



## 1.) Einleitung

Postpartale Erkrankungen der Gebärmutter stellen heutzutage ein bedeutendes Problem bei Hochleistungsmilchrindern dar (Sheldon et al. 2009a). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass 35-50% aller Milchkühe in den ersten drei bis sieben Wochen nach der Geburt eine Entzündung im Reproduktionstrakt entwickeln (LeBlanc 2012). Man geht davon aus, dass bis zu 20% aller Milchkühe von klinischer und bis zu 35% von subklinischer Endometritis betroffen sind (LeBlanc 2008, Sheldon et al. 2009a) sowie bis zu 40% aller Milchkühe postpartal an einer Metritis erkranken (Sheldon et al. 2009a). Entzündungsprozesse im Uterus verzögern die postpartalen Rückbildungsvorgänge in diesem Organ und führen häufig zu Sub- und Infertilität (Mateus et al. 2002, Sheldon et al. 2009a, b). Die reduzierte Fruchtbarkeit der Tiere schlägt sich u. a. in niedrigeren Konzeptionsraten und in einer höheren Anzahl an Tieren, die wegen Unfruchtbarkeit gemerzt werden nieder (LeBlanc et al. 2002, Gilbert et al. 2005). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass an klinischer Endometritis erkrankte Tiere ca. 73% häufiger wegen Unfruchtbarkeit gemerzt werden als gesunde Tiere (LeBlanc et al. 2002). Folglich ziehen postpartale Erkrankungen auch wirtschaftliche Konsequenzen für die Landwirte und Milchindustrie nach sich. Laut Sheldon et al. (2009a) belaufen sich die dadurch verursachten Kosten in der EU auf ca. 1,4 Milliarden Euro pro Jahr.

Infolge der Erschlaffung und Weitung des Geburtskanals während der peripartalen Phase weisen post partum fast 100% aller Kühe eine bakterielle Kontamination der Gebärmutter auf (Elliot et al. 1968, Sheldon 2004). Die meisten Tiere sind in der Lage die Pathogene ohne Entwicklung einer Erkrankung innerhalb weniger Wochen zu eliminieren, bei 10-17% kommt es aber zur Persistenz der Erreger und Infektion (Sheldon 2004, Sheldon et al. 2006). Welche Faktoren dabei eine Rolle spielen ist noch nicht endgültig geklärt. Man nimmt jedoch an, dass eine nicht angepasste Reaktion des lokalen Immunsystems post partum damit in Verbindung steht (LeBlanc 2012). In dieser Hinsicht scheint insbesondere die peripartale negative Energiebilanz (NEB) bei Hochleistungsmilchkühen, welche u. a. durch eine reduzierte systemische IGF-1-Konzentration gekennzeichnet ist, von Bedeutung zu sein (Wathes et al. 2007a, LeBlanc 2012). Kühe, die von der NEB betroffen sind, zeigen post partum



stärkere Entzündungen im Endometrium, eine verzögerte Heilung und Involution des Uterus (Wathes et al. 2007a, 2009) sowie eine reduzierte Fruchtbarkeit (Wathes et al. 2009, 2011). Piechotta et al. (2012) haben nachgewiesen, dass Tiere mit einer erniedrigten IGF-1-Serumkonzentration zwischen dem 242. und 248. Tag p.i. eine signifikant höhere Inzidenz postpartaler Erkrankungen aufweisen.

Galektine sind eine Familie  $\beta$ -Galaktosid-bindender Lektine (Barondes et al. 1994a) zu deren wichtigsten biologischen Funktionen die Modulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort gehört (Rabinovich und Toscano 2009). Sie werden im Verlauf und am Ende der Trächtigkeit in Uterus und Plazenta von Kühen auf mRNA- und Proteinebene exprimiert (Fröhlich 2011, Fröhlich et al. 2012) und spielen möglicherweise eine Rolle bei der Regulation des lokalen uterinen Immunsystems in der peripartalen Phase (Sheldon et al. 2009a, Fröhlich 2011). In vorangehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die lokale Expression bestimmter Galektine in Uterus und Plazenta ante partum, am 275. Tag der Trächtigkeit, durch die systemische IGF-1-Konzentration beeinflusst wird (Fröhlich 2011).

Aufgrund dessen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Galektine möglicherweise auch während des postpartalen Immun- und Entzündungsgeschehens im bovinen Uterus eine Rolle spielen und so die Entstehung und den Verlauf der postpartalen (Endo-) Metritis beeinflussen könnten. Folglich war das erste Ziel dieser Arbeit, die Expression und Lokalisation von Galektin-1, -3, -4, -9 bzw. -13 in Plazentom, Karunkel und interkarunkulärem Endometrium von Kühen post partum auf mRNA- und Proteinebene nachzuweisen, diese mit der Situation ante partum zu vergleichen sowie den Einfluss der IGF-1-Serumkonzentration auf die lokale Galektinexpression post partum zu untersuchen. Dazu wurden trächtige Milchkühe abhängig von ihrer IGF-1-Serumkonzentration am 248. Tag p.i. in zwei experimentelle Gruppen unterteilt und entsprechende Gewebeproben nach der Kalbung sowie nach Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion im Uterus durch Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) entnommen. LPS-Moleküle sind Bestandteile der äußeren Membran der Zellwand gram-negativer Bakterien und lösen nach ihrer Freisetzung u. a. starke Entzündungsreaktionen im Gewebe aus (Kayser et al. 2005).



Galektine sind außerdem an vielen biologischen Prozessen, wie Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion, Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose von Zellen, beteiligt (Perillo et al. 1998, Rabinovich 1999, Hsu und Liu 2004, Elola et al. 2007). Dadurch könnten sie wichtige Funktionen im Rahmen der bovinen Plazentation, wie das Remodeling von Gewebe, die Invasion des Trophoblasten oder die plazentare Angiogenese, vermitteln. Das zweite Ziel dieser Arbeit war deshalb die Charakterisierung der Effekte von Galektin-1, -3 und -4 auf die Proliferation und Motilität boviner plazentarer Zellen *in vitro*.

Weitere vielversprechende Kandidaten, die Entwicklung, Wachstum und Funktion der bovinen Plazenta regulieren könnten sind IGF-1, Growth Hormone und Schilddrüsenhormone. In anderen Spezies, wie Mensch oder Schaf konnte gezeigt werden, dass IGF-1, GH und T3 sich positiv auf das fetoplazentare Wachstum sowie die Aufrechterhaltung der plazentaren Funktion im Verlauf der Trächtigkeit auswirken (Forbes und Westwood 2008, Lacroix et al. 1999, 2002, Kilby et al. 2005). Im dritten Abschnitt dieser Arbeit wurden analog zur *in vitro*-Galektin Studie die Effekte von IGF-1, GH und T3 auf ein Zellkulturmodell der bovinen Plazenta *in vitro* untersucht.



## 2.) Literaturübersicht

### 2.1 Anatomie und Klassifizierung der bovinen Plazenta

Eine Plazenta bildet sich durch das Aneinanderlagern oder Verwachsen des vaskularisierten Chorions mit der Gebärmutterschleimhaut zum Zweck des Gas- und Stoffaustausches zwischen fetalem und maternalem Kompartiment (Grosser 1909, 1927). Ferner spielt die Plazenta eine wichtige Rolle als Syntheseort für Protein- und Steroidhormone (Wooding und Beckers 1987, Wooding 1992, Reimers et al. 1985, Matamoros et al. 1994, Schlafer et al. 2000) sowie einiger Wachstumsfaktoren (Schlafer et al. 2000), z. B. VEGF (Pfarrer et al. 2006b) und FGF (Pfarrer et al. 2006a). Wie bei den meisten Säugetieren erfolgt beim Rind eine allantoide Plazentation, bei der das Chorion durch Gefäße der Allantois vaskularisiert wird (Strahl 1906, Grosser 1909, 1927).

Die Klassifizierung der Plazenta kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. Anhand der Verteilung der Zotten auf dem Chorion lässt sich die Wiederkäuerplazenta als *Placenta multiplex sive cotyledonata* beschreiben (Strahl 1906, Grosser 1909, 1927). Die Zotten sind hier nicht diffus über das Chorion verteilt, sondern in Form von einzelnen Zottenfeldern, den Kotyledonen, angeordnet (Strahl 1906). Die Kotyledonen greifen fingerförmig in Krypten der maternalen Uteruskarunkeln und bilden so ein Plazentom oder Semiplazentom, in dem es zu einer komplexen Interdigitation von maternalem und fetalem Gewebe kommt (Strahl 1906, Grosser 1909, 1927). Die maternalen Karunkeln stellen knopfartige Vorwölbungen der Uterusschleimhaut dar (Strahl 1906, Grosser 1909, 1927), die bereits im Fetalstadium angelegt werden und die Anordnung der Kotyledonen bestimmen (Strahl 1906). Die karunkulären Septen bestehen aus einem einfachen zylindrischen oder kubischen Epithel (Björkman 1954, Björkman und Bloom 1957) und drüsenlosem Stroma, in das zahlreiche Blutgefäße eingebettet sind (Strahl 1906, Grosser 1927). Die Zotten der fetalen Kotyledonen verzweigen sich in Sekundär- und Tertiärzotten und dringen tief in die vorgeformten Krypten ein, die sich zwischen den maternalen Septen ergeben (Björkman 1954, Björkman und Bloom 1957, Leiser und



Kaufmann 1994). Aufgrund dieses Musters der fetomaternalen Interdigitation zählt man die bovine Plazenta zum villösen Typ (Leiser und Kaufmann 1994). Die zottenbesetzten Bereiche des Chorions bezeichnet man auch als Chorion frondosum und die dazwischenliegenden glatten Bereiche als Chorion laeve oder Paraplacenta (Björkman 1954, Leiser und Kaufmann 1994). Stoffaustausch findet in beiden Bereichen des Chorions statt (Leiser und Kaufmann 1994).

Jede fetale Zotte besteht aus Mesenchym, welches Allantoisgefäße enthält, und einem Epithelüberzug aus Trophektoderm, dem Trophoblasten (Björkman 1954, Björkman und Bloom 1957). Der Trophoblast stellt keine einheitliche Zellpopulation dar, sondern setzt sich aus zwei verschiedenen Zellpopulationen zusammen (Björkman 1954, Björkman und Bloom 1957, Björkman 1969). Die Mehrzahl der Zellen (ca. 80%), die sog. mononukleären Trophoblastzellen, sind typische, einkernige, polarisierte Epithelzellen (Wooding 1992, Wooding et al. 1997). Mononukleäre Trophoblastzellen und Karunkelepithelzellen tragen apikale Mikrovilli, die in die fetomaternalen Kontaktzone hineinragen, dort ineinander greifen und so zu einer enormen Oberflächenvergrößerung der Kontaktfläche zwischen Mutter und Fetus führen (Björkman und Bloom 1957). Etwa 15-20% des Trophoblasten werden durch sog. Trophoblastriesenzellen (trophoblast giant cell, TGC) repräsentiert (Wimsatt 1951, Wooding 1992, Wooding und Wathes 1980, Wooding et al. 1997). Diese Zellen weisen nicht die typischen Eigenschaften von Epithelzellen auf (Wooding 1992, Klisch et al. 1999a) und besitzen meistens zwei, seltener einen, drei oder mehr Kerne (Wimsatt 1951, Klisch et al. 1999a). Sie entstehen aus mononukleären Trophoblastzellen durch azytokinetische Mitose (Wimsatt 1951, Wooding 1992, Klisch et al. 1999a) und sind in der Regel polyploid, was mit ihrer erhöhten Synthesekapazität in Verbindung gebracht wird (Klisch et al. 1999b). Reife TGC sind in der Lage den Epithelzellverband aktiv zu verlassen und in Richtung Uterusepithel zu wandern (Wooding und Wathes 1980), um dann dort mit einzelnen maternalen Epithelzellen zu fetomaternalen Hybridzellen zu fusionieren, die meistens dreikernig sind, seltener jedoch auch mehr als drei Kerne besitzen können (Wooding und Beckers 1987, Klisch et al. 1999a). Diesen Vorgang bezeichnet man auch als "eingeschränkte Invasion des Trophoblasten" (Pfarrer et al. 2003), da die Migration



der TGC nur bis zur Basalmembran des mütterlichen Epithels reicht, jedoch nicht weiter (Wooding und Wathes 1980, Pfarrer et al. 2003). Neben der Ausbildung fetomaternaler Synzytien, welche zu einer Oberflächenvergrößerung der Plazenta führen, ist die zweite wesentliche Funktion der TGC die Produktion bestimmter Substanzen sowie deren Transport ins maternale Kompartiment (Wooding 1992). Dazu gehören u. a. das plazentare Laktogen (Wooding und Beckers 1987), Progesteron (Reimers et al. 1985, Ullmann und Reimers 1989), Prostaglandine (Reimers et al. 1985) und einige graviditätsassoziierte Glykoproteine (pregnancy-associated glycoproteins, PAGs) (Zoli et al. 1992, Green et al. 2000). In den TGC synthetisierte Substanzen befinden sich in sekretorischen Granula, die einen Großteil des Zytoplasmas einnehmen (Wooding 1992). Durch die Fusion von TGC mit Uterusepithelzellen werden die Granula an die fetomaternalen Hybridzellen weitergegeben und können hier ebenfalls nachgewiesen werden (Wooding und Beckers 1987, Wooding 1992, Zoli et al. 1992). Ihr Inhalt wird dann durch Exozytose an das subepitheliale maternale Bindegewebe abgegeben und so dem mütterlichen Organismus zur Verfügung gestellt (Wooding 1992). Schließlich degenerieren die fetomaternalen Hybridzellen und werden von uninukleären Trophoblastzellen phagozytiert (Björkman 1969, Wooding und Wathes 1980).

Die wohl bekannteste Möglichkeit der Klassifizierung der Plazenta erfolgt anhand Art und Anzahl der Schichten, die die maternalen und fetalen Blutkreisläufe voneinander trennen (Grosser 1909, 1927). Je nach Spezies kommt es zu einem unterschiedlich starken Abbau der mütterlichen Gewebsschichten (maternales Endothel, maternales Bindegewebe, Uterusepithel), wohingegen die fetalen Anteile (fetales Endothel, fetales Bindegewebe, Chorionepithel) stets vollständig erhalten sind. Grosser (1909) bezeichnete die Plazenta der Wiederkäuer allgemein als syndesmochorial, da es seiner Auffassung nach zu einem mehr oder weniger starken Abbau des Uterusepithels kam und das Chorionepithel folglich an das maternale Bindegewebe grenzte. Detailliertere Studien zeigten später jedoch, dass die bovine Plazenta, im Gegensatz zu den Plazenten vieler anderer Wiederkäuer, eine epitheliochoriale Plazenta ist, da das maternale Epithel erhalten bleibt (Grosser 1927, Björkman 1954, Björkman und Bloom 1957). Diese Auffassung wurde im Weiteren von



verschiedenen Autoren bestätigt und die Plazenten aller Wiederkäuer dem epitheliochorialen Typus zugerechnet (Ludwig 1962, Steven 1975, Ramsey 1982). Wooding prägte 1992 schließlich den heute noch gültigen Begriff "synepitheliochorial" für die ruminante Plazenta, um dem Phänomen der eingeschränkten Invasion des Trophoblasten und der dadurch resultierenden Ausbildung von fetomaternalen Synzytien im Uterusepithel Rechnung zu tragen (Wooding 1992).

Aufgrund der geringen Invasivität der bovinen Plazenta kommt es unter der Geburt kaum zu Gewebsverlusten auf der mütterlichen Seite, weshalb das Rind zu den In- oder Adeciduata gezählt wird (Strahl 1906, Grosser 1909, 1927), bei denen die Trennung der Gewebe unter der Geburt entlang der fetomaternalen Interdigitationszone erfolgt und die Nachgeburt so fast nur aus fetalen Gewebsanteilen besteht (Leiser und Kaufmann 1994). Eine ähnliche Einteilung der Plazenten basiert auf dem Verhalten der maternalen Blutgefäße während und nach der Trächtigkeit: so kommt es beim Rind weder zur Eröffnung noch zur Zerstörung maternaler Blutgefäße, weswegen man die Plazenta der Wiederkäuer auch als Semiplacenta/Halbplazenta (Strahl 1906) oder Placenta appositata (Robinson 1904) bezeichnet.

## **2.2 Uterus und Plazenta des Rindes während der peri- und postpartalen Phase**

Die peripartale Phase umfasst in etwa den Zeitraum zwischen drei Wochen vor und drei Wochen nach der Kalbung (Smith und Risco 2005) während man unter der postpartalen Phase die Zeitspanne zwischen Kalbung und Abschluss der Rückbildungsvorgänge am Uterus versteht (Paisley et al. 1986, Sheldon 2004). Die Dauer der postpartalen Phase lässt sich nicht exakt vorhersagen, da sie zahlreichen exogenen und endogenen Faktoren, wie Alter, Rasse, Ernährung oder peripartalen Erkrankungen, unterliegt. Störungen der Uterusinvolution oder der Wiederaufnahme



der zyklischen Aktivität führen häufig zu einer Verlängerung der postpartalen Phase (Paisley et al. 1986).

Während der Gravidität erfolgt eine massive Größenzunahme des Uterus, insbesondere im Bereich des fruchttragenden Horns. Um eine erneute Trächtigkeit zu ermöglichen, sind Rückbildungsvorgänge an diesem Organ essentiell. Die Involution des Uterus umfasst im Wesentlichen drei Schritte: die Reduktion der Größe des Uterus, das Ausstoßen von Gewebeanteilen sowie die Regeneration der Gebärmutter Schleimhaut, insbesondere in den vormals fruchttragenden Bereichen (Gier und Marion 1968). Die rektal erfassbare Involution ist nach etwa 40 Tagen abgeschlossen (Marion et al. 1968), die komplette histologische Involution dauert ca. zehn Tage länger (Gier und Marion 1968). Die Rückbildung des Uterus ist ein sensibler Prozess der bestimmten Faktoren unterworfen ist, so beeinflussen z. B. die Anzahl vorangehender Trächtigkeiten, die Jahreszeit oder pathologische Prozesse wie Nachgeburtsverhaltung und postpartale Infektionen die Dauer der Involution maßgeblich (Marion et al. 1968).

Direkt post partum kommt es zu Kontraktionen des Myometriums und Vasokonstriktionen, die zu einer Größenreduktion des Uterus vornehmlich in den ersten Tagen nach der Geburt führen (Gier und Marion 1968, Leslie 1983). Im Endometrium entwickelt sich zunächst ein Ödem, was sich aber nach sechs bis acht Tagen wieder komplett zurückbildet (Gier und Marion 1968).

Das Größenwachstum der Plazentome hält bis in die letzten Monate der Trächtigkeit an (Björkman 1954). Kurz vor sowie kurz nach der Geburt finden strukturelle Veränderungen an Karunkeln und Chorionzotten statt. In den karunkulären Krypten kommt es stellenweise zu Abflachung, Atrophie oder Verlust des Epithels, wohingegen in anderen Bereichen innerhalb des Kryptenepithels Plasmodien mit bis zu 20 Kernen beobachtet werden können (Björkman 1954, Björkman und Sollen 1960). Woicke et al. (1986) beobachteten neben einer ausgeprägten Abflachung des Kryptenepithels ferner eine starke Abnahme der Anzahl an Kryptenepithelzellen ab dem 270. Trächtigkeitstag sowie eine Verbreiterung und Kollagenisierung der maternalen Bindegewebssepten. Die Anzahl der TGC nimmt in den letzten zwei



Tagen vor der Geburt stark ab (Wooding 1983, 1992), was notwendig für die physiologische Ablösung der Nachgeburt zu sein scheint (Williams et al. 1987, Gross et al. 1991). Bei den meisten Kühen löst sich die Nachgeburt innerhalb der ersten sechs Stunden post partum spontan ab. Von einer Nachgeburtshaltung spricht man, wenn die Secundinae nach 24 Stunden oder mehr noch nicht abgegangen sind (Sheldon 2004).

Nach erfolgter Ablösung der Placenta fetalis ist das kubische Epithel der Karunkeln an vielen Stellen abgeflacht oder es fehlt ganz. Die Krypten sind kollabiert und meistens ohne Inhalt, jedoch können in manchen Krypten Reste fetalen Gewebes in Form von Zelldetritus oder seltener auch Teile intakter Zotten beobachtet werden. Die Bildung von Zelldetritus ist ein Anzeichen dafür, dass es bereits vor Abgang der fetalen Membranen zur Degeneration der fetalen Zotten gekommen ist (Björkman und Sollen 1960). Es folgt die Nekrose und Mineralisierung dieser fetalen Überreste, welche schließlich durch Phagozytose oder Ausstoß mit den Lochien beseitigt werden, sodass sie nach zwei (Gier und Marion 1968) bis maximal elf Tagen nach der Geburt nicht mehr nachweisbar sind (Archbald et al. 1972). In den ersten Tagen nach der Kalbung kommt es zu einer Vasokonstriktion der karunkulären Blutgefäße und durch die daraus resultierende Ischämie werden die oberflächlichen Schichten der Karunkeln nekrotisch und schilfern ab (Gier und Marion 1968). Nach 15 Tagen sind die Karunkeln nahezu komplett abgeschilfert (Gier und Marion 1968, Archbald et al. 1972).

Im Anschluss an den Ausstoß von nicht mehr "benötigtem" Gewebe kommt es zur Regeneration der Karunkeln (Gier und Marion 1968). Es zeigt sich, dass die Karunkeloberfläche unter optimalen Bedingungen am 25. Tag post partum wieder komplett mit Epithel bedeckt ist (Gier und Marion 1968), wohingegen Archbald et al. (1972) bereits nach 19 Tagen eine komplette Reepithelialisierung der Karunkeloberfläche beschrieben. Im interkarunkulären Endometrium setzt die Regeneration des Epithels ausgehend von weniger geschädigten Bereichen unmittelbar post partum ein (Gier und Marion 1968). Der Ersatz des Epithelgewebes erfolgt laut Gier und Marion (1968) durch das Auswachsen von Drüsenepithelien aus



den umliegenden Uterindrüsen und die komplette Reepithelialisierung ist im interkarunkulären Bereich nach acht Tagen abgeschlossen. Archbald et al (1972) fanden im Gegensatz dazu, dass bereits am ersten Tag post partum degenerierte und regenerierte Epithelzellen nebeneinander vorkamen, sodass das interkarunkuläre Gebiet schon während der frühen Involution stets von Epithel bedeckt war. Die Reepithelialisierung geht laut den Autoren nicht von den Drüsenepithelien, sondern von basalen Gebieten des Endometriumsepithels aus und ist nach ca. 15 Tagen abgeschlossen (Archbald et al. 1972). Laut Sheldon (2004) haben sich oberflächliche Schichten des Endometriums nach 25 Tagen regeneriert, wohingegen tiefere Schichten erst nach sechs bis acht Wochen abgeheilt sind.

In den ersten Tagen post partum bis etwa zwei oder drei Wochen nach der Kalbung kommt es zum Ausstoß der sog. Lochien. Dabei handelt es sich physiologischerweise um eine gelbe bis bräunliche, geruchlose, zähfließende Flüssigkeit, die neben nekrotischen und abgeschilferten Gewebsanteilen aus Fruchtwasser und Blut besteht (Sheldon 2004).

### **2.3 Postpartale Erkrankungen des bovinen Uterus**

Während der Geburt sowie in den ersten Tagen post partum ist der Geburtsweg erschlafft und geweitet (Gier und Marion 1968, Sheldon 2004, Sheldon und Dobson 2004). Dieser Umstand erleichtert es Bakterien aus der Umgebung des Tieres, dem Kot oder dem Tier selbst in den vormals sterilen Uterus einzudringen (Sheldon 2004, Sheldon und Dobson 2004) und das dort während der Involution herrschende Milieu begünstigt das Bakterienwachstum (Elliot et al. 1968, Bretzlaff 1987, Paisley et al. 1986). In den ersten zwei bis drei Wochen nach der Geburt ist die Gebärmutter von nahezu jeder Kuh mit Bakterien kontaminiert (Elliot et al. 1968, Sheldon 2004). So wiesen Elliot et al. (1968) in 93% der Uteri an Tag 3 bis 15 post partum verschiedene aerobe und anaerobe Bakterien nach, wobei es häufig während der zweiten Woche nach der Geburt zu einem Anstieg der betroffenen Tiere und der bakteriellen Belastung kommt (Sheldon 2004).