. Im darunter befindlichen Str. spongiosum liegen die Hauptteile der Drüsen (SINOWATZ, 2006). Bei dem luminalen endometrialen Oberflächenepithel handelt es sich um einschichtiges, beim Rind teilweise mehrreihiges, hochprismatisches Epithel, welches drei verschiedene Zelltypen aufweist: die sekretorischen Zellen mit Mikrovilli (Sekretion von Glykogen), Flimmerzellen mit Kinozilien und Basalzellen (KRZYMOWSKI & STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, 2004).

Im Endometrium lassen sich verschiedene Zellinfiltrate nachweisen. Dabei handelt es sich zumeist um Neutrophile, die direkt subepithelial im Str. compactum und teilweise auch im luminalen Epithel liegen (SKJERVEN, 1956). Weiter lassen sich Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophile Granulozyten und Mastzellen nachweisen. Auch diese Zelltypen treten überwiegend im subepithelialen Gewebe, insbesondere im Str. compactum, auf (SKJERVEN, 1956).

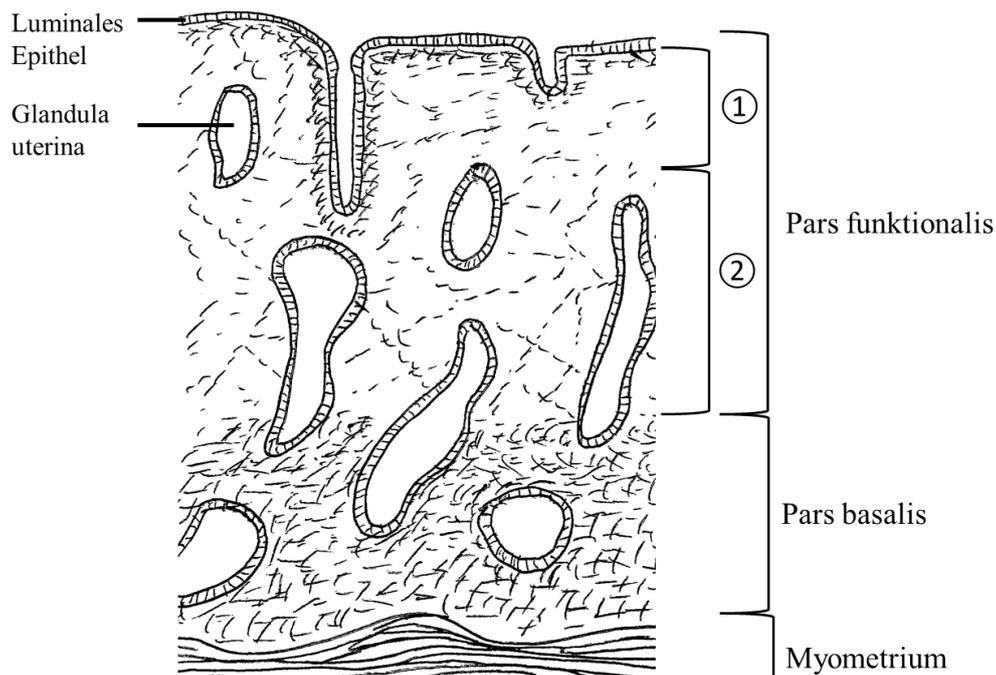


Abbildung 1: Aufbau des Endometriums (schematisch).

①: Stratum compactum; ②: Stratum spongiosum

Innerhalb eines Zyklus von durchschnittlich 21 Tagen kommt es im bovinen Endometrium zu einer Vielzahl von Veränderungen. Während der Proliferationsphase im Proöstrus (Tag 19 bis 21) und Östrus ödematisiert die Schleimhaut auf Grund des Östrogeneinflusses, und das Oberflächenepithel nimmt an Höhe zu. In der Sekretionsphase produzieren die sekretorischen Epithelzellen ein mukoides Sekret, das Bestandteil der Embryotrophe ist (FORDE et al., 2011). Kommt es zu einer Befruchtung kommunizieren die Epithelzellen als lumenseitige Auskleidung des Uterus mit dem Embryo und dienen gleichzeitig als erster intrauteriner Infektionsschutz (WIRA et al., 2005).

Während des Zyklus, und im Zuge der peripartalen Veränderungen, ist das uterine Gewebe starken hormonellen Einflüssen unterworfen. Dabei spielen insbesondere Estradiol und Progesteron eine maßgebliche Rolle und agieren als Gegenspieler in Auf- und Abbauvorgängen des Gewebes (BONDURANT, 1999; XIAO & GOFF, 1999). Estradiol fördert die Epithelisation und Vaskularisation des Endometriums (PEEK et al., 1992) und wirkt positiv auf die Produktion von Zervixschleim, die uterine Kontraktionsfähigkeit und die Konzeptionsbereitschaft. Progesteron hingegen wirkt Uterus-relaxierend (DAHME & HAFNER-MARX, 2007).

3.2. Das Uterussekret

Menge und Zusammensetzung von Sekreten des bovinen Uterus sind abhängig von Zyklusstand, postpartaler uteriner Involution und eventuell vorliegenden inflammatorischen Prozessen. Das Sekret hat sowohl embryotrophe als auch immunologische Funktionen im Zusammenhang mit der Reinigung des Uterus nach Geburt oder bei Infektion (GRUNERT, 1993).

3.2.1. Zyklusbedingte uterine Sekretionsmechanismen

Das Uterussekret wird von den sezernierenden Zellen des Oberflächenepithels und den tubulär verzweigten Uterindrüsen in der Lamina propria des Endometriums gebildet. Während eines Sexualzyklus ist die Sekretionsleistung dieser Zellen großen Schwankungen unterworfen. In der Proliferationsphase kommt es zu einer kontinuierlichen Ödematisierung der Schleimhaut. Das Oberflächenepithel nimmt an Höhe zu. Die Uterindrüsen strecken sich und nehmen geschlängelte Formen an. In der Sekretionsphase, unter zunehmender Progesteronfreisetzung durch das Corpus luteum, zeigen die Uterindrüsen ihre stärkste Schlängelung und maximale Sekretionsleistung (KRZYMOWSKI & STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, 2004).

Die Uterussekrete enthalten Proteine, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Zytokine und Adhäsionsfaktoren und werden auch als Uterinmilch bezeichnet (WILLIAMS et al., 1992; FORDE et al., 2011). Die Uterinmilch (auch Embryotrophe) stellt bis zur Implantation am 16. Tag post conceptionem das Nährmedium des frühen Embryos dar (GRUNERT, 1993; SHIMIZU et al., 2010). Bei ausbleibender Trächtigkeit synthetisieren die Oberflächenepithelien des Endometriums Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), welches die Luteolyse einleitet (GARVERICK & SMITH, 1993). Die uterine sekretorische Leistung wird in der Folge reduziert, die uterinen Drüsen bilden sich zurück (KRZYMOWSKI & STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, 2004).

3.2.2. Entzündungsbedingte uterine Sekretionsprozesse

Im Verlauf von intrauterinen entzündlichen Geschehen verändert sich die Zusammensetzung des durch das Endometrium sezernierten Sekretes. Entzündungsprozesse treten als Reaktion auf kontaminierende Pathogene oder inflammatorische Ereignisse während und nach der Geburt auf (GOLIGHTLY et al., 2011; TURNER et al., 2014). Bei Rezeptor-vermitteltem Kontakt der

epithelialen Endometriumszellen zu Pathogenen über spezielle Rezeptoren kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Tuner et al (2014) zeigten, dass es in bovinen endometrialen Epithel- und Stromazellkulturen als Reaktion auf bakterielle Peptide zu einer Akkumulation von Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 8 (IL8) in den Zellkulturüberständen kommt. IL8 wirkt chemotaktisch auf Neutrophile, welche in das Endometrium immigrieren und hier weitere proinflammatorische Zytokine synthetisieren (SHELDON & DOBSON, 2004). IL6 aktiviert reife Makrophagen und moduliert deren weitere Differenzierung, stimuliert die Umwandlung von Monozyten in reife Makrophagen sowie die Differenzierung natürlicher Killerzellen (GHASEMI et al., 2012).

Im Rahmen einer akuten Metritis ist die uterine Schleimhaut makroskopisch geschwollen und gerötet, teils rau mit trüb-bräunlichem, dünnflüssigen, oder hellerem, zähem Exsudat. Histologisch lassen sich Schleimhautblutungen, Nekrosen und teilweise eitrige Einschmelzungen erkennen (DAHME & HAFNER-MARX, 2007). Neue Studien zeigen, dass eine Beurteilung des Expressionslevels proinflammatorischer Zytokine nicht nur im Serum und uterinem Gewebe, sondern auch in der Uterusflüssigkeit möglich ist. Der Zytokingehalt ist in Uteruspülproben von Kühen mit klinischer Endometritis signifikant höher als bei gesunden Kühen (KIM et al.; BRODZKI et al., 2015b). Die veränderte Zusammensetzung des bovinen uterinen Sekrets bei Vorliegen von endometrialen Entzündungen bietet die Möglichkeit das Sekret für Untersuchungen zur Pathogenese der subklinischen Endometritis zu nutzen.

3.3. Uterine Epithelzellen (UEZ) als erste Barriere gegen Pathogene beim Rind und ihre Rolle bei uterinen Entzündungen

Die uterinen Epithelzellen bilden zusammen mit der drüsenhaltigen Lamina propria mucosae das Endometrium, welches mit dem Myometrium und dem Perimetrium die Uteruswand bildet. Das Endometrium übernimmt eine essentielle Rolle bei der embryo-maternalen Kommunikation und ist Teil der immunologischen Barriere gegen aufsteigende Pathogene (FISCHER et al., 2010).

Als geschlossenes Monolayer mit *Tight junctions* stellen die UEZ die erste Abwehrlinie gegen aufsteigende Infektionen dar. Über ihre TLRs sind die Zellen in der Lage Pathogene zu erkennen und sind so wichtiger Bestandteil der immunologischen Erstreaktion (TURNER et al., 2014). Die TLRs binden pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), spezielle Struktur motive, die charakteristisch für viele Mikroorganismen sind. Ein Beispiel für diese Struktur motive ist das Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien (HEALY et al., 2014). Dabei binden verschiedene TLRs unterschiedliche PAMPs (KUMAR et al., 2009). Als Folge einer TLR-Aktivierung werden von den Zellen verschiedene Botenstoffe wie zum Beispiel IL8 sezerniert. Im IL8-Signalweg gelangt der Transkriptionsfaktor „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NFκB) in den Zellkern und bewirkt die Expression von IL8. Bei NFκB handelt es sich um einen Proteinkomplex, der in den meisten Zelltypen inaktiv an inhibitorische κB-Proteine (IκB) gebunden, im Zytoplasma vorliegt. Erst in Folge einer Phosphorylierung durch Stimulation der Rezeptoren kommt es zu einer Freisetzung von NFκB (MIZGERD et al., 2002). Neben der Expression von TLRs zur Pathogenerkennung werden antimikrobielle Peptide (antimicrobialpeptides, AMPs) gebildet. Hier handelt es sich in erster Linie um Defensine, welche insbesondere bei der mukosalen Abwehr eine wichtige Rolle spielen (SELSTED & OUELLETTE, 2005). Das gesamte Endometrium exprimiert bovine neutrophile β-Defensine (BNBD4, BNBD5), bovine β-Defensine (BBD19, BBD123, BBD124) und Linguale Antimikrobielle Peptide (LAP) (CORMICAN et al., 2008). Davies et al. (2008) zeigten, dass Epithelzellen des bovinen Endometriums bei Stimulation mit LPS vermehrt Mucin-1 exprimieren. Die Autoren vermuten eine antimikrobielle Wirkung dieses transmembranen Proteins. Im Falle einer subklinischen oder klinischen

Endometritis des Rindes konnte gezeigt werden, dass die Expression von bovinem Granulozyten-chemotaktischem Protein 2 (CXCL5), IL1 β , IL8 und TNF α in endometrialen Epithelzellen signifikant erhöht ist (FISCHER et al., 2010).

CXCL5 ist ein auf PMN chemotaktisch wirkendes Protein (STRUYF et al., 2005), das zudem eine wichtige Rolle bei der embryo-maternalen Kommunikation spielt (GLAUCIA TEIXEIRA et al., 1997). IL1 β gehört zu den meiststudierten Angehörigen der IL-1-Familie und wird hauptsächlich von mononukleären Zellen sezerniert. Es stellt einen wichtigen Stimulator für T- und B-Lymphozyten dar und ließ sich im Endometrium verschiedener Spezies nachweisen (PAULA-LOPES et al., 1999; ROSS et al., 2003). Fischer et al. (2010) vermuten aus diesem Grund, dass es eine wichtige regulatorische Rolle endometrialer Vorgänge hat. Besonders interessant an der IL1-Familie ist deren zu den TLR-Rezeptoren homologe Aufbau ihrer zytoplasmatischen Domäne. Infolgedessen lassen sich die Wirkungen einer TLR-Rezeptorstimulation oder einer Stimulation durch IL1-Zytokine nicht unterscheiden. Diese bewirken gleichermaßen die Induktion der Cyclooxygenase-2, eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Synthese von Nitritoxiden (DINARELLO, 2009). Ein ebenfalls zu der Familie der Chemokine gehörendes pro-inflammatorisches Protein ist das Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1/CCL2), ein potenter Lockstoff für Monozyten, welcher von einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird. CCL2 reguliert die Migration und Infiltration von Monozyten, T-Gedächtniszellen und natürlichen Killerzellen (DESHMANE et al., 2009).

3.4. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) als wichtige uterine Abwehrzellen der unspezifischen Immunantwort

Die Phagozytose durch PMN ist einer der wichtigsten unspezifischen Abwehrmechanismen des Uterus. Bei Infektionen immigrieren diese Abwehrzellen innerhalb weniger Stunden in das betroffene Gewebeareal, bekämpfen direkt eingedrungene Pathogene. Durch die Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine wirken sie auch modulatorisch auf andere Zelltypen des Immunsystems (PAAPE et al., 1979; HAMMON et al., 2006).

3.4.1. Morphologie und Funktion

PMN (auch Neutrophile) sind 12 bis 15 μ m große kugelige Zellen. Sie sind als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr essentiell für die Erkennung und

Bekämpfung von immigrierten Pathogenen. Beim Menschen machen sie circa 50 bis 60% der zirkulierenden Leukozytenpopulation aus (SMITH, 1994), beim Rind hingegen nur 25%. Bei Einbezug von Körpergewicht und Blutvolumen verfügt das Rind jedoch über einen „potentiellen pool“ von über 100 Mrd. zirkulierenden PMN (PAAPE et al., 1979). Gebildet werden sie im hämatopoetischen Gewebe, aus dem sie nach verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsschritten in die Blutbahn entlassen werden. Im Zytoplasma der PMN befinden sich die drei namengebenden Arten von Granula. Hierzu zählen die azurophilen primären Granula, die spezifischen sekundären Granula und die tertiären Granula. Die Granula enthalten in unterschiedlicher Zusammensetzung verschiedene für die mikrobielle Abwehr wichtige Proteine und toxische Agenzien (z.B. Defensine, Proteasen, Lysozym, Myeloperoxidase, Laktoferrin). Die Mobilisierung der Granula ist vom Aktivierungszustand der PMN abhängig, wobei zunächst die tertiären, dann die sekundären und zuletzt die primären entleert werden (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Die wichtigste Funktion der PMN als „professionelle Phagozyten“ ist die Aufnahme und der Abbau von Pathogenen im Rahmen der Phagozytose (JANEWAY, 2002). Zudem setzen stimulierte PMN selbst Zytokine wie IL8, Tumornekrosefaktor-alpha ($TNF\alpha$) oder den Platelet activating factor (PAF) frei, was zu einer Funktionsmodulation der PMN führt und stimulierend auf das spezifische Immunsystem wirkt (GALLIGAN & YOSHIMURA, 2003). Die PMN stellen so eine wichtige Bindungsstelle zwischen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort dar.

Die PMN spielen eine entscheidende Rolle bei der immunologischen Antwort des Körpers auf Pathogene und Entzündungsmediatoren. Gleichzeitig kann eine überschießende oder fehlgeleitete Reaktion der PMN einen größeren Gewebeschaden als der zugrunde liegende Reiz selbst auslösen (SERHAN & SAVILL, 2005). Neutrophile sind essentiell für die Erhaltung des Gleichgewichts innerhalb eines Entzündungsgeschehens und regulieren über Interaktion mit anderen Immun- und Nicht-Immunzellen (Epithelzellen, Endothelzellen, Stromazellen) die biologischen Prozesse im pathophysiologischen Geschehen (SCAPINI & CASSATELLA, 2014).

3.4.2. Die Rolle der PMN innerhalb verschiedener Entzündungsformen

Akute Entzündung

Bei einer akuten Entzündung kommt es zu einer schnellen Einwanderung von Neutrophilen aus dem Blut in das betroffene Gewebeareal. Diesen folgen Monozyten, die im Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzieren (NATHAN, 2002). In der akuten Entzündungsphase werden PMN über verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Pathogenkomponenten mobilisiert und aktiviert. Ihre Hauptfunktion ist die Elimination von Pathogenen durch Phagozytose. Eine verminderte oder gar fehlende Neutrophilenpräsenz führt zu Immundefiziten (SCAPINI & CASSATELLA, 2014).

Chronische Entzündung

Chronische Entzündungen entstehen, wenn die auslösende Noxe nicht beseitigt und eliminiert werden kann. Es wird die primäre chronische Entzündung von der sekundären chronischen Entzündung unterschieden. Eine primäre chronische Entzündung tritt bei Autoimmunerkrankungen, Fremdkörperreaktionen oder nicht phagozytierbaren Erregern auf (z.B. Tuberkulose). Die sekundäre chronische Entzündung entwickelt sich meistens aus vorangegangenen akuten eitrigen Entzündungen. Histologisch ist eine chronische Entzündung durch das dominierende Vorkommen von mononukleären Zellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen gekennzeichnet (BÖCKER, 2008; MCGAVIN & ZACHARY, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass auch bei der chronischen subklinischen Endometritis vermehrt lymphozytäre Zellen (u.a. Plasmazellen) in Endometriumsproben nachweisbar sind (BARTELS, 2014). Neutrophile Granulozyten sind histologisch zum Teil nur noch im geringen Maße nachweisbar. Allerdings können auch rezidivierende akute Entzündungen das Bild der chronischen Entzündung verursachen (MCGAVIN & ZACHARY, 2011).

Sterile Entzündung

Bei der sterilen Entzündung handelt es sich um einen inflammatorischen Prozess ohne einen Nachweis von Pathogenen aufgrund einer Gewebeschädigung anderer Ursache, wie Trauma, ischämische Reperfusionsschäden oder chemische Noxen (CHEN & NUNEZ, 2010). Ein weiterer wichtiger Auslöser ist nekrotischen Zelluntergang und die in Zuge dessen freigesetzten intrazellulären Moleküle. Dabei handelt es sich um endogene pro-inflammatorische Faktoren wie Proteine,

Nukleinsäuren, Komponenten der extrazellulären Matrix und Lipidmediatoren (CHEN & NUNEZ, 2010). Diese sogenannten Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) werden über die PRRs erkannt. Die Entzündungsreaktion verläuft ähnlich wie die Erreger-induzierte Inflammation unter Beteiligung der gleichen Rezeptoren und Entzündungsmediatoren. Diese Art von Inflammation ist, unter anderem durch die Beseitigung von nekrotischem Zellmaterial, ein Teil der Wundheilung (CHEN & NUNEZ, 2010), bildet jedoch auch die Grundlage vieler Autoimmunerkrankungen wie Gicht, rheumatoide Arthritis und Arteriosklerose (ROSS, 1999). Durch die innerhalb der inflammatorischen Reaktion freigesetzten hydrolytischen, oxidativen und porenbildenden Moleküle können zusätzliche Schäden am Gewebe hervorgerufen werden. Dadurch kommt es zu einer ständigen Neubildung von DAMPs innerhalb des Gewebes (WEISS, 1989; CHEN & NUNEZ, 2010).

3.4.3. PMN: Migration, Phagozytose und Killing

Kommt es in Körpergeweben zu einer Pathogenerkennung oder sind durch eine bestehende Entzündung bereits Zellen geschädigt, werden von den Gewebsmakrophagen, Mastzellen oder geschädigten Zellen im betroffenen Gewebe verschiedene Mediatoren wie TNF, IL10 oder Histamin freigesetzt. Diese bewirken die Sezernierung von E- und P-Selektin und von L-Selektin-Liganden von den Endothelzellen der postkapillären Venolen. Diese Adhäsionsmoleküle ermöglichen das „Fangen“ (*Capturing*) von in der Blutbahn zirkulierenden PMN. Diese beginnen im Folgeschritt entlang der Gefäßwand zu „rollen“ (*Rolling*). Auf das *Rolling* folgt die Auswanderung der PMN in das extrazelluläre Entzündungsgebiet (SPERANDIO et al., 2006). Die Wanderung in der extrazellulären Matrix wird chemotaktisch durch lösliche Entzündungsmediatoren (Chemotaxine) gesteuert.

Am Wirkungsort sind PMN in der Lage, immigrierte Pathogene durch Phagozytose aufzunehmen und abzubauen. Hierbei werden im Zuge der Opsonisierung durch Immunglobuline oder Komplementfaktoren markierte Pathogene von den PMN aufgenommen und abgebaut. Die Abwehrzellen bilden Pseudopodien aus, die die Pathogene umschließen (PAAPE et al., 1979). Das dabei entstehende Phagosom verschmilzt im Zellinneren mit den Granula zum Phagolysosom, in dem der enzymatische und oxidative Abbau der pathogenen Strukturen stattfindet (SMITH, 1994). Durch die Aktivierung der NADPH-

Oxidase kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS), die den oxidativen Abbau von phagozytiertem Material ermöglichen (*Respiratory burst*). Durch diesen Prozess ist in der Regel eine vollständige Elimination der eingedrungenen Fremdkörper möglich. Die in das Gewebe eingewanderten PMN sterben in der Regel nach der Phagozytose durch Apoptose. Dabei bleibt die Zellmembran intakt und die apoptotischen Zellen werden von Makrophagen oder anderen Gewebszellen phagozytiert (HAMPTON et al., 1998; JANEWAY, 2002).

BRINKMANN et al. (2004) beschrieben an Neutrophilen eine weitere Form des Zelltodes: die NETose. Namensgebend für diesen Prozess sind die entstehenden NETs, Neutrophile Extracellular Traps. Dabei handelt es sich um netzartige, faserige Strukturen aus DNA, die während der NETose freigesetzt werden und umliegende Pathogene umschließen. Die in die Fasern eingebetteten antimikrobiellen Bestandteile können so direkt an den Fremdstrukturen wirken. Da sich die Fähigkeit NETs zu bilden auch bei anderen Zellarten, wie Mastzellen, beobachtet ließ, wurde der Name in ETose umgewandelt (VON KOCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2008).

3.4.4. Modulation der mRNA-Expression bei PMN-Aktivierung

Bei einer Stimulation von PMN kommt es neben der direkten Antwort (z.B. Degranulation, NET-Formation) zu einer Ausschüttung verschiedener Mediatoren zur Kommunikation mit anderen Immunzellen. Die mRNA-Expression verschiedener pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine kann gesteigert oder reduziert werden (ERICSON et al., 2014). So exprimieren stimulierte PMN chemotaktisch wirkende Substanzen, wie $\text{TNF}\alpha$, IL8, Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) und MIP-1 β (CHERTOV et al., 1997; BENNOUNA et al., 2003). Die meisten Studien untersuchten die Modulation der Genexpression humaner PMN in Reaktion auf die Stimulation mit verschiedenen Substanzen (ERICSON et al., 2014). Dabei zeigten aktivierte PMN in verschiedenen Studien eine erhöhte Genexpression von anti-apoptotischen Genen und Genen pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (THEILGAARD-MONCH et al., 2004; ZHANG et al., 2004; RADOM-AIZIK et al., 2008). Auch bei bovinen PMN ließ sich eine Modulation der Genexpression durch entsprechende Stimulation nachweisen (HERATH et al., 2009; FIJALKOWSKI et al., 2012; DUVEL et al., 2014). Duvel et al. (2014) zeigten, dass bei Kühen mit subklinischer Endometritis die Genexpression von IL8, $\text{TNF}\alpha$ und IL12 bei

peripheren Blut-Leukozyten signifikant erhöht ist. Besonders IL8 gilt als wichtiger Aktivator für PMN und wirkt stark chemotaktisch. Ebenso wirkt es stimulierend auf die Zelladhäsion, die Exozytose und Bildung von Superoxidanionen (BAGGIOLINI & CLARK-LEWIS, 1992). Neben der pro-inflammatorischen Komponente wirken Neutrophile über die Sekretion von immun-regulativen Zytokinen wie Interleukin 10 (IL10) auch anti-inflammatorisch (SCAPINI & CASSATELLA, 2014). IL10, als eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine, wird außer von Leukozyten auch von vielen weiteren myeloiden oder lymphoiden Zellen sezerniert. Der vorherrschende Zelltyp ist dabei abhängig vom betroffenen Gewebe und der Art der Infektion (akutes oder chronisches Geschehen). Unabhängig davon bewirkt IL10 eine Suppression der Makrophagen, der dendritischen Zellen und eine Limitierung der T-Helferzellen durch Runterregulation der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL1 β , IL6, TNF α) und Chemokinen (IL8) (COUPER et al., 2008).

Ein Zytokin, welches sowohl pro-als auch anti-inflammatorisch wirken kann, ist der CC-Chemokin-Ligand 20 (CCL20). Es wird von einer Vielzahl von Geweben gebildet und bindet an den CCR6-Rezeptor. Handelt es sich dabei um Treg-Zell-Rezeptoren (T-Helferzellen mit besonderen regulatorischen Funktionen), wird von diesen vermehrt IL10 oder TGF β (transforming growth factor beta) sezerniert, was zu einer Immunsuppression führt. Bindet CCL20 an TH17-Zellen, Neutrophile, Monozyten oder B-Zellen, wird die pro-inflammatorische Reaktion verstärkt. CCL20 wirkt chemotaktisch auf Lymphozyten und im geringeren Maß auf PMN. Bei diesen führt es zu einer Bildung von weiteren entzündungssteigernden Botenstoffen (COMERFORD et al., 2010).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte und Materialien

1.1. Geräte

Autoclav Selectomat Compact	Münchner Medizin Mechanik GmbH
Autoklav „D-65“	Systemec, Wetzlar
Automatisches Hämatologiegerät „Sysmex pocH-100iV Diff“	Sysmex Corporation, Kobe, Japan
Brutschrank „Incucell“	MMM Medcenter, Planegg
Brutschrank „Thermo Electron corporation“	ThermoFisher, München
Brutschrank „Thermo Scientific“	ThermoFisher, München
Brutschrank Incubator	Melag, Berlin
Dampfsterilisator „Varioklav®“	H+ P Labortechnik- Thermo Scientific, München
Eismaschine „ZBE 70-35“	Ziegra, Isernhagen
Experion	Biorad, Merck, USA
Kamera Leica Microsystems	Leica, Wetzlar
Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)	Einzelhandel
Laborwaage „Kern PU 360“	KERN Sohn GmbH, Balingen
Laborwaage „SBC22“	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Magnetrührer	IKA, Staufen
Metallrohr, chirurgischer. Stahl, Sonderanfertigung	Firma Mekon, Hannover
Mikroskop Aristoplan	Leitz, Stuttgart
Mikroskop Olympus BH-2	Olympus, München
Minishaker“MS 1“	IKA, Staufen

Nanophotometer Pearl	Implen, München
Pipetten, einstellbar (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl, 1-5 ml)	Biohit, Köln
Pipetten, einstellbar (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Brand, Wertheim
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-10 µl, 1-20 µl, 10-100 µl)	Gilson, Villers Le Bel, Frankreich
Reinstwassersystem „GenPure“	TKA, Niederelbert
Rüttelplatte „Wiseshake SHO 2D“	Witeg-Labortechnik-GmbH, Wertheim
Schüttler „Vortex Genius 3“	IKA, Staufen
sterile Werkbank Biowizard „Golden Line“	Kojair, Vilppula
Tiefkühlschrank -80°C	Angelantoni Industrie, Massa Martana, Italien
Tiefkühltruhe -80°C „Forma ULT Freezer“	Thermo Electron, Dreieich
Tischzentrifuge „Universal 32R“	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge „Z233 MK-2“	Hermle, Wehingen
Topical Thermocycler	Biometra, Jena
Vakuumpumpe „IBS Integra Vacuboy“	Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
Wasserbad „WBU-45“	Memmert, Schwabach
Werkbank UVC IT-M-AR	LFT Labortechnik GmbH, Wasserburg
Zentrifuge für 96 Wellplatte Universal 320	Hettich, Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge für Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Zentrifuge für Reaktionsgefäß 2 ml, Biofuge mini	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen

1.3. Material für das Probenentnahme-Instrumentarium

Alufolie	Roth, Karlsruhe
Arbeitskanal, chirurgischer, rostfreier Stahl (316LVM)	Mekon, Hannover
Biopsiezange mit Doppellöffel, Sonderanfertigung (Minibiosiezange, (650 mm, Außendurchmesser 3,0 mm))	BEMA Medical, Emmingen
celltip Abstrichbürstchen	mediware, Wesel
Draht (kunststoffummantelt)	Einzelhandel
Einmal-Skalpelle	Braun, Tuttlingen
FACS-Röhrchen mit 35 µm Siebdeckel, 5 ml	Becton Dickinson S. A., Heidelberg
Heißklebepistole	Einzelhandel
Interdentalbürstchen	DontoDent (DM)
Lineal	Einzelhandel
Merocel®-Material (PVA)	Medtronic, Meerbusch
Mikro-Schraubröhre 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pinzetten	Eickemeyer, Tuttlingen
Pipettenspitzen 1-10 µl weiß, 10-200 µl gelb und 100-1000 µl blau	Brand, Wertheim
Reaktionsfäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
Scheren	Eickemeyer, Tuttlingen
Schrumpfschlauch Ø1,0; E203950; WOER RSFR-H	Conrad Electronic, Hirschau
Schutzstab/Führungsstab, Kunststoff (79 mm x 3,2 mm x 2,2 mm)	SIMPROP Elektronik, Harsewinkel

Skalpellklingen	Roth, Karlsruhe
Wägeschiffchen, einmal	Zefa Laborservice, Harthausen

1.4. Material für Stimulationsversuche und molekularbiologische Untersuchungen

24-well-Platte für Zellkultur	Biochrom, Berlin
96-Well-Platte für PCR	4titude, Berlin
Deckgläser	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Einmal-Nitrilhandschuhe "Blue Nitril"	neoLab Migge, Heidelberg
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP, Trasadingen
Einmalspritzen,,BD Discardit™“ II (10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson S. A., Heidelberg
Einmal-Untersuchungshandschuhe, “Gentle skin® sensitive“	Meditrade, Kiefersfelden
Eppendorf-Reaktingefäße Rnase/Dnase frei 0,2 ml	Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktingefäße Rnase/Dnase frei 1,5 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Eppendorf-Reaktionsfäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
Experion Electrophorese Chip	Biorad, Mercurles, USA
Experion Electrophorese Prepeartion- Kid	Biorad, Mercurles, USA
Adhäsionsfolie für 96-Well-Platte PCR	4titude, Berlin
Heidelberger Verlängerung	Braun, Tuttlingen

innuSPEED Tissue RNA Kit	Analytica Jena, Jena
Insulinspritzen	Braun, Tuttlingen
Kanülen „BD Microlance™ 3“ (steril, 1,2 x 40 mm)	Becton Dickinson S. A., Heidelberg
Laborflaschen mit Gewinde (250 ml, 500 ml, 1000 ml)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen safe seal Tipps, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf
Objektträger	Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim
Pipettenspitzen "Biohit optifit Tip 5000 µl"	Biohit, Köln
Pipettenspitzen 1-10 µl weiß, 10-200 µl gelb und 100-1000 µl blau	Brand, Wertheim
QIAshredder® Spin-Säulen	QIAGEN, Hilden

1.5. Reagenzien

Biocoll	Biochrom, Berlin
Cytokeratin –Antikörper Z0622	Dako, Hamburg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-/RNA-Exitus	AppliChem, Darmstadt
dNTP-Mix	Promega, Madison, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12 Ham-F12 Nr. 6421	Sigma Aldrich, St. Louise
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Formalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Haema-Schnellfärbung mit gebrauchsfertigen Reagenzien	Labor+Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
K2-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
LPS Nr. L6529	Sigma Aldrich, St. Louise, USA
MM Sybergreen	Bioline, Luckenwalde
M-MLV RT 5x Reaction Buffer	Promega, Madison, USA
oligo dt Primer	Promega, Madison, USA
Penicilin-G (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Recombinant RNasin®	Promega, Madison, USA
RNAlater®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rnase/Dnase free Water	life Technologies, Carlsbad, USA
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Superscript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green® PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Trypsin 2,5%	Invitrogen, Karlsruhe
Vimentin-Antikörper M7020	Dako, Hamburg

1.6. Lösungen und Medien

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

PBS (Phosphate buffered Saline)-Trockensubstanz:

8,0 g NaCl

1,24 g KCl

0,2 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

Die Trockensubstanz wurde in 1.000 ml *Aqua tridest.* gelöst. Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Phosphatpuffer, doppelt konzentriert (2 x PBS)

19,08 g PBS-Trockensubstanz in 1.000 ml *Aqua dest.* gelöst

PEM: EDTA-Puffer zum Ablösen von Zellen

PBS + 0,2 M EDTA (500 ml PBS + 5 ml 0,2M EDTA)

Trypsin 0,5%

Trypsin 2,5% 1:5 mit PEM verdünnt (2 ml Trypsin 2,5% + 8 ml PEM)

EDTA-Puffer 0,76% zum Ablösen von Zellen

100 ml PBS-Puffer + 0,76 g EDTA

Medium Zellkultur ohne Antibiose

DMEM + FCS (10%) + Glutamin (2nM) (1%)

Medium Zellkultur mit Antibiose

DMEM + FCS (10%) + Glutamin (2nM) (1%) + Streptomycin/Penicillin-G (1%)

FCS

Fetales Kälberserum wurde bei 56°C über 30 min im Wasserbad hitzeinaktiviert und in 50 ml Aliquotos bei -20°C gelagert.

Einfriermedium

DMEM + DMSO (10%) + FCS (20%) + Glutamin (1%)

Antikörper

Die Antikörperfärbung für die Zellidentitätsprüfung der Epithelzellkultur (siehe II.2.1) wurde mit

Cytokeratin-Antikörper (Dako, Z0622) in Verdünnung 1:1.000 in PBS und

Vimentin-Antikörper (Dako, M7020) in Verdünnung 1:500 in PBS durchgeführt.

Anreicherungsboullion (LB-Medium)

Fa. Roth Artikelnummer.: x968.1: Verwendung nach Herstellerangaben

LPS

LPS (Sigma Nr. L6529) in Medium lösen

Herstellung von 0,5 ml Aliquots 1.000 ng/ml und lagern bei -21°C.

Vor Verwendung in einer Verdünnungsreihe auf 1 µg/ml verdünnen

Färbelösung für die Zytologie

Eosin-Methylenblau Lösung nach Wright (Merck 1383)

Lösungen für die PCR

Die Waschlotionen für die RNA-Präparation wurden gemäß Herstellerangaben in 96%igem Äthanol gelöst. Der Puffer und das Gel für die Microelektrophorese wurden gemäß Herstellerangaben verwendet.

Primer wurden nach ihrem Molekulargewicht zu 200 ng/ml mit *A. dest.* verdünnt.

2. Methoden

2.1. Zellkulturarbeiten

Für die späteren in-vitro-Versuche wurde im Vorfeld eine Uterusepithelzellbank erstellt.

2.1.1. Gewinnung primärer boviner Uterusepithelzellen (pbUEZ)

Die Organe zur Gewinnung primärer boviner Uterusepithelzellen (pbUEZ) stammten von frischtoten Kühen vom Schlachthof München. Nur Uteri mit Ovarien mit Corpus luteum in Blüte und ohne sichtbare klinische Auffälligkeiten wurden verwendet. Die ausgewählten Organe wurden präzervikal vom Gekröse abgetrennt und auf Eis in einem Thermobehältnis innerhalb von einer Stunde in das Labor verbracht und sofort weiterverarbeitet. Die weitere Isolation der pbUEZ aus dem uterinen Gewebe erfolgte nach laboreigenem Protokoll (LECHNER, 2008).

Alle verwendeten Medien wurden auf 37°C erwärmt. Vor Beginn der Präparation wurde das Organ mit PBS gewaschen, mit Küchenkrepp getrocknet und auf eine mit sterilisierter Alufolie bespannte Arbeitsfläche verbracht. Das Gelbkörpertragende Horn wurde freipräpariert und erneut mit PBS und Alkohol gewaschen. Anschließend wurde die Hornspitze entfernt und eine sterile Tupferprobe für die bakteriologische Untersuchung entnommen. Das Horn wurde viermal mit jeweils 20 ml PBS gespült und im Folgenden ein Polyvinylkatheter eingeführt, über den das Horn mit 0,76% EDTA-Lösung zur Lockerung des Epithelzellverbundes befüllt wurde. Die Spitze wurde ligiert und das Organ für 1h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurde das Horn sanft ausmassiert und steril auf ganzer Länge aufgeschnitten. Das eröffnete Organ wurde mittels Injektionsnadeln auf einer sterilen Arbeitsunterlage fixiert. Die vorgelösten oberflächlichen Endometriumsschichten wurden vorsichtig mit einem Metallspatel abgeschabt und in ein 50 ml Flacon mit DMEM + 10% FCS verbracht. Diese Zelllösung wurde dreimalig bei 150xg 8 min mit DMEM + 1% Penicillin/Streptomycin gewaschen und resuspendiert. Die Zelldichte wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, nachdem das Pellet in 2 ml DMEM + 10% FCS aufgenommen und gut resuspendiert wurde. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in 4 ml DMEM +10% FCS +1% Penicillin/Streptomycin ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte nach erkennbarer Zellinselbildung,

spätestens jedoch nach zwei Tagen.

2.1.2. Kultivierung der pbUEZ

Ein Mediumwechsel wurde spätestens bei Umschlag des Farbindikators des Mediums von Rot zu Gelb durchgeführt, durchschnittlich alle zwei bis drei Tage. Nach der Erstpassagierung erfolgte eine Aufteilung der Zelllinie: 50% der Zellen wurde mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin zum Kulturmedium kultiviert, die Kultivierung der restlichen Zellen erfolgte ohne Zusatz von Antibiotika. So konnte eine interne Kontrolle über eine mögliche Ursprungsverkeimung erreicht werden. Bei den in späteren Versuchen verwendeten Zellen handelt es sich um Zelllinien ohne Antibiotikazusatz.

Bei Erreichen eines Monolayers (>90%) wurden die UEZ passagiert und mit $1-2 \times 10^6$ Zellen pro 75er Zellkulturflasche ausgesät. Dazu wurde das in den Kulturflaschen enthaltene Medium verworfen und die Flaschen mit je 5 ml EDTA-Puffer zum Ablösen von Zellen (PEM) versehen. Es folgte eine Inkubation über 5 min bei 37°C und 5% CO₂ in PEM, wonach das PEM vorsichtig abgenommen wurde und pro Flasche 3 ml von 0,5% Trypsin zugegeben wurden. Innerhalb der Inkubationsdauer von 3 bis 6 min bei 37°C und 5% CO₂ wurde zum Lösen des Monolayers gegen den Flaschenboden geklopft. Durch Zugabe von 7 ml Medium wurde der Verdau gestoppt und die durch Resuspension erhaltene Zellsuspension in 15 ml Röhrchen überführt. Das durch Zentrifugation über 5 min bei 170xg erhaltene Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert und die Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.1.3. Kontrolle der Zellidentität

Die Kontrolle der charakteristischen histologischen Zellform („Kopfsteinpflaster“) wurde vor jeder Zellpassage, bei Mediumwechsel und vor der Kryokonservierung unter dem Lichtmikroskop bei 10- und 40facher Vergrößerung durchgeführt. Vor der Kryokonservierung wurde zusätzlich eine kombinierte Cytokeratin–Vimentin-Zellfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchgeführt, um die Epithelzellidentität zu bestätigen.

2.1.4. Kryokonservierung der pbUEZ

Für die Kryokonservierung wurde im ersten Schritt eine Passagierung entsprechend Protokoll durchgeführt (siehe III.2.1.2). Das durch Zentrifugation

über 5 min bei 170xg erhaltene Zellpellet wurde in kaltes Einfriermedium resuspendiert, mit jeweils 4 ml Medium pro 75er Zellkulturflasche. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in auf Eis kaltgestellte Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert und die Zellen bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen für die weitere Verwendung wurden die Zellen auf Eis in das Labor transportiert und in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Überführung der Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden vorsichtig 9 ml FCS dazu getropft. Nach Zentrifugation bei 220xg über 5 min konnte das erhaltene Pellet in 5 ml Medium und 5 ml FCS aufgenommen und ausgesät werden. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden.

2.2. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Bei den Spendertieren, deren Blut für die Isolierung von PMN entnommen wurde, handelte es sich um Kühe der Rasse deutsches Fleckvieh des Lehr- und Versuchsguts der LMU München in Oberschleißheim. Alle verwendeten Tiere waren klinisch gesund, nicht-trächtig und trockenstehend. Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes, Regierung von Oberbayern, Geschäftszeichen 55.2-1-54-2532.0-85-14.

2.2.1. Blutentnahme

Autoklavierte 200 ml Glasflaschen mit Schraubverschluss wurden im Vorfeld mit 50% der für das vorgesehene Blutvolumen benötigten EDTA-Lösung bestückt und lichtgeschützt auf Eis transportiert. Die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena jugularis*. Über eine Heidelberger Verlängerung wurde das Blut in die Glasflasche geleitet und nach der Hälfte des zu entnehmenden Blutvolumens die restliche EDTA-Lösung hinzugegeben. Insgesamt wurden pro Milliliter Vollblut 5 µl einer 0,6 molaren EDTA-Lösung verwendet. Die fraktionierte EDTA-Zugabe diente der Minimierung des Zellstress durch zu hohe Anfangskonzentrationen von EDTA. Die Isolation der PMN erfolgte innerhalb von 30 min; das Blut wurde bis zur Separation auf Eis gehalten.

2.2.2. Isolation von PMN aus dem Blut

Für die Isolation von PMN wurden jeweils 15 ml Vollblut mit 15 ml PBS 1:1 in einem 50 ml Falcon verdünnt. In einem weiteren 50 ml Falcon vorgelegte 15 ml Biocoll® wurden vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet. Im Anschluss

erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation bei 1.300xg über 30 min bei 10°C ohne Bremse. Die vom Erythrozytensediment abgespaltene Plasma- und Interphase wurde abgenommen und verworfen. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde eine zweifache hypotone Lyse mit *Aqua dest.* durchgeführt. Dazu wurde das Sediment auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und resuspendiert. Im Folgenden wurden 20 ml *Aqua dest.* hinzugefügt und das Falcon geschwenkt. Nach 20 s wurde die Lyse durch Zugabe von 20 ml 2-fach konzentriertem PBS gestoppt und das Flacon bei 220xg für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde abgekippt und die Lyse wiederholt. Zum Waschen der Granulozyten wurde das gewonnene Zellpellet mit 20 ml PBS resuspendiert und bei 220xg für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde das Zellpellet nach Abkippen des Überstandes in Zellkulturmedium aufgenommen und gut resuspendiert. Von der Zelllösung wurden 150 µl in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und im automatischen Hämatologiegerät Sysmex® ausgewertet.

2.3. Probenentnahme-Instrumentarium

Zur Gewinnung von bovinen uterinen Sekretproben bei weitgehend geschlossener Zervix im Diöstrus wurde ein Probenentnahme-Instrumentarium konzipiert und konstruiert. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus zwei konventionellen, etablierten, diagnostischen Untersuchungsmethoden bzw. -instrumenten für die subklinische Endometritis des Rindes (Zytobrush und Biopsie) mit einer Schwämmchen-Saugtechnik zur Sekretgewinnung aus dem diöstrischen bovinen Uterus.

Aufbau des kombinierten Probenentnahme-Instrumentariums:

- Arbeitskanal
- Schutzstab
- Merocel®- Schwämmchen
- Minizytobrush
- Minibiopsiezange

Arbeitskanal: Der verwendete Arbeitskanal wurde von der Firma Mekon aus Hannover hergestellt. Bei dem Material handelt es sich um chirurgischen, autoklavierbaren, rostfreien Stahl (316LVM) mit einem Außendurchmesser von 3,750 mm, Innendurchmesser 3,390 mm und einer Wandstärke von 0,180 mm

(siehe Abbildung 2). Insgesamt wurden vier Arbeitskanäle in zwei verschiedene Längen zugeschnitten (63,7 cm und 56,2 cm). Zur Minimierung der Verletzungsgefahr der Zervix und des Uterus während der Probenentnahme wurden die Schnittenden abgerundet.



Abbildung 2: Arbeitskanal mit innenliegendem Schutzstab. Der Schutzstab (hellgrau, innerhalb des Arbeitskanals, an der Spitze sichtbar) verschließt während der Passage der Cervix uteri den Arbeitskanal und verhindert durch das abgerundete Ende eine Verletzung des Gewebes.

Schutzstab: Der Arbeitskanal wurde während der transzervikalen Passage in den Uterus von einem eingelegten Schutzstab verschlossen, um eine Verunreinigung des Kanals mit Zervikalschleim zu verhindern. Als Schutzstab wurden flexible Kunststoffrohre der Firma SIMPROP Electronic mit 900 x 3,2 x 2,2 mm verwendet. Die Rohre wurden auf die benötigte Länge zugeschnitten und die Spitze des Schutzstabes mit Plastikkleber abgerundet (siehe Abbildung 2).

Merocel®- Schwämmchen: Als Saugschwämmchen für die Uterussekretentnahme wurde Merocel®-Material der Firma Medtronic, ein Polyvinylacetat (PVA) Schwammmaterial, verwendet. Die Schwämmchen wurden zunächst jeweils per Hand auf eine Größe von 9,4 cm x 0,3 cm (= 2,82 cm²) zugeschnitten. Im zweiten Schritt wurden die Schwämme nach Zuschnitt in der Semi-Mikroanalysewaage auf 0,06 g eingewogen und hierzu gegebenenfalls gekürzt. Zur Verwendung im Probenentnahme-Instrumentarium wurden die Schwämmchen in sich verdrillt und mittels Heißklebepistole an der Spitze eines Kunststoffrohres, das als Führungsstab dient, befestigt (siehe Abbildung 3). Bei dem Kunststoffrohr handelt es sich um das gleiche Material wie bei dem zuvor verwendeten Schutzstab des Arbeitskanals.

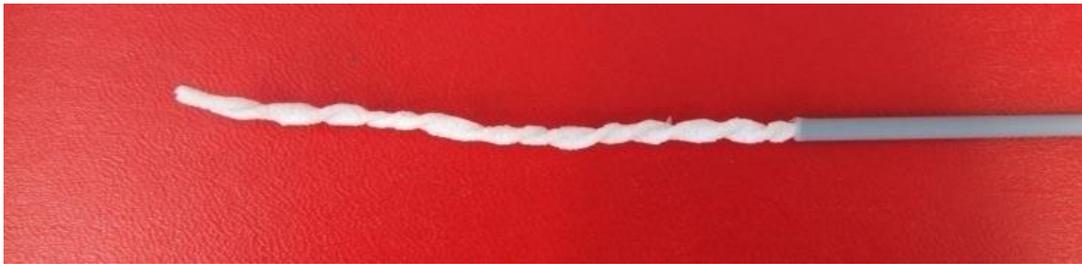


Abbildung 3: Merocel®-Schwämmchen mit Führungsstab. Das Schwämmchen wird zur erleichterten Führung durch den Arbeitskanal in sich verdrillt.

Minizytobrush: Für die Durchführung von zytologischen endometrialen Abstrichen wurden Interdentalbürstchen der Firma DontoDent verwendet. Diese werden im Folgenden als „Minizytobrush“ bezeichnet (siehe Abbildung 4). Die Minizytobrush sind konisch geformt, mit einem Durchmesser von 2,5-4,5 mm. Der innenliegende Metalldraht wurde über einen Schrumpfschlauch (Firma Conrad) mit einem Führungsdraht verbunden. Als Schutz der Minizytobrush während der Zervixpassage wurde ein flexibles Kunststoffrohr (wie oben beschrieben) verwendet und die Minizytobrush über den Führungsdraht innerhalb des Kunststoffrohres bewegt.



Abbildung 4: Größenvergleich der konventionellen Zytobrush mit der Minizytobrush. Links: konventionelle Zytobrush, rechts: Minizytobrush ohne Führungsdraht; Maßstab in Millimeter

Minibiopsiezange: Bei der verwendeten vergleichsweise kleinformatischen Biopsiezange handelt es sich um eine Sonderanfertigung der Firma BEMA Medical mit Doppellöffel-Aufsatz (siehe Abbildung 5). Im Folgenden wird die

verkleinerte Biopsiezange als „Minibiopsiezange“ bezeichnet. Die Gesamtlänge des Instrumentes beträgt 65 cm mit einem Außendurchmesser von 3,0 mm.



Abbildung 5: Größenvergleich der Minibiopsiezange mit einer herkömmlichen Uterus-Biopsiezange. Unten: neue Minibiopsiezange, oben: konventionelle Uterusbiopsiezange für Kuh und Stute; Maßstab in Millimeter

2.4. Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen und Auswertungen aller gewonnenen uterinen Gewebeproben der Vor- und Hauptversuche erfolgte durch das Institut für Veterinär-Pathologie unter Leitung von Prof. Dr. H.-A. Schoon in Leipzig. Die Auswertung und Beurteilung der Proben erfolgte nach etablierten Methoden (MERBACH, 2011; RODENBUSCH, 2011). Dementsprechend wurden die Proben in Paraplast eingebettet und 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt. Als Übersichtsfärbung wurde die Hämalaun-Eosin-Färbung angewendet. Die histologische Untersuchung wurde nach institutsüblichem Schema durchgeführt und beinhaltet die Befundung des luminalen Epithels, des Stratum compactum, des Stratum spongiosum, der Uterindrüsen, des Stromas und der Blutgefäße. Für eine weitere und detaillierte Darstellung der Biopstat-Beurteilung wird auf die entsprechende Dissertationsschrift hingewiesen (RODENBUSCH, 2011).

2.4.1. Beprobung von Schlachtuteri zur Evaluierung der Beurteilbarkeit entzündlicher endometrialer Alterationen in Minibiopaten (Vorversuch 1)

Für die Evaluierung der Auswertbarkeit minimierter Uterusbiopate wurden im Vorversuch neun Schlachtuteri vom Schlachthof München „Münchner Schlachthof Betriebs GmbH“ untersucht. Pro Schlachtorgan wurden jeweils zwei Minibiopate angefertigt. Die Uteri wurden präzervikal mit dem Skalpell vom Gekröse getrennt und direkt am Schlachthof an einem gesonderten Arbeitsplatz beprobt. Im ersten Schritt wurde der Arbeitskanal des Probenentnahme-Instrumentarium durch die geschlossene Cervix uteri in das Uteruslumen eingeführt. Aus jedem Uterushorn der Schlachtorgane wurde ein Minibiopat entnommen, so dass pro Uterus zwei Minibiopate unterschiedlicher Lokalisation verglichen werden konnten. Die Minibiopate wurden in Formalin fixiert und bei 7°C gekühlt im Dunkel gelagert. Die Untersuchung und Bewertung der gesammelten Biopate am Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig wurde auf die Aussagekraft der Minibiopate zur Beurteilung entzündlicher endometrialer Alterationen beschränkt.

2.4.2. Untersuchungen über die Verteilung von endometrialen entzündlichen Alterationen im Gesamtorgan mittels Minibiopaten und Organquerschnitten (Vorversuch 2)

Für die Analyse der räumlichen Verteilung von endometrialen entzündlichen Alterationen im Gesamtorgan wurden im Vorversuch 2 Gewebeproben aus fünf Rinder-Uteri am Schlachthof München gewonnen. Pro Schlachtorgan wurden mit der Minibiopsiezange an fünf Lokalisationen pro Horn und einer weiteren am Corpus uteri insgesamt 11 Minibiopate entnommen (siehe Abbildung 6). Vom selben Organ wurden im Anschluss an die Minibiopsien 4 Organquerschnitte mit dem Skalpell an Uterusspitze, Mitte des Horns, caudalem Hornenteil und Corpus uteri gewonnen (siehe Abbildung 7). Bei den untersuchten Uteri handelte es sich um Organe von zum Zeitpunkt der Schlachtung nicht-graviden Rindern unterschiedlicher Größe, ohne makroskopisch auffällige pathologische Veränderungen.

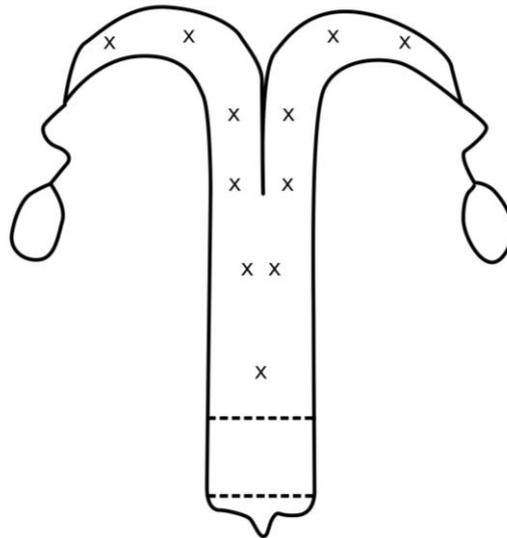


Abbildung 6: Lokalisation der Minibiopsate im Vorversuch 2. Pro Uterus (n=5) wurden fünf Biopsien pro Horn und eine am Corpus uteri mit der Minibiopsiezange genommen (pro Uterus insgesamt 11 Biopsien). Kreuze markieren die Lokalisationen der Minibiopsate.

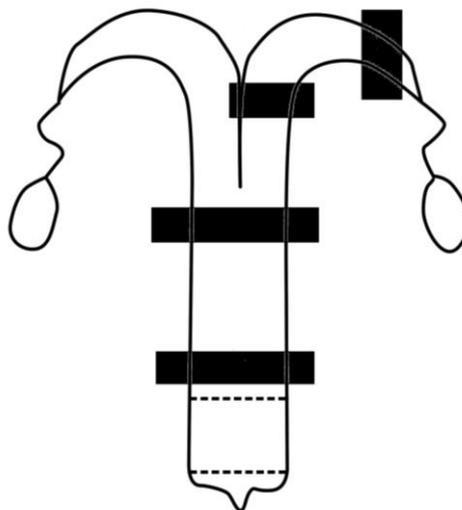


Abbildung 7: Lokalisation der Querschnittsproben im Vorversuch 2. Pro Uterus (n=5) wurden nach Durchführung der Minibiopsien (siehe Abbildung 6) vier Querschnitte (1 cm Breite) des Schlachtorgans angefertigt. Kästchen markieren die Lokalisationen für die Entnahme der Uterusquerschnittpräparate.

2.5. Voruntersuchung und Gruppeneinteilung der Tiere am Schlachthof

In der Arbeit wurden nur die Schlachtorgane (separierte Uteri) mit dem Probenentnahme-Instrumentarium nach dem Tod des Tieres beprobt. Es erfolgte außer einer adspektorischen Kontrolle keine Untersuchung lebender Tiere. Die Bezeichnung Probestier/Tier beschreibt ausschließlich das Schlachtorgan.

Die Gewinnung von bovinen uterinen Sekretproben erfolgte am Schlachthof Buchloe, Vion GmbH. Mit einem im Vorfeld erstellten Anamnesebogen (siehe Anhang Abbildung 19) wurden potentielle Probanden vor der Schlachtung separiert. Die vorausgewählten Tiere wurden adspektorisch untersucht. Sie durften keine Anzeichen für systemische Erkrankungen oder schwerwiegende lokale Befunde wie Mastitis oder äußere Verletzungen aufweisen. Es erfolgte eine Voreinteilung der Tiere in zwei Gruppen mit spezifischen Anforderungen:

- Gynäkologisch unauffällige, multipare Kühe: mindestens eine unproblematische Trächtigkeit, keine Geburtsprobleme, keine Nachgeburtsverhaltung, keine Behandlung wegen Reproduktionsstörungen, mindestens drei Monate p.p., Schlachtung auf Grund anderer Ursache als Subfertilität/Infertilität (z.B. Alter, Leistung Betriebsaufgabe, 3-Strichigkeit)
- Multipare Kühe mit ausbleibender Trächtigkeit ohne erkennbare Ursache seit letzter Geburt: Mindestens eine unproblematische Trächtigkeit, mehrfach erfolglose Besamung (mindestens 2x) vor Schlachtung, keine klinisch diagnostizierbaren gynäkologischen Erkrankungen (wie z.B. Ovarialzysten, Verletzungen, Azyklie), mindestens drei Monate p.p., Schlachtgrund Subfertilität/Infertilität

Entsprechende Kühe wurden mit einem Viehmarkierungsstift gekennzeichnet und gesammelt zur Schlachtung geschickt.

Im nachfolgenden Schlachtungsablauf wurden die Uteri der Probestiere am Gekröseband im präzervikalen Bereich vom restlichen Gekröse abgetrennt, markiert und an einen separaten Arbeitsplatz transportiert. Es folgte eine adspektorische und palpatorische Untersuchung der Uteri auf Zyklusstand, Symmetrie der Uterushörner, pathologische Veränderungen wie Ödematisierung, Rötung, Fluktuation etc. Es wurden nur Uteri mit Blütegelbkörper beprobt.

2.6. Anwendung des neuen Probenentnahme-Instrumentariums

2.6.1. Probengewinnung und-aufbereitung am Schlachthof

Die ausgewählten Uteri wurden mit Wasser, dann mit 70%igem Ethanol gereinigt und auf einer mit sterilisierter Alufolie bespannten Arbeitsfläche beprobt. Im ersten Schritt wurde unter sterilen Bedingungen der zuvor autoklavierte Arbeitskanal mit innenliegendem Schutzstab transzervikal bis zum Ende der großen Krümmung des gelbkörpertragenden Horns vorgeschoben. Im nächsten Schritt wurde der Schutzstab entfernt und das Schwämmchen durch den Arbeitskanal in das Horn eingeführt. Unter langsamen drehenden Bewegungen wurde der Arbeitskanal zusammen mit dem Schwämmchen in Richtung Uteruskörper zurückgezogen, bis das Schwämmchen in voller Länge im Uterushorn zu liegen kam. Jedes Schwämmchen wurde vier Minuten im Horn belassen (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Lage des Merocel®-Schwämmchens im aufgeschnittenen Uterushorn. Blutkontaminationen am Schwämmchen sind Folge der Schnittinzision entlang des Uterushorns zu Präsentationszwecken.

Das vollgesaugte Schwämmchen wurde vorsichtig durch den Arbeitskanal aus dem Uterus herausgezogen. Das Schwammmaterial wurde mit einer sterilen Schere bündig vom Führungsstab abgeschnitten, in ein leeres Microtube mit

Schraubverschluss gegeben und auf Eis gestellt. Die Verluste durch das Abschneiden der Schwämmchen vom Führungsstab nach der Probenentnahme wurden durch Abzug von 0,004 g vom ursprünglichen Schwammgewicht in der Verdünnungsformel (siehe III.2.6.2) berücksichtigt. Das Gewicht der vollgezogenen Schwämmchen wurde mit einer Mikroanalysewaage zur Bestimmung des Verdünnungsfaktors der uterinen Sekretproben protokolliert. Sofort nach der Gewichtsbestimmung wurden die Schwämme in mit 500 µl PBS beladene Microtubes mit Schraubverschluss gegeben und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten.

Im Anschluss erfolgte die zytologische Beprobung des Organs. Dazu wurde das Minizytobrush-Instrument geschützt im zugehörigen Plastikrohr durch den Edelstahl-Arbeitskanal bis zur großen Krümmung des gelbkörpertragenden Horns vorgeschoben und die anschließend aus dem Plastikrohr vorgeschobene Minizytobrush vorsichtig einmal um 360° auf dem Endometrium gedreht. Der zytologische Abstrich wurde direkt auf einem Objektträger ausgestrichen und in Objektträger-Transportbehältern in die Klinik transportiert.

Um die Gefahr einer eventuellen Blutkontamination der Proben zu minimieren, wurde die Uterusbiopsie zum Schluss durchgeführt. Die Minibiopsiezange wurde, unter palpatorischer Kontrolle durch die Uteruswand, bis zum Ende der großen Krümmung des gelbkörpertragenden Horns vorgeschoben. Die Uteruswand wurde von außen vorsichtig in den geöffneten Doppellöffel der Minibiopsiezange hineingedrückt und das Biopat durch Schluss der Zangenschenkel bei Zug am Gewebe entnommen. Die Gewebeprobe wurde direkt in 4%iges Formalin gegeben und auf Eis in die Klinik transportiert. Nach Abschluss der Probengewinnung wurden die Uteri jeweils der Länge nach eröffnet und auf äußerlich nicht sichtbare pathogene Veränderungen untersucht.

Für den Vergleich der Minizytobrush mit der konventionellen Zyobrush wurden bei 10 Uteri zusätzlich zytologische Ausstriche mit konventionellen Zytobrush gewonnen. Dazu wurden konventionelle Büsten (celltip Abstrichbürstchen) verwendet. Die Abstrichbürstchen wurde für die Beprobung auf einem Gestell befestigt (vgl. (KASIMANICKAM et al., 2005).

Vor der Durchführung des Hauptversuches wurde die Anwendung des Probenentnahme-Instrumentariums in einem Vorversuch an zwei Uteri erfolgreich

getestet. Es wurden mit der beschriebenen Methode insgesamt 38 Uteri beprobt (2 Uteri im Vorversuch, 36 Uteri im Hauptversuch). Nur die 36 Proben aus dem Hauptversuch wurden ausgewertet.

2.6.2. Probenaufarbeitung im Labor

Im klinikeigenen Labor wurden die mit Uterussektret und PBS beladenen Schwämmchen auf Rundbodenröhrchen mit integriertem Zellsieb mit einer Filtergröße von 35 µm überführt und eventuelles Restvolumen von PBS in den Microtubes zu den Schwämmen hinzu pipettiert. Die beladenen Filterröhrchen wurden bei 4.000xg über 30 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Zentrifugation erfolgte ein zweites Waschen der Schwämmchen durch langsame Zugabe von 400 µl PBS. Nach fünfminütiger Inkubation, zur vollständigen Aufnahme des PBS durch das Schwämmchen, wurde erneut bei 4.000xg, 30 min und 4°C zentrifugiert. Aus dem Schwämmchen konnten nach Spülung mit PBS pro Schwamm mindestens 700 µl zurückgewonnen werden. Das gewonnene Probenvolumen wurde in 400 µl und 300 µl Aliquots je Probe bei -20°C asserviert.

Berechnung der gewonnenen Uterussektretmenge:

Zur Bestimmung der intrauterin gewonnenen Flüssigkeitsmenge nach Zentrifugation und Waschen des Schwämmchens wurde zunächst der Verdünnungsfaktor (VF) mit Hilfe einer mehrfach beschriebenen Formel berechnet (ROHAN et al., 2000; CASTLE et al., 2004; MARKS et al., 2012):

$$VF = [(x - y) + 0,9 \text{ g Puffer}] / (x - y)$$

x= Schwammgewicht nach Probengewinnung (ohne Verdünner)

y= Schwammgewicht trocken

0,9 g entspricht der insgesamt zugegebenen PBS Menge

Das reine Probenvolumen in den gewonnenen 700 µl Probenflüssigkeit nach Waschung wurde mit Hilfe des ermittelten Verdünnungsfaktors bestimmt:

$$\text{Reines Probenvolumen} = 700 \mu\text{l} / VF$$

Alle verwendeten Instrumente wurden nach Verwendung gereinigt und mit Alkohol desinfiziert. Minizytobrush- und Schwämmchenmaterial wurde entsorgt. Arbeitskanal, Minibiopsiezange und das Gestell der konventionellen Zytobrush wurden autoklaviert.

Die fixierten Minibiopate wurden im Kühlschrank bei 7°C gelagert und gesammelt zur Auswertung an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig unter Leitung von Prof. Dr. H.-A. Schoon geschickt (siehe III.2.4)

2.7. Zytologische Untersuchungen

Die direkt im Schlachthof angefertigten zytologischen Ausstriche wurde im klinikeigenen Labor mittels Haema-Schnellfärbung nach Herstellerangaben (Labor + Technik LT-SYS®, Eberhard Lehmann GmbH) gefärbt. Diese Färbemethode wurde zur Schnellfärbung von Blutausstrichen und anderem klinischen Material für die in-vitro-Diagnostik entwickelt und ergibt vergleichbare Ergebnisse wie die Pappenheim-Färbung, wobei die Anfärbezeiten wesentlich verkürzt sind.

Durchführung:

1. Objektträger für 5 s in die Fixierlösung tauchen und abtropfen lassen
2. Objektträger für 5 s in Farblösung 1 (rot, Eosin) tauchen, abtropfen
3. Objektträger für 5 s in Farblösung 2 (blau, Azur) tauchen, abtropfen
4. Abspülen mit *Aqua dest.* und trocken lassen.

Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Es wurden je 300 kernhaltige Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil an PMN bestimmt.

Die Beurteilung der mit konventionellen Zytobrush angefertigten Ausstriche erfolgte identisch. Die Auszählung der Ausstriche erfolgte ohne Kenntnis der Anamnese durch denselben Untersucher für alle Proben.

2.8. Bakteriologische Untersuchungen

Alle gesammelten Uterussekretproben wurden vor der Verwendung in Folgeversuchen bakteriologisch untersucht. Die gefrorenen Proben wurden bei

Raumtemperatur aufgetaut und jeweils 20 µl Probe zu einer auf 37°C vorgewärmten Anreicherungsbouillon gegeben. Nach einer Inkubation über 24h bei 37°C wurden 3-Ösen-Ausstriche auf Schafblutager angefertigt und nach 24h begutachtet. Bei vorliegendem Koloniewachstum wurden die Agarplatten zur weiteren Charakterisierung mittels Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) an das Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der LMU München (Leitung: Prof. Dr. R. Straubinger, Bearbeitung der Proben durch Dr. G. Wolf) gesandt.

2.9. Stimmulationsversuche mit Uterussektret

Zum besseren Verständnis von Pathogenesemechanismen der bovinen Endometritis wurden in-vitro-Stimmulationsversuche von UEZ oder aus dem peripheren Blut isolierten PMN mit Uterussektret durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der UEZ-Stimmulationsversuch durchgeführt (siehe III.2.9.1). Der gewonnene Zellkulturüberstand wurde dann im PMN-Stimmulationsversuch weiterverwendet (siehe III.2.9.2).

2.9.1. pbUEZ-Stimmulationsversuch

Für die Stimmulationsversuche wurden die kultivierten primären bovinen Uterusepithelzellen (pbUEZ; kurz UEZ) entsprechend Protokoll (siehe III.2.1.2) gelöst und mit einer Konzentration von 200.000 Zellen/well in einer 24-well - Platte in 500 µl Medium + 10% FCS pro well ausgesät. Die Platten wurden bei 37°C und 5%CO₂ bis zum Erreichen eines Monolayers (>90%) über 2-3 Tagen inkubiert. Bei Umschlag des Farbindikators wurde ein Mediumwechsel durchgeführt (vgl. III.2.1.2). Die Uterussektretproben wurden entsprechend des jeweilig ermittelten Verdünnungsfaktors auf 12 µl unverdünnte Ursprungsprobe in Medium auf ein Gesamtvolumen von 400 µl pro well eingestellt und nach Abnahme des Zellkulturmediums in die wells zu den UEZ gegeben. Als Vergleichsstimmulation (Positivkontrolle) wurde LPS mit einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Als (Negativ-)Kontrolle wurde Zellkulturmedium (DMEM) verwendet.

Es folgte eine Inkubation über vier Stunden bei 5% CO₂ und 37°C. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand vorsichtig abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Für die spätere RNA-Isolation wurden die Epithelzellen mit 300 µl Lysepuffer pro

well lysiert und das Lysat bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Alle Proben wurden im Doppelansatz prozessiert.

2.9.2. PMN-Stimulationsversuch

Die isolierten PMN wurden auf 2×10^7 Zellen je ml Medium + 1% Glutamin eingestellt und jeweils 500 μl Zelllösung (entspricht 1×10^7 Zellen) in vorgeschriebene Eppendorf Gefäße gegeben. Als Stimulanz wurde der asservierte Überstand aus der vorherigen UEZ-Stimulationsreihe verwendet (siehe III.2.9.1). Pro 1×10^7 PMN wurden 300 μl Epithelzellkulturüberstand mit enthaltener Uterussekretprobe hinzugegeben. Als Vergleichsstimulationsgruppe wurde LPS mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Als Kontrolle wurde Zellkulturmedium (DMEM) verwendet. Es folgte eine Inkubation über 3h bei 37°C und 5% CO_2 . Im Anschluss wurde die Zelllösung bei 800xg über 8 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Zu dem erhaltenen Zellpellet wurden pro Ansatz 300 μl RNAlater hinzugegeben und gut resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 7°C lichtgeschützt aufbewahrt.

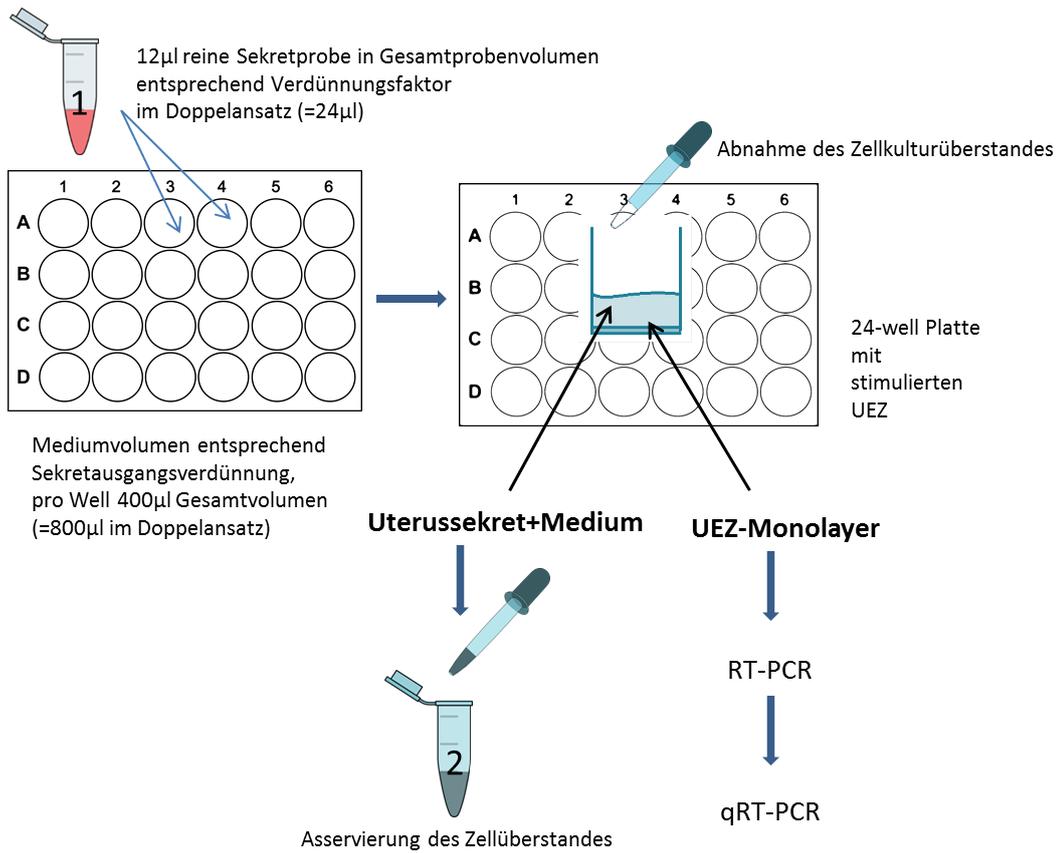


Abbildung 9: UEZ-Stimulationsversuch (Schemazeichnung). Links: UEZ-Inkubation mit 12 µl Sekretprobe (1) in 400 µl Gesamtlösung, Rechts: Abnahme Zellkulturüberstand (2) mit Asservierung. Der UEZ Monolayer wurde lysiert und eine mRNA Expressionsanalyse durchgeföhrt.

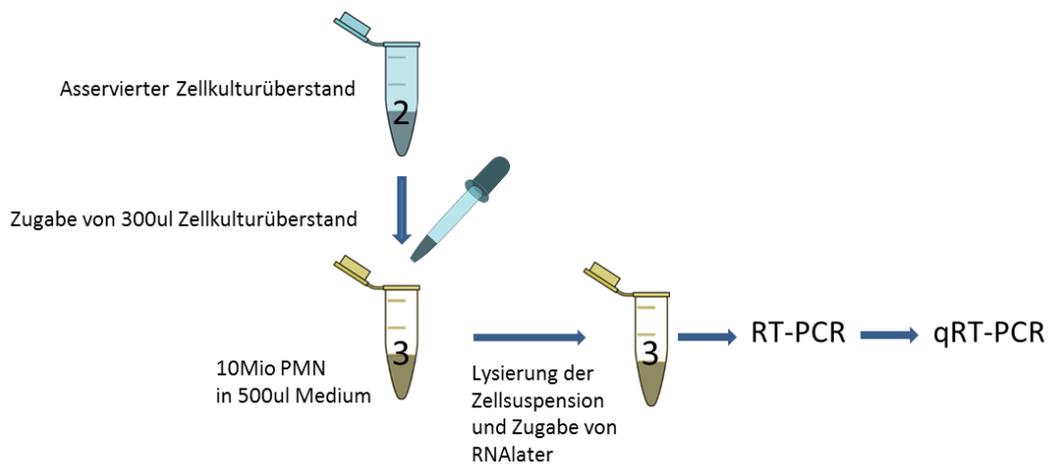


Abbildung 10: PMN-Stimulationsversuch (Schemazeichnung). (2): Asservierter Zellkulturüberstand (siehe Abbildung 9) (3): PMN in Medium mit 300 µl aus (2); nach Lyse der PMN folgt die Genexpressionsanalyse.

2.10. Molekularbiologische Untersuchungen

Die Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene wurden mit einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Dabei ist über Reverse Transkription (RT) der RNA mit nachfolgender Polymerasekettenreaktion (PCR) ein quantitativer Nachweis spezifischer Zielgene zur Durchführung von Expressionsstudien möglich.

2.10.1. tRNA-Extraktion

Die Extraktion der total-RNA (tRNA) aus den UEZ und PMN wurde mit einem kommerziellen RNA-Isolationskit durchgeführt (siehe III.1.4).

2.10.1.1. tRNA-Extraktion der UEZ

Die in Lysepuffer bei -82°C konservierten Epithelzellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Extraktion der tRNA wurde mit einem kommerziellen RNA-Isolationskit mit Absorptionsfilter bei Raumtemperatur durchgeführt. Das komplette Lysat wurde auf den ersten Filter des Kits überführt und bei $10.000\times g$ für 2 min zentrifugiert. Das gewonnene Eluat enthält die tRNA und wurde 1:1 mit 70%igem Ethanol verdünnt. Die Lösung wurde auf den zweiten Filter gegeben und erneut zentrifugiert. In diesen Schritt wurde die tRNA an die Filtermembran gebunden. Nach zwei Waschschritten und anschließender Trockenzentrifugation wurde die tRNA mit 80 μl RNase-freiem Wasser wieder gelöst und die gelöste tRNA durch Zentrifugation bei $6.000\times g$ für 1 min in ein Reaktionsgefäß überführt.

2.10.1.2. tRNA-Extraktion der PMN

Die in RNALater® konservierten PMN wurden im Reaktionsgefäß bei $10.000\times g$ über 2 min zentrifugiert und der RNALater®-Überstand abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von 400 μl Lysepuffer pro Reaktionsgefäß und sorgfältiger mehrfacher Resuspension über 5 min wurde das Lysat auf QIAshredder® Spin-Säulen gegeben und für 2 min bei $12.000\times g$ zentrifugiert. Die Extraktion der tRNA aus dem aufgereinigten Lysat erfolgte anschließend mit einem kommerziellen RNA-Isolationskit entsprechend der RNA-Extraktion aus den UEZ (vgl. III.2.10.1.1).

2.10.1.3. RNA-Integritätsprüfung

Die Überprüfung der RNA-Integrität nach Extraktion erfolgte mittels automatisierter Gelelektrophorese im Experion™ System. Dieses besteht aus Analysekit (Reagenzien und Chip für jeweils 12 Proben), Priming Station, Vortexer und einer Station für die Gelelektrophorese.

Der Chip wurde nach Herstellerangaben präpariert und anschließend mit 1 µl je RNA-Probe beladen. Nach Mischung im Vortexer erfolgt die Auswertung der Gelelektrophorese über die Experion™ Software. Die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA sowie fragmentierte RNAs werden mittels Kapillar-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und in einem Elektropherogramm sowie als virtuelles Gelbild dargestellt. Zusätzlich zu dem 28S/18S-rRNA-Verhältnis wird zur Einstufung der RNA-Integrität ein Zahlenwert generiert, der RNA QualityIndex (RQI). Die Spannweite des Index beläuft sich auf 1 für denaturierte RNA bis 10 für intakte, nicht degradierte oder fragmentierte RNA (BECKER, 2009). Im Weiteren wurden nur Proben mit einem $RQI \geq 7$ verwendet.

2.10.2. Gewinnung der cDNA durch Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA durch Reverse Transkription der tRNA wurde mit Hilfe der M-MLV Reverse Transkriptase durchgeführt. Die Verwendung von Oligo(dt)-Primern ermöglichte ein selektives Umschreiben der messengerRNA (mRNA) Fraktion innerhalb der tRNA in cDNA, wobei die Transkription nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Tabelle 2 zeigt das angewandte Gesamtprotokoll.

Tabelle 2: Reverse Transkription für die cDNA-Synthese. Primer- und Reaktionsmix

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
Oligo dt15 Primer	1	0,5µg/µl
tRNA Probe	10	
Zwischenvolumen	11	
M-MLV RT 5x Puffer®	5	1x
dNTP-Mix	1,25	10 mM
RNasin	0,625	2,5 U/µl
M-MLV RT®	0,5	40 U/µl
H ₂ O RNase free	6,625	
Endvolumen	25	

Dargestellt ist das Gesamtprotokoll für die RT-PCR; der obere Abschnitt zeigt die Zusammensetzung des Primermixes, der untere Abschnitt die des Reaktionsmixes.

Je 10 µl tRNA-Probe wurde mit 1 µl Oligo(dt)Primer versetzt und im Thermocycler auf 70°C über 5 min erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Im zweiten Schritt wurden zu den mit Primern versetzten RNA-Proben 14 µl des Reaktionsmix gegeben und die Transkription der cDNA im Thermocycler nach Protokoll durchgeführt. So erfolgte, nach einer 10minütigen Inkubation bei 40°C, die Transkription bei 48°C über 50 min, mit anschließender Inaktivierung der RT bei 70°C.

Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur wurde die cDNA-Konzentration im Mikrophotometer bestimmt und die Proben mit RNase freiem Wasser einheitlich auf 200 ng/µl eingestellt.

Die Konservierung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.10.3. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht die Quantifizierung von PCR-Produkten am Ende eines jeden Amplifikationszyklusses. Sie besteht, wie die konventionelle PCR, aus drei Schritten: (i) die Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge durch Einschmelzung, (ii) Anlagerung der spezifischen Primer (siehe Tabelle 4) und schließlich (iii) die Elongation der gesuchten

DNA-Fragmente im dritten Schritt. Der Ablauf dieser drei Schritte entspricht einem Zyklus, wobei eine vollständige PCR 40 bis 50 Zyklen umfasst. Der quantitativen Messung der gebildeten DNA-Fragmente dient ein zu den Reaktionsgefäßen gegebener fluoreszierender Farbstoff (SybrGreen). Dieser interkaliert mit der neugebildeten doppelsträngigen DNA und fluoresziert grün im direkten Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA.

Als Cycle threshold (Ct) wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenz der gebildeten DNA das Hintergrundsignal übersteigt. Er stellt ein relatives Maß für die Anzahl der Startkopien in einer Reaktion dar. Der Ct-Wert korreliert direkt mit der ursprünglichen Kopienzahl an cDNA der eingesetzten Probe, und somit mit der ursprünglichen mRNA-Startmenge. Bei einer großen Menge an ursprünglicher mRNA liegen niedrige Ct-Werte vor: hohe Ct-Werte weisen auf einen geringen mRNA-Gehalt hin.

Nach den Amplifikationszyklen wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese dient der Abgrenzung unspezifisch entstandener doppelsträngiger DNA Fragmente vom dem gesuchten DNA-Produkt.

Die qRT-PCR wurde mit einem vorgefertigten Mastermix (siehe Tabelle 3) durchgeführt, der an einem isolierten Arbeitsplatz zusammengefügt wurde.

Tabelle 3: Mastermix-Zusammensetzung für qRT-PCR

Reagenzien	Volumen (µl)	Endkonzentration
2xSensiFAST SYBR No-ROX Mix	10	
10µM Forward Primer	0,8	400nM
10µM Reverse Primer	0,8	400nM
Probe	1	200ng/µl
H ₂ O RNase-free	7,4	
Endvolumen	20	

Das Volumen des Mastermix wurde mit RNase freiem H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Nach einer anfänglichen Aktivierung mit Temperaturerhöhung auf 95°C über 2 min folgte die eigentliche qRT-PCR, mit einer Vervielfältigung der Probe über 40 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete eine Denaturierungsphase bei 95°C über 5 s, eine Annealingphase über 10 s bei 60°C und eine Extensionsphase über 5 s bei 72°C. Die Schmelzkurvenanalyse und Auswertung der einzelnen PCR -Läufe wurde mit der Software TOptical analyze durchgeführt. Anforderung an die Läufe waren eine Effizienz zwischen 89%-116%, ein Bestimmtheitsmaß der Standardkurve von $R^2 > 0,96$, mindestens eine Negativkontrolle negativ und eine Schmelzkurve die den targetspezifischen Schmelztemperaturen entspricht. Die Standardabweichung der Ct-Werte innerhalb der Doppelproben musste unter 1 liegen. Bei Nichterfüllung der Vorgaben erfolgte eine Wiederholung der Untersuchung.

Die mRNA-Expressionsanalyse wurde durch eine relative Quantifizierung der in der qRT-PCR gemessenen Produkte gegenüber dem Referenz-Gen SUZ12 vorgenommen. Dabei werden, im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung, nicht die Startkopienanzahlen bestimmt, sondern die mRNA-Expression des Zielgens auf ein nicht-reguliertes, konstant exprimiertes zweites Gen (SUZ12) bezogen. Als Referenz wurde das Gen SUZ12 gewählt. Dieses kodiert das Protein „zinc finger protein suppressor of zeste 12“ (SUZ12), welches Teil des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) ist. Der Komplex ist ein Chromatin-Modifikator, der Stammzellen in embryonalen und adulten Geweben reguliert (LEE et al., 2015). Das Gen SUZ12 wurde auf Grund anderer Studien gewählt, die seine Qualität als Referenzgen für bovines Endometriumsgewebe bestätigen (WALKER et al., 2009).

Tabelle 4: Verwendete Primer in der qRT-PCR

Primer für Zielgene	Forward (5'-3') Reverse (5'-3')	Produktlänge	Referenz
IL10¹	-tga ctt taa ggg tta cct ggg tt- -gct tct ccc cca gtg agt tc-	131bp	novel design, Acc.No.: NM_174088.1
CXCL5¹	-ggg gga agt gat agc cac ctt- -tct tca gtg ggt cca gag gt-	189bp	novel design, Acc.No.: NM_174300.2
IL6¹	-gga gga aaa gga cgg atg ct- -tct gcg atc ttt tgc ttc agg at-	195bp	novel design, Acc.No.: NM_173923
IKB¹	-gtg gtc cgc caa gtg aag gg- -att tct ggc tgg tta gtg atc ac-	105bp	novel design, Acc.No.: NM_001045868.1
NFkB1¹	-tac tga aca atg cct tcc gg- -cac gtc aat ggc ctc agt gta g-	134bp	(TARAKTSOGLU et al., 2011) NM_001076409
SUZ12¹	-gaa cac cta tca cac aca ttc ttg t- -tag agg egg ttg tgt cc act-	130bp	(WALKER et al., 2009) NM_001205587.1
IL-1β²	-ttc tct cca gcc aac ctt cat t- -atc tgc agc tgg atg ttt cca t-	198bp	(NEUVIANS et al., 2004) M35589
TNFα²	-ctt ctg cct gct gca ctt cg- -gag ttg atg tcg gct aca acg-	157bp	(YANG et al., 2008) NM_173966
CCL20²	-gac tgc tgt ctc cga tat aca- -gcc agc tgc tgt gtg aag c-	71bp	novel design, Acc.No.: NM_174263
CXCL8²	-cct ctt gtt caa tat gac ttc ca- -ggc cca ctc tca ata act ctc-	188bp	(YANG et al., 2008) NM_173925

¹Firma Biomers ²Firma Eurofins MWG, Vorwärts (Forward) und Rückwärts (Reverse) Primer, Abkürzungen: IL: Interleukin; CXCL: CXC-Chemokine ligand; CCL: CC-Chemokine ligand; TNFα: Tumornekrosefaktor α; IκB: kappaB Inhibitor; NFkB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells; SUZ12: zinc finger protein suppressor of zeste 12a; Acc. No: Accession-Nummer der Nukleotid-Sequenz der NCBI Gen-Datenbank, welche für die Erzeugung der Primer benutzt wurde

2.11. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen MS Excel (Microsoft Inc., USA) und SPSS Statistic (Version 23, Inc., Chicago, IL, USA).

Die Tiere zur Evaluierung der Praktikabilität des Probenentnahmegertes wurden in die Gruppen „Endometritis-positiv“ (E-pos, n=14) und „Endometritis-negativ“ (E-neg, n= 17) eingeteilt.

Die Einteilung erfolgte über die Auswertung der Zytobrush-Ausstriche („Endometritis“ bei einem PMN-Anteil von $\geq 5\%$ an Gesamtzellzahl) oder/und über die histologische Bewertung der Bioptate. Tiere mit positiver Endometritisd Diagnose in mindestens einer Untersuchungsmethode wurden der Gruppe E-pos zugeteilt. Bei den Tieren der Gruppe E-neg lag weder zytologisch noch histologisch ein Hinweis auf Endometritis vor.

Die deskriptive Analyse der Daten wurde mit SPSS und Excel durchgeführt. Box Plot Diagramme wurden mit SPSS erstellt.

In den in-vitro-Stimulationsversuchen erfolgte eine Exposition von UEZ mit Uterussekt von E-positiven und E-negativen Tieren in Kultur. Die UEZ-Gruppen wurden dementsprechend als Gruppe E-pos und Gruppe E-neg bezeichnet. Im PMN-Stimulationsversuch wurden PMN mit Zellkulturüberständen des UEZ-Stimulationsversuches von Gruppe E-pos oder Gruppe E-neg exponiert. Im PMN-Stimulationsversuch war das Stimulationsmaterial dementsprechend kein verdünntes Uterussekt, sondern mit Uterussekt versetzter Zellkulturüberstand (siehe III.2.9). Als dritte Stimulationsgruppe wurde in beiden in-vitro-Versuchen LPS mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Zellkulturmedium diente als Negativkontrolle.

Die gesammelten Daten der qRT-PCR wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei vorliegender Normalverteilung erfolgte eine Auswertung mittels t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Konnte keine Normalverteilung nachgewiesen werden, wurde für die Datenanalyse ein nicht-parametrischer Rangsummen-Test (Mann-Whitney-Test) verwendet ($p \leq 0,05$). Die Daten der mRNA-Expressionsanalyse der UEZ wurden mittels t-Test, die Daten der mRNA-Expressionsanalyse der PMN mittels Mann-Whitney-Test ausgewertet. Es wurden jeweils vier Gruppen miteinander verglichen (E-pos, E-

neg, LPS, Kontrolle).

Bei den erstellten Box Plots handelt es sich um Box Plots mit Whiskern (siehe Abbildung 11). Das Kästchen enthält 50% der Werte. Begrenzungen dabei sind das obere und untere Quartil. Die Länge des Kästchens entspricht demnach dem Interquartilsabstand (Maß der Streuung). Die Whisker stellen die restlichen Werte dar, bei denen es sich noch nicht um Ausreißer handelt. Innerhalb des Kästchens ist der Median gekennzeichnet, der die Gesamtdaten in zwei Hälften teilt. Mit (*) gekennzeichnete Extremwerte liegen mehr als drei Kastenlängen entfernt, mit (°) gekennzeichnete Ausreißer liegen 1,5-3 Kastenlängen entfernt.

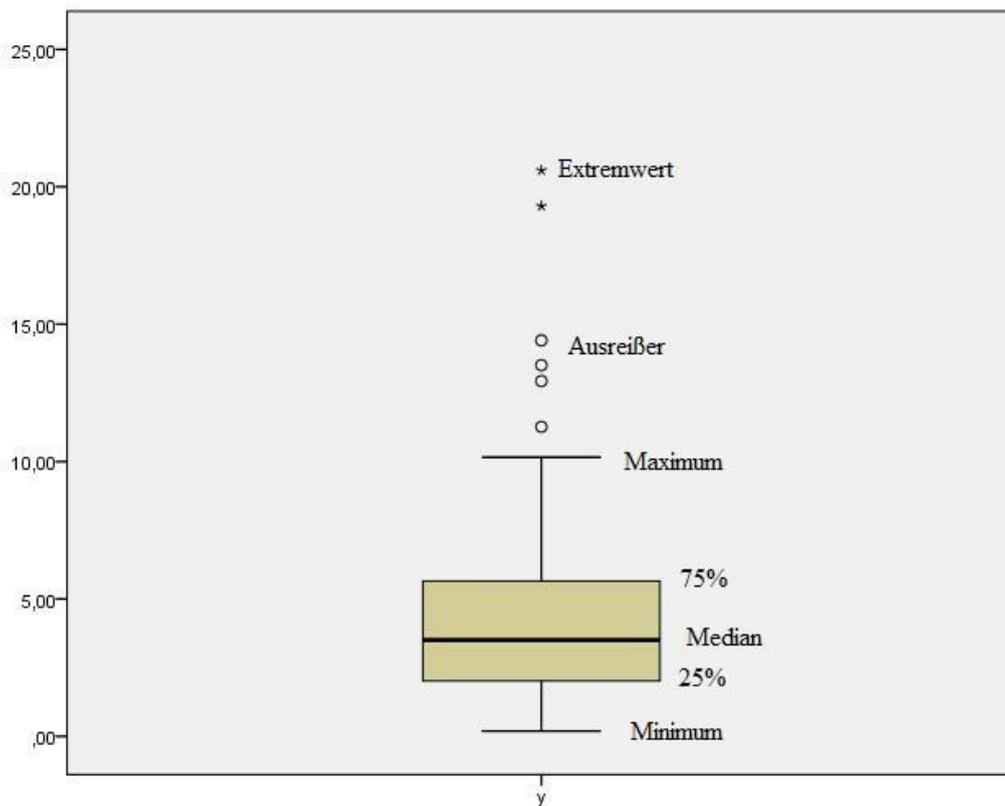


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung eines Box Plots. Der Kasten enthält 50% der Werte, (*) markieren Extremwerte, (°) markieren Ausreißer.

IV. ERGEBNISSE

Die Darstellung der Ergebnisse ist im Folgenden in zwei Kapitel unterteilt. Das erste Kapitel umfasst die Arbeit mit dem neuen Probenentnahme-Instrumentarium für die zytologische und histologische Beurteilung sowie Sekretcharakterisierung der beprobten Tiere. Die Ergebnisse aus diesem ersten Ergebnisteil wurden für die Einteilung der beprobten Tiere in „Endometritis-positive“ Tiere (E-pos) und „Endometritis-negative“ Tiere (E-neg) verwendet. Diese Einteilung wurde in den in-vitro-Folgeversuchen angewendet. Im zweiten Ergebnisteil sind die zellfunktionellen Effekte von Uterussekret in Interaktion mit UEZ und PMN vergleichend zwischen den Gruppen E-pos und E-neg auf Basis molekularbiologischer Untersuchungen dargestellt.

1. Praktikabilität des Probenentnahme-Instrumentariums für die Endometritisdagnostik

1.1. Praktikabilität und Effektivität der Uterussekretentnahme

Mit dem neuen Probenentnahme-Instrumentarium soll die Endometritis-Diagnostik über etablierte Methoden (Zytobrush und Biopsie) mit einer Entnahme von Uterussekretproben (Schwämmchen) kombiniert werden. Die Sekretprobe soll dabei eine für das gesamte Uteruslumen bzw. für das Endometrium repräsentative Probe darstellen. Zur Prüfung der Praktikabilität und Effektivität des Instrumentariums wurden insgesamt 38 Tiere erfolgreich mit dem Probenentnahme-Instrument beprobt, wobei das Probenmaterial von 36 Tieren labordiagnostisch analysiert werden konnte.

1.2. Praktikabilität des Instrumentariums

Das gesamte Arbeitsgerät wurde in seinen Dimensionen (Länge und Durchmesser des Arbeitskanals) für eine Beprobung auch diöstrischer Tiere entwickelt. Der Durchmesser des Arbeitskanals wurde entsprechend den Anforderungen für die Untersuchung des Uterus bei geschlossener Zervix dimensioniert. An freipräparierten Uteri von Schlachttieren erwies sich der Durchmesser des Arbeitskanals als klein genug, um eine zuverlässige Penetration der geschlossenen Zervix bei Tieren mit Blütegelbkörper zu gewährleisten. Insgesamt wurden 38 von 39 Uteri erfolgreich beprobt. Lediglich ein juveniler Färsenuterus konnte auf

Grund der Unpassierbarkeit der Zervix nicht untersucht werden.

Das Schwämmchen konnte intrauterin erstmals zuverlässig angewendet werden: Bei allen beprobten Uteri konnte das Schwämmchen erfolgreich durch den Arbeitskanal in das gelbkörpertragende Uterushorn eingeführt und in eine gestreckte Lage gebracht werden. Die korrekte Lage wurde palpatorisch kontrolliert. Bei 36 von 38 Beprobungen wurde die genaue Uterussekretmenge bestimmt (siehe III.2.6.2).

1.3. Zytologische Auswertbarkeit der mittels Minizytobrush-Technik gewonnenen Endometriumsproben im Hauptversuch

Für die zytologische Untersuchung wurde eine neue modifizierte Zytobrush-Technik und -methodik angewendet (siehe III.2.6.1). Beim Probenentnahme-Instrumentarium wurde, auf Grund des limitierten Durchmessers des Arbeitskanals, ein konisches Interdentalebürstchen (Minizytobrush) anstatt eines herkömmlichen Zytobrush-Bürstchens verwendet (siehe III.2.3). Für die zytologische Differenzierung (siehe III.2.7) wurde als Schwellenwert ein prozentualer PMN-Anteil von $\geq 5\%$ am Gesamtzellgehalt des Ausstrichs festgelegt. Von den 36 ausgewerteten Tieren lagen 25 Tiere unter dem Schwellenwert, bei 11 Tieren lag der prozentuale PMN-Anteil bei über 5%, wovon vier Tiere einen PMN-Anteil über 10% aufwiesen (11% bis 50%) (siehe Tabelle 5).

Die Ergebnisse der zytologischen Auswertung wurden im Anschluss als Kriterium für die Einteilung der beprobten Tiere in die Versuchsgruppen verwendet (siehe IV.1.6 und Tabelle 9, Tabelle 10).

Tabelle 5: Mittels Minizytobrush bestimmter prozentualer Anteil der PMN an der endometrialen Gesamtzellpopulation¹

PMN- Anteil (%)	PMN-Gehalt <5%		PMN-Gehalt $\geq 5\%$	
	0-3	3- <5	$\geq 5-10$	>10
Ausstriche (n)	22	3	7	4

¹PMN-Anteil (%) an der endometrialen Gesamtzellpopulation, die mittels Minizytobrush-Abstrich vom Endometrium gewonnen worden waren. Ausgezählt wurden 300 Zellen je Ausstrich (n= 36), Haema-Schnellfärbung, Auswertung im Lichtmikroskop bei Vergrößerung 100x (siehe III.2.7)

Zur Evaluierung der neu zu adaptierenden Probennahme-Methode wurden bei den ersten 10 beprobten Tieren zusätzlich zu einer Minizytobrush mittels Probenentnahme-Instrument eine zytologische Untersuchung mit einem konventionellen Zytobrush-Instrumentarium durchgeführt (siehe III.2.6.1). Die gewonnenen Abstriche wurden gesammelt und im Block durch denselben Untersucher blind ausgewertet. Nach Bestimmung des prozentualen PMN-Anteils an der Gesamtzellzahl wurden die Abstriche den beprobten Tieren zugeordnet und die Ergebnisse verglichen. Abbildung 12 zeigt exemplarisch vergleichende Ausstriche der Minizytobrush mit der Zytobrush von 3 beprobten Tieren. Es ließen sich keine Unterschiede im prozentualen PMN-Gehalt an der Gesamtzahl ausgezählter Zellen (Daten nicht gezeigt) und der Qualität der angefertigten Ausstriche im Vergleich der beiden Bürstenformen feststellen.

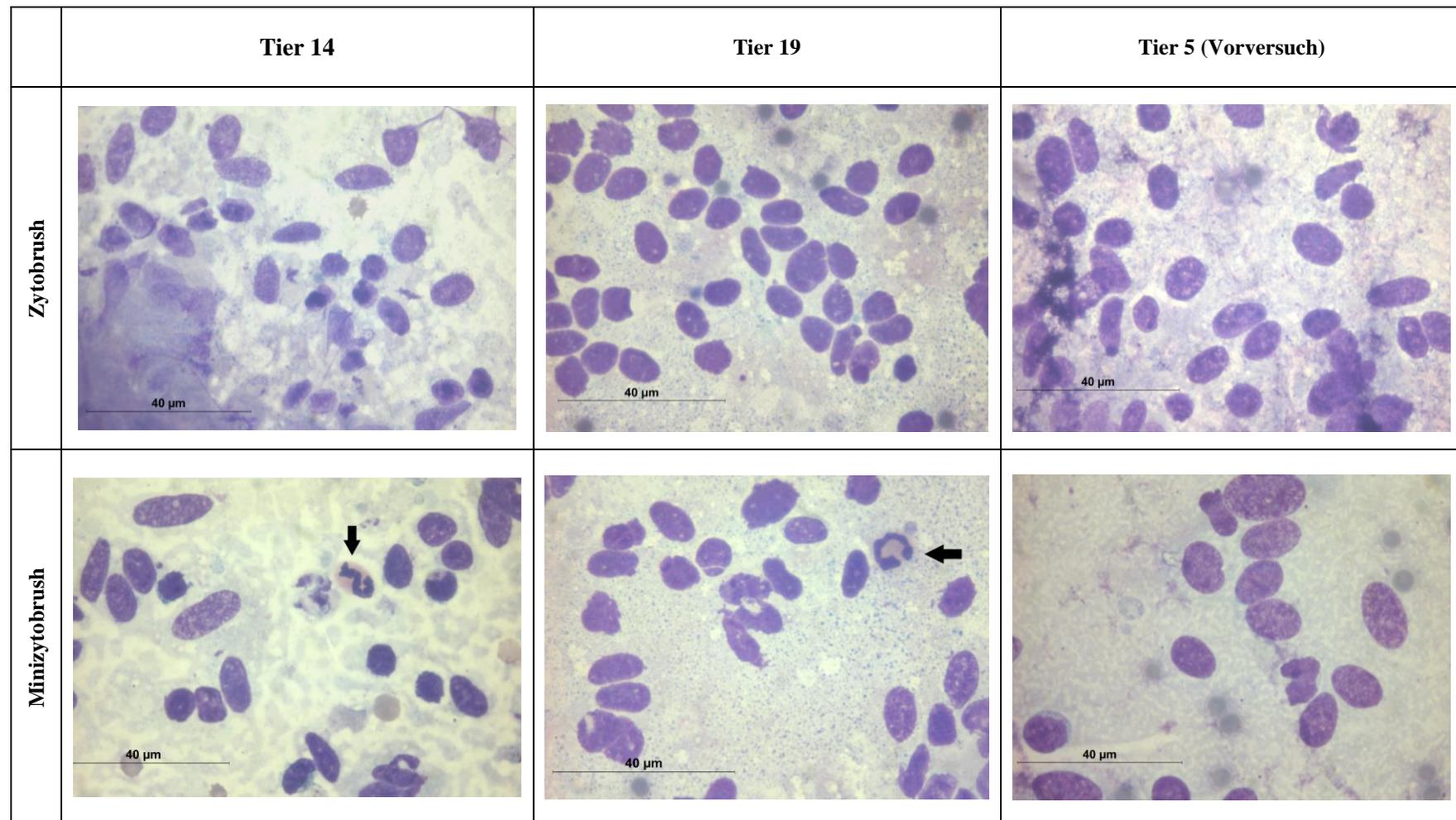


Abbildung 12: Exemplarische zytologische Ausstriche nach endometrialer Probenentnahme mit Zytobrush und Minizytobrush. Auswertung mit Haema-Schnellfärbung im Lichtmikroskop bei Vergrößerung 100 x; Pfeile markieren PMN-Beispiele (siehe III.2.7)

1.4. Histologische Untersuchungen zu entzündlichen Veränderungen am Endometrium

Die histologische Untersuchung und Auswertung der endometrialen Biopstat- und Gewebeproben fand im Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig statt.

1.4.1. Anhand von minimierten Uterusbiopstatproben charakterisierbare endometriale Strukturen und die Eignung der Minibiopstate für die Beurteilung entzündlicher endometrialer Alterationen (Vorversuch 1)

Im Vorversuch 1 wurde die Anwendung der Minibiopsiezange an neun am Schlachthof München gewonnenen Uteri von Rindern erprobt. Zur Evaluierung, ob die mit der Minibiopsiezange gewonnenen Gewebeproben eine Beurteilung von entzündlichen endometrialen Alterationen ermöglichen, wurde analysiert, welche endometrialen Strukturen anhand der Minibiopstate sicher identifiziert und charakterisiert werden können.

Aus jedem Schlachtorgan (n=9) wurden jeweils zwei Minibiopstate entnommen. Dabei wurde ein Minibiopstat pro Horn gewonnen (insgesamt 18 Proben) (siehe III.2.4.1.). Bei der Auswertung der Gewebeproben zeigte sich, dass tiefere Gewebsschichten wie das Stratum spongiosum (Str. spongiosum) mit dessen Drüsen und Stroma, Myometrium und größere Blutgefäße nur teilweise erfasst wurden. Bei jeder Minibiopstatprobe konnte aber das luminale Epithel, das Stratum compactum (Str. compactum) sowie das hier vorhandene Stroma mit Drüsen und kleinen Blutgefäßen zuverlässig identifiziert und analysiert werden. Alle 18 Proben konnten somit bei Fokussierung auf die Bewertung entzündlicher endometrialer Merkmale in den oberen endometrialen Schichten (Epithel und Str. compactum) ausgewertet werden (siehe Tabelle 6).

Bei dem Vergleich der paarweise gewonnenen Minibiopstate aus demselben Organ ließ sich eine Übereinstimmung der histologischen Befunde hinsichtlich entzündlicher endometrialer Merkmale zwischen den beiden Minibiopstaten desselben Organs feststellen.

Tabelle 6: Histologische Beurteilung von inflammatorischen Merkmalen des Endometriums in den Minibiopaten (Vorversuch 1)

Uterus (n=9)	Histologische Merkmale	Auswertbarkeit¹ der Minibiopate
U 1	ggr.- mgr. gemischtzellige Endometritis, ggr. Siderozyten im Stroma	++
U 2	ggr. lymph. Endometritis	+
U 3	ggr. Endometrose, sonst o.b.B.	++(+)
U 4	o.b.B.	++(+)
U 5	ggr. lymph. Endometritis	++(+)
U 6	o.b.B.	++
U 7	ggr. lymph. Endometritis, multiple Lymphfollikel, ggr. Siderozyten im Stroma	++
U 8	o.b.B.	++
U 9	o.b.B., ggr. Siderozyten im Stroma	+

Im Vorversuch 1 wurde die Auswertbarkeit von inflammatorischen Merkmalen des Endometriums anhand von Minibiopsien evaluiert. Auswertbarkeit gut (+++), befriedigend (++), ausreichend (+), o.b.B: ohne besonderen Befund, ¹Auswertbarkeit = Beurteilbarkeit von inflammatorischen Merkmalen im Endometrium. Abkürzungen: ggr.: geringgradig; mgr.: mittelgradig; lymph.: lymphoplasmazelluläre, U: Uterus; Auswertung der Biopate durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig; Paraplast-Schnitte; Haemalaun-Eosin-Färbung (RODENBUSCH, 2011)

1.4.2. Gleichmäßige Verteilung von endometrialen Läsionen im bovinen Endometrium beim Vergleich von Uterusgewebeproben unterschiedlicher Lokalisation (Vorversuch 2)

In Vorversuch 1 konnte gezeigt werden, dass mit der Minibiopsiezange angefertigte Minibiopate für eine histologische Bewertung von entzündlichen Merkmalen am Endometrium geeignet sind. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass sich die histologischen Befunde von zwei Minibiopaten aus unterschiedlicher Lokalisation von demselben Uterus nicht voneinander unterscheiden. In Vorversuch 2 sollte die vermeintlich gleichmäßige Verteilung von endometrialen entzündlichen Alterationen ausführlicher analysiert werden (siehe III.2.4). Dazu

wurden am Schlachthof München fünf weitere Schlacht-Uteri beprobt: Pro Schlachtorgan wurden im ersten Schritt 11 Minibiopate an verschiedenen Lokalisationen gewonnen und im Anschluss von demselben Organ vier Organquerschnitte an verschiedenen Lokalisationen angefertigt (siehe III.2.4). Insgesamt wurden von fünf Schlachtorganen 20 Uterusquerschnitte (4 Querschnitte pro Organ an 4 Lokalisationen, siehe Abbildung 7) untersucht. Die vier Uterusquerschnitte zeigten übereinstimmende histologische Befunde für das jeweilige Tier/Organ. Zusätzlich erfolgte eine histologische Befundung der gewonnen Minibiopate. Insgesamt wurden 55 Minibiopate gewonnen (11 pro Organ bei fünf beprobten Uteri, siehe Abbildung 6). Die an den Minibiopaten erhobenen Befunde wurden mit den Befunden der Organquerschnitte desselben Organs verglichen. Über den Vergleich sollte evaluiert werden, ob endometriale entzündliche Prozesse auch ohne Beteiligung der oberflächlichen Strukturen (Epithel und Str. compactum) auftreten und so im Minibiopat unerkant bleiben. Bei 39 Minibiopaten wurden hauptsächlich die oberen Gewebsschichten (Epithel und Str. compactum) des Endometriums erfasst. Pathologische Gefäßbefunde, die vorwiegend an den mittelgroßen Arterien (unterhalb des Str. compactum) auftreten, waren in diesen Minibiopaten nicht beurteilbar, da keine ausreichende Tiefe des Probenmaterials gegeben war (vgl. Vorversuch 1) (siehe Tabelle 7). Lagen am Uterus aber entzündliche endometriale Veränderungen vor, betrafen diese auch immer das Str. compactum und konnten über die Minibiopate identifiziert werden. Bei 16 Minibiopaten wurden auch tiefere Endometriumsschichten erfasst, so dass eine umfassende histologische Charakterisierung des Endometriums, vergleichbar zu den Uterusquerschnitten, möglich war. Es konnte festgestellt werden, dass Minibiopate (n=11/Organ) und Organquerschnitte (n=4/Organ) (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7) aus unterschiedlichen Lokalisationen des Uterus übereinstimmende histologische Charakteristika aufweisen (siehe Tabelle 7). Entzündliche Alterationen des Endometriums betrafen bei den untersuchten Uteri auch immer das Str. compactum und teilweise das lumenale Epithel und konnten mittels Minibiopsie identifiziert werden.

Tabelle 7: Histologische Charakterisierbarkeit des Endometriums im Minibiopstat im Vergleich zu Uterusquerschnitten (Vorversuch 2)

Uterus (n=5)	Vollständiger histologischer Befund am Uterusquerschnitt	Histologische Befundung am Minibiopstat (n=55)	
		vollständige histologische Befundung möglich ¹	lediglich Befundung des Entzündungs- status möglich ²
U 10	ggr. lymph. Endometritis; Ausbildung von Lymphfollikeln, ggr.- mgr. Hämosiderose; ggr. Angiosklerose; ggr. fokale Endometrose	6	5
U 11	ggr. Endometrose, teils destruierend; mgr. in den Karunkelanlagen; ggr. Angiosklerose	3	8
U 12	ggr.- mgr. Angiosklerose, ggr. Hämosiderose; ggr. Endometrose	1	10
U 13	mgr. gemischtzellige Endometritis	3	8
U 14	ohne besonderen Befund	3	8
Gesamt		16	39

Übereinstimmung von histologischen Befunden im Vergleich von Minibiopstaten mit Uterusquerschnitten (Vorversuch 2). An Schlachtuteri (n=5) wurden pro Organ jeweils Uterusquerschnitte (n=4) mit Minibiopstaten (n=11) verglichen. ¹vollständige histologische Befundung= die Tiefe/Größe der Minibiopstate ermöglicht eine den Organquerschnitten entsprechende Beurteilung, ²nur entzündliche Alterationen auswertbar= Im Minibiopstat erfasste endometriale Schichten ermöglichen eine histologische Auswertung nur in Hinsicht auf entzündliche Alterationen; Abkürzungen: ggr.: geringgradig; mgr.: mittelgradig; lymph.: lymphoplasmazelluläre, U: Uterus mit laborinterner Laufnummer; Die Auswertung der Biopstate erfolgte durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig; Paraplast-Schnitte; Haemalaun-Eosin-Färbung (RODENBUSCH, 2011)

1.4.3. Histologische Beurteilung der Minibioptate im Hauptversuch

Vorversuch 1 und 2 zeigten, dass mit der Minibiopsiezange angefertigte Minibioptate in ihrer Größe und Tiefe gegenüber mit konventionellen Uterusbiopsiezangen gewonnenen Biopтатаen reduziert sind. Aus diesem Grund erfolgte die histologische Auswertung der Minibioptate im Hauptversuch mit Fokussierung auf die Identifikation und Charakterisierung von entzündlichen endometrialen Alterationen. Konnten zusätzliche histologische Befunde erhoben werden, wurden diese ebenfalls dokumentiert. Von den insgesamt 36 Minibiopтатаen im Hauptversuch konnten drei Minibioptate nicht ausgewertet werden: zwei Proben aus Qualitätsgründen, eine dritte Probe ging verloren. Bei 23 Minibiopтатаen ließen sich keine entzündlichen Merkmale feststellen; insgesamt 10 Proben zeigten Merkmale einer Entzündung des Endometriums als Hauptbefund. Dabei handelte es sich in einem Fall um eine eitrige Endometritis, in vier Fällen um eine nicht-eitrige Endometritis, und fünfmal wurde eine lymphoplasmazelluläre (lympl.) Endometritis nachgewiesen. Als Übersicht dient Abbildung 13., die histologische Gesamtauswertung zeigt Tabelle 13 im Anhang.

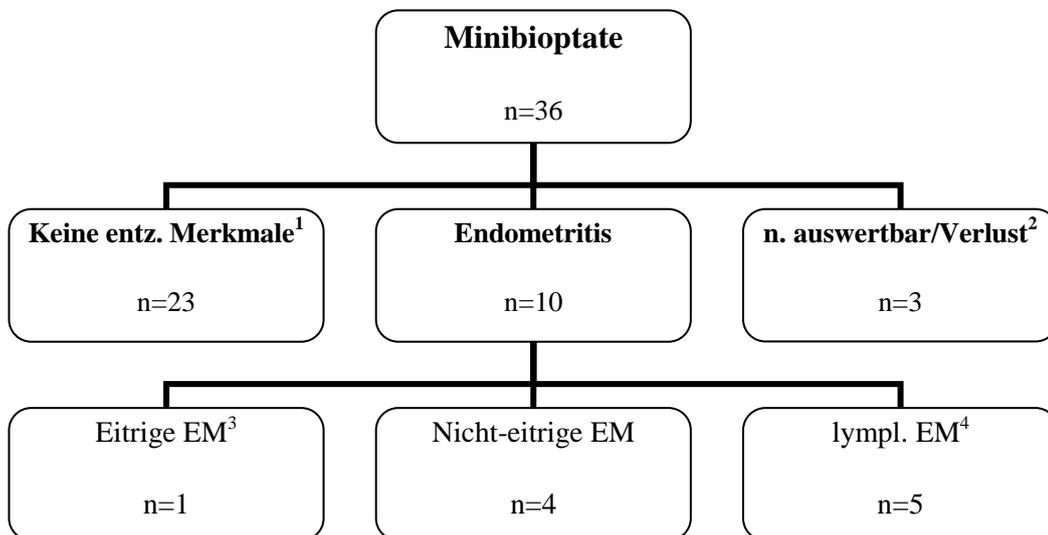


Abbildung 13: Histologische Befunde der Minibioptate im Hauptversuch.

Beurteilt wurden inflammatorische Merkmale des Endometriums, ¹keine entzündlichen Merkmale im Endometrium; ²n.auswertbar= nicht auswertbar: Aus Qualitätsgründen oder wegen Biopatatverlust nicht ausgewertete Minibioptate; ³EM: Endometritis; ⁴lympl. EM: lymphoplasmazelluläre Endometritis; Auswertung der Biopтатаe durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig; Paraplast-Schnitte; Haemalaun-Eosin-Färbung (RODENBUSCH, 2011)

Bei insgesamt 20 Proben konnten neben der Befundung zur Fragestellung „Endometritis ja/nein“ weitere Befunde in den oberen endometrialen Schichten erhoben werden (siehe Tabelle 8).

Von den 36 beprobten Tieren wurde bei zwei Kühen bei der Probengewinnung eine klinische Endometritis mit makroskopisch verändertem Uterussekret festgestellt. In der histologischen Untersuchung konnte allerdings nur bei einem Tier eine Endometritis diagnostiziert werden. Das zweite klinisch auffällige Tier zeigte lediglich eine ggr. Endometrose und mgr. Angiosklerose. Der histologische Hauptbefund „Endometritis ja/nein“ wurde als Kriterium für die Gruppeneinteilung der beprobten Tiere in den Folgeversuchen verwendet (siehe IV.1.6 und Tabelle 9, Tabelle 10).

Tabelle 8: Histologische Nebenbefunde zu der Bewertung inflammatorischer Merkmale am Endometrium

Histologische Nebenbefunde	Minibiopate mit Nebenbefunden (n=20)	
	Endometritis (n=8)	Keine Endometritis (n=12)
Angiosklerose	5	8
Hämosiderose	2	0
Endometrose	1	0
Angiosklerose+ Hämosiderose	0	2
Angiosklerose + Endometrose	0	1
Endometrose + Hämosiderose	0	1

Aufgezählt werden die histologischen Nebenbefunde in den Minibiopaten in Kombination mit inflammatorischen Merkmalen im Endometrium. Nebenbefunde treten isoliert oder in Kombination auf (Kombination durch + dargestellt): Bei 20 der 36 beurteilten Minibiopaten wurden zusätzlich zum Befund „Endometritis ja/nein“ histologische Nebenbefunde erhoben. Die Auswertung der Biopate erfolgte durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig an Paraplast-Schnitten; Haemalaun-Eosin-Färbung (RODENBUSCH, 2011)

1.5. Bakteriologische Untersuchungen

Jede Uterussekretprobe wurde nach oben beschriebenem Prinzip bakteriologisch untersucht (siehe III.2.8). Nur zwei Proben waren in der bakteriologischen Untersuchung positiv. Bei den isolierten Keimen handelte es sich im ersten Fall um *Staphylococcus warneri* und bei der zweiten Uterussekretprobe um *Bacillus licheniformis*. In beiden Fällen waren makroskopisch keine Auffälligkeiten am isolierten Uterus sichtbar. Das erste Organ zeigte auch zytologisch keine Anzeichen einer Entzündung (PMN <5%, Biopstat nicht auswertbar), während der Uterus des zweiten Tieres zytologisch und histologisch Endometritis positiv war (PMN >5%) (siehe Tabelle 11). *Staphylococcus warneri* gehört zu den koagulase-negativen Staphylokokken, welche nicht Endometritis assoziiert sind und zu den opportunistischen Erregern zählen. *Bacillus licheniformis* wird zu den potentiell uterusp Pathogenen Keimen gezählt und kann bei Endometritiden frequent nachgewiesen werden (WILLIAMS et al., 2005). Proben mit einem positiven bakteriologischen Ergebnis wurden von den nachfolgenden Stimulationsversuchen ausgeschlossen.

1.6. Einteilung der beprobten Tiere in die Versuchsgruppen für die Folgeversuche

Es wurden insgesamt die Uteri von 36 Tieren beprobt und befundet. Die Gruppeneinteilung der beprobten Tiere für die Folgeversuche erfolgte über drei Kriterien:

- Histologisch nachgewiesene Endometritis
- Zytologisch nachgewiesene Endometritis ($\geq 5\%$ PMN an der Gesamtzellzahl)
- Schlachtgrund Subfertilität/Infertilität: mindestens 2 x erfolglos besamt

Bei Tieren die der Gruppe „Endometritis-positiv“ (E-pos) zugeordnet wurden (n=14), musste entweder histologisch und/oder zytologisch bestätigt eine Endometritis vorliegen. Bei einem PMN-Gehalt von $\geq 5\%$ und ohne histologischen Endometritbefund wurde als drittes Kriterium der Schlachtgrund hinzugezogen. Bei Abgangsursache Sub- oder Infertilität (mind. 2x vor Schlachtung erfolglos besamt) und unproblematischer vorangegangener Trächtigkeit wurden diese Tiere ebenfalls der Gruppe E-pos zugeordnet (n=2).

Bei Tieren der Gruppe „Endometritis-negativ“ (E-neg) durfte weder histologisch noch zytologisch eine Endometritis diagnostiziert worden sein (n=17).

Es wurden fünf Tiere ausgeschlossen: Bei zwei Tieren wurde eine klinische Endometritis festgestellt; zwei weitere waren in der bakteriologischen Untersuchung positiv. Ein weiteres Tier wurde wegen eines unklaren makroskopischen Befunds an Ovar und Uterus (Brunstschleim intrauterin bei prominentem Corpus luteum) aus der Versuchsreihe genommen (siehe Tabelle 11).

Im Rahmen der statistischen Analyse der gesammelten qRT-PCR Daten wurden drei weitere Tiere aus den Auswertungen gestrichen. Grund waren Auffälligkeiten der erhaltenen Messwerte, welche auf Fehler im Versuchsablauf der PCR zurückgeführt werden konnten. Bewertet wurde die mRNA-Expression der ausgewählten Kandidatengene in UEZ und isolierten Blut-PMN nach Stimulation mit Uterussekretproben von 12 E-positiven Tieren und 16 E-negativen Kühen. Die genaue Zusammensetzung der Versuchsgruppen wird in Tabelle 9 und Tabelle 10 darstellt.

Tabelle 9: Vorberichtliche, zytologische und histologische Charakteristika der Tiere der Gruppe „Endometritis-positiv“ (E-pos)

Labornummer beprobtes Tier	Schlachtgrund SF/IF ¹	PMN-Gehalt ² (%)	Histologisch EM ³ nachweisbar
6	+	9	-
9	-	6	+
10	-	11	(Histologie fehlt) ⁴
12	+	50	-
14	-	4	+
18	-	1	+
19	-	7	+
21	+	2	+
24	-	0	+
27	+	5	-
32	+	2	+
37	+	5	-
38	+	15	+
39	+	20	-
n=14	⁵ n= 8	⁶ n=9 (PMN≥5%:)	⁷ n=8

Einteilung der Gruppe E-pos nach den Ergebnissen aus den zytologischen (siehe IV.1.3) und histologischen Untersuchungen (siehe IV.1.4.3). Grau unterlegte Zeilen markieren Tiere die nicht in die molekularbiologischen Auswertungen einbezogen wurden (siehe IV.1.6). ¹SF/IF: Schlachtgrund Subfertilität/Infertilität (Vorbericht durch den Landwirt); ²PMN-Gehalt: prozentualer PMN-Anteil an Gesamtzellpopulation in endometrialen Minizytobrush-Ausstrichen (siehe III.2.6.1); ³EM: Endometritis histologisch in Minibiopaten nachgewiesen (siehe III.2.4); ⁴Verlust des zugehörige Minibiopates; ⁵n= Anzahl der Tiere mit Schlachtgrund SF/IF; ⁶n= Anzahl der zytologischen Ausstriche mit PMN ≥5% an der Gesamtzellzahl; ⁷n= Anzahl der Biopate mit Symptomen einer Endometritis.

Tabelle 10: Vorberichtliche, zytologische und histologische Charakteristika der Tiere der Gruppe „Endometritis-negativ“ (E-neg)

Labornummer beprobtes Tier	Schlachtgrund a.U. als SF/IF ¹	PMN-Gehalt ² (%)	Histologisch EM ³ nachweisbar
7	+	0	-
8	-	2	-
11	+	0	-
13	-	1	-
15	+	2	-
16	+	0	-
17	+	0	-
20	+	0	-
22	+	2	-
25	+	4	-
26	+	0	-
30	+	1	-
31	+	1	-
33	+	4	-
34	+	0	-
35	+	3	-
36	-	3	-
n= 17	⁴ n= 14	⁵ n= 0	⁶ n= 0

Einteilung der Gruppe E-neg nach den Ergebnissen aus den zytologischen (siehe IV.1.3) und histologischen Untersuchungen (siehe IV.1.4.3). Grau unterlegte Zeilen markieren Tiere die nicht in die molekularbiologischen Auswertungen einbezogen wurden (siehe IV.1.6). ¹a.U. als SF/IF: andere Ursache als Subfertilität/Infertilität (Vorbericht durch den Landwirt); ²PMN-Gehalt: prozentualer PMN-Anteil an Gesamtzellpopulation in endometrialen Minizytobrush-Ausstrichen (siehe III.2.6.1); ³EM: Endometritis histologisch in Minibiopaten nachgewiesen (siehe III.2.4); ⁴n= Anzahl der Tiere mit Schlachtgrund andere Ursache als SF/IF; ⁵n= Anzahl der zytologischen Ausstriche mit PMN $\geq 5\%$ an der Gesamtzellzahl; ⁶n= Anzahl der Biopate mit Symptomen einer Endometritis.

Tabelle 11: Von in-vitro-Versuchen ausgeschlossene Tiere (n=5)

Labornummer	Schlachtgrund	PMN-Gehalt (%) ¹	Histologisch Symptome von EM ² nachweisbar	Ausschlussgrund
23	a.U. ³	3	n. auswertbar	BU-positiv ⁴
28	SF/IF ⁵	7	+	BU-positiv
29	SF/IF	0	-	fraglicher Zyklusstand ⁷
40	SF/IF	3	+	k. EM ⁶
41	SF/IF	8	-	k. EM

¹prozentualer Anteil der PMN an Gesamtzellzahl in der Uteruszytologie; ²EM:Endometritis; ³a.U.: andere Ursache für Schlachtung als SF/IF; ⁴BU-positiv: Bakteriologische Untersuchung mit positiven Ergebnis; ⁵SF/IF: Subfertilität/Infertilität; ⁶k. EM: klinische Endometritis; ⁷intrauterine Schleimansammlung bei Blütegelbkörper.

2. Gewinnung von Uterussektret und seine Verwendung als Stimulanz in funktionellen und molekularbiologischen Untersuchungen

2.1. Auswahl der zu beprobenden Tiere am Schlachthof

Zur Vorauswahl der zu beprobenden Kühe wurde mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Anhang Abbildung 19) ein Besitzergespräch durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag auf dem Schlachtgrund und dem Vorliegen von Reproduktionsstörungen. Ein großer Anteil von vorausgewählten Tieren musste auf Grund von unpassendem Zyklusstand, anderweitigen Erkrankungen des Genitale (z.B. Ovarialzysten, Pyometra) oder Frühträchtigkeit im späteren Verlauf wieder ausscheiden.

Das durchschnittliche Schlachtalter der E-negativen Tiere (n=17) betrug 7,11 Jahre mit einer durchschnittlichen Anzahl an Kalbungen von 4,33 (1-11). Bei den E-positiven Tiere (n=14) lag der Altersdurchschnitt zum Schlachtungszeitpunkt bei 7,14 Jahren und die Anzahl der Kalbungen bei 4,14 Kalbungen (1-8). Die Versuchstierauswahl wurde rassenunabhängig getroffen. Bei den beprobten Tieren handelte es sich um Fleckvieh-, Braunvieh- und Holsteinkühe. Alle Tiere

waren adspektorisch unauffällig und ohne gynäkologische Auffälligkeiten (z.B. sichtbarer vaginaler Ausfluss, eingefallene Beckenbänder, Scheidenstellung).

2.2. Uterussekretgewinnung und Bestimmung des Uterussekretvolumens

Es wurden bei 38 Tieren Uterussekretproben gewonnen, wovon 36 Proben weiter untersucht wurden (2 Proben wurden als Vorversuch gewonnen). Nach Einführung des Schwämmchens in das gelbkörpertragende Uterushorn wurde es vier Minuten im Uterushorn belassen. Zur Ermittlung der gewonnenen Sekretmenge wurde das nach der Beprobung feuchte Schwämmchen gewogen und die Gewichts Differenz durch Abzug des Trockengewichts berechnet (siehe III.2.6.2). Die Gruppen E-pos und E-neg zeigten ähnliche Minimal- und Maximalwerte der Sekretmenge und stimmten in der medianen Flüssigkeitsmenge überein (siehe Tabelle 12). Die Gruppe E-pos wies jedoch eine größere individuelle Variabilität der gewonnenen Sekretmengen auf als die E-negativen Tiere (siehe Abbildung 14). Die Probenmenge bei den Tieren mit klinischer Endometritis oder positivem bakteriologischem Befund im Uterussekret lag im Bereich des mittleren Volumens der Gruppe E-pos. Auf Grund der geringen Fallzahl wurden diese Tiere jedoch nicht weiter ausgewertet.

Tabelle 12: Gewinnbares Uterussekretvolumen in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit

	Versuchsgruppen		Ausgeschlossene Tiere		
	E-pos ¹ (n=14)	E-neg ² (n=17)	BU ³ -positiv (n=2)	k. EM ⁴ (n=2)	n.a. ⁵ (n=1)
Min	46,47	53,49	137,62	133,04	281,56
Max	281,00	271,43	138,66	229,09	281,56
MW	141,86	109,79	138,14	181,07	281,56
Median	96,59	96,55	138,14	181,07	281,56

Mit dem Merocel®-Schwämmchen gewonnene Uterussekret-Volumina in µl. Angegeben sind Minimalwert (Min), Maximalwert (Max), Mittelwert (MW) und Median des Volumens je Gruppe. ¹E-pos: Endometritis-positive Tiere; ²E-neg: Endometritis-negative Tiere; ³BU: bakteriologische Untersuchung; ⁴k.EM: klinische Endometritis; ⁵n.a: nicht auswertbar (siehe IV.1.6)

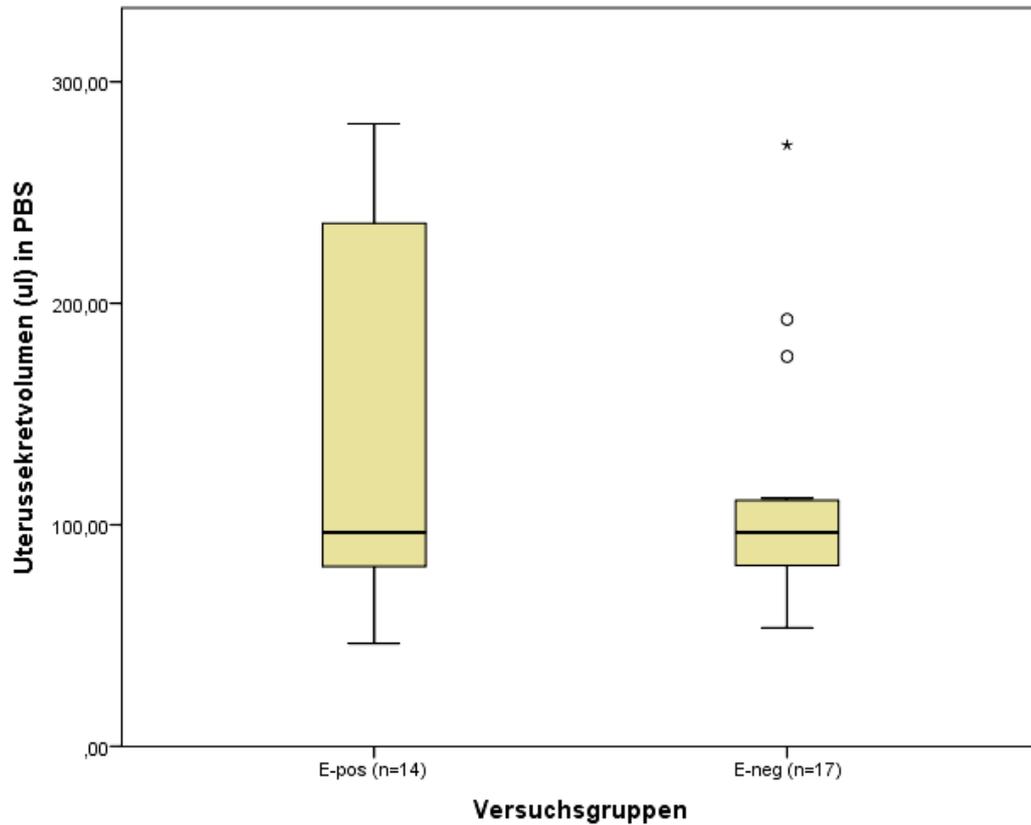


Abbildung 14: Starke Tier-individuelle Differenzen im gewinnbaren Uterussekretvolumen bei Tieren der Gruppe E-pos im Vergleich zu Gruppe E-neg. Gezeigt ist das in der Waschflüssigkeit (PBS) enthaltene, aus den Uteri gewonnene Sekretvolumen: Uterussekretvolumen= Gewichts-differenz zwischen feuchtem und trockenem Schwämmchen. Dargestellt sind Whisker-Boxplot mit Ausreißer (°) und Extremen (*) (siehe III.2.11). E-pos: Endometritis-positive Tiere; E-neg: Endometritis-negative Tiere

Da jeder gewonnenen Probe, unabhängig vom Uterussekretvolumen, das gleiche Volumen von PBS im Waschschriff hinzugefügt wurde (vgl. III.2.6.1 und III.2.6.2), ergeben sich individuelle Verdünnungsfaktoren (siehe III.2.6.2). Der berechnete Verdünnungsfaktor (VF) der Gruppe E-pos und E-neg lag im Mittel bei 7 bis 7,5. Der minimale VF betrug in beiden Gruppen 2,5; der maximale VF lag in der Gruppe E-pos bei 15, in der Gruppe E-neg bei 13.

2.3. Molekularbiologische Untersuchungen

Das gewonnene Uterussekret wurde in den molekularbiologischen Untersuchungen zur Stimulation von kultivierten Uterusepithelzellen und isolierten peripheren PMN verwendet (siehe III.2.9). Über messengerRNA-(mRNA)-Expressionsanalyse von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen wurde die Genexpressionsmodulation in den Gruppen E-pos, E-neg, LPS und Kontrolle (Medium) vergleichend untersucht (siehe III.2.10). Es wurde die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen CXC-Chemokine ligand 5 und 8 (CXCL5 und CXCL8), CC-Chemokine ligand 2 (CCL2), CC-Chemokine ligand 20 (CCL20), Interleukin 6 (IL6), Tumornekrosefaktor α (TNF α), kappaB Inhibitor (I κ B) untersucht. Als Vertreter der anti-inflammatorischen, als auch regulatorischen Zytokine wurde die mRNA-Expression von Interleukin 10 (IL10) untersucht.

2.3.1. Stimulationsversuch mit isolierten Uterusepithelzellen

Je 200.000 Uterusepithelzellen wurden über einen Zeitraum von vier Stunden mit 400 μ l verdünntem Uterussekret koinkubiert (Uterussekret und Medium). Das jeweils eingesetzte Volumen der Uterussekretprobe wurde entsprechend des individuellen Verdünnungsfaktors für jede Probe separat bestimmt (siehe III.2.6.2), sodass pro Ansatz je 12 μ l unverdünntes Sekret verwendet wurde. Nach Exposition der UEZ über vier Stunden wurde die mRNA-Expression ausgewählter Kandidatengene mit relativer qRT-PCR analysiert (siehe III.2.10.3). Die mit Uterussekret E-pos/E-neg exponierten Uterusepithelzellen werden im Folgenden als Gruppe E-pos/Gruppe E-neg bezeichnet. Es wurde die mRNA-Expression von vier Gruppen miteinander verglichen: Gruppe E-pos, Gruppe E-neg, LPS (1 μ g/ml) und Kontrolle (Medium). Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) gesetzt.

Insgesamt wurde die mRNA-Expression von zehn Kandidatengenen untersucht: CXCL5, CXCL8, IL6, IL1 β , CCL2, CCL20, TNF α , NF κ B, I κ B, IL10. Von den ausgewählten Kandidatengenen konnten sechs ausgewertet und ihre mRNA-Expression beurteilt werden: CXCL5, CXCL8, IL10, IL6, NF κ B, I κ B. Bei den Genen CCL20, CCL2, IL1 β , TNF α war die gebildete Produktmenge an cDNA und somit der ursprüngliche Gehalt an mRNA in der Probe zu gering für eine weitere Auswertung (keine oder sehr hohe Cycle threshold (Ct-Werte)), (siehe III.2.10.3).

2.3.2. Große Variabilität der cDNA-Produktmenge im UEZ-Stimulationsversuch

Abbildung 15 zeigt die Variabilität der mRNA-Expressionsstärke zwischen den einzelnen Proben in den Stimulationsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) und der Kontrolle (Medium) der untersuchten Kandidatengene im UEZ-Expositionsversuch. Die Basis-mRNA-Expression in der Kontrollgruppe zeigte sich bei allen Genen stabil. Die Gene CXCL5, CXCL8, IL6 und I κ B wurden von den UEZ innerhalb der einzelnen Stimulationsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) mit großer Variabilität der mRNA-Expressionsstärke zwischen den Proben exprimiert. Sowohl bei LPS-, als auch bei Uterussekretexposition (E-pos und E-neg) lagen zwischen dem minimalen und maximalen Ct-Wert innerhalb einer Stimulationsgruppe mehrere PCR-Zyklen. Mit der größten Variabilität in der mRNA-Expressionsstärke wurde IL6 von den UEZ exprimiert. Hier variierten die Ct-Werte der Proben in der Gruppe E-neg um bis zu sechs PCR-Zyklen. Die mRNA-Expression des Gens in der Kontrolle war dagegen sehr stabil. Die mRNA von IL10 und NF κ B wurde von den UEZ dagegen mit einer geringen Variabilität in den einzelnen Gruppen exprimiert. Bei IL10 zeigten sich die größten Varianzen der mRNA-Expressionsstärke innerhalb der Gruppe E-pos: Obwohl zwischen minimalem und maximalem Ct-Wert der einzelnen Proben vier PCR-Zyklen lagen, war die mRNA-Expression, insbesondere bei Betrachtung des Interquartils (1,3 PCR-Zyklen), deutlich einheitlicher als bei den pro-inflammatorischen Genen (CXCL8, CXCL5, IL6, I κ B, NF κ B).

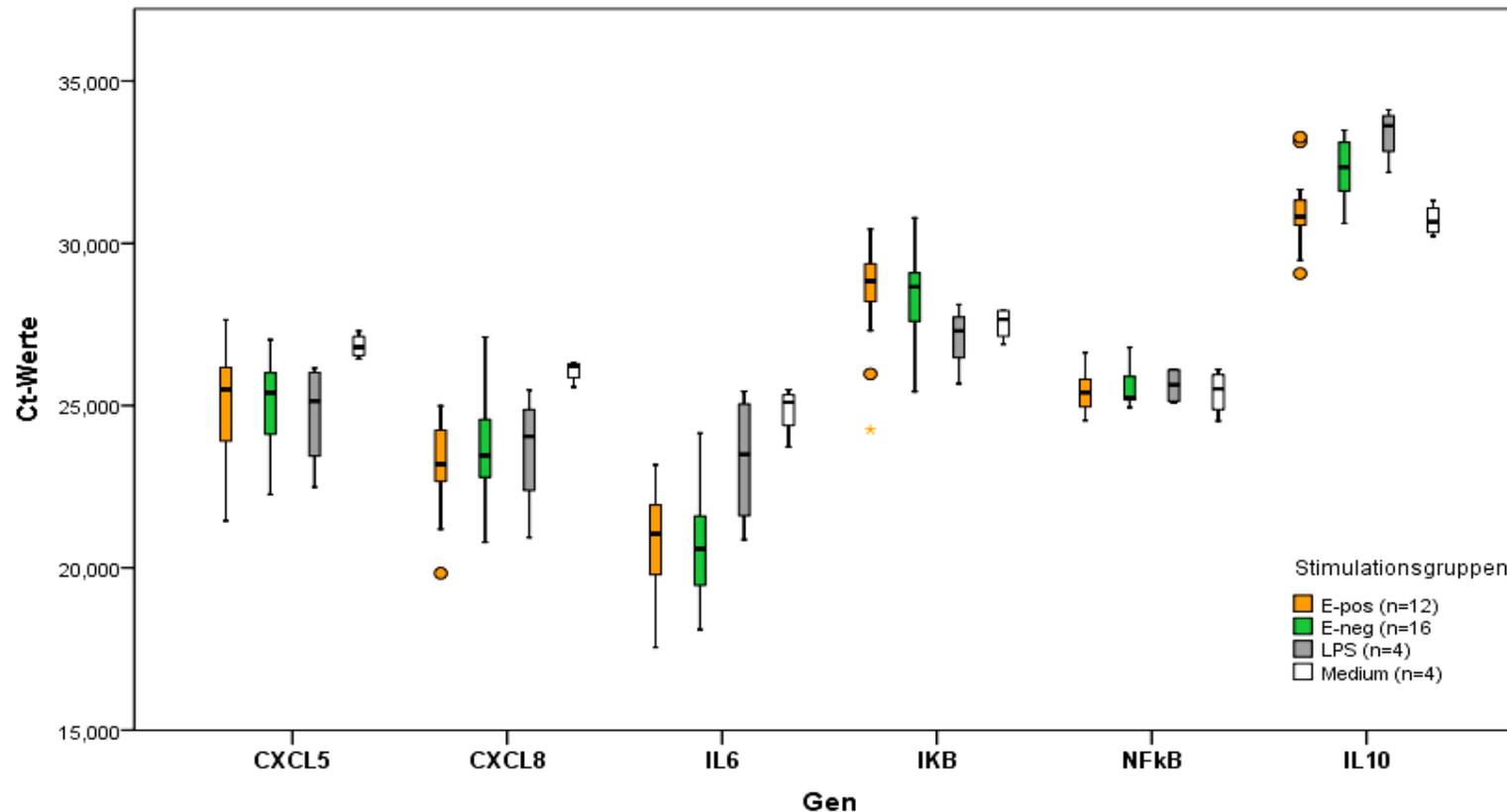


Abbildung 15: Variabilität der mRNA-Expressionsstärke im UEZ-Stimulationsversuch innerhalb der Versuchsgruppen.

Stimulationsgruppen: E-pos: Endometritis-positive Tiere; E-neg: Endometritis-negative Tiere; LPS (1µg/ml); Kontrolle (Medium). Die Inkubationszeit betrug 4h; die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Darstellt sind die Ct-Werte der qRT-PCR pro Gruppe und Kandidatengen als Whisker-Boxplots mit Ausreißern (°) und Extremwerten (*) (siehe III.2.11). Der Ct-Wert beschreibt die Anzahl von PCR-Zyklen, die bis zum cDNA-Produktnachweis durchlaufen werden. Niedrige Ct-Werte zeigen, dass eine große Ausgangsmenge an mRNA in der Probe enthalten ist (siehe III.2.10.3). CXCL5: CXC-Chemokine ligand 5; CXCL8: CXC-Chemokine ligand 8; CCL2: CC-Chemokine ligand 2; CCL20: CC-Chemokine ligand 20; IL6: Interleukin 6; TNFα: Tumornekrosefaktor α; IκB: kappaB Inhibitor; IL10: Interleukin 10

2.3.3. mRNA-Expressionsmodulation uteriner Uterusepithelzellen durch Stimulation mit Uterussekret

Die relative mRNA-Expressionsstärke der Kandidatengene (CXCL5, CXCL8, IL6, NFκB, IκB, IL10) gegenüber der Basisexpression der Kontrolle ist in Abbildung 16 dargestellt. Tabelle 14 im Anhang zeigt die mRNA-Expressionsstärke relativ zur Medium-Kontrolle (n=4) für die einzelnen Kandidatengene und Gruppen (E-pos, E-neg, LPS) mit den zugehörigen Signifikanzen. Es zeigten sich signifikante Expressionsregulationen der Gene CXCL8 in allen drei Gruppen (E-pos, E-neg, LPS). In beiden Uterussekretgruppen (E-pos und E-neg) wurde IL6 gegenüber der Kontrolle signifikant stärker exprimiert (E-pos, $p=0,001$; E-neg, $p<0,001$). CXCL5 wurde in der Gruppe E-pos im Vergleich zur Kontrolle 4fach stärker exprimiert, ohne dass dies statistisch gesichert werden konnte ($p=0,058$). Die LPS-Exposition der UEZ bewirkte dagegen eine signifikant verstärkte Expression von CXCL5 ($p=0,029$). Der Transkriptionsfaktor NFκB wurde in allen Expositions-Gruppen (E-pos, E-neg, LPS) etwa gleich stark exprimiert, während bei seinem Gegenspieler IκB eine signifikant verringerte Expression in der Gruppe E-neg ($p=0,01$) und der LPS-Gruppe ($p=0,029$) vorlag. Bei dem untersuchten anti-inflammatorischen Zytokin IL10, kam es zu einer signifikant geringeren Expression gegenüber der Kontrolle in den Gruppen E-neg ($p=0,005$) und LPS ($p=0,029$). Die Stimulation mit Uterussekret E-positiver Tiere führte zu keiner Expressionsregulation ($p=0,77$). Ein signifikanter Unterschied im Expressionsverhältnis zwischen den beiden Sekret-Stimulationsgruppen (E-pos und E-neg) ließ sich nur bei IL10 feststellen: IL10 wurde im Vergleich zur Gruppe E-neg in der Gruppe E-pos 3,6fach stärker exprimiert ($p=0,001$).

Fazit: Im Vergleich der mRNA-Expressionsstärke der untersuchten Kandidatengene untereinander wurden CXCL5, CXCL8 und IL6 deutlich stärker exprimiert als NFκB, IκB und IL10, wobei insbesondere IL6 in Gruppe E-pos und Gruppe E-neg stark exprimiert wurde.

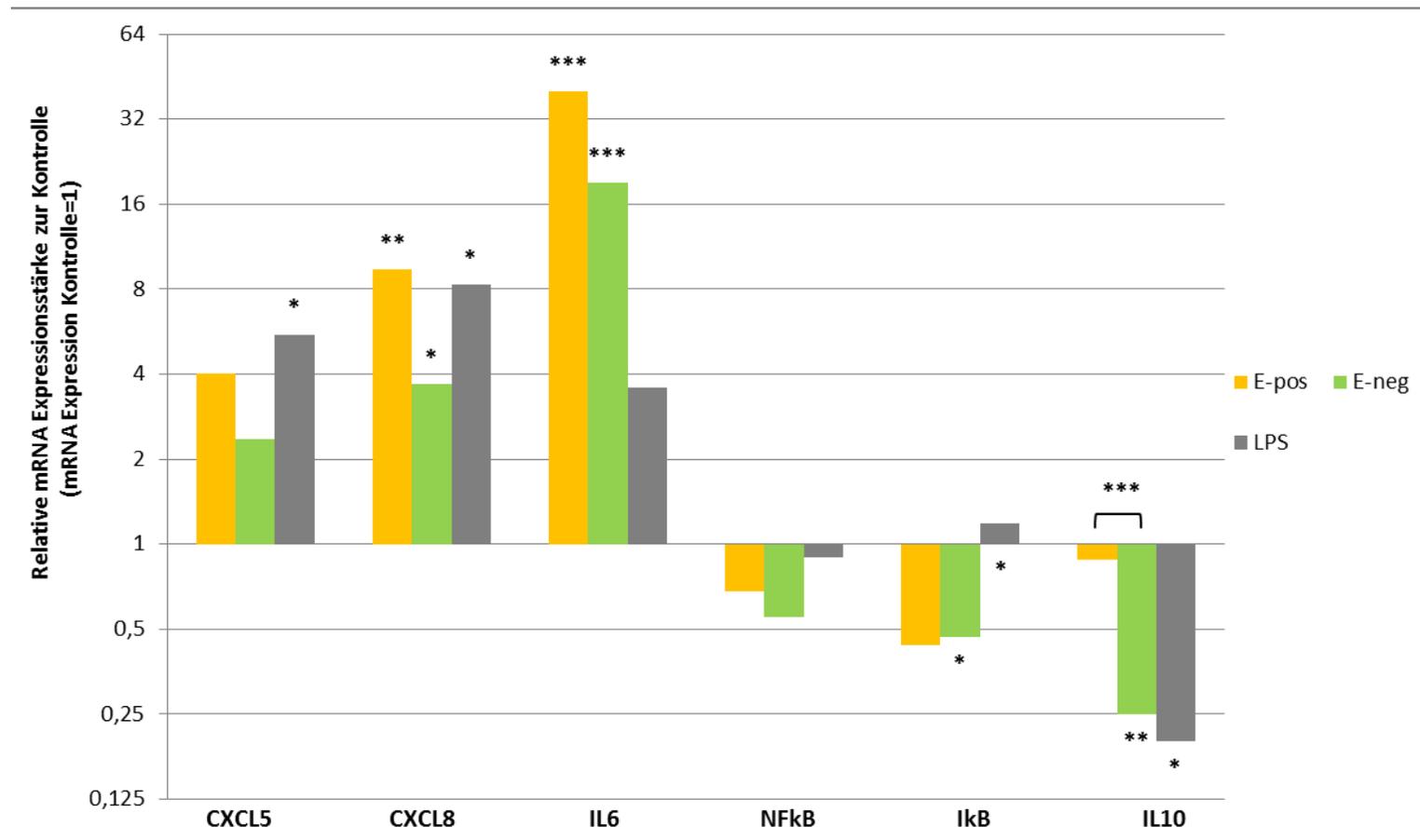


Abbildung 16: Relative mRNA Expressionsstärke der inflammatorischen Kandidatengene stimulierter Uterusepithelzellen in-vitro. Die Ergebnisse sind relative Expressionsstärken in logarithmischer Darstellung (mRNA-Expressionsstärke Medium-Kontrolle= 1). E-pos: Endometritis-positive Tiere; E-neg: Endometritis-negative Tiere (siehe. IV.1.6). Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle (*= $p \leq 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p \leq 0,001$) Klammern zeigen Unterschiede zwischen E-pos und E-neg. CXCL5: CXC-Chemokine ligand 5; CXCL8: CXC-Chemokine ligand 8; CCL2: CC-Chemokine ligand 2; CCL20: CC-Chemokine ligand 20; IL6: Interleukin 6; TNF α : Tumornekrosefaktor α ; I κ B: kappaB Inhibitor; IL10: Interleukin 10

CXCL5

Die Exposition der UEZ mit E-pos-Uterussekret führte zu einer 4fach stärkeren Expression von CXCL5 gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,058$). E-neg führte zu einer mRNA-Expressionsverstärkung um das 2,4fache der Kontrolle ($p=0,08$). Der Unterschied der mRNA-Expressionsstärke zwischen Gruppe E-pos und E-neg war jedoch nicht signifikant ($p=0,3$). Eine LPS-Exposition der UEZ mit LPS bewirkte eine signifikante, um das mehr als 5fache gesteigerte Expression des Gens ($p=0,029$) (siehe Abbildung 16).

LPS führte zu einer nicht-signifikanten, geringfügig stärkeren mRNA-Expression um das 1,4fache im Verhältnis zu Gruppe E-pos ($p=0,77$) und um das 2,3fache im Verhältnis zu Gruppe E-neg ($p=0,1$).

CXCL8

Das Chemokine CXCL8 wurde in allen drei Expositionsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) signifikant stärker als in der Kontrolle exprimiert. In Gruppe E-pos wurde CXCL8 mit einer fast 10fach stärkeren mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle am stärksten exprimiert ($p=0,004$). LPS führte zu einer verstärkten mRNA-Expression um das 8fache ($p=0,029$). Der Unterschied in der mRNA-Expressionsstärke von CXCL8 zwischen Gruppe E-pos und LPS war nicht signifikant. Die Stimulation mit Uterussekret E-negativer Tieren bewirkte eine mäßige, aber signifikant gesteigerte Expression ($p=0,05$) um den Faktor 3,7.

Der Vergleich der Gruppen E-neg und LPS erreichte kein Signifikanzniveau ($p=0,4$). Auf Grund großer Variabilität der Expressionsstärke von CXCL8 innerhalb der Gruppen (siehe Abbildung 15) erreichte der mRNA-Expressionsunterschied zwischen Gruppe E-pos und Gruppe E-neg kein Signifikanzniveau ($p=0,1$) (siehe Abbildung 16).

IL6

Interleukin-6 wurde in beiden Uterussekretgruppen (E-pos und E-neg) hochsignifikant stärker exprimiert als in der Kontrolle ($p=0,001$). In der Gruppe E-pos war die mRNA-Expression um das knapp 40fache ($p=0,001$), in Gruppe E-neg um das 19fache ($p<0,001$) gegenüber der Kontrolle verstärkt (siehe Abbildung 16). Die LPS-Exposition führte zu keiner signifikanten mRNA-Expressionserhöhung ($p=0,1$). In allen drei Gruppen (E-pos, E-neg, LPS) wurde

IL6 mit großer Variabilität der mRNA-Expressionsstärke exprimiert, wobei die Varianz mit Unterschieden von bis zu 6 PCR-Zyklen zwischen den Proben in der E-neg Gruppe am stärksten war (siehe Abbildung 15). Die Unterschiede der IL6-Expressionsstärken waren so nur zwischen Gruppe E-neg und LPS signifikant ($p=0,05$). Der Unterschied zwischen Gruppe E-pos zu LPS war nicht signifikant ($p=0,058$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Uterussekretgruppen (E-pos und E-neg) bestand nicht ($p=0,1$) (Daten nicht dargestellt).

NF κ B/I κ B

Die mRNA-Expression von NF κ B durch UEZ in-vitro wurde in keiner der Expositionsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) nach 4stündiger Inkubationszeit signifikant moduliert. Die LPS-Exposition führte zu einer geringgradig verminderten Expression vom NF κ B-Gen um das 0,9fache gegenüber der Kontrolle ($p=0,9$).

Die Stimulation der UEZ mit Uterussekret E-negativer Tiere führte zu einer signifikant geringeren Expression von I κ B gegenüber der Kontrolle ($p=0,01$). Die mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle war in Gruppe E-pos ebenfalls geringer, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau ($p=0,08$) (siehe Abbildung 16). Die Stimulation der UEZ mit LPS bewirkte gegenüber der Kontrolle eine geringfügige (1,2fach), aber signifikante Expressionssteigerung von I κ B ($p=0,029$). Die I κ B-Expressionsstärke nach LPS-Exposition war im Verhältnis zu Gruppe E-pos 2,3fach ($p=0,013$) und zu Gruppe E-neg ($p<0,001$) 2fach erhöht. Ein relevanter mRNA-Expressionsunterschied zwischen E-pos und E-neg bestand nicht.

IL10

Die mRNA des anti-inflammatorischen Zytokins IL10 wurde in den UEZ-Expositionsgruppen E-neg und LPS signifikant schwächer exprimiert als in der Kontrolle (siehe Abbildung 16). Entgegen den untersuchten pro-inflammatorischen Zytokinen bewirkte eine LPS-Exposition der UEZ eine Verminderung der IL10-Expressionsstärke auf ein Fünftel gegenüber der Kontrolle ($p=0,029$). Auch in Gruppe E-neg kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer verminderten IL10-Expression um das 4fache ($p=0,005$). Die mRNA-Expressionsstärke von IL10 in Gruppe E-pos entsprach in etwa der Basis-mRNA-Expressionsstärke der Kontrolle ($p=0,77$). Die mRNA-Expressionsstärke von

IL10 in der Gruppe E-pos war 3,6fach höher als in der Gruppe E-neg und unterschied sich damit hochsignifikant ($p < 0,001$).

2.3.4. Stimulationsversuch mit isolierten peripheren PMN

Pro Probe wurden 10 Millionen aus dem Blut isolierte PMN mit 300 μ l Zellkulturüberstand aus der vorherigen UEZ-Stimulation (siehe II.2.9.1) über 3 Stunden inkubiert. Im PMN-Stimulationsversuch ist das uterine Stimulationsmaterial dementsprechend kein reines (verdünntes) Uterussekret mehr (vgl. III.2.9.1), sondern mit Uterussekret versetzter Zellkulturüberstand (vgl. III.2.9.2). Nach Zentrifugation, zur Gewinnung eines Zellpellets und Abnahme des Kulturüberstandes, wurde das Zellpellet in RNAlater konserviert. Es wurde die relative mRNA-Expression von zehn Kandidatengen in folgenden vier Versuchsgruppen verglichen: E-pos, E-neg, LPS (1 μ g/ml) und Kontrolle (Medium). Neun der Kandidatengene codieren pro-inflammatorisch wirksame Zytokine: CXCL5, CXCL8, IL6, CCL2, CCL20, NF κ B, I κ B, IL1 β und TNF α . Als Vertreter der entzündungshemmenden (regulatorischen) Zytokine wurde eine mRNA-Expressionsanalyse von Zytokin IL10 durchgeführt.

2.3.5. Große Variabilität der cDNA-Produktmenge im PMN-Stimulationsversuch

Abbildung 17 zeigt die Variabilität der mRNA-Expressionsstärke zwischen den einzelnen Proben in den Stimulationsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) und der Kontrolle der untersuchten Kandidatengene im PMN-Stimulationsversuch. Die Kandidatengene CXCL5 und CXCL8 wurden innerhalb der Expositionsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) mit deutlicher Variabilität der mRNA-Expressionsstärke zwischen den Proben exprimiert. Zwischen dem minimalen und maximalen Ct-Wert innerhalb einer Gruppe lagen bis zu 3,7 PCR-Zyklen. In der Kontrolle wurde die mRNA beider Gene aber sehr konstant exprimiert; die Ct-Werte variierten hier zwischen den Proben um weniger als einen PCR-Zyklus. Die LPS-Exposition führte im Vergleich zu den Gruppen E-pos und E-neg zu einer größeren Variabilität der mRNA-Expressionsstärke zwischen den Proben innerhalb der Gruppe (siehe Abbildung 17). IL6 wurde in der Kontrolle konstant exprimiert. Innerhalb der Gruppen variierten die Ct-Werte um maximal 2,4 PCR-Zyklen. Bei

den Kandidatengen CCL20, IL1 β , I κ B und TNF α lag eine große Variabilität der mRNA-Expressionsstärke zwischen den Proben in der Kontrolle vor. Zwischen dem ersten und letzten Erreichen des Ct-Wertes lagen mehr als drei PCR-Zyklen (siehe Abbildung 17). Die LPS-Exposition führte bei den PMN zu einer der Kontrollgruppe ähnlichen Variabilität der mRNA-Expressionsstärke, mit einer Varianz von bis zu 3,6 PCR-Zyklen zwischen den Ct-Werten der Proben. Die Stimulation mit E-pos oder E-neg führte demgegenüber zu einer konstanteren mRNA-Expressionsstärke bei CCL20, IL1 β und I κ B (siehe Abbildung 16). Trotz der Variabilität der mRNA-Expressionen zwischen den Proben innerhalb der einzelnen Stimulationsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) war der Unterschied der mRNA-Expressionsstärken zwischen E-pos und Kontrolle, sowie zwischen E-neg und der Kontrolle bei IL1 β signifikant (E-pos, $p=0,04$; E-neg, $p=0,004$) (siehe Abbildung 18).

Im Folgenden werden Expressionsstärken der Kandidatengene durch die PMN immer im Vergleich zur Kontrolle beschrieben.

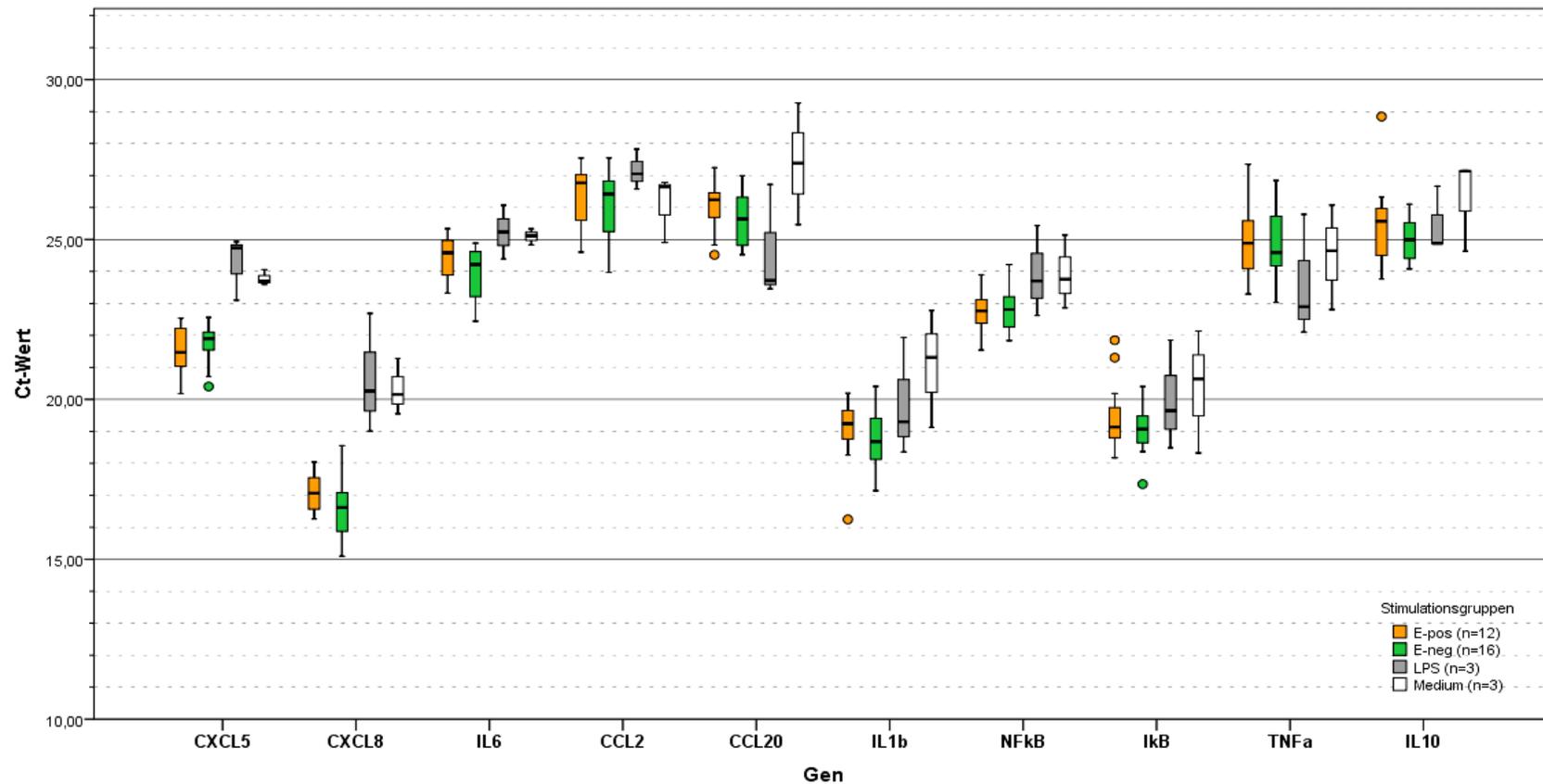


Abbildung 17: Variabilität der mRNA-Expressionsstärke im PMN-Stimulationsversuch innerhalb der Versuchsgruppen.

Stimulationsgruppen: E-pos: Endometritis-positive Tiere; E-neg: Endometritis-negative Tiere; LPS (1 μ g/ml); Kontrolle (Medium). Die Inkubationszeit betrug 3h; die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Darstellt sind die Ct-Werte der qRT-PCR pro Gruppe und Kandidatengen als Whisker-Boxplots mit Ausreißern ($^{\circ}$) und Extremwerten ($*$) (siehe III.2.11). Der Ct-Wert beschreibt die Anzahl von PCR-Zyklen, die bis zum cDNA-Produktnachweis durchlaufen werden. Niedrige Ct-Werte zeigen, dass eine große Ausgangsmenge an mRNA in der Probe enthalten ist (siehe III.2.10.3). CXCL5: CXC-Chemokine ligand 5; CXCL8: CXC-Chemokine ligand 8; CCL2: CC-Chemokine ligand 2; CCL20: CC-Chemokine ligand 20; IL6: Interleukin 6; TNF α : Tumornekrosefaktor α ; I κ B: kappaB Inhibitor; IL10: Interleukin 10

2.3.6. mRNA-Expressionsmodulation isolierter peripherer PMN

Die relative mRNA-Expressionsstärke der Kandidatengene gegenüber der Basisexpression der Kontrolle ist zusammengefasst in Abbildung 18 dargestellt. Tabelle 15 im Anhang zeigt die mRNA-Expressionsstärke relativ zur Kontrolle für die einzelnen Kandidatengene und Gruppen (E-pos, E-neg, LPS) mit zugehörigen Signifikanzen. Die mRNA-Expression der Kandidatengene CXCL8, CXCL5, NFκB und IL1β bei Stimulation der PMN mit Zellkulturüberstand aus der E-positiven Versuchsgruppe war im Vergleich zur Kontrolle signifikant stärker (siehe Abbildung 18). Eine Inkubation mit Kulturüberstand aus der E-negativen Gruppe führte ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate bei CXCL5 ($p=0,003$), CXCL8 ($p<0,001$) und IL1β ($p=0,004$), erreichte jedoch kein Signifikanzniveau bei NFκB ($p=0,059$). Nach LPS-Exposition konnte nur bei CCL20 ein signifikanter Expressionsunterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden ($p=0,025$). Bei dem Gen mit der am stärksten exprimierten mRNA handelte es sich um CXCL8, gefolgt von CXCL5 (siehe Abbildung 17). Bei keinem der untersuchten Gene ließ sich ein signifikanter Unterschied der mRNA-Expressionsstärke zwischen den Gruppen E-pos und E-neg feststellen.

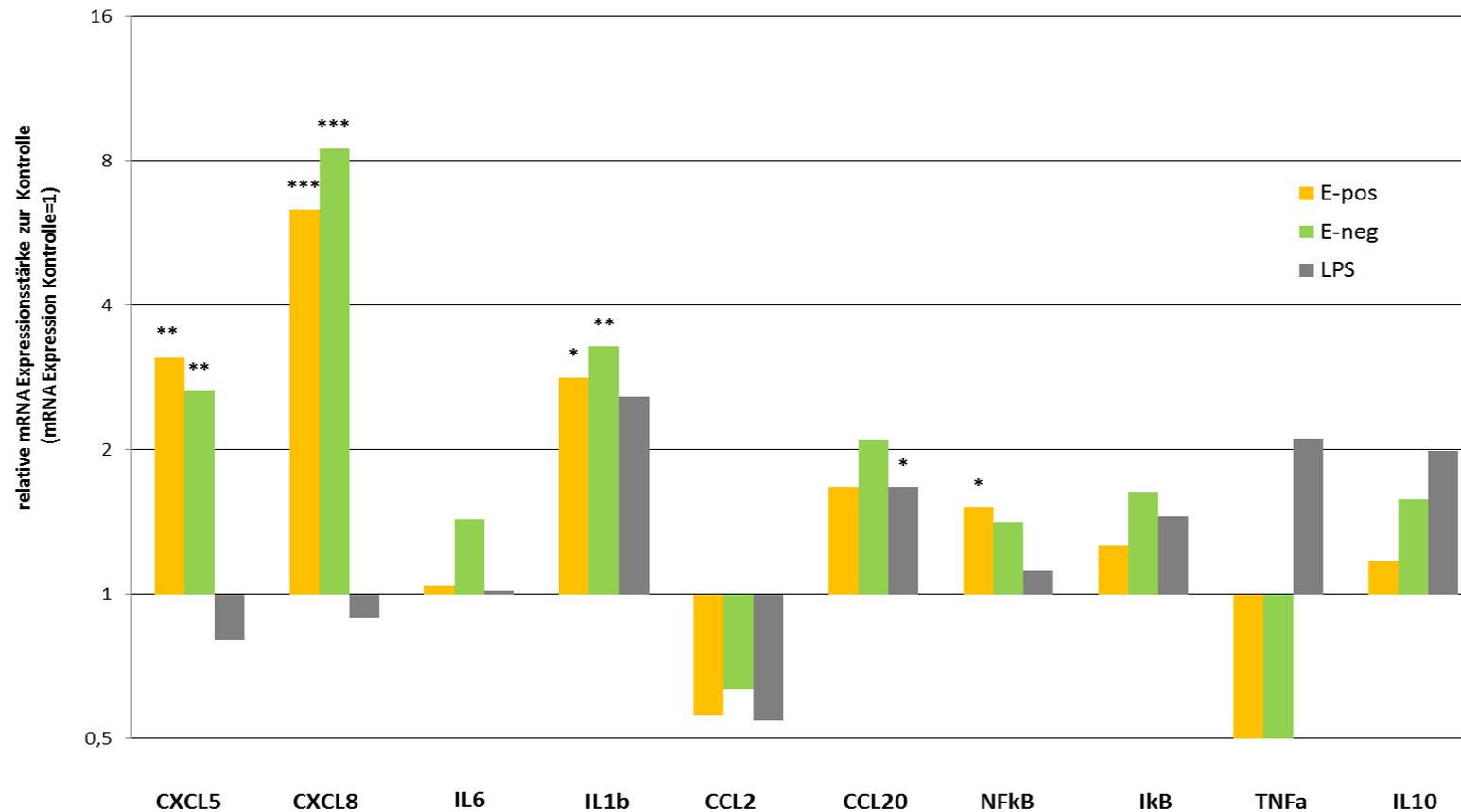


Abbildung 18: Relative mRNA Expressionsstärke der inflammatorischen Kandidatengene stimulierter PMN in-vitro. Die Ergebnisse sind relative Expressionsstärken in logarithmischer Darstellung (mRNA-Expressionsstärke Medium-Kontrolle= 1) E-pos: Endometritis-positive Tiere; E-neg: Endometritis-negative Tiere (siehe. IV.1.6). Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle (*= $p \leq 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p \leq 0,001$), Klammern zeigen Unterschiede zwischen E-pos und E-neg. CXCL5: CXC-Chemokine ligand 5; CXCL8: CXC-Chemokine ligand 8; CCL2: CC-Chemokine ligand 2; CCL20: CC-Chemokine ligand 20; IL6: Interleukin 6; TNF α : Tumornekrosefaktor α ; I κ B: kappaB Inhibitor; IL10: Interleukin 10

CXCL5 und CXCL8

Die mRNA-Expression von CXCL5 war bei PMN in Gruppe E-pos und Gruppe E-neg gegenüber der Kontrolle signifikant verstärkt. In Gruppe E-neg war die mRNA-Expression um das 2,7fache ($p=0,003$), in Gruppe E-pos um das 3fache ($p=0,006$) gegenüber der Kontrolle verstärkt. Der mRNA-Expressionsunterschied zwischen E-pos und E-neg war nicht signifikant ($p=0,3$). Die LPS-Exposition führte bei den PMN zu keiner signifikanten Modulation der mRNA-Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,7$). Es lag eine signifikant stärkere mRNA-Expression von Gruppe E-pos im Vergleich zu LPS ($p=0,001$) und Gruppe E-neg zu LPS ($p<0,001$) vor. Im Vergleich zwischen den ausgewählten Kandidatengen wurde die mRNA von CXCL5 von den PMN, nach CXCL8, am zweitstärksten exprimiert (siehe Abbildung 17).

Die CXCL8-Expression war im Verhältnis zur Kontrolle in den Uterussekrete-Expositionsgruppen hochsignifikant verstärkt. In der Gruppe E-pos wurde CXCL8 um etwa das 6fache ($p<0,001$) und in der Gruppe E-neg um mehr als das 8fache ($p<0,001$) der Kontrolle exprimiert. Der Unterschied der CXCL8-Expressionsstärke zwischen E-pos und E-neg erreichte aber kein Signifikanzniveau ($p=0,75$). Die LPS-Exposition der PMN führte im Gegensatz zu den Sekret-Expositionsgruppen (E-pos, E-neg) zu keinem mRNA-Expressionsunterschied im Vergleich zu der Kontrolle ($p=0,89$). Im Vergleich zu den anderen Kandidatengen wurde die mRNA von CXCL8 am stärksten exprimiert (siehe Abbildung 17).

IL6

Die mRNA-Expression von IL6 wurde in keiner Expositionsgruppe (E-pos, E-neg, LPS) signifikant unterschiedlich zur Kontrolle moduliert (siehe Abbildung 17). Die Expression in Gruppe E-pos war, mit dem 0,76fachen, nicht-signifikant schwächer als die mRNA-Expression in Gruppe E-neg ($p=0,1$). Die mRNA von IL6 wurde in der Kontrolle im Vergleich zu den Expositionsgruppen sehr konstant exprimiert (siehe Abbildung 17).

CCL2

Die mRNA-Expression von CCL2 wurde in keiner der drei Expositionsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) signifikant moduliert (siehe Abbildung 17). Die mRNA von

CCL2 wurde von den PMN in den Gruppen E-pos, E-neg und in der Kontrolle mit starker Variabilität der Expressionsstärke zwischen den Proben (bis zu 3,6 PCR-Zyklen zwischen minimalen und maximalen Ct innerhalb Gruppe E-neg) und in sehr geringer Menge exprimiert. Die LPS-Stimulation der PMN führte zu einer relativ konstanten mRNA-Expression (siehe Abbildung 17).

IL10

Die mRNA-Expressionsstärke von IL10 bei PMN wurde in Gruppe E-pos und Gruppe E-neg nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle moduliert. Eine LPS-Exposition führte zu einer 2fach verstärkten mRNA-Expression von IL10 im Vergleich zur Kontrolle, ohne dass dies statistisch belegt werden konnte ($p=0,1$; siehe Abbildung 18). IL10 war eines der von den PMN am schwächsten exprimierten Gene (siehe Abbildung 17).

CCL20

Die mRNA-Expression von CCL20 wurde in der Kontrolle mit großer Variabilität von knapp vier PCR-Zyklen zwischen den Proben exprimiert (siehe Abbildung 17). Die mRNA-Expression von CCL20 war in allen drei Gruppen (E-pos; E-neg; LPS) gegenüber der Kontrolle verstärkt. Nur bei LPS-Exposition, mit einer 1,7fach verstärkten Expression, war der Unterschied zur Kontrolle signifikant ($p=0,025$). CCL20 wurde nach LPS-Exposition im Verhältnis zur Gruppe E-pos 4,5fach stärker ($p=0,002$) und im Verhältnis zu der Gruppe E-neg 3,5fach stärker exprimiert ($p=0,01$). Eine ähnlich verstärkte mRNA-Expression in den Sekretgruppen im Vergleich zur LPS-Gruppe (siehe Abbildung 18) erreichte kein Signifikanzniveau. Insgesamt wurde CCL20 von den PMN nur in geringer Menge exprimiert (siehe Abbildung 17).

NFκB/IκB

Die mRNA-Expression von NFκB war in Gruppe E-pos signifikant um das 1,5fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($p=0,046$). Die Erhöhung der mRNA-Expression um das 1,4fache in der Gruppe E-neg im Vergleich zur Kontrolle erreichte keine Signifikanz ($p=0,06$). Der Unterschied in der mRNA-Expressionsstärke von NFκB zwischen den Gruppen E-pos und E-neg war nicht signifikant ($p=0,5$). Die LPS-Exposition der PMN bewirkte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Modulation der mRNA-Expression (siehe Abbildung

18). NFκB wurde im Vergleich zu den anderen Kandidatengenenen nur schwach exprimiert (siehe Abbildung 17).

Die IκB-mRNA-Expression wurde in keiner Gruppe (E-pos, E-neg, LPS) im Vergleich zur Kontrolle signifikant moduliert (siehe Abbildung 18). Es lag kein Unterschied in der mRNA-Expressionsstärke zwischen Gruppe E-pos und Gruppe E-neg vor (Abbildung 18). Die mRNA-Expressionsstärke nach LPS-Exposition unterschied sich nicht von der Kontrolle. Im Vergleich der mRNA-Expressionsstärken von NFκB und IκB zeigte sich eine stärkere Expression von IκB nach drei Stunden Inkubationszeit (siehe Abbildung 17).

TNFα

Die mRNA-Expression von TNFα wurde in keiner der Expositionsgruppen (E-pos, E-neg, LPS) im Vergleich zur Kontrolle signifikant moduliert. Die mRNA-Expression nach LPS-Exposition war im Verhältnis zu E-pos ($p=0,01$) und E-neg ($p=0,002$) jeweils etwa um das 4fache stärker (siehe Abbildung 18). Es lag eine deutliche Variabilität der mRNA-Expressionsstärke von TNFα innerhalb der Gruppen und der Kontrolle vor. Die größte Varianz war in Gruppe E-pos mit einem Unterschied von vier PCR-Zyklen zwischen dem minimalen und maximalen Ct-Wert zu finden. Insgesamt wurde die mRNA von TNFα in vergleichsweise geringer Menge exprimiert (siehe Abbildung 17).

IL1β

Die mRNA-Expression von IL1β war in Gruppe E-pos im Vergleich zur Kontrolle um das 2,8fache und in Gruppe E-neg um das 3,3fache verstärkt. Der Expressionsunterschied zu der Kontrolle war bei E-pos ($p=0,04$) und E-neg ($p=0,004$) signifikant. Der Unterschied der IL1β-Expression zwischen den beiden Gruppen erreichte kein Signifikanzniveau ($p=0,56$) (siehe Abbildung 18). Die um das 2,6fach verstärkte mRNA-Expression von IL1β nach LPS-Exposition im Vergleich zur Kontrolle erreichte kein Signifikanzniveau ($p=0,1$). Die mRNA von IL1β wurde von den PMN mit einer großen Variabilität zwischen den einzelnen Proben in den Gruppen (E-pos, E-neg, LPS) und der Kontrolle exprimiert (siehe Abbildung 17). Die größte Varianz lag in Gruppe E-pos mit einem Abstand von vier PCR-Zyklen zwischen dem minimalen und maximalen Ct-Wert vor. Im Vergleich zu den anderen Kandidatengenenen wurde IL1β relativ stark exprimiert (siehe Abbildung 17).

V. DISKUSSION

Ziel des Dissertationsprojektes war es, das Uterussekret von Kühen ohne und mit endometrialen Entzündungsmerkmalen unter definierten Bedingungen zu gewinnen und das Sekret für diagnostische Zwecke sowie für Untersuchungen zur Pathogenese der subklinischen Endometritis einzusetzen.

1. Konzeptionelle Überlegungen

Uterussekret als Probenmedium

Uterussekret wurde bisher kaum für die Endometritisdiagnostik des Rindes oder entsprechende Pathogeneseforschungen genutzt. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem Sekret um einen über das Gesamtorgan kommunizierenden Flüssigkeitsfilm handelt, der über die modulierte epitheliale Sezernierung die inflammatorische Reaktionslage des Endometriums widerspiegelt.

Das Uterussekret der beprobten Kühe sollte durch die Entnahmetechnik so wenig wie möglich in seiner Zusammensetzung und Konzentration an Entzündungsmediatoren (v.a. Zytokine) verändert werden. Ziel war eine gewebeschonende Sekretgewinnung mit keinen oder nur minimalen methodisch bedingten inflammatorischen oder zellschädigenden Gewebereizungen. Aus diesem Grund wurden ophthalmologische Schwämme aus der Humanmedizin verwendet, die diese Vorbedingungen in ihrer Primärverwendung ebenfalls erfüllen müssen und die sich in der humanmedizinischen Nutzung bewährt haben. Vorteil dieser Methodik war die Gewinnung von unverdünntem Uterussekret (im Gegensatz zu Uterusspülungen). Somit war auch eine exakte Volumenbestimmung möglich.

Zeitpunkt der Probenentnahme

Ein Ziel dieser Studie war der Vergleich von Endometritis-positiven Kühen mit Tieren ohne entzündliche endometriale Merkmale. In dem Großteil der Forschungsarbeiten zur Endometritis des Rindes findet die Beprobung des bovinen Uterus im Östrus oder im postpartalen Zeitraum statt. Im Östrus, wie auch im Zeitraum nach der Kalbung, befindet sich der Uterus jedoch in einem immunologisch besonders reaktiven Zustand. Der prozentuale Anteil an PMN ist

physiologisch erhöht (SKJERVEN, 1956; BUTT et al., 1991; SHELDON et al., 2006; MERBACH, 2011; MADDOZ et al., 2013a). Ein Vergleich von Tieren in diesem Zeitraum ist somit eher ein Vergleich im Grad der Ausprägung von physiologischen entzündungsähnlichen Merkmalen. Im Diöstrus hingegen, als längste Zyklusphase (5.-18.Tag), ist die immunologische Reaktivität herabgesetzt (SHELDON et al., 2006; KÜHNEL, 2015). Es ist also davon auszugehen, dass nicht-abheilende, entzündliche Prozesse im Diöstrus im Vergleich zum Östrus besser von physiologischen uterinen Abwehrmechanismen abzugrenzen sind. Eine erhöhte Anzahl an PMN in uterinen Ausstrichen des Diöstrus ist diagnostisch aussagekräftig für eine subklinische Endometritis, da in dieser Zyklusphase physiologisch die PMN-Anzahl am geringsten ist (SKJERVEN, 1956).

In der vorliegenden Studie wurde deshalb Uterussekret im Diöstrus der Rinder gewonnen. Als Schwellenwert bei der Auswertung zytologischer Ausstriche zur Endometritisdiagnostik wurden 5% für einen erhöhten PMN-Gehalt gewählt (siehe Tabelle 1). Um die physiologischen Entzündungsprozesse der postpartalen Involutions- und Reinigungsphase sicher auszuschließen, wurden nur Tiere beprobt, deren Kalbung mindestens drei Monate zurücklag.

Die Bedingungen des Diöstrus, insbesondere die geschlossene Cervix uteri, erforderte für eine erfolgreiche und schonende Passage die Konstruktion eines neuen kleinumigen Probenentnahme-Instrumentariums. Außerdem war es für die Untersuchung wichtig nacheinander Sekretentnahme, Schleimhautabstrich für die Zytologie und Biopotentnahme durchzuführen. Dafür wurden eine sogenannte Minizytobrush und eine Minibiosiezange etabliert (siehe III.2.3). Mit diesen konnte eine kombinierte Endometriumsdiagnostik durchgeführt und gleichzeitig Uterussekret mittels Merocel®-Schwammmaterial gewonnen werden.

Die Zytobrush-Methode ist zum jetzigen Zeitpunkt die gängigste Methode für die Diagnostik von subklinischen Endometritiden (BARLUND et al., 2008; BARANSKI et al., 2012; PASCOTTINI et al., 2015). Die Biopsie stellt aber noch immer den diagnostischen Goldstandard dar (MADDOZ et al., 2013b; BOGADO PASCOTTINI et al., 2016). Beim Rind werden diese Methoden fast ausschließlich für wissenschaftliche Fragestellungen, sehr selten nur unter Praxisbedingungen eingesetzt. Über die parallele Anwendung in den vorliegenden Studien konnten beide Methoden bezüglich ihrer Aussagekraft für die Endometritisdiagnose miteinander verglichen werden.

1.1. Merocel®-Schwämmchenmaterial für die Entnahme von bovinen Uterussekreten

In der vorliegenden Studie wurde das Merocel®-Schwämmchen erfolgreich zur Gewinnung von uterinem Sekret von 38 beprobten Tieren eingesetzt. Bei den Schwämmchen handelt es sich um ein im trockenen Zustand steifes Material, das durch seine Stabilität gut durch den Arbeitskanal geführt werden konnte. Die hier etablierte Konstruktion aus Führungsstab und Arbeitskanal erwies sich als sicher und stabil. Die Schmelzklebe-Verbindung zwischen Schwämmchen und Führungsstab war strapazierfähig und haltbar, sodass es in keinem Fall zu einem Verlust des Schwämmchens während der Probenentnahme kam. Das Einfädeln des Schwämmchens in den Arbeitskanal war teilweise zeitaufwendig und könnte einen Risikofaktor für Verunreinigungen darstellen. In der sich an diese Studie anschließenden Folgearbeit wird deshalb ein Adapter zur vereinfachten Einführung in den Arbeitskanal verwendet. Intrauterin war der Schwamm durch die Uteruswand gut palpierbar und ließ sich in seiner gesamten Länge für die Absorption von Sekret nutzen. Bei dem Merocel®-Material handelt es sich um ein vorrangig als Tamponaden-Material verwendetes chirurgisches PVA-Schwammgewebe aus der Humanophthalmologie und –chirurgie (ARYA et al., 2003; YANOFF & DUKER, 2013). Die Eignung des Schwammgewebes für immunologische Untersuchungen des Uterussekretes zeigte bereits Castle (2004): In einem Vergleich von drei ophthalmologischen Schwämmen stellte sich Merocel® als bestes Material für die Gewinnbarkeit und den Nachweis von Zytokinen dar.

Durch die hochabsorptiven Eigenschaften des Merocel®-Materials konnten aus allen beprobten Uteri erfolgreich Sekretproben gewonnen werden. Das Ergebnis der Sekretgewinnung war dabei unabhängig von der Größe des Uterus. Bei Anwendung der Low-volume-Uteruslavage stellten Kasimanickam et al. (2005) hingegen eine negative Korrelation zwischen Uterusgröße und zurückgewonnener Spülflüssigkeit fest; zusätzlich konnte bei 17% der durchgeführten Lavagen keine Spülflüssigkeit zurückgewonnen werden. Auch in der Studie von Brodzki et al. (2015a) konnte die Spülflüssigkeit nicht vollständig zurückgewonnen werden. Bei der Lavage kann dementsprechend ein Zurückbleiben von Fremdflüssigkeit im Uterus nicht vermieden werden, während bei der Schwämmchenmethode die Schwämmchen immer vollständig entfernt wurden. Es handelt sich zudem um

eine reizarme Probengewinnung. Das Schwämmchen wird in der Humanmedizin als reizloses und gewebeschonendes Tamponadematerial verwendet. Bei der Uteruslavage weist hingegen eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten in der Spülflüssigkeit gegenüber Zytobrush-Ausstrichen auf eine stärkere Reizung des endometrialen Gewebes hin (KASIMANICKAM et al., 2005).

Die Verwendung des Schwämmchens ermöglichte außerdem eine genaue Bestimmung des Verdünnungsfaktors, da das Volumen des gewonnenen Uterussekrets vor der Waschung des Schwämmchens bestimmt wurde (siehe III.2.6.2). Im Gegensatz dazu kann die Verdünnung der tatsächlichen Substratkonzentration methodenbedingt mit der Low-Volume-Lavage nicht kalkuliert und berücksichtigt werden, da die Spülflüssigkeit im ersten Schritt in den Uterus eingebracht wird (KIM et al., 2014; BRODZKI et al., 2015a).

Bei den ausgewählten beprobten Uteri konnten keine Ansammlungen von intrauteriner Flüssigkeit festgestellt werden. Bei dem intrauterinen Sekret handelte es sich meist lediglich um einen das Endometrium bedeckenden Flüssigkeitsfilm, vergleichbar mit der serösen Gleitschicht der abdominalen Organe. Trotzdem konnte auf Grund des hohen Absorptionsvermögens und einer relativ langen intrauterinen Verweildauer (Saugphase) des Schwämmchens über vier Minuten, minimal mindestens ein Volumen von 46 µl aus den Uteri gewonnen werden (siehe Tabelle 12). Das Maximalvolumen an gewonnenem Uterussekret derselben Gruppe (E-pos) betrug 280 µl, was das gute Absorptionsvermögen des Schwämmchens belegte. Die gewinnbare Uterussekretmenge wurde also bei einigen Tieren bereits durch die im Uterus vorhandene Sekretmenge limitiert. Gerade dann ist die Verwendung von Schwämmchen zur Uterussekretgewinnung im Vergleich zur Low-Volume-Lavage im Vorteil. Bei der Anwendung von Uteruslavagen würde bei einem so geringen uterinen Ausgangsvolumen eine starke Verdünnung der rückgewonnenen uterinen Flüssigkeit vorliegen. Beim Vergleich der gewonnenen Uterussekretvolumina der Gruppe E-pos mit der Gruppe E-neg zeigte sich, dass in Gruppe E-pos die Tier-individuellen gewonnenen Uterussekretvolumina deutlich stärker schwankten als in Gruppe E-pos (siehe Abbildung 14). Zu begründen ist diese Schwankung vermutlich damit, dass die Endometritis in Gruppe E-pos in Form von exsudativer Endometritis oder nicht-exsudativer Endometritis auftrat (RODENBUSCH, 2011). Dies bestätigen die Ergebnisse aus der anschließenden histologischen Untersuchung in dieser

Studie (siehe Tabelle 13). Auch Kasimanickam et al. (2004) und Barlund et al. (2008) beschrieben, dass ein Teil der untersuchten Kühe mit einer vermehrt zellulären Antwort ohne oder mit wenig Sekretproduktion auf einen inflammatorischen Reiz reagieren, während andere mit einer gesteigerten Sekretion bei minimaler zellulärer Antwort als Reinigungseffekt reagieren. Die mediane Uterussekretmenge war in beiden Gruppen der vorliegenden Studie jedoch gleich. Das stimmt mit den Beobachtungen von Mateus et al. (2002) überein: Hier konnten keine Unterschiede in Uterusvolumen und intrauteriner Flüssigkeitsmenge zwischen Tieren mit milder Endometritis und gesunden Tieren festgestellt werden. Die intrauterine Flüssigkeitsmenge war in der vorliegenden Studie in beiden Gruppen durchschnittlich sehr gering. Zudem wurde eine Endometritis vielfach zytologisch und/oder histologisch diagnostiziert, ohne dass das uterine Sekretvolumen erhöht war. Die Ergebnisse zur gewonnenen Uterussekretmenge zeigen, dass eine Diagnosestellung „Endometritis“ über den alleinigen Nachweis von uteriner Sekretansammlung (z.B. Sonographie), insbesondere bei der subklinischen Endometritis, als kritisch zu betrachten ist. Zwar konnten Kasimanickam et al. (2004) die subklinische Endometritis über ein sonographisch nachweisbares erhöhtes Sekretvolumen in Zusammenhang mit positiver Endometriumszytologie diagnostizieren, jedoch wurde in der Studie insbesondere das Gesamtpuerperiums (also bis etwa sechs Wochen p.p.) untersucht. In diesem Zeitraum ist allerdings, zumindest zu Beginn, eine erhöhte Sekretproduktion und auch –präsenz im Zusammenhang mit dem uterinen Reinigungsprozess als physiologisch anzusehen. In der vorliegenden Studie wurden nur Tiere zu einem späteren Zeitpunkt beprobt; bei ihnen lag die Kalbung mindestens drei Monate zurück.

1.2. Kombinierte Endometriumsdiagnostik mit dem neu etablierten Probenentnahme-Instrumentarium

Das vierteilige Probenentnahme-Instrumentarium wurde konstruiert und etabliert um eine Endometritisdiagnostik bei diöstrischen Tieren zu ermöglichen. Es konnte bei 38 Tieren erfolgreich angewendet werden; lediglich ein juveniler Färsen-Uterus konnte auf Grund der Unpassierbarkeit der Zervix nicht beprobt werden.

Die Minizytobrush ermöglichte, trotz der weicheren und kürzeren Borsten, die Anfertigung qualitativ ebenbürtiger Abstriche im Vergleich zur herkömmlichen

Zytobrush (siehe IV.1.3). So konnten akute entzündliche Prozesse des Uterus auch im Diöstrus nachgewiesen werden.

Auf Grund der kleinen und oberflächlichen Gewebe-Beprobung ist die Biopsie mit der hier eingesetzten Minibiopsiezange sehr gewebeschonend. Trotz der relativ kleinen Bioptate konnte in 33 von 36 Fällen eine aussagekräftige histologische Auswertung zur Fragestellung Endometritis „ja“ oder „nein“ erfolgen (siehe Abbildung 13). Eingeschränkt ist die histologische Untersuchung in der weiterreichenden Diagnostik mit Bewertung der tiefliegenden Strukturen (siehe IV.1.4.1). Ein Einsatz der Minibiopsiezange empfiehlt sich somit als tierschonende Methode für die Endometritisdagnostik. Ist eine vollständige histologische Charakterisierung der Uteruswand indiziert, ist die Verwendung von herkömmlichen Biopsiezangen zuverlässiger.

Große Vorteile des hier eingesetzten Probenentnahmeanstrumentes bietet die Kombination von Zytobrush und Biopsie. Bei fünf Tieren konnte eine Endometritis nur über die Zytologie diagnostiziert werden. Bei vier Tieren waren entzündliche Merkmale lediglich in der Histologie erkennbar. Nur drei Probanden wiesen sowohl eine positive Endometriumshistologie als auch -zytologie auf (siehe Tabelle 9).

Eine bezüglich Entzündungssymptomen unauffällige Histologie bei zytologischem Nachweis eines erhöhten PMN-Gehaltes kann verschiedene Ursachen haben: So können Entzündungsanzeichen durch eine unzureichende Größe und Tiefe bei der Biopotentnahme nicht erfasst worden sein. Eventuell handelte es sich teilweise auch um lokale entzündliche Vorgänge die zufällig durch eine Biopsie nicht erfasst wurden. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie (siehe IV.1.4.2) sowie die Arbeit von Rodenbusch (2011) und Chapwanya et al. (2010), dass die Entnahme eines einzelnen Biopats für spezifische Fragestellungen am bovinen Endometrium ausreichend ist. Auch möglich ist ein durch entzündliche Prozesse im angrenzenden Gewebe bedingter intrauteriner Einstrom von Neutrophilen, wie er z.B. im Falle von Zervizitis auftreten kann. Hartmann et al. (2016) konnten allerdings keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einem erhöhtem uterinen PMN-Gehalt und isolierter Zervizitis feststellen. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass die Histologie und Zytologie verschiedene Stadien und Formen der Entzündung erfassen. Dies bestätigen auch die Ergebnissen der Studie von Merbach (2011). Hier konnte bei

24 von 40 zytologisch subklinisch erkrankten Tieren (>10% PMN), trotz deutlich größerer Biopate, histologisch keine Endometritis nachgewiesen werden.

Bei vier Tieren der vorliegenden Studie konnte trotz histologischem Endometritisnachweis in der zytologischen Untersuchung kein erhöhter PMN-Gehalt nachgewiesen werden. Insbesondere bei der chronisch-eitrigen und nicht-eitrigen Endometritis kommt es nicht zu einer vermehrten Auswanderung von PMN in das Uteruslumen (RODENBUSCH, 2011). Diese Formen sind schwer mittels Zytologie zu diagnostizieren. In der Studie von Rodenbusch (2011) weisen nur 15,2% der histologisch diagnostizierten subklinischen Endometritiden einen PMN-Gehalt von >5% auf. Aktuelle Veröffentlichungen bestätigen, dass die zytologische und histologische Diagnose häufig eine schlechte Übereinstimmung aufweisen (MADOZ et al., 2013b; WAGENER et al., 2017). Diese Tatsache unterstützt die parallele Anwendung beider Methoden mit dem Probenentnahme-Instrumentarium für eine sicherere Diagnostik von Endometritiden. Da gerade chronische oder nicht-eitrige entzündliche Endometritiden häufig keinen erhöhten intrauterinen PMN-Gehalt bedingen, können diese Endometritisformen zu falsch-negativen Aussagen bei der alleinigen Anwendung der Zytobrush-Methode führen. Merbach (2011) stellte eine abnehmende PMN-Konzentration und ein vermehrtes Auftreten von Lymphozyten und Plasmazellen bei nicht-eitrigen Endometritiden fest. Diese Verschiebung der vorherrschenden Zellpopulationen kennzeichnet nach gängiger Literatur (BÜTTNER & THOMAS, 2003; BÖCKER, 2008; MCGAVIN & ZACHARY, 2011) den Übergang zu einer chronischen Entzündung und wurde in aktuellen Studien auch im bovinen Endometrium im Rahmen der subklinischen Endometritis beobachtet (BARTELS, 2014). Die chronische Endometritis ist somit mit der Zytobrush-Methode schwer zu erfassen. Der hohe Anteil an zytologisch-positiven, aber histologisch-negativen Befunden in der vorliegenden, aber auch anderen Studien (MERBACH, 2011), zeigt jedoch auch, dass die Zytologie akute Endometritiden eventuell besser erfasst als eine alleinige histologische Untersuchung. Die Methoden können offenbar jeweils unterschiedliche Stadien der Entzündung präferentiell abbilden. Die parallele Verwendung von zwei anerkannten diagnostischen Methoden mit Hilfe des etablierten Probenentnahme-Instrumentariums erhöhte die Sicherheit der Endometritisdiagnostik, da die Vorteile beider Methoden kombiniert werden konnten.

2. Modulation der mRNA-Genexpression von UEZ und PMN durch Uterussekret von Kühen mit und ohne Endometritis

In den entsprechenden in-vitro-Stimulationsversuchen wurden UEZ und aus dem Blut isolierte PMN aus gesunden Tieren mit Uterussekret von E-positiven und E-negativen Tieren koinkubiert und eine mRNA-Expressionsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass selbst minimale Mengen an Uterussekret in Kulturmedium oder Zellkulturüberstand signifikante Unterschiede der mRNA-Expression bei den Kandidatengenen sowohl bei den UEZ als auch bei den PMN im Vergleich zur Kontrolle verursachten.

2.1. Exposition von UEZ mit Uterussekret

Primäre uterine Endometriumsepithelzellen wurden mit Uterussekret von E-negativen Kühen (Gruppe E-neg) oder von E-positiven (Gruppe E-pos) exponiert. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der mRNA-Expressionsmodulation gegenüber der Kontrolle, sowohl bei pro-inflammatorischen als auch anti-inflammatorischen Zytokinen. Vorteil der vorliegenden Studie war, dass die mRNA-Expression der Kandidatengene unabhängig von der untersuchten Zelle war (Verwendung der identischen UEZ-Linie), und allein durch die Uterussekreteigenschaften bedingt wurde. Die bekannten Einflussfaktoren auf die immunologische Kompetenz eines Tieres, wie Energiemangel, Stress oder sonstige Erkrankungen (HAMMON et al., 2006; SHELDON et al., 2009b), beeinflussten so die Zellreaktion nicht systematisch.

2.1.1. Signifikante mRNA-Expressionssteigerung der pro-inflammatorischen Zytokine CXCL8 und IL6

Beide Zytokine gehören zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine, wobei CXCL8 eines der wichtigsten Chemokine für Neutrophile darstellt (ZERBE et al., 2003). IL6 ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Interleukin der frühen Phase der Entzündung. Es wirkt auf verschiedenen Ebenen entzündungsfördernd, etwa durch Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Fieberinduktion (ISHIKAWA et al., 2004).

Die Inkubation der UEZ mit Uterussekret von E-positiven wie auch E-negativen Tieren führte gleichermaßen zu einer signifikanten Expressionssteigerung von IL6

und CXCL8 gegenüber der Kontrolle. Obwohl die Exposition mit Uterussekret E-positiver Tiere eine deutlich stärkere mRNA-Expression von IL6 und CXCL8 bedingte als die Stimulation mit Uterussekret E-negativer Tiere (E-pos/ E-neg IL6: 40/ 19 resp. CXCL8: 9,4/ 3,7), ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationsgruppen nachweisen. Grund dafür war die starke Schwankung der mRNA-Expression innerhalb der Stimulationsgruppen (siehe Abbildung 15). Es ließen sich bereits große individuelle Unterschiede zwischen den beprobten Tieren bei den gewonnenen uterinen Sekretmengen (siehe Abbildung 14), prozentualen PMN-Gehalten und histologischen Befunden der Biopstat-Analyse (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10) zeigen. Dies lässt auf eine starke Heterogenität zwischen den Einzeltieren in den Gruppen E-pos und E-neg schließen. Eine deutliche Schwankung in der mRNA-Expressionsstärke zwischen den Einzelproben wurde dementsprechend erwartet. Dies bestätigten Ghasemi et al. (2012), die einen starken Zusammenhang zwischen Einzeltier und Zytokinexpression beschrieben.

Die variable mRNA-Expressionsstärke der UEZ nach LPS-Exposition in der vorliegenden Studie war in diesem Maße unerwartet. Eine mögliche Begründung kann eine zu geringe, und somit unzureichend stimulierend wirksame, LPS-Konzentration in der Positivkontrolle sein. Die verwendete LPS-Konzentration (1µg/ml) konnte jedoch von Lechner (2008) bereits erfolgreich zur Stimulation von UEZ verwendet werden. Da es sich bei den kultivierten UEZ aber um Zellen der gleichen Zelllinie handelte, ist nicht auszuschließen, dass die verwendete Linie eine schlechtere Ansprechbarkeit auf LPS zeigte.

Trotz der unterschiedlichen vorliegenden Entzündungsformen bei den E-positiven Tieren ließen sich zwischen den Gruppen E-pos und E-neg unterschiedliche mRNA-Expressionsstärken pro-inflammatorischer Zytokine feststellen. Dass CXCL8 und IL6 bei Kühen mit Endometritis verstärkt exprimiert werden, zeigten bereits verschiedene Studien an Endometriumbiopsaten (HERATH et al., 2009; GALVAO et al., 2011) und Zytobrush-Proben (GHASEMI et al., 2012). Die Unterschiede in der Genexpressionsstärke bestehen aber nicht konstant, sondern unterliegen Schwankungen (FISCHER et al., 2010; GALVAO et al., 2011). Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Uterussekret aus E-positiven Tieren eine tendenziell stärkere mRNA-Expression von IL6 und CXCL8 durch UEZ verursachte. Dies ist ein Hinweis auf eine entzündungsfördernde und

eventuell auch -erhaltende Wirkung von Uterussekret E-positiver Tiere. Die immunmodulatorische Wirkung des Uterussekrets über enthaltene Botenstoffe bestätigen auch die Studien von Kim et al. (2014) und Brodzki et al. (2015a). Diese wiesen IL6, TNF α und IL10 in Uteruslavagen von Kühen mit klinischer und subklinischer Endometritis nach.

2.1.2. Signifikanter Unterschied in der IL10-Expression zwischen Tieren mit und ohne Endometritisbefund

Entgegen der Erwartungen führte die Exposition der UEZ mit Uterussekret E-positiver Tiere bei IL10 zu einer signifikant höheren Expression gegenüber Gruppe E-neg. Während in den Gruppen LPS und E-neg IL10 gegenüber der Kontrolle signifikant schwächer exprimiert wurde, führte das Uterussekret E-positiver Tiere zu einer mRNA-Expression von IL10 die der mRNA-Expressionsstärke der Negativkontrollgruppe entsprach (siehe Abbildung 18). Bei IL10 handelt es sich um eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine. Es bedingt eine Hemmung pro-inflammatorischer Mechanismen auf vielfältige Weise, z.B. durch eine Suppression der Makrophagenfunktionalität oder über verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL1 β , IL6, TNF α) und Chemokine (IL8) (COUPER et al., 2008). IL10 ist somit essentiell, um einer überschießenden inflammatorischen Gewebereaktion im späteren Verlauf der Entzündung entgegen zu wirken. Im Rahmen der Pathogenerkennung und -elimination ist jedoch eine überwiegend entzündungsfördernde Gewebereaktion nötig. Die Zusammensetzung des Uterussekretes E-negativer Tiere führte, wie LPS, zu einer Hemmung der IL10-Expression und so zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes der Entzündungsregulation hin auf die pro-inflammatorische Seite. Pathogene können dadurch bei E-negativen Tieren eventuell schneller und effektiver durch lokale Abwehrmechanismen bekämpft werden. Im Gegensatz dazu führte eine Exposition von UEZ mit Uterussekret aus E-positiven Tieren nicht zu einer Hemmung der mRNA-Expression von IL10. Das anti-inflammatorische Zytokin IL10, könnte somit für eine immunologische Dysregulation und Abwehrschwäche bei E-positiven Tieren verantwortlich sein. Die gleichzeitig verstärkte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine (CXCL8 und IL6) in der E-positiven Gruppen ist zudem ein Hinweis auf eine bestehende endometriale Entzündung. Es ist vorstellbar, dass es bei gleichzeitig verstärkter mRNA-Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zu

einem ständigen Auf- und Abflammen der endometrialen Entzündungsreaktion kommen kann, sodass die Entzündung weder abheilen noch klinisch werden kann.

Die Vermutung, dass das Uterussekret E-positiver Tiere eine anti-inflammatorische Zellantwort fördert, wird gestützt durch die Studien von Kim et al. (2014) und Brodzki et al. (2015a). Diese konnten eine erhöhte IL10-Konzentration in Uteruslavagen von Kühen mit klinischer (KIM et al., 2014) und subklinischer Endometritis (BRODZKI et al., 2015a) gegenüber gesunden Kühen nachweisen. Auch im Serum von Kühen mit Nachgeburtsverhaltung oder klinischer Endometritis war eine erhöhte Konzentration von IL10 festzustellen (ISLAM et al., 2013; BRODZKI et al., 2015a).

2.2. Uterussekret bedingt eine mRNA-Expressionssteigerung der pro-inflammatorischen Zytokinen CXCL5, CXCL8 und IL1b bei PMN

Im PMN-Expositionsversuch wurden aus dem Blut isolierte PMN von gesunden Kühen mit Zellkulturüberständen aus unterschiedlichen UEZ-Kulturen versetzt. Der verwendete Zellkulturüberstand enthielt das mittels Merocel®-Schwämmchen gewonnene Uterussekret. Der Versuchsaufbau war somit den physiologischen Vorgängen der Pathogenerkennung am Uterus nachempfunden: Die uterinen Epithelzellen agieren als erste Barriere der immunologischen Abwehr des Organs und beeinflussen die Einwanderung von Neutrophilen durch Freisetzung spezifischer Botenstoffe wie CXCL8. Im vorherigen UEZ-Stimulationsversuch ließen sich bereits Unterschiede der Zellreaktion in Abhängigkeit von der Uterussekret-Kategorie nachweisen. Im zweiten Expositionsversuch wurde die mRNA-Expressionsmodulation der PMN nach Kontakt mit Zellkulturüberstand aus dem UEZ-Expositionsversuch untersucht.

Trotz der Unterschiede in der mRNA-Expressionsstärke im UEZ-Versuch ließ sich bei den PMN kein Unterschied zwischen den Gruppen E-pos und E-neg feststellen. Unabhängig von der Kategorisierung des Uterussekrets kam es in beiden Gruppen zu einer verstärkten mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine gegenüber der Kontrolle: diese war bei den Kandidatengen CXCL5, CXCL8 und IL1 β signifikant (siehe Abbildung 18). Es existieren nur wenige Studien über die Genexpression boviner Blut-PMN aus Kühen mit Endometritis. Duvel et al. (2014) konnten in peripheren Blut-Leukozyten von Kühen mit subklinischer Endometritis eine erhöhte Genexpression von CXCL8, TNF α und

IL12 nachweisen. IL1 β , IL10 und CCL3 wurden ebenfalls exprimiert, allerdings ohne Unterschied zwischen gesunden und subklinisch kranken Tieren. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie konnte eine Genexpression von CCL20 nicht nachgewiesen werden, während es in der vorliegenden Studie zumindest schwach exprimiert nachweisbar war (siehe Abbildung 17).

Bemerkenswert war die deutlich stärkere mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine der PMN der Gruppen E-pos und E-neg im Vergleich zur LPS-Exposition. Dies ist ein Hinweis auf eine schnellere und stärkere Zellaktivierung durch Exposition mit UEZ-Zellkulturüberstand (und enthaltenem Uterussektret) als durch alleinige LPS-Exposition der gewählten Konzentration. Welche Faktoren dabei die Zellaktivierung maßgeblich beeinflussen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. In einem Nachfolgeprojekt soll deshalb der Gehalt von relevanten Entzündungsmediatoren insbesondere im Uterussektret untersucht werden.

Interessant erscheint in dem Zusammenhang, dass eine intrauterine Eingabe von humanem rekombinatem IL8 einen Einstrom von bovinen Neutrophilen mit erhöhter ROS-Bildungsfähigkeit in das Uteruslumen bewirkt (ZERBE et al., 2003). Im UEZ-Versuch der aktuellen Studie war die mRNA-Expression von CXCL8 in beiden UEZ-Uterussektretgruppen signifikant verstärkt. Die verstärkte mRNA-Expression in den PMN-Gruppen E-pos und E-neg könnte folglich durch die von den UEZ in den Zellkulturüberstand sezernierten Zytokinen begründet sein, wodurch die PMN schneller und stärker auf den Zellkulturüberstand reagieren als auf LPS. Dies entspricht Ergebnissen von Turner et al. (2014), die eine Akkumulation von IL6 und IL8 im Zellkulturüberstand von endometrialen Epithel- und Stromazellkulturen nach Stimulation mit bakteriellen Peptiden nachweisen konnten. Möglich ist auch, dass die verwendete LPS-Konzentration (1 μ g/ml) zu gering für eine ausreichende PMN-Stimulation ist. Dagegen spricht wiederum, dass dieselbe Konzentration an LPS jedoch an Explants der Zitze nach drei Stunden Inkubationszeit zu einer stärkeren Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und CXCL8 führte (LIND, 2011).

3. Ausblick: Uterussekret als vielversprechendes Medium für Diagnostik und Forschung

Die erfolgreiche intrauterine Beprobung von 38 Rinder-Uteri im Diöstrus zeigt, dass es sich bei dem konstruierten und etablierten Probenentnahme-Instrumentarium um ein praktikables und damit vielversprechendes Instrument für die bovine Endometritisdiagnostik handelt. Die auch in dieser Studie erkennbaren, diagnostischen Limitationen der zytologischen Diagnose nach Zytobrush und histologischen Diagnose nach Biopsie konnten mit einer Kombination der Methoden verringert und die Treffsicherheit erhöht werden. Uterussekret konnte mit der Merocel®-Schwämmchen-Technik zuverlässig, gewebeschonend und mit bestimmbarem Verdünnungsfaktor gewonnen werden

Mit der neuen Schwämmchen-Methode kann nun in Folgeprojekten der qualitative und quantitative Nachweis von Zytokinen, Chemokinen und sonstigen Inhaltsstoffen unter definierten Bedingungen durchgeführt werden. Zudem bietet sich die Chance verschiedene Endometritis-Subtypen und –Verlaufsformen (siehe V.1.1) in den Untersuchungen genauer zu differenzieren und damit die Pathogenese besser zu verstehen.

Das Uterussekret wurde bisher kaum zur Diagnostik und Erforschung entzündlicher Vorgänge am Uterus genutzt. Auf Grund der signifikanten Unterschiede in Nachweisbarkeit und Konzentration von Botenstoffen in dieser und anderen Studien (KIM et al., 2014; BRODZKI et al., 2015a) scheint das Uterussekret aber ein potentielles Probemedium für die Proteomanalytik zur Biomarkeridentifizierung für entzündliche uterine Prozesse darzustellen. So konnten beim Menschen mit Urin und Zerebrospinalflüssigkeit bereits Körpersekrete zum Nachweis von Biomarkern evaluiert werden (GOOD et al., 2007).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Uterussekret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der chronischen Endometritis beim Rind

Die subklinische Endometritis des Rindes ist eine wirtschaftlich bedeutende Erkrankung, die jedoch schwer zu diagnostizieren ist. In der vorliegenden Studie sollte evaluiert werden, ob das bovine Uterussekret ein potentielles Medium für Untersuchungen zur Pathogenese und für die Diagnostik der subklinischen Endometritis darstellt.

Im ersten Schritt wurde ein Probenentnahme-Instrumentarium konstruiert, das in Zukunft eine zuverlässige Beprobung des Uterus von diöstrischen Tieren ermöglichen soll. Alle Bestandteile des Instrumentariums (Arbeitskanal, Minizytobrush, Minibiopsiezange, Schwämmchen) erfüllen die Anforderungen an eine Passage des geschlossenen Gebärmutterhalses, wobei insbesondere der Durchmesser des Arbeitskanals entscheidend war. Der Arbeitskanal wurde bei jeder Gebärmutterbeprobung einmalig transzervikal positioniert und Schwämmchen, Minizytobrush und Minibiopsiezange durch den Kanal in den Uterus eingeführt. So wurde eine gewebeschonende mehrfache Beprobung und Untersuchung des Uterus ermöglicht. Die Endometritisdiagnose erfolgte auf Basis der Kombination zytologischer Untersuchungen mittels neuer Minizytobrush und histologischer Charakterisierung über Minibiopsie. Die verwendete Minizytobrush war in der Qualität der angefertigten zytologischen Ausstriche gleichwertig zu einer konventionellen Zytobrush. Mit der angefertigten Minibiopsiezange konnten Minibiopiate gewonnen werden, die eine histologische Diagnostik von Endometritiden bei kleinstmöglichen Gewebeproben ermöglichten. Als neues Probenmedium sollte Uterussekret mittels Aufsaugen durch ein spezielles Schwämmchen gewonnen werden. Die Anwendung des Probenentnahme-Instrumentariums wurde an 38 Schlachtuteri evaluiert. Alle untersuchten Uteri zeigten makroskopisch keine Anzeichen einer Entzündung. Die Einteilung der mit dem Probenentnahme-Instrumentarium gewonnenen Proben in Endometritis-positiv (E-pos) und Endometritis-negativ (E-neg) erfolgte mittels zytologischer und histologischer Analyse.

Erstmalig konnte unverdünntes Uterussekret aus 38 Schlachtuteri vom Rind mit

Schwämmen aus Merocel®-Material erfolgreich gewonnen werden. Von diesen Proben wurden 36 in in-vitro-Experimenten eingesetzt. Das gewinnbare Sekretvolumen war auch bei positiver Endometritisdiagnose mit minimal 46 µl (Median: 96,6µl) relativ gering.

Im in-vitro-Experiment 1 des Dissertationsprojektes wurden bovine Uterusepithelzellen (UEZ) mit Uterussekret aus E-pos-, E-neg-Uteri oder mit LPS (1µg/ml) kultiviert. Mit dem resultierenden Zellkulturüberstand erfolgte im in-vitro-Experiment 2 eine Exposition von aus dem Blut isolierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Zur vergleichenden Charakterisierung immunologischer Reaktionen von UEZ und PMN wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Expression der Kandidatengen CXCL5, CXCL8, IL6, IL1β, CCL2, CCL20, TNFα, NFκB, IκB und IL10 der Zielzellen gemessen.

In den UEZ wurde die mRNA des pro-inflammatorischen Chemokines 8 (CXCL8) und des Interleukin 6 (IL6) bei Exposition mit Uterussekret (E-pos und E-neg) gegenüber der Kontrolle signifikant stärker exprimiert. Die mRNA-Expression von IL6 nach Stimulation mit E-pos-Sekret war gegenüber der Kontrolle 40fach ($p=0,001$), nach Stimulation mit E-neg-Sekret 20fach ($p=0,16$) verstärkt. Der Unterschied zwischen E-pos und E-neg konnte jedoch nicht statistisch nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression konnte bei dem anti-inflammatorischen Interleukin 10 (IL10) im UEZ-Stimulationsversuch nachgewiesen werden: Nach Exposition mit E-pos wurde die mRNA von IL10 3,6fach stärker exprimiert als nach Exposition mit Uterussekret E-neg ($p<0,001$).

Im nachfolgenden PMN-Stimulationsversuch zeigte sich eine signifikant verstärkte mRNA-Expression von CXCL8 und CXCL5 gegenüber der Kontrolle nach Exposition mit Zellkulturüberstand von E-pos und E-neg (CXCL8: E-pos 6fach; $p<0,001$ / E-neg 8fach; $p<0,001$; CXCL5: E-pos 4fach; $p=0,001$ / E-neg 3fach; $p=0,003$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen E-pos und E-neg bestand nicht.

In Abhängigkeit vom Entzündungsstatus des Endometriums führte Uterussekret zu einer signifikanten Modulation der mRNA-Expression wichtiger pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine in UEZ und PMN. Die verstärkte Expression des wichtigen anti-inflammatorischen Zytokins IL10 nach

Exposition mit E-pos gegenüber E-neg ist ein Hinweis auf eine inadäquate immunologische Reaktivität von Kühen mit subklinischer Endometritis bei uteriner Infektion.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Gewinnung und Analyse von Uterussekreten ein vielversprechendes Hilfsmittel in der Pathogeneseforschung und möglicherweise auch der Diagnostik der subklinischen Endometritis ist. Es sind jedoch weitere in-vitro-Studien nötig, bei denen insbesondere das Spektrum der immunologisch wirksamen Bestandteile des Uterussekretes und dessen Zusammenspiel mit den lokalen Zellen untersucht werden sollten.

Die Arbeit wurde gefördert durch die Dres. Jutta & Georg Bruns-Stiftung.

VII. SUMMARY

Uterine secretions for the diagnosis and pathogenesis research of chronic endometritis in cattle

Subclinical endometritis in dairy cows is an economically significant disease which is still difficult to diagnose. The objective of the present study was to evaluate whether bovine uterine secretions represent a potential medium for elucidating the pathogenesis and facilitating the diagnosis of subclinical endometritis. In a first approach, a specimen sampling instrument was designed, which should enable a reliable sampling method of uterine secretions during the luteal phase. All components of the instrument (working channel, mini-cytobrush, mini-biopsy forceps and sponges) enabled a unhindered passage of the closed cervix. In particular the diameter of the working channel was crucial. The working channel was positioned only once during each sample collection, and sponge, mini-cytobrush and mini-biopsy forceps were consecutively inserted through the canal into the uterus. In that way a gentle multiple sampling and examination of the uterus was made possible. Endometritis was diagnosed on the basis of combining cytological examination using the new mini-cytobrush and histological examination of mini-biopsies. The quality of cytological smears by using the mini-cytobrush was identical to a conventional cytobrush. With the customized mini-biopsy forceps, mini-biopsies could be recovered which enabled a histological diagnosis of endometritis in smallest possible tissue samples. As a third new sample uterine secretions were collected by using a special sponge. The application of the sampling instrument was evaluated in isolated uteri of 38 animals at the abattoir. All investigated uteri did not show macroscopic signs of inflammation. Cytological and histological analysis of the samples enabled to discriminate endometritis positive (E-pos) and endometritis negative (E-neg) samples.

For the first time, undiluted uterine secretions were collected with sponges of Merocel® material from 38 uteri of slaughtered cows; in total, 36 of these samples were used in further experiments in-vitro. The volume of collected uterine secretions was relatively low (median 96.6 µl), also from uteri diagnosed with endometritis. In the first in-vitro-experiments within this project bovine

uterine epithelial cells (UEZ) were cultured in presence and absence of uterine secretions from the E-pos, E-neg-uteri or with LPS (1 μ g/ml). In the second in vitro experiments the collected supernatants of the UEZ from the first experiments were used to stimulate blood polymorphonuclear neutrophils (PMN). The immunological reactions of UEZ and PMN was characterized by analyzing mRNA-expression of the candidate genes CXCL5, CXCL8, IL6, IL1 β , CCL2, CCL20, TNF α , NF κ B, I κ B, and IL10 with RT-qPCR. In UEZ the mRNA of the pro-inflammatory chemokines 8 (CXCL8) and interleukin-6 (IL6) was significantly more abundant when the cells were exposed to uterine secretions (E-pos and E-neg) compared to controls. The mRNA expression of IL6 after stimulation with E-pos secretion was 40fold ($p = 0.001$), after stimulation with E-neg secretion 20fold ($p = 0.16$) higher compared to the control. The difference between both stimuli (E-pos and E-neg) was not statistically significant. A significant difference in the mRNA expression was detected for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL10) in the UEZ-stimulation test: after exposure with E-pos, the mRNA of IL10 was 3.6fold higher than after exposure to uterine secretions E-neg ($p < 0.001$). In the subsequent PMN stimulation experiments a significantly increased mRNA expression of CXCL8 (E-pos 6fold; $p < 0.001$ / E neg 8fold; $p < 0.001$) and CXCL5 (E-pos 4fold; $p = 0.001$ / E-neg 3fold; $p = 0.003$) was shown after exposure with UEZ supernatant compared to the control. There was no significant difference between the groups E-pos and E-neg.

Depending on the grade of inflammation within the endometrium, uterine secretion caused a significant modulation of the mRNA expression of important anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in UEZ and PMN. The increased expression of the anti-inflammatory cytokine IL10 in UEZ after exposure to E-pos compared to E-neg may relate to an inadequate immunological reactivity of cows with subclinical endometritis during uterine infection. The present study shows that the recovery and analysis of uterine secretions can be a promising tool in the research and diagnosis of subclinical endometritis. However, additional in-vitro-studies may help investigating the spectrum of immunologically effective components within uterine secretions and their interaction with local cells.

The work was supported by the Dres. Jutta & George Bruns-Foundation.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol* 2006; 113: 211-22.

Arya AK, Butt O, Nigam A. Double-blind randomised controlled trial comparing Merocel with Rapid Rhino nasal packs after routine nasal surgery. *Rhinology* 2003; 41: 241-3.

Azawi OI. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 187-208.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; 307: 97-101.

Baranski W, Podhalicz-Dziegielewska M, Zdunczyk S, Janowski T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology* 2012; 78: 1939-47.

Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 714-23.

Bartels JJ (2014) Charakterisierung des gesunden und entzündeten Uterus des Rindes. LMU München, ediss : 17184

Becker C, Riedmaier, I., Pfaffel, M. W. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOspektrum* 2009; 5/09: 512-5.

Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 2003; 171: 6052-8.

Böcker W (2008) Pathologie. Urban & Fischer Verlag

Bogado Pascottini O, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2016; 86: 1550-6.

Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci* 1999; 77 Suppl 2: 101-10.

Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res* 1991; 55: 168-73.

Borges AM, Healey GD, Sheldon IM. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67: 526-39.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-5.

Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun* 2015a; 39: 143-9.

Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J, Kurek L. Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology* 2015b; 84: 11-8.

Butt BM, Senger PL, Widders PR. Neutrophil migration into the bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed *Haemophilus somnus*. *J Reprod Fertil* 1991; 93: 341-5.

Büttner R, Thomas C (2003) *Allgemeine Pathologie: mit 15 Tabellen*. Schattauer

Castle PE, Rodriguez AC, Bowman FP, Herrero R, Schiffman M, Bratti MC, Morera LA, Schust D, Crowley-Nowick P, Hildesheim A. Comparison of ophthalmic sponges for measurements of immune markers from cervical secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 399-405.

Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* 2010; 73: 988-94.

Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 826-37.

Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, Howard OM, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 1997; 186: 739-47.

Comerford I, Bunting M, Fenix K, Haylock-Jacobs S, Litchfield W, Harata-Lee Y, Turvey M, Brazzatti J, Gregor C, Nguyen P, Kara E, McColl SR. An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease. *Bioessays* 2010; 32: 1067-76.

Cormican P, Meade KG, Cahalane S, Narciandi F, Chapwanya A, Lloyd AT, O'Farrelly C. Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine beta-defensins. *Immunogenetics* 2008; 60: 147-56.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180: 5771-7.

Dahme E, Hafner-Marx A (2007) Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 6 edn. Enke

Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon IM. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 53.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29: 313-26.

Dinareello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519-50.

Dohmen MJ, Joop K, Sturk A, Bols PE, Lohuis JA. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* 2000; 54: 1019-32.

Donofrio G, Herath S, Sartori C, Cavirani S, Flammini CF, Sheldon IM. Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction* 2007; 134: 183-97.

Duvel A, Maass J, Heppelmann M, Hussen J, Koy M, Piechotta M, Sandra O, Smith DG, Sheldon IM, Dieuzy-Labaye I, Zieger P, Schuberth HJ. Peripheral blood leukocytes of cows with subclinical endometritis show an altered cellular composition and gene expression. *Theriogenology* 2014; 81: 906-17.

Ericson JA, Duffau P, Yasuda K, Ortiz-Lopez A, Rothamel K, Rifkin IR, Monach PA. Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways. *PLoS One* 2014; 9: e108553.

Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5: 1317-27.

Fijalkowski K, Czernomysy-Furowicz D, Nawrotek P, Karakulska J. Influence of *S. aureus* exosecretions on cytokine profile in bovine leukocyte cultures in vitro. *Res Vet Sci* 2012; 93: 1179-84.

Fischer C, Drillich M, Odau S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 818-29.

Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol Reprod* 2011; 84: 266-78.

Galligan C, Yoshimura T. Phenotypic and functional changes of cytokine-activated neutrophils. *Chem Immunol Allergy* 2003; 83: 24-44.

Galvao KN, Santos NR, Galvao JS, Gilbert RO. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 2011; 76: 290-9.

Garverick HA, Smith MF. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993; 9: 223-47.

Ghasemi F, Gonzalez-Cano P, Griebel PJ, Palmer C. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology* 2012; 78: 1538-47.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64: 1879-88.

Glaucia Teixeira M, Austin KJ, Perry DJ, Dooley VD, Johnson GA, Francis BR, Hansen TR. Bovine granulocyte chemotactic protein-2 is secreted by the endometrium in response to interferon-tau (IFN-tau). *Endocrine* 1997; 6: 31-7.

Golightly E, Jabbour HN, Norman JE. Endocrine immune interactions in human parturition. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335: 52-9.

Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, Coon JJ, Dominiczak A, Mischak H. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 2007; 6: 4549-55.

Griffin JF, Hartigan PJ, Nunn WR. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1974; 1: 91-106.

Grunert E (1993) *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. Parey Verlag, Berlin

Grunert E (1996) *Buiatrik Band 1 Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. Verlag M. & H. Schaper Alfeld, Hannover

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113: 21-9.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007-17.

Hartmann D, Rohkohl J, Merbach S, Heilkenbrinker T, Klindworth HP, Schoon HA, Hoedemaker M. Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. *Theriogenology* 2016; 85: 247-53.

Healy LL, Cronin JG, Sheldon IM. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci Rep* 2014; 4: 7060.

Herath S, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J Reprod Immunol* 2006; 69: 13-22.

Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, White JO, Cronin J, Sheldon IM. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 55.

Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, Sawamukai Y. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 1403-8.

Islam R, Kumar H, Nandi S, Rai RB. Determination of anti-inflammatory cytokine in periparturient cows for prediction of postpartum reproductive diseases. *Theriogenology* 2013; 79: 974-9.

Janeway C (2002) *Immunologie*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg

Jost BH, Billington SJ. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005; 88: 87-102.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004; 62: 9-23.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 2005; 46: 255-9.

Kim I-H, Kang H-G, Jeong J-K, Hur T-Y, Jung Y-H. Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Theriogenology* 2014; 82: 427-32.

Konigsson K, Gustafsson H, Gunnarsson A, Kindahl H. Clinical and bacteriological aspects on the use of oxytetracycline and flunixin in primiparous cows with induced retained placenta and post-partal endometritis. *Reprod Domest Anim* 2001; 36: 247-56.

Krzymowski T, Stefanczyk-Krzymowska S. The oestrous cycle and early pregnancy--a new concept of local endocrine regulation. *Vet J* 2004; 168: 285-96.

Kühnel WL, W. (2015) Hans-Harald Sedlacek: Immunologie – Die Immunabwehr des Menschen. Schutz, Gefahren, Erkrankungen. , 2.Auflage edn. Elsevier GmbH, Berlin-Boston. 789

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 2009; 420: 1-16.

Lechner S (2008) Interaktionen von Inseminatbestandteilen mit Epithelzellen und Leukozyten im Uterus des Rindes. LMU München

Lee SC, Miller S, Hyland C, Kauppi M, Lebois M, Di Rago L, Metcalf D, Kinkel SA, Josefsson EC, Blewitt ME, Majewski IJ, Alexander WS. Polycomb repressive complex 2 component Suz12 is required for hematopoietic stem cell function and lymphopoiesis. *Blood* 2015; 126: 167-75.

Lenz M, Drillich M, Heuwieser W. [Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 237-44.

Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997; 80: 984-94.

Lincke A, Drillich M, Heuwieser W. [Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on fertility--a review of recent publications]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 245-50.

Lind M (2011) Etablierung und Anwendung einer Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer Vorgänge bei der Mastitis des Rindes. In: LMU München. LMU München, München

Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plontzke J, Drillich M, de la Sota RL. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 2013a; 96: 4333-9.

Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 2013b; 97: 195-201.

Marks MA, Eby Y, Howard R, Gravitt PE. Comparison of normalization methods for measuring immune markers in cervical secretion specimens. *J Immunol Methods* 2012; 382: 211-5.

Mateus L, da Costa LL, Bernardo F, Silva JR. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 31-5.

McGavin MD, Zachary JF (2011) *Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*. Elsevier Health Sciences Germany

Mee JF, Buckley F, Ryan D, Dillon P. Pre-breeding ovaro-uterine ultrasonography and its relationship with first service pregnancy rate in seasonal-calving dairy herds. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 331-7.

Merbach S (2011) Prognostische Bewertung endometrialer Veränderungen beim Rind In: *Veterinärmedizinische Fakultät. Universität Leipzig, Leipzig*

Mizgerd JP, Scott ML, Spieker MR, Doerschuk CM. Functions of IkappaB proteins in inflammatory responses to Escherichia coli LPS in mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 575-82.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-52.

Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. Involvement of Pro-Inflammatory Cytokines, Mediators of Inflammation, and Basic Fibroblast Growth Factor in Prostaglandin F₂ α -Induced Luteolysis in Bovine Corpus Luteum1. *Biol Reprod* 2004; 70: 473-80.

Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, Pearson RE. Leukocytes--second line of defense against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 1979; 62: 135-53.

Pascottini OB, Dini P, Hostens M, Ducatelle R, Opsomer G. A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows. *Theriogenology* 2015; 84: 1438-46.

Paula-Lopes FF, de Moraes AA, Hansen PJ. The presence of interleukin-1beta in the bovine reproductive tract. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 279-85.

Peek M, Landgren BM, Johannisson E. The endometrial capillaries during the normal menstrual cycle: a morphometric study. *Hum Reprod* 1992; 7: 906-11.

Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W. Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2009; 92: 5429-35.

Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 2010; 74: 127-34.

Radom-Aizik S, Zaldivar F, Jr., Leu SY, Galassetti P, Cooper DM. Effects of 30 min of aerobic exercise on gene expression in human neutrophils. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 104: 236-43.

Rodenbusch S (2011) Makroskopische und histopathologische Untersuchungen am Genitaltrakt sub- und infertiler weiblicher Rinder im klinischen Kontext unter besonderer Berücksichtigung der Endometriumbiopsie In: Veterinärmedizinische Fakultät. Universität Leipzig, Leipzig

Rohan LC, Edwards RP, Kelly LA, Colenello KA, Bowman FP, Crowley-Nowick PA. Optimization of the weck-Cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 45-8.

Ross JW, Malayer JR, Ritchey JW, Geisert RD. Characterization of the interleukin-1beta system during porcine trophoblastic elongation and early placental attachment. *Biol Reprod* 2003; 69: 1251-9.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.

Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 2014; 124: 710-9.

Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 6: 551-7.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005; 6: 1191-7.

Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 295-306.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 1516-30.

Sheldon IM, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008; 176: 115-21.

Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 2009a; 81: 1025-32.

Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2009b; 44 Suppl 3: 1-9.

Shimizu T, Krebs S, Bauersachs S, Blum H, Wolf E, Miyamoto A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiol Genomics* 2010; 42a: 290-300.

Sinowatz F, Hees, H. (2006) *Histologie- Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, München

Skjerven O. Endometrial biopsy studies in reproductively normal cattle; clinical, histochemical and histological observations during the estrous cycle. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1956; 22: 1-101.

Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 672-86.

Sperandio M, Pickard J, Unnikrishnan S, Acton ST, Ley K. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol* 2006; 416: 346-71.

Struyf S, Gouwy M, Dillen C, Proost P, Opdenakker G, Van Damme J. Chemokines synergize in the recruitment of circulating neutrophils into inflamed tissue. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1583-91.

Taraktoglou M, Szalabska U, Magee DA, Browne JA, Sweeney T, Gormley E, MacHugh DE. Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages exposed to bacterial antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 140: 130-9.

Theilgaard-Monch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol* 2004; 172: 7684-93.

Turner ML, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1 and TLR6. *Endocrinology* 2014; 155: 1453-65.

von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 2008; 111: 3070-80.

Wagener K, Gabler C, Drillich M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2017; 94: 21-30.

Walker CG, Meier S, Mitchell MD, Roche JR, Littlejohn M. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Molecular Biology* 2009; 10: 100.

Weiss SJ. Tissue Destruction by Neutrophils. *New England Journal of Medicine* 1989; 320: 365-76.

Williams BL, Gwazdauskas FC, Pearson RE. The effect of day of the estrous cycle, location of ovulatory structure, and progesterone on in vitro bovine endometrial secretions. *J Dairy Sci* 1992; 75: 2112-8.

Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 2005; 63: 102-17.

Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007; 68: 549-59.

Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol* 2005; 53: 65-76.

Xiao CW, Goff AK. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 101-9.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008; 45: 1385-97.

Yanoff M, Duker JS (2013) *Ophthalmology: Expert Consult: Online and Print*. Elsevier Saunders

Zerbe H, Schuberth HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* 2003; 60: 209-23.

Zhang X, Kluger Y, Nakayama Y, Poddar R, Whitney C, DeTora A, Weissman SM, Newburger PE. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 358-72.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Aufbau des Endometriums (schematisch).</i>	12
<i>Abbildung 2: Arbeitskanal mit innenliegendem Schutzstab.</i>	37
<i>Abbildung 3: Merocel®-Schwämmchen mit Führungsstab.</i>	38
<i>Abbildung 4: Größenvergleich der konventionellen Zytobrush mit der Minizytobrush.</i>	38
<i>Abbildung 5: Größenvergleich der Minibiopsiezange mit einer herkömmlichen Uterus-Biopsiezange.</i>	39
<i>Abbildung 6: Lokalisation der Minibioptate im Vorversuch 2.</i>	41
<i>Abbildung 7: Lokalisation der Querschnittproben im Vorversuch 2.</i>	41
<i>Abbildung 8: Lage des Merocel®-Schwämmchen im aufgeschnittenen Uterushorn.</i>	43
<i>Abbildung 9: UEZ-Stimulationsversuch (Schemazeichnung).</i>	49
<i>Abbildung 10: PMN-Stimulationsversuch (Schemazeichnung).</i>	49
<i>Abbildung 11: Exemplarische Darstellung eines Box Plots.</i>	57
<i>Abbildung 12: Exemplarische zytologische Ausstriche nach endometrialer Probenentnahme mit Zytobrush und Minizytobrush.</i>	62
<i>Abbildung 13: Histologische Befunde der Minibioptate im Hauptversuch.</i>	67
<i>Abbildung 14: Starke Tier-individuelle Differenzen im gewinnbaren Uterussekretvolumen bei Tieren der Gruppe E-pos im Vergleich zu Gruppe E-neg.</i>	75
<i>Abbildung 15: Variabilität der mRNA-Expressionsstärke im UEZ- Stimulationsversuch innerhalb der Versuchsgruppen.</i>	78
<i>Abbildung 16: Relative mRNA Expressionsstärke der inflammatorischen Kandidatengene stimulierter Uterusepithelzellen in-vitro.</i>	80
<i>Abbildung 17: Variabilität der mRNA-Expressionsstärke im PMN- Stimulationsversuch innerhalb der Versuchsgruppen.</i>	85
<i>Abbildung 18: Relative mRNA Expressionsstärke der inflammatorischen Kandidatengene stimulierter PMN in-vitro.</i>	87
<i>Abbildung 19: Fragebogen zur Erhebung der Anamnese für die Vorauswahl der Tiere am Schlachthof.</i>	129

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Beispiele für verwendete Schwellenwerte des PMN-Gehaltes im Rahmen der Endometritisdiagnostik.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 2: Reverse Transkription für die cDNA–Synthese. Primer- und Reaktionsmix.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 3: Mastermix-Zusammensetzung für qRT-PCR.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 4: Verwendete Primer in der qRT-PCR.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 5: Mittels Minizytobrush bestimmter prozentualer Anteil der PMN an der endometrialen Gesamtzellpopulation¹.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 6: Histologische Beurteilung von inflammatorischen Merkmalen des Endometriums in den Minibiopaten (Vorversuch 1).....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 7: Histologische Charakterisierbarkeit des Endometriums im Minibiopat im Vergleich zu Uterusquerschnitten (Vorversuch 2).....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 8: Histologische Nebenbefunde zu der Bewertung inflammatorischer Merkmale am Endometrium.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 9: Vorberichtliche, zytologische und histologische Charakteristika der Tiere der Gruppe „Endometritis-positiv“ (E-pos).....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 10: Vorberichtliche, zytologische und histologische Charakteristika der Tiere der Gruppe „Endometritis-negativ“ (E-neg).....</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 11: Von in-vitro-Versuchen ausgeschlossene Tiere (n=5).....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 12: Gewinnbares Uterussekretvolumen in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabelle 13: Histologischer Gesamtbefund der Minibiopate im Hauptversuch .</i>	<i>130</i>
<i>Tabelle 14: Expressionsstärke der Kandidatengene im UEZ-Stimulationsversuch relativ zur Kontrolle.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabelle 15: Expressionsstärke der Kandidatengene im PMN-Stimulationsversuch im Vergleich zur Kontrolle.....</i>	<i>134</i>

XI. ANHANG

<p><u>Befragungsbogen Landwirt Schlachthof</u></p> <p>Datum:</p> <p><u>Ohlmarke</u></p> <p>Grund der Schlachtung:</p> <p>Alter des Tieres:</p> <p>Anzahl der Trächtigkeiten:</p> <p>Letzte Trächtigkeit:</p> <p>Anzahl der Besamungen vor der letzten Trächtigkeit/Schlachtung:</p> <p>Tierärztliche Untersuchung:</p> <p>Vorrangegangene Behandlung (Spülung etc):</p> <p>Häufigkeit von Fruchtbarkeitsstörungen im Betrieb:</p> <p>Tel.:</p>

Abbildung 19: Fragebogen zur Erhebung der Anamnese für die Vorauswahl der Tiere am Schlachthof. Befragt wurden die Schlachtierbesitzer vor dem Abladen. Der Fragebogen diente der Vorselektion der Schlachtkühe für die anschließende Beprobung.

Tabelle 13: Histologischer Gesamtbefund der Minibiopate im Hauptversuch

histologischer Gesamtbefund der Minibiopate im Hauptversuch									
	Endometritisform ¹					Nebenbefunde ²			
<i>Bioplat</i> ³	<i>keine</i>	<i>eitrig</i>	<i>nicht-eitrig</i>	<i>lymphoplasmazelluläre</i>	<i>gemischtzellige</i>	<i>Angiosklerose</i>	<i>Hämorrhagie</i>	<i>Endometrose</i>	<i>nicht auswertbar</i>
C	x					hgr			
D	x					ggr.			
F	x								
G					x		ggr.		
I									
H	x								
J	x								
K	x						ggr.	ggr.	
L					x	ggr.			
M	x								
N	x								
O									x
P			x			ggr.			
Q			x			ggr.			

histologischer Gesamtbefund der Minibiopate im Hauptversuch									
	Endometritisform ¹					Nebenbefunde ²			
<i>Biopata</i> ³	<i>keine</i>	<i>eitrige</i>	<i>nicht-eitrige</i>	<i>lymphoplasmazelluläre</i>	<i>gemischtzellige</i>	<i>Angiosklerose</i>	<i>Hämosiderose</i>	<i>Endometrose</i>	<i>nicht auswertbar</i>
S	x					ggr.	ggr.		
V			x			ggr.			
W	x								
X									x
Y			x				ggr.		
Z	x					mgr.	mgr.		
A2	x					ggr.			
B2	x								
C2					x	ggr.			
E2	x								
G2	x					mgr.			
H2	x								
F2					x			ggr.	
I2	x								
J2	x					mgr.			

histologischer Gesamtbefund der Minibiopate im Hauptversuch									
	Endometritisform¹					Nebenbefunde²			
<i>Bioplat³</i>	<i>keine</i>	<i>eitrige</i>	<i>nicht-eitrige</i>	<i>lymphoplasma- zelluläre</i>	<i>gemischtzellige</i>	<i>Angiosklerose</i>	<i>Hämosiderose</i>	<i>Endometrose</i>	<i>nicht auswert- bar</i>
K2	x					mgr			
L2	x					ggr.			
M2	x								
N2					x				
O2	x					ggr.			
P2		x							
Q2	x					mgr.		ggr.	
n=36	23	1	4	0	5	16	5	3	3

Vollständiger histologischer Gesamtbefund an den Minibiopaten im Hauptversuch; Auswertung und Beurteilung durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig. Paraplastschnitte, Haemalaun-Eosin-Färbung. ¹Endometritisform: Kategorisierung durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig ;²Nebenbefund: zusätzlich zu den entzündlichen endometrialen Merkmalen erhobene Befunde; ³Bioplat: laborinterne Laufnummer; Abkürzungen: ggr.: geringgradig; mgr.: mittelgradig; hgr.: hochgradig

Tabelle 14: Expressionsstärke der Kandidatengene im UEZ-Stimulationsversuch relativ zur Kontrolle

Kandidatengenen	Gruppen					
	E-pos ¹		E-neg ²		LPS (1µg/ml)	
	ES ³	p-Wert	ES	p-wert	ES	p-Wert
CXCL5	4,0	p=0,058	2,4	p=0,08	5,5	p=0,029
CXCL8	9,4	p=0,004	3,7	p=0,05	8,3	p=0,029
IL6	40	p=0,001	19	p<0,001	3,6	p=0,114
NFκB	0,7	p=1	0,6	p=0,385	0,9	p=0,886
IκB	0,4	p=0,078	0,5	p=0,01	1,2	p=0,029
IL10	0,9	p=0,77	0,3	p=0,005	0,2	p=0,029

Uterusepithelzell-Stimulationsversuch: Relative mRNA-Expressionsstärke der Kandidatengene im Vergleich zur Kontrollgruppe (Medium) in den Expositionsgruppen; ¹E-pos: UEZ stimuliert mit Uterussektret aus Endometritis-positiven Tieren; ²E-neg: UEZ stimuliert mit Uterussektret aus Endometritis-negativen Tieren; ³EW: Expressionsstärke, mRNA-Expressionsstärke relativ zur Kontrolle

Tabelle 15: Expressionsstärke der Kandidatengene im PMN-Stimulationsversuch im Vergleich zur Kontrolle

	Gruppen					
	E-pos ¹		E-neg ²		LPS (1µg/ml)	
Kandidatengen	ES ³	p-Wert	ES	p-Wert	ES	p-Wert
CXCL5	3,114	p=0,006	2,65	p=0,003	0,804	p=0,651
CXCL8	6,342	p<0,001	8,501	p<0,001	0,89	p=0,89
IL6	1,043	p=0,906	1,43	p=0,332	1,018	p=0,965
IL10	1,17	p=0,756	1,578	p=0,138	1,99	p=0,126
CCL2	0,56	p=0,312	0,632	p=0,436	0,544	p=0,493
CCL20	1,67	p=0,18	2,1	p=0,093	1,67	p=0,025
NFkB	1,52	p=0,046	1,41	p=0,059	1,12	p=0,715
IKB	1,26	p=0,643	1,63	p=0,1	1,45	p=0,469
IL1b	2,83	p=0,044	3,28	p=0,004	2,58	p=0,137
TNFa	0,5	p=0,163	0,5	p=0,063	2,11	p=0,223

PMN-Stimulationsversuch: Relative mRNA-Expressionsstärke der Kandidatengene im Vergleich zur Kontrollgruppe (Medium) in den Expositionsgruppen. ¹E-pos: PMN stimuliert Zellkulturüberstand der Gruppe E-pos aus UEZ-Stimulationsversuch (siehe III.2.9.2); ²E-neg: PMN stimuliert mit Zellkulturüberstand der Gruppe E-neg aus UEZ-Stimulationsversuch; ³ES: Expressionsstärke mRNA-Expressionsstärke relativ zur Kontrolle

XII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. Holm Zerbe für die Unterstützung und Betreuung danken. Durch die Vermittlung wichtiger Kontakte, hilfreicher Denkanstöße und seinem stetigen Einsatz hat er die Umsetzung der Arbeit bestmöglich gefördert.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.- A. Schoon bedanken. Sein außerordentlicher Einsatz für das Projekt hat maßgeblich zu der Umsetzung der Dissertationsarbeit beigetragen. Sein Wissen, das er in vielen Telefonaten, Emails und insbesondere praktisch eingebracht hat, war für die Arbeit unentbehrlich.

Ein großer Dank gilt Dr. Frank Weber für die unermüdliche Unterstützung, Aufmunterung, fachliche Beratung, Motivation und Kritik. Auf seine positive Art und Hilfe in jeglicher Krise war stets Verlass. Er konnte Probleme in Herausforderungen verwandeln und war immer ein wichtiger Ansprechpartner mit offener Tür.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth für die Ideenentwicklung und fachliche Unterstützung im immunologischen Bereich.

Vielen Dank an Dr. med. vet. Horst-Dieter Reichenbach für die maßgebliche Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Ideen.

Ich bedanke mich bei der Drs. med. vet Jutta und Georg Bruns-Stiftung für die finanzielle Unterstützung die maßgeblich zur Durchführbarkeit der Arbeit beigetragen hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Kyri und der Firma Vion GmbH. Durch seine Hilfsbereitschaft und großes Interesse wurde die umfassende Probenentnahme am Schlachthof möglich. Insbesondere möchte ich auch den Mitarbeitern des Schlachtbetriebs für ihre unermüdliche Unterstützung, die Änderungen in der Schlachtreihenfolge, die vielen netten Gespräche in den Wartezeiten und ständiges Tiere-Treiben danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Anna Rieger für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein Dank aus ganzem Herzen gilt Sandra Kirsch für die erste Einarbeitung in die Laborarbeit, über die Hilfe bei der Betreuung der Zellkultur bis zur PCR-Analyse. Ohne ihre fachliche und persönliche Hilfe wäre das Projekt in diesem Rahmen nicht möglich gewesen. Danke Sandra!

Ebenso gilt mein Dank Frau Ingrid Hartmann und Frau Monika Altmann für die Hilfe im Labor.

Ein großer Dank an das gesamte Team der Klinik für Wiederkäuer, alle Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen. Die Unterstützung bei zeitlichen Engpässen, die lehrreichen Stunden als Doktorand in der Klinik und ein Arbeitsklima, das weit über reine Kollegialität hinausgeht, haben maßgeblich zu einer schönen und instruktiven Zeit beigetragen. Danke auch an Rita, die stets ein offenes Ohr hatte.

Ich danke meiner Familie für die ermunternden Worte, das Vertrauen und die Zeit, die sie mir gegeben hat. Meinem Vater für die treibende Kraft und das Durchhaltevermögen; meiner Mutter für die tröstenden Worte und die Aufmunterungen und meiner Schwester für die Kritik und das Verständnis. Ihr seid mein Fundament und meine Tragsäulen.

Insbesondere danke ich Anna-Lena Gerlach und Christopher Schlierf: Danke für die kompetente Betreuung von Panikattacken! Ihr habt mich stets motiviert und seid mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen.