

**Uterussekret zur Diagnose der subklinischen  
Endometritis beim Rind**

von Anika Luzia Helfrich

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

**Uterussekret zur Diagnose der subklinischen  
Endometritis beim Rind**

von Anika Luzia Helfrich  
aus Stuttgart-Filderstadt

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

Mitbetreuung durch:

Dr. Frank Weber

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Univ.-Prof. Dr. Erwin P. Märtlbauer

Priv.-Doz. Dr. Roswita Dorsch

Tag der Promotion: 27.07.2018

Meiner Familie

*Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.*

Albert Einstein

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Immunologie der weiblichen Reproduktion des Rindes.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Angeborene und erworbene Immunmechanismen im Uterus.....	3
1.2.	Physiologische Veränderungen.....	4
1.3.	Gebärmutterentzündungen beim Rind .....	6
<b>2.</b>	<b>Subklinische Endometritis beim Rind.....</b>	<b>8</b>
2.1.	Ätiologie und prädisponierende Faktoren.....	8
2.1.1.	Immunologische Aspekte.....	9
2.1.2.	Metabolische Besonderheiten der peripartalen Phase.....	11
2.1.3.	Keimspektrum .....	12
2.2.	Diagnose.....	13
2.2.1.	Zytologische Untersuchung des Endometriums.....	14
2.2.2.	Histopathologische Untersuchung des Endometriums.....	16
2.2.3.	Sonographische Untersuchung.....	17
2.2.4.	Neue diagnostische Ansätze.....	18
2.3.	Prävalenz .....	19
2.4.	Folgen.....	20
2.5.	Therapie und Prophylaxe .....	22
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>1.</b>	<b>Probengewinnung.....</b>	<b>24</b>
1.1.	Versuchsbetrieb und -tiere .....	24
1.2.	Konstruktion des Probenentnahmeggeräts .....	25
1.2.1.	Arbeitskanal und Mandrin.....	26
1.2.2.	Merocel-Schwämmchen zur Gewinnung von Uterussekret.....	26
1.2.3.	Modifiziertes Cytobrush zur Gewinnung zytologischer Proben.....	28
1.2.4.	Biopsiezange zur Gewinnung von Proben für die histopathologische und molekularbiologische Untersuchung.....	28
1.2.5.	Präparation der Materialien.....	29
1.2.5.1.	Einwegmaterial.....	29
1.2.5.2.	Mehrwegmaterial .....	29

---

1.3.	Vorgehen bei der klinischen Untersuchung und Probenentnahme .....	30
<b>2.</b>	<b>Laboruntersuchungen.....</b>	<b>32</b>
2.1.	Probenbearbeitung und -konservierung .....	32
2.2.	Untersuchung des Uterussekrets .....	33
2.2.1.	Extraktion des Uterussekrets.....	33
2.2.2.	Bestimmung des Verdünnungsfaktors .....	33
2.2.3.	Quantifizierung der Blutkontamination .....	34
2.2.4.	PMN-Chemotaxis-Assay.....	36
2.2.4.1.	PMN-Gewinnung .....	36
2.2.4.2.	Transmigrationstest .....	37
2.2.4.3.	Durchflusszytometrie und Fluoreszenzfärbung .....	38
2.2.5.	AlphaLISA-Untersuchung .....	41
2.3.	Zytologische Untersuchung.....	44
2.4.	Untersuchung der Endometrium-Bioptate .....	44
2.4.1.	Histopathologische Untersuchung.....	44
2.4.2.	Molekularbiologische Untersuchung .....	45
2.4.2.1.	RNA-Extraktion aus Endometrium-Bioptaten.....	46
2.4.2.2.	Bestimmung der RNA-Integrität und -Konzentration.....	46
2.4.2.3.	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription.....	48
2.4.2.4.	Konzentrationsbestimmung der cDNA .....	49
2.4.2.5.	Quantitative real-time PCR.....	49
2.5.	Bakteriologische Untersuchung .....	52
2.5.1.	Kultivierung .....	53
2.5.2.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	53
<b>3.</b>	<b>Auswertung der Daten .....</b>	<b>55</b>
3.1.	Gruppeneinteilung der Versuchstiere.....	55
3.1.1.	Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln.....	55
3.1.2.	Gruppeneinteilung nach Zyklusstand.....	56
3.2.	Statistische Analyse.....	56
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere und Probenentnahme .....</b>	<b>59</b>
1.1.	Beschreibung der Versuchstiere.....	59

---

1.2.	Anwendbarkeit des Probenentnahmegäräts <i>in vivo</i> .....	59
1.3.	Einfluss der Probenentnahme auf die Fruchtbarkeit .....	60
1.3.1.	Fruchtbarkeitskennzahlen beprobter und nicht beprobter Tiere .....	60
1.3.2.	Fruchtbarkeitskennzahlen der Versuchsherde zu Beginn und nach Ende des Versuchszeitraums .....	60
<b>2.</b>	<b>Charakterisierung und Gruppierung der Versuchstiere .....</b>	<b>61</b>
2.1.	Klinische Untersuchung .....	61
2.2.	Zytologische Untersuchung.....	62
2.3.	Histopathologische Untersuchung.....	62
2.4.	Bakteriologische Untersuchung .....	63
2.5.	Gruppeneinteilung.....	64
2.5.1.	Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln.....	64
2.5.2.	Gruppeneinteilung nach Zyklusstand.....	65
<b>3.</b>	<b>Untersuchung des Uterussekrets.....</b>	<b>66</b>
3.1.	Uterussekretnenge, Verdünnungsfaktor und Blutkontamination.....	67
3.2.	PMN-Chemotaxis.....	68
3.2.1.	PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit .....	68
3.2.2.	PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel.....	69
3.2.3.	PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit vom Zyklusstand .....	69
3.3.	Interleukine im Uterussekret .....	70
3.3.1.	Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit .....	71
3.3.2.	Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel .....	73
3.3.3.	Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Zyklusstand .....	73
<b>4.</b>	<b>Expression entzündungsrelevanter Gene im Endometrium .....</b>	<b>75</b>
4.1.	Qualitätskriterien der RT-qPCR.....	75
4.2.	Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit .....	77
4.3.	Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel .....	78

---

4.4.	Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Zyklusstand .....	78
<b>5.</b>	<b>Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln .....</b>	<b>81</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>1.</b>	<b>Einsatz des neuen Probenentnahmegärts in der Praxis.....</b>	<b>83</b>
1.1.	Praxistauglichkeit der Probengewinnung.....	83
1.2.	Konzeptionelle Überlegungen.....	84
1.3.	Geringe Übereinstimmung zytologischer und histologischer Befunde.....	85
<b>2.</b>	<b>Übergreifende Betrachtung von Uterussekret und endometrialer Genexpression.....</b>	<b>87</b>
2.1.	Hintergrund .....	87
2.2.	Uterussekret ist für die Diagnose zytologischer Endometritiden geeignet	89
2.2.1.	Chemotaktisches Potenzial von Uterussekret .....	89
2.2.2.	Zytokine .....	90
2.2.2.1.	Proinflammatorische Zytokine.....	90
2.2.2.2.	Antiinflammatorisches Zytokin IL10.....	93
2.2.3.	Enzym der Prostaglandin-Synthese PTGS2.....	94
2.2.4.	Antimikrobielles Peptid S100A9 .....	95
2.3.	Untergeordnete Bedeutung histologischer Endometritiden .....	96
2.4.	Pathologische Bedeutung endometrialer Lymphfollikel nicht nachweisbar .....	96
2.5.	Zyklusbedingte Modifikation von Uterussekret und endometrialer Genexpression .....	97
2.5.1.	Proinflammatorische Zytokine.....	98
2.5.2.	Antiinflammatorisches Zytokin IL10.....	100
2.5.3.	Enzym der Prostaglandin-Synthese PTGS2 und antimikrobielles Peptid S100A9.....	100
2.5.4.	Kombinierter Einfluss von Gebärmuttergesundheit und Zyklusstand .....	101
<b>3.</b>	<b>Beeinflussen subklinische Endometritiden die Fruchtbarkeit? .....</b>	<b>102</b>
<b>4.</b>	<b>Fazit: Eignung von Uterussekret zur Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind.....</b>	<b>103</b>

---

<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>109</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>112</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>132</b>
<b>1.</b>	<b>PMN-Grenzwerte und SE-Prävalenz in verschiedenen Studien.....</b>	<b>132</b>
<b>2.</b>	<b>Geräte, Material und Reagenzien.....</b>	<b>132</b>
2.1.	Geräte .....	132
2.1.1.	Geräte für verschiedene Untersuchungen .....	132
2.1.2.	Geräte für Probengewinnung und -asservierung.....	133
2.1.3.	Geräte für Untersuchung des Uterussekrets .....	133
2.1.4.	Geräte für zytologische Untersuchung.....	134
2.1.5.	Geräte für molekularbiologische Untersuchung .....	134
2.1.6.	Geräte für bakteriologische Untersuchung.....	134
2.2.	Material und Reagenzien.....	134
2.2.1.	Material für Probeentnahmegerat.....	134
2.2.2.	Material für klinische Untersuchung und Probenentnahme.....	135
2.2.3.	Material und Reagenzien für Probenuntersuchung .....	136
2.2.3.1.	Material und Reagenzien für PMN-Chemotaxis-Assay .....	136
2.2.3.2.	Material und Reagenzien für AlphaLISA-Untersuchung.....	136
2.2.3.3.	Material und Reagenzien für zytologische Untersuchung .....	136
2.2.3.4.	Material und Reagenzien für molekularbiologische Untersuchung.....	136
2.2.3.5.	Material für bakteriologische Untersuchung.....	137
<b>3.</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>137</b>
3.1.	Puffer und Lösungen für Untersuchung des Uterussekrets.....	137
3.1.1.	Extraktionspuffer für Uterussekret.....	137
3.1.2.	Puffer und Lösungen für PMN-Chemotaxis-Assay .....	138
3.1.3.	Puffer und Lösungen für AlphaLISA-Untersuchung.....	138
3.1.3.1.	Protokoll für IL1B-AlphaLISA .....	138
3.1.3.2.	Untersuchung anderer Analyten mittels AlphaLISA .....	139
3.2.	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Untersuchung .....	140
<b>4.</b>	<b>Primer-Spezifikationen.....</b>	<b>141</b>
<b>5.</b>	<b>Anamnese- und Untersuchungsprotokolle.....</b>	<b>142</b>

---

<b>6.</b>	<b>Ergebnistabellen und p-Werte der statistischen Auswertung.....</b>	<b>146</b>
6.1.	Einfluss der Probenentnahme auf die Fruchtbarkeit .....	146
6.2.	PMN-Chemotaxis von Uterussekret.....	147
6.3.	Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret.....	148
6.4.	Expression entzündungsrelevanter Gene in Endometrium-Bioptaten .....	151
6.5.	Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln.....	153
<b>7.</b>	<b>Übergreifende Darstellung der Auswertung der Interleukin- Konzentrationen im Uterussekret und der endometrialen Genexpression.....</b>	<b>154</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>156</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AD	Außendurchmesser
AlphaLISA	Amplified luminescent proximity homogeneous assay - linked immunosorbent assay
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
BCS	Body-Condition-Score
BHB	Betahydroxybutyrat
<i>Blut%</i>	Prozentuale Blutkontamination von Uterussekretproben
<i>c</i> (RNA)	RNA-Konzentration
<i>c</i> (US)	Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte nur um den Verdünnungsfaktor
<i>c</i> (US <sub>calc</sub> )	Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte um den Verdünnungsfaktor und die Blutkontamination
CB	Cytobrush
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	Koloniebildende Einheit
C <sub>t</sub>	Cycle threshold
<i>D</i>	Verdünnungsfaktor
DAMP	Damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.NEG	Gruppe der Tiere ohne Endometritis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FSC	Vorwärtsstreulicht
H0	Nullhypothese
HE	Hämalaun-Eosin
Hp	Haptoglobin
ID	Innendurchmesser
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
KB	Künstliche Besamung
KE	Klinische Endometritis, <i>auch Plural</i>
LAP	Lingual Antimicrobial Peptide
LDL	Lower Detection Limit
LE	Leukozyten-Esterase
LF-	Gruppe gebärmuttergesunder Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind
LF+	Gruppe gebärmuttergesunder Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LVL	Low-volume uterine lavage
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption time-of-flight
MIQE	Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
<i>n</i>	Tierzahl
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Nichtveresterte Fettsäure
NK	Negativkontrolle
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
NTC	No template control
<i>OD</i>	Optische Dichte

p.p.	Postpartum
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PG	Prostaglandin
PK	Positivkontrolle
PMN	Polymorphkerniger Leukozyt, Verwendung für ‚neutrophiler Granulozyt‘
PPE	Physiologische puerperale Entzündung
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2
PVD	Purulent Vaginal Discharge
RB	Repeat Breeder
rhIL8	Rekombinantes, humanes IL8
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
RQI	RNA Quality Index
-RT	Einsatz von Proben in der qPCR, die mit Mastermix ohne Zusatz von Reverser Transkriptase umgeschrieben wurden
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
s.c.	Subkutan
S100A9	Antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine
SE	Subklinische Endometritis, <i>auch Plural</i>
SE(cyto)	Gruppe der Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist (‚zytologische Endometritis‘)
SE(cyto+histo)	Gruppe der Tiere mit SE, die in der Zytologie und in der Histopathologie nachweisbar ist
SE(histo)	Gruppe der Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist (‚histologische Endometritis‘)
SSC	Seitwärtsstreulicht
<i>Str. pluranimalium</i>	<i>Streptococcus pluranimalium</i>

---

<i>Str. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>T. pyogenes</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
$T_r$	Relative Transmigrationsrate
US	Uterussektret, <i>auch Plural</i>

## I. EINLEITUNG

Weltweit war innerhalb der letzten etwa 50 Jahre eine deutliche Verschlechterung der reproduktiven Effizienz in Milchviehherden zu registrieren (LUCY, 2001; WASHBURN et al., 2002; WALSH et al., 2011). Bei steigendem Besamungsaufwand werden Konzeptionsraten<sup>1</sup> von nur etwa 40 % dokumentiert (BUTLER, 1998; ROYAL et al., 2000; LUCY, 2001; PRYCE et al., 2004; RETHMEIER et al., 2018). Subfertilität stellt seit Jahren mit etwa 20 % den häufigsten Abgangsgrund von Milchkühen noch vor Euterkrankheiten und Gliedmaßenproblemen dar (PARKINSON, 2009; ADR, 2016; LKV BAYERN, 2016). Für die Profitabilität landwirtschaftlicher Betriebe entstehen dadurch Einbußen infolge verlängerter Zwischenkalbezeiten, erhöhter Besamungskosten und zunehmender Remontierungsraten (PRYCE et al., 2004; ROCHE, 2006).

Die Ursachen der Fruchtbarkeitsprobleme sind multifaktoriell, wobei das komplexe Zusammenspiel von Genetik, Umwelt und Management noch nicht abschließend aufgeklärt ist (ROCHE, 2006; LEBLANC, 2010; WALSH et al., 2011). Zahlreiche Faktoren, darunter Energie- und Immunstatus der Tiere (PRYCE et al., 2004; ROCHE, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2008; ABDELLI et al., 2017), beeinflussen ovarielle und/oder uterine Funktionen und führen infolge von Befruchtungsstörungen oder embryonaler Mortalität zu reduzierter Fruchtbarkeit (BUTLER, 2000; ROYAL et al., 2000; LONG, 2009; PARKINSON, 2009; WALSH et al., 2011). Ein adäquat vorbereitetes uterines Mikro-Milieu ist für die Etablierung und Erhaltung einer Gravidität ausschlaggebend. Entzündliche Veränderungen wie Metritiden oder Endometritiden stören diese endometriale Kapazität zur Aufnahme und Entwicklung des Konzeptus (GILBERT, 2011; WALSH et al., 2011). Seit ca. 15 Jahren wird in diesem Zusammenhang der subklinischen Endometritis des Rindes eine große Bedeutung beigemessen (KASIMANICKAM et al., 2004). Als klinisch inapparente Entzündung der Gebärmutterschleimhaut führt sie einigen Autoren zufolge zu einer massiven Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit betroffener Tiere, wobei beispielsweise um 18 % bis 70 % reduzierte Erstbesamungserfolge festgestellt wurden

---

<sup>1</sup> Konzeptionsrate: Quotient aus der Anzahl tragender Kühe und der Anzahl aller Besamungen in einem bestimmten Zeitintervall; als ‚Erstbesamungserfolg‘ nach Erstbesamung (HOEDEMAKER et al., 2014).

(KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008). Eine allgemein akzeptierte und praktikable Methode zur Diagnose der subklinischen Endometritis existiert nicht (DE BOER et al., 2014). Zytologische und histopathologische Beurteilungen des Endometriums wurden evaluiert, zeigten aber wiederholt geringe Übereinstimmungen (MEIRA et al., 2012; MADDOZ et al., 2014). Daher fehlt bislang eine Methode zur raschen Identifikation von an subklinischer Endometritis erkrankten Tiere. Erst das zuverlässige Auffinden betroffener Tiere erlaubt die Evaluierung effektiver therapeutischer Maßnahmen.

Die Untersuchung von Uterussekret erwies sich an Schlachtorganen als vielversprechende Methode zur Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind (HILLMER, 2018). Die Überprüfung der nachfolgend aufgestellten Hypothesen bildete Grundlage und Motivation der hier vorliegenden Arbeit:

- Das neu entwickelte Probenentnahmegesetz zur Uterussekretgewinnung ist am Tier anwendbar.
- Geeignete diagnostische Marker für subklinische Endometritis lassen sich im Uterussekret identifizieren.
- Die Untersuchung von Uterussekret ermöglicht die Detektion zytologisch wie histologisch diagnostizierter subklinischer Endometritiden gleichermaßen.
- Uterussekret stellt ein aussichtsreiches Medium für die Forschung zur subklinischen Endometritis beim Rind dar.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Immunologie der weiblichen Reproduktion des Rindes**

#### **1.1. Angeborene und erworbene Immunmechanismen im Uterus**

An physiologischen Ereignissen wie Ovulation, Konzeption und Kalbung sind Prozesse und Signalgeber beteiligt, die auch bei entzündlichen Vorgängen eine Rolle spielen. Ihre sorgfältige Regulation ist entscheidend für die Gewebekompostase und Fruchtbarkeit. Störungen in der Begrenzung und Fortdauern von zunächst physiologischen entzündlichen Prozessen sind häufig Ursache pathologischer Veränderungen im weiblichen Genitale des Rindes (MEDZHITOV, 2008; JABBOUR et al., 2009; SHELDON et al., 2014).

Entzündungen entstehen als Reaktion von Zellen und Geweben auf die Konfrontation mit einer Noxe (Infektion/Gewebeschädigung) und führen zur Anreicherung zellulärer wie löslicher Blutbestandteile im Gewebe (MEDZHITOV, 2008; SHELDON et al., 2014). Das angeborene Immunsystem stellt dabei im weiblichen Reproduktionstrakt das wichtigste Instrument zur Elimination von Pathogenen und Wiederherstellung geschädigter Gewebe dar (SINGH et al., 2008). Zur unspezifischen Abwehr zählen physikalische Barrieren wie Schamabschluss, Zervixformierung und Schleimhautepithel sowie physikalisch-chemische Barrieren in Form von zervikalem und vaginalem Schleim (SINGH et al., 2008; SHELDON et al., 2014; DADARWAL et al., 2017). Neutrophile Granulozyten (im Folgenden als ‚PMN‘, polymorphkernige Leukozyten, bezeichnet) gelten neben Makrophagen als wichtigste Effektorzellen der endometrialen Immunabwehr und bilden die sog. ‚first line of defence‘ gegen eindringende Pathogene (KIM et al., 2005; SINGH et al., 2008; TURNER et al., 2012; DADARWAL et al., 2017). Der Begriff ‚Chemotaxis‘ beschreibt ihre Anlockung und Wanderung bedingt durch lokale Botenstoffe. ‚Pattern recognition receptors‘, darunter v. a. Toll-like-Rezeptoren (TLR), auf der Oberfläche immunologisch aktiver Wirtszellen erkennen ‚pathogen associated molecular patterns‘ (PAMP) wie Peptidoglykane oder Lipopolysaccharide (LPS) eingedrungener Erreger oder ‚damage associated molecular patterns‘ (DAMP) wie DNA oder Histone von zugrunde gehendem Gewebe. Dies führt zur Freisetzung entzündlicher Botenstoffe in Form von Zytokinen und Lipidmediatoren

(TAKEUCHI und AKIRA, 2010). Zu den Zytokinen zählen verschiedene Proteinfamilien wie Interleukine (IL), Chemokine und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), während Prostaglandine zur Gruppe der Lipidmediatoren gehören (SHELDON et al., 2014). Sie steuern die Immunreaktion über die Rekrutierung von PMN und Monozyten, die sich im Uterus ansammeln und Mikroorganismen und geschädigtes Gewebe abbauen (FRANK et al., 1983; ZERBE et al., 2003). Später dirigieren antiinflammatorische Botenstoffe wie IL10 und Resolvine die Eindämmung der Entzündung und die Wiederherstellung zerstörten Gewebes (SHELDON et al., 2014).

Zahlreiche Studien zeigten, dass nicht nur ‚klassische‘ Immunzellen, sondern auch endometriale Epithel- und Stromazellen selbst immunologisch aktiv sind: Nach der Erkennung eingedrungener Pathogene über TLR (DAVIES et al., 2008; HERATH et al., 2009) produzieren und sezernieren sie immunaktive Substanzen, darunter die Zytokine IL1B und IL6, das Chemokin IL8, TNF $\alpha$ , Prostaglandine (PGE<sub>2</sub>) und antimikrobielle Peptide wie  $\beta$ -Defensine und Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) (DAVIES et al., 2008; CHAPWANYA et al., 2009; HERATH et al., 2009; FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; SHELDON et al., 2014; TURNER et al., 2014; GÄRTNER et al., 2015).

Die Rolle der adaptiven Immunantwort im weiblichen Genitale des Rindes ist weniger erforscht, jedoch deuten einige Studien darauf hin, dass spezifische humorale wie zelluläre Mechanismen an der endometrialen Abwehr beteiligt sind (SINGH et al., 2008). Nach Infektion mit *Tritrichomonas foetus* konnte histologisch eine Infiltration des Endometriums mit mononukleären Zellen detektiert werden (ANDERSON et al., 1996). Die Immunglobuline IgA und IgG wurden im bovinen Uterus sowohl nach Infektion mit spezifischen (DUNCAN et al., 1972; ANDERSON et al., 1996; DHALIWAL et al., 1996) als auch mit unspezifischen (WATSON et al., 1990) Keimen nachgewiesen.

## 1.2. Physiologische Veränderungen

Zyklusbedingte Veränderungen: Die Empfänglichkeit der bovinen Gebärmutter für Infektionen ändert sich unter hormoneller Steuerung durch Steroidhormone und Prostaglandine im Verlauf des Reproduktionszyklus und gilt in der Lutealphase als maximal (ROWSON et al., 1953; LEWIS, 2004). Ursächlich hierfür sind Umbauprozesse, die die Funktionalität und Abwehrbereitschaft des Gewebes beeinflussen

(BOOS, 1981; OHTANI et al., 1993). Infolge der Unterdrückung lokaler Abwehrmechanismen unter Progesteroneinfluss kommt es zu einer Verringerung der Anzahl und funktionellen Aktivität von PMN (HOEDEMAKER et al., 1992; VAGNONI et al., 2001; LEWIS, 2004; SCHLAFER und MILLER, 2007). Bei Applikation relevanter Uteruspathogene (*E. coli* oder *T. pyogenes*) in der Lutealphase konnte eine Gebärmutterentzündung mit Ansammlung purulenten Materials induziert werden. Bei entsprechender Applikation in der Follikelphase wurde bereits nach zwei Tagen ein steriler Uterus vorgefunden (ROWSON et al., 1953). Die erhöhte Abwehrbereitschaft der Gebärmutter während der Follikelphase wurde histologisch durch eine erhöhte Präsenz von PMN im Endometrium (MCENTEE, 1985), immunhistochemisch (COBB und WATSON, 1995) und elektronenmikroskopisch (HYTTEL, 1985) belegt. Molekularbiologisch wurde in der Follikelphase eine verstärkte Expression von IL1B, IL8 und antimikrobiellen Peptiden in endometrialen Epithelzellen nachgewiesen (FISCHER et al., 2010; IBRAHIM et al., 2016).

Puerperale Veränderungen: Peripartal ist regelmäßig ein Keimeintrag durch den geweiteten Geburtsweg zu verzeichnen, der bei über 90 % der Kühe innerhalb der ersten drei bis vier Wochen postpartum (p.p.) nachweisbar ist (ELLIOTT et al., 1968; GRIFFIN et al., 1974; BONNETT et al., 1991b; CHAPWANYA et al., 2012; PRUNNER et al., 2014a). SHELDON et al. (2002) charakterisierten als potenzielle Kontaminationskeime über 30 verschiedene Bakterienspezies. Mit größter Häufigkeit kamen *E. coli*, Streptokokken-Spezies, *T. pyogenes* und Anaerobier wie *Prevotella*-Spezies und *F. necrophorum* vor; daneben treten *Proteus* (HUSSAIN et al., 1990) und Staphylokokken-Spezies (BRODZKI et al., 2014) auf. Die bakterielle Besiedelung des Uterus zeigt einen sukzessiven Rückgang bis zur vollständigen Elimination zwischen vier und acht Wochen p.p. in Folge der Aktivierung natürlicher uteriner Abwehrmechanismen (ELLIOTT et al., 1968; GRIFFIN et al., 1974; HUSSAIN et al., 1990; SHELDON et al., 2002). Dabei ist die Unterscheidung zwischen uteriner Kontamination und Infektion entscheidend. Während Erstere nicht mit einer Erkrankung assoziiert ist, führt Letztere infolge von Pathogenadhärenz, -invasion und -vermehrung sowie Freisetzung bakterieller Toxine zur Entstehung einer Erkrankung (SHELDON et al., 2006).

Bei einem unproblematischen Verlauf des Puerperiums bildet sich die Gebärmutter innerhalb von etwa drei Wochen um mehr als 80 % ihrer peripartalen Größe zurück

(,klinisches Puerperium‘). Anschließend sistiert der Lochialfluss und der Uterus ist klinisch nicht mehr von einem nichttragenden Organ zu unterscheiden (OKANO und TOMIZUKA, 1987; LEFEBVRE und STOCK, 2012; MEIRA et al., 2012). Nach insgesamt ca. sechs Wochen ist die Rückbildung auch morphologisch und funktionell abgeschlossen (,Gesamtpuerperium‘) (MARION und GIER, 1959; ZAREMBA, 1990).

Zur raschen Beseitigung eingedrungener Bakterien und zügigen Rückbildung des Uterus tragen endokrine und immunologische Mechanismen bei (LESLIE, 1983). Die Infiltration des Endometriums mit PMN in den ersten etwa vier Wochen p.p. ist als physiologischer Prozess bedeutend (GILBERT et al., 2005; GABLER et al., 2010; CHAPWANYA et al., 2012; PRUNNER et al., 2014b). Auch eine Hochregulation der Genexpression proinflammatorischer Mediatoren wie IL1A, IL1B, IL6, IL8 und TNF $\alpha$ , der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2) sowie von TLR4 in endometrialen Epithel- und Stromazellen innerhalb der ersten Wochen p.p. ist Teil des physiologischen Puerperiums (CHAPWANYA et al., 2009; HERATH et al., 2009; GABLER et al., 2010; CHAPWANYA et al., 2012). Im Bereich der Karunkeln sind immunologische Prozesse an der Ablösung der fetalen Membranen beteiligt (STREYL et al., 2012).

Eine kontrollierte und zeitlich limitierte endometriale Entzündungsreaktion im Puerperium, von CHAPWANYA et al. (2012) als ‚postpartum endometrial inflammatory response‘ bezeichnet, ist notwendig für die Ablösung der Nachgeburt, die bakterielle Säuberung und Involution der Gebärmutter sowie die Wiederherstellung der Epithelintegrität zur raschen Regeneration endometrialer Funktionen (HERATH et al., 2009; GABLER et al., 2010; CHAPWANYA et al., 2012; LEBLANC, 2014; SHELDON et al., 2014). Im Folgenden wird dafür der Begriff ‚physiologische puerperale Entzündung‘ (PPE) verwendet. Die Regulation dieser Entzündungsreaktion ist nicht abschließend geklärt (CHAPWANYA et al., 2012).

### **1.3. Gebärmutterentzündungen beim Rind**

Beim Rind sind hauptsächlich peripartal auftretende Gebärmutterentzündungen bedeutsam, die infolge aufsteigender Infektionen mit ubiquitären Keimen entstehen (DEKRUIF, 1999; LEWIS, 2004; SCHLAFER und MILLER, 2007). Zu ihrer Einteilung werden unterschiedliche Kriterien herangezogen.

Hinsichtlich pathologisch-anatomischer Merkmale werden Gebärmutterentzündungen nach ihrer Lokalisation unterschieden. Eine auf das Endometrium begrenzte Entzündung wird als Endometritis bezeichnet. Bei Beteiligung tieferer Schichten der Gebärmutterwand spricht man von Metritis. Sind zusätzlich Serosa oder Gebärmutterbänder betroffen, wird die Entzündung Peri- bzw. Parametritis genannt (SCHULZ, 1991; BONDURANT, 1999; SCHLAFER und MILLER, 2007).

Histopathologisch wird nach Verlaufsform und vorherrschenden Entzündungszellen differenziert: Die akute, eitrige Endometritis ist gekennzeichnet durch die Infiltration des Endometriums mit PMN (MCENTEE, 1985; SCHULZ, 1991). Bei der chronischen, nichteitrigem Endometritis dominieren ein lymphoplasmazelluläres Bild sowie chronisch-degenerative Veränderungen wie Fibrose und Atrophie (MCENTEE, 1985; SCHLAFER und MILLER, 2007). Die Übergangsform zwischen beiden Entzündungstypen bildet die chronisch-eitrige oder gemischtzellige Endometritis (MERBACH, 2011).

Im klinischen Kontext wurde lange Zeit der Begriff ‚Metritis-Komplex‘ übergreifend für leichte Entzündungen der Gebärmutter Schleimhaut bis hin zu schwerwiegenden Entzündungen der gesamten Gebärmutterwand verwendet (LEWIS, 1997; PARKINSON, 2009). LEBLANC et al. (2002) lieferten die Grundlage für das aktuelle Verständnis klinischer Endometritis (KE): Sie wird definiert als das Auftreten eitrigem Scheidenausflusses oder eines zervikalen Durchmessers größer als 7,5 cm nach 20 Tagen p.p. sowie mukopurulentem Ausflusses nach 26 Tagen p.p. Die Detektion des Vaginalausflusses geschieht durch äußere Adspektion und vaginoskopisch. Im Jahr 1998 fand erstmals die Endometrium-Zytologie als Kriterium zur Beurteilung von Endometritiden beim Rind Erwähnung (GILBERT et al., 1998), die KASIMANICKAM et al. (2004) für die Definition subklinischer Endometritis (SE) verwendeten: SE wird definiert als erhöhter PMN-Gehalt im endometrialen Zellbild (>18 % 20 bis 33 Tage p.p. bzw. >10 % 34 bis 47 Tage p.p.) oder sonographisch darstellbare Flüssigkeitsansammlung im Uterus zwischen 20 und 47 Tagen p.p. in Abwesenheit klinischer Anzeichen einer Gebärmutterentzündung bei äußerer Adspektion sowie rektaler und vaginaler Untersuchung.

SHELDON et al. (2006) veröffentlichten eindeutige klinische Definitionen der Gebärmutterentzündungen des Rindes: Entzündungen bis 21 Tage p.p. werden als

Metritis bezeichnet. Puerperale Metritiden sind gekennzeichnet durch übelriechenden, wässrigen, rotbraunen Scheidenausfluss bei systemischen Krankheitsanzeichen wie Fieber oder Rückgang der Milchleistung. Sie treten oft innerhalb von zehn Tagen p.p. in Zusammenhang mit Nachgeburtsverhaltung, Dystokie, Tot- oder Zwillingsgeburten auf. Charakteristisch für klinische Metritiden ist eitriger Scheidenausfluss ohne systemische Krankheitsanzeichen. Nach 21 Tagen p.p. vorkommende Entzündungen werden als Endometritiden klassifiziert. Sie werden unterteilt in KE und SE, welche bereits oben definiert wurden (LEBLANC et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2004). Daneben wird die Pyometra als Ansammlung von purulentem oder mukopurulentem Material im Uterus bei aktivem Gelbkörper und geschlossener Zervix beschrieben.

Wiederholt konnte nur eine geringe Übereinstimmung zwischen vaginalen und zytologischen Befunden beobachtet werden (DUBUC et al., 2010a; WESTERMANN et al., 2010; MCDUGALL et al., 2011). Daher schlugen DUBUC et al. (2010a) die Terminologie ‚purulent vaginal discharge‘ (PVD) anstelle von KE vor, die neben Endometritis auch Zervizitis und Vaginitis als mögliche Ursachen eitrigen Scheidenausflusses berücksichtigt.

## **2. Subklinische Endometritis beim Rind**

Die SE kann zusammenfassend als oberflächliche Entzündung des Endometriums bezeichnet werden, die ohne klinische Symptomatik abläuft (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; SHELDON et al., 2006). Die Kategorisierung von KE und SE als eigenständige Manifestationen uteriner Erkrankungen ist aufgrund verschiedener Risikofaktoren, additiver Effekte auf die Fruchtbarkeit und unterschiedlicher Einflüsse auf die endometriale Genexpression notwendig (DUBUC et al., 2010b; LEBLANC et al., 2011; BARAŃSKI et al., 2013b; SALILEW-WONDIM et al., 2016). In aktuellen Publikationen wird die SE vermehrt als ‚zytologische Endometritis‘ angesprochen, womit der Technik ihrer Diagnose Rechnung getragen wird (DUBUC et al., 2010a; DENIS-ROBICHAUD und DUBUC, 2015b; PASCOTTINI et al., 2017b).

### **2.1. Ätiologie und prädisponierende Faktoren**

Die Bedeutung der PPE zur Elimination von Bakterien, Involution des Uterus und Wiederherstellung endometrialer Funktionen wurde in II.1.2. erörtert. Welche Faktoren entscheiden, ob eine Kuh in dieser Phase eine Erkrankung entwickelt oder ein

ungestörtes Puerperium durchläuft, ist nicht abschließend geklärt. Situationen, die zu verstärktem uterinen Trauma und bakterieller Kontamination führen, wie Dys-toxie, Zwillinge und Metritis, sind vornehmlich mit dem Auftreten von KE verknüpft (DUBUC et al., 2010b). In der Pathogenese der SE werden v. a. immunologische und metabolische Faktoren seitens der Kuh sowie Art, Menge und stamm-spezifische Eigenschaften der meist bakteriellen Pathogene diskutiert (GILBERT et al., 2005; SINGH et al., 2008; LEBLANC et al., 2011; SHELDON et al., 2014). Der Einfluss betriebsspezifischer Faktoren auf die Häufigkeit von SE wird bei einem Vergleich der SE-Prävalenzen verschiedener Betriebe innerhalb einzelner Studien deutlich (GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008; DUBUC et al., 2010a; CHEONG et al., 2011; PRUNNER et al., 2014a). Zur Identifikation der zugrunde liegenden Faktoren fanden bisher nur wenige Untersuchungen statt.

### **2.1.1. Immunologische Aspekte**

Eine Dysregulation der PPE bereits im frühen Puerperium wird zunehmend als Ursache für die SE gewertet (LEBLANC, 2014). Das physiologische Puerperium ist gekennzeichnet durch den Übergang von einer immunsupprimierten Situation während der Trächtigkeit zu verstärkter immunologischer Aktivität peripartal, welche der Nachgeburtsablösung, bakteriellen Säuberung und Uterusinvolution dient. Anschließend folgt die Regulation des Immunsystems auf basale Ansprechbarkeit (LEBLANC, 2014). In der Literatur finden sich diesbezüglich verschiedene Hypothesen zur Entstehung der SE, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

HERATH et al. (2009) betrachten eine übersteigerte Immunreaktion infolge insuffizienter Regulationsmechanismen als Ursache chronisch-entzündlicher Veränderungen. Im Vergleich mit gebärmuttergesunden Kühen wiesen die Autoren eine ausgeprägtere proinflammatorische Reaktion im Endometrium bereits in der ersten Woche p.p. bei Kühen nach, die später eine SE entwickelten. Dies äußerte sich in Form verstärkter endometrialer Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL1A und IL1B sowie des Pathogenerkennungsrezeptors TLR4. Zudem war ein höherer Quotient der Genexpression von proinflammatorischem IL1 zu antiinflammatorischem IL10 zu beobachten.

Andere Autoren beschreiben hingegen geschwächte lokale Abwehrmechanismen im frühen Puerperium als Ursache für eine unvollständige bakterielle Elimination. Infolge der permanenten Reizung des Endometriums und Stimulation der lokalen

Immunantwort entstehen chronische Entzündungen (GILBERT et al., 2007; BRODZKI et al., 2015c). An Tag fünf p.p. wurden bei Kühen, die später eine SE entwickelten, in Gebärmutterspülproben höhere IL10-Konzentrationen nachgewiesen als bei gesunden Kontrolltieren (BRODZKI et al., 2015c). Sieben Tage p.p. dokumentierten FOLEY et al. (2015) eine reduzierte Anzahl zirkulierender PMN bei Kühen mit späterer SE. Untersuchungen von GALVÃO et al. (2011) unterstützen diese Hypothese teilweise: Sie zeigten eine reduzierte mRNA-Expression von TNF $\alpha$  zum Zeitpunkt der Kalbung und eine Woche p.p. in Endometrium-Bioptaten von Kühen, bei denen später eine KE oder SE diagnostiziert wurde. Der Nachweis einer vermehrten IL6-Genexpression bei Tieren mit späterer Endometritis zum Zeitpunkt der Kalbung unterstützt hingegen eher die These, dass eine überschießende Immunreaktion Ausgangspunkt chronischer Endometritiden ist. Andere Studien konnten vor 38 Tagen p.p. keine Unterschiede in der endometrialen Genexpression zwischen gesunden und SE-Kühen feststellen (PETER et al., 2015). Auch GILBERT et al. (2007) betrachten das Versäumnis der rechtzeitigen Elimination eingedrungener Bakterien als Ursache der SE. In ihren Untersuchungen wiesen sie eine positive Korrelation zwischen dem PMN-Gehalt im Endometrium und der Besiedelung mit Bakterien, darunter *T. pyogenes* und *Prevotella*-Spezies, an Tag 49 p.p. nach. Der PMN-Gehalt am Tag der Kalbung war hingegen negativ korreliert mit bakterieller Infektion sowie dem PMN-Gehalt an Tag 49 p.p. Daraus schlussfolgern die Autoren, dass ein rascher PMN-Einstrom in den Uterus p.p. die bakterielle Kolonisation und damit das Risiko für SE reduziert.

Allerdings gibt es einige Studien, die keinen Zusammenhang zwischen SE und bakterieller Besiedelung des Uterus dokumentierten. Bei Milchkühen mit SE aus Weidehaltung konnten weder anaerobe noch aerobe Bakterien aus der Gebärmutter isoliert werden (MADOZ et al., 2014). Als mögliche Erklärung wird angeführt, dass die ursächlichen Keime bereits beseitigt wurden, die entzündliche Antwort aber fort dauert. Das Auftreten von SE an Tag 21 p.p. war bei Untersuchungen von PRUNNER et al. (2014b) nicht assoziiert mit dem Nachweis spezifischer Pathogene (*E. coli* oder *T. pyogenes*). Auch MCDUGALL et al. (2011), BARAŃSKI et al. (2012) und PETER et al. (2015) wiesen nur eine geringe Korrelation zwischen PMN-Gehalt und bakteriologischen Befunden am Endometrium nach. Sie schlussfolgern, dass die SE eher mit der postpartalen Wiederherstellung des Endometriums als mit bakteriellen Infektionen zusammenhängt.

Andere Autoren zeigten, dass neben einer Dysregulation auch eine Dysfunktion immunologischer Prozesse an der Entstehung der SE beteiligt ist. Im peripheren Blut und in Gebärmuttersspülproben war bei Kühen mit SE zu unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten (5, 22, 40, 65 Tage p.p.) ein geringerer Anteil phagozytisch aktiver PMN und Monozyten bzw. Makrophagen zu finden als bei gebärmuttergesunden Tieren (BRODZKI et al., 2015b). Bereits zum Zeitpunkt der Kalbung wurde bei zirkulierenden PMN von Kühen, die später an KE oder SE erkrankten, eine reduzierte Funktionsfähigkeit (Myeloperoxidaseaktivität und Cytochrom C-Reduktionsaktivität) deutlich (HAMMON et al., 2006). Genexpressionsanalysen demonstrierten, dass bei gebärmuttergesunden Tieren zwischen Tag 7 und 21 p.p. über 4.000 Gene in endometrialen Biopaten differentiell exprimiert werden. Ein Übergang von einem entzündlichen Milieu hin zu Gewebe-Proliferation und -Reparatur ließ sich erkennen. Bei Tieren mit SE wurden dagegen nur 31 Gene differentiell exprimiert, was für deren Unfähigkeit, die uterine Gewebemöostase wiederherzustellen, spricht (FOLEY et al., 2015).

Verlaufsuntersuchungen zwischen Tag 24 und 51 p.p. legen nahe, dass sich aus KE häufig SE entwickeln (PETER et al., 2015). Ebenso gab es aber wie auch bei BARAŃSKI et al. (2012) und PLÖNTZKE et al. (2010) Fälle, in denen erst nach Tag 38 p.p. bei zuvor gebärmuttergesunden Kühen eine SE diagnostiziert wurde. Auch bei nulliparen Färsen wurde zum Zeitpunkt der künstlichen Besamung (KB) SE nachgewiesen (PASCOTTINI et al., 2016c).

Zusammenfassend ist neben der Persistenz der bakteriellen Besiedelung auch die Rolle der dysregulierten Immunantwort in der Pathogenese der SE zu berücksichtigen (HERATH et al., 2009; WAGENER et al., 2017a).

### **2.1.2. Metabolische Besonderheiten der peripartalen Phase**

Metabolische Imbalancen im peripartalen Zeitraum beeinträchtigen allgemeine Immunfunktionen und damit die Abwehrbereitschaft des Uterus gegenüber eindringenden Pathogenen. Bedeutend sind hierbei vor allem eine ausgeprägte negative Energiebilanz (NEB), eine Hypokalzämie sowie eingeschränkte Leberfunktionen (WAGENER et al., 2017a). Kühe mit experimentell erzeugter stark negativer Energiebilanz zeigten zwei Wochen p.p. im peripheren Blut eine reduzierte Zahl an PMN sowie zahlreiche differentiell exprimierte Gene aus der Funktionsgruppe Immunologie und Entzündung im Vergleich zu Kühen mit weniger stark ausgeprägter

NEB (WATHES et al., 2009; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2013). Die Autoren schlussfolgern, dass eine stark ausgeprägte NEB die Kühe daran hindert, effektiv und in vollem Umfang mit einer angemessenen Immunreaktion auf die mikrobielle Kontamination des Uterus bei der Kalbung zu reagieren. *In vitro* wurde nach Inkubation mit sehr hohen Konzentrationen nichtveresterter Fettsäuren (NEFA) eine herabgesetzte Lebensfähigkeit von PMN festgestellt (SCALIA et al., 2006). Bei Kühen mit peripartalem Fettlebersyndrom wurde eine reduzierte funktionelle Kapazität der PMN in Blut und Endometrium deutlich (ZERBE et al., 2000).

Kühe, die später eine SE entwickeln, erfahren häufig bereits eine Woche ante partum bis früh postpartal eine ausgeprägtere NEB. Dies äußerte sich in höheren Konzentrationen an Betahydroxybutyrat (BHB) und NEFA, reduzierter Futteraufnahme und niedrigerem Body-Condition-Score (BCS) verglichen mit gebärmuttergesunden Kühen (HAMMON et al., 2006; DUBUC et al., 2010b; GALVÃO et al., 2010; HEIDARPOUR et al., 2012; SENOSY et al., 2012; PRIEST et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013; YASUI et al., 2014). Außerdem wurde zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (Tag 7, 28, 42 p.p.) ein reduzierter intrazellulärer Glykogengehalt in PMN bei SE-Kühen festgestellt (GALVÃO et al., 2010). Die reduzierte intrazelluläre Verfügbarkeit oxidativer Energieträger beeinträchtigt möglicherweise die Abwehrbereitschaft des Organismus. Zusätzlich wurden bei Kühen mit späterer SE bereits in den ersten beiden Wochen p.p. reduzierte Kalziumkonzentrationen im Blut gefunden (MARTINEZ et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013). PRIEST et al. (2013) zeigten erhöhte Leberwerte bei Kühen mit SE, die zytologisch allerdings bereits an Tag 14 p.p. diagnostiziert wurde. Im Gegensatz zu diesen Erläuterungen stehen Untersuchungen, in denen kein Zusammenhang zwischen ketogener Stoffwechsellage und dem Auftreten von SE nachgewiesen wird (SHIN et al., 2015).

### 2.1.3. Keimspektrum

Bakterien sind möglicherweise an der Etablierung puerperaler Immundysfunktionszustände beteiligt oder stellen durch die Begünstigung von KE indirekte Risikofaktoren für SE dar. Dafür sprechen Untersuchungen, die das Vorhandensein von  $\alpha$ -hämolisierenden Streptokokken und *T. pyogenes* im Uterus am Tag 10 p.p. als Risikofaktor für den Nachweis einer SE an Tag 24 p.p. fanden. *E. coli* und koagulase negative Staphylokokken beeinflussten das Auftreten von SE dagegen nicht (SENS und HEUWIESER, 2013). Eine Zusammenfassung der Studien zum

uterinen Mikrobiom von Kühen mit und ohne Gebärmutterentzündung bieten DADARWAL et al. (2017).

Aktuell wird außerdem die Bedeutung spezifischer Virulenzfaktoren und Bakterienstämme in der Pathogenese chronischer Gebärmutterentzündungen diskutiert, wobei klinische Metritiden und Endometritiden im Zentrum der Forschung stehen (LEBLANC et al., 2011). Vergleichende Untersuchungen der Bakterienstämme, die von gebärmuttergesunden Kühen und von Kühen mit uteriner Entzündung stammen, deuten darauf hin, dass Unterschiede in der Virulenz für die Pathogenität im Uterus bedeutsam sind. Vor allem die verstärkte Adhäsion an und Invasion von endometrialen Epithel- und Stromazellen machen die schädigende Wirkung von ‚endometrial pathogenen *E. coli*‘ (SHELDON et al., 2010) und *T. pyogenes* (SANTOS et al., 2010) aus. Daneben spielen synergistische Effekte verschiedener Uteruspathogene, wie beispielsweise zwischen *T. pyogenes* und gram-negativen Anaerobiern wie *E. coli*, *F. necrophorum* und *Prevotella*-Spezies, im frühen Puerperium eine Rolle (RUDER et al., 1981; DOHMEN et al., 1995; SHELDON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2007).

Wie in II.2.1.1. erörtert, ist allerdings ein Zusammenhang zwischen bakterieller Besiedelung des Endometriums und SE nicht zuverlässig zu belegen (BARAŃSKI et al., 2012; MADDOZ et al., 2014). Sollten also bakterielle Infektionen in der Pathogenese der SE vorkommen, so ist nicht zwingend mit ihrer Persistenz bis zum Nachweis der SE ab Tag 21 p.p. zu rechnen (DRILLICH, 2014). Insgesamt ist anzunehmen, dass der individuellen Immunantwort des Wirts auf eine unspezifische puerperale Infektion des Uterus in der Pathogenese der SE eine größere Bedeutung zukommt als der Besiedelung mit spezifischen Uteruspathogenen (BARAŃSKI et al., 2012; WAGENER et al., 2017a).

## 2.2. Diagnose

Für die Diagnose der SE existiert bislang kein allgemein akzeptierter Goldstandard. Zahlreiche Forschungsgruppen arbeiten an Methoden zu ihrer zuverlässigen Erkennung. Die große Problematik besteht in der eingeschränkten Vergleichbarkeit verschiedener Studien, da angewandte Definitionen, Untersuchungsmethoden, -kriterien und -zeitpunkte abweichen (DE BOER et al., 2014). Im Folgenden werden Endometrium-Zytologie und -Histopathologie, Sonographie sowie neue Ansätze in der Diagnostik der SE vorgestellt.

### 2.2.1. Zytologische Untersuchung des Endometriums

Die zytologische Untersuchung stellt bisher die zentrale Technik zur Diagnose der SE dar, da sie wenig invasiv und mit geringem materiellen Aufwand zu bewerkstelligen ist (MADOZ et al., 2014; PASCOTTINI und OPSOMER, 2016). Ihre Anwendbarkeit unter Praxisbedingungen ist aufgrund des großen zeitlichen Aufwands beschränkt (LEBLANC, 2014). WAGENER et al. (2017a) diskutieren den Einsatz auf Bestandsebene in der integrierten tierärztlichen Bestandsbetreuung für Betriebe mit unspezifischer Fruchtbarkeitsproblematik. Zwei Methoden werden zur Gewinnung zytologischer Proben eingesetzt: Cytobrush (CB) und low-volume uterine lavage (LVL).

Cytobrush: Bei der CB-Methode wird ein an einem Stab fixiertes Bürstchen, das in einem Katheter geschützt liegt, unter manueller transrektaler Kontrolle in die Gebärmutter eingeführt. Im Uterus wird das Bürstchen aus dem Katheter vorgeschoben, über die Schleimhaut gerollt und nach Zurückziehen in den Katheter aus dem Genitaltrakt entfernt (KASIMANICKAM et al., 2004). Dabei werden entweder das Corpus uteri (BARLUND et al., 2008; DUBUC et al., 2010a; MCDUGALL et al., 2011) oder ein Cornu uteri (KASIMANICKAM et al., 2004; BARAŃSKI et al., 2012) beprobt. Das Bürstchen wird auf einem Objektträger ausgestrichen, fixiert und meist mit modifizierter Wright-Giemsa-Färbung gefärbt (KASIMANICKAM et al., 2004; BARLUND et al., 2008). Die CB-Methode gilt als minimalinvasiv und führte auch bei Beprobung vier Stunden nach KB nicht zu einer negativen Beeinträchtigung der Konzeptionsrate (KAUFMANN et al., 2009). Zur Übereinstimmung der PMN-Gehalte von CB-Proben, die an verschiedenen uterinen Lokalisationen gewonnen wurden, existieren bislang nur wenige Studien, die zu uneinheitlichen Ergebnissen kommen (ELLENBERGER et al., 2006; PASCOTTINI et al., 2016a). Bislang ist daher ungeklärt, ob der Zustand des gesamten Endometriums anhand einer CB-Beprobung adäquat abgebildet wird. Neben der zytologischen Beprobung können mittels CB auch bakteriologische Proben gewonnen werden (PRUNNER et al., 2014b). Zur Gewinnung zytologischer Proben bei der KB wurde das Cytotape entwickelt, ein an der Spitze eines Besamungskatheters befestigtes Stück Klebeband (PASCOTTINI et al., 2015).

Low-volume uterine lavage: Die LVL wird als Alternative zur CB-Technik durchgeführt (GILBERT et al., 2005; SALASEL et al., 2010; CHEONG et al., 2011; GALVÃO et al., 2011). Durch einen transzervikal eingeführten Katheter wird

eine definierte Menge einer Lösung (z. B. sterile Kochsalzlösung) in den Uterus appliziert. Nach vorsichtiger transrektaler Massage der Gebärmutter wird die Flüssigkeit aspiriert und anschließend zentrifugiert. Die Zellen des Pellets werden auf einem Objektträger ausgestrichen und analog zur CB-Zytologie fixiert, gefärbt und ausgewertet (GILBERT et al., 2005). Der Anteil der wiedergewonnenen Flüssigkeit wurde mit 10 % bis 25 % angegeben (GILBERT et al., 2005; GALVÃO et al., 2011), wobei dadurch keine Beeinflussung des PMN-Gehalts im Ausstrich nachzuweisen war (KASIMANICKAM et al., 2005a).

Beprobungszeitpunkt: In der Regel wird für jede Studie ein Zeitraum p.p. innerhalb der freiwilligen Wartezeit<sup>2</sup> als Beprobungszeitraum definiert. Seine Wahl beeinflusst den Anteil zytologisch positiver Proben, da die beschriebene PPE und die Gebärmutterinvolution tierindividuell bis zu 50 Tage p.p. andauern können (LEBLANC, 2008). In einigen Studien wird dies durch PMN-Grenzwerte berücksichtigt, die an den Beprobungszeitpunkt angepasst werden (KASIMANICKAM et al., 2004; DUBUC et al., 2010a; GALVÃO et al., 2011; MADOZ et al., 2013). Generell steht die Relevanz früh p.p. zytologisch diagnostizierter SE in der Diskussion. GALVÃO et al. (2009) konnten eine verlängerte Güstzeit nur in Folge von SE nachweisen, die mit 35 oder 49 Tagen p.p., nicht aber mit 21 Tagen p.p. detektiert wurde. Auch GABLER et al. (2010) schlagen die zytologische Diagnostik der SE erst ab 25 Tagen p.p. vor.

Auswertung zytologischer Proben: Die Beurteilung der zytologischen Proben geschieht durch Ermittlung des Anteils der PMN an der Gesamtzellzahl unter dem Lichtmikroskop (KASIMANICKAM et al., 2004). Dabei werden entweder nur PMN und Epithelzellen (DUBUC et al., 2010a) oder alle kernhaltigen Zellen (Epithelzellen, Leukozyten; Ausschluss von Erythrozyten) (CHEONG et al., 2011) berücksichtigt. In einer systematischen Vergleichsstudie erwies sich die Auszählung von 300 Zellen als verlässlichste Methode (MELCHER et al., 2014). Eine hohe Intra- und Interobserver-Übereinstimmung konnte bestätigt werden (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; MELCHER et al., 2014). Während beide zytologischen Techniken (CB und LVL) zu weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen führen (KASIMANICKAM et al., 2005a; BARLUND et al., 2008), wird die CB-Methode vorteilhafter bewertet: Vermutlich

---

<sup>2</sup> Freiwillige Wartezeit: Zeitraum nach der Kalbung, innerhalb dessen die Kühe noch nicht besamt werden (HOEDEMAKER et al., 2014).

beeinträchtigt die LVL-Technik durch den pH-Wert der Salzlösung und den Zentrifugationsprozess die Integrität der Zellen. Deformierte Zellen sind lichtmikroskopisch schlechter auszuwerten, wodurch die Intraobserver-Reproduzierbarkeit leidet (0,85 bei CB bzw. 0,76 bei LVL) (BARLUND et al., 2008). Bei 17 % der beprobten Tiere konnten KASIMANICKAM et al. (2005a) zudem in der LVL keine Flüssigkeit zurückgewinnen.

PMN-Grenzwert: Obwohl zytologische Untersuchungen in der Diagnose der SE weitgehend akzeptiert sind, besteht große Uneinigkeit über den anzuwendenden PMN-Grenzwert (WAGENER et al., 2017a). Dieser wird zum Teil ohne weitere Begründung auf einen Wert festgelegt (GILBERT et al., 2005) oder durch Vergleich mit einer Referenzmethode, wie beispielsweise der Histopathologie, ermittelt (DE BOER et al., 2014). Regelmäßig findet außerdem die statistische Berechnung des PMN-Grenzwerts anhand des Einflusses auf die spätere Fruchtbarkeit statt (DE BOER et al., 2014). Hierzu finden bei zahlreichen Autoren ROC-Analysen Anwendung (KASIMANICKAM et al., 2004; MADOZ et al., 2013; PASCOTTINI et al., 2016c). Dabei ist allerdings eine mögliche Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit durch andere Faktoren zu berücksichtigen (WAGENER et al., 2017a). Für pluripare Kühe sind Werte zwischen 5 % und 18 % in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt üblich. Tabelle 13 (S. 132) zeigt einen Überblick über die in verschiedenen Studien angewandten Grenzwerte unter Berücksichtigung des Untersuchungszeitraums und der dokumentierten Prävalenz. Zwischen 21 und 62 Tagen p.p. wird die Anwendung eines Grenzwerts von 5 % als sinnvoll erachtet (MADOZ et al., 2013).

### **2.2.2. Histopathologische Untersuchung des Endometriums**

Regelmäßig wird die histopathologische Untersuchung als Referenz in der Beurteilung endometrialer Veränderungen beim Rind herangezogen (STUDER und MORROW, 1978; DE BOIS und MANSPEAKER, 1986; BONNETT et al., 1991a; CHAPWANYA et al., 2010). Aufgrund des hohen Zeit- und Materialaufwands der Biopsie sowie der großen Häufigkeit schlechter Probenqualitäten (30 – 40 % (BONNETT et al., 1991a; MEIRA et al., 2012)) wird sie in der Praxis nur selten eingesetzt (PASCOTTINI und OPSOMER, 2016). Daneben besteht Uneinigkeit hinsichtlich einer möglichen negativen Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit (RAMIREZ-GARZON, 2017): Während ETHERINGTON et al. (1988) und BONNETT et al. (1993) einen negativen Einfluss nachwiesen, beurteilten

CHAPWANYA et al. (2010) und MERBACH (2011) die uterine Biopsie bei angemessener Durchführung als sichere Technik ohne Beeinträchtigung von Fruchtbarkeit und Tiergesundheit. Diese unterschiedlichen Einschätzungen resultieren möglicherweise aus der Verwendung von Biopsiezangen verschiedener Größen.

Der direkte Vergleich der histologischen und zytologischen Untersuchungen ergibt regelmäßig eine geringe Übereinstimmung. Wird die Histopathologie als Referenzmethode betrachtet, so zeigt die Zytologie eine niedrige Sensitivität bei sehr hoher Spezifität. Tiere, die in der Zytologie auffallen, haben häufig also auch histologische Auffälligkeiten, während histologisch detektierte Entzündungen nicht zuverlässig zytologisch nachweisbar sind (MERBACH, 2011; MADOZ et al., 2014; CENGIZ et al., 2016; PASCOTTINI et al., 2016b). Als Ursache werden zwei Hypothesen angeführt: Zum einen beeinflusst der Zyklusstand die Zellpopulationen eher in tieferen Schichten des Endometriums (PASCOTTINI et al., 2016b), während oberflächliche, zytologisch untersuchbare Lagen davon unbeeinflusst bleiben (MADOZ et al., 2013; WAGENER et al., 2017a). Zum anderen können mittels Biopsie auch Charakteristika chronischer Endometritiden wie Schädigung des Epithels, Infiltration tieferer Schichten mit Entzündungszellen, Gefäßstauung und Akkumulationen von Lymphozyten und Plasmazellen erfasst werden (BONDURANT, 1999; MERBACH, 2011; CENGIZ et al., 2016). Ob diese histologisch detektierbaren chronischen Alterationen im Endometrium einen Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Kuh nehmen, ist nicht abschließend geklärt (MADOZ et al., 2014; PASCOTTINI und OPSOMER, 2016). Erste Arbeiten zeigten einen abnehmenden Besamungserfolg mit steigendem Schweregrad histologisch diagnostizierter Endometritis (MERBACH, 2011). Bei Betrachtung der Zytologie als Referenzmethode wiesen MEIRA et al. (2012) für die histopathologische Untersuchung eine Sensitivität von 44 % und eine Spezifität von 92 % nach. In dieser Untersuchung führte die Histologie in 56 % der Fälle zu falschnegativen Diagnosen.

### **2.2.3. Sonographische Untersuchung**

Die sonographische Beurteilung von Zervixdurchmesser, Größe der Uterushörner, Dicke des Endometriums und intrauteriner Flüssigkeitsansammlung bietet eine nichtinvasive Methode zur Diagnose uteriner Entzündungen (LENZ et al., 2006). Die Übereinstimmung mit zytologischen Ergebnissen ist gering (Sensitivität 50 %, Spezifität 92 %).

Spezifität 88 %). Außerdem ist die Darstellung methodisch von der exakten Positionierung der Sonde und zudem vom Zyklusstand abhängig (KASIMANICKAM et al., 2004; BARLUND et al., 2008; MEIRA et al., 2012). Aus diesen Gründen wird die Sonographie allein nicht als zuverlässige Methode zur Diagnose der SE angesehen (BARLUND et al., 2008). Die detaillierte Analyse von Veränderungen der endometrialen Echotextur stellt einen Ansatz dar, die Genauigkeit der Ultraschalluntersuchungen in der SE-Diagnostik zu verbessern (POLAT et al., 2015).

#### **2.2.4. Neue diagnostische Ansätze**

Vor dem Hintergrund der Diskrepanzen und der geringen Praxistauglichkeit klassischer Untersuchungsmethoden sind neue Diagnoseansätze für SE aufgefunden, die sich in der Evaluierung befinden (WAGENER et al., 2017a).

Optische Dichte: Die photometrische Bestimmung der optischen Dichte (*OD*) von Gebärmuttersspülproben bei 620 nm zeigte im Vergleich mit der zytologischen Diagnostik eine sehr gute Sensitivität und akzeptable Spezifität (100 % bzw. 82,2 % bei *OD*-Grenzwert 0,059) (MACHADO et al., 2012). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Diagnose ‚Endometritis‘ ungeachtet klinischer Befunde alle Tiere mit einem PMN-Gehalt von über 18 % in der LVL umfasste und damit keine Differenzierung von KE und SE stattfand.

Leukozyten-Esterase-Test: Leukozyten-Esterase (LE) wird durch aktivierte PMN sezerniert. Ihr Nachweis dient als Indikator für den PMN-Gehalt in verschiedenen Körperflüssigkeiten (RERKNIMITR et al., 2006). Die LE-Aktivität wird mittels Harn-Teststreifen in uterinen Spülproben (CHEONG et al., 2012) oder Cytobrush-Überständen (COUTO, 2010) bestimmt. Eine gute Übereinstimmung mit dem Anteil an PMN in zytologischen Proben konnte nachgewiesen werden, wobei ein möglicher Verdünnungsfaktor keine Berücksichtigung fand (COUTO, 2010). Vor ihrem breiten Einsatz als Alternative zur endometrialen Zytologie ist die weitere Optimierung und Validierung dieser Methode erforderlich (CHEONG et al., 2012; DENIS-ROBICHAUD und DUBUC, 2015b).

Direkter Zytokinnachweis in Gebärmuttersspülproben: Der direkte Nachweis verschiedener Zytokine wird mittels ELISA-Untersuchungen in Gebärmuttersspülproben durchgeführt. So wurden bei Kühen mit SE im Vergleich zu gebärmuttergesunden Kontrolltieren an Tag 60 p.p. höhere Konzentrationen von IL6, IL10 und Haptoglobin (Hp) nachgewiesen (BRODZKI et al., 2015b). Zwischen vier

und sechs Wochen p.p. lag außerdem IL8 in höheren Konzentrationen vor (KIM et al., 2014). In *ex vivo*-Modellen wurde die vermehrte Sekretion von IL1B, IL6 und IL8 nach Inkubation endometrialer Explants mit Bakterien oder PAMPs detektiert (BORGES et al., 2012).

Molekularbiologische Untersuchungen: Die Untersuchung der endometrialen Genexpression ermöglicht neue Erkenntnisse zur Pathogenese von Gebärmutterentzündungen und die Charakterisierung potenzieller diagnostischer Marker auf molekularbiologischer Ebene. Dabei zeigte sich übereinstimmend eine Hochregulation der mRNA-Expression von IL1A, IL1B, IL6, IL8, TNF $\alpha$  und PTGS2 (FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; GHASEMI et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2014; PETER et al., 2015). Auch antimikrobielle Peptide, darunter die Kalzium-bindenden Proteine S100A8 und S100A9, werden im Endometrium von Kühen mit SE vermehrt exprimiert (IBRAHIM et al., 2016). In *ex vivo*-Studien (Zell-/Explantkultur) konnten diese Ergebnisse in Teilen bestätigt werden (DAVIES et al., 2008). Bei molekularbiologischen Untersuchungen am Endometrium ist auf Unterschiede in der Gewinnung der Gewebeproben hinzuweisen: Während GALVÃO et al. (2011) und JANOWSKI et al. (2017) Endometrium-Biopsate verwendeten, setzten GABLER et al. (2010), GHASEMI et al. (2012) und KASIMANICKAM et al. (2014) endometriale Epithelzellen aus CB-Proben ein.

In einigen Studien wurde der Zusammenhang zwischen SE und Fruchtbarkeit molekularbiologisch untersucht. Kühe mit SE, die eine reduzierte Fruchtbarkeit aufwiesen (Repeat Breeder<sup>3</sup>, RB), zeigten eine stärkere endometriale Genexpression von Mucin 1, TLR4, IL6 und IL8 im Vergleich mit SE-Kühen, deren Reproduktionsleistung unbeeinträchtigt war (KASIMANICKAM et al., 2014).

### 2.3. Prävalenz

Zur Prävalenz der SE existieren zahlreiche Untersuchungen, die eine geringe Übereinstimmung zeigen. Regelmäßig werden Werte zwischen 12 % und 94 % angegeben (KAUFMANN et al., 2009; SALASEL et al., 2010). Die Ursachen dieser Diskrepanzen liegen in der Anwendung unterschiedlicher Definitionen, Untersuchungsmethoden und -zeitpunkte sowie herdenspezifischer Faktoren

---

<sup>3</sup> Repeat Breeder: Klinisch gesunde, zyklische Kühe mit mindestens drei erfolglosen Besamungen seit der letzten Kalbung.

(DUBUC et al., 2010a; BARAŃSKI et al., 2012; WAGENER et al., 2017a). BARAŃSKI et al. (2012) belegten dies durch eine Prävalenzstudie, in der unterschiedliche Herden, PMN-Grenzwerte und Beprobungszeitpunkte verglichen wurden. Die Prävalenz der SE betrug in Abhängigkeit von den genannten Variablen 19 % bis 75 %. Darüber hinaus findet der Ausschluss von Tieren mit PVD, antibiotischer oder hormoneller Vorbehandlung oder Problemen im Kalbeverlauf uneinheitlich statt (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; MADDOZ et al., 2013; PRUNNER et al., 2014a). Eine Übersicht über die Ergebnisse einiger Studien zur postpartalen SE-Prävalenz bietet Tabelle 13 (S. 132). Zum Zeitpunkt der KB wurde eine Prävalenz der SE von 28 % nachgewiesen (PASCOTTINI et al., 2017a). Untersuchungen an Kühen aus extensiver Weidehaltung ergaben wiederholt eine geringere SE-Prävalenz verglichen mit intensiven Milchviehhaltungen. Als Begründung wird die effizientere Beseitigung peripartal eingedrungener Erreger infolge von weniger stark ausgeprägtem metabolischen Stress herangezogen (MADDOZ et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013; MADDOZ et al., 2014).

#### **2.4. Folgen**

Regelmäßig wird ein negativer Effekt der SE auf die Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen berichtet, der an verschiedenen Fruchtbarkeitsparametern festgemacht wird. Kühe mit SE zeigten im Vergleich mit gebärmuttergesunden Kühen in Abhängigkeit von Untersuchungsmethode und -zeitpunkt um 18 % bis 70 % reduzierte Erstbesamungserfolge und um 25 bis 88 Tage verlängerte Gützeiten (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008; CHEONG et al., 2011; BARAŃSKI et al., 2012; PASCOTTINI et al., 2017b). Einige Autoren fanden darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen SE und verlängerter Rastzeit, reduzierter 300 Tage-Trächtigkeitsrate sowie höherem Besamungsaufwand (GILBERT et al., 2005; BARAŃSKI et al., 2013a). Auch im Rahmen von extensiver Weidehaltung oder terminierten, hormonellen Besamungsprogrammen war eine negative Beeinflussung der Fruchtbarkeit durch SE nachzuweisen (MADDOZ et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013). Einige Studien stellten dagegen keine Beeinflussung der Fruchtbarkeit durch das Auftreten von SE fest (PLÖNTZKE et al., 2010; PRUNNER et al., 2014a; GOBIKRUSHANTH et al., 2016). Bei der Beurteilung ist stets der Einfluss zusätzlicher Faktoren auf die Fruchtbarkeit von Kühen mit und ohne SE zu berücksichtigen. Dazu zählen

beispielsweise BCS, Milchleistung und Jahreszeit (PASCOTTINI et al., 2017b). Zusätzlich ist bedeutend, ob und welches Therapieschema für Kühe mit SE angewandt wird (BARLUND et al., 2008).

Untersuchungen an Embryonen, die nach Superovulation von Kühen mit und ohne SE gewonnen wurden, zeigten, dass eine zum Zeitpunkt der KB bestehende SE einen negativen Effekt auf die Embryonen-Qualität und -Quantität sowie deren Genexpression hat (DRILLICH et al., 2012; HOELKER et al., 2012). LIMA et al. (2013) beobachteten, dass mit 46 Tagen p.p. diagnostizierte SE zu einer reduzierten Trächtigkeitserhaltung zwischen 32 und 60 Tagen post inseminationem führt. Daher liegt die Überlegung nahe, dass die frühe embryonale Mortalität infolge defizitärer oder gestörter Interaktion zwischen Endometrium und Embryo einen möglichen Mechanismus der beeinträchtigten Fruchtbarkeit bei SE darstellt (DRILLICH, 2014). Daneben wird die reduzierte Fruchtbarkeit von SE-Tieren als Folge des Einflusses entzündlicher Vorgänge im Uterus auf die ovarielle Zyklizität (z. B. verlängerter Anöstrus, verlängerte Lutealphasen) beschrieben und kontrovers diskutiert (MATEUS et al., 2002; SHELDON et al., 2002; GOBIKRUSHANTH et al., 2016). Auch chronisch-degenerative Veränderungen bei der Ausheilung endometrialer Entzündungen wie Fibrose oder Atrophie der Uterindrüsen sind als Ursache der reduzierten Fruchtbarkeit denkbar (SHELDON et al., 2006).

SE wird als ätiologische Komponente des RB-Syndroms betrachtet. Bei RB-Kühen wurde SE mit einer Häufigkeit von 13 % (POTHMANN et al., 2015) bzw. 53 % (SALASEL et al., 2010) nachgewiesen. POTHMANN et al. (2015) diskutieren, dass anderen Faktoren, wie z. B. veränderten Hormonprofilen oder Herdenmanagementfaktoren, eine größere Bedeutung in der RB-Pathogenese zukommt als der SE.

Die wirtschaftlichen Einbußen infolge von SE ergeben sich hauptsächlich aus der reduzierten Fruchtbarkeit. Jeder Tag der verlängerten Güstzeit kann mit 2 bis 5 \$ veranschlagt werden (PLAIZIER et al., 1997; MEADOWS et al., 2005). Für die Etablierung einer Trächtigkeit sind mehr Besamungen nötig und betroffene Kühe gehen früher aus dem Betrieb ab als fruchtbare, gebärruttergesunde Tiere (GILBERT et al., 2005; BARAŃSKI et al., 2013a). Daneben sind Kosten für Diagnostik und Behandlung sowie durch Wartezeit entstehende Einbußen infolge des Milchverwurfs zu berücksichtigen (LEWIS, 1997).

## 2.5. Therapie und Prophylaxe

Zur Behandlung von KE finden antibiotische und hormonelle Ansätze sowie Kombinationen aus beiden Anwendung (LEFEBVRE und STOCK, 2012; LEBLANC, 2014). Die SE erfordert aufgrund ihrer Pathophysiologie eigens angepasste Behandlungsstrategien, die bisher noch wenig erforscht sind.

Selbstheilungstendenz: Insgesamt lässt sich eine hohe Selbstheilungstendenz chronischer Endometritiden feststellen. Neben der körpereigenen Immunabwehr spielt dabei der Eintritt der Brunst mit erhöhter Abwehrbereitschaft des Uterus eine Rolle (DEKRUIF, 1999). Bei SE, die zwischen vier und fünf Wochen p.p. diagnostiziert wurde, war innerhalb von zwei bis drei Wochen eine Selbstheilungsrate von 40 % bzw. 66 % zu verzeichnen (DUBUC et al., 2011; BARAŃSKI et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2013).

Antibiotische und hormonelle Therapie: Die wenigen Studien, die zur Wirksamkeit einer systemischen PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -Therapie oder einer intrauterinen Applikation von Antibiotika bei SE durchgeführt wurden, kamen zu uneinheitlichen Ergebnissen (KASIMANICKAM et al., 2005b; DUBUC et al., 2011; LIMA et al., 2013; DENIS-ROBICHAUD und DUBUC, 2015a). Unter Berücksichtigung des unregelmäßigen Nachweises bakterieller Erreger, zunehmender Antibiotikaresistenzen und der geringen Zahl belastbarer Studienergebnisse kann zu einer antibiotischen oder hormonellen Therapie der SE nach aktuellem Stand der Forschung nicht geraten werden (WAGENER et al., 2017a). Wird dennoch eine antibiotische Therapie angestrebt, ist in Kenntnis häufig auftretender antimikrobieller Resistenzen bakterieller Uteruspathogene (SANTOS et al., 2010) und unter Berücksichtigung der Antibiotikaleitlinien (BTK, 2015) sowie der Bestimmungen zur Antibiotigrammpflicht (BMEL, 2018) vorab eine bakteriologische Untersuchung mit Antibiotogramm zu empfehlen.

Antiphlogistische Therapie: Die antiphlogistische Therapie stellt einen neuen Behandlungsansatz dar, der noch kaum erforscht ist. Die dreimalige Applikation eines nichtsteroidalen Antiphlogistikums (NSAID) zeigte im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren einen positiven Effekt auf die Fruchtbarkeit von Kühen mit SE, die bereits mit 14 Tagen p.p. diagnostiziert wurde. Auf die Heilung der SE ergab sich dabei kein positiver Effekt (PRIEST et al., 2013). Wurde Tieren mit klinischer Mastitis zusätzlich zur intrazisternalen antibiotischen Therapie ein NSAID verabreicht, so war eine Verbesserung der Fruchtbarkeit festzustellen (MCDOUGALL

et al., 2016). Als mögliche Erklärung kann die Unterbindung bekannter negativer Effekte klinischer Mastitiden auf die Fruchtbarkeit angebracht werden. Epidemiologische Untersuchungen belegten eine Beeinträchtigung von Fruchtbarkeitsparametern wie Konzeptionsrate und Günstzeit durch das Auftreten klinischer Mastitiden (SANTOS et al., 2004). Daneben ist die direkte Wirkung von NSAIDs auf bestehende uterine Entzündungen denkbar. Eine Erhebung der Gebärmuttergesundheit fand in der genannten Studie nicht statt (MCDOUGALL et al., 2016).

Prophylaxe: Die zentrale Aufgabe in der Prophylaxe der SE ist die Verbesserung der Tiergesundheit in der Transitperiode (ALERI et al., 2016) und im frühen Puerperium (LEBLANC, 2014) durch adäquate Managementpraktiken. Dabei stehen geeignete Fütterungskonzepte, Haltungsstrategien und Hygienemaßnahmen im Mittelpunkt (LEWIS, 1997; COLAZO et al., 2009; INGVARTSEN und MOYES, 2013). Zur frühzeitigen Erkennung behandlungswürdiger puerperaler Kühe eignen sich routinemäßige rektale und vaginale sowie ggf. auch zytologische Kontrollen in den ersten Wochen p.p. (FÖLDI et al., 2006). Als langfristige Maßnahme ist zusätzlich die genetische Selektion auf verstärkte Krankheitsresistenz anzustreben (ALERI et al., 2016). Erste Untersuchungsergebnisse zur Impfung hochträchtiger Kühe gegen puerperale Infektionserreger (*E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum*) sind erfolgsversprechend: Eine verringerte Prävalenz puerperaler Metritiden sowie verbesserte Fruchtbarkeitsleistungen konnten nachgewiesen werden (MACHADO et al., 2014).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

In diesem Kapitel werden die Versuchstiere, die Probengewinnung und Probenuntersuchung sowie das Vorgehen bei der Auswertung der erhobenen Daten beschrieben. Die Dokumentation der eingesetzten Geräte, Materialien, Reagenzien und Lösungen sowie angewandte Pipettierschemata finden sich im Anhang dieser Arbeit (vgl. IX.).

#### **1. Probengewinnung**

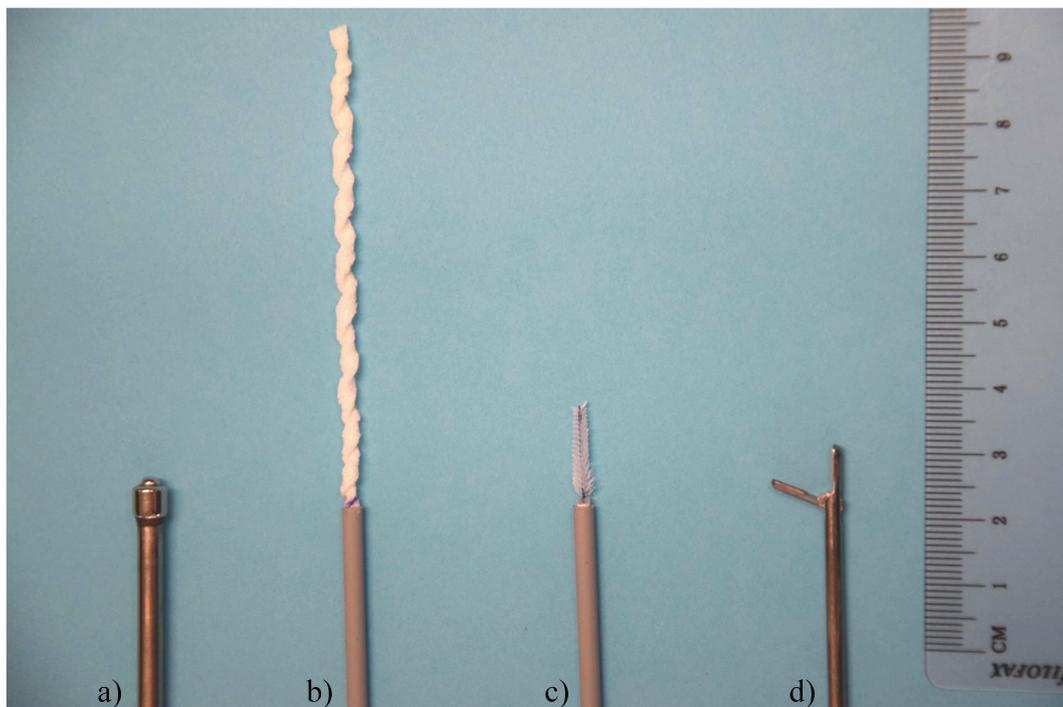
##### **1.1. Versuchsbetrieb und -tiere**

Die für die Untersuchungen verwendeten Milchkühe wurden im Lehr-, Versuchs- und Fachzentrum für Milchvieh- und Rinderhaltung Achselschwang der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft gehalten. Die Unterbringung der Versuchstiere erfolgte im Außenklimastall mit planbefestigter Lauffläche und Tiefstreuboxen mit Sandbettwaben sowie Stroheinstreu. Die Herde bestand aus etwa 188 Milchkühen (inkl. Trockenstehern) der Rassen Fleckvieh (ca. 60 %), Braunvieh (ca. 30 %) und Rotbunte (ca. 6 %) sowie einzelnen Vertretern extensiver Rassen (Murnau-Werdenfelser, Pustertaler Schecke, Original-Braunvieh). In einem räumlich getrennten landwirtschaftlichen Betrieb fand die Jungtieraufzucht statt. Die Fütterung wurde über eine mit individuellen Milchleistungsfutterrationen aufgewertete Mischration aus Gras- und Maissilage, Heu, Stroh, Gerste, Körnermais, Rapsextraktionsschrot, Viehsalz, Futterkalk und Mineralfutter realisiert. Laktierende Tiere waren in hochlaktierende sowie altmelkende Kühe unterteilt und erhielten Rationen entsprechend unterschiedlicher Energiedichte. Die durchschnittliche Milchleistung der Herde betrug für das Jahr 2016 10.404 kg bei 4,01 % Fett- und 3,57 % Eiweißgehalt. Die Brunstbeobachtung erfolgte visuell durch das Betreuungspersonal und wurde durch Aktivitätsmessung mittels Fußtranspondern der Firma Westfalia (GEA Group, Düsseldorf) unterstützt. Besamungen wurden durch den betreuenden Tierarzt etwa 12 Stunden nach Brunstbeginn durchgeführt.

Eine Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes war von der zuständigen Behörde erteilt worden (Regierung von Oberbayern, Geschäftszeichen 55.2-1-54-2532-6-2016).

## 1.2. Konstruktion des Probenentnahmegärts

Zur Probengewinnung aus der Gebärnutter von Kühen war in der Arbeitsgruppe ein Probenentnahmegärät entwickelt und an Schlachtorganen evaluiert worden (HILLMER, 2018). Für seinen Einsatz am Tier wurde es im Rahmen der vorliegenden Arbeit geringfügig modifiziert. Nach einmaliger Passage des Gebärnutterhalses mit einem Arbeitskanal können dadurch unmittelbar aufeinanderfolgend Uterussekret (US) sowie zytologische, histologische und bakteriologische Proben aus dem bovinen Uterus gewonnen und anschließend vergleichend untersucht werden. Das Probenentnahmegärät besteht aus einem Arbeitskanal mit stumpfem Mandrin, einem Schwämmchen an einem Führungsstab mit Adapter, einem Bürstchen an einem Führungsstab mit Schutzhülse und einer Biopsiezange (vgl. Abbildung 1). Um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten und die Probenentnahme unabhängig vom Zyklusstadium zu ermöglichen, sind alle Bestandteile des Geräts Sonderanfertigungen mit kleinen Abmessungen von maximal 4 mm Außendurchmesser (AD). Die einzelnen Komponenten werden im Folgenden beschrieben.



**Abbildung 1: Probenentnahmegärät.**

Das Probenentnahmegärät besteht aus a) einem Arbeitskanal mit Mandrin, b) einem Schwämmchen an einem Führungsstab, c) einem Bürstchen an einem Führungsstab mit Schutzhülse und d) einer Biopsiezange. Es dient der unmittelbar aufeinanderfolgenden Gewinnung von Uterussekret sowie zytologischen, histologischen und bakteriologischen Proben aus dem bovinen Uterus.

### 1.2.1. Arbeitskanal und Mandrin

Den Arbeitskanal bildete ein 600 mm langes Rundrohr aus Edelstahl mit AD 4,0 mm und Innendurchmesser (ID) 3,5 mm bei einer Wandstärke von 0,25 mm. An seinem vorderen Ende wurde die Wandstärke auf 0,75 mm erhöht, indem ein 5 mm langes Stück eines zweiten Edelstahlrundrohrs mit AD 5,0 mm und ID 4,0 mm aufgesteckt und verlötet wurde. So wurde ein Abrunden der vorderen Kanten auf einer Drehbank möglich. Rauheiten der Oberfläche wurden mit Schleifpapier nachgearbeitet. Schleimhautverletzungen an Scheide, Zervix und Uterus sowie die daraus resultierende Kontamination der Proben durch Blutungen wurden dadurch auf das geringstmögliche Maß reduziert.

Ein an der Spitze stumpfer Mandrin aus chirurgischem Stahl mit 3,2 mm Durchmesser und 700 mm Länge lag während der Zervixpassage im Arbeitskanal. Am hinteren Ende wurde auf 600,5 mm Länge ein Stelling angebracht, der ein Vorschieben des Mandrins in den Arbeitskanal nur so weit zuließ, dass er diesen am vorderen Ende um ca. 0,5 mm überragte. Der Mandrin diente dem Schutz des Gewebes vor Verletzungen durch das vordere Ende des Arbeitskanals und verhinderte beim Einführen eine Verunreinigung des Arbeitskanallumens durch Sekrete aus Vagina und Zervix.

### 1.2.2. Merocel-Schwämmchen zur Gewinnung von Uterussektret

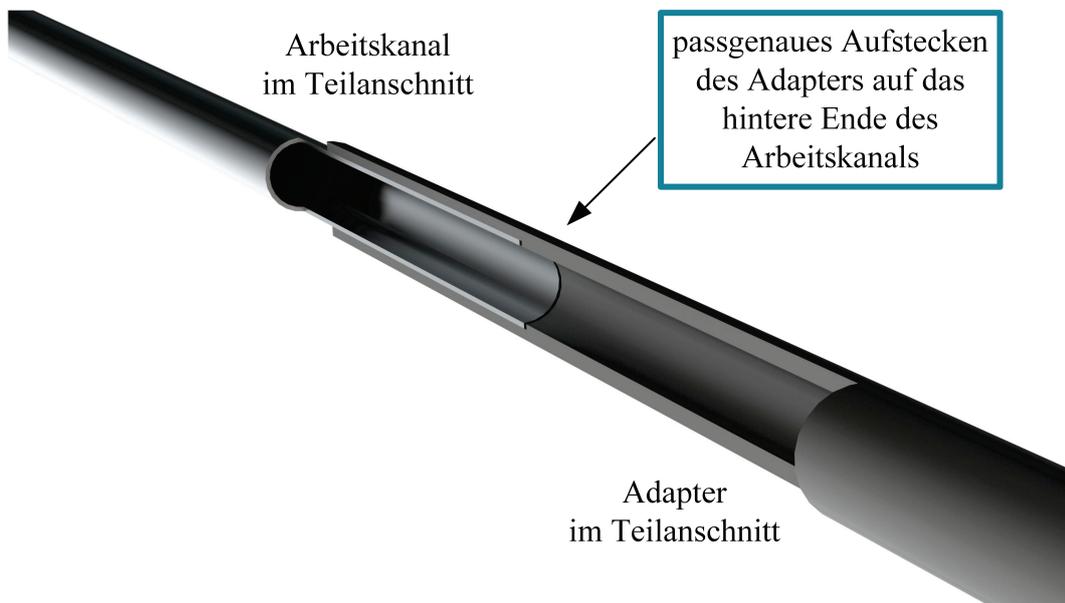
Als geeignetes Material für die Gewinnung von Schleimhautsekreten erwiesen sich ophthalmische Schwämmchen aus der Humanmedizin. Aufgrund ihrer definierten Eigenschaften hinsichtlich der Aufnahme und Wiederabgabe von Zytokinen und Immunglobulinen finden sie Anwendung in Untersuchungen zur lokalen Immunität sowie zu physiologischen und pathologischen Zuständen an Schleimhäuten (ROHAN et al., 2000). In der Humanmedizin wurde damit beispielsweise Zervikalschleim gewonnen und das Vorhandensein spezifischer Antikörper nach einer systemischen Immunisierung gegen humanes Papillomavirus überprüft (NARDELLI-HAEFLIGER et al., 2003). CASTLE et al. (2004) identifizierten in vergleichenden Untersuchungen dreier verschiedener ophthalmischer Schwämmchen das Merocel-Schwämmchen als das für die Rückgewinnung aufgenommener Immunmarker am besten Geeignete. Limitationen zeigten sich dabei einzig in der Rückgewinnung von IL6 bei *in vitro*-Beladung sowie von IgG bei *in vivo*-Anwendungen (CASTLE et al., 2004). Merocel-Material ist hydroxyliertes Polyvinylacetat, das in einem chemisch-synthetischen Prozess

hergestellt wird und biologisch verträglich ist. Durch die hochgradige Vernetzung des Polyvinylalkohols entsteht ein Material mit offenen Poren, das hochabsorbierend und hydrophil reagiert (MEDTRONIC, 2009).

Im Projekt kamen zur US-Gewinnung 205 mm lange Merocel-Schwämmchen der Materialspezifikation ‚CF 120‘ mit den Maßen 2 mm x 4 mm zur Anwendung. Sie wurden mit einem Skalpell auf eine Länge von 102,5 mm gekürzt und erhielten eine Markierung 10 mm vom hinteren Ende entfernt. An dieser Markierung wurden die Schwämmchen nach der Probenentnahme abgesetzt. So konnte für die Berechnung des Verdünnungsfaktors der US-Proben das Gewicht des trockenen Schwämmchens mit einem festen Wert eingerechnet werden (vgl. III.2.2.2.). Die Schwämmchen wurden längs aufgedrillt, damit sie bei der Probengewinnung unter leichtem Drehen in den Arbeitskanal vorgeschoben werden konnten. Die Sterilisation der Schwämmchen wurde durch Bestrahlung mit Gammastrahlen (Kobalt-60, Dosis 52,6 kGy) bei BBF Sterilisationservice (Kernen-Rommelshausen) realisiert.

Als Führungsstab wurde ein Kunststoffrohr mit AD 3,2 mm und ID 2,2 mm verwendet, das auf eine Länge von 830 mm gekürzt und durch Einlegen in 70 % Ethanol für 5 min desinfiziert wurde. An seinem Ende wurde mittels Heißkleber das Schwämmchen befestigt (vgl. III.1.2.5.1.).

Um das Einführen der flexiblen Merocel-Schwämmchen im Stall möglichst zügig und kontaminationsarm durchführen zu können, wurden ‚Adapter‘ verwendet. Sie bestanden aus 160 mm langen Edelstahlrohren mit AD 5 mm und ID 3,5 mm. Am vorderen Ende wurden sie auf einer Länge von 30 mm auf einen ID von 4 mm (entspricht dem AD des Arbeitskanals) aufgebohrt. Bereits vor der Beprobung wurden sie über das Schwämmchen und den vorderen Teil des Führungsstabs gestülpt. Im landwirtschaftlichen Betrieb wurde der Adapter mit seinem weiteren, vorderen Teil auf das hintere Ende des transzervikal positionierten Arbeitskanals aufgesetzt. Ohne zusätzliche Handhabung und Kontakt zur Stallluft konnte das Schwämmchen anschließend in den Arbeitskanal vorgeschoben werden. Eine Markierung am Schwämmchen-Führungsstab auf 730 mm (entspricht Länge Arbeitskanal + Länge des englumigen Adapterstücks) ermöglichte das passgenaue Vorschieben des Schwämmchens (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Arbeitskanals mit aufsitzendem Schwämmchen-Adapter.**

Die Konstruktion ermöglicht das zügige und kontaminationsarme Einführen des flexiblen Merocel-Schwämmchens zur Uterussekretgewinnung in den Arbeitskanal.

### 1.2.3. Modifiziertes Cytobrush zur Gewinnung zytologischer Proben

Aufgrund der kompakten Abmessungen des Arbeitskanals war die Verwendung eines modifizierten Cytobrush notwendig. Hierfür wurde ein kommerzielles Interdentalbürstchen mit konischem Besatz (2,5 mm – 4,5 mm) verwendet. Nach Dampfsterilisation wurde sein Metalldraht mittels Heißkleber in der Öffnung eines 780 mm langen Kunststoffrohrs mit AD 2,0 mm und ID 0,8 mm befestigt, das als Führungsstab diente. Um zu verhindern, dass die von dem Bürstchen aufgenommenen Zellen im Inneren des Arbeitskanals abgestreift wurden, diente ein zweiter, 680 mm langer Kunststoffstab mit AD 3,2 mm und ID 2,2 mm als Schutzhülse. Dieser wurde auf einer Länge von 600 mm (entspricht Länge des Arbeitskanals) mit einer Markierung versehen. Zur Probenentnahme wurde das Bürstchen im Uterus kurz aus dieser Schutzhülse hervorgeschoben und vor Entfernen aus dem Arbeitskanal wieder in die Umhüllung zurückgezogen. Führungsstab und Schutzhülse wurden vor Anbringen des Bürstchens durch Einlegen in 70 % Ethanol für 5 min desinfiziert.

### 1.2.4. Biopsiezange zur Gewinnung von Proben für die histopathologische und molekularbiologische Untersuchung

Für die Gewinnung kleiner Schleimhautbiopate von ca. 6 mm x 3 mm x 2 mm Größe (LxBxH) aus der Gebärmutter wurde eine zu diesem Zweck konstruierte

Biopsiezange mit Doppellöffel aus chirurgischem Edelstahl verwendet. Ihr Durchmesser betrug 3,0 mm bei einer Länge von 650 mm. Um trotz des geringen Durchmessers bei großer Länge der Zange ausreichend Kraft zum Herausschneiden der Biopate auf die Kanten übertragen zu können, wurde einer der beiden Löffel starr konstruiert, während der andere beim Schließen der Zange darauf gedrückt wurde (vgl. Abbildung 1d, S. 25).

### **1.2.5. Präparation der Materialien**

Merocel-Schwämmchen und Cytobrush mit Führungsstäben sind Einmalartikel und wurden nach jeder Beprobung entsorgt. Arbeitskanäle, Mandrins, Adapter und Biopsiezange wurden nach Reinigung und Desinfektion erneut zur Probenentnahme eingesetzt.

#### **1.2.5.1. Einwegmaterial**

Vor jedem Beprobungstermin fand die Präparation der notwendigen Anzahl an Einweg-Instrumenten statt: Unter einer Sicherheitswerkbank wurden unter Verwendung steriler Handschuhe und einer Heißklebepistole die sterilen Merocel-Schwämmchen an ihrem markierten Ende und die sterilen Bürstchen über ihren Metalldraht in die Öffnung der jeweiligen Kunststoffstäbe geklebt. Die dampfsterilisierten Adapterstücke wurden über die Schwämmchen und den vorderen Teil der Führungsstäbe gestülpt und mit einem Klebestreifen in ihrer Position fixiert. Die Bürstchen-Stab-Kombinationen wurden in die Schutzhülse geschoben. Anschließend wurden je ein präpariertes Merocel-Schwämmchen und ein Bürstchen in Sterilisationsfolie verpackt und verschweißt.

#### **1.2.5.2. Mehrwegmaterial**

Die Arbeitskanäle mit Mandrins wurden einzeln in Sterilisationsfolie verpackt und dampfsterilisiert. Auch die Biopsiezange wurde der Dampfsterilisation unterzogen. Zwischen den Beprobungen eines Tages wurde die Biopsiezange zunächst mit Wasser und einer Bürste gereinigt und anschließend bis zum Einsatz am nächsten Versuchstier in 70 % Ethanol gelagert. Arbeitskanäle und Mandrins wurden je Betriebsbesuch nur einmal verwendet und anschließend gereinigt und autoklaviert.

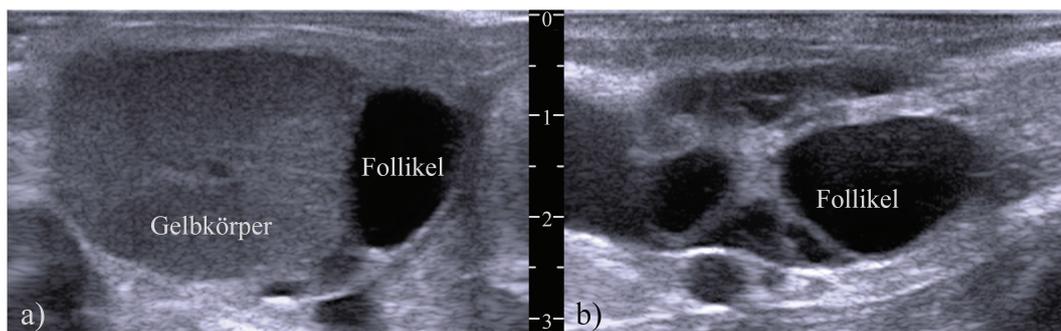
### 1.3. Vorgehen bei der klinischen Untersuchung und Probenentnahme

Die Probenentnahme wurde bei Kühen zwischen 43 und 62 Tagen p.p. durchgeführt. Im Abstand von 14 Tagen fanden Bestandsbesuche auf dem Versuchsbetrieb statt. Kühe, die sich im genannten postpartalen Zeitfenster befanden, wurden vorgestellt und hierzu im Fressfanggitter fixiert. Zu jedem Versuchstier wurde ein ausführlicher Vorbericht aufgenommen (vgl. Abbildung 20, S. 142). Neben Signalement und Leistung der Tiere wurden Informationen zum Verlauf der letzten Kalbung (Anzahl und Vitalität der Kälber, Geburtshilfe, Stoffwechsel- und Puerperalstörungen, Behandlungen) sowie zur Gebärmuttergesundheit (Ergebnis der sog. Erstlingsuntersuchung innerhalb von 20 bis 40 Tagen p.p.) dokumentiert. Behandlungen der Tiere innerhalb von zwei Wochen vor dem Probenentnahmeterrmin wurden dokumentiert. Folgende Behandlungen waren bei insgesamt vier Tieren, die später als gebärmuttergesund kategorisiert wurden, durchgeführt worden: Zwei Tiere mit Panaritium, Ceftiofur s.c.; ein Tier mit Mastitis, Cefquinom intrazisternal; ein Tier mit Radialisquetschung, Romefen s.c. und Vitamin-B-Komplex s.c.

Jedes vorgestellte Tier wurde zunächst einer kurzen Allgemeinuntersuchung unter Berücksichtigung der im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien unterzogen. Tiere mit augenscheinlichen Symptomen einer klinischen Allgemeinerkrankung wurden vom Versuch ausgeschlossen (vgl. Abbildung 21, S. 143). Die spezielle gynäkologische Untersuchung und die Beprobung der Tiere wurden in einem gesonderten Protokoll festgehalten (vgl. Abbildung 22, S. 144). Die vaginale Untersuchung fand unter Zuhilfenahme eines Röhrenspekulums nach Abelein statt. Hierfür wurde der Kuhschwanz mit einem Strick um den Hals der Kuh zur Seite gebunden, die Scham gründlich mit feuchten Papiertüchern gereinigt und das angefeuchtete Spekulum unter Spreizen der Labien eingeführt. Mit Hilfe einer Taschenlampe wurden Form und Öffnungsgrad der Portio vaginalis sowie Schleimhautfarbe und Feuchtigkeit der Scheide befundet. Gegebenenfalls vorhandene Flüssigkeitsansammlungen wurden charakterisiert (z. B. Schleim, Eiter, Harn). Anschließend wurde eine manuelle rektale Untersuchung unter Verwendung eines Untersuchungshandschuhs sowie ausreichend Gleitgel durchgeführt. Hierbei wurden Symmetrie, Größe und Kontraktilität des Uterus sowie Größe und Funktionsgebilde der Eierstöcke beurteilt. Anhand der Befunde der gynäkologischen Untersuchung wurde eine klinische Diagnose hinsichtlich der Gebärmuttergesundheit gestellt (keine klinische Endometritis/klinische Endometritis).

Im Anschluss wurden die Proben aus der Gebärmutter gewonnen. Nach erneuter Reinigung der Scham mit feuchten Papiertüchern wurde der Arbeitskanal mit Mandrin unter manueller rektaler Kontrolle über die Scham durch Scheide und Zervix geführt. Sein Ende kam im Uterushorn ipsilateral zum dominanten Funktionsgebilde auf dem Ovar (wenn vorhanden: Gelbkörper, ansonsten Blase) zum Liegen. Ein über den Arbeitskanal gestülpter Kunststoff-Schutzüberzug wurde bei Erreichen des äußeren Muttermunds durchstoßen; er diente einerseits der Reduktion des Keimeintrags in den Uterus und verhinderte andererseits das Eintreten von Zellen vaginalen Ursprungs in das Arbeitskanallumen. Nach Entfernen des Mandrins wurde mit Hilfe des Adapters das an einem Kunststoffstab befestigte Merocel-Schwämmchen durch den Arbeitskanal in den Uterus eingeführt. Ein Zurückziehen des Arbeitskanals auf den letzten Zentimetern ermöglichte die Längsstreckung des Schwämmchens im Uteruslumen und verhinderte sein Aufknäueln. Das Schwämmchen blieb für zwei Minuten im Uteruslumen liegen. Zur Optimierung der Flüssigkeitsaufnahme wurde es währenddessen durch Drehen seines Führungsstabes vorsichtig rotiert. Stab und Schwämmchen wurden wieder durch den Arbeitskanal zurückgezogen, das Schwämmchen an der zuvor angebrachten Markierung abgeschnitten und mittels einer Pinzette in ein Mikroschraubröhrchen mit 300 µl vorgelegtem Extraktionspuffer (PBS mit 100 µg/ml Aprotinin) verbracht. Im nächsten Schritt wurde das modifizierte Cytobrush in seiner Schutzhülse durch den Arbeitskanal ins Uteruslumen geschoben. Eine geringe Bewegung des Arbeitskanals nach kranial vorab (ca. 3 – 4 cm) stellte die Beprobung eines bisher unberührten Endometrium-Abschnitts sicher. Im Uterus wurde das Bürstchen mit Hilfe des Führungsstabes aus seiner Schutzhülse vorge-schoben, einmal um 360° über die Schleimhaut gerollt und nach Zurückziehen in die Schutzhülse wieder aus dem Arbeitskanal entfernt. Der so gewonnene uterine Schleimhautabstrich wurde umgehend in einem vom Stall abgetrennten Raum auf zwei dampfsterilisierten Objektträgern ausgestrichen. Anschließend wurde das Bürstchen zur bakteriologischen Beurteilung über die Hälfte eines Columbia-Schafblutagars gerollt. Daraufhin wurde die Biopsiezange durch den Arbeitskanal in den Uterus eingeführt und an zwei unterschiedlichen Lokalisationen des beprobten Gebärmutterhorns wurde je ein Bioptat gewonnen. Eines der beiden Bioptate wurde für die histopathologische Beurteilung in 1,5 ml 4 % Formalin, das andere für die molekularbiologische Untersuchung in 1,5 ml RNAlater verbracht. Nachfolgend wurde der Arbeitskanal aus dem Genitaltrakt entfernt.

Die manuelle rektale Untersuchung wurde zur Uterusbefundung und Zyklusdiagnose durch eine transrektale sonographische Untersuchung mit einer 10 MHz-Linearsonde komplettiert. Der Zyklusstand wurde anhand der Präsenz eines Gelbkörpers angesprochen (vgl. Abbildung 3 und III.3.1.2.). Zuletzt wurde eine Blutprobe aus der Schwanzvene (*V. caudalis mediana*) entnommen. Die Blutprobe diente der Bestimmung der Plasmakonzentrationen der im Uterussekret untersuchten Analyten, sodass eine rechnerische Korrektur der Blutkontamination der Uterussekretproben möglich war (vgl. III.2.2.3. und III.2.2.5.). Alle Proben wurden nach ihrer Gewinnung umgehend auf Eis gelagert, wobei die Blutproben in Papiertücher eingewickelt wurden, um ein Gefrieren zu verhindern.



**Abbildung 3: Sonographische Darstellung der Eierstöcke zur Zyklusdiagnose (beispielhaft).**

a) Lutealphase: Ovar mit Blütegelbkörper und Follikel; b) Follikelphase: Ovar mit dominantem Follikel; mittig: Maßstab in cm

## 2. Laboruntersuchungen

### 2.1. Probenbearbeitung und -konservierung

Die gewonnenen Proben wurden gekühlt auf Eis innerhalb von maximal drei Stunden in das Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München transportiert und dort bearbeitet. Die Blutproben wurden bei 3.363 xg und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Etwa 1,5 ml der Plasmaüberstände wurden in Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die formalinfixierten Endometrium-Bioptate wurden über Nacht bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag ungekühlt per Post an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig verschickt. Die RNAlater-fixierten Endometrium-Bioptate wurden bis zur Verwendung für die molekularbiologische Untersuchung bei -80 °C tiefgefroren. Sie dienten als Back-up für die seltenen Fälle, in denen die formalinfixierte Probe histopathologisch nicht auswertbar war, und wurden bei Bedarf nach Leipzig versandt.

## 2.2. Untersuchung des Uterussekrets

### 2.2.1. Extraktion des Uterussekrets

Die Extraktion des Uterussekrets (US) aus den Merocel-Schwämmchen wurde in Anlehnung an das Extraktionsprotokoll nach CROWLEY-NOWICK et al. (1997), optimiert nach ROHAN et al. (2000), durchgeführt. Die nach der Probengewinnung in Mikroröhrchen mit 300 µl Extraktionspuffer verbrachten Schwämmchen wurden in den Einsatz von Filterröhrchen mit einer Cellulose-Acetat-Membran mit Porengröße 0,45 µm gegeben. Im Mikroröhrchen zurückbleibende Flüssigkeit wurde überpipettiert. Durch Zentrifugation der Filterröhrchen bei 14.000 xg und 20 °C für 15 min wurde das US extrahiert. Anschließend wurden die Schwämmchen in neue Filterröhrchen überführt, in denen durch Zugabe von 300 µl Extraktionspuffer und anschließende Zentrifugation bei 14.000 xg und 20 °C für 15 min ein zweiter Extraktionsschritt durchgeführt wurde. Die beiden eluierten Volumina wurden in einem Mikroröhrchen kombiniert und nach der Bestimmung der Blutkontamination (vgl. III.2.2.3.) bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C tiefgefroren. Als zusätzliche Quelle zur bakteriologischen Untersuchung wurde der Filtereinsatz des zuerst verwendeten Filterröhrchens nach Zentrifugation und Entnahme des Schwämmchens mit sterilem Abstrichbesteck ausgetupft und der zur Hälfte mit Cytobrush-Material beschickte Schafblut-Agar damit bestrichen.

### 2.2.2. Bestimmung des Verdünnungsfaktors

Bei jedem Tier wurden unterschiedliche Mengen US gewonnen, die anschließend mit je 2 x 300 µl Extraktionspuffer aus den Merocel-Schwämmchen gespült wurden. Daher war für jede US-Probe ein individueller Verdünnungsfaktor  $D$  zu berücksichtigen. Dieser errechnet sich nach ROHAN et al. (2000) aus der Masse des Schwämmchens vor ( $y$ , trocken) und nach ( $x$ , feucht) der Probenentnahme sowie dem Gewicht des zugegebenen Extraktionspuffers (näherungsweise 0,6 g bei 600 µl mit Dichte 1,005 g/ml) wie folgt:

$$D = \frac{(x - y) + 0,6 \text{ g}}{x - y} \quad \text{Formel 1}$$

Die Konstruktion des Probeentnahmegärts sowie die Probengewinnung unter Stallbedingungen ließen kein exaktes Wiegen der Merocel-Schwämmchen unmittelbar vor und nach der Beprobung zu. Daher wurde die Formel an die gegebenen Bedingungen angepasst. Die Masse des durch das Schwämmchen

aufgenommenen Sekrets  $m(US)$  errechnet sich durch

$$m(US) = m1 - m0 - 0,3 \text{ g} - 0,053 \text{ g} \quad \text{Formel 2}$$

$m1$  bezeichnet dabei die Masse des Filtrerröhrchens mit dem nassen Schwämmchen und 300  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer.  $m0$  beschreibt die Leermasse des Filtrerröhrchens. Das trockene Schwämmchen ( $y$ ) wird mit 0,053 g eingerechnet. Dieser Wert ergab sich in Vorversuchen, bei denen wiederholt das Gewicht der trockenen Schwämmchen nach Abschneiden an der gesetzten Markierung (Streifen von 2,0 mm x 4,0 mm x 92,5 mm) bestimmt wurde. Der Verdünnungsfaktor  $D$  ergibt sich als

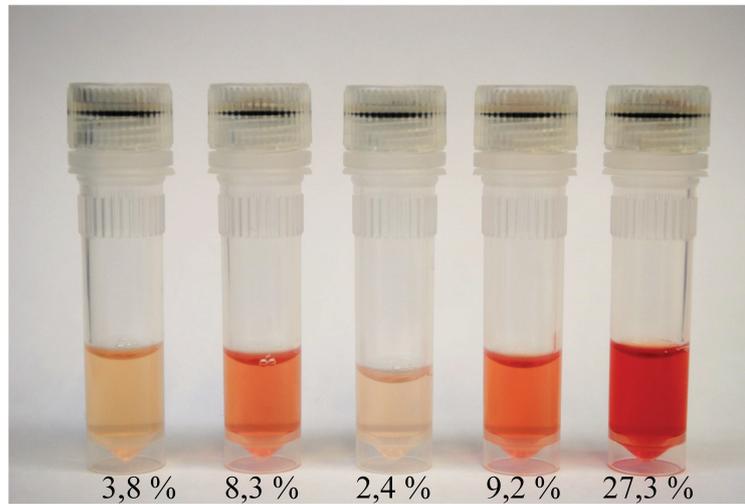
$$D = \frac{m(US) + 0,6 \text{ g}}{m(US)} \quad \text{Formel 3}$$

Alle Wägungen wurden auf einer temperaturstabilen Präzisionswaage mit Windschutz auf 0,001 g genau durchgeführt. US-Proben mit  $D$  größer 50 wurden von der weiteren Untersuchung und Auswertung ausgeschlossen.

### 2.2.3. Quantifizierung der Blutkontamination

Eine der Probenentnahmetechnik geschuldete Kontamination der US-Proben mit Blut aus kleinen Schleimhautverletzungen war nicht immer zu vermeiden (vgl. Abbildung 4). Möglicherweise beeinflusst dieser Bluteintrag die Konzentration der untersuchten Analyten in der Probe. Ist im Blut mehr Analyt vorhanden als lokal, so wird die US-Probe überschätzt. Ist dagegen im Blut weniger Analyt vorhanden als lokal, so entsteht ein Verdünnungseffekt.

Um diese Verzerrung rechnerisch zu korrigieren, wurde die Quantifizierung der Blutkontamination in US-Proben durch photometrische Messung bei 570 nm realisiert, um oxygeniertes und desoxygeniertes Hämoglobin gleichermaßen zu erfassen (ZIJLSTRA und BUURSMA, 1997; SHETH et al., 2012). Hierzu wurden verschiedene Blutverdünnungsstufen photometrisch gemessen und so eine Standardkurve erstellt, anhand derer der prozentuale Blutanteil jeder US-Probe bestimmt werden konnte.



**Abbildung 4: Verschiedene Grade der Blutkontamination von Uterussekretproben.**

Die angegebenen Prozentzahlen stellen den photometrisch anhand einer Standardkurve bestimmten Blutvolumenanteil (*Blut%*) in der gewonnenen Uterussekretprobe dar.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden Merocel-Schwämmchen mit je 100  $\mu$ l Vollblut von zehn Tieren der Versuchsherde beladen, was in etwa der durchschnittlich bei HILLMER (2018) gewonnenen Menge US entsprach. Anschließend wurden die Proben identisch zu den US-Proben prozessiert (vgl. III.2.2.1.). Die Eluate galten im Folgenden als 100 %-Wert, entsprachen also einer US-Probe, die vollständig aus Blut bestand. Danach wurden für jedes der zehn Eluate Verdünnungsreihen mit PBS erstellt und photometrisch bei 570 nm gemessen. Zur Berechnung der Standardkurve mit zwölf Standardpunkten (0,1 % bis 100 %) wurde für jede Verdünnungsstufe der Mittelwert aus der optischen Dichte (*OD*) von 10 Proben verwendet. Die Formel zur Berechnung der prozentualen Blutkontamination *Blut%* einer US-Probe ergab sich zu

$$\text{Blut}\% = 242 \cdot OD^2 + 118 \cdot OD + 0,24 \quad \text{Formel 4}$$

wobei *OD* die optische Dichte der Probe bei 570 nm beschreibt. Die Nachweisgrenze lag bei 2,18 % Blut in der unverdünnten US-Probe. Für Werte, die rechnerisch unter dieser Grenze lagen, wurde mit einer Blutkontamination von 2,18 % kalkuliert. US-Proben, die zu mehr als  $\frac{1}{3}$  aus Blut bestanden (Blutkontamination > 33 %) wurden von der weiteren Untersuchung und Auswertung ausgeschlossen. Die *OD* jeder US-Probe wurde mit Hilfe eines Nanophotometers in dreifacher Wiederholung anhand je 1  $\mu$ l Probenvolumen bei 570 nm bestimmt. Durch Einsetzen des Medians in obige Formel wurde die prozentuale Blutkontamination errechnet.

#### **2.2.4. PMN-Chemotaxis-Assay**

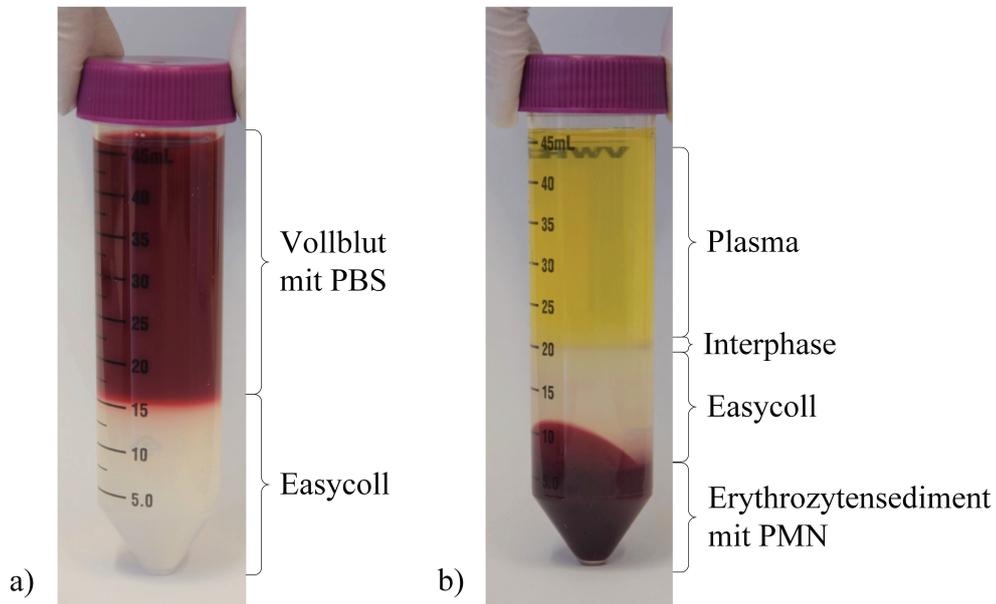
Zur Untersuchung der biologischen Aktivität von US wurde ein Chemotaxis-Assay durchgeführt. Hierbei wurde dessen Kapazität untersucht, über chemotaktisch wirksame Botenstoffe PMN zu aktivieren und anzulocken. Dies lässt sich in einer sog. Transmigrationskammer realisieren: Zwei aufeinanderliegende Wells werden durch eine 10 µm dicke Membran getrennt, durch deren 3 µm große Poren PMN aktiv zum chemotaktischen Reiz wandern müssen (BOYDEN, 1962). Im unteren Well wurde US vorgelegt und in das obere Well wurde eine PMN-Suspension mit definierter Zell-Konzentration pipettiert. Nach Inkubation wurde die Zahl der durch die Membran in das untere Well gewanderten Zellen mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) gemessen und die relative Transmigrationsrate  $T_r$  durch Vergleich mit einer Positivkontrolle bestimmt. Das chemotaktische Potenzial der eingesetzten Proben konnte so relativ quantifiziert werden.

##### **2.2.4.1. PMN-Gewinnung**

Mittels Dichtegradientenzentrifugation und Erythrozytenlyse wurden PMN aus venösem Vollblut eines gesunden Versuchstiers der Klinik für Wiederkäuer isoliert. Für die gesamte Versuchsreihe wurde Blut derselben Kuh verwendet, um individuelle Unterschiede in der Leukozytenpopulation auszuschließen. Eine Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes war von der zuständigen Behörde erteilt worden (Regierung von Oberbayern, Geschäftszeichen 55.2-1-54-2532.0-85-14).

##### Dichtegradientenzentrifugation zur Zellseparation

15 ml Vollblut wurden 1:2 mit PBS verdünnt und anschließend vorsichtig mit Phasentrennung über 15 ml Easycoll (Dichte 1,077 g/ml), die in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt wurden, geschichtet. Durch Zentrifugation bei 1.300 xg und 10 °C für 30 min ohne Bremse wurden die Blutbestandteile separiert (vgl. Abbildung 5): Im Erythrozytensediment waren die PMN enthalten; darüber befand sich die Phase des Trennmittels Easycoll, auf der in einer feinen Schicht die mononukleären Zellen als sog. ‚Interphase‘ lagen. Als oberste Schicht lag das Plasma auf. Plasma, Interphase und Easycoll wurden abpipettiert und verworfen.



**Abbildung 5: Dichtegradientenzentrifugation.**

- a) Phasentrennung beim Überschichten von Easycoll mit Vollblut, verdünnt mit PBS 1:2  
 b) Auftrennung der Blutbestandteile nach Zentrifugation

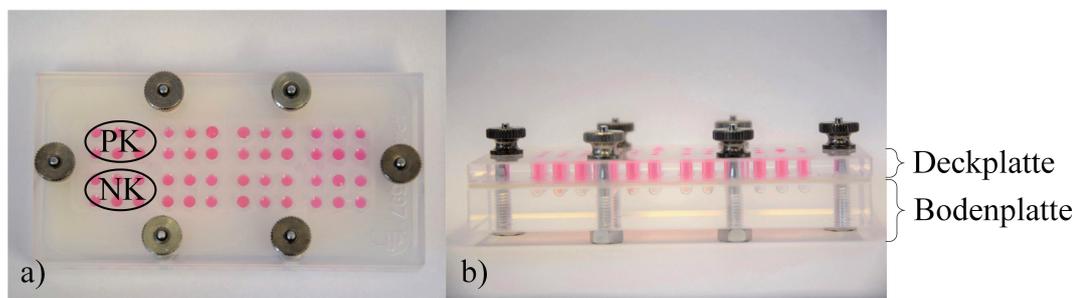
#### Hypotone Erythrozytenlyse

Das PMN-enthaltende Erythrozytensediment wurde mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Die Lyse der Erythrozyten geschah durch Zugabe von 20 ml *Aqua dest.* und Schwenken für 20 s. Mit 20 ml 2xPBS wurde die Lysereaktion gestoppt. Nach Zentrifugation bei 220 xg und 4 °C für 8 min ohne Bremse wurde am Röhrchenboden ein weißes Pellet aus PMN sichtbar. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und der Lyse-Schritt wiederholt. Danach folgte ein Waschschrift: Das Pellet wurde in 20 ml PBS aufgenommen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das PMN-Pellet in 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl der PMN-Suspension wurde in einem automatischen Hämatologiesystem bestimmt, um nachfolgend durch Verdünnen mit Medium eine Zellzahl von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml einzustellen.

#### **2.2.4.2. Transmigrationstest**

Zum Einsatz kam eine 48-Well-Transmigrationskammer mit Boden- und Deckplatte aus Acryl (vgl. Abbildung 6). Die Wells der Bodenplatte wurden mit je 25 – 28  $\mu$ l US-Probe bzw. Positiv- oder Negativkontrolle unter Bildung eines positiven Flüssigkeitsmeniskus beschickt. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes, humanes IL8 (rhIL8) in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet. Die Negativkontrolle bildete der Extraktionspuffer des US (PBS mit 100  $\mu$ g/ml

Aprotinin). Die US-Proben wurden im Doppelansatz eingesetzt. Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils im sechsfachen Ansatz pipettiert. Anschließend wurde die Polycarbonatmembran vorsichtig aufgelegt. Sie bildete im Folgenden den Boden der oberen Wells. Eine darübergelegte Silikonmatte diente der Abdichtung der Wells gegeneinander und verhinderte so ein Ineinanderfließen der Proben. Zuletzt wurde die Deckplatte aufgesetzt und mit Schraubmuttern fixiert. In jedes der oberen Wells wurden 50  $\mu\text{l}$  der PMN-Suspension ( $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und somit etwa 250.000 Zellen pipettiert. Die beschickte Transmigrationskammer inkubierte für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.



**Abbildung 6: Transmigrationskammer in a) Draufsicht und b) Seitenansicht.**

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle

Im Anschluss wurde die Kammer auf Eis gelagert und die Zellsuspension der oberen Wells, welche die nicht gewanderten Zellen beinhaltet, abpipettiert und verworfen. Die Deckplatte wurde gleichzeitig mit der Silikonmatte und der Membran abgenommen. Die Flüssigkeit der unteren Wells wurde resuspendiert, um adhärenente Zellen von der Wand zu lösen. Anschließend wurden 25  $\mu\text{l}$  davon in Reaktionsgefäße mit je 25  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium pipettiert, um das für die Durchflusszytometrie nötige Run-Volumen von 20  $\mu\text{l}$  zzgl. Vorlauf zu erreichen.

#### 2.2.4.3. Durchflusszytometrie und Fluoreszenzfärbung

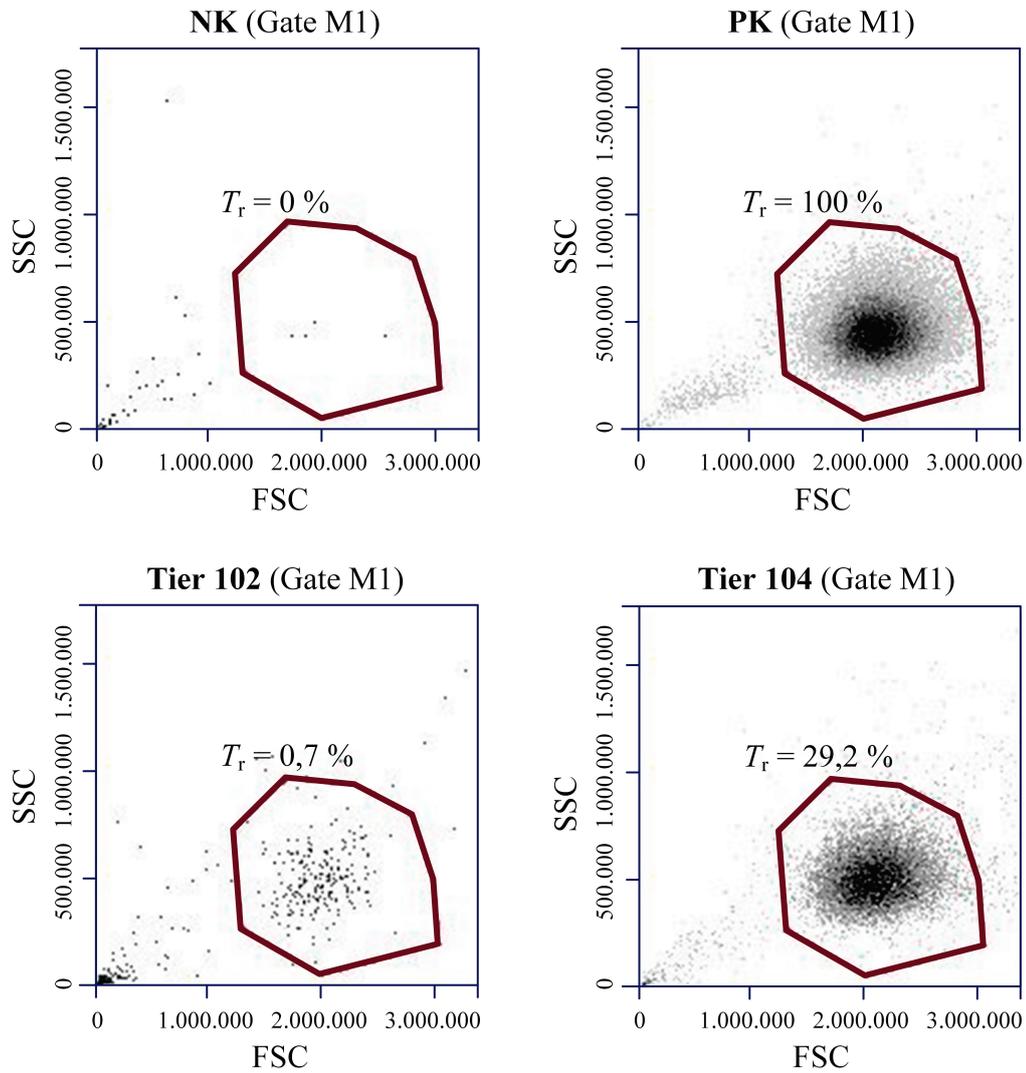
Die Quantifizierung der nach Aktivierung in die unteren Wells gewanderten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Mit Hilfe dieser Methode können sowohl ungefärbte als auch fluoreszenzmarkierte Zellen gezählt und charakterisiert werden (RADBRUCH, 2000). Zur Auswertung der Daten wurde die zum Durchflusszytometer gehörende Software verwendet.

Die Zellsuspensionen der unteren Wells wurden im Flow-System aufgenommen und über sich verjüngende Röhrensysteme zu einer kapillaren Düse geschickt. In

der sog. Durchflusszelle passieren die Einzelzellen einen fokussierten Laserstrahl. Dort werden sie gezählt und das entstehende Streu- und ggf. Fluoreszenz-Licht wird detektiert. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und Komplexität der Zellen: Das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) beschreibt die Beugung des Lichts im stumpfen Winkel und ist abhängig vom Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht (Sideward-Scatter, SSC) bezeichnet die Lichtbrechung im rechten Winkel und wird durch die Granularität der Zellen sowie intrazelluläre Vesikel beeinflusst. Die Zellen des Blutes können so bereits ungefärbt differenziert werden. Zusätzlich können fluoreszenzmarkierte Zellen detektiert werden.

Der Anteil an biologischem Material im eingesetzten US störte die Darstellung der migrierten PMN. Bei diesen kleinen Partikeln geringer Granularität handelte es sich möglicherweise um Schleimbestandteile oder Zelltrümmer des US. Um die PMN dennoch differenziert darzustellen, wurde vor der Messung im Durchflusszytometer eine Fluoreszenzfärbung der Zellsuspensionen durchgeführt. Fluoresceiniso-thiocyanat(FITC)-gekoppelte anti-bovin-CD11b-Antikörper aus der Maus markieren spezifisch Leukozyten. CD11-Moleküle sind Glykoproteine, die als sog. Integrine auf der Oberfläche aller Leukozyten vorkommen. Von den drei verschiedenen CD11-Untergruppen CD11a, CD11b und CD11c tritt v. a. CD11b nach Rekrutierung aus intrazellulären Granula prominent auf der Oberfläche aktivierter PMN auf und vermittelt die Endothel-Adhärenz der Zellen (MAZZONE und RICEVUTI, 1995). Zur Zellsuspension der unteren Wells wurden jeweils 5 µl anti-bovin-CD11b-Antikörper (Konzentration 0,01 mg/ml) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min im Dunkeln wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen. Durch stichprobenartige durchflusszytometrische Charakterisierung von US vor dem Einsatz in der Transmigrationskammer konnte sichergestellt werden, dass keine intakten Zellen (PMN, Epithelzellen) in den US-Proben vorhanden waren, die das Ergebnis hätten verfälschen können.

Zur Auswertung wurden die Ergebnisse als Punktdiagramme dargestellt. Zunächst wurde in der Positivkontrolle anhand der Darstellung von FSC und SSC ein Gate für die PMN erstellt. Die darin befindlichen Zellen wurden nur als ‚Events‘ (gewanderte PMN) gezählt, wenn sie nach CD11b-Markierung in der Fluoreszenz-Darstellung im gesetzten Gate auftauchten (Gate M1, vgl. Abbildung 7). Zur vergleichenden Auswertung verschiedener Messungen wurden gleichbleibende Gates am Durchflusszytometer verwendet. Das Run-Limit wurde auf 20 µl gesetzt.



**Abbildung 7: Darstellung der PMN mittels Durchflusszytometrie.**

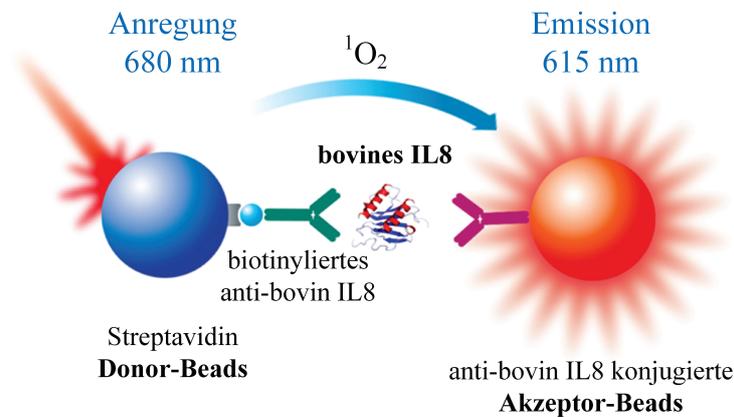
Gezeigt werden Forward-Scatter (FSC) und Sideward-Scatter (SSC) für Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK) sowie für zwei Tiere mit unterschiedlicher relativer Transmigrationsrate  $T_r$  (Tier 102: 0,7 %, Tier 104: 29,2 %). Dabei werden nur die fluoreszenzmarkierten Zellen dargestellt (Gate M1). Der markierte Bereich beinhaltet die gewanderten PMN.

Zur Bewertung des chemotaktischen Potenzials der US untereinander wurde ihre relative Transmigrationsrate  $T_r$  im Verhältnis zur Positivkontrolle rhIL8 (entspricht 100 %-Wert) errechnet. Um Schwankungen innerhalb der eingesetzten PMN-Population zu berücksichtigen, wurde dabei der Mittelwert der sechsfach pipettierten Positivkontrolle jeder Platte verwendet.

$$T_r = \frac{\text{durchschnittliche Events der Probe}}{\text{durchschnittliche Events der Positivkontrolle}} \cdot 100 \quad \text{Formel 5}$$

### 2.2.5. AlphaLISA-Untersuchung

Zum direkten und spezifischen Nachweis verschiedener Biomarker im US wurde die AlphaLISA (Amplified luminescent proximity homogeneous assay - linked immunosorbent assay)-Technologie angewandt. Ihr Prinzip beruht auf der fluo-  
metrisch detektierbaren Energieübertragung zwischen sog. Donor- und Akzeptor-Beads (Kügelchen) nach Bindung des nachzuweisenden Analyten in der Probe.



**Abbildung 8: Darstellung des AlphaLISA-Prinzips am Beispiel IL8.**

Die Anregung von Donor-Beads mit 680 nm führt zur Abspaltung von reaktivem Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Die räumliche Nähe zwischen Akzeptor- und Donor-Beads infolge der Bindung ihrer gekoppelten Antikörper an den Analyten (hier: IL8) ermöglicht die Energieübertragung von  $^1\text{O}_2$  auf Akzeptor-Beads und Emission bei 615 nm (modifiziert nach PERKINELMER (1998))

Werden Donor-Beads mit Licht der Wellenlänge 680 nm angeregt, so führt dies zur Abspaltung von reaktivem Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Diese Sauerstoffmoleküle mit je einem einzelnen angeregten Elektron können sich während ihrer Halbwertszeit von 4  $\mu\text{s}$  über eine Entfernung von 200 nm bewegen. Befinden sich Akzeptor-Beads innerhalb dieser Reichweite, kommt es zur Energieübertragung von Singulett Sauerstoff auf die Akzeptor-Beads und zu einer messbaren Emission bei 615 nm. Sind keine Akzeptor-Beads in räumlicher Nähe, fällt das angeregte Sauerstoffmolekül wieder in seinen Ausgangszustand zurück und kein Signal ist messbar (vgl. Abbildung 8). Im AlphaLISA sind die Beads mit spezifischen Antikörpern gegen die Zielsubstanz gekoppelt. Durch Bindung an in der Probe vorhandenes Antigen wird die für ein messbares Signal notwendige räumliche Nähe zwischen Akzeptor- und Donor-Beads hergestellt. Die Stärke des emittierten Signals bei 615 nm ist proportional zur Menge Analyt in der Probe und kann durch das Mitführen von Standardkurven auf jeder Platte in Konzentrationen umgerechnet werden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wird auf jede Platte ein 12-facher sog. ‚Background‘

pipettiert, bei dem anstelle von Probe Assaypuffer eingesetzt wird. Das Lower Detection Limit (LDL) wird durch Addition des Mittelwerts der Background-Signale mit ihrer dreifachen Standardabweichung und anschließendes Ablesen der zugehörigen Konzentration in der Standardkurve ermittelt. Auf diese Weise wird die Konzentration an Analyt ermittelt, die definitiv vom Hintergrundrauschen, das beispielsweise durch zufällig in gegenseitiger Nähe befindliche Akzeptor- und Donor-Beads entsteht, unterschieden werden kann (PERKINELMER, 1998). Für die statistische Auswertung werden für Proben, bei denen die Konzentrationen der Analyten unterhalb des LDL liegen, jeweils die niedrigsten pipettierten Standardkonzentrationen des jeweiligen Analyten eingesetzt (vgl. Tabelle 8, S. 70).

Als große Vorteile dieser Methode für die Untersuchung von US stellen sich die Möglichkeit der Verwendung sehr kleiner Probenvolumina ab 1 µl sowie die Eignung des Tests für unterschiedlichste Probenqualitäten dar. Darüber hinaus ermöglicht die weite dynamische Range des Tests (4-5 log) die Quantifizierung verschiedener Analyten im bisher noch wenig charakterisierten bovinen US.

Mittels AlphaLISA wurden die Konzentrationen von IL1B, IL6, IL8, IL17A sowie IL10 im US bestimmt. Zur anschließenden rechnerischen Korrektur der Ergebnisse um den Eintrag an Analyten durch Blutkontamination wurden von allen Tieren auch Plasmaproben untersucht. Die Durchführung geschah dabei nach Herstellerangaben auf 384-Well-AlphaPlates, wobei das Protokoll für 2 µl Probenvolumen angewandt wurde. Um kleine Probenvolumina genau zu pipettieren, wurde eine 0,1 – 2,5 µl-Pipette mit dazugehörigen PCR-Spitzen (0,1 – 20 µl) verwendet. Lediglich für IL10 fand das Protokoll für 5 µl Probenvolumen Anwendung, da in Vorversuchen sehr geringe Mengen IL10 im US detektiert wurden. Die Verdünnung der Reagenzien sowie die notwendigen Pipettierschritte werden in IX.3.1.3. beschrieben. Die Standards wurden im Dreifachansatz, die Proben im Doppelansatz pipettiert. Bei Variationskoeffizienten der Doppelwerte von > 10 % wurde die Untersuchung der Proben wiederholt. Die Donor-Beads sind lichtempfindlich und wurden daher unter Abdunkelung mit Filtern pipettiert (< 100 lux) und im Dunkeln inkubiert. Am Mikroplattenreader war die Aufrüstung mit einem Laser für AlphaScreen/AlphaLISA/AlphaPlex notwendig. Folgende Messeinstellungen wurden angewandt: Excitation 680 nm, Emission 615 nm, Excitation time 0,30 s, Integration start 0,36 s, Integration time 0,40 s.

Durch Korrektur der mittels AlphaLISA im US gemessenen Konzentrationen um Verdünnungsfaktor (vgl. III.2.2.2.) und Blutkontamination (vgl. III.2.2.3.) wurde die absolute Konzentration der Zielsubstanz in reinem Uterussektret  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  rechnerisch ermittelt. Der Verdünnungsfaktor wurde wie folgt berücksichtigt:

$$c(\text{US}) = D \cdot c(\text{US}_{\text{verdünnt}}) \quad \text{Formel 6}$$

Dabei beschreibt  $c(\text{US}_{\text{verdünnt}})$  die Konzentration des jeweiligen Analyten im analysierten, verdünnten und blutkontaminierten US,  $D$  den Verdünnungsfaktor nach der Extraktion des US aus dem Merocel-Schwämmchen (vgl. III.2.2.2.) und  $c(\text{US})$  die Konzentration des Analyten im unverdünnten, blutkontaminierten US.

Der rechnerischen Korrektur der Blutkontamination liegt die Überlegung zugrunde, dass  $c(\text{US})$  durch die Analyt-Konzentrationen in reinem US und Plasma sowie die Anteile von Blut und US an der Gesamtprobe bestimmt wird:

$$c(\text{US}) = \frac{\text{US}\%}{100} \cdot c(\text{US}_{\text{calc}}) + \frac{\text{Blut}\%}{100} \cdot c(\text{Plasma}) \quad \text{Formel 7}$$

Dabei stellt  $\text{Blut}\%$  die prozentuale Blutkontamination der US-Probe dar (vgl. III.2.2.3.),  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  die rechnerische Konzentration des Analyten im reinen, unverdünnten US und  $c(\text{Plasma})$  die Konzentration des Analyten im Plasma. Der Anteil an reinem US an der Probe  $\text{US}\%$  ergibt sich als:

$$\text{US}\% = 100 \% - \text{Blut}\% \quad \text{Formel 8}$$

Durch Einsetzen und Umformen lässt sich die Konzentration  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  berechnen.

$$c(\text{US}_{\text{calc}}) = \frac{D \cdot c(\text{US}_{\text{verdünnt}}) - \frac{\text{Blut}\%}{100} \cdot c(\text{Plasma})}{1 - \frac{\text{Blut}\%}{100}} \quad \text{Formel 9}$$

Zur statistischen Auswertung der AlphaLISA-Untersuchungen wurden die rechnerisch ermittelten Konzentrationen  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  verwendet. Lag  $c(\text{US}_{\text{verdünnt}})$  unterhalb des LDL, so wurde auch für  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  die niedrigste pipettierte Standardkonzentration des jeweiligen Analyten eingesetzt.

### 2.3. Zytologische Untersuchung

Die mittels modifiziertem Cytobrush gewonnenen zytologischen Proben des Endometriums wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme auf zwei Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet (vgl. III.1.3.). Im Labor wurden sie gemäß Herstellerangaben mittels Haema-Schnellfärbung gefärbt:

- Objektträger 5 s in Fixierlösung tauchen, abtropfen lassen
- Objektträger 5 s in Färbelösung I (Eosin) tauchen, abtropfen lassen
- Objektträger 5 s in Färbelösung II (Azur) tauchen, abtropfen lassen
- Objektträger mit *Aqua dest.* abspülen, trocknen lassen

Die Beurteilung geschah durch mäanderförmige Begutachtung der Ausstriche am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl. Dabei wurde der prozentuale Anteil der PMN an einer Gesamtzahl von 300 kernhaltigen Zellen (endometriale Epithelzellen und Leukozyten) beurteilt. Die Auswertung von 300 Zellen je Ausstrich zeigte bei Untersuchungen von MELCHER et al. (2014) die größte Genauigkeit und Wiederholbarkeit in der Diagnose subklinischer Endometritiden. Je Tier wurden zwei Objektträger durch zwei bzgl. der Anamnese und klinischen Untersuchung geblindete, für alle Proben gleichbleibende Untersucher beurteilt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der vier erhaltenen Einzelwerte verwendet. Ein Grenzwert von 5 % PMN wurde für die Diagnose der SE angewandt (MADOZ et al., 2013).

### 2.4. Untersuchung der Endometrium-Bioptate

Von jedem Versuchstier wurden zwei Bioptate der uterinen Schleimhaut gewonnen. Eines davon diente der histopathologischen Untersuchung und wurde in 4 % Formalin fixiert. Das zweite Bioptat wurde in RNAlater fixiert und für die molekularbiologische Untersuchung verwendet (vgl. III.1.3.).

#### 2.4.1. Histopathologische Untersuchung

Die Aufbereitung der formalinfixierten Endometrium-Bioptate fand am Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig nach etablierten Routineverfahren statt (MERBACH, 2011; RODENBUSCH, 2011). Die Proben wurden zunächst über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraplast eingebettet. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden ca. 3 – 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Färbung erfolgte mit Hämalaun-Eosin (HE) (MULISCH et al., 2015).

Aufgrund von Besonderheiten des bovinen Endometriums war in HE-gefärbten Präparaten eine eindeutige Differenzierung von endometrialen Stromazellen und Lymphozyten nicht immer möglich: Das Stratum compactum stellt sich dicht und zellreich dar und die Stromazellen erscheinen kompakt, rund und z. T. leicht basophil und damit den Lymphozyten ähnlich. Daher wurde in unklaren Fällen der immunhistochemische Nachweis des T-Lymphozyten-Markers CD3 mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen-anti-human) nach der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung dieser Untersuchung findet sich bei KLOSE (2015).

Die Beurteilung der Proben am Lichtmikroskop nahm Herr Prof. Schoon vom Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig vor. Zur histomorphologischen Einteilung und Graduierung endometrialer Veränderungen fanden am Institut etablierte Verfahren Anwendung (MERBACH, 2011). Dabei wurden vor allem entzündliche Veränderungen beurteilt und nach ihrem Charakter (eitrig, gemischt-zellig, lymphoplasmazellulär) und Grad (angedeutet, gering-, mittel-, hochgradig) kategorisiert (vgl. Abbildung 23, S. 145).

#### **2.4.2. Molekularbiologische Untersuchung**

Die Veränderung ihrer Genexpression stellt die zentrale Reaktionsweise von Zellen auf sich ändernde Bedingungen und Anforderungen dar. Die Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bietet eine Möglichkeit zur Darstellung dieser veränderten Genexpressionsmuster durch den quantitativen Nachweis spezifischer messengerRNA (mRNA). Die mRNA wird nach Extraktion aus Gewebeproben mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Polymerasen und spezifische Primer ermöglichen die Amplifikation umgrenzter cDNA-Abschnitte, die einzelne Gene charakterisieren. Interkalierende Farbstoffe, die nach Anlagerung an doppelsträngige DNA fluoreszieren, machen das PCR-Produkt im Verlauf der Reaktion optisch messbar (HIGUCHI et al., 1993; BUSTIN, 2000). Die Durchführung und Beschreibung der RT-qPCR erfolgte unter Berücksichtigung der MIQE-Guidelines (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) nach BUSTIN et al. (2009). Das Ziel ist, eine hohe Transparenz zur kritischen Evaluation der dargestellten Ergebnisse sicherzustellen sowie die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Untersuchungen zu gewährleisten.

#### **2.4.2.1. RNA-Extraktion aus Endometrium-Biopsaten**

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus den bei -80 °C in RNAlater konservierten Endometrium-Biopsaten wurden Lysetubes mit 2,4 – 2,8 mm Keramik-Beads sowie ein konventionelles RNA Kit verwendet.

Die Proben wurden aufgetaut, zusammen mit je 400 µl Lysepuffer in die Lysetubes überführt und in einem Homogenisator für 2 x 1 min mit 1 min Pause homogenisiert. Ein sich anschließender Zentrifugationsschritt der Lysetubes bei 13.000 xg für 1 min bewirkte, dass noch vorhandene grobe Gewebebestandteile absanken und nicht in die weitere Verarbeitung aufgenommen wurden. Nachfolgend wurde die RNA-Extraktion entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt: Der Überstand der Lysetubes wurde auf eine DNA-bindende Säule übertragen und bei 10.000 xg für 2 min zentrifugiert. Genomische DNA wurde dabei von der Säule gebunden, das Filtrat enthielt die Gesamt-RNA. Letzteres wurde mit 70 % Ethanol versetzt, auf eine RNA-bindende Säule pipettiert und bei 10.000 xg für 2 min zentrifugiert. Dabei wurde die RNA an die Säule gebunden. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500 µl bzw. 700 µl Waschpuffer und jeweils Zentrifugation bei 10.000 xg für 1 min. Dadurch wurde die Reinheit der extrahierten RNA optimiert. Eine Trocken zentrifugation bei 10.000 xg für 2 min sorgte im Anschluss für ein möglichst vollständiges Entfernen des Waschpuffers. Zuletzt wurde die RNA mittels 80 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation bei 6.000 xg für 1 min aus der Säule gelöst und in das Eluat gespült. Dieses Eluat enthielt die Gesamt-RNA der Probe und wurde auf 3 Reaktionsgefäße aufgeteilt, die bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurden. 2 µl wurden für die Bestimmung der RNA-Integrität mit Chip verwendet. 10 µl wurden als Template in die cDNA-Synthese eingesetzt. Das restliche Volumen wurde bei -80 °C asserviert.

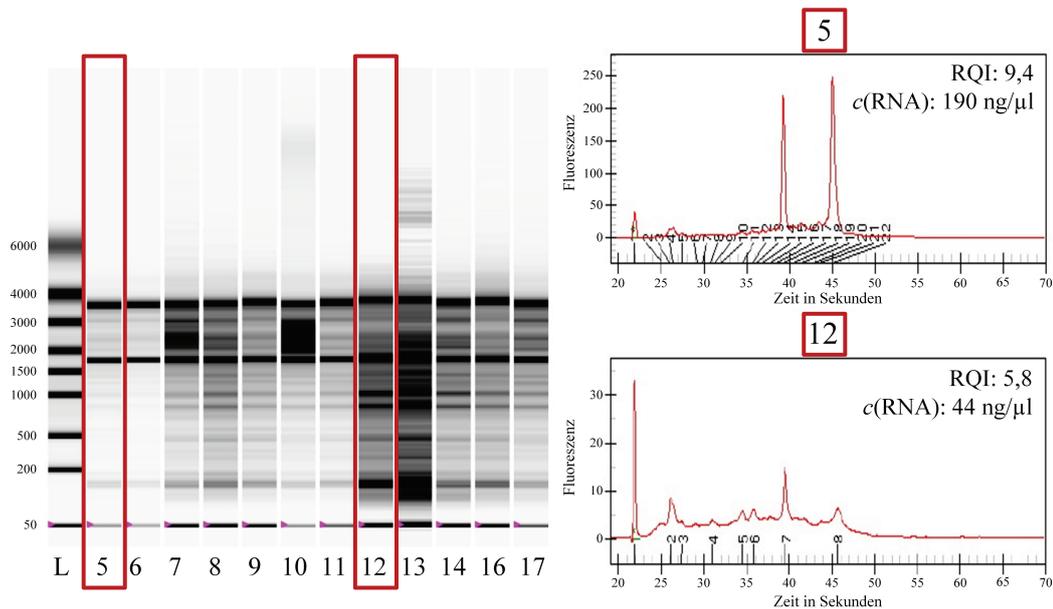
#### **2.4.2.2. Bestimmung der RNA-Integrität und -Konzentration**

Da RNA instabil und empfindlich gegenüber ubiquitär vorkommenden RNAsen ist, fand vor dem weiteren Einsatz der RNA-Proben in der RT-qPCR eine Qualitätssicherung statt (FLEIGE und PFAFFL, 2006). Die Überprüfung der Integrität der extrahierten RNA geschah mittels automatisierter Gelelektrophorese unter Einsatz eines Experion Automated Electrophoresis Systems. Zunächst wurden 2 µl jeder RNA-Probe sowie eine im Experion RNA Analysis Kit mitgelieferte Leiter für 2 min auf 70 °C erhitzt und anschließend für mindestens 5 min auf einem Kühlrack

abgekühlt. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben wurde die Gel-Stain-Solution hergestellt und der RNA StdSens Chip vorbereitet (Beladen mit Gel-Stain-Solution, Priming in der Priming Station, Beladen mit Loading-Buffer). Je 1  $\mu$ l RNA-Probe wurde auf den Chip aufgetragen. Nach Mischen in der Vortex Station wurde der Chip in die Automated Electrophoresis Station eingelegt, die automatisiert die Gelelektrophorese durchführte.

Zur Auswertung der Ergebnisse diente die Experion Software, welche maßgeblich ribosomale RNA (rRNA) beurteilt, da diese mit 85 – 90 % die größte Fraktion der Gesamt-RNA darstellt (vgl. Abbildung 9). Der RNA Quality Index (RQI) beschreibt die Integrität bzw. Degradierung der RNA und wird durch Vergleich der Elektropherogramme der Probe mit denen standardisiert degenerierter RNA ermittelt. Für seine Berechnung wird ein Algorithmus aus den Signalstärken an drei Regionen des Elektropherogramms (28S-, 18S-, pre-18S-Region) gebildet (DENISOV et al., 2008). 28S- und 18S-Peaks erscheinen bei intakter RNA prominent, während bei degradierter RNA 18S- und pre-18S-Regionen in den Vordergrund treten. Der Wertebereich des RQI erstreckt sich von 10 (intakte RNA) bis 1 (hochgradig degradierte RNA). FLEIGE und PFAFFL (2006) bezeichneten Proben mit RQI-Werten größer fünf als gute, größer sieben als perfekte Gesamt-RNA-Qualität. Für die weitere Prozessierung wurden RNA-Proben mit RQI größer fünf verwendet. Neben dem RQI-Wert wurde im Experion System die Konzentration der RNA in ng/ $\mu$ l bestimmt. Eine Verdünnung der Proben auf einheitliche Nukleinsäure-Konzentrationen fand erst nach dem Umschreiben in cDNA statt.

Stichprobenartig wurden einzelne RNA-Proben im Nanophotometer untersucht und der Quotient der *OD* bei Anregung mit 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) bestimmt. Da Nukleinsäuren, Proteine und Phenole unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen (Nukleinsäuren bei 260 nm und Proteine bei 280 nm), wird der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  als Kriterium für die Reinheit von Nukleinsäuren verwendet. Für reine RNA wird ein Wert von über 2,0 angestrebt (GLASEL, 1995). Liegt der Quotient darunter, so spricht dies für eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder Phenolen.



**Abbildung 9: Virtuelles Gel (links) und Elektropherogramme (rechts) einer automatisierten Gelelektrophorese.**

Tier 5 mit hoher RNA-Integrität (RQI 9,4); Tier 12 mit geringerer RNA-Integrität (RQI 5,8). RQI: RNA Quality Index als Maß für die Integrität bzw. Degradierung von RNA, Wertebereich 10 (intakte RNA) bis 1 (hochgradig degradierte RNA); c(RNA): RNA-Konzentration

#### 2.4.2.3. cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Für den Einsatz in der qPCR ist das Umschreiben der RNA in cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) notwendig. Um sicherzustellen, dass von der extrahierten Gesamt-RNA nur die mRNA umgeschrieben wurde, kamen Oligo-dT-Primer zum Einsatz, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA sind. Alle bei der cDNA-Synthese eingesetzten Reagenzien wurden von einem Hersteller bezogen. Als Enzym wurde eine H(-)-Punktmutante der RT verwendet. Der Ansatz wurde gemäß Herstellerangaben im 25  $\mu$ l-Protokoll in RNase- und DNase-freien Reaktionsgefäßen mit 0,2 ml Volumen durchgeführt.

Zunächst wurden 10  $\mu$ l RNA-Probe mit 1  $\mu$ l Oligo-dT-Primer gemischt, im Thermocycler für 5 min auf 70 °C temperiert und anschließend für mindestens 5 min auf einem Kühlrack abgekühlt. Danach wurden jeweils 14  $\mu$ l Mastermix (vgl. IX.3.2.) zu jedem RNA-Oligo-dT-Primer-Gemisch pipettiert und folgendes Temperaturprogramm im Thermocycler durchlaufen:

- 10 min bei 38 °C: Aktivierung der Reversen Transkriptase
- 50 min bei 46 °C: Reverse Transkription
- 15 min bei 70 °C: Enzym-Denaturierung
- 15 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen

Einzelne RNA-Proben wurden darüber hinaus mit einem Mastermix ohne Zusatz von RT umgeschrieben (-RT). Sie dienen in der anschließenden qPCR als zusätzliche ‚Negativkontrollen‘ zum Ausschluss möglicher Kontaminationen mit genomischer DNA.

#### **2.4.2.4. Konzentrationsbestimmung der cDNA**

Nach Abkühlen der cDNA-Proben auf Raumtemperatur wurde durch Messung ihrer *OD* bei 260 nm am Nanophotometer eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Anschließend wurden die cDNA-Proben mit RNase-freiem Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 200 ng/μl eingestellt. Zur Beurteilung der Reinheit der cDNA-Proben wurde der Quotient A260/A280 bestimmt (vgl. III.2.4.2.2.). Ein Wert von mindestens 1,8 wird für reine DNA angestrebt (GLASEL, 1995). Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -20 °C tiefgefroren.

#### **2.4.2.5. Quantitative real-time PCR**

Die qPCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR und ermöglicht neben der Amplifikation auch die Quantifizierung von DNA-Molekülen. Der Reaktionsansatz, der neben der DNA-Probe Primer, Desoxyribonukleotide (dNTPs) sowie das Enzym Polymerase enthält, durchläuft dabei im Thermocycler 40 – 50 Zyklen aus jeweils drei Reaktionsschritten:

- Denaturierung: Durch Erhitzen auf 95 °C wird der bestehende DNA-Doppelstrang aufgebrochen.
- Annealing: Durch Absenken der Temperatur auf 55 °C bis 65 °C (primerabhängig) kommt es zur spezifischen Primeranlagerung an die DNA-Einzelstränge.
- Extension: Am Temperaturoptimum der DNA-Polymerase von 72 °C findet die Amplifikation des komplementären Strangs am 3‘-Ende der Primer statt.

Im Gegensatz zur konventionellen PCR wird bei der qPCR durch den Einsatz interkalierender Farbstoffe wie SYBR Green, die nach Anlagerung an doppelsträngige DNA fluoreszieren, das PCR-Produkt in Echtzeit optisch messbar und dadurch quantifizierbar gemacht. Daher findet nach jedem Zyklus eine fluorometrische Messung des Reaktionsansatzes zur Quantifizierung der vorhandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle statt. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge doppelsträngiger DNA und zeigt einen typischen Verlauf über die Zykluszahl, da sich die Menge vorhandener DNA bei einer

Reaktionseffizienz von 100 % in jedem Zyklus verdoppelt: In den ersten Zyklen tritt in der Regel kein messbares Signal auf. In Abhängigkeit von der ursprünglich in der Probe vorhandenen Menge Target-spezifischer DNA zeigt sich ab einer bestimmten Zykluszahl ein zunächst exponentieller Anstieg der Fluoreszenz, der über einen linearen Abschnitt in eine Plateauphase übergeht, in der im Reaktionsansatz essentielle Komponenten wie Primer oder dNTPs für eine weitere Amplifikation nicht mehr ausreichend verfügbar sind. Die Zykluszahl, an der die Fluoreszenz einen definierten Grenzwert übersteigt und in die exponentielle Phase übergeht, wird als  $C_t$ -Wert (cycle threshold, auch  $C_q$ -Wert, quantification cycle) bezeichnet. Der  $C_t$ -Wert ist abhängig von der ursprünglich in der Probe vorhandenen Menge spezifischer DNA und stellt somit ein Maß für die in der Ausgangsprobe vorhandene Menge Target-spezifischer mRNA dar (KUBISTA et al., 2006). Die Amplifikationskurven der Proben und Standards zeigen in der Regel einen parallelen Verlauf, weshalb die exakte Lage des Grenzwerts innerhalb einer Platte für die Beurteilung nicht ausschlaggebend ist.

Nach Abschluss der qPCR kann durch schrittweises Erhitzen des PCR-Produkts und fluorometrische Bestimmung dessen Schmelztemperatur ermittelt werden. Bei Erreichen dieser Temperatur brechen die Doppelstränge der Zielsequenz auf und es kommt zu einem sprunghaften Abfall der Fluoreszenz. Der Vergleich der ermittelten, spezifischen Schmelztemperatur mit einem Erwartungswert, der anhand der Nukleotidsequenz des Targets bestimmt wird, dient als Kontrolle, ob spezifisch die Zielsequenz amplifiziert wurde.

Die absolute Quantifizierung der PCR-Produkte wird durch das Mitführen einer Standardkurve des jeweiligen Targets möglich. Definierte Verdünnungen aufgereinigter Plasmide, welche die Zielsequenz enthalten, durchlaufen die qPCR zusammen mit den Proben. Durch Auftragen ihrer  $C_t$ -Werte gegen ihre logarithmierten Konzentrationen wird die Standardkurve entwickelt, an der die Kopienzahlen der Proben in der Einheit Kopien/ $\mu$ l abgelesen werden können. Auf jeder Platte wurde eine Standardkurve mit fünf Standardpunkten definierter Konzentrationen ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l) mitgeführt.

Für die Endometrium-Biopsate wurde die Genexpression der Zytokine IL1B, IL6, IL8, IL10 und TNF $\alpha$ , der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2) sowie des antimikrobiellen Peptids S100A9 untersucht. Hierfür wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Primer eingesetzt. Informationen zur Lage der Primer im jeweiligen

Gen sowie zu ihrer Schmelztemperatur sind im Anhang dieser Arbeit zu finden (vgl. Tabelle 15, S. 141). Die Primer wurden durch biomers.net (Ulm) und eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

**Tabelle 1: Primer-Sequenzen für die RT-qPCR.**

<b>Gen</b>	<b>for- und rev-Primer (5' → 3')</b>	<b>bp</b>	<b>Referenz</b>	<b>Acc. No.</b>
<b>IL1B</b>	for TTCTCTCCAGCCAACCTTCATT rev ATCTGCAGCTGGATGTTTCCAT	198	NEUVIAN S et al. (2004)	M35589
<b>IL6</b>	for GGAGGAAAAGGACGGATGCT rev TCTGCGATCTTTTGCTTCAGGAT	195	HILLMER (2018)	NM_1739 23.2
<b>IL8</b>	for CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA rev GGCCCACTCTCAATAACTCTC	189	YANG et al. (2008)	NM_1739 25
<b>IL10</b>	for TGACTIONTAAAGGGTTACCTGGGTT rev GCTTCTCCCCAGTGAGTTC	131	HILLMER (2018)	NM_1740 88
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	for CTCTGCCTGCTGCACTTCG rev GAGTTGATGTCGGCTACAACG	156	YANG et al. (2008)	NM_1739 66
<b>PTGS2</b>	for CTCTTCCTCCTGTGCCTGAT rev CTGAGTATCTTTGACTGTGGGAG	359	ODAU et al. (2006)	AF03169 8
<b>S100A9</b>	for GGCTAGGGCACTATGACAC rev GGCCACCAGCATAATGAAC	179	LIND et al. (2015)	NM_0010 46328

RT-qPCR: Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR; for: forward-Primer; rev: reverse-Primer; bp: Länge des Amplikons in Basenpaaren; Acc. No.: Zugangsnummer zur Nukleotid-Sequenz in der National Center for Biotechnology Information (NCBI)-Datenbank

Die qPCR wurde unter Verwendung eines handelsüblichen PCR Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach dem Auftauen wurden Primer, Standards und Proben unter Rütteln für 5 min auf 60 °C erhitzt, um an den Reaktionsgefäßen adhären DNA zu lösen. Der Mastermix (vgl. IX.3.2.) wurde an einem isolierten Arbeitsplatz pipettiert. In einer transparenten 96-Well PCR-Platte wurden jeweils 19  $\mu$ l/Well Mastermix vorgelegt und anschließend je 1  $\mu$ l/Well cDNA-Probe (200 ng/ $\mu$ l), Standard oder RNase-freies Wasser als Negativkontrolle (NTC) zugegeben. Die cDNA-Proben wurden dabei im Doppelansatz, die Standards und NTCs im Dreifachansatz pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer transparenten PCR-Folie abgeklebt, kurz zentrifugiert und in den Thermocycler eingesetzt. Die qPCR wurde als zweistufige Reaktion durchgeführt (vgl. Tabelle 2). Lediglich für das Gen PTGS2 wurde ein dreistufiges Protokoll angewandt (vgl. Tabelle 3).

**Tabelle 2: Temperaturprotokoll der zweistufigen qPCR (IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , S100A9).**

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Funktion
1	95 °C	2 min	Aktivierung der Polymerase
40	95 °C	5 s	Denaturierung der Doppelstränge
	60 °C	15 s	Primeranlagerung und Extension
	fluorometrische Bestimmung		

Schmelzkurve: Aufheizen in 0,5 °C-Schritten von 60 – 95 °C

qPCR: quantitative real-time PCR; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine

**Tabelle 3: Temperaturprotokoll der dreistufigen qPCR (PTGS2).**

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Funktion
1	95 °C	2 min	Aktivierung der Polymerase
40	95 °C	5 s	Denaturierung der Doppelstränge
	60 °C	10 s	Primeranlagerung
	72 °C	15 s	Extension
	fluorometrische Bestimmung		

Schmelzkurve: Aufheizen in 0,5 °C-Schritten von 60 – 95 °C

qPCR: quantitative real-time PCR; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2

Zur Beurteilung der Qualität jedes qPCR-Laufs wurden mit Hilfe der Software TOptical Effizienz und Bestimmtheitsmaß der Standardkurve, Verhalten der Negativkontrollen sowie Schmelztemperatur und -kurve des PCR-Produkts analysiert. Lag die Effizienz der Standardkurve oder ihr Bestimmtheitsmaß außerhalb der Referenzwerte (90 % - 110 % bzw.  $>0,985$ ), blieb keine der NTCs negativ oder wurde nicht die Target-spezifische Schmelztemperatur gemessen, so wurde die Untersuchung der Platte wiederholt. Proben wurden erneut untersucht, wenn die Standardabweichung im Doppelansatz mehr als 0,7 Zyklen betrug.

## 2.5. Bakteriologische Untersuchung

Bei jedem Versuchstier wurden von zwei unterschiedlichen Quellen Proben für die bakteriologische Untersuchung gewonnen, mit denen jeweils die Hälfte eines Schafblut-Agars beschickt wurde: Zum einen wurde das Cytobrush nach dem Ausstreichen auf zwei sterilen Objektträgern über die Hälfte eines Schafblut-Agars gerollt (BU<sub>cyto</sub>, vgl. III.1.3.). Zum anderen wurde der Filtereinsatz nach Extraktion des US aus dem Merocel-Schwämmchen beprobt (BU<sub>filter</sub>, vgl. III.2.2.1.).

### 2.5.1. Kultivierung

Die bakteriologischen Proben wurden für 48 Stunden bei 37 °C auf Schafblut-Agar kultiviert, wobei nach 24 Stunden eine vorläufige Beurteilung stattfand. Die Differenzierung von bakteriologisch positiven und kontaminierten Proben erfolgte nach folgenden Kriterien:

Als bakteriologisch positive Proben galten

- Proben, bei denen sowohl in BU<sub>cyto</sub> als auch in BU<sub>filter</sub> morphologisch identisches Wachstum auftrat mit jeweils mindestens fünf koloniebildenden Einheiten (CFU) von maximal zwei unterschiedlichen Kolonie-Morphologien, sowie
- Proben, bei denen nur in BU<sub>cyto</sub> Monokulturen mit mindestens fünf CFU wuchsen.

Alle anderen Proben mit Koloniewachstum wurden als kontaminiert angesehen:

- Proben, bei denen in BU<sub>cyto</sub> und/oder BU<sub>filter</sub> jeweils weniger als 5 CFU von bis zu zwei unterschiedlichen Kolonie-Morphologien wuchsen,
- Proben, bei denen in BU<sub>cyto</sub> und/oder BU<sub>filter</sub> mehr als zwei unterschiedliche Kolonie-Morphologien auftraten,
- Proben, bei denen nur in BU<sub>cyto</sub> Mischkulturen wuchsen, sowie
- Proben, bei denen nur in BU<sub>filter</sub> Koloniewachstum vorkam.

Von den bakteriologisch positiven Proben wurden durch Übertragen einzelner Kolonien auf neue Schafblut-Agarplatten und Bebrütung bei 37 °C für 24 h Reinkulturen gezogen, die anschließend bis zur weiteren Differenzierung in Cryo-Tubes bei -80 °C asserviert wurden.

### 2.5.2. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Spezies-Differenzierung der bakteriologisch positiven Proben wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix-assisted laser desorption time-of-flight) durchgeführt. Dabei werden die Proteomprofile der identifizierten Proben mit denjenigen hinterlegter Profile verglichen. Eine Software gibt einen Score Value als Grad für die Kongruenz beider wider. Die ermittelten Speziesangaben sind anhand von Wachstumseigenschaften, Score Values sowie der Differenz zum nächstniedrigeren Taxon zu überprüfen.

Die bis zur Differenzierung in Cryo-Tubes bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asservierten Reinkulturen wurden auf Schafblut-Agarplatten ausgestrichen und 24 h lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Bei Raumtemperatur wurden sie in das Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, transportiert. Dort wurde für jede Probe eine Einzelkolonie auf eine Markierung am Stahl-Target aufgetragen, mit 1 bis  $2\ \mu\text{l}$  70 % Ameisensäure überschichtet und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden 1 bis  $2\ \mu\text{l}$  Matrix mit Zimtsäure (14 mg alpha-Cyano-4-hydroxymimtsäure in 1 ml organischem Lösungsmittel (je 1 ml:  $500\ \mu\text{l}$  Acetonitril,  $475\ \mu\text{l}$  *Aqua dest.*,  $25\ \mu\text{l}$  Trifluoressigsäure)) aufgetragen und das Target erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Die so erstellten Präparate wurden in einem Microflex LT Bruker gemessen. Die automatisierte Auswertung geschah mit Hilfe von MALDI Biotyper 2.0 SR1 unter Verwendung der Spektren Bruker Taxonomy, SR Taxonomy sowie institutseigener Spektren.

Bei der Ergebnisinterpretation sind einige Kriterien zur berücksichtigen: Die Ausgangskolonie und das Ergebnis der Identifizierung müssen auf Plausibilität geprüft werden. Nach der Vorgabe der Auswertungssoftware führen Score Values von

- 2,300 – 3,000 zu hoch wahrscheinlicher Speziesidentifikation,
- 2,000 – 2,299 zu wahrscheinlicher Spezies- und hoch wahrscheinlicher Genusidentifikation,
- 1,700 – 1,999 zu unsicherer Spezies- und wahrscheinlicher Genusidentifikation,
- 0,000 – 1,699 zu nicht zuverlässiger Identifikation.

Ferner ist auch der Abstand der Score Values der erst- zu den nächstgenannten Taxa in der Differenzierungsliste bedeutend. Ein Abstand von größer 0,300 zum nächsten Taxon spricht für eine eindeutige Identifizierung des erstgenannten Taxons. Die Ergebnisinterpretation wurde durch Herrn Dr. Wolf vom Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, durchgeführt.

### **3. Auswertung der Daten**

#### **3.1. Gruppeneinteilung der Versuchstiere**

Die beschriebene klinische Untersuchung und endometriale Probenentnahme ermöglichte die Diagnose der subklinischen Endometritis (SE) anhand der klinischen Untersuchung sowie der etablierten Laborverfahren Zytologie und Histopathologie. Gleichzeitig konnte Uterussekret (US) als neuartige Probenqualität gewonnen und seine Eignung in der Diagnostik der SE untersucht werden. Die beprobten Tiere wurden nach ihrer Gebärmuttergesundheit in Gruppen kategorisiert. Bei den gebärmuttergesunden Tieren fand zusätzlich eine Einteilung nach dem Vorkommen endometrialer Lymphfollikel sowie dem Zyklusstand statt. Entsprechend dieser Gruppeneinteilungen wurden die Ergebnisse der Untersuchungen an US sowie der molekularbiologischen Beurteilung der Endometrium-Bioptate vergleichend ausgewertet.

##### **3.1.1. Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln**

Anhand der Ergebnisse aus der klinischen, zytologischen und histopathologischen Untersuchung wurden die beprobten Tiere nach ihrer Gebärmuttergesundheit einer der drei Gruppen keine Endometritis (E.NEG), subklinische Endometritis (SE) und klinische Endometritis (KE) zugeteilt. Tiere mit SE wurden nach ihrem Positivbefund in der Diagnostik weiter unterteilt in SE(cyto+histo), SE(cyto) und SE(histo). Im Folgenden wird nur in der Zytologie nachweisbare SE mit ‚zytologische Endometritis‘ angesprochen, während lediglich in der Histopathologie detektierbare SE als ‚histologische Endometritis‘ bezeichnet wird. ‚Klinisch-positiv‘ (Klin+) Tiere zeigten vaginoskopisch sichtbaren mukopurulenten oder purulenten Scheidenausfluss. ‚Zytologisch-positiv‘ (Cyto+) wurde definiert als ein PMN-Anteil von mindestens 5 % im endometrialen Cytobrush-Abstrich. Als ‚histopathologisch-positiv‘ (Histo+) wurden Tiere bezeichnet, in deren Bioptat Anzeichen einer Entzündung zu detektieren waren. Daneben traten in der histopathologischen Untersuchung Lymphfollikel (Fol) im endometrialen Stroma auf. In einer weiteren Fragestellung wurden daher gebärmuttergesunde Tiere in jene mit Lymphfollikeln (LF+) und jene ohne Lymphfollikel (LF-) untergliedert (vgl. Tabelle 4).

**Tabelle 4: Gruppeneinteilungen nach Gebärmuttergesundheit.**

		<b>Klin</b>	<b>Cyto</b>	<b>Histo</b>	<b>Fol</b>
<b>E.NEG</b>	<b>LF-</b>	-	-	-	-
	<b>LF+</b>	-	-	-	+
<b>SE(cyto+histo)</b>		-	+	+	+/-
<b>SE(cyto)</b>		-	+	-	+/-
<b>SE(histo)</b>		-	-	+	+/-
<b>KE</b>		+	+)*)	+)*)	+/-

Dargestellt ist das Schema zur Einteilung der Versuchstiere in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit. Klin: klinischer Befund (,+': vaginoskopisch detektierbarer mukopurulenter oder purulenter Scheidenausfluss); Cyto: zytologischer Befund (,+': PMN-Anteil  $\geq 5\%$  im endometrialen Abstrich); Histo: histopathologischer Befund (,+': Anzeichen einer Entzündung im Biopat); Fol: Vorkommen endometrialer Lymphfollikel (,+': endometriale Lymphfollikel histopathologisch nachweisbar); E.NEG: Tiere ohne Endometritis; LF-: gebärmuttergesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärmuttergesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind; SE: subklinische Endometritis; SE(cyto+histo): Tiere mit SE, die in Histopathologie und Zytologie nachweisbar ist; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; KE: Tiere mit klinischer Endometritis; \*) Die Diagnose KE wurde gestellt, sofern das Tier neben dem klinischen Befund auch in der zytologischen und/oder histopathologischen Untersuchung Entzündungscharakteristika aufwies.

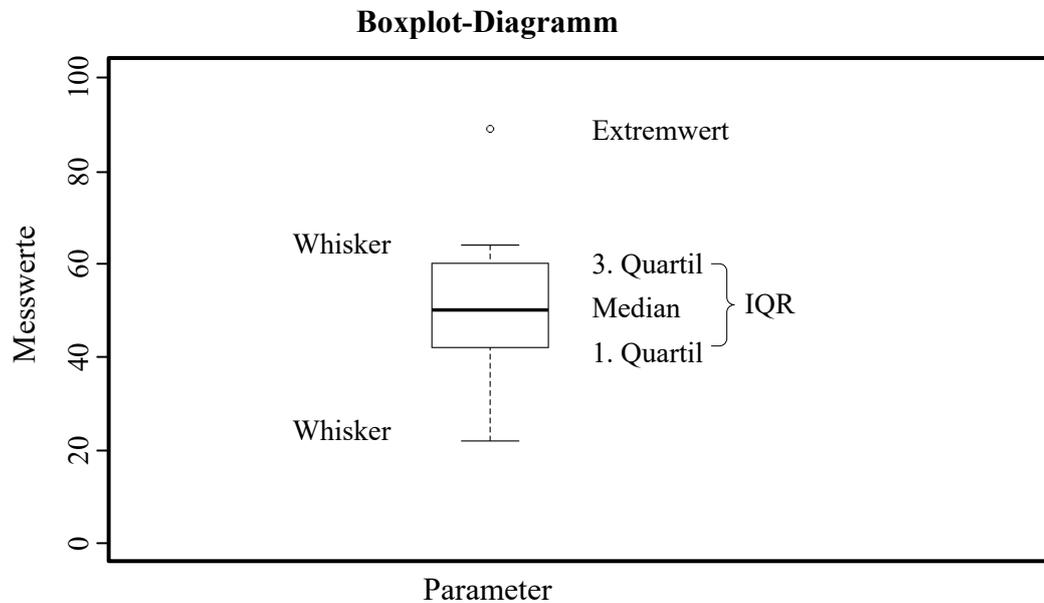
### 3.1.2. Gruppeneinteilung nach Zyklusstand

Eine Auswertung der untersuchten Parameter im Verlauf des Sexualzyklus fand innerhalb der gebärmuttergesunden Tiere statt. Als Kriterium zur Beurteilung des Zyklusstands wurde der Ovarbefund in der sonographischen Untersuchung herangezogen. Die Lutealphase wurde definiert als das Vorhandensein eines Gelbkörpers mit einem Durchmesser von mindestens 2 cm in der sonographischen Darstellung. Als Follikelphase wurde das Fehlen eines Gelbkörpers neben dem fakultativen Auftreten von Follikeln mit einem maximalen Durchmesser von 2 cm im Ultraschallbild gewertet. Tiere mit Zystischen Ovarfollikeln (Follikel-Theka-Zysten, Follikel-Lutein-Zysten) sowie unklarem Zyklusstand wurden von der Auswertung ausgenommen.

### 3.2. Statistische Analyse

Die Datenerhebung erfolgte in Microsoft Excel. Die deskriptive und induktive statistische Datenanalyse wurde mit der Software R-Studio (Version 1.0.136) durchgeführt, welche eine Benutzeroberfläche für die frei zugängliche Programmiersprache R (Version 3.3.2) bietet (R CORE TEAM, 2016). Neben der Durchführung statistischer Tests und der Erstellung von Grafiken ist damit die schlüssige Dokumentation der Auswertungen möglich. Zur deskriptiven Analyse

der Daten wurden Median, 1. und 3. Quartil sowie Boxplot-Diagramme verwendet (vgl. Abbildung 10). Die den Diagrammen zugrunde liegenden Messwerte sowie exakte p-Werte der unten beschriebenen statistischen Tests sind tabellarisch zusammengefasst im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (IX.6., ab S. 146).



**Abbildung 10: Beispiel eines Boxplot-Diagramms.**

Die Box (Interquartilsabstand IQR) umschreibt 50 % der Messwerte. Ihre untere Begrenzung bildet das 1. Quartil bzw. 25 %-Quantil, ihre obere Begrenzung bildet das 3. Quartil bzw. 75 %-Quantil. Der Querstrich in der Box stellt den Median dar. Die Whiskers reichen beim Boxplot-Diagramm nach Tukey bis zu den minimalen und maximalen Messwerten, die innerhalb von  $1,5 \cdot \text{IQR}$  vom 1. bzw. 3. Quartil entfernt liegen. Werte, die sich außerhalb dieses Abstands befinden, werden gesondert als  $^{\circ}$  dargestellt (Extremwert).

Die induktive Statistik erfordert zunächst die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung, welche mit dem Shapiro-Wilk-Test durchgeführt wurde. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) lautete ‚Die Daten sind normalverteilt‘. Die Daten aus Transmigrationstest, AlphaLISA und RT-qPCR sowie die verschiedenen Fruchtbarkeitskennzahlen ergaben sich als nicht normalverteilt, weshalb zur weiteren Auswertung nichtparametrische Testverfahren Anwendung fanden (HEDDERICH und SACHS, 2015).

Zum Vergleich der Untersuchungsergebnisse aus Transmigrationstest, AlphaLISA und RT-qPCR sowie der Fruchtbarkeitskennzahlen zwischen den drei Gruppen E.NEG, SE(cyto) und SE(histo) wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test angewandt, um die drei Gruppen übergreifend auf signifikante Unterschiede hin zu untersuchen. Ergaben sich dabei Unterschiede, so wurde anschließend ein Post-hoc-Test zum paarweisen Vergleich der Gruppen durchgeführt. Hierzu wurde der

Mann-Whitney-U-Test (auch Wilcoxon-Rangsummentest) zum Vergleich der Mediane zweier Gruppen eingesetzt.  $H_0$  lautete ‚Die Mediane der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander‘ (HEDDERICH und SACHS, 2015).

Der Einfluss von Zyklusstand und Vorkommen endometrialer Lymphfollikel auf die Ergebnisse von Transmigrationstest, AlphaLISA, RT-qPCR und Fruchtbarkeit wurde innerhalb der gebärmuttergesunden Tiere untersucht. Dazu wurden statistische Vergleiche der Parameter zwischen Tieren ohne und mit Lymphfollikeln bzw. zwischen Tieren in Follikel- und Lutealphase mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (HEDDERICH und SACHS, 2015). Analog wurde bei der Beurteilung einer möglichen Auswirkung der Probenentnahme auf die Fruchtbarkeit der Tiere vorgegangen.

Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 5 % festgelegt. Bei dessen Unterschreiten wurde  $H_0$  abgelehnt. Folgendermaßen wurden die p-Werte kategorisiert:

- $0,05 \leq \text{p-Wert} < 0,1$ : Tendenz (+)
- $0,01 \leq \text{p-Wert} < 0,05$ : signifikantes Ergebnis (\*)
- $0,001 \leq \text{p-Wert} < 0,01$ : hoch signifikantes Ergebnis (\*\*)
- $p < 0,001$ : höchst signifikantes Ergebnis (\*\*\*)

Durch multiple paarweise Vergleiche bei der Auswertung nach Gebärmuttergesundheit (E.NEG/SE(cyto); E.NEG/SE(histo); SE(cyto)/SE(histo)) kommt es zu einer Kumulierung der Alpha-Fehler. Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, Unterschiede zwischen den Gruppen irrtümlich als statistisch signifikant zu beurteilen. Deshalb ist eine Anpassung des Signifikanzniveaus erforderlich, um das globale Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  zu erhalten. Hierzu fand die Bonferroni-Korrektur Anwendung (HEDDERICH und SACHS, 2015). Das korrigierte Signifikanzniveau ergibt sich als  $\alpha/n$ , wobei  $n$  die Anzahl der paarweisen Vergleiche beschreibt. Für  $n = 3$  galt daher nach Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05/3 = 0,0167$  sowie folgende Kategorisierung:

- $0,0167 \leq \text{p-Wert} < 0,0333$ : Tendenz (+)
- $0,0033 \leq \text{p-Wert} < 0,0167$ : signifikantes Ergebnis (\*)
- $0,0003 \leq \text{p-Wert} < 0,0033$ : hoch signifikantes Ergebnis (\*\*)
- $p < 0,0003$ : höchst signifikantes Ergebnis (\*\*\*)

## **IV. ERGEBNISSE**

Ein Teil der durchgeführten Untersuchungen diente der Gruppeneinteilung der Versuchstiere bzgl. der Gebärmuttergesundheit, dem Vorkommen endometrialer Lymphfollikel und dem Zyklusstand nach etablierten Verfahren (klinische, zytologische, histopathologische Untersuchung). Das chemotaktische Potenzial und der Interleukin-Gehalt von Uterussektret (US) sowie die Genexpression in endometrialem Gewebe wurden vergleichend zwischen den gebildeten Gruppen ausgewertet.

### **1. Versuchstiere und Probenentnahme**

#### **1.1. Beschreibung der Versuchstiere**

Die Probenentnahme aus der Gebärmutter wurde zwischen April 2016 und April 2017 bei 108 Kühen der Versuchsherde durchgeführt. Dabei wurden 58 Kühe der Rasse Fleckvieh, 38 Kühe der Rasse Braunvieh, sechs Kühe der Rasse Rotbunte sowie sechs Kühe aus Kreuzungen der genannten Rassen beprobt. Ihre Beprobung fand zwischen 43 und 62 Tagen p.p. und im Mittel in ihrer dritten Laktation (Min.: 1, Max.: 7) statt. Die mittlere Milchleistung der beprobten Kühe betrug 40,8 kg/Tag (Min.: 20,6 kg/Tag, Max.: 56,3 kg/Tag).

#### **1.2. Anwendbarkeit des Probenentnahmegärts *in vivo***

Die in III.1.3. beschriebene Untersuchung und Beprobung der Tiere im Versuchsbetrieb erwies sich als gut durchführbar. Dank der geringen Abmessungen des Arbeitskanals des Probenentnahmegärts mit 4,0 mm Außendurchmesser war auch bei diöstrischen Tieren die Passage des Gebärmutterhalses zur intrauterinen Beprobung möglich. Je Tier war ein Zeitaufwand von insgesamt etwa 15 Minuten für die vaginoskopische, rektale manuelle und sonographische Untersuchung sowie die Probenentnahme aus der Gebärmutter notwendig. Da alle vorgestellten Versuchstiere bei gutem Allgemeinbefinden waren und keine klinischen Anzeichen einer Allgemeinerkrankung zeigten, war kein Ausschluss von Tieren nach den Abbruchkriterien des Tierversuchsantrags indiziert (vgl. Abbildung 21, S. 143). Die Kühe tolerierten die Manipulation und Probengewinnung i. d. R. sehr gut, standen ruhig im Fressfanggitter und fraßen oder kauten wieder. Bei zwei Tieren wurde die transrektale Sonographie als letzte Untersuchungseinheit wegen zunehmender Wehrhaftigkeit bzw. starker Kontraktionen des Rektums vorzeitig abgebrochen.

### 1.3. Einfluss der Probenentnahme auf die Fruchtbarkeit

Um zu beurteilen, ob die Probengewinnung im Rahmen des durchgeführten Tierversuchs die Fruchtbarkeit der Kühe beeinflusste, wurden relevante Fruchtbarkeitsparameter erfasst, die zunächst kurz erläutert werden. Der Besamungsaufwand (auch ‚Trächtigkeitsindex‘) ist der Quotient aus der Gesamtzahl notwendiger Belegungen bei den tragenden Tieren und der Anzahl tragender Tiere. Dagegen stellt der Besamungsindex den Quotienten aus der Anzahl an Belegungen bei allen Tieren und der Anzahl tragender Tiere der Herde dar. Als Erstbesamungserfolg gilt der Quotient aus der Anzahl tragender Kühe nach Erstbesamung und der Anzahl an Erstbesamungen. Die Güstzeit beschreibt das Intervall von der Kalbung bis zum ersten Tag der darauffolgenden Trächtigkeit. Die Verzögerungszeit bezeichnet den Zeitraum zwischen erster Belegung nach der letzten Kalbung und erstem Tag der neuen Trächtigkeit (HOEDEMAKER et al., 2014). Diese Parameter wurden vergleichend zwischen beprobten und nicht beprobten Tieren der Versuchsherde ausgewertet sowie für die gesamte Herde an zwei Erfassungszeitpunkten zu Beginn und nach Ende des Tierversuchs analysiert.

#### 1.3.1. Fruchtbarkeitskennzahlen beprobter und nicht beprobter Tiere

Von 108 beprobten postpartalen Kühen gingen 13 vor Etablierung der nächsten Trächtigkeit aus dem Bestand ab. Gründe dafür waren u. a. geringe Milchleistung, Probleme an Euter oder Fundament sowie bei einem Tier Mängel in der Fruchtbarkeit. Somit standen nach Versuchsende Fruchtbarkeitskennzahlen von 95 beprobten Kühen zur Verfügung, die mit 45 zum Versuchsende trächtigen, nicht beprobten Kühen verglichen wurden. Dabei ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für Besamungsaufwand sowie Güst- und Verzögerungszeit zwischen beprobten und nicht beprobten Kühen feststellen ( $p \geq 0,05$ ; vgl. Tabelle 16, S. 146). Der Besamungsaufwand betrug in beiden Gruppen im Median eine KB (Mittelwert ‚nicht beprobt‘: 1,9; Mittelwert ‚beprobt‘: 1,6). Die Güstzeit lag im Median bei 95 und 96 Tagen bei nicht beprobten bzw. beprobten Tieren und die mediane Verzögerungszeit war in beiden Gruppen null Tage (Mittelwert ‚nicht beprobt‘: 29 Tage; Mittelwert ‚beprobt‘: 17 Tage).

#### 1.3.2. Fruchtbarkeitskennzahlen der Versuchsherde zu Beginn und nach Ende des Versuchszeitraums

Fruchtbarkeitsparameter der gesamten Herde wurden zu Beginn (31.05.2016) und nach Ende des Probenentnahmezeitraums (02.05.2017) erfasst und vergleichend

ausgewertet. Die Auswertung ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Beginn und Ende des Versuchszeitraums für Besamungsaufwand, Güst- und Verzögerungszeit der zum jeweiligen Erfassungstermin trächtigen Kühe ( $n(\text{Beginn}) = 110$ ,  $n(\text{Ende}) = 102$ ;  $p \geq 0,05$ ; vgl. Tabelle 17, S. 146). Der Median des Besamungsaufwands lag in beiden Gruppen bei einer KB (Mittelwert ‚Beginn‘: 1,9; Mittelwert ‚Ende‘: 1,7). Die Güstzeit betrug 93 und 95 Tage zu Beginn bzw. nach Ende des Versuchszeitraums und die mediane Verzögerungszeit war in beiden Gruppen null Tage (Mittelwert ‚Beginn‘: 28 Tage; Mittelwert ‚Ende‘: 21 Tage). Der Besamungsindex betrug zu Beginn der Beprobung 2,3 Besamungen und nach ihrem Ende 2,1 Besamungen. Der Erstbesamungserfolg lag bei 57,3 % und 62,7 % zu Beginn bzw. nach Ende des Versuchszeitraums.

## **2. Charakterisierung und Gruppierung der Versuchstiere**

Zur Gruppeneinteilung der 108 Versuchstiere standen die Ergebnisse aus klinischer, zytologischer und histopathologischer Untersuchung zur Verfügung. Zusätzlich wurde der bakteriologische Status des Endometriums beurteilt.

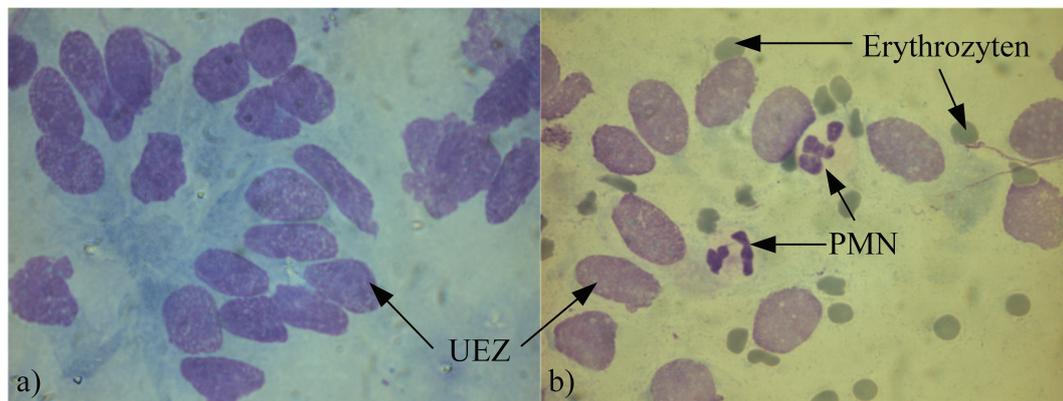
### **2.1. Klinische Untersuchung**

Die klinische Untersuchung beinhaltete die äußere Adspektion, eine manuelle und sonographische rektale Untersuchung sowie eine vaginoskopische Untersuchung. Vier Tiere fielen dabei mit Ansammlungen von mukopurulentem oder purulentem Material in der Scheide auf. Da sie zusätzlich in der zytologischen und/oder histopathologischen endometrialen Probe Entzündungscharakteristika aufwiesen (vgl. III.3.1.1.), wurde jeweils eine klinische Endometritis (KE) diagnostiziert.

Die sonographische Untersuchung diente der Ergänzung der manuellen Uterusbefundung sowie der Zyklusdiagnose an den Ovarien. Nach den in III.3.1.2. beschriebenen Kriterien befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme 39 Tiere in der Follikel- und 45 Tiere in der Lutealphase. Bei neun und sieben Tieren wurden Follikel-Theka- bzw. Follikel-Lutein-Zysten diagnostiziert. Bei acht Tieren war eine eindeutige Ansprache des Zyklusstands aufgrund abweichender Befunde in der klinischen und sonographischen Untersuchung oder nicht eindeutiger Ultraschallbilder nicht möglich.

## 2.2. Zytologische Untersuchung

Pro Tier wurden zwei endometriale Cytobrush-Abstriche angefertigt und jeweils von zwei unabhängigen Untersuchern bewertet. Der prozentuale Anteil der PMN an einer Gesamtzahl von 300 kernhaltigen Zellen wurde beurteilt (vgl. Abbildung 11). Der Mittelwert der vier erhaltenen Einzelwerte wurde für die Auswertung verwendet. Ein Grenzwert von 5 % PMN wurde unabhängig vom Zyklusstand für die Diagnose der SE herangezogen. Von 216 Objektträgern waren 13 aufgrund geringer Kontraste oder niedriger Zellgehalte nicht auswertbar (6,0 %). Dennoch stand für jedes Tier mindestens ein gut auswertbarer Abstrich zur Verfügung. Der PMN-Gehalt der zytologischen Proben erstreckte sich von 0 % bis 26,8 % bei einem Median von 0,3 %. Für 11 Tiere lag der PMN-Gehalt über dem Grenzwert von 5 %. Drei davon waren Tiere mit KE, acht waren klinisch unauffällig.



**Abbildung 11: Cytobrush-Ausstriche in Haema-Schnellfärbung.**

a) keine Endometritis; b) zytologisch nachweisbare Endometritis mit PMN-Gehalt 6,7 %. UEZ: uterine Epithelzellen, z. T. ohne Zytoplasma; PMN: neutrophile Granulozyten

## 2.3. Histopathologische Untersuchung

Die histopathologische Untersuchung der formalinfixierten Endometrium-Bioptate wurde am Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig durchgeführt. Die histomorphologische Einteilung und Graduierung fand nach etablierten Verfahren statt (vgl. Abbildung 23, S. 145). Von insgesamt 108 Biopaten zeigten 101 eine gute bis mäßige Auswertbarkeit. Drei Biopate wurden als schlecht beurteilbar klassifiziert. Die Auswertbarkeit wurde vor allem durch kleine Abmessungen der Biopate, fehlendes luminales Epithel sowie das Auftreten von Artefakten beeinträchtigt. Dennoch war die Beurteilung dieser drei Biopate mit ‚Verdacht auf keine Endometritis‘ möglich. Bei vier Tieren (3,7 %) war das Biopat nicht auswertbar, weshalb die RNAlater-fixierte Back-up-Probe eingesandt und histopathologisch beurteilt wurde.

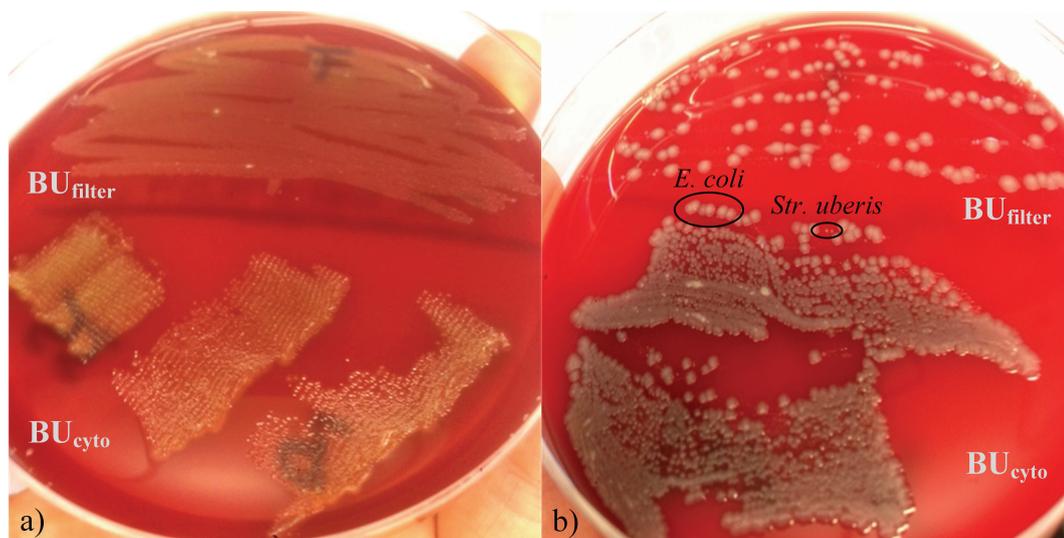
Bei 91 Tieren waren keine entzündlichen Veränderungen im Endometrium-Biopsat festzustellen. Bei 17 Tieren wurde histopathologisch eine Endometritis diagnostiziert. Davon hatten drei Tiere eine KE. Bei nur einem der restlichen 14 histopathologisch auffälligen Tiere überschritt der PMN-Anteil in der zytologischen Auswertung den Grenzwert von 5 % PMN.

Als Entzündungstyp wurden bei 14 Tieren lymphoplasmazelluläre Endometritiden dokumentiert. Davon litt ein Tier an KE, während 13 Tiere klinisch unauffällig waren. Bei 3 Tieren wurde eine gemischtzellige Endometritis festgestellt (zwei Kühe mit KE, eine klinisch unauffällige Kuh). Bei 15 Tieren wurden die entzündlichen Veränderungen als geringgradig bis mittelgradig eingestuft. Ein klinisch unauffälliges Tier zeigte lediglich eine angedeutete Endometritis, während ein Tier mit KE hochgradige endometriale Veränderungen aufwies. Darüber hinaus wurden Lymphfollikel im subepithelialen Stroma sowohl bei Kühen mit als auch ohne Endometritis gefunden. Zur Beurteilung ihrer Auswirkung auf das uterine Milieu sowie die endometriale Genexpression und Fruchtbarkeit wurden die gebärmuttergesunden Kühe nach dem Auftreten von Lymphfollikeln unterteilt in 70 Kühe ohne Lymphfollikel und 13 Kühe mit Lymphfollikeln.

#### **2.4. Bakteriologische Untersuchung**

Bei jedem Tier wurden zwei bakteriologische Proben aus dem Uterus gewonnen, mit denen jeweils die Hälfte eines Schafblut-Agars beschickt wurde: BU<sub>cyto</sub> stammte aus dem Cytobrush, BU<sub>filter</sub> wurde durch Austupfen des Filtereinsatzes nach Zentrifugation des Merocel-Schwämmchens mit US gewonnen. Die bakteriologische Beurteilung des Uterus wurde durch das häufige Auftreten von Kontaminationen, die im Probengewinnungsprozess begründet lagen, erschwert. Die in III.2.5.1. beschriebenen Kriterien zur Unterscheidung von bakteriologisch positiven und kontaminierten Proben ermöglichten dennoch eine einheitliche Beurteilung. Demnach galten Proben als bakteriologisch positiv, wenn in BU<sub>cyto</sub> und BU<sub>filter</sub> morphologisch identisches Wachstum mit mindestens fünf koloniebildenden Einheiten (CFU) von maximal zwei unterschiedlichen Koloniemorphologien auftrat oder nur in BU<sub>cyto</sub> Monokulturen mit mindestens fünf CFU wuchsen. Die Proben von vier Kühen wurden als bakteriologisch positiv beurteilt. Sie wurden zur Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie an das Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, gesandt.

Bei zwei Tieren mit klinischer Endometritis wurde *T. pyogenes* in Rasenwachstum festgestellt (vgl. Abbildung 12a). Für ein Tier, welches nur in der zytologischen Untersuchung auffällig war, wurde hochgradiges Wachstum von *Str. uberis* und *E. coli* nachgewiesen (vgl. Abbildung 12b). Bei einem Tier ohne jegliche Form der Endometritis wurde *Str. pluranimalium* identifiziert.



**Abbildung 12: Bakteriologische Proben aus der Gebärmutter.**

Die bakteriologischen Proben wurden durch Austupfen des Filtereinsatzes nach Zentrifugation des Merocel-Schwämmchens mit Uterussekret (BU<sub>filter</sub>) sowie durch das Cytobrush (BU<sub>cyto</sub>) gewonnen und jeweils über die Hälfte eines Schafblutagars ausgestrichen. Inkubation für 48 h bei 37 °C. a) Wachstum von *T. pyogenes* bei einer Kuh mit klinischer Endometritis; b) Wachstum von *Str. uberis* und *E. coli* bei einer Kuh mit nur zytologisch nachweisbarer Endometritis.

## 2.5. Gruppeneinteilung

Die statistischen Auswertungen der Untersuchungen an US sowie der endometrialen Genexpression fanden jeweils entsprechend der Gruppeneinteilung bzgl. Gebärmuttergesundheit, Vorkommen endometrialer Lymphfollikel und Zyklusstand statt (vgl. III.3.).

### 2.5.1. Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln

Die Gruppeneinteilung in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit erfolgte in die Kategorien E.NEG (keine Endometritis), SE (subklinische Endometritis) und KE (klinische Endometritis). SE-Tiere wurden gemäß dem Positivbefund in der Diagnostik weiter unterteilt in SE(cyto+histo), SE(cyto) und SE(histo). Eine Übersicht über die Verteilung der Versuchstiere auf die verschiedenen Gruppen bietet Tabelle 5. Daraus wird eine geringe Übereinstimmung der zytologischen und

histopathologischen Untersuchungsergebnisse ersichtlich. Nur bei einem Tier wurde die SE übereinstimmend in beiden Untersuchungen festgestellt, während sieben und 13 Tiere nur in der zytologischen bzw. histopathologischen Beurteilung Entzündungsanzeichen aufwiesen. Nach dem Auftreten von Lymphfollikeln (Fol) in der Histopathologie wurden gebärmuttersgesunde Tiere weiter differenziert in LF- ( $n = 70$ ) und LF+ ( $n = 13$ ).

**Tabelle 5: Gruppengrößen nach Einteilung der beprobten Tiere hinsichtlich ihrer Gebärmuttergesundheit und Anzahl der Positivbefunde in den verschiedenen Untersuchungen.**

	<i>n</i>	Klin+	Cyto+	Histo+	Fol+	BU+
<b>E.NEG</b>	83	0	0	0	13	1
<b>SE(cyto+histo)<sup>*)</sup></b>	1	0	1	1	1	0
<b>SE(cyto)</b>	7	0	7	0	1	1
<b>SE(histo)</b>	13	0	0	13	5	0
<b>KE<sup>*)</sup></b>	4	4	3	3	0	2

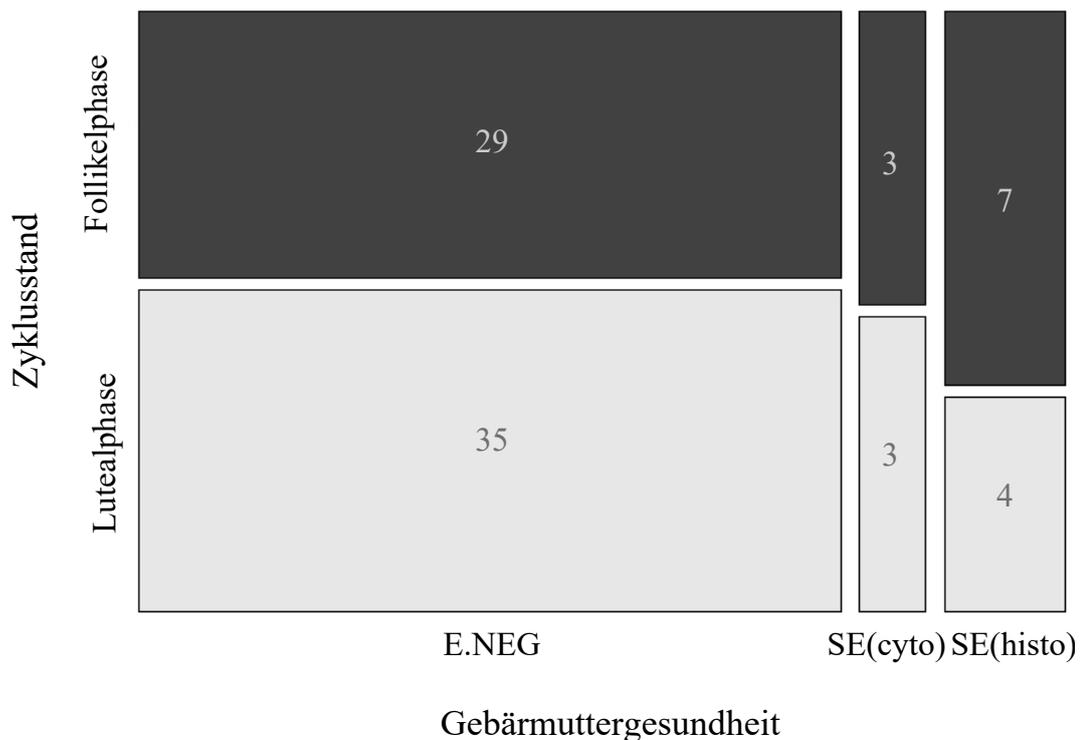
Dargestellt sind die Gruppengrößen in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit und die Anzahl an Positivbefunden in der klinischen, zytologischen, histopathologischen und bakteriologischen Untersuchung sowie bei der Beurteilung endometrialer Lymphfollikel. *n*: Tierzahl; Klin+: vaginoskopisch detektierbarer mukopurulenter oder purulenter Scheidenausfluss; Cyto+: PMN-Anteil  $\geq 5\%$  im endometrialen Abstrich; Histo+: Anzeichen einer Entzündung im Biopat; Fol+: endometriale Lymphfollikel histopathologisch nachweisbar; BU+: bakteriologisch positive Probe; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE: subklinische Endometritis; SE(cyto+histo): Tiere mit SE, die in Histopathologie und Zytologie nachweisbar ist; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; KE: Tiere mit klinischer Endometritis; <sup>\*)</sup> Ausschluss aufgrund geringer Fallzahlen.

Die Gruppen KE und SE(cyto+histo) wurden aufgrund niedriger Tierzahlen von den nachfolgenden Untersuchungen der US-Proben und der molekularbiologischen Beurteilung endometrialer Biopate ausgeschlossen. Demnach standen die Proben von 103 Tieren zur weiterführenden Untersuchung und vergleichenden statistischen Auswertung zur Verfügung.

### 2.5.2. Gruppeneinteilung nach Zyklusstand

Der Einfluss des Zyklusstands auf die untersuchten Parameter in US und endometrialer Genexpression wurde innerhalb von 83 gebärmuttersgesunden Kühen untersucht. 29 Kühe der Gruppe E.NEG befanden sich zum Beprobungstermin in der Follikelphase, 35 Tiere waren in der Lutealphase. Zwölf und sieben Kühe wurden aufgrund von Zystischen Ovarfollikeln bzw. unklarem Zyklusstand von der Auswertung nach Zyklusstand ausgenommen.

Die Verteilung der statistisch ausgewerteten Gruppen mit unterschiedlichem Status an Gebärmuttergesundheit (E.NEG, SE(cyto) und SE(histo)) auf die beiden Zyklusphasen stellte sich weitgehend gleichmäßig dar (vgl. Abbildung 13). Zum Beprobungstermin befanden sich jeweils drei Tiere der Gruppe SE(cyto) in Follikel- und Lutealphase, während sich die Tiere der Gruppe SE(histo) mit  $n = 7$  und  $n = 4$  auf Follikel- bzw. Lutealphase verteilten. Ein (SE(cyto)) bzw. zwei (SE(histo)) Tiere blieben dabei wegen Zystischer Ovarfollikel oder unklarem Zyklusstand unberücksichtigt.



**Abbildung 13: Mosaikplot der Tierzahlen nach Gebärmuttergesundheit und Zyklusstand.**

Die Fläche der einzelnen Felder repräsentiert die Tierzahl der jeweiligen Kombination aus Gebärmuttergesundheits- und Zyklusstandgruppe. Die Verteilung der drei Gruppen mit unterschiedlichem Status der Gebärmuttergesundheit auf die beiden Zyklusphasen stellte sich weitgehend gleichmäßig dar. Tiere mit Zystischen Ovarfollikeln und unklarem Zyklusstand werden nicht abgebildet. E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

### 3. Untersuchung des Uterussekrets

Nachdem die mit Merocel-Schwämmchen gewonnenen US-Proben mittels Zentrifugation in Filterröhrchen aus den Schwämmchen extrahiert wurden, fand die Quantifizierung von Verdünnungsfaktor und Blutkontamination statt. Ihre biologische Aktivität wurde im PMN-Transmigrationstest beurteilt und die Konzentrationen verschiedener Interleukine direkt mittels AlphaLISA bestimmt.

### 3.1. Uterussekretmenge, Verdünnungsfaktor und Blutkontamination

US-Proben von 103 Tieren standen zur vergleichenden Untersuchung zur Verfügung. Die Masse des pro Tier gewonnenen US  $m(\text{US})$  betrug im Median 91 mg und reichte von 6 mg bis 349 mg. Der Verdünnungsfaktor  $D$  lag im Median bei 7,6 und erstreckte sich von 2,7 bis 101,0. Die US-Proben von zwei Tieren ohne Endometritis wurden aufgrund eines Verdünnungsfaktors größer 50 von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da eine rechnerische Korrektur hier nicht sinnvoll erschien. Die Blutkontamination  $\text{Blut}\%$  der US-Proben belief sich im Median auf 5,9 % und reichte von 2,2 % bis rechnerisch 186,6 %. Die US-Proben von neun Tieren der Gruppe E.NEG wurden aufgrund einer Blutkontamination von über 33 % von den nachfolgenden Analysen ausgenommen, da auch hier die rechnerische Korrektur als nicht sinnvoll erachtet wurde. Somit standen US-Proben von 92 Tieren für die Untersuchung und Auswertung zur Verfügung. Ihre Gruppeneinteilung nach klinischer, zytologischer und histopathologischer Untersuchung zeigte folgende Verteilung:  $n(\text{E.NEG}) = 72$ ,  $n(\text{SE}(\text{cyto})) = 7$ ,  $n(\text{SE}(\text{histo})) = 13$  (vgl. Tabelle 6). Die Einteilung der gebärmuttergesunden Tiere nach Lymphfollikeln und Zyklusstand wird in Tabelle 7 (S. 68) dargestellt.

**Tabelle 6: Für Analyse von PMN-Chemotaxis und Interleukin-Konzentrationen des Uterussekrets verfügbare Tierzahlen zur Auswertung bzgl. der Gebärmuttergesundheit.**

Gruppe	$n$	$D > 50^1$	$\text{Blut}\% > 33^1$	$n$ für Transmigrations- test und AlphaLISA <sup>2</sup>
E.NEG	83	2	9	72
SE(cyto)	7	0	0	7
SE(histo)	13	0	0	13

$n$ : Tierzahl; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; <sup>1</sup> Uterussekretprouben mit einem Verdünnungsfaktor ( $D$ ) größer 50 oder einer Blutkontamination ( $\text{Blut}\%$ ) von über 33 % wurden von der Untersuchung und Auswertung ausgeschlossen, da eine rechnerische Korrektur hier als nicht sinnvoll erachtet wurde. <sup>2</sup> Im Transmigrationstest wurde die chemotaktische Wirkung des Uterussekrets auf isolierte PMN *in vitro* untersucht. Mittels AlphaLISA wurden die Konzentrationen der Interleukine IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10 im Uterussekret bestimmt.

**Tabelle 7: Für Analyse von PMN-Chemotaxis und Interleukin-Konzentrationen des Uterussekrets verfügbare Tierzahlen zur Auswertung bzgl. Lymphfollikeln und Zyklusstand.**

	Einteilung	<i>n</i> für Transmigrations- test und AlphaLISA <sup>*)</sup>
<b>Lymphfollikel</b>	LF-	62
	LF+	10
<b>Zyklusstand</b>	Follikelphase	21
	Lutealphase	33
	Zystische Ovarfollikel/unklar	18

Die Auswertung bzgl. des Vorkommens endometrialer Lymphfollikel bzw. des Zyklusstands fand bei 72 gebärmuttersgesunden Kühen statt. *n*: Tierzahl; LF-: gebärmuttersgesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärmuttersgesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind; <sup>\*)</sup> Im Transmigrationstest wurde die chemotaktische Wirkung des Uterussekrets auf isolierte PMN *in vitro* untersucht. Mittels AlphaLISA wurden die Konzentrationen der Interleukine IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10 im Uterussekret bestimmt.

### 3.2. PMN-Chemotaxis

Zur Bewertung ihres chemotaktischen Potenzials wurden die US-Proben in einem Chemotaxis-Assay mit isolierten PMN eingesetzt und ihre relative Transmigrationsrate  $T_r$  im Verhältnis zur Positivkontrolle rhIL8 bestimmt (vgl. III.2.2.4.). In Vorversuchen war untersucht worden, wie sich die  $T_r$  bei steigender IL8-Konzentration verhält (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte kein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen  $T_r$  und Chemokin-Konzentration festgestellt werden. Daher war eine Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie der Blutkontamination der US-Proben bei der vergleichenden Auswertung der  $T_r$  nicht möglich. Die  $T_r$  der US-Proben der 92 ausgewerteten Kühe betrug im Median 29 % (1. Quartil: 10 %, 3. Quartil: 65 %) und erstreckte sich über einen Wertebereich von 0 % bis 125 %. Nach dem Einsatz von rechnerisch 250.000 PMN im oberen Well wurden nach Inkubation in der Transmigrationskammer im unteren Well durchflusszytometrisch im Mittel etwa 34.600 Events für die Positivkontrolle gezählt.

#### 3.2.1. PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit

Für die US-Proben von 92 Tieren fand eine statistische Auswertung der  $T_r$  hinsichtlich der Gebärmuttergesundheit mittels Mann-Whitney-U-Test statt. SE(cyto) und SE(histo) wiesen im Vergleich mit E.NEG keine signifikant unterschiedliche  $T_r$  auf ( $p \geq 0,0167$ ; vgl. Abbildung 14a, S. 69, sowie Tabelle 18, S. 147). Zwischen den Gruppen SE(cyto) und SE(histo) zeigte die  $T_r$  einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,0167$ ). Während ihr Median für SE(histo) bei 25 % lag, betrug er für

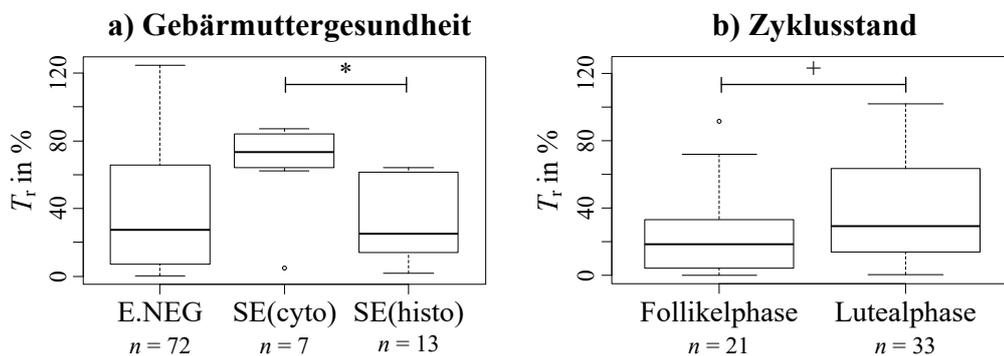
SE(cyto) 73 % (2,9-fach erhöht). Fand der Verdünnungsfaktor in der Art Berücksichtigung, dass nur US-Proben mit  $D \leq 10$  in die Auswertung aufgenommen wurden ( $n(\text{E.NEG}) = 47$ ,  $n(\text{SE(cyto)}) = 3$ ,  $n(\text{SE(histo)}) = 7$ ), so zeigten SE(histo) und SE(cyto) eine tendenziell unterschiedliche  $T_r$  ( $p < 0,0333$ ; Median 21 % bzw. 82 %), während E.NEG keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beiden SE-Gruppen aufwies.

### 3.2.2. PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel

72 gebärmuttersgesunde Kühe wurden hinsichtlich des Auftretens von Lymphfollikeln im endometrialen Stroma differenziert. Bei der statistischen Auswertung der  $T_r$  mittels Mann-Whitney-U-Test wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen LF- und LF+ festgestellt ( $p \geq 0,05$ ; vgl. Tabelle 18, S. 147).

### 3.2.3. PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit vom Zyklusstand

Innerhalb der 72 Kühe ohne Endometritis erfolgte eine Auswertung der  $T_r$  nach dem Zyklusstand. Dabei wurden 18 Tiere mit Zystischen Ovarfollikeln oder unklarem Zyklusstand ausgeschlossen. Bei der Auswertung der  $T_r$  mittels Mann-Whitney-U-Test wurde ein tendenzieller Unterschied zwischen Follikel- und Lutealphase deutlich ( $p < 0,1$ ). In der Lutealphase war die  $T_r$  im Mittel 1,6-fach so hoch wie in der Follikelphase (29 % bzw. 19 %, vgl. Abbildung 14b sowie Tabelle 18, S. 147).



**Abbildung 14: PMN-Chemotaxis in Abhängigkeit von a) Gebärmuttergesundheit und b) Zyklusstand.**

Boxplot-Diagramme der relativen Transmigrationsrate ( $T_r$ ) von Uterussektret in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit und Zyklusstand. Die zugrunde liegenden Zahlenwerte sowie exakte p-Werte finden sich in Tabelle 18 (S. 147). Zur Beurteilung nach Zyklusstand wurden nur gebärmuttersgesunde Kühe herangezogen. Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Zu beachten sind unterschiedliche Signifikanzniveaus aufgrund des mehrfachen paarweisen Vergleichs mit anschließender Bonferroni-Korrektur bei der Auswertung nach Gebärmuttergesundheit: +,': Tendenz ( $p < 0,0333$  (a) bzw.  $p < 0,1$  (b)); \*,\*': signifikant ( $p < 0,0167$  (a) bzw.  $p < 0,05$  (b)).  $n$ : Tierzahl; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

### 3.3. Interleukine im Uterussekret

Mittels AlphaLISA wurden die Konzentrationen der Interleukine IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10 im US bestimmt. Als Nachweisgrenze wurde das Lower Detection Limit (LDL) ermittelt und für darunterliegende Messwerte der Wert des niedrigsten Standardpunkts der mitgeführten Standardkurve eingesetzt. Außer für IL17A lag der niedrigste Standardpunkt unterhalb des LDL. Zur statistischen Auswertung wurden die um den individuellen Verdünnungsfaktor sowie die Blutkontamination korrigierten Werte  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  von 92 Tieren verwendet (vgl. III.2.2.5.). Insgesamt sechs rechnerisch negative Einzelwerte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  betrafen Tiere der Gruppe E.NEG und wurden von der Beurteilung ausgenommen. Die Ergebnisse der AlphaLISA-Untersuchungen werden in Tabelle 8 dargestellt. Für IL1B, IL6 und IL10 lagen jeweils mehr als die Hälfte der gemessenen Werte unterhalb des LDL (Median = niedrigster Standardpunkt). Dagegen lag die mediane IL8-Konzentration im US drei log-Stufen über diesen Werten im Bereich von 1.900 pg/ml. IL17A trat im US im Median mit Konzentrationen von 64,1 pg/ml auf. Eine Untersuchung der TNF $\alpha$ -Konzentration fand nicht statt, da in Vorversuchen mittels AlphaLISA etwa drei log-Stufen höhere TNF $\alpha$ -Konzentrationen in Blutplasma nachgewiesen wurden als im US. Eine Korrektur der Konzentrationen in US um die Blutkontamination wurde daher für TNF $\alpha$  als nicht sinnvoll erachtet (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 8: Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret bestimmt durch AlphaLISA.**

Interleukin	<i>n</i>	LDL in pg/ml	Niedrigster SP in pg/ml	$c(\text{US}_{\text{calc}})$ in pg/ml		
				1. Quartil	Median	3. Quartil
<b>IL1B</b>	92	2,1	1,0	1,0	1,0	31,3
<b>IL6</b>	91	48,5	5,6	5,6	5,6	2.730,8
<b>IL8</b>	91	2,1	0,3	663,0	1.906,5	3.438,3
<b>IL17A</b>	92	1,7	3,0	24,9	64,1	142,6
<b>IL10</b>	88	4,6	1,0	1,0	1,0	28,7

Dargestellt sind das Lower Detection Limit (LDL), welches als Nachweisgrenze verwendet wurde, der niedrigste Standardpunkt (SP), der für Werte unterhalb des LDL eingesetzt wurde, sowie Median, 1. und 3. Quartil von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  für die Interleukine IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10. Einzelne, nach Korrektur der Blutkontamination rechnerisch negative Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen und werden durch Nennung der Tierzahlen ersichtlich. IL: Interleukin;  $c(\text{US}_{\text{calc}})$ : Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination

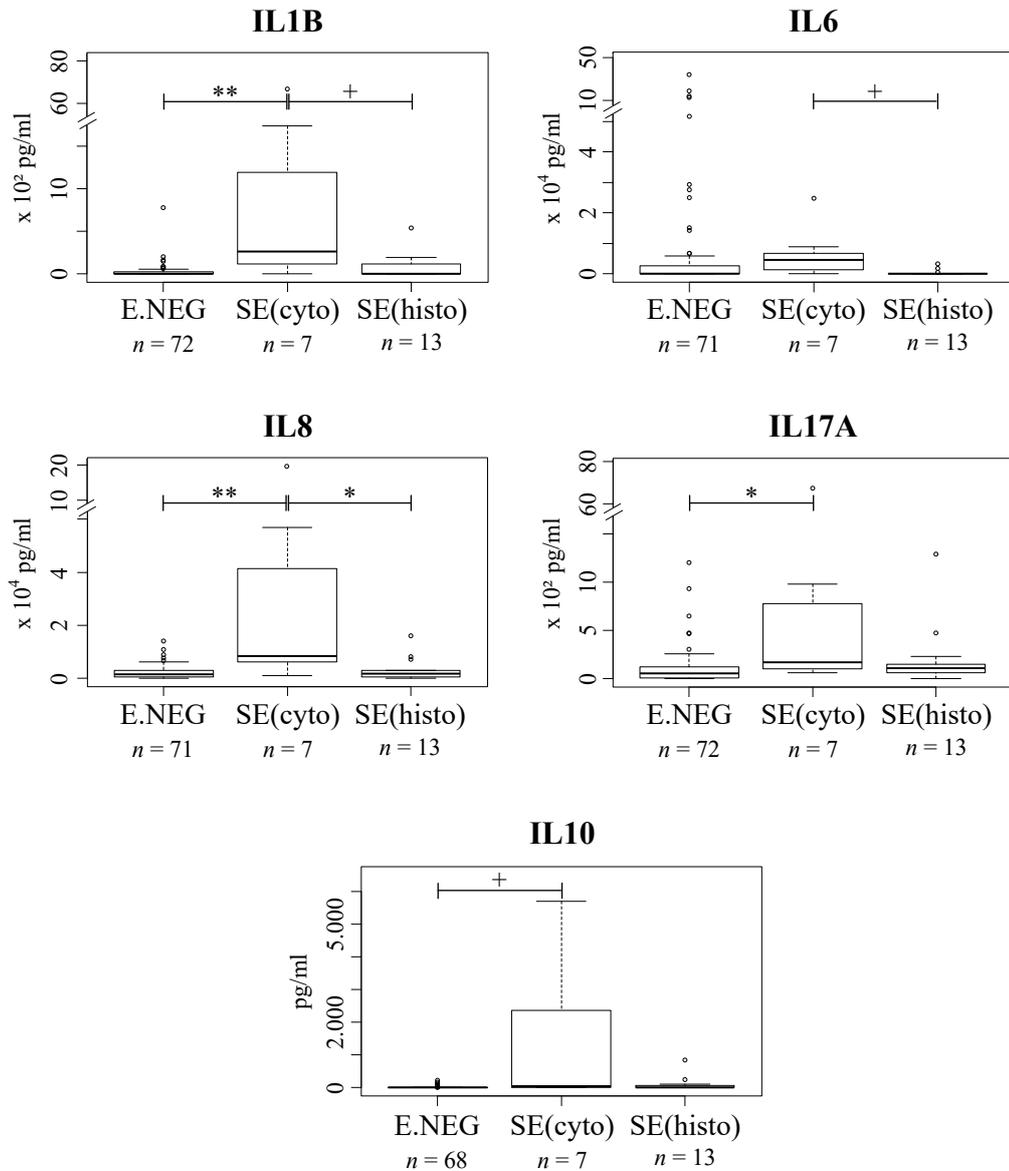
### 3.3.1. Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit

Für die US von 92 Tieren fand eine Auswertung der AlphaLISA-Ergebnisse nach der Gebärmuttergesundheit statt. Die statistische Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im US mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Mann-Whitney-U-Test ergab nach Bonferroni-Korrektur ( $\alpha = 0,0167$ ) für einige Interleukine signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen E.NEG und SE(cyto) sowie zwischen SE(cyto) und SE(histo). Dagegen zeigten E.NEG und SE(histo) keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Konzentrationen der untersuchten Analyten im US (vgl. Abbildung 15, S. 72, sowie Tabelle 19 und Tabelle 20, S. 148).

E.NEG/SE(cyto): Zwischen E.NEG und SE(cyto) waren für die US-Konzentrationen von IL1B und IL8 hoch signifikante ( $p < 0,0033$ ) und von IL17A signifikante ( $p < 0,0167$ ) Unterschiede nachweisbar. IL1B war 268-fach, IL8 5-fach und IL17A 3-fach höher konzentriert im US von SE(cyto) als bei gebärmuttergesunden Kontrolltieren. Die Konzentration von IL10 im US von SE(cyto) überstieg jene von E.NEG tendenziell (41-fach erhöht,  $p < 0,0333$ ), während für IL6 keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt wurden.

SE(cyto)/SE(histo): SE(cyto) wies im US signifikant höhere Konzentrationen an IL8 ( $p < 0,0167$ ) sowie tendenziell höhere Konzentrationen an IL1B und IL6 ( $p < 0,0333$ ) auf als SE(histo). IL8 trat dabei in der Gruppe SE(cyto) in 4-fach höheren Konzentrationen im US auf. Für IL10 und IL17A wurden hierbei keine Unterschiede festgestellt.

Verwendung von  $c(\text{US})$  anstelle von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$ : Die statistische Auswertung in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit wurde analog auch mit den mittels AlphaLISA gemessenen Interleukin-Konzentrationen durchgeführt, welche lediglich um den Verdünnungsfaktor, nicht aber um die Blutkontamination korrigiert wurden ( $c(\text{US})$ , vgl. Tabelle 21 und Tabelle 22, S. 149). Dabei wurde eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Auswertung von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  deutlich. In Tabelle 9 (S. 73) sind die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests bei Verwendung von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  und  $c(\text{US})$  gegenübergestellt.



**Abbildung 15: Interleukin-Konzentrationen im Uterussektret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Boxplot-Diagramme der Konzentrationen von IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10 im Uterussektret nach Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination  $c(US_{calc})$  in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit. Die zugrunde liegenden Zahlenwerte sowie exakte p-Werte finden sich in Tabelle 19 und Tabelle 20 (S. 148). Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug nach Bonferroni-Korrektur 0,0167. Einzelne, nach Korrektur der Blutkontamination rechnerisch negative Werte von  $c(US_{calc})$  wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen und werden durch Nennung der Tierzahlen ersichtlich.  $n$ : Tierzahl; IL: Interleukin; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; +: Tendenz ( $p < 0,0333$ ); \*: signifikant ( $p < 0,0167$ ); \*\*: hoch signifikant ( $p < 0,0033$ )

**Tabelle 9: Statistische Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret mit und ohne Berücksichtigung der Blutkontamination.**

Auswertung mit $c(\text{US}_{\text{scale}})   c(\text{US})$						
	$E.\text{NEG} - SE(\text{cyto})$		$E.\text{NEG} - SE(\text{histo})$		$SE(\text{cyto}) - SE(\text{histo})$	
<b>IL1B</b>	**	**	-	-	+	+
<b>IL6</b>	-	-	-	-	+	+
<b>IL8</b>	**	**	-	-	*	*
<b>IL17A</b>	*	**	-	-	-	-
<b>IL10</b>	+	-	-	-	-	-

Die zugrunde liegenden p-Werte sind in Tabelle 20 und Tabelle 22 (S. 148f) aufgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug nach Bonferroni-Korrektur  $\alpha = 0,0167$ .  $c(\text{US}_{\text{scale}})$ : Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination;  $c(\text{US})$ : Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte nur um den Verdünnungsfaktor; IL: Interleukin; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; ,-': statistisch kein Unterschied festzustellen ( $p \geq 0,0333$ ); ,+': Tendenz ( $p < 0,0333$ ); ,\*': signifikant ( $p < 0,0167$ ); ,\*\*\*': hoch signifikant ( $p < 0,0033$ )

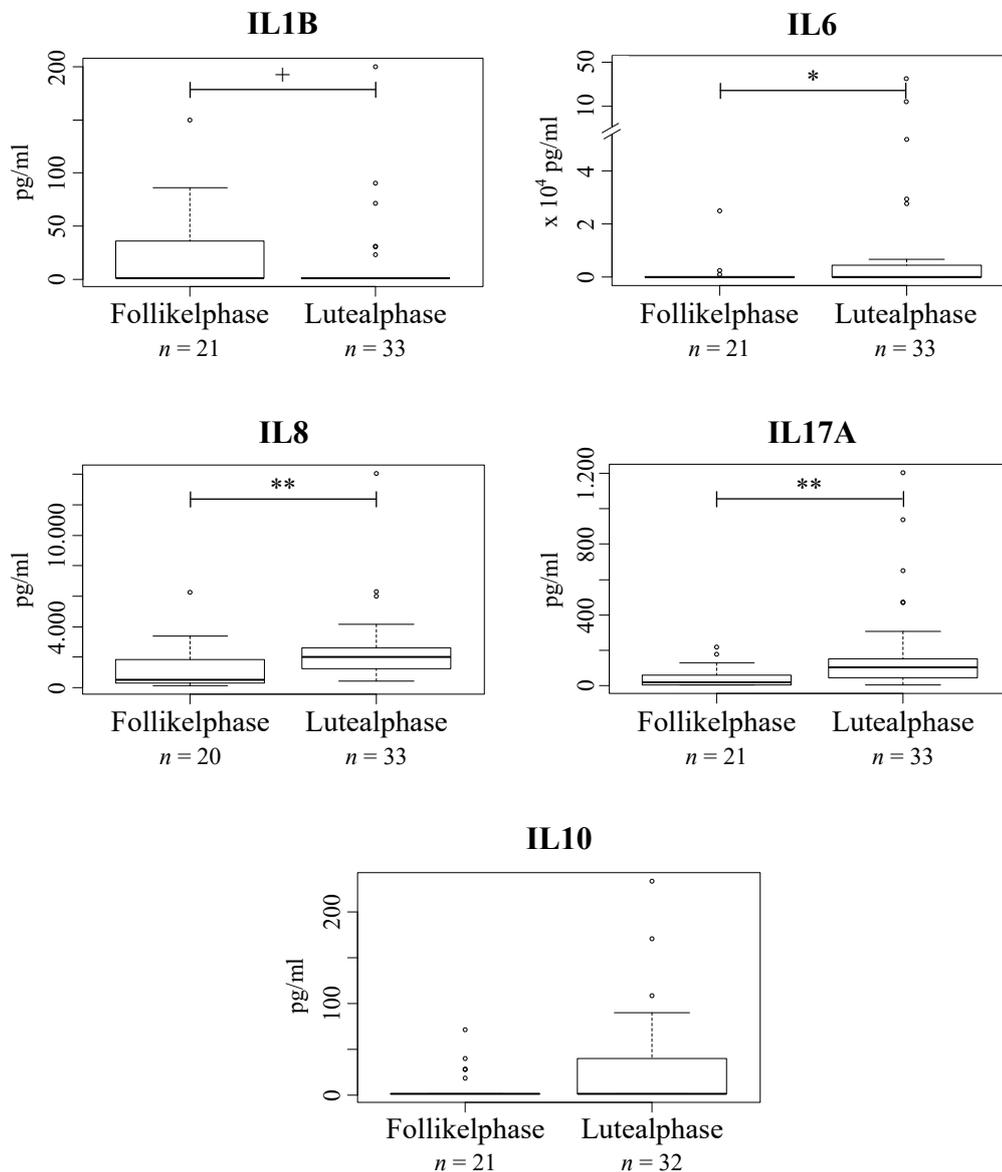
### 3.3.2. Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel

Die statistische Auswertung der Interleukin-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Auftreten endometrialer Lymphfollikel mittels Mann-Whitney-U-Test bei gebärrmuttergesunden Kühen ergab signifikante Unterschiede für die Konzentrationen von IL17A und IL10 im US zwischen LF- und LF+ ( $p < 0,05$ ; vgl. Tabelle 23, S. 150). Bei Präsenz endometrialer Lymphfollikel traten IL17A und IL10 in 3-fach bzw. 29-fach höheren Konzentrationen im US auf als in Abwesenheit von Lymphfollikeln. Für IL1B, IL6 und IL8 wurde keine Beeinflussung der US-Konzentrationen durch das Vorkommen von Lymphfollikeln festgestellt ( $p \geq 0,05$ ).

### 3.3.3. Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Zyklusstand

Die statistische Auswertung nach dem Zyklusstand bei gebärrmuttergesunden Kühen ergab hoch signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von IL8 und IL17A im US ( $p < 0,01$ , vgl. Abbildung 16, S. 74, sowie Tabelle 24, S. 150). Für beide Analyten wurden im Median höhere Konzentrationen in der Lutealphase festgestellt (IL8 4-fach und IL17A 6-fach höher als in Follikelphase). IL6 war in der Lutealphase im Vergleich zur Follikelphase signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); dabei unterschieden sich allerdings lediglich die 3. Quartile (5,6 pg/ml und 4.558 pg/ml

für Follikel- bzw. Lutealphase), während für Median und 1. Quartil in beiden Gruppen identische Werte dokumentiert wurden (jeweils 5,6 pg/ml, was dem niedrigsten Standardpunkt für IL6 entspricht und für Werte unterhalb der Nachweisgrenze eingesetzt wurde). IL1B zeigte sich tendenziell in der Follikelphase höher konzentriert ( $p < 0,1$ ), während für IL10 kein Unterschied deutlich wurde.



**Abbildung 16: Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Zyklusstand.**

Boxplot-Diagramme der Konzentrationen von IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10 im Uterussekret nach Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination  $c(US_{calc})$  in Abhängigkeit vom Zyklusstand. Die zugrunde liegenden Zahlenwerte sowie exakte p-Werte sind in Tabelle 24 (S. 150) aufgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test innerhalb der gebärmuttergesunden Kühe. Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Einzelne, nach Korrektur der Blutkontamination rechnerisch negative Werte von  $c(US_{calc})$  wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen und werden durch Nennung der Tierzahlen ersichtlich. IL: Interleukin; n: Tierzahl, '+': Tendenz ( $p < 0,1$ ); \*, \*\*: signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*\*: hoch signifikant ( $p < 0,01$ )

#### 4. Expression entzündungsrelevanter Gene im Endometrium

Durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) wurde die Genexpression der Interleukine IL1B, IL6, IL8 und IL10 sowie von TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 in Endometrium-Biopsaten bestimmt. Die absolute Quantifizierung der mRNA-Expression war durch Einstellen der cDNA-Proben auf 200 ng/ml und Mitführen von Standardkurven möglich. Von vier Tieren wurde das zweite Biopate als Back-up-Probe für die histopathologische Untersuchung benötigt, da die formalinfixierte Probe nicht auswertbar war. Für die ersten vier beprobten Tiere wurden sowohl formalin- als auch RNAlater-fixiertes Biopate histopathologisch untersucht, um die Auswertbarkeit der RNAlater-fixierten Back-up-Biopsate vergleichend zu evaluieren. In diesen acht Fällen stand somit kein Probenmaterial für die RT-qPCR zur Verfügung, sodass im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchung RNAlater-fixierte Endometrium-Biopsate von 95 Tieren analysiert wurden.

##### 4.1. Qualitätskriterien der RT-qPCR

**RNA-Qualität:** Mittels automatisierter Gelelektrophorese wurden der RNA Quality Index (RQI) und die RNA-Konzentration ( $c(\text{RNA})$ ) der Proben nach der Extraktion aus den Endometrium-Biopsaten bestimmt. Der RQI betrug im Median 8,7, was für eine sehr gute RNA-Qualität spricht.  $c(\text{RNA})$  lag im Mittel bei 325,67 ng/ $\mu\text{l}$ . Die RNAlater-fixierten Endometrium-Biopsate von zwei Tieren der Gruppe E.NEG wurden aufgrund vergleichsweise niedriger RNA-Qualität (RQI 6,1 und 5,8 bei  $c(\text{RNA})$  16 ng/ $\mu\text{l}$  bzw. 44 ng/ $\mu\text{l}$ ) von der weiteren molekularbiologischen Untersuchung und Auswertung ausgeschlossen. Die für die RT-qPCR verfügbaren Tierzahlen und deren Gruppeneinteilung werden in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 10: Für die Genexpressionsanalyse verfügbare Tierzahlen zur Auswertung bzgl. der Gebärmuttergesundheit.**

	<i>n</i>	Probe nicht verfügbar <sup>1</sup>	reduzierte RNA-Qualität <sup>2</sup>	<i>n</i> für RT-qPCR <sup>3</sup>
<b>E.NEG</b>	83	8	2	73
<b>SE(cyto)</b>	7	0	0	7
<b>SE(histo)</b>	13	0	0	13

*n*: Tierzahl; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; <sup>1</sup> Acht Proben waren für die Genexpressionsuntersuchung nicht verfügbar, weil sie entweder als Back-up für die histopathologische Untersuchung benötigt wurden ( $n = 4$ ) oder der Beurteilung der Auswertbarkeit RNAlater-fixierter Biopsate in der Histopathologie dienten ( $n = 4$ ). <sup>2</sup> Mittels automatisierter Gelelektrophorese wurde der RNA Quality Index bestimmt. <sup>3</sup> Die mRNA-Expression wurde absolut durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) und Mitführen von Standardkurven quantifiziert.

**Tabelle 11: Für die Genexpressionsanalyse verfügbare Tierzahlen zur Auswertung bzgl. Lymphfollikeln und Zyklusstand.**

	<b>Einteilung</b>	<b>n für RT-qPCR</b>
<b>Lymphfollikel</b>	LF-	61
	LF+	12
<b>Zyklusstand</b>	Follikelphase	21
	Lutealphase	34
	Zystische Ovarfollikel/unklar	18

Die mRNA-Expression wurde absolut durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) und Mitführen von Standardkurven quantifiziert. Die Auswertung bzgl. des Vorkommens endometrialer Lymphfollikel sowie des Zyklusstands fand bei 73 gebärrmuttergesunden Tieren statt. *n*: Tierzahl; LF-: gebärrmuttergesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärrmuttergesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind

DNA-Qualität: Qualität und Konzentration der cDNA-Proben wurden nach dem Umschreiben mit Reverser Transkriptase (RT) photometrisch bestimmt. Der Quotient A260/A280 betrug im Median 1,6. Bei reiner DNA ist ein Wert von mindestens 1,8 zu erwarten. Die bestehende Abweichung lässt sich durch die Zugabe von Proteinen erklären, die für den Umschreibeprozess (RT, RNAsin) erforderlich sind. Im Mittel wurde eine cDNA-Konzentration von 817,0 ng/μl festgestellt, welche anschließend durch die Zugabe von RNase-freiem Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 200 ng/μl eingestellt wurde.

Qualität der qPCR-Läufe: Als Qualitätsparameter jedes qPCR-Laufs wurden Effizienz und Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Standardkurve, Verhalten der Negativkontrollen (NTC) sowie Schmelztemperatur und -kurve des PCR-Produkts analysiert. Folgende Kriterien waren für die Verwendung der Messwerte Voraussetzung:

- Effizienz 90 % bis 110 %
- $R^2$  größer als 0,985
- mindestens eine der drei NTCs war negativ
- Nachweis der Target-spezifischen Schmelztemperatur

Die mittleren Werte von Effizienz und  $R^2$  werden für die einzelnen Gene in Tabelle 12 dargestellt. Zusätzlich wurden RNA-Proben mit Mastermix ohne Zusatz von RT umgeschrieben (-RT) und für jedes Gen in der qPCR eingesetzt. Sie zeigten außer für IL10 keine messbaren  $C_t$ -Werte. Für IL10 wurden bei den -RT-Proben wiederholt hohe  $C_t$ -Werte sowie ein eindeutiger IL10-spezifischer Produkt-Peak in der Schmelzkurve festgestellt. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden, weshalb die qPCR-Ergebnisse für IL10

unter Vorbehalt zu betrachten sind. Für PTGS2 wurde die -RT-Untersuchung nicht durchgeführt, da nicht mehr ausreichend Probenmaterial verfügbar war.

**Tabelle 12: Genexpression von IL1B, IL6, IL8 und IL10 sowie TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 in Endometrium-Bioptaten.**

Gen	Eff.	R <sup>2</sup>	-RT	mRNA-Expression in Kopien/ $\mu$ l		
				1. Quartil	Median	3. Quartil
<b>IL1B</b>	92,2	0,996	negativ	179,6	518,9	897,0
<b>IL6</b>	93,6	0,998	negativ	16,4	28,0	72,9
<b>IL8</b>	93,0	0,992	negativ	115,8	966,2	2.097,6
<b>IL10</b>	100,0	0,992	positiv*)	625,8	12.886,0	23.456,3
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	93,0	0,994	negativ	133,2	251,9	411,4
<b>PTGS2</b>	94,2	0,996	n. u.	76,6	850,0	2.683,0
<b>S100A9</b>	93,6	0,998	negativ	90,0	189,4	480,3

Die mRNA-Expression wurde durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) nach Einstellen der cDNA auf 200 ng/ $\mu$ l bestimmt ( $n = 93$ ).  $n$ : Tierzahl; Eff.: Effizienz des qPCR-Laufs in %, R<sup>2</sup>: Bestimmtheitsmaß der Standardkurve; -RT: Einsatz von Proben in qPCR, die mit Mastermix ohne Zusatz von Reverser Transkriptase umgeschrieben wurden; mRNA: messenger Ribonukleinsäure; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; ‚n. u.‘: nicht untersucht, da nicht ausreichend Probenmaterial verfügbar; \*): im Mittel 87.030 Kopien/ $\mu$ l

Einen Überblick über die Genexpression der Endometrium-Bioptate der 93 Tiere bietet Tabelle 12. Die mRNA-Expression von IL6 lag im Median bei 28,0 Kopien/ $\mu$ l und damit unterhalb des niedrigsten Standardpunkts von 100 Kopien/ $\mu$ l. Die Quantifizierung unterhalb des niedrigsten Standardpunkts ist möglicherweise weniger genau, allerdings lässt der lineare Verlauf der Standardkurve sowie ihr Verlauf durch ‚Null‘ eine Extrapolation zu. Die Mediane der mRNA-Expression von IL1B, IL8, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 bewegten sich zwischen 190 Kopien/ $\mu$ l und 1.000 Kopien/ $\mu$ l. Für IL10 wurde im Median eine mRNA-Konzentration von 12.886 Kopien/ $\mu$ l bestimmt. Sie lag damit deutlich über den Konzentrationen der restlichen Gene. Ein Zusammenhang mit den positiven -RT-Proben ist denkbar, dennoch wird der relative Vergleich der Werte zwischen verschiedenen Gruppen als zulässig beurteilt.

#### **4.2. Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit**

Für die Endometrium-Bioptate von 93 Tieren fand eine Auswertung der mRNA-Expression verschiedener Gene nach der Gebärmuttergesundheit statt. Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Mann-

Whitney-U-Test ergab nach Bonferroni-Korrektur ( $\alpha = 0,0167$ ) für einige Gene signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen E.NEG und SE(cyto) sowie zwischen SE(histo) und SE(cyto). Dagegen wurden zwischen E.NEG und SE(histo) keine signifikanten Unterschiede in der endometrialen Expression der untersuchten Gene nachgewiesen ( $p \geq 0,0167$ ). Die Genexpression von IL6, PTGS2 und S100A9 zeigte sich zwischen allen drei Gruppen mit verschiedenem Status der Gebärmuttergesundheit nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Abbildung 17, S. 79, sowie Tabelle 25 und Tabelle 26, S. 151f).

E.NEG/SE(cyto): Bei SE(cyto) war die endometriale Genexpression von IL1B und IL8 hoch signifikant ( $p < 0,0033$ ) und von IL10 signifikant ( $p < 0,0167$ ) stärker als bei E.NEG. Dabei wurde IL1B 3-fach, IL8 19-fach und IL10 2-fach stärker in der Gruppe SE(cyto) exprimiert als in der Gruppe gebärmuttergesunder Kontrolltiere. Für TNF $\alpha$  stellte sich eine tendenziell stärkere mRNA-Expression bei SE(cyto) verglichen mit E.NEG dar ( $p < 0,0333$ ).

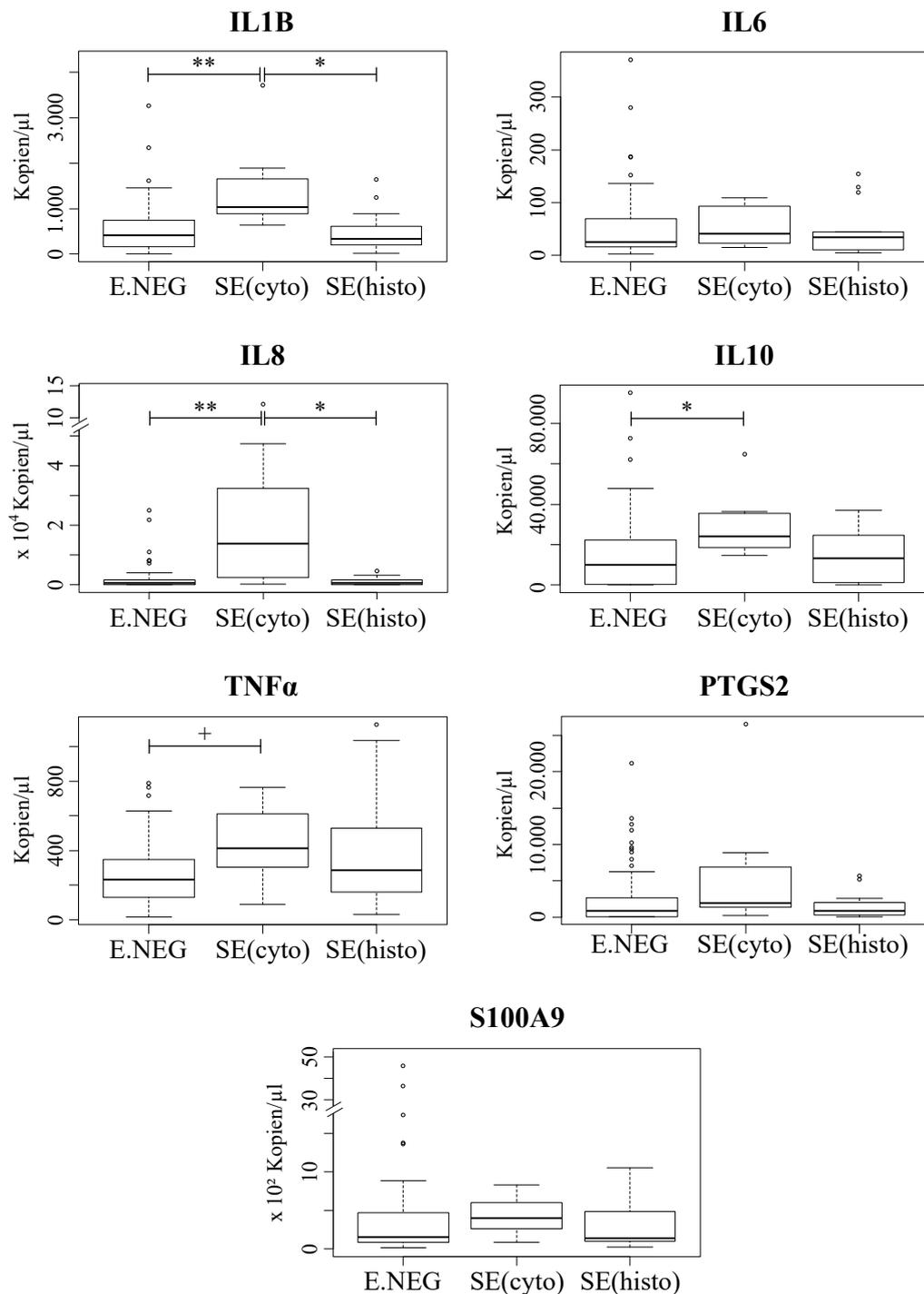
SE(cyto)/SE(histo): Die mRNA-Expression von IL1B und IL8 zeigte sich zwischen SE(cyto) und SE(histo) signifikant unterschiedlich ( $p < 0,0167$ ). Beide Gene wurden in der Gruppe SE(cyto) stärker exprimiert als in der Gruppe SE(histo). Das Ausmaß entsprach dem beim Vergleich der Gruppen E.NEG und SE(cyto): Bei SE(cyto) wurde IL1B 3-fach und IL8 19-fach stärker im Endometrium exprimiert.

#### **4.3. Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel**

Die statistische Auswertung nach dem Auftreten von Lymphfollikeln bei E.NEG zeigte keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression der untersuchten Gene zwischen LF- und LF+ ( $p \geq 0,05$ ; vgl. Tabelle 27; S. 152).

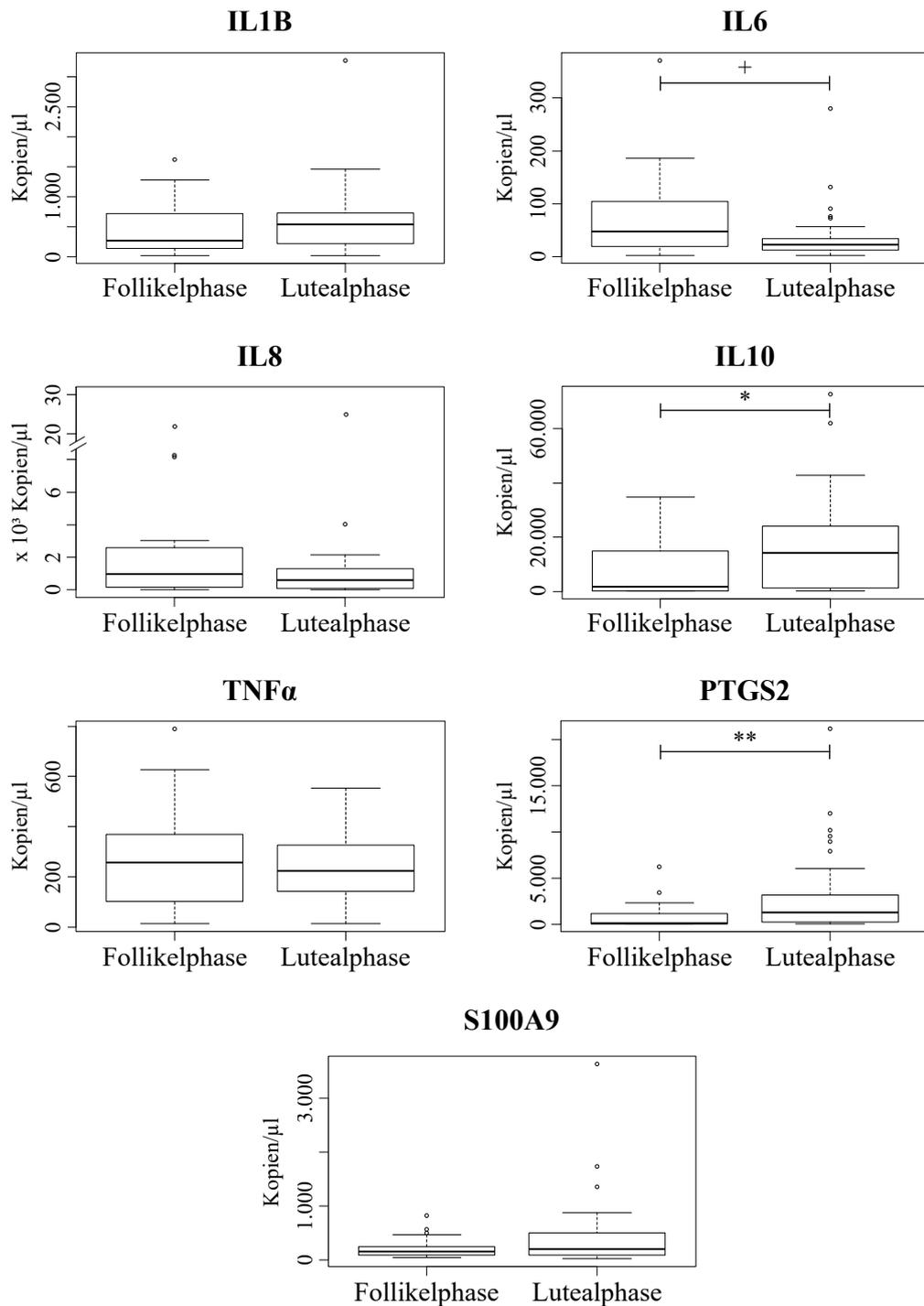
#### **4.4. Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Zyklusstand**

Die statistische Auswertung nach dem Zyklusstand bei gebärmuttergesunden Kühen ergab für die Genexpression von PTGS2 hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) und von IL10 signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen Follikel- und Lutealphase (vgl. Abbildung 18, S. 80, sowie Tabelle 28, S. 153). Beide Gene wurden während der Lutealphase verstärkt im Endometrium exprimiert (PTGS2 13-fach, IL10 9-fach). Dagegen zeigte IL6 eine tendenziell stärkere mRNA-Expression während der Follikelphase ( $p < 0,1$ ).



**Abbildung 17: Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Boxplot-Diagramme der mRNA-Expression von IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 in Endometrium-Biopsaten in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit. Die zugrunde liegenden Zahlenwerte sowie exakte p-Werte finden sich in Tabelle 25 und Tabelle 26 (S. 151f). Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test ( $n(\text{E.NEG}) = 73$ ,  $n(\text{SE}(\text{cyto})) = 7$ ,  $n(\text{SE}(\text{histo})) = 13$ ). Das Signifikanzniveau betrug nach Bonferroni-Korrektur 0,0167. Die mRNA-Expression wurde nach Einstellen der cDNA auf 200 ng/ $\mu\text{l}$  bestimmt.  $n$ : Tierzahl; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; +: Tendenz ( $p < 0,0333$ ); \*: signifikant ( $p < 0,0167$ ); \*\*: hoch signifikant ( $p < 0,0033$ )

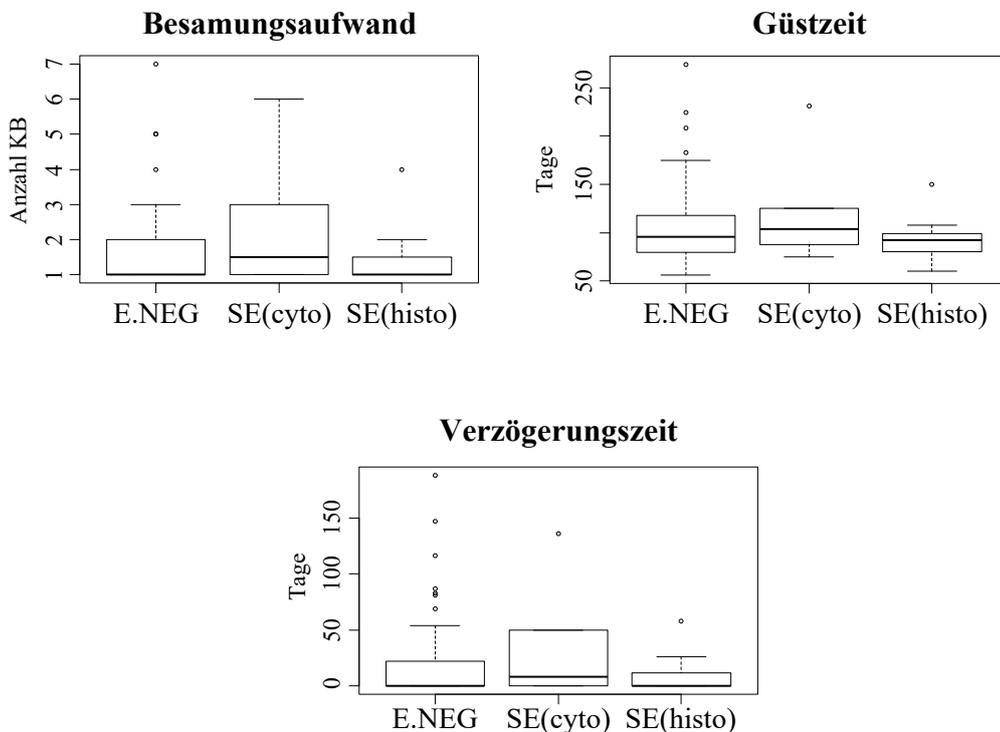


**Abbildung 18: Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Zyklusstand.**

Boxplot-Diagramme der mRNA-Expression von IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 in Endometrium-Biopsaten in Abhängigkeit vom Zyklusstand. Die zugrunde liegenden Zahlenwerte sowie exakte p-Werte finden sich in Tabelle 28 (S. 153). Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test innerhalb der gebärfertigen Kühe ( $n(\text{Follikelphase}) = 21$ ,  $n(\text{Lutealphase}) = 34$ ). Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Die mRNA-Expression wurde nach Einstellen der cDNA auf 200 ng/ $\mu$ l bestimmt.  $n$ : Tierzahl; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; '+': Tendenz ( $p < 0,1$ ); '\*': signifikant ( $p < 0,05$ ); '\*\*': hoch signifikant ( $p < 0,01$ )

## 5. Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln

Von 103 Tieren, die nach ihrer Gebärmuttergesundheit in E.NEG, SE(cyto) und SE(histo) eingeteilt wurden, gingen 12 aus verschiedenen Gründen vor Etablierung der nächsten Trächtigkeit aus der Herde ab. Darunter befand sich ein Tier, das aufgrund schlechter Fruchtbarkeit selektiert wurde. Dieses als SE(cyto) kategorisierte Rind wurde wiederholt wegen Zystischer Ovarfollikel therapiert und ging nach achtmaliger erfolgloser KB aus dem Betrieb ab. Für die restlichen 91 Tiere wurden relevante Fruchtbarkeitsparameter im Anschluss an die Beprobung erfasst und hinsichtlich der Gebärmuttergesundheit ausgewertet. Erläuterungen zu den analysierten Fruchtbarkeitskennzahlen finden sich in IV.1.3. Die Auswertung von Besamungsaufwand, Güst- und Verzögerungszeit mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem paarweisen Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen an Gebärmuttergesundheit ( $p > 0,0167$ , vgl. Abbildung 19 sowie Tabelle 29, S. 153).



**Abbildung 19: Einfluss des Entzündungsstatus der Gebärmutter auf Fruchtbarkeitskennzahlen.**

Die zugrunde liegenden Zahlenwerte sowie exakte p-Werte finden sich in Tabelle 29 (S. 153). Die Auswertung geschah mittels Mann-Whitney-U-Test; das Signifikanzniveau betrug 0,05 ( $n(\text{E.NEG}) = 73$ ,  $n(\text{SE(cyto)}) = 6$ ,  $n(\text{SE(histo)}) = 12$ ).  $n$ : Tierzahl; KB: Künstliche Besamung; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

---

Eine Auswertung der genannten Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit vom Auftreten endometrialer Lymphfollikel bei gebärmuttergesunden Kühen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen LF- und LF+ ( $p \geq 0,05$ ; vgl. Tabelle 30, S. 154).

## V. DISKUSSION

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Eignung von Uterussekreten (US) für die Diagnostik der subklinischen Endometritis (SE) beim Rind zu bewerten. Hierfür wurden bei Kühen eines landwirtschaftlichen Betriebs nach Abschluss des Puerperiums verschiedene Proben aus der Gebärmutter gewonnen. Die Auswertung der klinischen Untersuchung sowie der zytologischen und histopathologischen Beurteilung des Endometriums ermöglichte die Kategorisierung der Versuchstiere entsprechend ihrer Gebärmuttergesundheit. In weiteren Fragestellungen wurden die gebärmuttergesunden Tiere bzgl. des Auftretens endometrialer Lymphfollikel und ihres Zyklusstands gruppiert. Gemäß dieser Einteilungen wurden das chemotaktische Potenzial und die Konzentrationen ausgewählter Interleukine von US sowie die endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene vergleichend untersucht.

### 1. Einsatz des neuen Probenentnahmegärts in der Praxis

#### 1.1. Praxistauglichkeit der Probengewinnung

Das von HILLMER (2018) beschriebene Probenentnahmegärts zur aufeinanderfolgenden Gewinnung von US sowie zytologischen, histologischen und bakteriologischen Proben des Endometriums wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals *in vivo* an Kühen in einem landwirtschaftlichen Betrieb eingesetzt. Zur Optimierung der Probenentnahme und Sicherstellung hoher Probenqualitäten waren folgende Modifikationen der ursprünglichen Konstruktion und Methode notwendig:

- Verdickung des transzervikal einzuführenden Arbeitskanals an seinem vorderen Ende und Abrundung der Kanten zur Reduktion von Schleimhautverletzungen sowie daraus resultierender Blutkontamination der Proben (vgl. III.1.2.1.)
- Anwendung eines Adapters zum zügigen und kontaminationsarmen Einführen des Merocel-Schwämmchens zur US-Gewinnung in den Arbeitskanal (vgl. III.1.2.2.)
- Verkürztes Verbleiben des Merocel-Schwämmchens im Uteruslumen (zwei Minuten statt vier Minuten) als Kompromiss zwischen Belastung der Versuchstiere und Gewinnung ausreichender Mengen an US

Dadurch war die erfolgreiche Gewinnung von Proben hoher Qualität bei den 108 vorgestellten sowohl östrischen als auch diöstrischen Tieren möglich. Die Eignung der mittels verkleinertem Cytobrush und minimierter Biopsiezange gewonnenen Proben für die zytologische bzw. histopathologische Diagnostik wies HILLMER (2018) im Vergleich mit konventionellen Instrumenten nach. Etwa 6 % der zytologischen Proben enthielten in der hier vorliegenden Arbeit zu wenige Zellen für die Beurteilung ihres PMN-Anteils. Knapp 4 % der Biopate waren aufgrund zu geringer Abmessungen oder fehlenden luminalen Epithels nicht zu beurteilen, weshalb die RNAlater-fixierten Back-up-Proben histopathologisch untersucht wurden. Die verwendeten Merocel-Schwämmchen ermöglichten die US-Gewinnung bei allen vorgestellten Tieren. Die Tauglichkeit des Materials für die Rückgewinnung aufgenommener Immunmarker wurde von CASTLE et al. (2004) nachgewiesen.

Die durchgeführte Probenentnahme einschließlich der Gewinnung von zwei Endometrium-Biopaten je Tier führte nachweislich zu keiner negativen Beeinflussung der Fruchtbarkeit der Versuchstiere (vgl. IV.1.3.). Dieses Ergebnis legt bei korrekter Durchführung die Unbedenklichkeit der Beprobung für die Fertilität der Tiere nahe und stimmt überein mit Untersuchungen von CHAPWANYA et al. (2010) und MERBACH (2011). Dagegen beschrieben andere Autoren eine Verschlechterung der Fruchtbarkeit infolge der uterinen Biopsie, worin sich ihr seltener Einsatz sowohl in der Praxis als auch in der Forschung begründet (ETHERINGTON et al., 1988; BONNETT et al., 1993). Möglich ist, dass diese abweichenden Einschätzungen aus der Verwendung unterschiedlich groß dimensionierter Biopsiezangen resultieren.

## **1.2. Konzeptionelle Überlegungen**

Probenentnahmezeitraum: Die Probenentnahme wurde zwischen 43 und 62 Tagen p.p. durchgeführt und fand damit nach Ablauf des Gesamtpuerperiums von etwa sechs Wochen (MARION und GIER, 1959; ZAREMBA, 1990) sowie innerhalb der Freiwilligen Wartezeit des Versuchsbetriebs statt. Dadurch wurde einerseits sichergestellt, dass die physiologische puerperale Entzündungsreaktion des Endometriums bereits abgeschlossen war, sodass im Rahmen der Untersuchung detektierte entzündliche Veränderungen des Endometriums als pathologisch eingestuft werden konnten. Andererseits konnte so die Beprobung bereits besamter Kühe sowie eine Einflussnahme der Probengewinnung auf das Fruchtbarkeitsmanagement des Versuchsbetriebs ausgeschlossen werden.

PMN-Grenzwert: Für die Diagnose der SE in der zytologischen Untersuchung wurde ein Grenzwert von 5 % PMN angewandt (GILBERT et al., 2005; PLÖNTZKE et al., 2010; BARAŃSKI et al., 2012; MELCHER et al., 2014; BRODZKI et al., 2015b). Dieser zeigte sich in statistischen Analysen unter Berücksichtigung der Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit zwischen 21 und 62 Tagen p.p. als diagnostisch für SE und nicht durch den Zyklusstand beeinflusst (MADOZ et al., 2013; BRODZKI et al., 2015a).

### 1.3. Geringe Übereinstimmung zytologischer und histologischer Befunde

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine geringe Übereinstimmung zytologischer und histopathologischer Ergebnisse festgestellt. Dieser Befund veranlasste die differenzierte Betrachtung von Tieren mit nur zytologisch (SE(cyto)) bzw. nur histopathologisch nachweisbarer SE (SE(histo)) im weiteren Verlauf der Arbeit.

Regelmäßig bewies die Endometrium-Zytologie in der SE-Diagnostik eine niedrige Sensitivität und sehr hohe Spezifität bei Verwendung der Histopathologie als Referenzmethode (MERBACH, 2011; MADOZ et al., 2014; CENGIZ et al., 2016; PASCOTTINI et al., 2016b). Dies bedeutet, dass zytologisch diagnostizierte SE zuverlässig in der Histopathologie zu erkennen ist, während histologisch nachgewiesene Entzündungen nicht immer auch zytologisch belegt werden können. Als Ursache dieser Diskrepanz werden unterschiedliche endometriale Entzündungsformen angesehen: Die zytologische Untersuchung beurteilt den Gehalt an PMN, wodurch lediglich akute bzw. nach PASCOTTINI et al. (2016a) ‚aktive‘ Entzündungen detektiert werden. Chronische Veränderungen, wie z. B. eine lymphoplasmazelluläre Infiltration des Endometriums, können dagegen ausschließlich in der histopathologischen Untersuchung dargestellt werden (BONNETT et al., 1991a; MERBACH, 2011; PASCOTTINI et al., 2016a). Die Bedeutung dieser chronischen Alterationen des Endometriums für die Fruchtbarkeit von Kühen ist allerdings noch unklar (BONNETT et al., 1993; RODENBUSCH, 2011; MADOZ et al., 2014; PASCOTTINI und OPSOMER, 2016). PASCOTTINI et al. (2016b) stellten außerdem eine ungleichmäßige Verteilung der PMN im Endometrium bei Vorliegen einer Endometritis fest: Ein größerer Anteil an PMN ist in tieferen Lagen des endometrialen Stratum compactum lokalisiert und entzieht sich dadurch zytologischen Methoden. Darüber hinaus bestehen Hinweise darauf, dass im Rahmen des Sexualzyklus auftretende Veränderungen der endometrialen Zellpopulation vor allem tiefere endometriale Schichten betreffen und dadurch in der

Histopathologie zu falschpositiven Resultaten führen können, während sie auf die Zytologie keinen Einfluss nehmen (RODENBUSCH, 2011; MADOZ et al., 2014). Dagegen existieren wenige Untersuchungen, die eine geringe Sensitivität der histopathologischen Untersuchung bzgl. der Referenzmethode Zytologie nachweisen. MEIRA et al. (2012), MERBACH (2011) und HILLMER (2018) fanden jeweils bei etwa 60 % der Tiere mit zytologisch nachweisbarer SE falschnegative Diagnosen durch die Histopathologie. Eine mögliche Erklärung der Abweichungen in der vorliegenden Arbeit bietet die Anwendung einer modifizierten Biopsiezange: Die damit gewonnenen Biopate sind vergleichsweise klein und repräsentieren v. a. oberflächliche Bereiche des Endometriums. Möglicherweise werden entzündliche Veränderungen dadurch nicht ausreichend erfasst. Zusätzlich können durch das häufige Fehlen luminalen Epithels in den histologischen Schnitten epithelial gelegene PMN, die zytologisch nachweisbar sind, nicht immer in die histopathologische Beurteilung eingeschlossen werden. Des Weiteren ist denkbar, dass entzündliche Prozesse teilweise lokal begrenzt im Endometrium auftreten, wodurch ein einzelnes Biopat für den Gesundheitszustand des gesamten Uterus nicht repräsentativ wäre. Beim Pferd wurde diese Fragestellung bereits intensiv untersucht. Demnach können die Befunde an einem endometrialen Biopat als repräsentativ für das gesamte Endometrium betrachtet werden (BERGMAN und KENNEY, 1976; BLANCHARD et al., 1987; SCHOON et al., 1992). Für das Rind bestätigten HILLMER (2018) und in Teilen auch RODENBUSCH (2011), dass ein einzelnes Biopat den Zustand des gesamten Endometriums gut wiedergibt. Dagegen wiesen PASCOTTINI et al. (2016a) eine ungleichmäßige Verteilung entzündlicher Veränderungen im bovinen Uterus nach. Bislang fehlt allerdings ebenso der eindeutige Nachweis, dass eine einzelne zytologische Probe als repräsentativ für den Entzündungsstatus des gesamten Endometriums zu betrachten ist (ELLENBERGER et al., 2006; PASCOTTINI et al., 2016a). Demnach ist ein Einfluss lokal begrenzter entzündlicher Veränderungen auch auf die zytologische Bewertung nicht auszuschließen. Um diesen potenziellen Effekt zu evaluieren, wäre die Untersuchung von zytologischen und histologischen Proben von zwei bis drei verschiedenen endometrialen Lokalisationen pro Tier zu prüfen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde je Tier ein zweites Biopat gewonnen, welches in die molekularbiologische Analyse einging. Die Entnahme eines dritten Biopats war nach Einschätzung der Autoren nicht mit der möglichen Belastung der Versuchstiere vereinbar.

## 2. **Übergreifende Betrachtung von Uterussektret und endometrialer Genexpression**

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen an US sowie der endometrialen Genexpression übergreifend diskutiert. Dabei wird die Einteilung der Versuchstiere in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit, Vorkommen endometrialer Lymphfollikel und Zyklusstand berücksichtigt. Die Beurteilung der US geschah hinsichtlich ihres chemoattraktiven Potenzials im PMN-Chemotaxis-Assay sowie nach ihren Konzentrationen an IL1B, IL6, IL8, IL17A und IL10 in AlphaLISA-Untersuchungen. Die Genexpression von IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 wurde durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) an Endometrium-Biopsaten bewertet. Die Gegenüberstellungen der Auswertungen auf Produkt- und Genexpressionsebene sind in Tabelle 31 (Gebärmuttergesundheit), Tabelle 32 (Lymphfollikel) und Tabelle 33 (Zyklusstand, S. 154f) aufgeführt.

### 2.1. **Hintergrund**

Uterussektret: Die Gewinnung und Untersuchung von US stellt eine neue Methode in der Forschung zur SE beim Rind dar, die erstmals durch HILLMER (2018) an Schlachtoorganen angewandt wurde. Zugrunde liegt die Vorstellung, dass US ein dem Endometrium aufliegender Flüssigkeitsfilm ist, der durch Sekretion der Uterindrüsen sowie endometrialer Epithel-, Stroma- und ggf. Immunzellen komponiert wird. Seine Zusammensetzung wird als repräsentativ für den Gesundheitszustand des gesamten Endometriums angenommen. Das gewonnene US wurde mit Hilfe einer definierten Menge Extraktionspuffer und Zentrifugation aus den Merocel-Schwämmchen gelöst. Durch ein Wiegeverfahren war die Ermittlung eines individuellen Verdünnungsfaktors möglich, der von der Menge des ursprünglich gewonnenen Sekrets abhing (vgl. III.2.2.2.). Im Gegensatz zur Gewinnung von Gebärmuttersspülproben (KIM et al., 2014; BRODZKI et al., 2015c), bei denen die tatsächlich im Uterus vorhandene Menge an US und damit der Verdünnungseffekt durch das Spülmedium nicht erfasst werden, ermöglicht dieses Vorgehen die rechnerische, absolute Bestimmung der Analyten in reinem US. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Gebärmuttersspülung ist, dass die Schwämmchenmethode bei allen beprobten Tieren die Gewinnung einer US-Probe ermöglichte. Hingegen konnten KASIMANICKAM et al. (2005a) bei 17 % der mittels uteriner Lavage beprobten Kühe keine Flüssigkeit zurückzugewinnen.

Blutkontamination: Bei der Gewinnung von US traten kleine Schleimhautblutungen auf, wie dies auch regelmäßig für zytologische Proben berichtet wird (KASIMANICKAM et al., 2005b; PASCOTTINI et al., 2016a). Ihr Einfluss auf die detektierten Interleukin-Konzentrationen im US wurde berücksichtigt, indem die Blutkontamination quantifiziert und ihr Eintrag an Analyt rechnerisch korrigiert wurde (vgl. III.2.2.3.). Die statistische Auswertung bzgl. der Gebärmuttergesundheit unter Verwendung der Interleukin-Konzentrationen mit und ohne Korrektur der Blutkontamination kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen (vgl. Tabelle 9, S. 73). Hierfür sind zwei Gründe denkbar: Zum einen war die mediane Blutkontamination der US mit 5,9 % derart gering, dass ein vernachlässigbarer Einfluss auf die Interleukin-Konzentrationen im US angenommen werden kann. Zum anderen spricht dieses Ergebnis dafür, dass die untersuchten Analyten im Falle einer Endometritis mit vielfach höheren Konzentrationen im US auftreten, als der Effekt der Blutkontamination ausmacht. Daher wird für die hier analysierten Interleukine eine Korrektur der Blutkontamination in künftigen Untersuchungen als nicht erforderlich erachtet. Diese Vernachlässigbarkeit der Blutkontamination ist allerdings nicht generell anwendbar. Liegt ein Analyt allgemein oder individuell im Blut sehr viel höher konzentriert vor als im US, so ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Blutkontamination zu erwarten. Dies gilt beispielsweise für TNF $\alpha$ . Der Ausschluss stark blutkontaminierter Proben von der Auswertung (in der vorliegenden Arbeit > 33 %) wird aufgrund des vergleichsweise geringen Anteils an US in der Probe dennoch empfohlen.

Endometrium-Bioptate: Die zelluläre Zusammensetzung der Proben für die Genexpressionsanalyse hat einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse, da verschiedene Zellen und Gewebe individuelle Genexpressionsmuster aufweisen (SHEN-ORR et al., 2010). Im Rahmen von Genexpressionsstudien zur SE werden unterschiedliche Probenmaterialien verwendet (vgl. II.2.2.4.): Der Einsatz von Zellen aus Cytobrush-Abstrichen (GABLER et al., 2010; GHASEMI et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2014) ermöglicht die explizite Untersuchung endometrialer Epithelzellen. Bedingt durch den Gewinnungsprozess ist auch ein Vorkommen von Erythrozyten sowie im Falle eines SE-Nachweises von PMN zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wurden Endometrium-Bioptate für die Untersuchung der Genexpression eingesetzt (CHAPWANYA et al., 2009; HERATH et al., 2009; GALVÃO et al., 2011; JANOWSKI et al., 2017). Sie weisen

eine indifferente Zusammensetzung aus endometrialen Epithel- und Stromazellen sowie Endothel-, Immun- und Blutzellen auf (DAVIES et al., 2008). Der Anteil der verschiedenen Gewebe ist variabel, wobei nach histopathologischer Beurteilung der formalinfixierten Proben von einem großen Anteil an Stromazellen auszugehen ist. Das RT-qPCR-Ergebnis beschreibt daher nicht die Genexpression eines definierten Zelltyps, sondern spiegelt ungeachtet der genauen Zellzusammensetzung der Biopate den biologischen Ist-Zustand *in vivo* unter Beteiligung der verschiedenen Zelltypen wider. Der Nachweis der immunologischen Aktivität wurde im Rahmen von Zellkulturstudien sowohl für endometriale Epithel- als auch Stromazellen erbracht, sodass von einer simultanen Beeinflussung des uterinen Milieus durch beide Zelltypen ausgegangen werden kann (DAVIES et al., 2008; TURNER et al., 2014).

## **2.2. Uterussekret ist für die Diagnose zytologischer Endometritiden geeignet**

Nach ihrer Gebärmuttergesundheit wurden die Versuchstiere in Kühe ohne Endometritis (E.NEG), Kühe mit nur zytologisch nachweisbarer Endometritis (SE(cyto)) sowie Kühe mit nur histologisch nachweisbarer Endometritis (SE(histo)) kategorisiert. Vier Tiere mit klinischer Endometritis sowie ein Tier mit zytologisch und histologisch nachweisbarer SE wurden aufgrund niedriger Tierzahlen von der Auswertung ausgenommen. Für die Untersuchungen an US und die endometriale Genexpression wurden für einige Analyten Unterschiede zwischen E.NEG und SE(cyto) sowie zwischen SE(cyto) und SE(histo) nachgewiesen. Zwischen E.NEG und SE(histo) waren für keinen der untersuchten Parameter statistisch signifikante Unterschiede festzustellen.

### **2.2.1. Chemotaktisches Potenzial von Uterussekret**

Erstmals wurde die chemotaktische Wirkung von bovinem US auf PMN untersucht. Die relative Transmigrationsrate  $T_T$  unterschied sich zwischen den Gruppen E.NEG und SE(cyto) nicht signifikant, obwohl sie mit 73 % numerisch bei SE(cyto) deutlich höher lag als bei E.NEG (28 %). Dass dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an der breiten Streuung von  $T_T$  innerhalb von E.NEG (vgl. Abbildung 14, S. 69). Auch das US zahlreicher Tiere ohne Endometritis löste demnach eine starke PMN-Chemotaxis aus. Dagegen zeigte US bei SE(cyto) ein signifikant stärkeres chemoattraktives Potenzial als bei SE(histo). Dies deutet auf höhere Konzentrationen chemotaktisch wirksamer

Botenstoffe im US von SE(cyto) im Vergleich zu SE(histo) hin. Da diese Untersuchung einen unspezifischen biologischen Test darstellt, bleiben die zugrunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene unklar. Relevante Kandidaten wurden im weiteren Verlauf durch Bestimmung auf Produkt- und Genexpressionsebene analysiert.

### **2.2.2. Zytokine**

Zytokine sind Modulatoren der Immunantwort (JABBOUR et al., 2009). Zu ihnen zählen die hier untersuchten proinflammatorischen Interleukine IL1B, IL6, IL17A, das Chemokin IL8 sowie TNF $\alpha$ . Ihre zentrale Funktion liegt in der effektiven und schnellen Etablierung einer lokalen Immunreaktion durch Anlockung und Aktivierung zirkulierender Leukozyten, Ausbildung endothelialer Adhäsionsmoleküle und Erhöhung der Gefäßpermeabilität (SINGH et al., 2008; HOLDSWORTH und GAN, 2015). Antiinflammatorische Zytokine wie IL10 vermitteln die Begrenzung der Entzündung und die Wiederherstellung zerstörten Gewebes (SHELDON et al., 2014).

#### **2.2.2.1. Proinflammatorische Zytokine**

Interleukin-1B: Für IL1B wurde im Uterus eine übereinstimmende Regulation auf Transkriptions- und Produktebene gefunden. Bei SE(cyto) fand sich IL1B in signifikant höheren Konzentrationen im US und wurde im Endometrium signifikant stärker exprimiert als bei gebärruttergesunden Kühen. IL1B ist ein bedeutender Regulator der lokalen und systemischen Abwehr, der die Sekretion u. a. von Prostaglandinen, Chemokinen (IL8) und Interleukinen (IL6) stimuliert (DINARELLO, 2009). Seine verstärkte Genexpression im entzündeten Endometrium wurde bei Kühen bereits wiederholt nachgewiesen (FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; KASIMANICKAM et al., 2014; PETER et al., 2015; WAGENER et al., 2017b). Untersuchungen zu IL1B auf Produktebene fanden bislang lediglich bei KIM et al. (2014) statt: Hier konnte mit vier Wochen p.p. keine Beeinflussung der IL1B-Konzentration in Gebärmuttersspülproben durch zytologisch diagnostizierte SE nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung fand dabei keine Berücksichtigung der Verdünnung des US während der Gewinnung statt. Diese zu vernachlässigen ist eine mögliche Ursache für nicht darstellbare, aber biologisch vorhandene Unterschiede. Die Anwendung unterschiedlicher PMN-Grenzwerte für die zytologische SE-Diagnose

(5 % in der vorliegenden Arbeit bzw. 18 % bei KIM et al. (2014)) stellt eine weitere denkbare Erklärung für die aufgezeigten Abweichungen dar.

Interleukin-6: Zwischen gebärmuttergesunden Kühen und SE(cyto) wurden keine signifikanten Unterschiede für die IL6-Konzentration im US sowie die IL6-Expression in endometrialem Gewebe festgestellt. Dabei wird dem Interleukin eine pleiotrope Wirkung in der Verstärkung lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen ähnlich zu IL1B zugeschrieben (HOLDSWORTH und GAN, 2015). Die graphische Darstellung (vgl. Abbildung 15, S. 72, und Abbildung 17, S. 79) liefert hierfür eine mögliche Erklärung: Auch zahlreiche als gebärmuttergesund kategorisierte Kühe wiesen hohe IL6-Konzentrationen im US sowie eine starke endometriale mRNA-Expression von IL6 auf. Es ist nicht auszuschließen, dass hierfür die nachweislich geringe Rückgewinnungsrate von IL6 (58 %) aus den Merocel-Schwämmchen (CASTLE et al., 2004) sowie seine insgesamt schwache mRNA-Expression in den Endometrium-Biopsaten im Bereich der Extrapolation der Standardkurve verantwortlich sind.

Der fehlende Nachweis einer IL6-Präsenz bei SE deckt sich mit Resultaten anderer Autoren für die Genexpression (FISCHER et al., 2010; KASIMANICKAM et al., 2014; WAGENER et al., 2017b) sowie für den direkten Nachweis von IL6 in Gebärmuttersspülproben (KIM et al., 2014). Weitere Autoren wiesen dagegen im Endometrium höhere IL6-Transkriptabundanzen bei Endometritis nach (GABLER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; GHASEMI et al., 2012). Hierbei ist bedeutend, dass GABLER et al. (2010) und GALVÃO et al. (2010) keine Unterscheidung zwischen klinischer Endometritis (KE) und SE vornahmen. Eine Korrelation zwischen dem endometrialen PMN-Gehalt und der mRNA-Expression konnten GABLER et al. (2010) dagegen nur für IL1B und IL8, nicht aber für IL6, nachweisen. Da KE und SE unterschiedliche Ausprägungen endometrialer Entzündungen darstellen, ist ihre getrennte Beurteilung sinnvoll (DUBUC et al., 2010b; BARAŃSKI et al., 2013b). BRODZKI et al. (2015b) fanden entgegen der vorliegenden Untersuchung höhere Konzentrationen an IL6 in Gebärmuttersspülproben von Tieren, bei denen zytologisch an Tag 60 p.p. eine SE diagnostiziert wurde. Eine mögliche Erklärung der Diskrepanz zur vorliegenden Arbeit ist, dass in die genannte Studie nur Kühe aufgenommen wurden, die zwischen 21 und 47 Tagen p.p. an KE erkrankt waren und eine intrauterine antibiotische Behandlung erhalten hatten.

Interleukin-8: Die Untersuchungen an US und Endometrium-Bioptaten zeigten in der statistischen Auswertung für IL8 übereinstimmende Resultate. Verglichen mit gebärruttergesunden Kühen fand sich IL8 bei SE(cyto) in signifikant höheren Konzentrationen im US und wurde im Endometrium signifikant stärker exprimiert. IL8 zählt zu den Chemokinen (auch ‚CXCL8‘) und gilt als der stärkste chemotaktische Faktor für PMN (WUYTS et al., 2003; ROMAGNANI et al., 2004). Sein chemoattraktives Potenzial im bovinen Uterus wurde *in vivo* durch ZERBE et al. (2003) belegt. Die Hochregulation von IL8 bei SE stimmt sowohl auf Produktebene (KIM et al., 2014) als auch auf Transkriptionsebene (FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; GHASEMI et al., 2012; LOYI et al., 2013; PETER et al., 2015) mit der Literatur überein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für IL8 gleichen denen für IL1B. Diese Kongruenz stellten auch GABLER et al. (2010), FISCHER et al. (2010) und PETER et al. (2015) fest. Da IL1B (neben TNF $\alpha$ ) als potenter Stimulator der IL8-Sekretion gilt, ist ein derart synchroner Anstieg beider Zytokine zu erwarten (WUYTS et al., 2003; GIJSBERS et al., 2005). Die initiale IL1B-Präsenz vor dem Auftreten von IL8 ist aufgrund der Chronizität der SE nicht darzustellen.

Interleukin-17A: In der vorliegenden Studie wurde IL17A im bovinen US nachgewiesen. SE(cyto) zeigte signifikant höhere Konzentrationen an IL17A verglichen mit gebärruttergesunden Kontrolltieren. Die zentrale Rolle dieses Interleukins in der Regulation und Verstärkung der Immunabwehr ist erst seit etwa 25 Jahren bekannt (ROUVIER et al., 1993; YAO et al., 1995). IL17A verstärkt die Bildung zahlreicher Mediatoren im Gewebe, darunter IL6, PGE<sub>2</sub> und antimikrobielle Peptide (DINARELLO, 2009; MENSIKOVA et al., 2013). Seine Bedeutung für die SE des Rindes ist bislang kaum erforscht. JOHNSON et al. (2015) wiesen eine verstärkte mRNA-Expression von IL17A bei Kühen mit SE im Vergleich zu gebärruttergesunden Kühen nach. Bei bovinen Mastiden wurde eine Hochregulation der IL17A-Expression in Eutergewebe sowie in somatischen Zellen der Milch nachgewiesen (RIOLLET et al., 2006; TAO und MALLARD, 2007; WHELEHAN et al., 2011). Eine Veränderung der Genexpression in Blut-Leukozyten wurde nicht festgestellt, weshalb IL17A vor allem eine Beteiligung an lokalen Abwehrmechanismen zugeschrieben wird (TAO und MALLARD, 2007). Die weitere Evaluierung seiner Rolle bei der SE des Rindes, auch auf Ebene der Genexpression, ist anzustreben.

Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ : In der hier vorgestellten Arbeit wurde die endometriale Genexpression von TNF $\alpha$  untersucht. Dabei wurde eine tendenziell stärkere Expression im Endometrium von SE(cyto) im Vergleich zu E.NEG nachgewiesen. Das Zytokin ist vor allem für die Initiierung der unspezifischen Immunantwort bedeutend (KSONTINI et al., 1998; HEHLGANS und PFEFFER, 2005). Denkbar ist daher, dass aufgrund des chronischen Charakters der SE eine deutliche Hochregulation von TNF $\alpha$  nicht mehr darzustellen ist. In der Literatur wird über unterschiedliche Forschungsergebnisse berichtet: Während einige Autoren eine verstärkte endometriale Genexpression von TNF $\alpha$  bei Kühen mit Endometritis feststellten (FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; GHASEMI et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2014; PETER et al., 2015), fanden andere Studien hier keinen Zusammenhang (GALVÃO et al., 2011). In Gebärmuttersspülproben wiesen BRODZKI et al. (2015c) bei Kühen mit SE 40 Tage p.p. sogar reduzierte TNF $\alpha$ -Konzentrationen nach. Mit 60 Tagen p.p. fanden die Autoren genauso wie KIM et al. (2014) keinen Unterschied zu gebärmuttergesunden Kühen (BRODZKI et al., 2015b). Eine Untersuchung auf Produktebene fand im Rahmen der vorliegenden Studie nicht statt, da für TNF $\alpha$  eine rechnerische Korrektur der Blutkontamination von US aufgrund vielfach höherer TNF $\alpha$ -Konzentrationen in Blutplasma (etwa 3 log-Stufen) als nicht sinnvoll erachtet wurde. Insgesamt reihen sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung in das uneinheitliche Bild der Regulation von TNF $\alpha$  bei SE ein. Eine eindeutige Aussage zu seiner Beteiligung an der Pathologie der SE ist aufgrund der tendenziellen Unterschiede in der endometrialen Genexpression nicht zu treffen.

#### **2.2.2.2. Antiinflammatorisches Zytokin IL10**

IL10 zeigte bei SE(cyto) tendenziell höhere Konzentrationen im US sowie eine signifikant stärkere endometriale mRNA-Expression im Vergleich zu Kühen ohne Endometritis. In der Literatur finden sich zur Rolle von IL10 bei bovinen Endometritiden bislang nur wenige Untersuchungen, die uneinheitliche Ergebnisse dokumentieren. GALVÃO et al. (2011) stellten auf Ebene der Genexpression keinen Unterschied zwischen gebärmuttergesunden Kühen und Kühen mit Endometritis fest, wobei die Diagnose zytologisch ohne vaginoskopischen Ausschluss einer KE gestellt wurde. BRODZKI et al. (2015c) fanden dagegen übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit eine Hochregulation von IL10 in Gebärmuttersspülproben von Kühen mit SE, während KIM et al. (2014) dies nur für

KE, nicht aber für SE, bestätigten. IL10 ist das bedeutendste antiinflammatorische Zytokin und besitzt die Fähigkeit zur Eindämmung der Immunantwort und Kontrolle von Gewebeschäden infolge exzessiver Abwehrreaktionen (COUPER et al., 2008; MOSSER und ZHANG, 2008; HOLDSWORTH und GAN, 2015). Eine betont antiinflammatorische Abwehrlage im Endometrium könnte die Ausprägung der physiologischen puerperalen Entzündung zur Elimination eingedrungener Erreger und Wiederherstellung der uterinen Epithelintegrität unterdrücken und damit die Entstehung chronischer, subklinischer Endometritiden begünstigen. *In vitro*-Untersuchungen von HILLMER (2018) unterstützen diese These: Nach Inkubation isolierter uteriner Epithelzellen mit US von Kühen mit SE wurde eine ausbleibende Herunterregulation der IL10-Expression im Vergleich zum Einsatz von US gebärmuttergesunder Kühe nachgewiesen. Die gleichzeitig verstärkte Präsenz proinflammatorischer Mediatoren bei SE deutet die Autorin als kontinuierlichen Wechsel aus Auf- und Abflammen der uterinen Entzündungsreaktion. In der Folge kann die Entzündung weder abheilen noch klinisch manifest werden (HILLMER, 2018).

### 2.2.3. Enzym der Prostaglandin-Synthese PTGS2

Neben Zytokinen spielen Botenstoffe auf Lipidbasis, sog. Eikosanoide, eine bedeutende Rolle sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Vorgängen im Endometrium (FISCHER et al., 2006; JABBOUR et al., 2009). Für die endometriale Genexpression der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2) wurde in der vorliegenden Arbeit keine Beeinflussung durch die Gebärmuttergesundheit dokumentiert. PTGS2 (auch ‚Cyclooxygenase 2‘) ist ein induzierbares Enzym, das im Endometrium maßgeblich den Umbau von Arachidonsäure zu Prostaglandin (PG)  $H_2$  katalysiert. Dieses wird durch PG-Synthasen weiter zu Prostaglandinen (z. B.  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ) prozessiert (AROSH et al., 2002; PARENT et al., 2002; KOHLI und LEVY, 2009). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiesen FISCHER et al. (2010) und PETER et al. (2015) eine Endometritis-unabhängige Regulation der endometrialen PTGS2-Expression nach. Dagegen fanden GABLER et al. (2010) eine verstärkte Genexpression von PTGS2 bei Kühen mit Endometritis, wobei SE und KE nicht differenziert betrachtet wurden. Prostaglandinen wird eine maßgebliche Beteiligung an den Fertilitätseffekten der SE zugeschrieben, wobei die Mechanismen nicht geklärt sind. Einige Untersuchungen belegten einen PG-Switch von  $PGF_{2\alpha}$  zu  $PGE_2$  bei Vorliegen einer

SE (HERATH et al., 2006; BARAŃSKI et al., 2013b), der infolge verlängerter Lutealphasen zu reduzierter Fertilität führen könnte (GABLER et al., 2010). GABLER et al. (2009) und WAGENER et al. (2017b) betrachten dagegen die reduzierte Produktion von PGE<sub>2</sub> als mögliche Erklärung für den negativen Einfluss von SE auf die Fruchtbarkeit: PGE<sub>2</sub> ist als luteoprotektiver Faktor zusammen mit IFN- $\tau$  bedeutend für die Trächtigkeitserkennung und -erhaltung (PARENT et al., 2002). Die Bedeutung der Prostaglandine sowie relevanter Enzyme zur Prostaglandin-Synthese für die Pathogenese und die Fertilitätseffekte subklinischer Endometritiden erfordern weitere Untersuchungen.

#### 2.2.4. Antimikrobielles Peptid S100A9

Antimikrobielle Peptide sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, die u. a. auf Schleimhäuten vorkommen. Zu ihnen gehören Defensine, Kalzium-bindende S100-Proteine und Kathelizidine (ROTH et al., 2003; FOELL et al., 2007; YANG und OPPENHEIM, 2009; IBRAHIM et al., 2016). Die vorliegende Arbeit analysierte die Genexpression von S100A9 in Endometrium-Biopsaten. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen SE(cyto) und E.NEG festgestellt. Bei *in vitro*-Simulation einer bakteriellen Infektion des Uterus durch Inkubation endometrialer Zellen mit LPS wurden dagegen veränderte Genexpressionsmuster für zahlreiche antimikrobielle Peptide, darunter S100A9, festgestellt (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012). Die fehlende Hochregulation der endometrialen Expression von S100A9 bei SE(cyto) kann damit begründet werden, dass SE nicht zwingend mit einer bakteriellen Infektion des Endometriums einhergeht (MCDUGALL et al., 2011; BARAŃSKI et al., 2012; MADDOZ et al., 2014; PETER et al., 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Bakterien aus dem Uterus von nur einem der sieben als SE(cyto) kategorisierten Tiere isoliert. Im Rahmen von SE scheint demnach ein Schutz durch antimikrobielle Peptide nicht die zentrale Aufgabe der Schleimhaut zu sein. Dieser Hypothese entgegen stehen Untersuchungsergebnisse von IBRAHIM et al. (2016): Die antimikrobiellen Peptide S100A8 und S100A9 wurden im Endometrium von Kühen mit SE stärker exprimiert als bei gebärmuttergesunden Kühen. Es liegt nahe, dass die fehlende Erhebung des bakteriologischen Status des Endometriums in der genannten Studie die Diskrepanz zur hier vorliegenden Arbeit bedingt. Bei Bestehen einer bakteriellen Infektion des Uterus ist ungeachtet seines Entzündungsstatus eine Hochregulation antimikrobieller Substanzen denkbar.

### **2.3. Untergeordnete Bedeutung histologischer Endometritiden**

Zwischen gebärmuttergesunden Kühen und SE(histo) waren hinsichtlich der untersuchten Parameter im US sowie der endometrialen Genexpression keine Unterschiede festzustellen. Im Vergleich mit SE(cyto) wies SE(histo) dagegen eine signifikant geringere chemoattraktive Wirkung auf PMN und niedrigere Konzentrationen an IL8 im US sowie eine signifikant schwächere Expression von IL1B und IL8 in Endometrium-Biopsaten auf. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass lediglich histopathologisch nachweisbare SE keinen Einfluss auf das uterine Milieu und die endometriale Genexpression zu nehmen scheint. Zum anderen wird die Notwendigkeit einer Abgrenzung von zytologisch nachweisbarer SE und histopathologisch nachweisbarer SE bzgl. ihres Pathomechanismus und ihrer Erscheinung unterstrichen. Nur histopathologisch detektierbare SE stellt eine chronische, lymphoplasmazelluläre Entzündung des Endometriums dar, bei der (zytologisch nachweisbare) PMN selten vorkommen (vgl. IV.2.3.). Hinzu kommt, dass eine starke Präsenz von Lymphozyten und Plasmazellen im bovinen Endometrium auch im Rahmen physiologischer Vorgänge im Verlauf des Sexualzyklus belegt ist (RODENBUSCH, 2011; MADOZ et al., 2014). Es ist vorstellbar, dass deren Abgrenzung zu pathologischen Veränderungen nicht immer eindeutig möglich ist. Unter Berücksichtigung der nicht nachzuweisenden Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit betroffener Tiere ist daher insgesamt von einer untergeordneten Bedeutung von histologischen Endometritiden für die bovine Reproduktion auszugehen.

### **2.4. Pathologische Bedeutung endometrialer Lymphfollikel nicht nachweisbar**

Sowohl bei gebärmuttergesunden Kühen als auch bei Kühen mit Endometritis traten Lymphozyten teilweise in Form von Lymphfollikeln subepithelial im endometrialen Stroma auf. Ihre Auswirkung auf das US sowie die endometriale Genexpression wurde innerhalb der gebärmuttergesunden Tiere untersucht. Verglichen mit LF- wurden im US von LF+ signifikant höhere Konzentrationen an proinflammatorischem IL17A sowie antiinflammatorischem IL10 festgestellt, während IL1B, IL6 und IL8 durch das Vorkommen von Lymphfollikeln unbeeinflusst blieben. Auf Ebene der endometrialen Genexpression waren dagegen keine signifikanten Unterschiede für IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 zwischen Tieren ohne und mit Lymphfollikeln zu finden.

Zur Bedeutung endometrialer Lymphfollikel bietet die Literatur verschiedene Hypothesen: Nach MCENTEE (1985) sind sie pathologische Strukturen im Endometrium und Indikatoren einer chronischen Entzündungsreaktion. Diese These stützen Untersuchungen von ANDERSON et al. (1996), die nach der Infektion von Rindern mit *Tritrichomonas foetus* umgrenzte Lymphozytenansammlungen im Endometrium fanden. SCHULZ (1991) bewertet endometriale Lymphfollikel als Ausdruck einer Immunkompetenz nach überstandener Entzündung, die nicht zwangsläufig zu einer Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit führen. RODENBUSCH (2011) fanden Lymphfollikel in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit sowohl bei gebärruttergesunden Kühen als auch bei Kühen mit Endometritis. Dabei traten Lymphfollikel analog zu BONNETT et al. (1993) häufiger bei Kühen mit guter Fertilität auf. Dies begründen die Autoren mit einer durch die Lymphfollikel vermittelten größeren Widerstandsfähigkeit der Gebärrutter gegenüber transzervikal eindringenden Pathogenen. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Beeinflussung relevanter Fruchtbarkeitsparameter durch das Auftreten von Lymphfollikeln dokumentiert. Zusammen mit den geringen Auswirkungen auf das US sowie den ausbleibenden Effekten auf die endometriale Genexpression wird geschlussfolgert, dass Lymphfollikel auch im endometrialen Stroma gebärruttergesunder Kühe auftreten können und deren Fruchtbarkeit nicht zwangsläufig negativ beeinflussen. Welche physiologische oder pathologische Bedeutung den follikulären Lymphozytenansammlungen zukommt, bleibt unklar.

### **2.5. Zyklusbedingte Modifikation von Uterussekreten und endometrialer Genexpression**

Der Kenntnisstand zu zyklusbedingten Veränderungen in der Abwehrbereitschaft des Uterus wurde in II.1.2. erörtert. Im Allgemeinen wird in der Literatur eine erhöhte Aktivität der uterinen Immunabwehr während der Follikelphase dokumentiert, während lokale Abwehrmechanismen der Gebärrutter unter Progesteroneinfluss als supprimiert gelten (LEWIS, 2004). Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche den Einfluss des Zyklusstands auf das uterine Milieu auf Produktebene beleuchtet. Zur Auswertung wurden gebärruttergesunde Kühe anhand ihres Ovarbefunds in Follikel- und Lutealphase kategorisiert.

### 2.5.1. Proinflammatorische Zytokine

Die durch das US stimulierte PMN-Chemotaxis war tendenziell in der Lutealphase höher als in der Follikelphase, was überraschenderweise auf ein höheres chemoattraktives Potenzial unter Progesteroneinfluss hindeutet. Verglichen mit Tieren in der Follikelphase wiesen Tiere in der Lutealphase auch signifikant höhere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL8 und IL17A im US auf, während für IL1B keine Unterschiede bestanden. Die endometriale Genexpression von IL1B, IL6, IL8 sowie auch von TNF $\alpha$  unterschied sich dagegen für Follikel- und Lutealphase nicht signifikant. Diese zyklusunabhängige Genexpression im Endometrium stimmt weitgehend mit der Literatur überein (FISCHER et al., 2010; GÄRTNER et al., 2015; PETER et al., 2015). Im Gegensatz dazu fanden FISCHER et al. (2010) in Untersuchungen an gesunden Schlachtoorganen eine verstärkte endometriale Expression von IL1B und IL8 während der Follikelphase. Schlachtgrund und Zeitraum p.p. fanden dabei keine Berücksichtigung, obwohl ein Einfluss auf die Ergebnisse denkbar ist. Möglicherweise resultieren die Abweichungen zur vorliegenden Arbeit aus dem Einsatz unterschiedlicher Probenmaterialien: FISCHER et al. (2010) wiesen durch die Verwendung von CB-Material evtl. eine zyklusabhängige Regulation speziell bei uterinen Epithelzellen nach. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen Endometrium-Biopsate molekularbiologisch analysiert, wodurch u. a. auch Stromazellen in die Untersuchung eingingen.

Der Nachweis einer stärkeren Präsenz der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL8 und IL17A im US während der als immunsupprimiert geltenden Lutealphase ist unerwartet. Der signifikante Unterschied für IL6 ist dabei jedoch vorsichtig zu betrachten, da Follikel- und Lutealphase den gleichen Medianwert aufwiesen. Die Unterschiede bei IL8 und IL17A sind hingegen als deutlich einzuschätzen. Angesichts der fehlenden Übereinstimmung der Resultate aus Protein- und Expressionsanalyse liegt die Erklärung nahe, dass die kontinuierliche, undulierende Beeinflussung des Endometriums durch hormonelle Vorgänge im Verlauf des Sexualzyklus an der Regulation der Genexpression ansetzt. Denkbar ist, dass sich erst im Nachgang auch die Menge der produzierten Botenstoffe im US ändert, woraus ein zeitlicher Versatz zum Transkriptionsmuster resultiert. Zusätzlich kann die posttranskriptionelle Regulation von mRNA-Prozessierung und -Translation sowie Proteinfreisetzung Diskrepanzen zwischen Expressions- und Produktebene bedingen (DAY und TUIE, 1998).

Eine weitere mögliche Erklärung dieser unerwartet hohen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine im lutealen US ist, dass die Zuordnung der Tiere zu Follikel- und Lutealphase aus zweierlei Gründen eventuell nicht ausreichend zuverlässig ist: Da die Zykluseinteilung anhand der Präsenz eines Gelbkörpers geschah, besteht eine gewisse Gefahr der falschen Kategorisierung, da beispielsweise Tiere schon im Proöstrus waren, aber wegen eines noch großen Gelbkörpers in die Lutealphase eingeteilt wurden. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass eine feinere Aufgliederung der einzelnen Zyklusphasen, etwa in prä- und postovulatorische Phase sowie frühe und späte Lutealphase, oder aber während des Diöstrus in Phasen mit und ohne Existenz eines dominanten Follikels (Follikelwelle) aussagekräftiger gewesen wäre. Das Endometrium, das sich in Vorbereitung auf die Follikelphase, am Übergang zur Lutealphase oder unter dem hormonellen Einfluss einer Follikelwelle befindet, ist in seiner immunologischen Aktivität nicht mit dem ‚ruhenden‘ Endometrium in der Mitte der Lutealphase gleichzusetzen (ADAMS, 1999; AROSH et al., 2002; NOAKES, 2009; FISCHER et al., 2010). Die beschriebene dynamische Beeinflussung des Endometriums durch zyklusbedingte Hormonprofile lässt sich durch die grobe Einteilung in Follikel- und Lutealphase nicht adäquat abbilden. Da jedoch die Untersuchung zyklusabhängiger Veränderungen nicht zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war, wurde keine feinere Klassifizierung der Tiere vorgenommen. Hierfür wären regelmäßige klinische und sonographische Untersuchungen sowie die Bestimmung der Sexualsteroid Progesteron und Östrogen notwendig gewesen, die nicht Teil des Versuchsplans waren.

Einen zusätzlichen Erklärungsansatz dieser unerwarteten Befunde bietet die Viskosität des US, die in der Follikelphase deutlich höher ist. Es ist nicht auszuschließen, dass folglich bei der Zentrifugation der Merocel-Schwämmchen ein größerer Anteil an US zusammen mit den untersuchten Analyten im Schwämmchen zurückblieb und nicht durch die Filtermembran ins Eluat gelangte. So könnten falschniedrige Konzentrationen der untersuchten Botenstoffe im US zustande gekommen sein. Dass dennoch die Menge untersuchter Analyten im eluierten US in Follikel- und Lutealphase gleichermaßen genügt, um signifikante Unterschiede hinsichtlich der Gebärmuttergesundheit festzustellen, liegt vermutlich an der vielfach stärkeren Präsenz der Botenstoffe bei Vorliegen einer Endometritis. Demnach präsentiert sich die Untersuchung von US als nicht geeignet, um die marginalen Unterschiede verschiedener Interleukine im Verlauf des Sexualzyklus adäquat abzubilden.

### **2.5.2. Antiinflammatorisches Zytokin IL10**

Für das antiinflammatorische Zytokin IL10 wurden im US keine signifikanten zyklusabhängigen Konzentrationsunterschiede festgestellt. Dagegen ergab die molekularbiologische Evaluierung eine signifikant stärkere mRNA-Expression von IL10 während der Lutealphase im Vergleich zur Follikelphase. In der Literatur findet sich kein Hinweis auf eine Untersuchung der zyklusabhängigen Expression von IL10 im Endometrium. Das Zytokin ist der zentrale Vermittler der antiinflammatorischen Reaktion (COUPER et al., 2008; MOSSER und ZHANG, 2008; HOLDSWORTH und GAN, 2015). Seine verstärkte Präsenz unter Progesteroneinfluss ist konform mit der Vorstellung, dass das Endometrium hier eine reduzierte immunologische Aktivität zeigt (LEWIS, 2004). Mögliche Erklärungen für die mangelnde Übereinstimmung der Produkt- und Transkriptionsanalysen wurden in V.2.5.1. diskutiert.

### **2.5.3. Enzym der Prostaglandin-Synthese PTGS2 und antimikrobielles Peptid S100A9**

Zusätzlich zu den Zytokinen wurde ein Enzym des Arachidonsäuremetabolismus (PTGS2) sowie ein antimikrobielles Peptid (S100A9) im Endometrium in Abhängigkeit vom Zyklusstand molekularbiologisch analysiert. PTGS2 zeigte sich in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten während der Lutealphase verstärkt exprimiert (AROSH et al., 2002; FISCHER et al., 2010). Die erhöhte Präsenz im lutealen Endometrium unterstützt die Vorstellung, dass PTGS2 durch Vermittlung der Synthese von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> an der Regulation physiologischer Vorgänge im Uterus beteiligt ist, darunter Luteoprotektion und Luteolyse (AROSH et al., 2002; FISCHER et al., 2006; JABBOUR et al., 2009). Infolge der potenziell regulatorischen Funktion von PTGS2 durch die Synthese antiinflammatorischer Moleküle wie PGD<sub>2</sub> (JABBOUR et al., 2009) könnte das Enzym während der Lutealphase auch analog zu IL10 eine reduzierte Ansprechbarkeit der lokalen Immunantwort bedingen. Dagegen wiesen PETER et al. (2015) und GÄRTNER et al. (2015) eine zyklusunabhängige Expression von PTGS2 in endometrialem Gewebe nach. Die Abweichung zur vorliegenden Arbeit gründet möglicherweise auf der Analyse unterschiedlicher Probenmaterialien: Während die hier vorgestellte Arbeit Endometrium-Biopsate in der RT-qPCR einsetzte, verwendeten PETER et al. (2015) und GÄRTNER et al. (2015) Zellen aus Cytobrush-Proben. Dieser Befund deutet an, dass den Zellen des endometrialen Stromas, die mittels Biopsie

erfasst werden, ein größerer Beitrag an der zyklusabhängigen Produktion von PTGS2 zukommt als endometrialen Epithelzellen.

Das antimikrobielle Peptid S100A9 zeigte eine vom Zyklusstand unabhängige Expression im Endometrium, wie dies bereits durch IBRAHIM et al. (2016) belegt wurde. Die Autoren schließen auf eine konstitutive Expression und Präsenz einiger körpereigener antimikrobieller Moleküle zur Wahrung einer zyklusunabhängigen, stabilen Abwehrlage des Uterus (IBRAHIM et al., 2016).

#### **2.5.4. Kombiniertes Einfluss von Gebärmuttergesundheit und Zyklusstand**

Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass die endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene vom Zyklusstand abhängt, findet dieser bei molekularbiologischen Untersuchungen oder Proteinnachweis im Hinblick auf subklinische oder klinische Endometritiden in der Regel keine Berücksichtigung (HERATH et al., 2009; FISCHER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; GHASEMI et al., 2012; KASIMANICKAM et al., 2014; KIM et al., 2014; BRODZKI et al., 2015b). Einige Autoren belegten dagegen eine zyklusunabhängige Expression der untersuchten Signalmoleküle vor der Auswertung nach Gebärmuttergesundheit (GABLER et al., 2010; GÄRTNER et al., 2015; PETER et al., 2015). Auch eine gleichmäßige Verteilung der beprobten Tiere auf die verschiedenen Zyklusstadien wird zumeist nicht angestrebt. Einzig JANOWSKI et al. (2017) nahmen ausschließlich Kühe mit Corpus luteum in ihre Studie auf. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Einteilung der Tiere nach Gebärmuttergesundheit und Zyklusstand zugleich angestellt. Für eine diesbezügliche valide statistische Auswertung wären dann größere Gruppen und somit eine umfangreichere Stichprobe an Versuchstieren erforderlich gewesen (hier:  $n = 3$  SE(cyto) in Follikelphase und  $n = 3$  SE(cyto) in Lutealphase). Eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der Tiere innerhalb der Gruppen an Gebärmuttergesundheit auf Follikel- und Lutealphase wurde sichergestellt (vgl. Abbildung 13, S. 66). Dass ungeachtet des Zyklusstands Unterschiede im IL-Gehalt von US und der endometrialen Expression entzündungsrelevanter Gene zwischen gebärmuttergesunden Tieren und SE(cyto) festgestellt wurden, ist offenbar auf eine vielfach stärkere Hochregulation der Analyten im Falle einer Entzündung zurückzuführen. Zyklusbedingte Effekte sind dabei wohl von nachrangiger Bedeutung.

LOYI et al. (2015) analysierten die endometriale Expression verschiedener Zytokine bei Kühen mit Endometritis zu verschiedenen Zyklusstadien. Die Untersuchung an isolierten bovinen Uteri im Schlachthof verglich Organe mit KE oder SE in der Follikel- oder Lutealphase mit gesunden Organen im gleichen Zyklusstadium ( $n = 6$  je Untergruppe). Zwar zeigten Tiere mit SE in beiden Zyklusphasen eine numerisch stärkere mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL8 und TNF $\alpha$ , bei der statistischen Auswertung wurden signifikante Unterschiede allerdings nur für IL6 und TNF $\alpha$  während der Lutealphase nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten auf einen gleichzeitigen Einfluss von Gebärmuttergesundheit und Zyklusstand auf die endometriale Genexpression hin. Die Autoren vermuten, dass Endometritiden zu einer verstärkten Expression proinflammatorischer Zytokine führen, wobei das Ausmaß der differentiellen Expression vom Grad der Entzündung (KE/SE) sowie dem Zyklusstand abhängt (LOYI et al., 2015). Es ist zu überprüfen, ob die Ergebnisse von LOYI et al. (2015) auch bei *in vivo*-Untersuchungen nachzuvollziehen sind. Dabei ist die in V.2.5.1. beschriebene Ansprache des Zyklusstands anhand von Hormonuntersuchungen sowie eine feinere Untergliederung der Zyklusphasen anzustreben. Bei der Interpretation der genannten Ergebnisse ist darüber hinaus zu berücksichtigen, dass der Schlachtgrund keine Berücksichtigung fand, obwohl lediglich Tiere mit mindestens 120 Tage p.p. in die Studie aufgenommen wurden. Es ist denkbar, dass mitunter aufgrund von Subfertilität abgegangene Tiere beprobt wurden, die auch ohne nachweisbare Endometritis veränderte endometriale Expressionsmuster aufweisen können (WAGENER et al., 2017b).

### **3. Beeinflussen subklinische Endometritiden die Fruchtbarkeit?**

Ogleich die Auswirkungen subklinischer Endometritiden auf die Fruchtbarkeit von Rindern keine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit darstellten, wurden relevante Fruchtbarkeitsparameter zwischen Kühen mit und ohne SE ausgewertet. Ein Tier der Gruppe SE(cyto) wurde aufgrund des wiederholten Auftretens Zystischer Ovarfollikel und achtmaliger erfolgloser KB vor der Etablierung einer neuen Trächtigkeit gemerzt und daher nicht in die Auswertung der Fruchtbarkeitskennzahlen aufgenommen. Dabei wurde keine Beeinflussung von Besamungsaufwand, Güst- und Verzögerungszeit durch zytologisch oder histologisch nachweisbare SE festgestellt. Zu diesen Resultaten kamen auch

PLÖNTZKE et al. (2010) und PRUNNER et al. (2014a). Dagegen wiesen eine Vielzahl von Autoren eine teils massive Beeinträchtigung verschiedener Fruchtbarkeitskennzahlen nach: Tiere mit SE zeigten im Vergleich zu gebärmuttergesunden Tieren um 18 % bis 70 % reduzierte Erstbesamungserfolge und um 25 bis 88 Tage verlängerte Gützeiten (KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008; BARAŃSKI et al., 2012; PASCOTTINI et al., 2017b). Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse ist, dass bei einigen Autoren vaginoskopisch detektierbare KE nicht zum Ausschluss führte (GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008), sodass die additiven Effekte von KE und SE auf die Fruchtbarkeit gemessen wurden. Die wahrscheinlichere Begründung ist allerdings, dass in der vorliegenden Untersuchung die erste künstliche Besamung (KB) im Mittel 35 Tage (Min.: 2 Tage, Max.: 86 Tage) nach der Beprobung der Versuchstiere erfolgte. In dieser Zeit konnten vorhandene subklinische Entzündungen abheilen, sodass sie keinen Einfluss mehr auf den Besamungserfolg nahmen. Die Diagnose der SE im Rahmen der KB liefert demnach die aussagekräftigsten Ergebnisse zu ihrem direkten Effekt auf die Fruchtbarkeit und wird mittels Cytotape praktiziert (vgl. II.2.2.1.). Damit wurde eine Reduktion der Konzeptionsrate bei Tieren mit SE zum Zeitpunkt der KB um 31 % im Vergleich zu gebärmuttergesunden Tieren nachgewiesen (PASCOTTINI et al., 2017b).

#### **4. Fazit: Eignung von Uterussekret zur Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind**

Die eingangs aufgestellten Hypothesen, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten, werden nun abschließend besprochen.

Das neu entwickelte Probenentnahmeggerät zur Uterussekretgewinnung ist am Tier anwendbar.

Das von HILLMER (2018) entwickelte Probenentnahmeggerät wurde erstmalig *in vivo* eingesetzt und präsentierte sich als geeignet für die aufeinanderfolgende Gewinnung von Uterussekret (US) sowie zytologischen, histologischen und bakteriologischen Endometrium-Proben beim Rind. Die US-Entnahme mit Merocel-Schwämmchen stellte dabei eine nichtinvasive Methode dar, die von den Tieren sehr gut toleriert wurde und bei allen vorgestellten Kühen zum Erhalt auswertbarer Proben führte. Die Fertilität der Versuchstiere blieb durch die Beprobung

nachweislich unbeeinflusst. Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion zur Antibiotagrupppflicht in der Tiermedizin (BMEL, 2018) macht die Möglichkeit der kombinierten Gewinnung von US und bakteriologischen Proben mit Hilfe der Merocel-Schwämmchen die Untersuchung auch jenseits der SE-Diagnostik interessant.

Geeignete diagnostische Marker für subklinische Endometritis lassen sich im Uterussekret identifizieren.

Der quantitative Nachweis entzündlicher Botenstoffe im US stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Diagnose der subklinischen Endometritis (SE) dar. Die vergleichsweise geringen Mengen zu gewinnenden US erfordern einen Test, der trotz niedriger Probenvolumina zuverlässige Ergebnisse liefert. Hierfür erwies sich die AlphaLISA-Technik als geeignet. Die proinflammatorischen Zytokine IL1B, IL8 und IL17A präsentierten sich als potenzielle diagnostische Marker für SE. Sie könnten einen Ausgangspunkt für zukünftige Forschungsprojekte darstellen, um einen cow-side-Test zur Diagnose der SE anhand von US zu entwickeln. Zusätzlich ist die Eignung von IL10 für die Diagnose der SE weiter zu evaluieren.

Die Untersuchung von Uterussekret ermöglicht die Detektion zytologisch wie histologisch diagnostizierter subklinischer Endometritiden gleichermaßen.

Tiere mit nur zytologisch nachweisbarer SE zeigten im Vergleich mit gebärmuttersunden Tieren eine signifikante Modulation des US hinsichtlich verschiedener Zytokine. Dagegen wiesen Tiere mit nur histologisch nachweisbarer SE keine veränderte Komposition des US bzgl. der untersuchten Parameter auf. Ob diesen chronisch-entzündlichen Veränderungen des Endometriums allerdings eine Bedeutung in der bovinen Reproduktionspathologie zuzuordnen ist, wurde bislang nicht geklärt. Die Untersuchung von US ist demnach als Alternative zur Endometrium-Zytologie zu betrachten. Als vorteilhaft gegenüber der zytologischen Untersuchung wird die objektive und quantitative Bestimmung entzündungsrelevanter Analyten im US unabhängig vom Erfahrungsschatz des Untersuchers eingeschätzt. Grenzwerte an IL1B, IL8 und IL17A sowie ggf. an IL10 im US, deren Überschreiten zur Diagnose ‚zytologische Endometritis‘ führt, sowie die Sensitivität und Spezifität der Untersuchung gilt es anhand größerer Tierzahlen zu bestimmen. Darüber hinaus ist zu evaluieren, ob im Gegensatz zur zytologischen Diagnostik einheitliche Grenzwerte unabhängig vom Untersuchungszeitraum anwendbar sind.

Uterussekret stellt ein aussichtsreiches Medium für die Forschung zur subklinischen Endometritis beim Rind dar.

Die Analyse von US gewährt einen detaillierten Einblick in das uterine Milieu sowie eventuell vorliegende entzündliche Geschehen. Neben der Eignung für die SE-Diagnostik ist ein Beitrag der Untersuchung zur Klärung des Pathomechanismus von SE auf molekularer Ebene denkbar. Der Einsatz von US in der Proteomanalytik könnte ein wichtiger Baustein zur Identifizierung weiterer, für die Pathogenese und Chronifizierung der SE relevanter Biomarker sein. Möglich ist auch eine Differenzierung innerhalb der zytologisch nachweisbaren Endometritiden anhand des Musters der im US regulierten Analyten. Zusätzlich ist der Einsatz von US zur Überprüfung der Effektivität neuer Therapieansätze möglich.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

**Anika Luzia Helfrich**

### **Uterussekret zur Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind**

Die subklinische Endometritis (SE) des Rindes ist eine Entzündung der Gebärmutterschleimhaut, die ohne klinische Symptomatik abläuft. Infolge der Beeinträchtigung der Fertilität betroffener Kühe verursacht sie teils erhebliche ökonomische Schäden in landwirtschaftlichen Betrieben. Für die Diagnose der SE besteht aktuell kein allgemein akzeptierter Goldstandard. Zytologische und histopathologische Untersuchungen des Endometriums finden Anwendung, zeigten aber in vergleichenden Auswertungen wiederholt eine geringe Übereinstimmung. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Eignung von Uterussekret (US) als neues Medium für die Diagnose der SE beim Rind zu bewerten. In einem Vorläuferprojekt war zu diesem Zweck ein neues Probenentnahmegesetz entwickelt und an Schlachtoorganen evaluiert worden, das nach einmaliger Zervixpassage die aufeinanderfolgende Gewinnung von US sowie zytologischen und histologischen Endometrium-Proben erlaubt. Zur Sekretgewinnung werden dabei Merocel-Schwämmchen eingesetzt, die hinsichtlich der Aufnahme und Wiederabgabe verschiedener Immunmarker gut charakterisiert sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Instrumentarium erstmals *in vivo* am Tier eingesetzt. Insgesamt 108 Kühe eines landwirtschaftlichen Betriebs wurden nach Abschluss des Puerperiums (43 – 62 Tage p.p.) gynäkologisch untersucht und anschließend beprobt. Die geringen Mengen zu gewinnenden Uterussekrets (Median 91 mg pro Tier) erforderten Labortests, die trotz kleiner Probenmengen zuverlässige Ergebnisse liefern. Zur Bestimmung seines chemotaktischen Potenzials auf PMN wurde US in einem PMN-Chemotaxis-Assay eingesetzt und die relative Transmigrationsrate im Vergleich zu einer Positivkontrolle bestimmt. Der quantitative Nachweis pro- und antiinflammatorischer Zytokine (IL1B, IL6, IL8, IL17A, IL10) erfolgte mittels AlphaLISA-Technik, welche die Energieübertragung zwischen sog. Donor- und Akzeptor-Beads nach Antikörper-vermittelter Bindung des Analyten in der Probe als fluorometrisch messbares Signal nutzt. Ein Wiegeverfahren erlaubte die Ermittlung des individuellen Verdünnungsfaktors der US-Proben, der durch Zugabe definierter

Mengen Extraktionspuffer vor der Schwämmchen-Zentrifugation zustande kam und die rechnerische absolute Bestimmung der IL-Konzentrationen in reinem US ermöglichte. Die Kontamination der US-Proben mit Blut wurde anhand einer Standardkurve photometrisch quantifiziert sowie rechnerisch korrigiert und stellte für die Beurteilung der hier untersuchten Zytokine nachweislich keine Beeinträchtigung dar. Zur Auswertung der mit Haema-Schnellfärbung gefärbten zytologischen Präparate wurde der Anteil von PMN an 300 kernhaltigen Zellen ausgezählt und ein Grenzwert von 5 % für die Diagnose der SE angewandt. Die histopathologische Untersuchung der formalinfixierten Endometrium-Bioptate geschah nach Vorkommen, Charakter und Grad entzündlicher Veränderungen. An RNAlater-fixierten Endometrium-Biopsaten wurde durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) die Genexpression von IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$  sowie der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2) und des antimikrobiellen Peptids S100A9 untersucht. Zusätzlich wurden je Tier zwei bakteriologische Proben aus dem Uterus gewonnen, die für 48 Stunden auf Blutagar kultiviert und bei positivem Befund mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie weiter charakterisiert wurden.

Die Probenentnahme erwies sich bei allen vorgestellten Tieren als gut durchführbar und nahm keinen Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Kühe. Anhand der klinischen, zytologischen und histopathologischen Untersuchungsergebnisse wurden die Tiere entsprechend ihrer Gebärmuttergesundheit eingeteilt: 83 Tiere wurden als gebärmuttergesund eingestuft (E.NEG). 21 Tiere zeigten eine SE, wobei eine geringe Übereinstimmung der zytologischen und histologischen Resultate deutlich wurde. Diese wurde im Verlauf der weiteren Arbeit durch die differenzierte Betrachtung von Tieren mit zytologisch und histologisch nachweisbarer SE (SE(cyto+histo),  $n = 1$ ), Tieren mit nur zytologisch nachweisbarer SE (SE(cyto),  $n = 7$ ) und Tieren mit nur histologisch nachweisbarer SE (SE(histo),  $n = 13$ ) berücksichtigt. Vier Tiere wiesen eine klinische Endometritis (KE) auf und wurden gemeinsam mit dem einzigen Tier der Gruppe SE(cyto+histo) von der Auswertung ausgeschlossen. Gemäß dieser Gruppeneinteilung wurden Parameter des US sowie die endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene vergleichend ausgewertet.

SE(histo) zeigte für keinen der untersuchten Parameter in US und endometrialer Genexpression Unterschiede zur Gruppe gebärmuttergesunder Tiere. Demnach bedingen allein histologisch nachweisbare, chronische Entzündungen des

Endometriums keine Modulation des uterinen Milieus sowie der endometrialen Genexpression hinsichtlich der untersuchten Analyten. Dagegen wurde bei SE(cyto) im Vergleich zu E.NEG eine signifikante Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine IL1B, IL8 und IL17A auf Proteinebene im US festgestellt, die für IL1B und IL8 auch auf Ebene der endometrialen Genexpression nachzuvollziehen war. Für IL6 waren weder auf Protein- noch auf Genexpressionslevel Unterschiede zwischen E.NEG und SE(cyto) festzustellen. Das antiinflammatorische Zytokin IL10 zeigte sich bei SE(cyto) im US tendenziell höher konzentriert und im Endometrium signifikant stärker exprimiert als bei gebärrmuttergesunden Kontrolltieren. Für die mRNA-Expression von TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen E.NEG und SE(cyto) dokumentiert. Die dargestellte Beeinflussung des uterinen Milieus durch zytologisch detektierbare SE birgt Potenzial für die Diagnostik. Die Zytokine IL1B, IL8 und IL17A stellen dabei potenzielle diagnostische Marker für zytologisch nachweisbare SE im US dar. Die Bedeutung des regulatorischen Botenstoffs IL10 für die Chronifizierung endometrialer Entzündungen und seine Eignung für die SE-Diagnostik gilt es weiter zu evaluieren.

Die Gewinnung und Untersuchung von Uterussektret ist als vielversprechende Methode für die Diagnose subklinischer Endometritiden beim Rind zu betrachten. Uterussektret bietet sich sowohl zur Suche nach Biomarkern als auch zur Erforschung der Pathogenese der subklinischen Endometritis an.

*Die vorliegende Arbeit wurde durch den Förderverein Bioökonomieforschung e. V. (FBF) unterstützt.*

## VII. SUMMARY

**Anika Luzia Helfrich**

### **Uterine secretion for diagnosis of subclinical endometritis in cattle**

Subclinical endometritis (SE) in cattle is defined as a clinically unapparent inflammation of the endometrium. It is reported to impair fertility in affected cows which causes considerable economic loss in agricultural businesses. A gold standard for diagnosis of SE has not been set. While uterine cytology and histopathology are mainly applied as diagnostic devices, a comparative evaluation revealed low agreement between both methods. Hence, the main objective of the present study was to assess the capability of uterine secretion (US) as a new medium for diagnosis of SE in dairy cows. For this purpose, a novel sampling tool had been developed and evaluated on isolated uteri of slaughtered cows in a previous project. After a singular passage through the cervix, the sampling tool allows for consecutive collection of US as well as cytological and histopathological samples of the bovine endometrium. For sampling of US a Merocel sponge is used, which is well characterised in terms of acquiring and releasing different immune markers.

Within the present study the sampling tool was applied to animals *in vivo* for the first time. In total 108 dairy cows were examined gynaecologically and subsequently sampled after completion of the puerperium (43 to 62 days p.p.). Due to low amounts of obtained US (median 91 mg per animal) laboratory assays which provide reliable results despite small sample volumes were required. To evaluate its chemotactic effect on PMN, US was analysed in a PMN-chemotaxis-assay and the relative transmigration rate compared to a positive control was determined. Quantitative analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL1B, IL6, IL8, IL17A, IL10) was conducted using AlphaLISA-technology, which is based on fluorometrically detectable energy transmission between donor and acceptor beads after antibody-mediated binding of the target substance. Weighing of the sponges allowed for ascertainment of individual dilution factors of the US samples, which originated in the addition of a predefined amount of extraction buffer before centrifugation of the sponges. This dilution factor enabled the calculatory absolute determination of IL-concentrations in pure US. Contamination of the US samples with blood was quantified photometrically using a standard curve and did not compromise the evaluation of the investigated cytokines. Cytological samples were

stained by Diff-Quick and the proportion of PMN among 300 nucleated cells was rated. A threshold of 5 % PMN was applied for diagnosis of SE. The histopathological assessment of formalin-fixed endometrial biopsies was performed according to presence, character and degree of inflammatory alterations. RNAlater-fixed endometrial biopsies served for gene expression analysis of the cytokines IL1B, IL6, IL8, IL10 and TNF $\alpha$  as well as the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) and the antimicrobial peptide S100A9 by reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). In addition, two bacteriological samples were acquired from the uterus of each animal and cultivated on blood agar for 48 hours. If a positive result was found, bacterial species were differentiated by MALDI-TOF mass spectrometry.

The sampling was feasible in all presented cows and did not affect their fertility. Considering clinical, cytological and histopathological results, animals were assigned to groups according to their uterine health status: 83 animals displayed no signs of endometritis (E.NEG). 21 animals were diagnosed with SE, but cytological and histological results revealed low agreement. This was accounted for by differentiating animals with SE into animals with cytologically and histologically detectable SE (SE(cyto+histo),  $n = 1$ ), animals with only cytologically detectable SE (SE(cyto),  $n = 7$ ) and animals with only histologically detectable SE (SE(histo),  $n = 13$ ). Four animals showed signs of clinical endometritis and together with the only animal with SE(cyto+histo) were excluded from further analysis. According to this group assignment, parameters of US and endometrial expression of inflammatory genes were analysed comparatively.

In comparison to E.NEG, SE(histo) showed no differences in the analysed parameters in US and endometrial gene expression. This finding indicates, that merely histologically detectable chronic inflammation of the endometrium does not modulate the uterine environment as well as the endometrial gene expression concerning the investigated analytes. In contrast, SE(cyto) depicted a significant upregulation of pro-inflammatory cytokines IL1B, IL8 and IL17A on protein level in US compared to E.NEG. This upregulation was confirmed on endometrial gene expression level for IL1B and IL8. No significant differences for IL6 neither on product nor on gene expression level were found between SE(cyto) and E.NEG. The anti-inflammatory cytokine IL10 tended to be higher concentrated in US and was significantly higher expressed in endometrial biopsies of SE(cyto) compared

to E.NEG. For mRNA-expression of TNF $\alpha$ , PTGS2 and S100A9, no significant differences were found between SE(cyto) and E.NEG. The demonstrated influence of cytologically detected SE on the uterine environment implies potential for diagnostics. The cytokines IL1B, IL8 and IL17A represent potential diagnostic markers for cytologically detectable SE in US. Avenues for further research include the role of the regulatory mediator IL10 in chronification of endometrial inflammation and its value for diagnosis of SE.

The sampling and evaluation of uterine secretion is considered a promising method for diagnosis of subclinical endometritis in cattle. Uterine secretion lends itself to the identification of biomarkers as well as the investigation of the pathogenesis of bovine subclinical endometritis.

*The present work was supported by the Association for Bioeconomy Research (FBF).*

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelli A, Raboisson D, Kaidi R, Ibrahim B, Kalem A, Iguer-Ouada M. *Elevated non-esterified fatty acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cows and their association with reproductive performance and disorders: A meta-analysis*. Theriogenology 2017; 93: 99-104.

Adams GP. *Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants*. Journal of Reproduction and Fertility. 1999; 54 (Suppl.): 17-32.

ADR (2016), *Rinderproduktion in Deutschland 2015*. Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) e. V., Bonn.

Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B, Fisher AD. *Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period*. Research in Veterinary Science 2016; 108: 8-17.

Anderson ML, BonDurant RH, Corbeil RR, Corbeil LB. *Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Trichostrongylus axei* in immunized and control heifers*. The Journal of Parasitology 1996; 82: 594-600.

Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. *Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle*. Biology of Reproduction 2002; 67: 161-169.

Barański W, Podhalicz-Dzięgielewska M, Zduńczyk S, Janowski T. *The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds*. Theriogenology 2012; 78: 1939-1947.

Barański W, Zduńczyk S, Janowski T. *Reproductive performance of cows with subclinical endometritis diagnosed by different cytological thresholds in the postpartum period*. Tierärztliche Praxis Großtiere 2013a; 41: 15-19.

Barański W, Łukasik K, Skarżyński D, Sztachañska M, Zduńczyk S, Janowski T. *Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis*. Theriogenology 2013b; 80: 766-772.

Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. *A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle*. Theriogenology 2008; 69: 714-723.

Bergman RV, Kenney RM (1976), *Representativeness of a uterine biopsy in the mare*. Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners.

Blanchard TL, Garcia MC, Kintner LD, Kenney RM. *Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare*. Theriogenology 1987; 28: 445-450.

BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft) Bundesgesetzblatt Jahrgang 2018 Teil I Nr. 7: *Zweite Verordnung zur Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken vom 21. Februar 2018*. Bundesanzeiger Verlag Bonn, 213-216.

Bondurant RH. *Inflammation in the bovine female reproductive tract*. Journal of Animal Science 1999; 77: 101.

Bonnett BN, Miller RB, Etherington WG, Martin SW, Johnson WH. *Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results*. Canadian Journal of Veterinary Research 1991a; 55: 155-161.

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*. Canadian Journal of Veterinary Research 1991b; 55: 168-173.

Bonnett BN, Martin SW, Meek AH. *Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows*. Preventive Veterinary Medicine 1993; 15: 205-220.

Boos A (1981), *Histomorphologische Veränderungen im Endometrium des Rindes während der verschiedenen Zyklusphasen*. Tierärztliche Hochschule, Hannover: Diss. med. vet.

Borges ÁM, Healey GD, Sheldon IM. *Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo*. American Journal of Reproductive Immunology 2012; 67: 526-539.

Boyden S. *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*. Journal of Experimental Medicine 1962; 115: 453-466.

Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Lisiecka U, Marczuk J. *Phenotyping of leukocytes and granulocyte and monocyte phagocytic activity in the peripheral blood and uterus of cows with endometritis*. Theriogenology 2014; 82: 403-410.

Brodzki P, Brodzki A, Kurek Ł, Marczuk J, Tatara MR. *Endometrial cytology at luteal and follicular phases of the ovarian cycle in cows*. Annals of Animal Science 2015a; 15: 107-117.

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*. Veterinary Research Communications 2015b; 39: 143-149.

Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J. *Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum*. Theriogenology 2015c; 84: 11-18.

BTK (2015), *Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln*. Bundestierärztekammer (BTK), Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt 3/2015.

Bustin SA. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. Journal of Molecular Endocrinology 2000; 25: 169-193.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL. *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clinical Chemistry 2009; 55: 611-622.

Butler WR. *Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 2533-2539.

Butler WR. *Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle*. Animal Reproduction Science 2000; 60: 449-457.

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*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2004; 11: 399-405.

Cengiz M, Altun S, Comakli S, Ozkaraca M, Cengiz S, Hayirli A. *Sensitivity and specificity of endometrial cytopathological diagnosis in slaughtered cows*. Reproduction in Domestic Animals 2016; 51 (Suppl. 2): 82.

Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O'Farrelly C. *Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity*. Theriogenology 2009; 71: 1396-1407.

Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee J, Doherty ML, Callanan JJ, O'farrelly C. *Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction*. Theriogenology 2010; 73: 988-994.

Chapwanya A, Meade KG, Foley C, Narciandi F, Evans ACO, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. *The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility*. Reproduction, Fertility and Development 2012; 24: 1028-1039.

Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert RO. *Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows*. Journal of Dairy Science 2011; 94: 762-770.

Cheong SH, Nydam DV, Galvao KN, Crosier BM, Ricci A, Caixeta LS, Sper RB, Fraga M, Gilbert RO. *Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows*. Theriogenology 2012; 77: 858-864.

Cobb SP, Watson ED. *Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle*. Research in Veterinary Science 1995; 59: 238-241.

Colazo MG, Hayirli A, Doepel L, Ambrose DJ. *Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source*. Journal of Dairy Science 2009; 92: 2562-2571.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. *IL-10: The master regulator of immunity to infection*. The Journal of Immunology 2008; 180: 5771-5777.

Couto GB (2010), *Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for the diagnosis of subclinical endometritis and correlation with first service pregnancy rate in postpartum Holstein cows*. Université de Montréal: Diss. med. vet., <http://hdl.handle.net/1866/4256>.

Crowley-Nowick PA, Bell MC, Brockwell R, Edwards RP, Chen S, Partridge EE, Mestecky J. *Rectal immunization for induction of specific antibody in the genital tract of women*. Journal of Clinical Immunology 1997; 17: 370-379.

Dadarwal D, Palmer C, Griebel P. *Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract*. Theriogenology 2017; 104: 62-71.

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*. Reproductive Biology and Endocrinology 2008; 6: 53.

Day DA, Tuite MF. *Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview*. Journal of Endocrinology 1998; 157: 361-371.

De Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, Gilbert RO, McDougall S. *Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2014; 97: 3983-3999.

De Bois CHW, Manspeaker JE (1986), *Endometrial biopsy of the bovine*. In: Morrow DA (ed). Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals, 2 edn. WB Saunders Philadelphia, PA, 424-426.

DeKruif (1999), *Uteruserkrankungen*. In: Grunert E, Berchtold M (eds), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey, Berlin, Wien.

Denis-Robichaud J, Dubuc J. *Randomized clinical trial of intrauterine cephalosporin infusion in dairy cows for the treatment of purulent vaginal discharge and cytological endometritis*. Journal of Dairy Science 2015a; 98: 6856-6864.

Denis-Robichaud J, Dubuc J. *Determination of optimal diagnostic criteria for purulent vaginal discharge and cytological endometritis in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2015b; 98: 6848-6855.

Denisov V, Strong W, Walder M, Gingrich J, Wintz H. *Development and validation of RQI: an RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system*. Bio-Rad Bulletin 2008; 5761

Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA, Baker JR. *Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after experimental intrauterine inoculation with Leptospira interrogans serovar hardjo*. Research in Veterinary Science 1996; 60: 157-162.

Dinarello CA. *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annual Review of Immunology 2009; 27: 519-550.

Dohmen MJW, Lohuis JACM, Huszenicza G, Nagy P, Gacs M. *The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis*. Theriogenology 1995; 43: 1379-1388.

Drillich M, Tesfaye D, Rings F, Schellander K, Heuwieser W, Hoelker M. *Effects of polymorphonuclear neutrophile infiltration into the endometrial environment on embryonic development in superovulated cows*. Theriogenology 2012; 77: 570-578.

Drillich M. *Subklinische Endometritis des Rindes – eine neue Erkrankung oder nur eine akademische Diskussion?* Veterinär-Spiegel 2014; 24: 71-76.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. *Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2010a; 93: 5225-5233.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. *Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2010b; 93: 5764-5771.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. *Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2011; 94: 1325-1338.

Duncan JR, Wilkie BN, Hiestand F, Winter AJ. *The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation*. The Journal of Immunology 1972; 108: 965-976.

Ellenberger C, Rodenbusch S, Hauffe C, Lenz M, Kießling A, Sobiraj A, Schoon HA. *Subklinische Fertilitätsstörungen beim Rind - Welchen Beitrag kann die Pathologie leisten*. Subklinische Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind 2006: 28-36.

Elliott L, McMahon KJ, Gier HT, Marion GB. *Uterus of the cow after parturition: bacterial content*. American Journal of Veterinary Research 1968; 29: 77-81.

Etherington WG, Martin SW, Bonnett B, Johnson WH, Miller RB, Savage NC, Walton JS, Montgomery ME. *Reproductive performance of dairy cows following treatment with cloprostenol 26 and/or 40 days postpartum: a field trial*. Theriogenology 1988; 29: 565-575.

Fischer C, Drillich M, Gabler C, Heuwieser W, Einspanier R. *Postpartale Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind: Untersuchung der Genexpression im Endometrium als Schlüssel zum Erfolg?* Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 2006; 119: 197-202.

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.* Reproduction, Fertility and Development 2010; 22: 818-829.

Fleige S, Pfaffl MW. *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance.* Molecular Aspects of Medicine 2006; 27: 126-139.

Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules.* Journal of Leukocyte Biology 2007; 81: 28-37.

Földi J, Kulcsar M, Pecsí A, Huyghe B, De Sa C, Lohuis JACM, Cox P, Huszenicza G. *Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle.* Animal Reproduction Science 2006; 96: 265-281.

Foley C, Chapwanya A, Callanan JJ, Miranda-CasoLuengo R, Lu J, Meijer WG, Lynn DJ, O'Farrelly C, Meade KG. *Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of post-partum cytological endometritis.* BMC Genomics 2015; 16: 811.

Frank T, Anderson KL, Smith AR, Whitmore HL, Gustafsson BK. *Phagocytosis in the uterus: a review.* Theriogenology 1983; 20: 103-110.

Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. *Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis.* Theriogenology 2009; 71: 993-1004.

Gabler C, Fischer C, Drillich M, Einspanier R, Heuwieser W. *Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum.* Reproductive Biology and Endocrinology 2010; 8: 152.

Galvão KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. *Effect of prostaglandin F 2 $\alpha$  on subclinical endometritis and fertility in dairy cows.* Journal of Dairy Science 2009; 92: 4906-4913.

Galvão KN, Flaminio MJBF, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Ricci A, Guard CL, Butler WR, Gilbert RO. *Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows.* Journal of Dairy Science 2010; 93: 2926-2937.

Galvão KN, Santos NR, Galvão JS, Gilbert RO. *Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows.* Theriogenology 2011; 76: 290-299.

Gärtner MA, Peter S, Jung M, Drillich M, Einspanier R, Gabler C. *Increased mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in inflamed bovine endometrium in vivo as well as in endometrial epithelial cells exposed to Bacillus pumilus in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* 2015; 28: 982-994.

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: 1538-1547.

Gijsbers K, Gouwy M, Struyf S, Wuyts A, Proost P, Opdenakker G, Penninckx F, Ectors N, Geboes K, Van Damme J. *GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors*. *Experimental Cell Research* 2005; 303: 331-342.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN. *Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows*. *Theriogenology* 1998; 49: 251.

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: 1879-1888.

Gilbert RO, Santos NR, Galvão KN, Brittin SB, Roman HB. *The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE)*. *Journal of Dairy Science* 2007; 90 (Suppl. 1): 469.

Gilbert RO. *The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle*. *Reproduction, Fertility and Development* 2011; 24: 252-257.

Glasel JA. *Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios*. *Biotechniques* 1995; 18: 62-63.

Gobikrushanth M, Salehi R, Ambrose DJ, Colazo MG. *Categorization of endometritis and its association with ovarian follicular growth and ovulation, reproductive performance, dry matter intake, and milk yield in dairy cattle*. *Theriogenology* 2016; 86: 1842-1849.

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

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. *Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 113: 21-29.

Hedderich J, Sachs L (2015), *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*. Springer, Berlin Heidelberg.

Hehlgans T, Pfeffer K. *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. *Immunology* 2005; 115: 1-20.

Heidarpour M, Mohri M, Fallah-Rad AH, Shahreza FD, Mohammadi M. *Acute-phase protein concentration and metabolic status affect the outcome of treatment in cows with clinical and subclinical endometritis*. Veterinary Record 2012; 171: 219.

Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. *Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus*. Endocrinology 2006; 147: 562-570.

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*. Reproductive Biology and Endocrinology 2009; 7: 55.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Nature Biotechnology 1993; 11: 1026-1030.

Hillmer M (2018), *Uterussektret zur Diagnostik und Pathogeneseforschung der chronischen Endometritis beim Rind*. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: Diss. med. vet, <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/22337/>.

Hoedemaker M, Lund LA, Wagner WC. *Influence of arachidonic acid metabolites and steroids on function of bovine polymorphonuclear neutrophils*. American Journal of Veterinary Research 1992; 53: 1534-1539.

Hoedemaker M, Mansfeld R, DeKruif A (2014), *Fruchtbarkeit - Das Trächtigkeitsergebnis*. In: DeKruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M (eds), Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Enke Verlag, Stuttgart, 46-64.

Hoelker M, Salilew-Wondim D, Drillich M, Grosse-Brinkhaus C, Ghanem N, Goetze L, Tesfaye D, Schellander K, Heuwieser W. *Transcriptional response of the bovine endometrium and embryo to endometrial polymorphonuclear neutrophil infiltration as an indicator of subclinical inflammation of the uterine environment*. Reproduction, Fertility and Development 2012; 24: 778-793.

Holdsworth SR, Gan P-Y. *Cytokines: names and numbers you should care about*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 2015; 10: 2243-2254.

Hussain AM, Daniel RCW, O'Boyle D. *Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows*. Theriogenology 1990; 34: 291-302.

Hyttel P. *The epithelium of uterine biopsies from cyclic dairy cattle: ultrastructure and endocytotic activity*. Cells Tissues Organs 1985; 123: 93-100.

Ibrahim M, Peter S, Gärtner MA, Michel G, Jung M, Einspanier R, Gabler C. *Increased mRNA expression of selected antimicrobial peptides around ovulation and during inflammatory processes in the bovine endometrium postpartum*. Theriogenology 2016; 86: 2040-2053.

Ingvarstsen KL, Moyes K. *Nutrition, immune function and health of dairy cattle*. *Animal* 2013; 7: 112-122.

Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. *Inflammatory pathways in female reproductive health and disease*. *Reproduction* 2009; 138: 903-919.

Janowski T, Barański W, Łukasik K, Skarżyński D, Zduńczyk S, Malinowska K. *Endometrial mRNA expression of prostaglandin synthase enzymes PTGS 2, PTGFS and mPTGES 1 in repeat-breeding cows with cytologically determined endometritis*. *Acta Veterinaria Hungarica* 2017; 65: 96-104.

Johnson H, Torres CG, Carvallo F, Duchens M, Peralta OA. *Endometrial expression of selected transcripts in postpartum of primiparous Holstein cows with clinical and subclinical endometritis*. *Animal Reproduction Science* 2015; 156: 34-39.

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*. *The Canadian Veterinary Journal* 2005a; 46: 255-259.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. *The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis*. *Theriogenology* 2005b; 63: 818-830.

Kasimanickam R, Kasimanickam VR, Olsen JR, Jeffress EJ, Moore DA, Kastelic JP. *Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013; 11: 103.

Kasimanickam R, Kasimanickam V, Kastelic JP. *Mucin 1 and cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding*. *Theriogenology* 2014; 81: 952-958.

Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Forderung D, Heuwieser W. *Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate*. *Theriogenology* 2009; 71: 385-391.

Kim I-H, Na K-J, Yang M-P. *Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis*. *Journal of Reproduction and Development* 2005; 51: 757-764.

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: 427-432.

Klose K (2015), *Endometriale periglandulär akzentuierte mononukleäre Entzündungszellinfiltrate beim Pferd – Physiologischer Befund oder Initialstadium einer Endometrose?* Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Diss. med. vet., <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:15-qucosa-171843>.

Kohli P, Levy BD. *Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation*. British Journal of Pharmacology 2009; 158: 960-971.

Ksontini R, MacKay SLD, Moldawer LL. *Revisiting the role of tumor necrosis factor  $\alpha$  and the response to surgical injury and inflammation*. Archives of Surgery 1998; 133: 558-567.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L. *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular Aspects of Medicine 2006; 27: 95-125.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. *Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2002; 85: 2223-2236.

LeBlanc SJ. *Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review*. The Veterinary Journal 2008; 176: 102-114.

LeBlanc SJ. *Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle*. Journal of Reproduction and Development 2010; 56: 1-7.

LeBlanc SJ, Osawa T, Dubuc J. *Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows*. Theriogenology 2011; 76: 1610-1618.

LeBlanc SJ. *Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows*. Animal 2014; 8: 54-63.

Lefebvre RC, Stock AE. *Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation*. Veterinary Clinics: Food Animal Practice 2012; 28: 79-96.

Lenz M, Drillich M, Heuwieser W. *Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound*. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 2006; 120: 237-244.

Leslie KE. *The events of normal and abnormal postpartum reproductive endocrinology and uterine involution in dairy cows: a review*. The Canadian Veterinary Journal 1983; 24: 67-71.

Lewis GS. *Uterine health and disorders*. Journal of Dairy Science 1997; 80: 984-994.

Lewis GS. *Steroid regulation of uterine immune defenses*. *Animal Reproduction Science* 2004; 82: 281-294.

Lima FS, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Greco LF, Ayres H, Favoreto MG, Carvalho MR, Galvão KN, Santos JEP. *Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin F 2 $\alpha$  on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination*. *Journal of Dairy Science* 2013; 96: 6480-6488.

Lind M, Sipka AS, Schuberth HJ, Blutke A, Wanke R, Sauter-Louis C, Duda KA, Holst O, Rainard P, Germon P, Zerbe H, Petzl W. *Location-specific expression of chemokines, TNF- $\alpha$  and S100 proteins in a teat explant model*. *Innate Immunity* 2015; 21: 322-331.

LKV Bayern (2016), *Jahresbericht Milchleistungsprüfung in Bayern 2016*. Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung (LKV) in Bayern e. V., München.

Long S (2009), *Pregnancy and Parturition - Abnormal development of the conceptus and its consequences*. In: Noakes D, Parker J, England G (eds), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Elsevier Saunders, 123-145.

Loyi T, Kumar H, Nandi S, Mathapati BS, Patra M, Pattnaik B. *Differential expression of pro-inflammatory cytokines in endometrial tissue of buffaloes with clinical and sub-clinical endometritis*. *Research in Veterinary Science* 2013; 94: 336-340.

Loyi T, Kumar H, Nandi S, Patra MK. *Expression of pathogen recognition receptors and pro-inflammatory cytokine transcripts in clinical and sub-clinical endometritis cows*. *Animal Biotechnology* 2015; 26: 194-200.

Lucy MC. *Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?* *Journal of Dairy Science* 2001; 84: 1277-1293.

Machado VS, Knauer WA, Bicalho MLS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. *A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum*. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 1349-1357.

Machado VS, de Souza Bicalho ML, Junior EBdSM, Rossi R, Ribeiro BL, Lima S, Santos T, Kussler A, Foditsch C, Ganda EK. *Subcutaneous immunization with inactivated bacterial components and purified protein of Escherichia coli, Fusobacterium necrophorum and Trueperella pyogenes prevents puerperal metritis in Holstein dairy cows*. *PLoS One* 2014; 9: e91734.

Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plöntzke 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*. *Journal of Dairy Science* 2013; 96: 4333-4339.

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*. *Journal of Dairy Science* 2014; 97: 195-201.

Marion GB, Gier HT. *Histological and cytological changes in the bovine uterine epithelium*. Journal of Animal Science 1959; 18: 1552-1553.

Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, Galvão K, Santos JEP. *Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease*. Journal of Dairy Science 2012; 95: 7158-7172.

Mateus L, Lopes da Costa L, Bernardo F, Robalo Silva J. *Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows*. Reproduction in Domestic Animals 2002; 37: 31-35.

Mazzone A, Ricevuti G. *Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance*. Haematologica 1995; 80: 161-175.

McDougall S, Hussein H, Aberdein D, Buckle K, Roche JR, Burke C, Mitchell M, Meier S. *Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle*. Theriogenology 2011; 76: 229-240.

McDougall S, Abbeloos E, Piepers S, Rao AS, Astiz S, Van Werven T, Statham J, Pérez-Villalobos N. *Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance*. Journal of Dairy Science 2016; 99: 2026-2042.

McEntee K (1985), *Pathology of the female reproductive system*. In: Joest E (ed). Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, Band IV: Genitalorgane, Haut, Skelett. Parey, Berlin, 177 - 179.

Meadows C, Rajala-Schultz PJ, Frazer GS. *A spreadsheet-based model demonstrating the nonuniform economic effects of varying reproductive performance in Ohio dairy herds*. Journal of Dairy Science 2005; 88: 1244-1254.

Medtronic, Merocel. 2009: <http://www.merocel.com/>. Zugriff: November 8th, 2017.

Medzhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature 2008; 454: 428-435.

Meira EBS, Henriques LCS, Sa LRM, Gregory L. *Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows*. Journal of Dairy Science 2012; 95: 6969-6973.

Melcher Y, Prunner I, Drillich M. *Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis*. Theriogenology 2014; 82: 57-63.

Mensikova M, Stepanova H, Faldyna M. *Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various diseases: A review*. Cytokine 2013; 64: 11-17.

Merbach S (2011), *Prognostische Bewertung endometrialer Veränderungen beim Rind*. Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Universität Leipzig: Diss. med. vet., <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:15-qucosa-87482>.

Mosser DM, Zhang X. *Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine*. Immunological Reviews 2008; 226: 205-218.

Mulisch M, Welsch U, Romeis B, Aescht E (2015), *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Spektrum, Berlin.

Nardelli-Haeffliger D, Wirthner D, Schiller JT, Lowy DR, Hildesheim A, Ponci F, De Grandi P. *Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles*. Journal of the National Cancer Institute 2003; 95: 1128-1137.

Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. *Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2-induced luteolysis in bovine corpus luteum*. Biology of Reproduction 2004; 70: 473-480.

Noakes DE (2009), *Normal cyclical ovarian activity and its control - Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity*. In: Noakes D, Parker J, England G (eds), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Elsevier Saunders, 3-58.

Oda S, Gabler C, Holder C, Einspanier R. *Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct*. Journal of Endocrinology 2006; 191: 263-274.

Ohtani S, Okuda K, Nishimura K, Mohri S. *Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle*. Theriogenology 1993; 39: 1033-1042.

Okano A, Tomizuka T. *Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow*. Theriogenology 1987; 27: 369-376.

Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. *Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon- $\tau$* . Endocrinology 2002; 143: 2936-2943.

Parkinson TJ (2009), *Subfertility and Infertility - Infertility and subfertility in the cow: structural and functional abnormalities, management deficiencies and non-specific infections*. In: Noakes D, Parker J, England G (eds), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Elsevier Saunders, 393-475.

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: 1438-1446.

Pascottini OB, Opsomer G. *Postpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 2016; 85: 378-385.

Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. *Distribution of inflammation and association between active and chronic alterations within the endometrium of dairy cows*. Reproduction in Domestic Animals 2016a; 51: 751-757.

Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. *Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows*. Theriogenology 2016b; 86: 1550-1556.

Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Van Eetvelde M, Vercauteren P, Opsomer G. *Prevalence of cytological endometritis and effect on pregnancy outcomes at the time of insemination in nulliparous dairy heifers*. Journal of Dairy Science 2016c; 99: 9051-9056.

Pascottini OB, Hostens M, Sys P, Vercauteren P, Opsomer G. *Risk factors associated with cytological endometritis diagnosed at artificial insemination in dairy cows*. Theriogenology 2017a; 92: 1-5.

Pascottini OB, Hostens M, Sys P, Vercauteren P, Opsomer G. *Cytological endometritis at artificial insemination in dairy cows: Prevalence and effect on pregnancy outcome*. Journal of Dairy Science 2017b; 100: 588-597.

PerkinElmer, AlphaLISA and AlphaScreen No-Wash Assays. 1998: <http://www.perkinelmer.de/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/alphalisa-alphascreen-no-wash-assays/alphalisa-alphascreen-no-washassays-main.html#AlphaLISAAAlphaScreenno-washassays-Assayprinciple>. Zugriff: 2017, November 9th.

Peter S, Michel G, Hahn A, Ibrahim M, Lübke-Becker A, Jung M, Einspanier R, Gabler C. *Puerperal influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors*. Journal of Physiology and Pharmacology 2015; 66: 449-462.

Plaizier JC, King GJ, Dekkers JCM, Lissemore K. *Estimation of economic values of indices for reproductive performance in dairy herds using computer simulation*. Journal of Dairy Science 1997; 80: 2775-2783.

Plöntzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. *Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina*. Animal Reproduction Science 2010; 122: 52-57.

Polat B, Cengiz M, Cannazik O, Colak A, Oruc E, Altun S, Salar S, Bastan A. *Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis*. Animal Reproduction Science 2015; 155: 50-55.

Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota R, Erber R, Aurich C, Ehling-Schulz M, Drillich M. *The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows*. Theriogenology 2015; 83: 1249-1253.

Priest NV, McDougall S, Burke CR, Roche JR, Mitchell M, McLeod KL, Greenwood SL, Meier S. *The responsiveness of subclinical endometritis to a nonsteroidal antiinflammatory drug in pasture-grazed dairy cows*. Journal of Dairy Science 2013; 96: 4323-4332.

Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M. *Risk factors for uterine diseases on small-and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations*. Theriogenology 2014a; 82: 857-865.

Prunner I, Pothmann H, Wagener K, Giuliadori M, Huber J, Ehling-Schulz M, Drillich M. *Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows*. Theriogenology 2014b; 82: 1316-1322.

Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, Mao IL. *Fertility in the high-producing dairy cow*. Livestock Science 2004; 86: 125-135.

R Core Team (2016), *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Radbruch A (2000), *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Ramirez-Garzon HO (2017), *Effect of endometrial biopsy on uterine health in tropically adapted beef cattle*. School of Veterinary Science, The University of Queensland Australia: Diss. med. vet., <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:692887>.

Rerknimitr R, Rungsangmanoon W, Kongkam P, Kullavanijaya P. *Efficacy of leukocyte esterase dipstick test as a rapid test in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis*. World Journal of Gastroenterology 2006; 12: 7183-7187.

Rethmeier J, Wenzlau M, Wagner M, Wiedemann S, Bachmann L. *Fertility parameters in German dairy herds - Determined by herd size and milk yield? Reproduction in Domestic Animals 2018; 53 (Suppl. 1): 33.*

Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS, Martinez N, Thatcher WW. *Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates*. Journal of Dairy Science 2013; 96: 5682-5697.

Riollet C, Mutuel D, Duonor-Cérutti M, Rainard P. *Determination and characterization of bovine interleukin-17 cDNA*. Journal of Interferon & Cytokine Research 2006; 26: 141-149.

Roche JF. *The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency*. Animal Reproduction Science 2006; 96: 282-296.

Rodenbusch S (2011), *Makroskopische und histopathologische Untersuchungen am Genitaltrakt sub- und infertiler weiblicher Rinder im klinischen Kontext unter besonderer Berücksichtigung der Endometriumbiopsie*. Institut für Veterinär-Pathologie und Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig: Diss. med. vet., <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:15-qucosa-69939>.

Rodriguez-Martinez H, Hultgren J, Båge R, Bergqvist A, Svensson C, Bergsten C, Lidfors L, Gunnarsson S, Algers B, Emanuelson U. *Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice*. IVIS Reviews in veterinary Medicine 2008; 1: 1-23.

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*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2000; 7: 45-48.

Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. *CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis*. Trends in Immunology 2004; 25: 201-209.

Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C. *Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules*. Trends in Immunology 2003; 24: 155-158.

Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. The Journal of Immunology 1993; 150: 5445-5456.

Rowson LE, Lamming GE, Fry RM. *Influence of ovarian hormones on uterine infection*. Nature 1953; 171: 749-750.

Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE. *Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility*. Animal Science 2000; 70: 487-501.

Ruder CA, Sasser RG, Williams RJ, Ely JK, Bull RC, Butler JE. *Uterine infections in the postpartum cow: II. Possible synergistic effect of Fusobacterium necrophorum and Corynebacterium pyogenes*. Theriogenology 1981; 15: 573-580.

Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. *Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows*. Theriogenology 2010; 74: 1271-1278.

Salilew-Wondim D, Ibrahim S, Gebremedhn S, Tesfaye D, Heppelmann M, Bollwein H, Pfarrer C, Tholen E, Neuhoff C, Schellander K. *Clinical and subclinical endometritis induced alterations in bovine endometrial transcriptome and miRNome profile*. BMC Genomics 2016; 17: 218.

Santos JEP, Cerri RLA, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. *Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows*. Animal Reproduction Science 2004; 80: 31-45.

Santos TMA, Caixeta LS, Machado VS, Rauf AK, Gilbert RO, Bicalho RC. *Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in Arcanobacterium pyogenes isolated from the uterus of postpartum dairy cows*. Veterinary Microbiology 2010; 145: 84-89.

Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C. *In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability*. Journal of Dairy Science 2006; 89: 147-154.

Schlafer DH, Miller RB (2007), *Female Genital System*. In: Jubb, Kennedy, Palmer's (eds), Pathology of Domestic Animals. Saunders Elsevier, Edinburgh, 4229-4564.

Schoon H, Schoon D, Klug E. *Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute*. Pferdeheilkunde 1992; 8: 355-362.

Schulz LC (1991), *Weibliche Geschlechtsorgane und Milchdrüse*. In: Schulz LC (ed). Pathologie der Haustiere: Teil I Organveränderungen. Gustav Fischer Verlag, Jena, 655-676.

Senosy WS, Izaïke Y, Osawa T. *Influences of metabolic traits on subclinical endometritis at different intervals postpartum in high milking cows*. Reproduction in Domestic Animals 2012; 47: 666-674.

Sens A, Heuwieser W. *Presence of Escherichia coli, Trueperella pyogenes,  $\alpha$ -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis*. Journal of Dairy Science 2013; 96: 6347-6354.

Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. *Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle*. Reproduction 2002; 123: 837-845.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc SJ, Gilbert RO. *Defining postpartum uterine disease in cattle*. Theriogenology 2006; 65: 1516-1530.

Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. *Specific strains of Escherichia coli are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice*. PLoS One 2010; 5: e9192.

Sheldon IM, Cronin JG, Healey GD, Gabler C, Heuwieser W, Streyll D, Bromfield JJ, Miyamoto A, Fergani C, Dobson H. *Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease*. *Reproduction* 2014; 148: 41-51.

Shen-Orr SS, Tibshirani R, Khatri P, Bodian DL, Staedtler F, Perry NM, Hastie T, Sarwal MM, Davis MM, Butte AJ. *Cell type-specific gene expression differences in complex tissues*. *Nature Methods* 2010; 7: 287-289.

Sheth SA, Yanamadala V, Eskandar EN (2012), *Intraoperative human functional brain mapping using optical intrinsic signal imaging*. In: Chaudhary V (ed). *Advances in Brain Imaging*. InTech, 77-100.

Shin E-K, Jeong J-K, Choi I-S, Kang H-G, Hur T-Y, Jung Y-H, Kim I-H. *Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows*. *Theriogenology* 2015; 84: 252-260.

Singh J, Murray RD, Mshelia G, Woldehiwet Z. *The immune status of the bovine uterus during the peripartum period*. *The Veterinary Journal* 2008; 175: 301-309.

Streyll D, Kenngott R, Herbach N, Wanke R, Blum H, Sinowatz F, Wolf E, Zerbe H, Bauersachs S. *Gene expression profiling of bovine peripartal placentomes: detection of molecular pathways potentially involved in the release of foetal membranes*. *Reproduction* 2012; 143: 85-105.

Studer E, Morrow DA. *Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1978; 172: 489-494.

Swangchan-Uthai T, Lavender CRM, Cheng Z, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC. *Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide*. *Biology of Reproduction* 2012; 87: 1-13.

Swangchan-Uthai T, Chen Q, Kirton SE, Fenwick MA, Cheng Z, Patton J, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC. *Influence of energy balance on the antimicrobial peptides S100A8 and S100A9 in the endometrium of the post-partum dairy cow*. *Reproduction* 2013; 145: 527-539.

Takeuchi O, Akira S. *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell* 2010; 140: 805-820.

Tao W, Mallard B. *Differentially expressed genes associated with Staphylococcus aureus mastitis of Canadian Holstein cows*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007; 120: 201-211.

Turner ML, Healey GD, Sheldon IM. *Immunity and inflammation in the uterus*. *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47: 402-409.

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: 1453-1465.

Vagnoni KE, Abbruzzese SB, Christiansen ND, Holyoak GR. *The influence of the phase of the estrous cycle on sheep endometrial tissue response to lipopolysaccharide*. *Journal of Animal Science* 2001; 79: 463-469.

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

Wagener K, Pothmann H, Prunner I, Peter S, Erber R, Aurich C, Drillich M, Gabler C. *Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis*. *Theriogenology* 2017b; 90: 237-244.

Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. *A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows*. *Animal Reproduction Science* 2011; 123: 127-138.

Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. *Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds*. *Journal of Dairy Science* 2002; 85: 244-251.

Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ. *Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows*. *Physiological Genomics* 2009; 39: 1-13.

Watson ED, Diehl NK, Evans JF. *Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of *Actinomyces pyogenes**. *Research in Veterinary Science* 1990; 48: 70-75.

Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W. *A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows*. *Theriogenology* 2010; 74: 1248-1255.

Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. *Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011; 140: 181-189.

Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. *The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow*. *Theriogenology* 2007; 68: 549-559.

Wuyts A, Struyf S, Gijbbers K, Schutyser E, Put W, Conings R, Lenaerts J-P, Geboes K, Opdenakker G, Menten P. *The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1 $\beta$  and is down-regulated by interferon- $\gamma$ : comparison with interleukin-8/CXCL8*. Laboratory Investigation 2003; 83: 23-34.

Yang D, Oppenheim JJ. *Alarmins and antimicrobial immunity*. Medical Mycology 2009; 47: 146-153.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Günther 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- $\kappa$ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder*. Molecular Immunology 2008; 45: 1385-1397.

Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau A-M, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. *Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor*. Immunity 1995; 3: 811-821.

Yasui T, McCann K, Gilbert RO, Nydam DV, Overton TR. *Associations of cytological endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows*. Journal of Dairy Science 2014; 97: 2763-2770.

Zaremba W (1990), *Postpartale Stadien beim Rind*. In: Richter J, Götze R (eds), Tiergeburtschilfe. Parey-Verlag, Berlin und Hamburg, 107.

Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip TAM, Schuberth HJ. *Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver*. Theriogenology 2000; 54: 771-786.

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: 209-223.

Zijlstra WG, Buursma A. *Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 1997; 118: 743-749.

## IX. ANHANG

### 1. PMN-Grenzwerte und SE-Prävalenz in verschiedenen Studien

**Tabelle 13: PMN-Grenzwerte zur zytologischen SE-Diagnostik.**

Referenz	Methode	Tage p.p.	PMN-Grenzwert	SE-Prävalenz
KASIMANICKAM et al. (2004)	CB <sup>-PVD</sup>	20 – 33 34 – 47	<sup>S</sup> 18 % <sup>S</sup> 10 %	35,1 % 34,0 %
GILBERT et al. (2005)	LVL	40 – 60	5 %	53,0 %
BARLUND et al. (2008)	CB	28 – 41	<sup>S</sup> 8 %	11,1 %
GALVÃO et al. (2009)	LVL	21	<sup>S</sup> 8,5 %	66,7 %
		35	<sup>S</sup> 6,5 %	38,2 %
		49	<sup>S</sup> 4 %	37,2 %
KAUFMANN et al. (2009)	CB <sup>-PVD</sup>	4h p. KB	15 %	13,4 %
SALASEL et al. (2010)	LVL <sup>-PVD</sup>	150 – 230	<sup>S</sup> 3 %	52,7 % bei RB
DUBUC et al. (2010a)	CB <sup>-PVD</sup>	32 – 38	<sup>S</sup> 6 %	9,4 %
		53 – 59	<sup>S</sup> 4 %	7,7 %
PLÖNTZKE et al. (2010)	CB <sup>-PVD</sup>	18 – 38	5 %	38,0 %
MCDUGALL et al. (2011)	CB <sup>-PVD</sup>	28	9 %	30,0 %
		42	7 %	23,0 %
MADOZ et al. (2013)	CB <sup>-PVD</sup>	21 – 62	<sup>S</sup> 5 %	17,0 %
PASCOTTINI et al. (2016c)	CT	Färsen zur KB	<sup>S</sup> 1 %	7,9 %

PMN: polymorphkernige Leukozyten, Verwendung für ‚neutrophile Granulozyten‘; SE: subklinische Endometritis; Methode: Methode zur Gewinnung zytologischer Endometrium-Proben; CB: Cytobrush; LVL: Low-volume-uterine-lavage; CT: Cytotape; Tage p.p.: Zeitpunkt der Probenentnahme in Tagen postpartum; KB: künstliche Besamung; RB: Repeat Breeder (klinisch gesunde, zyklische Kühe mit mindestens drei erfolglosen Besamungen seit der letzten Kalbung); <sup>-PVD</sup>: Ausschluss von PVD durch äußere Adspektion und vaginale Untersuchung; <sup>S</sup>: statistisch ermittelter PMN-Grenzwert

### 2. Geräte, Material und Reagenzien

#### 2.1. Geräte

##### 2.1.1. Geräte für verschiedene Untersuchungen

Autoklav D-65

Eismaschine RF0266A

Elektronische Pipette HandyStep,  
einstellbar (1 µl – 50 ml)

Systec, Linden

The Manitowoc Company,  
Manitowoc (USA)

Brand, Wertheim

Kühlschrank (+6 °C) mit Gefrierfach	Bosch, Stuttgart
Kühlschrank (+6 °C) mit Gefrierfach	Liebherr, Bulle (Schweiz)
Microplate Reader CLARIOstar, Photometer mit Laseraufrüstung für AlphaScreen/AlphaLISA/AlphaPlex	BMG Labtech, Ortenberg
NanoPhotometer Pearl, ab 0,3 µl Probenvolumen	Implen, München
Pipetten einstellbar und zugehörige Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Reinstwassersystem GenPure	TKA, Niederelbert
Schüttler MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Tischzentrifuge Biofuge pico, bis 14.000 xg	Heraeus, Hanau

### 2.1.2. Geräte für Probengewinnung und -asservierung

Autoklav Selectomat Compact	Münchner Medizin Mechanik GmbH, Planegg
Gefrierzelle (-20 °C)	Kirsch, Willstätt-Sand
Gefrierzelle Iridium 800 (-80 °C)	Angelantoni Lifescience, Massa Martana (Italien)
Glumatic Heißklebepistole 3002 und zugehörige Cristal-Sticks	Steinel, Herzebrock-Clarholz
Kühlzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Präzisionswaage SBC22 mit Gehäuse, Wägegenauigkeit 0,01 mg	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2	Bioair, Euroclone Division, Pero (Italien)
Ultraschallgerät Esaote MyLabOne, 6 – 10 MHz Linearsonde für transrektale Untersuchung (SV3513 VET), Software MyLabDesk	Esaote, Köln

### 2.1.3. Geräte für Untersuchung des Uterussekrets

Automatisches Hämatologiegerät Sysmex pocH-100iV Diff	Sysmex Corporation, Kobe (Japan)
Brutschrank HeracellVios 160	Thermo Fisher Scientific, München
Fluoreszenz-Durchflusszytometer Accuri C6	Becton Dickinson, Drogheda (Irland)
Pipette 0,1 - 2,5 µl und PCR-Spitzen BIOCERT 0,1 – 20 µl, steril	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe accu-jet und Serumpipetten	Brand, Wertheim

Rüttler für Mikrotiterplatten MTS 4	IKA, Staufen
Zentrifuge Universal 32R mit Einsätzen	Hettich, Tuttlingen

#### 2.1.4. Geräte für zytologische Untersuchung

Counter AC-15	Karl Hecht KG, Sontheim
Kamera Leica Microsystems	Leica, Wetzlar
Mikroskop Aristoplan	Leitz, Stuttgart

#### 2.1.5. Geräte für molekularbiologische Untersuchung

Experion Automated Electrophoresis Systems mit Priming Station, Vortex Station II und Automated Electrophoresis Station	Bio-Rad, Hercules (USA)
Heizblock und Schüttler für Mikroplatten BioShake iQ	Analytik Jena AG, Jena
Thermocycler TOptical mit zugehöriger Software	Biometra an Analytik Company, Göttingen
Workstation DNA/RNA UV-Cleaner Box	Biosan, Riga (Lettland)
Zentrifuge myFUGE Mini für 0,2 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Homogenisator SpeedMill Plus	Analytik Jena AG, Jena
Zentrifuge Universal 320R für 96 Well Platte	Hettich, Tuttlingen

#### 2.1.6. Geräte für bakteriologische Untersuchung

Brutschrank Incucell	Münchner Medizin Mechanik GmbH, Planegg
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung Gasprofi 2SCS mit Butan-Flasche	WLD-Tec, Göttingen

### 2.2. Material und Reagenzien

#### 2.2.1. Material für Probeentnahmegesetz

Biopsiezange mit Doppellöffel, AD 3,0 mm, Länge 650 mm, Sonderanfertigung	Bema Medical, Stuttgart
Dontodent Interdental-Bürstchen, 2,5 mm – 4,5 mm	DontoDent, DM-Drogeriemarkt, Karlsruhe
Edelstahlrohre 4,0 mm x 0,25 mm und 5,0 mm x 0,75 mm, Länge 650 mm, wiederholt kalt nachgezogen	Sawade, Gottmadingen
Einmalskalpelle	Braun, Tuttlingen
Kirschner-Draht als Mandrin, Durchmesser 3,2 mm, Länge 700 mm, beidseits rund	MK Medical, Emmingen-Liptingen

Kunststoffrohre, 2,0 mm x 0,8 mm und 3,2 mm x 2,2 mm	Simprop, Harsewinkel
Merocel CF 120, Streifen mit 2 mm x 4 mm x 205 mm	Medtronic, Mystic (USA)
Stelling 3 mm x 7 mm	Kipp, Sulz am Neckar
Sterile Operationshandschuhe Sempermed supreme	Semperit, Wien (Österreich)
Steriking Sterilisationsverpackungen unterschiedlicher Größen	Wipak Oy, Nastola (Finnland)
Tupfer steril, mit Aluminiumstab und Viscose	Nerbe Plus, Winsen/Luhe

### 2.2.2. Material für klinische Untersuchung und Probenentnahme

Anatomische Pinzetten und Scheren	Eickemeyer, Tuttlingen und Roth, Karlsruhe
Aprotinin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Costar SpinX Centrifuge Tube Filters, 0,45 µm, CA-Membran, steril	Corning, Amsterdam (Niederlande)
Einmalkanülen BD Microlance 3, 18G, 1 ½'', 1,2 x 40 mm	Becton Dickinson, Drogheda (Irland)
Einmal-Untersuchungshandschuhe Nitril Next Gen	Meditrade, Kiefersfelden
Elektroden-Gel für Ultraschall-Rektalsonde	HenrySchein, Melville (USA)
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe
Formalin 4 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gleit-Gel mit Schutzfilm	Selectavet, Weyarn-Holzolling
Kunststoff-Schutzüberzüge für Arbeitskanal Chemises sanitaires, 61 cm	IMV, L'Aigle (Frankreich)
Mikro-Schraubröhrchen 2 ml Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht
Papiertücher forma-care PREMIUM Ärztekrepp	Dr. Schumacher, Malsfeld
PBS-Trockensubstanz ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom, Berlin
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
RNAlater	Sigma-Aldrich, Steinheim
Röhrchen 15 ml mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrenspekulum nach Abelein, 37 cm	WDT, Garbsen
Schutzhüllen für Ultraschall-Rektalsonde, 18mm, Vytex Natural Rubber Latex	Rrt Richter Rubber, Hannover
S-Monovette 9 ml, K3 EDTA	Sarstedt, Nümbrecht

Veterinary Gloves	HenrySchein, Melville (USA)
-------------------	-----------------------------

### 2.2.3. Material und Reagenzien für Probenuntersuchung

#### 2.2.3.1. Material und Reagenzien für PMN-Chemotaxis-Assay

Albumin Fraction V from bovine serum	Merck, Darmstadt
Easycoll, Dichte 1,077 g/ml	Biochrom, Berlin
Maus-anti-bovin-CD11b-FITC, monoklonal, 0,1mg/ml	Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim
Neuro Probe AP48, 48-Well Micro Chemotaxis Chamber mit zugehörigen Polycarbonat-Membranen, 3 µm Poren, 25 x 80 mm	Neuro Probe, Gaithersburg (USA)
Recombinant Human IL-8, 25 µg	PeproTech, Rocky Hill (USA)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR, Ismaning
Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM):Ham's Nutrient Mixture F-12 (Ham's-F12) =1:1	Biochrom, Berlin

#### 2.2.3.2. Material und Reagenzien für AlphaLISA-Untersuchung

AlphaLISA Detection Kits, 100 Assay Points, für IL1B, IL6, IL8, IL17A, IL10	PerkinElmer, Rodgau
Abdichtungsfolie TopSeal-A Plus	PerkinElmer, Rodgau
AlphaPlate-384, light grey, pinch bar design	PerkinElmer, Rodgau
Lichtgeschützte Reaktionsgefäße, 1,5 ml, amber	Roth, Karlsruhe
Lichtgeschützte Reaktionsgefäße, Eppendorf Tubes 5 ml, amber	Eppendorf AG, Hamburg

#### 2.2.3.3. Material und Reagenzien für zytologische Untersuchung

Haema-Schnellfärbung mit gebrauchsfertigen Reagenzien	Labor+Technik Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Objektträger	Heinz Herenz, Hamburg

#### 2.2.3.4. Material und Reagenzien für molekularbiologische Untersuchung

Ethanol, 96 %	Roth, Karlsruhe
DNA-Exitus-Plus und RNse-Exitus Plus	AppliChem, Darmstadt
Experion RNA Analysis Kit und RNA StdSens Chip	Bio-Rad, Hercules (USA)

Innu SPEED Lysetubes P mit 2,4 – 2,8 mm Keramik-Beads	Analytik Jena AG, Jena
Kühlrack IsoFreeze PCR Cooler	Scientific Specialties, Lodi (USA)
Oligo-dT-15-Primer (500µg/ml), dNTP-Mix (100mM), M-MLV Reverse Transkriptase H(-) Point Mutant (200u/µl), M-MLV RT 5x Buffer, RNasin Ribonuclease Inhibitor (400u/µl)	Promega, Madison (USA)
PCR-Pipettenspitzen BIOCERT, verschiedene Größen, DNA-, RNase-frei, steril	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße Soft Tubes, 0,2ml, RNase-, DNase- und DNA-frei, steril	Biozym, Hessisch Oldendorf
Primer (IL1B, IL6, IL10, PTGS2)	Biomers.net, Ulm
Primer (IL8, S100A9, TNFα)	Eurofins Genomics, Ebersberg
RNA Mini Kit	Bio&Sell, Feucht
SensiFAST SYBR No-ROX Kit für PCR	Bioline, Luckenwalde
Transparente 96 Well Platten Frame Star, non-skirted, low profile und qPCR Adhesive Clear Seals	4titude, Berlin
Wasser, Nuklease-frei, steril-filtriert	Roth, Karlsruhe

### 2.2.3.5. Material für bakteriologische Untersuchung

Cryobank Tubes, gemischt	Mast Diagnostica, Reinfeld
Columbia Schafblut-Agar	Oxoid, Wesel
Parafilm PM-966	Bemis Company, Neenah (USA)

## 3. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen, die lyophilisiert oder als Pulver geliefert wurden, wurden gemäß Herstellerangaben aufgelöst, verwendet und gelagert.

### 3.1. Puffer und Lösungen für Untersuchung des Uterussekrets

#### 3.1.1. Extraktionspuffer für Uterussekret

##### Phosphate-buffered Saline (PBS)

9,55 g PBS-Trockensubstanz

in 1000 ml Aqua dest. lösen, Lagerung bei 4 °C

Aprotinin (10mg/ml)

10 mg Aprotinin-Pulver mit 1 ml H<sub>2</sub>O mischen  
einfrieren bei -20 °C in Aliquots von 50 µl

Extraktionspuffer für Uterussektret

10 µl Aprotinin (10 mg/ml) mit 990 µl PBS mischen  
ergibt Aprotininkonzentration 100 µg/ml

**3.1.2. Puffer und Lösungen für PMN-Chemotaxis-Assay**PBS doppelt konzentriert (2xPBS)

19,1 g PBS-Trockensubstanz in 1000 ml *Aqua dest.* lösen

Rekombinantes, humanes IL8, Gebrauchslösung (100 ng/ml)

25 µg Trockensubstanz in 2500 µl *Aqua dest.* mit 0,5 % Bovinem Serumalbumin  
lösen und als Stocklösung (1000 ng/ml) in Aliquots bei -20 °C einfrieren

vor dem Einsatz im Transmigrationstest die Stocklösung 1:10 mit  
Zellkulturmedium verdünnen

Maus-anti-bovin-CD11b-FITC-Antikörper-Gebrauchslösung (0,01 mg/ml)

30 µl anti-CD11b-FITC-Antikörper (0,1 mg/ml) mit 270 µl PBS mischen  
pro 50 µl Probe je 5 µl der Gebrauchslösung zugeben

Reinigung Durchflusszytometer

Das Durchflusszytometer wird nach jeder Messeinheit mit sterilfiltriertem *Aqua dest.* und FACS Clean gespült.

**3.1.3. Puffer und Lösungen für AlphaLISA-Untersuchung**

Die Durchführung der AlphaLISA-Untersuchungen geschah nach Herstellerangaben. Beispielfhaft wird im Folgenden das Protokoll für den IL1B-AlphaLISA beschrieben.

**3.1.3.1. Protokoll für IL1B-AlphaLISA**

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll für 2 µl Probenvolumen. Die Lösungen wurden erst unmittelbar vor ihrer Verwendung hergestellt.

## **Verdünnung der Reagenzien**

### 1X Assaypuffer

10 ml 10X AlphaLISA Immunoassay Puffer + 90 ml H<sub>2</sub>O (Verdünnung 1:10)

### Standard-Verdünnungen

Der lyophilisierte IL1B-Standard (0,3 µg) wird zunächst in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen (Konzentration 3 µg/ml) und im Anschluss nach dem vorgegebenen Protokoll verdünnt.

### 5X Anti-IL1B-Akzeptor-Beads (50 µg/ml, Verdünnung 1:100)

60 µl 5mg/ml AlphaLISA Anti-IL1B-Akzeptor-Beads + 5940 µl Assaypuffer

### 5X biotinylierter Antikörper (5 nM, Verdünnung 1:100)

60 µl 500 nM biotinylierter Anti-IL1B-Antikörper + 5940 µl Assaypuffer

### 2X Streptavidin(SA)-Donor-Beads (80 µg/ml, Verdünnung 1:62,5)

Nur unter Abdunkelung zu verwenden

200 µl 5 mg/ml SA-Donor-Beads + 12300 µl Assaypuffer

## **Pipettierschema**

- 2 µl/Well Probe bzw. Standard + 4 µl/Well Anti-IL1B-Akzeptor-Beads  
➔ Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 4 µl/Well biotinyliertem Anti-IL1B-Antikörper  
➔ Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 10 µl/Well SA-Donor-Beads  
➔ Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Photometrische Messung bei 615 nm nach Anregung mit 680 nm

### **3.1.3.2. Untersuchung anderer Analyten mittels AlphaLISA**

Der Nachweis von IL17A mittels AlphaLISA erfolgte analog zu IL1B im 3-Schritt-Protokoll. Für IL6 und IL8 fand nach Herstellerangaben ein 2-Schritt-Protokoll Anwendung: Anti-IL6/8-Akzeptor-Beads und biotinylierter Anti-IL6/8-Antikörper wurden als Mix zur Probe bzw. zum Standard gegeben. Für IL10 fand das Protokoll für 5 µl Probenvolumen im 2-Schritt-Protokoll Anwendung. Die Reagenzien wurden dabei wie folgt eingesetzt:

- 5 µl/Well Probe bzw. Standard
- 20 µl/Well Mix aus Anti-IL10-Akzeptor-Beads und Anti-IL10-Antikörpern
- 25 µl/Well SA-Donor-Beads

Je Assay wurden 12 Verdünnungsstufen des Standards eingesetzt (vgl. Tabelle 14).

**Tabelle 14: Niedrigste und höchste Standardpunkte der Standardkurven verschiedener Analyten in den AlphaLISA-Untersuchungen.**

	niedrigster Standardpunkt	höchster Standardpunkt
<b>IL1B</b>	1 pg/ml	300.000 pg/ml
<b>IL6</b>	5,6 pg/ml	1.000.000 pg/ml
<b>IL8</b>	0,3 pg/ml	100.000 pg/ml
<b>IL17A</b>	3 pg/ml	1.000.000 pg/ml
<b>IL10</b>	1 pg/ml	300.000 pg/ml

IL: Interleukin

### 3.2. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Untersuchung

#### Waschlösungen für RNA-Extraktion

Nach Herstellerangaben in 96 % Ethanol lösen

#### Mastermix für cDNA-Synthese (je Probe)

5 µl Puffer

1,25 µl dNTP

0,5 µl Reverse Transkriptase

0,625 µl RNasin

6,625 µl Nuklease-freies Wasser

#### Mastermix für PCR (je Probe)

10 µl SensiFast SYBR Mix

0,8 µl forward Primer (10 µM)

0,8 µl reverse Primer (10 µM)

7,4 µl Nuklease-freies Wasser

#### Primer-Verdünnung

Primer-Lyophilisate individuell nach Molekulargewicht in Nuklease-freiem Wasser auf 100 µM einstellen

vor Verwendung in der qPCR mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µM verdünnen

#### 4. Primer-Spezifikationen

**Tabelle 15: Primer-Sequenzen für die RT-qPCR.**

Gen	Primersequenz (5' → 3') und -länge	Gen-Länge	Produkt-Länge (Position im Gen)	T <sub>m</sub>	GC %	Referenz	Acc. No.
<b>IL1B</b>	for TTCTCTCCAGCCAACCTTCATT(22) rev ATCTGCAGCTGGATGTTTCCAT(22)	944	198 (2 – 199)	59,6 60,4	45,5 45,5	NEUVIANS et al. (2004)	M35589
<b>IL6</b>	for GGAGGAAAAGGACGGATGCT(20) rev TCTGCGATCTTTTGCTTCAGGAT(23)	1.108	195 (327 – 521)	59,8 60,6	55,0 43,5	HILLMER (2018)	NM_173923.2
<b>IL8</b>	for CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA(23) rev GGCCCACTCTCAATAACTCTC(21)	1.485	189 (61 – 249)	56,3 57,8	39,1 52,4	YANG et al. (2008)	NM_173925
<b>IL10</b>	for TGACTTTAAGGGTTACCTGGGTT(23) rev GCTTCTCCCCCAGTGAGTTC(20)	745	131 (216 – 346)	59,3 60,0	43,5 60,0	HILLMER (2018)	NM_174088
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	for CTTCTGCCTGCTGCACTTCG(20) rev GAGTTGATGTGCGCTACAACG(21)	1.712	156 (334 – 489)	61,9 59,4	60,0 52,4	YANG et al. (2008)	NM_173966
<b>PTGS2</b>	for CTCTTCCTCCTGTGCCTGAT(20) rev CTGAGTATCTTTGACTGTGGGAG(23)	3.489	359 (519 – 877)	58,8 58,3	55,0 47,8	ODAU et al. (2006)	AF031698
<b>S100A9</b>	for GGCTAGGGCACTATGACAC(19) rev GGCCACCAGCATAATGAAC(19)	651	179 (173 – 351)	57,3 56,7	57,9 53,6	LIND et al. (2015)	NM_001046328

Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR); for: forward-Primer; rev: reverse-Primer; T<sub>m</sub>: Schmelztemperatur des Primers in °C; GC %: Gehalt der Primer an den Basen Guanin und Cytosin in %; Acc. No.: Zugangsnummer zur Nukleotid-Sequenz in der National Center for Biotechnology Information (NCBI)-Datenbank

## 5. Anamnese- und Untersuchungsprotokolle

### Vorbericht Einzeltier

Datum:

Probennummer:

### Identität und Leistung

Kennnummer:	Ohrmarke: DE09	Name:
Rasse: <input type="checkbox"/> FV <input type="checkbox"/> BV <input type="checkbox"/> RB <input type="checkbox"/> Kreuzung__x__ <input type="checkbox"/> andere:		Gruppe:
Laktationsnummer:	aktuelle Leistung:	Körpergewicht:

### letzte Kalbung

Kalbedatum:	aktuell Tage p. p.:	1. Brunst p. p.:
Anzahl Kälber:	Geschlecht: <input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich	
Vitalität: <input type="checkbox"/> lebend <input type="checkbox"/> Totgeburt <input type="checkbox"/> Abort		
Geburtshilfe: <input type="checkbox"/> ohne Hilfe <input type="checkbox"/> normal/mit leichter Hilfe <input type="checkbox"/> erschwert <input type="checkbox"/> Schweregeburt <input type="checkbox"/> Wehenschwäche		
Stoffwechselstörungen: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> MilCHFieber <input type="checkbox"/> Ketose <input type="checkbox"/> Labmagenverlagerung <input type="checkbox"/> andere:		
Puerperalstörungen: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Nachgeburtverhalten <input type="checkbox"/> puerperale Metritis <input type="checkbox"/> klinische Metritis <input type="checkbox"/> andere:		
Behandlung seit Kalbung: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Behandlung: _____		

### Erstlingsuntersuchung

Datum:		
Vaginale US: Portioform: Z R V S		Zervixöffnung: 0 1 2 3 4 5
Schleimhaut: A B C D E		Feuchtigkeit: I II III IV V
Flüssigkeit: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Schleim sauber <input type="checkbox"/> Eiter <input type="checkbox"/> Harn <input type="checkbox"/> Schleim blutig		
Rektale US: linkes Ovar	Ovargröße: <input type="checkbox"/> Erbse <input type="checkbox"/> Bohne <input type="checkbox"/> Haselnuss <input type="checkbox"/> Walnuss <input type="checkbox"/> Hühnerrei	
	Funktionsgebilde: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Follikel <input type="checkbox"/> Theka-Zyste <input type="checkbox"/> Lutein-Zyste <input type="checkbox"/> CL	
rechtes Ovar	Ovargröße: <input type="checkbox"/> Erbse <input type="checkbox"/> Bohne <input type="checkbox"/> Haselnuss <input type="checkbox"/> Walnuss <input type="checkbox"/> Hühnerrei	
	Funktionsgebilde: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Follikel <input type="checkbox"/> Theka-Zyste <input type="checkbox"/> Lutein-Zyste <input type="checkbox"/> CL	
Diagnose: <input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> klinische Endometritis <input type="checkbox"/> Pyometra <input type="checkbox"/> Theka-Zyste <input type="checkbox"/> Lutein-Zyste <input type="checkbox"/> Urovagina <input type="checkbox"/> andere:		
Therapie: systemisch <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Erstrumate i.m. <input type="checkbox"/> Receptal i.v. <input type="checkbox"/> Ovogest i.v. <input type="checkbox"/> andere:		
lokal <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Eucacomp i.ut. <input type="checkbox"/> Metricure i.ut.		

### Kontrolluntersuchung

Datum:		
Vaginale US: Portioform: Z R V S		Zervixöffnung: 0 1 2 3 4 5
Schleimhaut: A B C D E		Feuchtigkeit: I II III IV V
Flüssigkeit: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Schleim sauber <input type="checkbox"/> Eiter <input type="checkbox"/> Harn <input type="checkbox"/> Schleim blutig		
Rektale US: linkes Ovar	Ovargröße: <input type="checkbox"/> Erbse <input type="checkbox"/> Bohne <input type="checkbox"/> Haselnuss <input type="checkbox"/> Walnuss <input type="checkbox"/> Hühnerrei	
	Funktionsgebilde: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Follikel <input type="checkbox"/> Theka-Zyste <input type="checkbox"/> Lutein-Zyste <input type="checkbox"/> CL	
rechtes Ovar	Ovargröße: <input type="checkbox"/> Erbse <input type="checkbox"/> Bohne <input type="checkbox"/> Haselnuss <input type="checkbox"/> Walnuss <input type="checkbox"/> Hühnerrei	
	Funktionsgebilde: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Follikel <input type="checkbox"/> Theka-Zyste <input type="checkbox"/> Lutein-Zyste <input type="checkbox"/> CL	
Diagnose: <input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> klinische Endometritis <input type="checkbox"/> Pyometra <input type="checkbox"/> Theka-Zyste <input type="checkbox"/> Lutein-Zyste <input type="checkbox"/> Urovagina <input type="checkbox"/> andere:		
Therapie: systemisch <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Erstrumate i.m. <input type="checkbox"/> Receptal i.v. <input type="checkbox"/> Ovogest i.v. <input type="checkbox"/> andere:		
lokal <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> Eucacomp i.ut. <input type="checkbox"/> Metricure i.ut.		

### **Abbildung 20: Anamnese-Protokoll zu den Versuchstieren.**

FV: Fleckvieh; BV: Braunvieh; RB: Rotbunte; Z: zapfenförmig; R: rosettenförmig; V: breit verlaufend; S: schlaff-lappig überhängend; 0: geschlossen; 1: strohhalmstark geöffnet; 2: bleistiftstark geöffnet; 3/4/5: 1-/2-/3-fingerstark geöffnet; A: blass; B: blassrosa; C: hyperämisch; D: krankhafte Rötung; I: trocken; II: wenig feucht; III: mäßig feucht; IV: sehr feucht; V: Flüssigkeitsansammlung

## Anlage 7 zu 1.2.10

### „Score Sheet“ - Abbruchkriterien

#### Kriterien für den Abbruch des Versuchsvorhabens „Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind“

Im Versuch werden ausschließlich Tiere verwendet, die frei von augenscheinlichen Symptomen einer klinischen Allgemeinerkrankung sind. Tiere mit Allgemeinsymptomen werden vom Versuch ausgeschlossen. Hierfür wird folgender Score verwendet:

Kriterium	Score 0	Score 1	Score 2
a) Körperkondition	BCS >2,5		BCS < 2,5
b) klinische Allgemeinuntersuchung			
Atemfrequenz (/min)	24 - 40	< 24 oder > 40	
Pulsfrequenz (/min)	65 - 90	< 65 oder > 90	
Schleimhautfarbe	blassrosa	rosarot oder blassgelb	gelb, rot, grau, blau
c) innere Körpertemperatur (°C)	< 39,5	39,5 - 40,5	> 40,5
d) Festliegen	nein		ja
e) Störungen in Verhalten/Haltung/ Gang (Ataxie, Epilepsie, Drängen)	nein		ja

Bei einem kumulativen Score von > 1 wird das Tier nicht in den Versuch aufgenommen und dem betreuenden Tierarzt vorgestellt.

Tiere, bei denen während der Untersuchung die Diagnose „klinische Endometritis“ gestellt wird, werden im Anschluss an die Probenentnahme dem Tierhalter sowie dem betreuenden Tierarzt Dr. Horst-Dieter Reichenbach gemeldet und von diesen entsprechend der betriebspezifischen Vorgehensweise therapiert. Alle weiteren Abweichungen, die im Rahmen der Untersuchung auffallen (z. B. Ovarialzysten, Azyklie), werden ebenfalls unverzüglich mitgeteilt, um eine schnellstmögliche Therapie zu gewährleisten.

Als weiteres Abbruchkriterium gilt eine heftige Widersetzlichkeit von Versuchstieren, durch die eine Gefahr für Mensch oder Tier entstehen könnte.

#### **Abbildung 21: „Score Sheet“ – Abbruchkriterien (Anlage 7 zum Tierversuchsantrag).**

BCS: Body-Condition-Score

<u>Untersuchungsbefunde</u>																
Identität					Vaginale Untersuchung					Rektale Untersuchung					Zyklusstand	klin. Diagnose
					Portio					Uterus			Ovarien			
Nr.	Kennnummer Name	OM	Rasse	BCS	Form	Öffnung	Schleimhaut	Feuchtigkeit	Flüssigkeit	Größe	Kontraktilität	Symmetrie	Links	Rechts		

**Abbildung 22: Protokoll zur gynäkologischen Untersuchung der Versuchstiere im Betrieb.**

OM: Ohrmarke; BCS: Body-Condition-Score

	<b>Eitrige Endometritis:</b> dominierend PMN, daneben einzelne mononukleäre Zellen, v.a. LZ und MP			<b>Gemischtzellige Endometritis:</b> PMN und mononukleäre Zellen, dominiert durch PZ; mit oder ohne LF			<b>Lymphoplasmazelluläre Endometritis:</b> dominierend mononukleäre Zellen, v.a. LZ und PZ; mit oder ohne LF	
Grad	PMN	mononukleäre Zellen		PMN	mononukleäre Zellen		mononukleäre Zellen, v.a. LZ und PZ	PMN
		LZ	PZ		LZ	PZ		
keine	<10	<8	≤3	<10	<8	≤3	<10	<10
angedeutet	10-20	≥8	≤5	10-20	8-10	3-6	10-15	
geringgradig	21-35			21-35	11-15	7-12	16-25	
mittelgradig	36-80			36-80	16-20	13-30	26-45	
hochgradig	>80			>80	>20	>30	>45	

**Abbildung 23: Histomorphologische Einteilung und Graduierung der Endometritiden mittels lichtmikroskopischer Untersuchung (modifiziert nach MERBACH (2011)).**

Die angegebenen Zellzahlen beziehen sich auf ein Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung im Bereich des Stratum compactum oder des luminalen Epithels mit Anteilen des Stratum compactum. PMN: Neutrophile Granulozyten; LZ: Lymphozyten; MP: Makrophagen; PZ: Plasmazellen

## 6. Ergebnistabellen und p-Werte der statistischen Auswertung

### 6.1. Einfluss der Probenentnahme auf die Fruchtbarkeit

**Tabelle 16: Fruchtbarkeitskennzahlen für im Rahmen des Tierversuchs beprobte und nicht beprobte Tiere der Versuchsherde.**

Parameter	Gruppe	Anzahl KB bzw. Tage			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
Besamungs- aufwand	nicht beprobt	1	1	2	0,2553
	beprobt	1	1	2	
Güstzeit	nicht beprobt	78	95	134	0,9006
	beprobt	82	96	113	
Verzögerungs- zeit	nicht beprobt	0	0	46	0,2613
	beprobt	0	0	22	

Die Auswertung geschah mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug 0,05;  $n(\text{beprobt}) = 95$ ,  $n(\text{nicht beprobt}) = 45$ .  $n$ : Tierzahl; KB: künstliche Besamung

**Tabelle 17: Fruchtbarkeitskennzahlen aller trächtigen Tiere der Versuchsherde zu Beginn und nach Ende des Versuchszeitraums.**

Parameter	Gruppe	Anzahl KB bzw. Tage			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
Besamungs- aufwand	Beginn	1	1	3	0,2617
	Ende	1	1	2	
Güstzeit	Beginn	77	93	132	0,9741
	Ende	79	95	121	
Verzögerungs- zeit	Beginn	0	0	45	0,3447
	Ende	0	0	23	

Die Auswertung geschah mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug 0,05;  $n(\text{Beginn}) = 110$ ,  $n(\text{Ende}) = 102$ .  $n$ : Tierzahl; KB: künstliche Besamung

## 6.2. PMN-Chemotaxis von Uterussekreten

**Tabelle 18: PMN-Chemotaxis von Uterussekreten in Abhängigkeit von Gebärmuttergesundheit, Vorkommen endometrialer Lymphfollikel und Zyklusstand.**

Auswertung	Gruppe	rel. Transmigrationsrate in %			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
Gebärmuttergesundheit	E.NEG	8	28	65	0,0492 <sup>1</sup>
	SE(cyto)	64	73	84	0,7976 <sup>2</sup>
	SE(histo)	14	25	62	0,0112* <sup>3</sup>
Lymphfollikel	LF-	11	28	62	0,9093
	LF+	5	25	81	
Zyklusstand	Follikelphase	4	19	33	0,0760+
	Lutealphase	14	29	64	

$n(\text{E.NEG}) = 72$ ,  $n(\text{SE(cyto)}) = 7$ ,  $n(\text{SE(histo)}) = 13$ ,  $n(\text{LF-}) = 62$ ,  $n(\text{LF+}) = 10$   
 $n(\text{Follikelphase}) = 21$ ,  $n(\text{Lutealphase}) = 33$ . Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Zu beachten sind unterschiedliche Signifikanzniveaus aufgrund des mehrfachen paarweisen Vergleichs mit anschließender Bonferroni-Korrektur bei der Auswertung nach Gebärmuttergesundheit: '+': Tendenz ( $p < 0,0333$  bei Gebärmuttergesundheit bzw.  $p < 0,1$  bei Lymphfollikel und Zyklusstand); '\*': signifikant ( $p < 0,0167$  bei Gebärmuttergesundheit bzw.  $p < 0,05$  bei Lymphfollikel und Zyklusstand);  $n$ : Tierzahl; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; LF-: gebärmuttergesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärmuttergesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind; <sup>1</sup>: paarweiser Vergleich von E.NEG und SE(cyto); <sup>2</sup>: paarweiser Vergleich von E.NEG und SE(histo); <sup>3</sup>: paarweiser Vergleich von SE(cyto) und SE(histo)

### 6.3. Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret

**Tabelle 19: Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Interleukin	Gruppe	n	c(US <sub>calc</sub> ) in pg/ml		
			1. Quartil	Median	3. Quartil
IL1B	E.NEG	72	1,0	1,0	24,2
	SE(cyto)	7	122,2	267,7	1.197,0
	SE(histo)	13	1,0	1,0	122,0
IL6	E.NEG	71	5,6	5,6	2.601,0
	SE(cyto)	7	1.419,0	4.566,0	6.806,0
	SE(histo)	13	5,6	5,6	136,0
IL8	E.NEG	71	625,4	1.702,0	3.007,0
	SE(cyto)	7	6.212,0	8.482,0	41.260,0
	SE(histo)	13	496,0	1.897,0	3.070,0
IL17A	E.NEG	72	11,5	54,7	123,6
	SE(cyto)	7	102,9	172,2	781,7
	SE(histo)	13	66,9	113,0	150,4
IL10	E.NEG	68	1,0	1,0	3,8
	SE(cyto)	7	1,0	41,1	2.359,0
	SE(histo)	13	1,0	1,0	66,0

Dargestellt sind die mittels AlphaLISA bestimmten Konzentrationen der Interleukine im Uterussekret nach Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination. Einzelne, nach Korrektur der Blutkontamination rechnerisch negative Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen und werden durch Nennung der Tierzahlen ersichtlich.  $n$ : Tierzahl, die nach Streichung rechnerisch negativer Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  für die Auswertung verwendet wurde;  $c(\text{US}_{\text{calc}})$ : Konzentration des Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination; IL: Interleukin; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

**Tabelle 20: Statistische Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Interleukin	p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test		
	<i>E.NEG/SE(cyto)</i>	<i>E.NEG/SE(histo)</i>	<i>SE(cyto)/SE(histo)</i>
IL1B	0,0027**	0,7726	0,0241+
IL6	0,0638	0,5610	0,0192+
IL8	0,0011**	1,0000	0,0112*
IL17A	0,0052*	0,1088	0,1778
IL10	0,0324+	0,0881	0,4717

Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug nach Bonferroni-Korrektur 0,0167. Der Vollständigkeit halber werden alle p-Werte ungeachtet des Ausgangs des vorangestellten Kruskal-Wallis-Tests angegeben. IL: Interleukin; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; ,+': Tendenz ( $p < 0,0333$ ), ,\*': signifikant ( $p < 0,0167$ ); ,\*\*\*': hoch signifikant ( $p < 0,0033$ )

**Tabelle 21: Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret ohne Berücksichtigung der Blutkontamination in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Interleukin	Gruppe	<i>n</i>	<i>c</i> (US) in pg/ml		
			1. Quartil	Median	3. Quartil
<b>IL1B</b>	E.NEG	81	1,0	1,0	15,5
	SE(cyto)	7	119,6	240,6	1.115,0
	SE(histo)	13	1,0	1,0	98,2
<b>IL6</b>	E.NEG	81	5,6	5,6	1.834,0
	SE(cyto)	7	1.315,0	4.381,0	6.778,0
	SE(histo)	13	5,6	5,6	522,0
<b>IL8</b>	E.NEG	81	663,7	1.450,0	2.419,0
	SE(cyto)	7	5.880,0	8.308,0	33.740,0
	SE(histo)	13	467,3	1.852,0	3.027,0
<b>IL17A</b>	E.NEG	81	20,8	52,7	115,8
	SE(cyto)	7	125,0	375,3	670,0
	SE(histo)	13	67,5	112,3	148,5
<b>IL10</b>	E.NEG	81	1,0	1,0	30,9
	SE(cyto)	7	1,0	46,0	1.858,0
	SE(histo)	13	1,0	1,0	71,0

Dargestellt sind die mittels AlphaLISA bestimmten Konzentrationen der Interleukine im Uterussekret nach Korrektur um Verdünnungsfaktor, wobei die Blutkontamination der Uterussekretproben unberücksichtigt blieb (*c*(US)). *n*: Tierzahl; *c*(US): Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte nur um den Verdünnungsfaktor; IL: Interleukin; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

**Tabelle 22: Statistische Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret ohne Berücksichtigung der Blutkontamination in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Interleukin	p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test		
	<i>E.NEG/SE(cyto)</i>	<i>E.NEG/SE(histo)</i>	<i>SE(cyto)/SE(histo)</i>
<b>IL1B</b>	0,0018**	0,6384	0,0241+
<b>IL6</b>	0,0577	0,5209	0,0192+
<b>IL8</b>	0,0009**	0,9084	0,0085*
<b>IL17A</b>	0,0024**	0,0899	0,0960
<b>IL10</b>	0,0516	0,1353	0,4717

Für die Berechnung wurde *c*(US) anstelle von *c*(US<sub>calc</sub>) verwendet, wodurch die Blutkontamination der Uterussekretproben unberücksichtigt blieb. Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug nach Bonferroni-Korrektur 0,0167. Der Vollständigkeit halber werden alle p-Werte ungeachtet des Ausgangs des vorangestellten Kruskal-Wallis-Tests angegeben. *c*(US<sub>calc</sub>): Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination; *c*(US): Konzentration des jeweiligen Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur der mit AlphaLISA bestimmten Werte nur um den Verdünnungsfaktor; IL: Interleukin; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; +, +': Tendenz ( $p < 0,0333$ ); \*, \*': signifikant ( $p < 0,0167$ ); \*\*, \*\*': hoch signifikant ( $p < 0,0033$ )

**Tabelle 23: Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel.**

Interleukin	Gruppe	<i>n</i>	<i>c</i> (US <sub>calc</sub> ) in pg/ml			p-Wert
			1. Quartil	Median	3. Quartil	
<b>IL1B</b>	LF-	62	1,0	1,0	25,7	0,4377
	LF+	10	1,0	1,0	1,0	
<b>IL6</b>	LF-	62	5,6	5,6	2.615,0	0,8910
	LF+	9	5,6	5,6	1.904,0	
<b>IL8</b>	LF-	61	583,4	1.916,0	3.336,0	0,4227
	LF+	10	1.068,0	1.162,0	1.526,0	
<b>IL17A</b>	LF-	62	3,0	47,8	114,4	0,0471*
	LF+	10	61,1	125,6	233,2	
<b>IL10</b>	LF-	59	1,0	1,0	1,0	0,0153*
	LF+	9	1,0	29,0	70,7	

Dargestellt sind die mittels AlphaLISA bestimmten Konzentrationen der Interleukine im Uterussekret nach Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination für gebärfuttergesunde Kühe ohne und mit Lymphfollikeln sowie p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ . Einzelne, nach Korrektur der Blutkontamination rechnerisch negative Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen und werden durch Nennung der Tierzahlen ersichtlich. *n*: Tierzahl, die nach Streichung rechnerisch negativer Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  für die Auswertung verwendet wurde;  $c(\text{US}_{\text{calc}})$ : Konzentration des Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination; IL: Interleukin; LF-: gebärfuttergesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärfuttergesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind; ,+': Tendenz ( $p < 0,1$ ); ,\*': signifikant ( $p < 0,05$ )

**Tabelle 24: Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret in Abhängigkeit vom Zyklusstand.**

Interleukin	Gruppe	<i>n</i>	<i>c</i> (US <sub>calc</sub> ) in pg/ml			p-Wert
			1. Quartil	Median	3. Quartil	
<b>IL1B</b>	Follikelphase	21	1,0	1,0	36,3	0,0622+
	Lutealphase	33	1,0	1,0	1,0	
<b>IL6</b>	Follikelphase	21	5,6	5,6	5,6	0,0368*
	Lutealphase	33	5,6	5,6	4.558,0	
<b>IL8</b>	Follikelphase	20	301,6	498,0	1.633,0	0,0017**
	Lutealphase	33	1.228,0	2.033,0	2.618,0	
<b>IL17A</b>	Follikelphase	21	3,0	18,5	60,1	0,0046**
	Lutealphase	33	45,1	103,8	151,5	
<b>IL10</b>	Follikelphase	21	1,0	1,0	1,0	0,4746
	Lutealphase	32	1,0	1,0	38,2	

Dargestellt sind die mittels AlphaLISA bestimmten Konzentrationen der Interleukine im Uterussekret nach Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination für gebärfuttergesunde Kühe in Follikel- und Lutealphase sowie p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ . Einzelne, nach Korrektur der Blutkontamination rechnerisch negative Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen und werden durch Nennung der Tierzahlen ersichtlich. *n*: Tierzahl, die nach Streichung rechnerisch negativer Werte von  $c(\text{US}_{\text{calc}})$  für die Auswertung verwendet wurde;  $c(\text{US}_{\text{calc}})$ : Konzentration des Analyten im Uterussekret nach rechnerischer Korrektur um Verdünnungsfaktor und Blutkontamination; IL: Interleukin; ,+': Tendenz ( $p < 0,1$ ); ,\*': signifikant ( $p < 0,05$ ); ,\*\*\*: hoch signifikant ( $p < 0,01$ )

## 6.4. Expression entzündungsrelevanter Gene in Endometrium-Biopsaten

Tabelle 25: Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.

Gen	Gruppe	Genexpression in Kopien/ $\mu$ l		
		1. Quartil	Median	3. Quartil
<b>IL1B</b>	E.NEG	169,0	420,5	747,4
	SE(cyto)	890,8	1.032,0	1.657,0
	SE(histo)	204,2	329,9	618,4
<b>IL6</b>	E.NEG	16,4	25,3	69,4
	SE(cyto)	23,5	40,9	93,7
	SE(histo)	11,0	34,2	44,6
<b>IL8</b>	E.NEG	107,9	740,9	1.722,0
	SE(cyto)	2.544,0	13.910,0	32.430,0
	SE(histo)	69,8	742,2	1.695,0
<b>IL10</b>	E.NEG	312,1	10.130,0	22.350,0
	SE(cyto)	18.440,0	24.250,0	35.420,0
	SE(histo)	1.250,0	13.410,0	24.690,0
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	E.NEG	129,1	231,8	345,9
	SE(cyto)	302,2	411,4	612,0
	SE(histo)	158,7	285,3	528,3
<b>PTGS2</b>	E.NEG	68,4	820,9	2.683,0
	SE(cyto)	1.383,0	1.921,0	6.884,0
	SE(histo)	245,5	886,9	1.961,0
<b>S100A9</b>	E.NEG	84,9	160,5	471,0
	SE(cyto)	261,6	405,7	600,9
	SE(histo)	102,0	145,3	488,1

Dargestellt ist die durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bestimmte Expression entzündungsrelevanter Gene in Endometrium-Biopsaten. Die mRNA-Expression wurde nach Einstellen der cDNA auf 200 ng/ $\mu$ l bestimmt.  $n(\text{E.NEG}) = 73$ ,  $n(\text{SE}(\text{cyto})) = 7$ ,  $n(\text{SE}(\text{histo})) = 13$ .  $n$ : Tierzahl; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

**Tabelle 26: Statistische Auswertung der endometrialen Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit von der Gebärmuttergesundheit.**

Gen	p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test		
	<i>E.NEG/SE(cyto)</i>	<i>E.NEG/SE(histo)</i>	<i>SE(cyto)/SE(histo)</i>
<b>IL1B</b>	0,0024**	0,9327	0,0047*
<b>IL6</b>	0,3946	0,8945	0,6992
<b>IL8</b>	0,0022**	0,7266	0,0085*
<b>IL10</b>	0,0112*	0,4192	0,0557
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0,0313+	0,1514	0,6426
<b>PTGS2</b>	0,0659	0,9615	0,1827
<b>S100A9</b>	0,2077	0,9519	0,5880

Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug nach Bonferroni-Korrektur 0,0167. Der Vollständigkeit halber werden alle p-Werte ungeachtet des Ausgangs des vorangestellten Kruskal-Wallis-Tests angegeben. IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; ,+': Tendenz ( $p < 0,0333$ ); ,\*': signifikant ( $p < 0,0167$ ); ,\*\*': hoch signifikant ( $p < 0,0033$ )

**Tabelle 27: Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel.**

Gen	Gruppe	Genexpression in Kopien/ $\mu$ l			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
<b>IL1B</b>	LF-	165,5	413,1	722,7	0,2940
	LF+	249,4	546,8	1.121,0	
<b>IL6</b>	LF-	14,2	25,3	72,9	0,8582
	LF+	20,9	28,3	40,8	
<b>IL8</b>	LF-	107,9	718,4	1.683,0	0,6181
	LF+	140,8	1.085,0	1.827,0	
<b>IL10</b>	LF-	293,7	9.495,0	19.430,0	0,1031
	LF+	3.033,0	19.320,0	30.130,0	
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	LF-	105,5	231,8	359,8	0,8291
	LF+	185,0	229,2	261,3	
<b>PTGS2</b>	LF-	57,7	566,3	2.166,0	0,0803+
	LF+	648,1	1.944,0	6.621,0	
<b>S100A9</b>	LF-	84,7	190,0	471,0	0,7490
	LF+	103,5	133,9	430,3	

Dargestellt ist die durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bestimmte Genexpression von IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 in Endometrium-Biopsaten für gebärmuttergesunde Kühe ohne (LF-) und mit Lymphfollikeln (LF+) sowie p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ . Die mRNA-Expression wurde nach Einstellen der cDNA auf 200 ng/ $\mu$ l bestimmt.  $n(\text{LF-}) = 61$ ,  $n(\text{LF+}) = 12$ .  $n$ : Tierzahl; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; ,+': Tendenz ( $p < 0,1$ )

**Tabelle 28: Endometriale Expression entzündungsrelevanter Gene in Abhängigkeit vom Zyklusstand.**

Gen	Gruppe	Genexpression in Kopien/ $\mu$ l			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
IL1B	Follikelphase	132,5	262,2	720,1	0,3571
	Lutealphase	235,6	532,2	718,6	
IL6	Follikelphase	19,2	48,2	104,8	0,0895+
	Lutealphase	12,9	22,6	33,9	
IL8	Follikelphase	162,9	982,3	2.610,0	0,1754
	Lutealphase	107,5	617,0	1.304,0	
IL10	Follikelphase	139,3	1.594,0	14.840,0	0,0288*
	Lutealphase	1.389,0	14.210,0	23.880,0	
TNF $\alpha$	Follikelphase	102,2	257,7	369,9	0,7901
	Lutealphase	144,0	225,6	323,2	
PTGS2	Follikelphase	22,3	99,9	1.134,0	0,0091**
	Lutealphase	215,9	1.259,0	3.029,0	
S100A9	Follikelphase	89,1	154,4	250,2	0,5192
	Lutealphase	90,9	203,8	478,6	

Dargestellt ist die durch Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bestimmte Genexpression von IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , PTGS2 und S100A9 in Endometrium-Biopsaten für gebärruttergesunde Kühe in Follikel- und Lutealphase sowie p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ . Die mRNA-Expression wurde nach Einstellen der cDNA auf 200 ng/ $\mu$ l bestimmt.  $n(\text{Follikelphase}) = 21$ ,  $n(\text{Lutealphase}) = 34$ .  $n$ : Tierzahl; IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; +, +<sup>c</sup>: Tendenz ( $p < 0,1$ ); \*, \*<sup>c</sup>: signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*, \*\*<sup>c</sup>: hoch signifikant ( $p < 0,01$ )

### 6.5. Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit von der Gebärruttergesundheit und endometrialen Lymphfollikeln

**Tabelle 29: Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit von der Gebärruttergesundheit.**

Parameter	Gruppe	Anzahl KB bzw. Tage			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
Besamungsaufwand	E.NEG	1	1	2	0,4670
	SE(cyto)	1	1,5	3	
	SE(histo)	1	1	1,5	
Güstzeit	E.NEG	80	96	118	0,4398
	SE(cyto)	91	104	121	
	SE(histo)	82	93	99	
Verzögerungszeit	E.NEG	0	0	22	0,6540
	SE(cyto)	0	8,5	42	
	SE(histo)	0	0	7	

Die Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test übergreifend für alle drei Gruppen an Gebärruttergesundheit. Das Signifikanzniveau betrug 0,05;  $n(\text{E.NEG}) = 73$ ,  $n(\text{SE(cyto)}) = 6$ ,  $n(\text{SE(histo)}) = 12$ .  $n$ : Tierzahl; KB: künstliche Besamung; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist

**Tabelle 30: Fruchtbarkeitskennzahlen in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel.**

Parameter	Gruppe	Anzahl KB bzw. Tage			p-Wert
		1. Quartil	Median	3. Quartil	
<b>Besamungs- aufwand</b>	LF-	1	1	2	0,1410
	LF+	1	2	2	
<b>Güstzeit</b>	LF-	79	95	114	0,1586
	LF+	93	106	118	
<b>Verzögerungs- zeit</b>	LF-	0	0	20	0,2063
	LF+	0	6	23	

Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test innerhalb der gebärruttergesunden Tiere. Das Signifikanzniveau betrug 0,05;  $n(\text{LF-}) = 64$ ,  $n(\text{LF+}) = 9$ .  $n$ : Tierzahl; KB: künstliche Besamung; LF-: gebärruttergesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärruttergesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind

## 7. Übergreifende Darstellung der Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussektret und der endometrialen Genexpression

**Tabelle 31: Übergreifende Darstellung der Auswertung in Abhängigkeit von der Gebärruttergesundheit.**

Analyt	Auswertung	IL-Konzentration im Uterussektret	Endometriale Genexpression
<b>IL1B</b>	SE(cyto) > E.NEG	**	**
	SE(cyto) > SE(histo)	+	*
<b>IL6</b>	SE(cyto) > E.NEG	-	-
	SE(cyto) > SE(histo)	+	-
<b>IL8</b>	SE(cyto) > E.NEG	**	**
	SE(cyto) > SE(histo)	*	*
<b>IL17A</b>	SE(cyto) > E.NEG	*	n. u.
	SE(cyto) > SE(histo)	-	
<b>IL10</b>	SE(cyto) > E.NEG	+	*
	SE(cyto) > SE(histo)	-	-
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	SE(cyto) > E.NEG	n. u.	+
	SE(cyto) > SE(histo)		-
<b>PTGS2</b>	SE(cyto) > E.NEG	n. u.	-
	SE(cyto) > SE(histo)		-
<b>S100A9</b>	SE(cyto) > E.NEG	n. u.	-
	SE(cyto) > SE(histo)		-

Dargestellt sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussektret sowie der endometrialen Genexpression, die durch AlphaLISA bzw. Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bestimmt wurden. Zwischen E.NEG und SE(histo) waren hinsichtlich der untersuchten Parameter keine Unterschiede festzustellen, weshalb die Auswertung nicht dargestellt wird. IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): histologische Endometritis; ,-': statistisch kein Unterschied festzustellen ( $p \geq 0,0333$ ); ,+': Tendenz ( $p < 0,0333$ ); ,\*': signifikant ( $p < 0,0167$ ); ,\*\*': hoch signifikant ( $p < 0,0033$ ); ,n. u.': nicht untersucht

**Tabelle 32: Übergreifende Darstellung der Auswertung in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel.**

Analyt	Auswertung	IL-Konzentration im Uterussekret	Endometriale Genexpression
<b>IL1B</b>	LF+ > LF-	-	-
<b>IL6</b>	LF+ > LF-	-	-
<b>IL8</b>	LF+ > LF-	-	-
<b>IL17A</b>	LF+ > LF-	*	n. u.
<b>IL10</b>	LF+ > LF-	*	-
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	LF+ > LF-	n. u.	-
<b>PTGS2</b>	LF+ > LF-	n. u.	-
<b>S100A9</b>	LF+ > LF-	n. u.	-

Dargestellt sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret sowie der endometrialen Genexpression, die durch AlphaLISA bzw. Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bestimmt wurden, bei gebärmuttergesunden Kühen in Abhängigkeit vom Vorkommen endometrialer Lymphfollikel. IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; LF-: gebärmuttergesunde Tiere, bei denen keine Lymphfollikel nachweisbar sind; LF+: gebärmuttergesunde Tiere, bei denen Lymphfollikel nachweisbar sind; -,': statistisch kein Unterschied festzustellen ( $p \geq 0,1$ ); \*,\*': signifikant ( $p < 0,05$ ); ,n. u.': nicht untersucht

**Tabelle 33: Übergreifende Darstellung der Auswertung in Abhängigkeit vom Zyklusstand.**

Analyt	IL-Konzentration im Uterussekret	Endometriale Genexpression
<b>IL1B</b>	+(F)	-
<b>IL6</b>	*(L)	+(F)
<b>IL8</b>	***(L)	-
<b>IL17A</b>	***(L)	n. u.
<b>IL10</b>	-	*(L)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	n. u.	-
<b>PTGS2</b>	n. u.	***(L)
<b>S100A9</b>	n. u.	-

Dargestellt sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Interleukin-Konzentrationen im Uterussekret sowie der endometrialen Genexpression, die durch AlphaLISA bzw. Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) bestimmt wurden, bei gebärmuttergesunden Kühen in Abhängigkeit vom Zyklusstand. In Klammern wird jeweils die Zyklusphase (,F': Follikelphase; ,L': Lutealphase) genannt, in der höhere Werte detektiert wurden. IL: Interleukin; TNF $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ; PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2; S100A9: antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine; E.NEG: Tiere ohne Endometritis; SE(cyto): Tiere mit SE, die nur in der Zytologie nachweisbar ist; SE(histo): Tiere mit SE, die nur in der Histopathologie nachweisbar ist; -,': statistisch kein Unterschied festzustellen ( $p \geq 0,1$ ); ,+': Tendenz ( $p < 0,1$ ); ,\*': signifikant ( $p < 0,05$ ); ,\*\*\*': hoch signifikant ( $p < 0,01$ ); ,n. u.': nicht untersucht

## **X. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ausdrücklicher Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Holm Zerbe, für die Anregung des Forschungsthemas und sein fortwährendes Interesse. Die Möglichkeit zum selbstständigen Arbeiten bei gleichzeitigem Wissen um jederzeit verfügbare fachliche Unterstützung und persönlichen Rückhalt haben einen optimalen Rahmen für dieses Forschungsvorhaben geschaffen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Frank Weber, für die hervorragende Begleitung und Unterstützung sowie die unzähligen konstruktiven Impulse. Die Zusammenarbeit und der gegenseitige Austausch mit ihm waren mir eine besondere Freude!

Herrn Dr. Reichenbach von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, möchte ich herzlich für den unermüdlichen Einsatz bei der Probenentnahme danken. Seine langjährige Erfahrung, sein großes Fingerspitzengefühl sowie seine unerschöpfliche Geduld und Zuversicht haben maßgeblich zum Erfolg dieses Projekts beigetragen. Darüber hinaus vielen Dank an das gesamte Team des Lehr-, Versuchs- und Fachzentrums für Milchvieh- und Rinderhaltung Achselschwang, ohne dessen tatkräftige Unterstützung dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Schoon vom Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig für das außerordentliche Engagement im Rahmen dieser Arbeit, die unkomplizierte Kommunikation und die interessanten Tage im Histopathologie-Labor. Sein unvergleichlicher Erfahrungsschatz in der Beurteilung des Endometriums war für das Gelingen dieser Arbeit essentiell.

Vielen Dank an Herrn Dr. Wolf vom Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der LMU München, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, für die intensive technische wie fachliche Unterstützung bei der bakteriologischen Differenzierung. Bei Frau Dr. Anna Rieger möchte ich mich herzlich für die geduldige und kompetente Hilfe bei der statistischen Auswertung, die Liebe zu R und die oft kurzfristige Verfügbarkeit bedanken.

Dem Förderverein Bioökonomieforschung e. V. (FBF) danke ich vielmals für die finanzielle Unterstützung, die die praktische Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Aus ganzem Herzen möchte ich mich bei Sandra Kirsch für die ausdauernde Unterstützung im Labor bedanken. Danke für die Einarbeitung und Begleitung während der gesamten Zeit meiner (Labor-)Arbeit, die Hilfe bei ‚Notfällen‘, die vielen zytologischen Auswertungen, die Ideen, die Unkompliziertheit im gegenseitigen Austausch, die Freundschaft.

Einen lieben Dank möchte ich auch an Rita Radloff richten, die in allen organisatorischen und persönlichen Belangen ein offenes Ohr hatte.

Für die innovative und zielorientierte Hilfe bei der Konstruktion bzw. Optimierung des Probenentnahmegeräts danke ich dem Team unserer Hauswerkstatt sowie Manfred Kutschka, Rafael Rodriguez, Michael Krix und Thomas Becker.

Bei meinen Kollegen der Klinik für Wiederkäufer möchte ich mich ganz besonders bedanken. Ihre aufgeschlossene Art hat mir den Einstieg in das neue Arbeitsumfeld unwahrscheinlich erleichtert und ihre enorme Bereitschaft zum Wissenstransfer ist bewundernswert! Danke auch dem Pflergeteam unserer Klinik für die freundliche Zusammenarbeit und speziell für das achtsame Autoklavieren der sperrigen Arbeitsmaterialien. Auch meinen Mu(h)iatriker-Kollegen herzlichen Dank für die musikalischen Exkurse und eure Begeisterung für die Kunst.

Hervorheben möchte ich an dieser Stelle meine Mitdoktoranden: Vielen Dank für die Herzlichkeit und Ehrlichkeit, die tiefgründigen Gespräche und motivierende Aufmunterung, unterhaltsame Ausflüge und gemeinsamen Sport, Kuchen-Dates und Rooftop-Abende. Es war großartig und ich wünsche mir sehr, dass wir in Kontakt bleiben werden!

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Vielen Dank, dass ich immer auf eure Unterstützung zählen kann! Liebe Mama: Danke für deine unendliche Liebe, deine Kraft und deinen beeindruckenden Optimismus. Lieber Papa: Danke für deine liebevolle, umsorgende Art und deinen riesigen Elan. Liebe Franzi, lieber Christoph: Danke, dass ihr euren Weg geht und immer für mich da seid. Vielen Dank, Josef, für deine bedingungslose Unterstützung, deine Ideen, dein Mitdenken, den Adapter und die Korrekturen aber vor allem für die wundervolle gemeinsame Zeit!