

**Untersuchungen zur Bedeutung des präpartalen
Progesteronentzugs in Hinblick auf die Steuerung
der Geburt und die Ablösung der Nachgeburt
beim Rind**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des PhD-Grades

der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sima Shenavai

Tierärztin aus Meisenheim am Glan

Gießen 2011

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2012

© 2012 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-084-7

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

**Untersuchungen zur Bedeutung des präpartalen
Progesteronentzugs in Hinblick auf die Steuerung der
Geburt und die Ablösung der Nachgeburt
beim Rind**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sima Shenavai

Tierärztin aus Meisenheim am Glan

Gießen, September 2011

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Hauptbetreuer: Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler

Zweitbetreuer: Prof. Dr. Klaus Steger

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Holm Zerbe

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. Gerald Reiner
(Prüfungsvorsitzender) und
Prof. Dr. Andreas Meinhardt
(Beisitzer)

Tag der Disputation: 12. März 2012

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Thesis selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sima Shenavai

**Meiner Familie,
meiner verstorbenen Oma
und Markus gewidmet**

Die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden zum Teil in folgender
Publikation veröffentlicht:

Shenavai, S., Hoffmann, B., Dilly, M., Pfarrer, C., Özalp, G. R., Caliskan, C., Seyrek-
Intas, K., Schuler, G. (2010): Use of the progesterone (P4) receptor antagonist
aglepristone to characterize the role of P4 withdrawal for parturition and placental
release in cows. In: *Reproduction*, Jg. 140, H. 4, S. 623 – 632.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. EINLEITUNG	12
2. LITERATURÜBERSICHT	15
2.1 Klassifizierung der Rinderplazenta	15
2.2 Makroskopische Anatomie der Rinderplazenta	16
2.3 Mikroskopische Anatomie der Rinderplazenta und präpartale Veränderungen der Plazentomstruktur	18
2.4 Biosynthese und Bedeutung plazentarer Steroide beim Rind.....	21
2.4.1 Allgemeine Charakteristika der Steroidhormone und deren Rezeptoren	21
2.4.2 Östrogene	25
2.4.3 Progesteron und Progesteronrezeptoren.....	27
2.4.4 Expression steroidogener Enzyme im Trophoblasten des Rindes.....	30
2.5 Glucocorticoide und ihre Rezeptoren.....	33
2.6 Prostaglandine als Regelfaktor der Reproduktion beim weiblichen Rind	34
2.6.1 Metabolismus	34
2.6.2 Prostaglandinrezeptoren.....	38
2.6.3 Wirkungen und Bedeutungen von PGF _{2α} und PGE ₂ in der Steuerung weiblicher Fortpflanzungsfunktionen.....	40
2.7 Endokrine Steuerung der Geburt beim Rind und wichtige beteiligte Faktoren	43
2.8 Nachgeburtsverhalten beim Rind.....	47
2.8.1 Klinische und ökonomische Bedeutung	47
2.8.2 Fakten und Vermutungen zu Ätiologie und Pathogenese.....	47
2.8.3 Morphologische Veränderungen in Rinderplazentomen bei Nach- geburtsverhalten	51
2.8.4 Endokrinologische Befunde bei Rindern mit Nachgeburtsverhalten	52
2.9 Antigestagene: Wirkungsmechanismen und Einsatzmöglichkeiten	56

3. MATERIAL UND METHODEN	61
3.1 Versuchsaufbau und Probenentnahmen	61
3.2 Klinische Untersuchungen	63
3.3 Gewebefixierung und immunhistologische Untersuchungen	63
3.3.1 Gewebefixierung in Formol nach Lillie	63
3.3.2 Immunhistologie.....	63
3.3.2.1 Prinzip, Färbeprotokoll und Auswertung	63
3.3.2.2 Immunhistologischer Nachweis der Cox II.....	65
3.3.2.3 Immunhistologischer Nachweis des Glucocorticoidrezeptors	67
3.3.2.4 Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors	68
3.4 Relative Quantifizierung der Trophoblastriesenzellen nach Lektin- Histochemie.....	69
3.4.1 Färbeprotokoll.....	69
3.4.2 Auswertung.....	70
3.5 Beurteilung des Karunkelepithe labbaus an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitten mittels Morphometrie.....	70
3.5.1 HE-Färbung	70
3.5.2 Auswertung.....	71
3.6 Präparation der cDNA und qualitative RT- PCR	72
3.6.1 RNA-Isolierung	72
3.6.2 DNase-Behandlung	73
3.6.3 Reverse Transkription (RT)	74
3.6.4 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	75
3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten	77
3.7 Quantitative RT-PCR.....	78
3.7.1 Allgemeines zur Real-Time RT-PCR (SYBR Green-Methode)	78
3.7.2 Auswertung der Daten aus der Real-Time RT-PCR	79
3.7.3 Statistische Auswertung	81
3.7.4 Durchführung der Real-Time RT-PCR.....	81
3.7.4.1 Protokoll.....	81
3.7.4.2 Erstellung von Standardkurven zur Berechnung der Effizienzen	82
3.8 Bestimmung der Steroidhormonkonzentrationen im maternalen Blut- plasma mittels Radioimmunoassay (RIA)	83

3.9	Bestimmung der 13, 14-Dihydro-15-Keto-PGF _{2α} (PGFM)-Konzentration im maternalen Plasma mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	84
3.9.1	Allgemeines	84
3.9.2	Prinzip des ELISAs	84
3.9.3	Durchführung	84
3.9.4	Auswertung	86
3.9.5	Validierung des ELISAs für die Bestimmung der PGFM-Konzentrationen in Rinderplasma	87
3.10	Reagenzien, Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterial	87
3.10.1	Primärantikörper	87
3.10.2	Sekundärantikörper	87
3.10.3	Isotypenkontrollantikörper	88
3.10.4	Seren zur Blockierung unspezifischer Bindungen in der Immunhistologie	88
3.10.5	Puffer und Lösungen	88
3.10.6	Reagenzien und Kits	90
3.10.7	Verbrauchsmaterialien und Geräte	91
3.11	Verwendete Software	93
4.	ERGEBNISSE	94
4.1	Klinische Beobachtungen	94
4.2	Expression der Cyclooxygenase II in den Plazentomen	98
4.2.1	Expression der Cyclooxygenase II auf Proteinebene	98
4.2.2	Expression der Cox II-spezifischen mRNA	101
4.3	Expression des Glucocorticoidrezeptors in den Plazentomen	102
4.3.1	Expression des Glucocorticoidrezeptors auf Proteinebene	102
4.3.2	Expression der Glucocorticoidrezeptor-spezifischen mRNA	104
4.4	Expression des Progesteronrezeptors in den Plazentomen	106
4.4.1	Expression des Progesteronrezeptors auf Proteinebene	106
4.4.2	Expression der Progesteronrezeptor-spezifischen mRNA	108
4.5	Reifezustand der Plazentome	109
4.5.1	Anteil der TGC an den Trophoblastzellen	109
4.5.2	Reduktion des Karunkel epithels	111
4.6	Steroidhormonkonzentrationen im maternalen Blutplasma	114

4.6.1	Freie und konjugierte Östrogene	114
4.6.2	Progesteron	118
4.7	13, 14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F _{2α} -Konzentrationen im maternalen Blutplasma	121
5.	DISKUSSION	124
5.1	Effekte der Antigestagenbehandlung auf den Geburtsverlauf, das Einsetzen der Laktation und die Vitalität der Kälber	124
5.2	Effekte der Antigestagenbehandlung auf den Nachgeburtsabgang und die Plazentareifung	129
5.3	Diskussion der Steroidhormonprofile im maternalen Blutplasma.....	130
5.4	Diskussion der PGFM-Konzentrationen im maternalen Blutplasma und der Cox II-Expression im Trophoblasten.....	132
5.5	Diskussion der PR- und GR-Expression.....	137
5.6	Schlussfolgerungen	140
6.	ZUSAMMENFASSUNG	141
7.	SUMMARY	145
8.	LITERATURVERZEICHNIS	148
9.	DANKSAGUNG	179

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schnitt durch ein Plazentom des Rindes (modifiziert nach Schnorr 1996).....	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von Steroidhormon-Rezeptoren.....	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Steroidogenese im bovinen Trophoblasten (modifiziert nach Schuler et al. 2008).....	31
Abbildung 4: PGF _{2α} -Synthesewege (nach Madore et al. 2003).....	36
Abbildung 5: Endokrine Steuerung der Geburt beim Rind (Modell).....	45
Abbildung 6: Strukturelle Charakteristika der Pioniersubstanz der Antigestagene, Mifepriston (RU 38486), sowie des in der Veterinärmedizin therapeutisch eingesetzten Aglepristons (RU 46534).....	59
Abbildung 7: Einteilung des Plazentoms in Zonen (schematisch).....	66
Abbildung 8: Bestimmung des relativen Anteils der Karunkelepithelfläche an der insgesamt von der Basalmembran des Karunkel-epithels begrenzten Fläche.....	71
Abbildung 9: Nachweis spezifischer RT-PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	78
Abbildung 10: Verlauf der Körpertemperatur bei drei Kühen, die am 270. und am 271.Tag post inseminationem mit Aglepriston behandelt wurden.....	95
Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis der Cox II in den einkernigen Trophoblastzellen eines Rindes nach Aglepriston-induzierter Geburt (D272+Ap).....	98
Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis der Cox II in den einkernigen Trophoblastzellen der Gruppen D272+Ap (A), D272-Ap (B) und Normalgeburt (C).....	99
Abbildung 13: Cox II-Immunoreaktivität in den einkernigen Trophoblastzellen in Abhängigkeit von der Lokalisation im Rinderplazentom.....	100
Abbildung 14: Expression der Cox II-mRNA in den Kotyledonen.....	101

Abbildung 15: Immunhistologischer Nachweis des Glucocorticoidrezeptors im Plazentom eines Rindes nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (A) und im Plazentom eines unbehandelten Tieres nach Sectio caesarea am Tag 272 (B).....	103
Abbildung 16: Nachweis des Glucocorticoidrezeptors im Plazentom eines Rindes nach Normalgeburt.....	103
Abbildung 17: Semiquantitative Beurteilung der Glucocorticoidrezeptor-Immunoreaktivität im Karunkelepithel und in den Trophoblastriesenzellen.....	104
Abbildung 18: Expression der Glucocorticoidrezeptor-spezifischen mRNA in Karunkeln (A) bzw. Kotyledonen (B).....	105
Abbildung 19: Prozentualer Anteil (\bar{x} +SD) Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellen (KS) in Rinderplazentomen.....	106
Abbildung 20: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors im Plazentom eines Rindes nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (A), eines unbehandelten Rindes nach Sectio caesarea am Tag 272 (B) sowie nach spontaner termin-gerechter Geburt (C).....	107
Abbildung 21: Expression der Progesteronrezeptor-mRNA im Karunkelgewebe	108
Abbildung 22: Prozentualer Anteil (\bar{x} +SD) der Trophoblastriesenzellen (TGC) an den Trophoblastzellen	109
Abbildung 23: Darstellung der Trophoblastriesenzellen (TGC) in Rinder-plazentomen mittels Lektin histochemie	110
Abbildung 24: Morphometrische Erfassung des Karunkelepithels.....	112
Abbildung 25: Histomorphologie unreifer Plazentome der Gruppen D272+Ap (A) und D272-Ap (B) mit intaktem, isoprismatischem Karunkel-epithel (schwarze Pfeile) und zahlreichen Trophoblastriesen-zellen (TGC). (C) Matures Plazentom nach Normalgeburt.....	113
Abbildung 26: Verlauf der Plasmakonzentrationen von Estron, Estronsulfat und Estradiol-17 β bei drei trächtigen Kühen vor/nach Geburtsinduktion mit Aglepriston (A – C) sowie bei drei unbe-handelten Kontrolltieren vor/nach Schnittentbindung am Tag 272 (D – F).....	115

Abbildung 27: Peripartaler Verlauf der Plasmakonzentrationen von Estron, Estronsulfat und Estradiol-17 β bei vier Kühen der Normalgeburtsgruppe.....	117
Abbildung 28: Verlauf der Plasmakonzentration von Progesteron bei drei trächtigen Kühen vor/nach Geburtsinduktion mit Aglepriston (A) sowie bei drei unbehandelten Kontrolltieren vor/nach Schnittentbindung am Tag 272 (B).....	119
Abbildung 29: Plasmakonzentration von Progesteron bei vier Kühen der Normalgeburtsgruppe.....	120
Abbildung 30: Verlauf der maternalen PGFM-Plasmakonzentration (A) von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272, (B) von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 sowie (C) von Rindern nach spontaner termin-gerechter Geburt.....	122

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Intensitäten immunhistologischer Signale und deren Gewichtung.....	67
Tabelle 2:	Zusammensetzung des DNase-Mixes	73
Tabelle 3:	Programm für die DNase-Behandlung	73
Tabelle 4:	Zusammensetzung des RT-Mastermixes	74
Tabelle 5:	Programm für die Reverse Transkription (RT)	75
Tabelle 6:	Zusammensetzung des Prämixes.....	75
Tabelle 7:	Zusammensetzung des Primermixes.....	76
Tabelle 8:	PCR-Protokoll	76
Tabelle 9:	In der PCR verwendete Primer und Größe der entsprechenden PCR-Produkte in Basenpaaren (bp).....	77
Tabelle 10:	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR (pro Reaktion)	82
Tabelle 11:	Programm für die qPCR.....	82
Tabelle 12:	Mittels „Standardkurven“ ermittelte Effizienzen der PCR-Reaktionen für die Zielgene Cyclooxygenase II (Cox II), Glucocorticoidrezeptor (GR), Progesteronrezeptor (PR) sowie die beiden Referenzgene GAPDH und β -Aktin.....	83
Tabelle 13:	Pipettierschema des angewendeten ELISA zur Messung der PGFM-Konzentrationen in Rinderplasmaproben.....	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- $\Delta_{5/4}$ - Isomerase
20 α -HSD	20 α -Hydroxysteroiddehydrogenase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AKR	Aldo-Ketoreduktase
Ap	Aglepriston
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cox II	Cyclooxygenase II
CPGES	zytosolische Prostaglandin E-Synthase
Ct	Threshold Cycle
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds DNA	double-strand DNA (doppelsträngige DNA)
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	Prostaglandin E-Rezeptor
FP	Prostaglandin F-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glucocorticoidrezeptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPDH	15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase
HRE	Hormone Responsive Elements
ICC	Immunocytochemistry
IRS	Immunoreactive score
kDa	Kilodalton
LBD	Ligandbindungsdomäne
LH	luteinisierendes Hormon

MG	Molekulargewicht
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPGES	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	Normalisierungsfaktor
NLS	Nuclear Localisation Signal
NSB	nichtspezifische Bindung
P ₄	Progesteron
P450arom	Aromatase
P450c17	17 α -Hydroxylase-C17, 20-Lyase
P450scc	side-chain-cleavage enzyme
PAS	Periodic Acid-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.c.	post conceptionem
PG	Prostaglandin
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGFM	Prostaglandin F _{2α} -Metabolit (13, 14-Dihydro-15-Keto Prostaglandin F _{2α})
PGES	Prostaglandin E -Synthase
PGFS	Prostaglandin F-Synthase
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin
p.i.	post inseminationem
PR	Progesteronrezeptor
PR-A	Progesteronrezeptor-Isoform A
PR-B	Progesteronrezeptor-Isoform B
RGE	relative Genexpression
RIA	Radioimmunoassay
RT	reverse Transkription
RU 38486	Mifepriston
RU 46534	Aglepriston
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)

SPRM	Selective Progesterone Receptor Modulator (selektiver PR-Modulator)
ss DNA	single-strand DNA (einzelsträngige DNA)
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
SULT1E1	Östrogensulfotransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGC	Trophoblast Giant Cell (Trophoblastriesenzelle)
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
UTC	Uninucleated Trophoblast Cell (einkernige Trophoblastzelle)

1. EINLEITUNG

Die Nachgeburtsverhaltung ist eines der häufigsten Probleme in der Milchviehhaltung und geht mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten einher. Ätiologie und Pathogenese sind, insbesondere auf molekularer Ebene, nur ansatzweise geklärt. Gängige Erklärungsmodelle basieren überwiegend auf einer Störung des Lösungsprozesses an der feto-maternalen Kontaktzone sowie auf einer unzureichenden postpartalen Uterusmotilität (LAVEN UND PETERS 1996; MCNAUGHTON UND MURRAY 2009; BEAGLEY ET AL. 2010).

Präpartal kommt es im Rinderplazentom zu charakteristischen, histomorphologischen Veränderungen. Man spricht auch von der „morphologischen Plazentareifung“. Am deutlichsten sind die Abflachung bzw. der partielle Verlust des Karunkel-epithels (WOICKE ET AL. 1986; SCHOON 1989) und die Reduktion der Anzahl der Trophoblastriesenzellen (WILLIAMS ET AL. 1987; GROSS ET AL. 1991). Diese präpartalen Umstrukturierungsprozesse werden als Voraussetzung für die vollständige Separation von fetalem und maternalem Anteil der Plazenta und somit für einen physiologischen Abgang der Nachgeburt angesehen.

Beim Rind ist das Corpus luteum graviditatis während der gesamten Trächtigkeit die Hauptprogesteronquelle. Es stellt den bei weitem überwiegenden Anteil des im mütterlichen Blut zirkulierenden Progesterons (P_4) bereit. Der präpartale P_4 -Abfall und der Eintritt der Geburt sind an die ein bis zwei Tage vorher einsetzende Luteolyse gekoppelt (HOFFMANN ET AL. 1979). Beim Rind bildet zusätzlich die Plazenta P_4 , doch das plazentare P_4 trägt kaum zum maternalen Plasmaspiegel bei. Lediglich in dem kurzen Zeitraum zwischen dem ca. 150. und 240. Graviditätstag ist die Plazenta in der Lage auch in Abwesenheit eines funktionstüchtigen Gelbkörpers die Gravidität aufrecht zu erhalten (ESTERGREEN ET AL. 1967; DAY 1977; JOHNSON ET AL. 1981; CONLEY UND FORD 1987). Die Rinderplazenta ist jedoch offensichtlich befähigt, hohe Progesteronkonzentrationen im Plazentagewebe zu erzeugen (TSUMAGARI ET AL. 1994; SCHULER 2000). Eine eigenständige Bedeutung des plazentaren Progesterons ist beim Rind bisher nicht bekannt.

Die plazentare Progesteronsynthese des Rindes findet im Trophoblasten statt. Immunhistologisch waren Progesteronrezeptoren (PR) im maternalen Teil der Plazentome (Karunkeln), also in unmittelbarer Nähe der P_4 -produzierenden Trophoblastzellen, nachweisbar (SCHULER ET AL. 1999). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Karunkeln eher den Wirkungen des plazentaren als des lutealen Progesterons unter-

liegen. Die Bedeutung des plazentaren Progesterons könnte beim Rind also darin bestehen, lokal hohe Progesteronkonzentrationen zu erzeugen, welche für den Eintritt bestimmter Progesteronwirkungen, z.B. lokale Immunsuppression oder Erhalt der Gewebeintegrität im Bereich der feto-maternalen Kontaktzone, erforderlich sein könnten. Schwellenwerte für „periphere Wirkungen“, wie die eher vom lutealen P₄-abhängige Ruhigstellung des Myometriums und der Schluss der Zervix könnten dagegen deutlich niedriger sein.

Dementsprechend wurden die folgenden, dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothesen formuliert:

- Hohe Progesteronkonzentrationen sind der Schlüsselfaktor für den Erhalt der Gewebeintegrität an der feto-maternalen Kontaktzone während der Gravidität.
- Eine unmittelbar präpartal stattfindende Umstrukturierung der feto-maternalen Kontaktzone („morphologische Plazentareifung“) ist essentiell für die termingerechte Ablösung der Nachgeburt.
- Ein vollständiger präpartaler Entzug des Progesterons lutealen und plazentaren Ursprungs ist Voraussetzung für die „Plazentareifung“ und somit für einen physiologischen Nachgeburtsabgang. Eine Persistenz der plazentaren Progesteronproduktion, über die präpartale Luteolyse oder Austreibung des Kalbes hinaus, könnte ein wesentlicher Faktor in der Ätiologie der Nachgeburtsverhaltung beim Rind sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden spätgravide Kühe (n = 3) mit Aglepriston behandelt. Dieser kompetitive Progesteronrezeptor-Blocker unterbindet rezeptorvermittelte Effekte des Progesterons, unabhängig von dessen Ursprung.

Untersuchungsziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der im Folgenden aufgeführten Fragestellungen:

- Kann durch den Einsatz eines Antigestagens beim Rind die Geburt induziert werden, ohne, dass es – wie nach Geburtseinleitungen mit Prostaglandin F_{2α}-Analoga oder Glucocorticoiden – zu einem gehäuften Auftreten von Nachgeburtsverhaltungen kommt? Hierbei stand aufgrund des Anwendungsverbots dieses Wirk-

stoffs in der Nutztiermedizin primär nicht die Entwicklung eines neuen Therapieansatzes, sondern der „proof of principle“ im Vordergrund.

- Welche endokrinologischen Veränderungen werden durch die Antigestagenbehandlung induziert, beziehungsweise welcher Teil der beim Rind zur Geburt führenden, bisher noch weitgehend unklaren Signalkaskade hängt direkt vom präpartalen Progesteronentzug ab?
- Werden durch die Progesteronrezeptorblockade histomorphologische Veränderungen der Plazentomstruktur im Sinne einer „Plazentareifung“ hervorgerufen?

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Klassifizierung der Rinderplazenta

Die Plazenta vermittelt als temporäres, feto-maternales Austauschorgan den Stoffaustausch zwischen Muttertier und Fetus. Zusätzlich hat sie endokrine, immunologische und mechanisch-protective Funktionen. Eine funktionsfähige Plazenta ist somit unentbehrlich für eine ungestörte Entwicklung der Frucht (BECK 1976; ENDERS UND BLANKENSHIP 1999).

Der Begriff Plazenta stammt aus dem Lateinischen und bedeutet übersetzt Kuchen. Diese Bezeichnung ist auf die „Kuchenform“ der Humanplazenta zurückzuführen und wurde formunabhängig für alle entsprechenden feto-maternalen Austauschorgane höherer Säugetiere (Placentalia) übernommen (BENIRSCHKE 1983; MICHEL 1995; SCHLAFER ET AL. 2000).

Da die Plazenten verschiedener Spezies jedoch erhebliche Unterschiede bezüglich Aufbau und Funktionen aufweisen können, unterscheidet man verschiedene Plazentationstypen (BECK 1976; BENIRSCHKE 1983; LEISER UND KAUFMANN 1994; CARTER UND ENDERS 2004)

Die Klassifikation erfolgt anhand folgender Kriterien (LEISER UND KAUFMANN 1994; VOGEL 2005):

1. Anordnung der Embryonalhüllen
2. Form der Oberflächenvergrößerung
3. Verteilung der Chorionzotten
4. Gewebeschichten zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf
(Einteilung nach Grosser, 1927)

Bei der Rinderplazenta handelt es sich um eine allanto-choriale Plazenta vom villösen Typ, bei der die Oberflächenvergrößerung durch die Ausbildung stark verzweigter Chorionzotten erreicht wird. Die Chorionzotten der Rinderplazenta kommen nicht diffus über die gesamte Plazentaoberfläche verteilt vor (Plazenta diffusa completa), sondern sind auf multiple, abgegrenzte Bereiche begrenzt, die als Kotyledonen bezeichnet werden. Diese sind mit dem maternalen Gegenstück, den Karunkeln, innig verzahnt. Kotyledone und Karunkel bilden gemeinsam ein Plazentom. Demnach hat das Rind eine Plazenta multiplex sive cotyledonaria (BENIRSCHKE 1983; LEISER UND KAUFMANN 1994; SCHLAFER ET AL. 2000; CARTER UND ENDERS 2004).

Die sogenannte Plazentaschranke, welche fetalen und maternalen Blutkreislauf trennt, besteht prinzipiell aus folgenden sechs Schichten: maternales Gefäßendothel, endometriales Stroma, Endometriumepithel auf mütterlicher Seite sowie Chorionepithel (Trophoblast), Chorionstroma und fetales Gefäßendothel auf fetaler Seite. Bei einem erheblichen Teil der Spezies kommt es im Verlauf der Gravidität durch die invasive Aktivität des Trophoblasten zu einem Gewebeabbau auf der maternalen Seite (ENDERS UND BLANKENSHIP 1999; CARTER UND ENDERS 2004). Der Trophoblast des Rindes ist nur wenig invasiv. Abgesehen vom unmittelbar präpartalen Zeitraum, bleiben alle Schichten der Uterusmukosa vollständig erhalten. Daher wird die Rinderplazenta auch als epitheliochoriale bzw. synepitheliochoriale (siehe Abschnitt 2.3) Plazenta bezeichnet (BJÖRKMAN 1954; WATHES UND WOODING 1980; CARTER UND ENDERS 2004; ENDERS UND CARTER 2004). Da es auch beim Abgang der Nachgeburt nicht zu nennenswerten Verlusten maternalen Gewebes kommt, spricht man beim Rind wie beispielsweise auch bei Schweinen und Equiden von einer Plazenta *adeciduata* oder *Semiplazenta* (Einteilung nach Strahl, 1906). Hund, Katze, Meerschweinchen und Primaten gehören dagegen zu den *Deciduata*. Bei diesen Spezies kommt es unter der Geburt im Bereich der Plazentationsstellen zu Gewebeverlusten und Blutungen (LEISER UND KAUFMANN 1994; MICHEL 1995; SCHNORR ET AL. 2006).

2.2 Makroskopische Anatomie der Rinderplazenta

Die Ausbildung der Plazentome erfolgt an den Stellen, an denen das Chorion Kontakt mit spezialisierten, auf die Implantation vorbereiteten, drüsenfreien Bereichen des Endometriums aufnehmen kann. Diese sogenannten Karunkelanlagen sind bereits in der Fetalperiode vorhanden (ATKINSON ET AL. 1984). In jedem Uterushorn sind vier Reihen mit 10 – 15 davon zu finden (LEISER 1999; SCHLAFER ET AL. 2000).

Die Implantation beginnt beim Rind ungefähr am 20. Tag post conceptionem (p.c.) (LEISER 1975; CHAVATTE-PALMER ET AL. 2007). Zu diesem Zeitpunkt ist das gesamte Chorion mit Primärzotten bestückt, welche aber noch nicht in der Uterusmukosa verankert sind. Im zweiten Trächtigkeitsmonat kommt es im Zuge der Plazentation zur Ausbildung von sich zunehmend verzweigenden Chorionzotten, die sich in die entsprechenden karunkulären Krypten einsenken (HRADECKÝ ET AL. 1988). Somit

entsteht eine große Oberfläche, die einen effektiven Stoffaustausch ermöglicht. Die Chorionzotten in den Bereichen zwischen den Kotyledonen bilden sich zurück (MICHEL 1995). Ab dem vierten Monat p.c. ist die morphologische Entwicklung der Plazentome nahezu abgeschlossen. Sie sind zu diesem Zeitpunkt ungefähr kirschkerngroß. Die Chorionplatte überzieht die Karunkeloberfläche kappenartig. Von dieser ausgehend senken sich Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten tief in das Karunkelgewebe ein. Die entwickelten Plazentome sind kissenförmig mit basaler, 2 – 3 cm langer Einziehung. In diesem drüsenlosen, bindegewebigen Karunkelstiel verlaufen größere Blutgefäße (Abbildung 1) (LEISER 1999; SCHNORR ET AL. 2006).

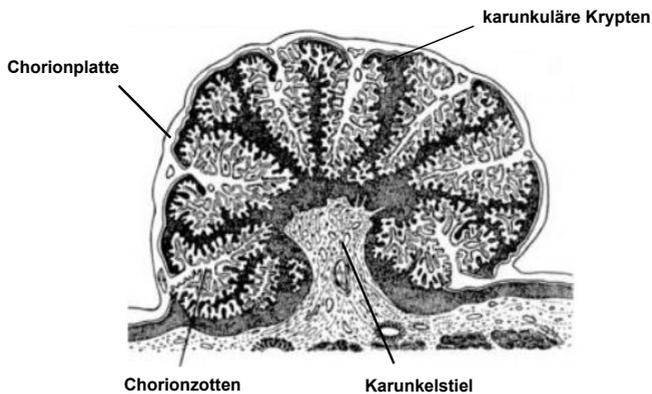


Abbildung 1: Schnitt durch ein Plazentom des Rindes (modifiziert nach Schnorr 1996)

Die Größe der Plazentome variiert je nach Lokalisation und Graviditätsstadium (SCHLAFER ET AL. 2000; LAVEN UND PETERS 2001). Das Hauptwachstum vollzieht sich zwischen 60. und 190. Graviditätstag (LAVEN UND PETERS 2001), während danach nur noch eine moderate Größenzunahme stattfindet. Die größten Plazentome befinden sich im mittleren Bereich des Fruchtsacks, in der Nähe der Eintrittspforte der Nabelgefäße. Sie erreichen bis zum achten Monat Kinderfaustgröße. An den Fruchtsackenden dagegen befinden sich kleinere Plazentome. (LEISER UND KAUFMANN 1994; SCHNORR ET AL. 2006). Im nicht-fruchttragenden Uterushorn sind weniger, kleinere und leichtere Plazentome vorhanden als im fruchttragenden Horn (LAVEN UND PETERS 2001).

2.3 Mikroskopische Anatomie der Rinderplazenta und präpartale Veränderungen der Plazentomstruktur

Maternales Karunkelepithel und fetales Chorionepithel (Trophoblast) bilden die feto-maternale Kontaktzone. Die Epithelien sind beide durch eine Basalmembran von dem blutgefäßreichen Chorion- bzw. Karunkelstroma abgegrenzt, wobei die maternalen Bindegewebszellen wesentlich kompakter angeordnet sind als die Chorionstromazellen. Das einschichtige Karunkelepithel besteht – mit Ausnahme des präpartalen Zeitraums – aus in der Regel einkernigen, meist isoprismatischen Zellen mit Mikrovillibesatz. Im unmittelbaren präpartalen Zeitraum kommt zu einer fortschreitenden Reduktion des Karunkelepitheles.

Das Chorionepithel ist ebenfalls einschichtig, besteht aber aus morphologisch unterschiedlichen Zelltypen; den einkernigen Trophoblastzellen (Uninucleated Trophoblast Cells, UTC) und den meist zweikernigen Trophoblastriesenzellen (Trophoblast Giant Cells, TGC) (BJÖRKMAN 1954; SCHMOLLICH UND MICHEL 1985; SCHOON 1989; SOBIRAJ 1992). Da die TGC offensichtlich relativ kurzlebig sind (siehe unten), findet im Trophoblasten eine ständige Differenzierung von TGC aus UTC statt. Folglich sind neben UTC und den reifen TGC auch zahlreiche Zellen mit intermediärer Differenzierung zu finden (KLISCH ET AL. 1999a).

Bei den UTC handelt es sich um iso- bis hochprismatische, der Basalmembran anliegende Epithelzellen. Durch die in der Nachbarschaft liegenden TGC kann die Form jedoch erheblich variieren (BJÖRKMAN 1954; LEISER 1975). Die UTC vermitteln den unmittelbaren Kontakt zum mütterlichen Kompartiment. Sie interdigitieren über einen apikalen Mikrovillisaum mit dem Karunkelepithel und sind insbesondere am Nährstoffaustausch beteiligt (BJÖRKMAN 1969; IGWEBUIKE 2006).

Trophoblastriesenzellen sind schon während der Implantation nachweisbar (LEISER 1975 (WATHES UND WOODING 1980)). Die ca. 20 – 40 µm großen Zellen haben keinen Kontakt zur Basalmembran. Sie besitzen in der Regel zwei Kerne und werden daher auch als Diplokaryozyten oder Binucleate cells (BNC) bezeichnet (SCHOON 1989; SOBIRAJ 1992; KLISCH ET AL. 1999b). Die TGC differenzieren sich aus den einkernigen Trophoblastzellen meist durch zwei aufeinander folgende azytokinetische Mitosen. Dabei kommt es zur Kernteilung (Mitose) ohne anschließende Zytoplasmateilung (Zytokinese). Der zweiten Mitose folgt eine zusätzliche S-Phase. Es resultieren zweikernige Zellen, deren Nuclei jeweils einen DNA-Gehalt von 8 C aufweisen. Gelegentlich findet man auch ein-, drei- oder mehrkernige TGC (KLISCH ET AL. 1999a; KLISCH

ET AL. 1999b; IGWEBUIKE 2006). Die beiden Kerne der TGC unterteilen das Zytoplasma in einen kleineren supranukleären und einen größeren infranukleären Bereich. Letzterer wird bei reifen TGC von zahlreichen glykoproteinhaltigen, PAS-positiven Granula ausgefüllt. Diese enthalten plazentares Laktogen und die Pregnancy-associated Glycoproteins (PAGs) (DUELLO ET AL. 1986; WOODING UND BECKERS 1987; GREEN ET AL. 2000; KLISCH UND LEISER 2003; KLISCH ET AL. 2005; WOODING ET AL. 2005). Weitere Syntheseprodukte sind Progesteron (REIMERS ET AL. 1985; GROSS UND WILLIAMS 1988b) und Östrogene (GROSS UND WILLIAMS 1988b; SCHULER ET AL. 2006a). Die ebenfalls beschriebene Prostaglandinsynthese (REIMERS ET AL. 1985; GROSS UND WILLIAMS 1988a) ist fragwürdig, da in den TGC die für die Prostaglandinsynthese essentielle Cyclooxygenase II nicht exprimiert wird (SCHULER ET AL. 2006b).

Die ursprünglich an der Epithelbasis gebildeten Trophoblastriesenzellen migrieren Richtung Uterusepithel und fusionieren dort mit je einer Karunkelepithelzelle zu einer trinukleären feto-maternalen Hybridzelle. Aufgrund der Ausbildung feto-maternaler Hybridzellen wird die Rinderplazenta auch als Plazenta synepitheliochorialis bezeichnet (WOODING 1992). Die Wanderungsbewegung der TGC findet während der gesamten Gravidität statt. Letztendlich wird der Inhalt der TGC-Granula durch Exocytose ins maternale Kompartiment freigesetzt, bevor die Hybridzellen degenerieren. Die abgeschilferten Überreste werden von den Trophoblastzellen phagozytiert (WOODING UND WATHES 1980; WOODING 1982; MORGAN UND WOODING 1983; HOFFMAN UND WOODING 1993; KLISCH ET AL. 1999a; KLISCH ET AL. 1999b).

Präpartal können im Rinderplazentom charakteristische histomorphologische Veränderungen beobachtet werden. Diese Reifungsprozesse werden als Voraussetzung für eine rechtzeitige und vollständige Ablösung der Nachgeburt angesehen. Sie sind erst zwei bis fünf Tage vor der Geburt abgeschlossen (LAVEN UND PETERS 1996). Den auffälligsten Veränderungen unterliegen das Karunkelepithel und die TGC. Im letzten Monat vor der Geburt flachen die Karunkelepithelzellen zunehmend ab. Gleichzeitig kommt es zu einem Rückgang der Zellzahl, einer vermehrten Degeneration der Zellen und einem reduzierten Mikrovillibesatz. Die Abflachung des Epithels ist in den chorionplattennahen Primärzotten am ausgeprägtesten. Hier sind insbesondere unmittelbar prä- und intrapartal deutliche Epithellücken und teilweise sogar ein vollständiges Verschwinden der Karunkelepithelzellen erkennbar (WOICKE ET AL. 1986; SCHOON 1989; SOBIRAJ 1992). Schoon (1989) bezeichnet daher die Rinderplazenta in diesem Stadium als Plazenta syndesmochorialis. Sobiraj (1992) dagegen unterstützt

diese Bezeichnung nicht. Seiner Meinung nach fehlt das Karunkelepithel kurz nach der Geburt lediglich in oberflächlichen Plazentombereichen, wobei er einen präparativen Verlust nicht ausschließt. Folglich hält er die Klassifizierung der geburtsreifen Rinderplazenta als epitheliochorial für angemessener. Wooding (1992) vertritt die Ansicht, dass die reife Rinderplazenta weder als komplett snyderemochorial noch als eindeutig epitheliochorial bezeichnet werden kann. Er führte die Bezeichnung Plazenta synepitheliochorialis ein (siehe oben).

Da die Karunkelepithelzellen auch unmittelbar vor der Geburt noch eine sehr hohe proliferative Aktivität aufweisen, ist die Reduktion des Karunkelepitheles vermutlich auf einen erhöhten Zellumsatz und nicht auf eine verminderte Neubildung der Zellen zurückzuführen. Der dadurch vermehrt anfallende Zelldetritus dient möglicherweise als Nährstoffquelle für den Fetus (SCHULER 2000; WIRTH 2001; HOFFMANN UND SCHULER 2002).

Die TGC machen während der gesamten Gravidität ungefähr 20 % der Chorionepithelzellen aus. Kurz vor der Geburt kommt es jedoch zu einer Reduktion des TGC-Anteils auf ca. 5 % (WILLIAMS ET AL. 1987; GROSS ET AL. 1991). Vermutlich ist dieser TGC-Abfall sowohl auf eine verminderte Differenzierung (BRAUN ET AL. 2007) als auch auf eine gesteigerte Apoptoserate zurückzuführen (BOOS ET AL. 2003a). Eine verstärkte Migrationsrate könnte ebenfalls eine Rolle spielen (WARD ET AL. 2002).

Welche Faktoren diese Veränderungsprozesse steuern ist unklar. Eine Hypophysektomie bei Schaffeten verlängert die Trächtigkeit und der Abfall der TGC-Anzahl bleibt aus. Dagegen wird die Reduktion dieser Zellpopulation durch die Behandlung mit Tetracosactrin, einem Analogon des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), induziert (WOODING ET AL. 1986). Entsprechend wird durch Unterbindung der fetalen Cortisolproduktion in der Spätgravidität mittels fetaler Adrenalektomie der präpartale TGC-Abfall verhindert, wohingegen die Infusion von Cortisol bei prämaternen Feten den TGC-Abfall induziert (WARD ET AL. 2002). Auch die Behandlung von Mutter-schafen mit einem synthetischen Glucocorticoid im letzten Trimester der Gravidität führt zu einer Reduktion der TGC im Trophoblasten (BRAUN ET AL. 2007). Insgesamt lassen diese Beobachtungen vermuten, dass der TGC-Abfall vor der Geburt beim Schaf und möglicherweise auch beim Rind durch den präpartalen Cortisolanstieg (siehe Abschnitt 2.7) induziert wird.

Des Weiteren kann nach Woicke et al. (1986) präpartal eine mehr oder weniger ausgeprägte Infiltration des Plazentomgewebes mit neutrophilen Granulozyten und eine

Verbreiterung der maternalen Bindegewebssepten beobachtet werden. Eine Zunahme des Stromakollagens findet nach dem 270. Tag jedoch nicht statt. Vermutlich handelt es sich um eine Östrogen-bedingte Aufquellung des maternalen Bindegewebes aufgrund vermehrter Wasserabsorption der Stromazellen (SCHOON 1989; SHARPE ET AL. 1989; LAVEN UND PETERS 1996). Nach Schuler et al. (2000) steigt in der Spätgravidität die Proliferation im Karunkelstroma deutlich an und erreicht Maximalwerte unter der Geburt. Sie führen daher die Verbreiterung der Karunkel-septen zu einem erheblichen Teil auf Wachstum zurück.

Interessant ist, dass die Reduktion des Karunkelepithels und der Abfall der TGC beim Vorliegen von Nachgeburtsverhaltungen nicht oder nur in geringem Maße zu beobachten sind (siehe Abschnitt 2.8.3), selbst wenn eine ungestörte Gravidität und die spontane Austreibung eines vitalen, maturen Kalbes vorausgingen. Dies deutet darauf hin, dass die Reifungsvorgänge des Fetus nicht strikt an die morphologische Plazentareifung gebunden sind (WOICKE ET AL. 1986).

2.4 Biosynthese und Bedeutung plazentarer Steroide beim Rind

2.4.1 Allgemeine Charakteristika der Steroidhormone und deren Rezeptoren

Steroidhormone sind eine phylogenetisch sehr alte Gruppe von Hormonen, welcher die in der Nebennierenrinde gebildeten Corticosteroide und die Sexualsteroiden zuzuordnen sind. Zu den Sexualsteroiden gehören Östrogene, Gestagene und Androgene. Sie werden hauptsächlich in den Gonaden, aber auch in der Nebennierenrinde (adrenale Sexualsteroiden) und – in Abhängigkeit von der Spezies – in der Plazenta gebildet. Für die Regulation der Reproduktion sind sie von herausragender Bedeutung (BAMBERG 1994, HORN UND KRÜGER 2003).

Steroide werden aus Cholesterin gebildet. Chemisch unterscheidet man nach der Anzahl der Kohlenstoffatome die C₂₁-Steroide (Gestagene und Corticosteroide), die C₁₉-Steroide (Androgene) und die C₁₈-Steroide (Östrogene) (BAMBERG 1994).

Da die Steroidhormone hydrophob sind, werden sie im Blut überwiegend gebunden an Serumproteine transportiert. Als Transportproteine dienen Albumin (z.B. für Progesteron), oder spezifische Globuline, wie das „Sex hormone binding globulin“ (vor allem für Testosteron und Estradiol-17 β) und das „Corticosteroid binding globulin“ (für Cortisol). Nur ungebundene Steroidhormone können in die Zielzelle diffundieren. Die Freisetzung erfolgt, wenn die Konzentration an freien Steroiden sinkt (BAMBERG

1994). Nach Diffusion durch die Zellmembran der Zielzelle binden sie an einen spezifischen, intrazellulären Steroidhormonrezeptor. Der normalerweise durch Hitzeschockproteine stabilisierte Rezeptor verändert durch die Bindung des Liganden seine Konformation. Das Hitzeschockprotein löst sich ab, der Rezeptor dimerisiert mit einem weiteren ligandgebundenen Rezeptor und bestimmte Bereiche des Rezeptors, die sogenannten „Nuclear Localisation Signals“ (NLS), werden frei. Nach Translokation in den Zellkern (im Falle intrazytoplasmatischer Rezeptoren) bindet der Hormon-Rezeptor-Komplex an spezifische DNA-Regionen (Hormon Responsive Elements, HRE). Dadurch wird, unter Beteiligung verschiedener Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren, die Transkription bestimmter Gene aktiviert bzw. reprimiert (LANDERS UND SPELSBERG 1991; BAMBERG 1994; BEATO UND KLUG 2000; HORN UND KRÜGER 2003). Der Glucocorticoidrezeptor (GR) dimerisiert erst nach Bindung des HRE (BEATO UND KLUG 2000).

Steroidhormonrezeptoren agieren demnach als ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren. Sie gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren, Subfamilie 3 (LU ET AL. 2006). Die Klassifizierung der nukleären Rezeptoren in sechs Subfamilien erfolgt anhand von phylogenetischen Merkmalen (GERMAIN ET AL. 2006).

Alle Steroidhormonrezeptoren haben eine hochkonservierte Struktur (Abbildung 2) und sind entsprechend ihrer Funktionsweise aus fünf bis sechs funktionellen Domänen aufgebaut (A – F) (GERMAIN ET AL. 2006). Die aminoternale A/B Domäne weist die höchste Variabilität bezüglich Länge und Aminosäuresequenz innerhalb dieser Rezeptorfamilie auf. Sie besitzt eine autonome, ligandunabhängige transkriptionsaktivierende Funktion (AF-1). Die DNA-Bindungsdomäne (DBD, Region C) ist die am höchsten konservierte Region des Steroidrezeptors. Sie besitzt zwei Zinkfinger-Motive. Innerhalb eines Zinkfinger-Motives liegt die sogenannte P-Box. Diese ist für die Erkennung entsprechender Hormone Responsive Elements der DNA verantwortlich. Der zweite Zinkfinger enthält die D-Box, welche die Dimerisierung zweier DBD vermittelt (BEATO UND KLUG 2000).

Über die Verbindungsdomäne D, auch Hinge-Region genannt, ist die DBD mit der Ligandbindungsdomäne (LBD, Domäne E) verbunden. Letztere stellt die Bindungsstelle für das Steroidhormon dar und enthält die ligandabhängige, transkriptionsaktivierende Funktion 2 (AF-2), einschließlich einer Co-Aktivator Bindungsstelle (LU ET AL. 2006). Sie ist ebenfalls hochkonserviert innerhalb der Klasse der Mammalia (BAMBERG 1994; BEATO UND KLUG 2000; GERMAIN ET AL. 2006; DIEDRICH ET AL. 2007).

Eine carboxyterminale Domäne F kommt nicht bei allen Rezeptoren dieser Superfamilie vor und ihre Funktion ist nicht vollständig bekannt. Bei Progesteron-, Androgen- und Glucocorticoidrezeptoren scheint sie essentiell für die Hormonbindung zu sein (BEATO UND KLUG 2000). Auch bezüglich der unterschiedlichen „Erkennung“ von Agonisten bzw. Antagonisten wird ihr Bedeutung zugesprochen (NICHOLS ET AL. 1998; BEATO UND KLUG 2000; GERMAIN ET AL. 2006).

Structural Organization of Nuclear Receptors

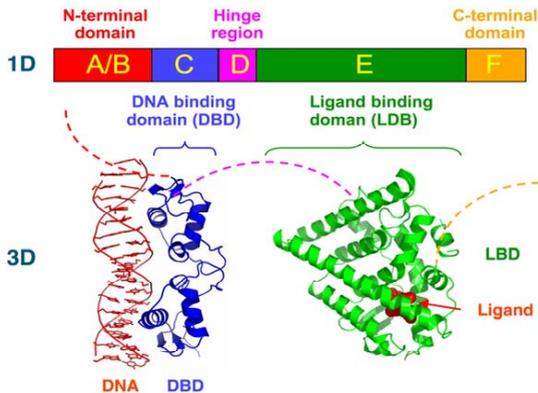


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von Steroidhormonrezeptoren (Quelle:http://de.academic.ru/pictures/dewiki/110/nuclear_receptor_structure.png)

Die Fragestellung nach der intrazellulären Lokalisation der Steroidhormonrezeptoren war lange Zeit Gegenstand vieler Studien. Basierend auf Untersuchungen an subzellulären Fraktionen wurde ursprünglich die Ansicht vertreten, freie Steroidhormonrezeptoren seien im Zytoplasma lokalisiert und würden erst nach der Bindung des Liganden in den Nukleus transferiert werden. Diese Aussage ist heute nicht mehr uneingeschränkt gültig. Neuere, insbesondere immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass die Mehrzahl der Östrogen- und Progesteronrezeptoren auch bei Abwesenheit eines Liganden im Zellkern lokalisiert ist (KING UND GREENE 1984; WELSHONS ET AL.; RENOIR ET AL. 1990; YAMASHITA 1995, YAMASHITA 1998; SCARPIN ET AL. 2009), während die freien Glucocorticoid- bzw. Androgenrezeptoren überwiegend

im Zytoplasma zu finden sind (WIKSTRÖM ET AL. 1987; GASC ET AL. 1989; PICARD ET AL. 1990; WALTERS UND NEMERE 2004; KUMAR ET AL. 2006).

Der Progesteronrezeptor pendelt offensichtlich permanent zwischen Kern und Zytoplasma hin und her. Dabei diffundiert der Rezeptor passiv vom Zellkern ins Zytoplasma und wird durch aktive, ATP-abhängige Transportprozesse wieder zurück in den Kern transportiert. Zwei Kernlokalisationssignale in der Aminosäuresequenz des Rezeptors (Nuclear Localisation Signals, NLS) vermitteln diesen Transport in den Zellkern und bewirken, dass sich die Mehrzahl der Rezeptoren letztendlich im Zellkern befindet. Sie liegen zwischen den Domänen C und D (NLS1) bzw. innerhalb der Domäne E (NLS2) und wurden auch bei anderen Steroidhormonrezeptoren nachgewiesen (PICARD UND YAMAMOTO 1987; PICARD ET AL. 1990; LANDERS UND SPELSBERG 1991; BEATO UND KLUG 2000; KUMAR ET AL. 2006).

Während die NLS2 in der Hormonbindungsdomäne E ligandabhängig ist, ist NLS1 konstitutiv aktiv (GUIOCHON-MANTEL ET AL. 1989; GUIOCHON-MANTEL ET AL. 1991; BEATO UND KLUG 2000). Picard et al. (1990) führen die unterschiedliche Lokalisation der freien Steroidhormonrezeptoren auf Differenzen bezüglich der Regulation der nukleären Lokalisation zurück. Offensichtlich besitzt der Glucocorticoidrezeptor eine „Inaktivierungsfunktion“ innerhalb der Hormonbindungsdomäne, die die NLS bei Abwesenheit eines Liganden hemmt. Nach neueren Untersuchungen besitzen Steroidhormonrezeptoren neben den NLS auch Kernexportsignale (Nuclear Export Signals, NES) innerhalb der DBD und es findet ein kontinuierlicher Kernimport bzw. -export statt. Welche subzelluläre Lokalisation schließlich überwiegt hängt vom Rezeptor und seinen Transportsignalen ab (BLACK ET AL. 2001; KUMAR ET AL. 2006).

Mit Ausnahme des Glucocorticoidrezeptors können Steroidhormonrezeptoren unter bestimmten Bedingungen auch unabhängig von ihrem Liganden aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren fungieren (WEIGEL UND ZHANG 1998). Da die meisten nukleären Rezeptoren Phosphoproteine sind, spielt die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Rezeptorfunktion. Das gilt sowohl für die ligandabhängige als auch für die ligandunabhängige Aktivierung (DENNER ET AL. 1990; WEIGEL 1996; WEIGEL UND ZHANG 1998). Der Neurotransmitter Dopamin und Wachstumsfaktoren sind Beispiele für endogene Substanzen, die die ligandunabhängige Aktivierung der Steroidhormonrezeptoren initiieren können (POWER ET AL. 1991; NEWTON ET AL. 1994; WEIGEL UND ZHANG 1998).

Abgesehen von der klassischen, genomischen Wirkung werden auch nicht-genomische Wirkungen der Steroide beschrieben. Während genomische Effekte erst nach einigen Stunden oder sogar Tagen auftreten, setzen nicht-genomische Wirkungen innerhalb kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten) ein. Sie können nicht durch Hemmstoffe der Transkription unterdrückt werden. Man unterscheidet spezifische rezeptorvermittelte und unspezifische nicht-genomische Effekte. Unspezifische Effekte treten beispielsweise bei hohen Steroidhormonkonzentrationen durch Interkalierung in die Zellmembran ein, während membranständige Rezeptoren und second messenger die spezifischen, nicht-genomischen Wirkungen vermitteln. Durch die nicht-genomische Wirkung von Progesteron wird unter anderem die Akrosomenreaktion der Spermien beeinflusst (WEHLING 1997; LÖSEL UND WEHLING 2003).

Alle freien Steroide haben eine sehr kurze Halbwertszeit von maximal zehn Minuten. Die Inaktivierung erfolgt vor allem in der Leber. Durch Glucuronidierung und Sulfatierung entstehen wasserlösliche Konjugate, die renal oder enteral ausgeschieden werden (BAMBERG 1994).

2.4.2 Östrogene

Neben den Gonaden und der Nebennierenrinde bildet bei zahlreichen Spezies, wie beispielsweise beim Rind und anderen Huftieren sowie bei Primaten, auch die Plazenta erhebliche Mengen an Östrogenen. Im Gegensatz zum Menschen (DICZFALUSY 2005; GUIBOURDENCHE ET AL. 2009) und zum Pferd (PASHEN UND ALLEN 1979; ARAI ET AL. 2006), deren Plazenten aufgrund eines 17α -Hydroxylase-Mangels bezüglich der Östrogensynthese auf Präkursoren aus dem fetalen Kompartiment angewiesen sind, werden in der Plazenta des Rindes alle zur Umwandlung von Cholesterin in Östrogene erforderlichen Enzyme exprimiert (HOFFMANN ET AL. 1976; HOFFMANN ET AL. 1979; HOFFMANN UND SCHULER 2002; SCHULER ET AL. 2008). So bleibt bei Rindern mit *Retentio secundinarum* die placentare Östrogensynthese nach Expulsion der Frucht zunächst weitgehend erhalten. Erst nach dem Abgang der Nachgeburt kommt es zu einem Abfall der Östrogenkonzentration auf Basalniveau (HOFFMANN ET AL. 1979; HOFFMANN 1994).

Beim Rind ist bis kurz vor der Geburt Estronsulfat das Hauptprodukt der placentaren Östrogensynthese, gefolgt von konjugiertem (glucuronidiertem) Estradiol- 17α und Estradiol- 17β (HOFFMANN ET AL. 1997). Ab dem dritten Graviditätsmonat ist

Estronsulfat im peripheren Blut nachweisbar. Zwischen 230. und 250. Tag p.c. kommt es zu einem deutlichen Anstieg. In der Endphase der Gravidität sind Werte zwischen 15 und 30 nmol/l messbar (HOFFMANN ET AL. 1997; SCHULER ET AL. 2008). Konjugierte Östrogene binden nicht an den klassischen nukleären Östrogenrezeptor (HÄHNEL ET AL. 1973; KUIPER ET AL. 1997). Erst nach Hydrolyse durch die Steroidsulfatase („Sulfatase Pathway“) ist eine Rezeptorinteraktion möglich (HOFFMANN UND SCHULER 2002; SCHULER ET AL. 2008).

Freies Estron steigt erst ca. zwei Wochen ante partum deutlich an und erreicht seine maximale Konzentration von ungefähr 10 nmol/l etwa zehn Tage vor der Geburt (ELEY ET AL. 1979; HOFFMANN ET AL. 1997; HOFFMANN UND SCHULER 2002; SCHULER ET AL. 2008). In den letzten beiden Wochen ante partum sind auch freies Estradiol-17 α und Estradiol-17 β vermehrt im maternalen Blutplasma nachweisbar, wobei letzteres vermutlich nicht aus der Plazenta, sondern aus dem Euter stammt (HOFFMANN ET AL. 1997; JANOWSKI ET AL. 2002).

Präpartal sind die plazentaren Östrogene an der Vorbereitung des weichen Geburtswegs auf die anstehende Geburt und an der Mammo- und Laktogenese beteiligt. Außerdem induzieren sie die Bildung kontraktionsassoziierter Proteine wie Connexin-43, Prostaglandin- und Oxytocinrezeptoren im Myometrium (WHITTLE ET AL. 2001; CHALLIS ET AL. 2002; MESIANO UND WELSH 2007). Darüber hinaus wird ihnen eine Bedeutung bei der Plazentareifung und dem Nachgeburtsabgang zugesprochen (GRUNERT ET AL. 1989; BIRGEL 1996; HOFFMANN 1994). Welche Funktion die Östrogenproduktion in den früheren Trächtigkeitsstadien hat, ist weitgehend unklar. Aufgrund der hohen Expression des Östrogenrezeptors α in Karunkelstroma und Karunkelepithel und der hohen Proliferationsrate der Karunkelepithelzellen wird den Östrogenen weniger eine klassische endokrine Hormonwirkung, sondern eher eine Rolle als lokaler Regulator von Wachstum und Differenzierung der Karunkeln zugesprochen (BOOS ET AL. 2000; SCHULER 2000; SCHULER ET AL. 2002; HOFFMANN UND SCHULER 2002). Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Greven et al. (2007) bekräftigt. So konnte gezeigt werden, dass in den Rinderplazentomen die Steroidsulfatase vornehmlich in den Karunkelepithelzellen exprimiert und dort gegen Ende der Gravidität aufreguliert wird (GREVEN ET AL. 2007; GREVEN 2008). Wie bereits erwähnt, können sulfatierte Östrogene durch die Aktivität der Steroidsulfatase in die freie, biologisch aktive Form überführt werden. Möglicherweise dient während der Trächtigkeit der „Umweg“ der Östrogensynthese über die sulfatierte Form dazu, das

Muttertier vor systemischen Nebenwirkungen zu schützen, indem das Spektrum potentieller östrogenresponsiver Zielzellen auf solche begrenzt wird, die neben Östrogenrezeptoren auch die Steroidsulfatase exprimieren.

Die neben dem Östrogenrezeptor α existierende Östrogenrezeptor-Isoform β wird auch in den Kotyledonen, insbesondere in den TGC, exprimiert und könnte somit eine Rolle bei der Trophoblastriesenzelldifferenzierung spielen (SCHULER ET AL. 2005).

2.4.3 Progesteron und Progesteronrezeptoren

Progesteron ist beim Rind, wie bei den meisten Säugetieren, das trächtigkeitserhaltende Hormon. Durch Reduktion der Verfügbarkeit an intrazellulärem Kalzium und der Anzahl der gap junctions, sowie durch Erhöhung des Ruhemembranpotentials der Myometriumszellen bewirkt es eine weitgehende Ruhigstellung der Uterusmuskulatur. Außerdem ist es für den Zervixschluss verantwortlich, fördert die Sekretion der Endometriumsdrüsen („Uterinmilch“) und wirkt immunmodulatorisch (THORBURN ET AL. 1977; DÖCKE 1994b; HOFFMANN 1994; MESIANO 2004; MESIANO UND WELSH 2007).

Die Plasmaprogesteronwerte betragen beim graviden Rind ca. 5 – 10 ng/ml. Ab dem zweiten Trimester ist bereits ein leichter Abfall der Plasmakonzentration erkennbar (SCHALLENBERGER ET AL. 1985). 30 bis 40 Stunden vor der Geburt beginnt ein rapider Abfall auf Konzentrationen unter 1 ng/ml. Nach der Geburt erfolgt ein weiterer Rückgang der Konzentration auf Basalniveau (HOFFMANN ET AL. 1977). Birgel et al. (1996) beschreiben zwei Phasen des präpartalen Progesteronabfalls. In der ersten Phase (239 bis 37 Stunden ante partum) fielen die Durchschnittswerte der Versuchstiere allmählich von 7,2 ng/ml auf 4,8 ng/ml. In der folgenden zweiten, bis zum Geburtseintritt reichenden Phase fielen die Konzentrationen dann weiter steil auf Werte um 0,9 ng/ml ab. Auch Kindahl et al. (2004) sprechen von einer ersten moderaten und einer zweiten abrupten Phase des präpartalen Progesteronabfalls, wobei sie die erste Phase auf eine Umstellung der plazentaren Progesteron- zur Östrogensynthese und die zweite Phase auf die präpartale Luteolyse zurückführen.

Unabhängig vom Trächtigkeitsstadium stellt beim graviden Rind das Corpus luteum graviditatis die Hauptprogesteronquelle dar. Daneben produziert auch die Plazenta Progesteron. Sie trägt jedoch nur geringfügig und nur temporär zum maternalen

Plasmalogesteronspiegel bei. Dementsprechend ist lediglich im Zeitraum zwischen dem ca. 150. und 240. Tag p.c. eine Aufrechterhaltung der Gravidität bei fehlender Lutealfunktion (z.B. nach Ovariectomie oder medikamentell induzierter Luteolyse) möglich (ESTERGREEN ET AL. 1967; DAY 1977; JOHNSON ET AL. 1981). Eine eigenständige biologische Bedeutung des plazentaren Progesterons beim Rind ist daher weitgehend unbekannt. Tsumagari et al. (1994) und Schuler (2000) konnten hohe Gewebekonzentrationen in den Kotyledonen nachweisen. Selbst peripartal, nach Abfall der peripheren Progesteronkonzentration auf Basalniveau, sind noch relativ hohe P₄-Konzentrationen im Kotyledonengewebe messbar (LAVEN UND PETERS 1996; TSUMAGARI ET AL. 1994). Im Rinderplazentom sind Progesteronrezeptoren immunhistologisch nahezu ausschließlich in den Karunkelstromazellen nachweisbar (SCHULER ET AL. 1999; BOOS ET AL. 2000). Da die Progesteron-produzierenden Trophoblastriesenzellen in unmittelbarer Nähe der Karunkelstromazellen lokalisiert sind, ist es nahe liegend, dass das plazentare Progesteron als parakriner Regelfaktor für Wachstum und Differenzierung der Karunkeln fungiert (SCHULER ET AL. 1999). Die Funktion des plazentaren Progesterons könnte beim Rind darin bestehen, hohe lokale Konzentrationen zu erzeugen, welche für den Eintritt bestimmter Effekte (beispielsweise die auf den graviden Uterus beschränkte Suppression der maternalen Immunreaktion) erforderlich sein könnten. So zeigten Untersuchungen beim Schaf, dass Progesteron in den ersten 50 Tagen der Gravidität die endometriale Sekretion des „uterine milk proteins“ induziert, welches die Lymphozytenfunktionen inhibiert. In dieser frühen Phase der Gravidität bildet das Corpus luteum das trächtigkeitserhaltende Progesteron und die Konzentration an der feto-maternalen Kontaktzone ist vermutlich zu gering, um eine unmittelbare Immunsuppression auszulösen. Nach dem 50. Tag p.c. produziert die Plazenta genügend Progesteron, um eine direkte Hemmung der Lymphozytenproliferation hervorzurufen (HANSEN 1998; BEN-ZIMRA ET AL. 2002). Da P₄-Antagonisten diese Hemmung nicht verhindern oder reduzieren, handelt es sich hier vermutlich um rezeptorunabhängige Progesteroneffekte (MONTERROSO UND HANSEN 1993; HANSEN 1998).

Die Struktur des nukleären Progesteronrezeptors (PR) entspricht dem bereits beschriebenen allgemeinen Aufbau der Steroidhormonrezeptoren. Man unterscheidet die Isoformen A (PR-A) und B (PR-B). Der humane PR-A hat ein Molekulargewicht (MG) von 94 Kilodalton (kDa) und besitzt N-terminal 164 Aminosäuren weniger als der 114 kDa schwere PR-B. Dieser Abschnitt soll eine dritte transkriptions-

aktivierende Funktion (AF-3) enthalten (SARTORIUS ET AL. 1994). Beide PR-Isoformen werden zwar vom gleichen Gen codiert, aber die Expression wird von unterschiedlichen Promotoren reguliert. Das PR-Gen enthält mehrere Bindestellen für Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Östrogene induzieren rezeptorvermittelt die Transkription des PR-Gens. Demnach ist für den Eintritt zahlreicher Progesteronwirkungen eine vorherige Östrogenexposition („Östrogenpriming“) erforderlich (SAVOURET ET AL. 1991; KRAUS ET AL. 1994; GIANGRANDE ET AL. 1997; GIANGRANDE UND McDONNELL 1999). Während PR-B allgemein transkriptionsaktivierende Eigenschaften zugesprochen werden, fungiert PR-A speziesabhängig als Aktivator oder Repressor der Transkription. So hat der PR-A des Huhnes transkriptionsaktivierende Eigenschaften, während der humane PR-A reprimierend auf die Transkription wirkt. Diese transkriptionshemmende Wirkung betrifft sowohl PR-B abhängige als auch andere, durch Steroidhormonrezeptoren regulierte Gene. Demnach wird auch die Corticosteroid- oder Androgen-vermittelte Transkription reduziert. Folglich beeinflusst das Verhältnis der beiden Isoformen die Progesteron-vermittelten Effekte erheblich (REKAWIECKI ET AL. 2008). Der Anteil der jeweiligen Isoform wird von der Progesteronkonzentration beeinflusst. So soll in Lutealzellen eine hohe Progesteronkonzentration die Expression von PR-A aufregulieren. PR-A wiederum inhibiert die Expression von PR-B und somit die Progesteronwirkung. Umgekehrt supprimieren niedrige Progesteronkonzentrationen die PR-A Expression, was zu einer gesteigerten Transkription der PR-B mRNA und einer Verstärkung der Progesteronwirkung führt (MISAO ET AL. 1998; REKAWIECKI ET AL. 2008). Die Expression des Östrogenrezeptors wird offensichtlich durch Progesteron gehemmt (EVANS UND LEAVITT 1980; LEAVITT UND TAKEDA 1986).

Wei et al. (1996) beschreiben eine dritte Isoform (PR-C). Diese ist N-terminal weiter verkürzt. Sie hat den ersten Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne verloren, während die Hormonbindungsdomäne komplett erhalten ist. Obwohl PR-C selbst keine transkriptionsaktivierende Aktivität mehr besitzt, kann er mit PR-A oder PR-B dimerisieren und die transkriptionelle Aktivität dieser Isoformen modulieren (WEI ET AL. 1996; WEI ET AL. 1997).

Neben den nukleären Progesteronrezeptoren werden auch membranständige Progesteronrezeptoren beschrieben. Sie gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen und vermitteln schnelle, nicht-genomische Progesteroneffekte (LÖSEL UND WEHLING 2003; REKAWIECKI ET AL.

2008; STORMSHAK UND BISHOP 2008). Man unterscheidet drei Isoformen (α , β , γ), deren Expressionsmuster sich in verschiedenen Geweben deutlich unterscheidet. Beim Schaf wurden solche Rezeptoren im Reproduktionstrakt sowie im Hypothalamus und in der Hypophyse gefunden (ASHLEY ET AL. 2006). Vermutlich spielen sie bei der Regulation der Reproduktion bei weiblichen Tieren eine Rolle. Des Weiteren gibt es nicht-genomische, rezeptorunabhängige Progesteronwirkungen. Beispielsweise kann Progesteron die Permeabilität der Zellmembran verändern (REKAWIECKI ET AL. 2008).

Bogacki et al. (2002) konnten zeigen, dass Progesteron die Oxytocin-induzierte $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese in bovinen Endometriumszellen auf nicht-genomischer Ebene hemmt. Diese Hemmung wird vermutlich durch Verhinderung der Bindung von Oxytocin an seine Rezeptoren vermittelt (BOGACKI ET AL. 2002; GRAZZINI ET AL. 1998; STORMSHAK UND BISHOP 2008).

2.4.4 Expression steroidogener Enzyme im Trophoblasten des Rindes

Wie bereits in Abschnitt 2.4.2 erwähnt werden im Trophoblasten des Rindes alle für die Östrogensynthese erforderlichen Enzyme exprimiert. Dazu gehören das side-chain-cleavage enzyme (P450_{scc}, CYP11A1), die 17α -Hydroxylase-C17, 20-Lyase (P450_{c17}; CYP17), die 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase- $\Delta 5/4$ -Isomerase (3β -HSD, HSD3B1) und die Aromatase (P450_{arom}; CYP19). Ein erster wichtiger Schritt in der Biosynthese von Steroiden ist der vom StAR-Protein vermittelte Transport des Substrates Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran, wo das P450_{scc} lokalisiert ist (MILLER 2007). P450_{scc} metabolisiert Cholesterin zu Pregnenolon. Dieses wird entweder von der 3β -HSD zu Progesteron oder durch die P450_{c17} über 17α -Hydroxypregnenolon zu Dehydroepiandrosteron umgewandelt. Letzteres ist Ausgangsprodukt für die Androgen- und Östrogensynthese auf dem $\Delta 5$ -Syntheseweg. Progesteron wird in der Rinderplazenta auf dem $\Delta 4$ -Syntheseweg durch P450_{c17} zwar effektiv in 17α -Hydroxyprogesteron überführt, eine weitere Umwandlung in Androstendion war dagegen im in vitro-Ansatz unter Verwendung von Plazentahomogenaten kaum nachweisbar. Daher werden in der Rinderplazenta Östrogene praktisch ausschließlich auf dem $\Delta 5$ -Syntheseweg gebildet, eine Umwandlung von Progesteron in Östrogene findet kaum statt (SCHULER ET AL. 1994). Die Östrogene können schließlich von der Östrogensulfotransferase (SULT1E1) in

den UTC (KHATRI ET AL. 2011) sulfatiert und somit in ihre biologisch inaktive Form überführt werden (Abbildung 3).

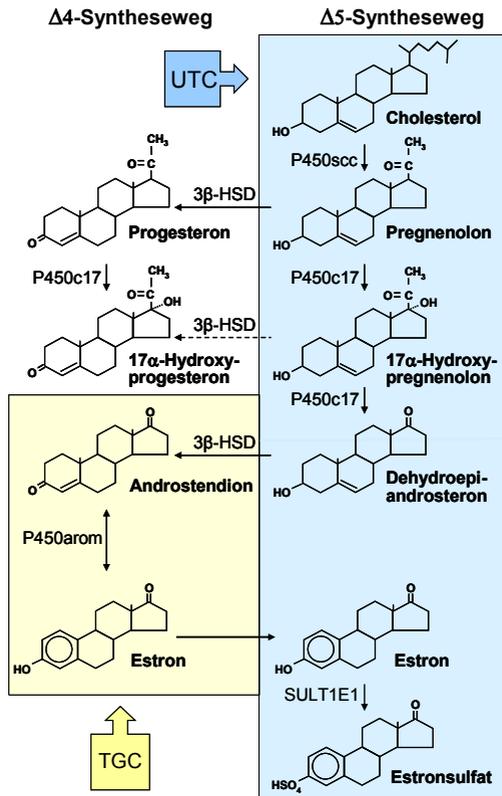


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Steroidogenese im bovinen Trophoblasten (modifiziert nach Schuler et al. 2008).

UTC = einkernige Trophoblastzellen; TGC = Trophoblastriesenzellen

Die beiden für die Dehydroepiandrosteronsynthese notwendigen Enzyme, P450scc und P450c17, werden im Trophoblasten des Rindes in den UTC exprimiert. Das P450scc konnte mittels immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen außer in den UTC auch in den Karunkel epithelzellen nachgewiesen werden (BEN-DAVID UND SHEMAH 1990). Da in den Karunkel epithelzellen auch die Expression des steroidogenic acute regulatory proteins (StAR) nachgewiesen wurde (VERDUZCO GOMEZ

2007), ist denkbar, dass auch Pregnenolon maternalen Ursprungs in die plazentare Steroidsynthese des Rindes einfließt. P450c17 wird in den Plazentomen ausschließlich in den UTC exprimiert. In den letzten beiden Trimestern der Gravidität variiert die Lokalisation dieses Enzyms im Zottenbaum deutlich. Zwischen 80. und 160. Tag sowie in den letzten ein bis zwei Graviditätswochen ist die Expression über den gesamten Zottenbaum verteilt nachweisbar, während sie im dazwischen liegenden Zeitraum im Wesentlichen auf die chorionplattennahen Bereiche der Primärzotten beschränkt ist. Weder in der Chorionplatte, noch im interplazentomaren Trophoblasten konnte eine nennenswerte P450c17-Expression detektiert werden (ÖZALP 2005; SCHULER ET AL. 2006a).

Die β -HSD-spezifische mRNA wurde mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung hauptsächlich in unreifen TGC lokalisiert, während UTC und mature TGC keine deutlichen Signale aufwiesen (ÖZALP 2005; SCHULER ET AL. 2008). Tsumagari et al. (1994) konnten einen Anstieg der Enzymaktivität im Kotyledonengewebe im siebten Monat, Maximalwerte im achten Monat und einen deutlichen Abfall unter der Geburt, ähnlich dem Verlauf der Progesterongewebekonzentration in den Kotyledonen, nachweisen. Hierbei lagen die zum Zeitpunkt der Geburt in den Kotyledonen gemessenen β -HSD-Aktivitäten bzw. Progesteronkonzentrationen jedoch immer noch deutlich über dem Basalniveau.

Die Aromatase wurde immunhistologisch in den TGC detektiert. In diesen nahm die Signalintensität im Verlauf der Differenzierung zu (ÖZALP 2005; SCHULER ET AL. 2006a; HIRAYAMA ET AL. 2008). Auch die SULT1E1 wurde in früheren Untersuchungen sowohl immunhistologisch als auch mittels In-situ-Hybridisierung in den TGC nachgewiesen (BROWN ET AL. 1987; USHIZAWA ET AL. 2007; HIRAYAMA ET AL. 2008). Nach neueren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe ist das Enzym jedoch immunhistologisch unter Verwendung zweier verschiedener Antiseren gegen rekombinantes bovines bzw. humanes Enzym übereinstimmend vorwiegend in den UTC nachweisbar (KHATRI ET AL. 2011).

Eine Kompartimentalisierung der an der Steroidogenese beteiligten Enzyme in unterschiedlichen Zelltypen eines Organs oder sogar in unterschiedlichen Organen ist bei der Biosynthese von Steroiden häufig zu beobachten. Sie erhöht die Regulationsmöglichkeiten des Substratflusses innerhalb der Steroidsynthese-Kaskade (CONLEY UND BIRD 1997). Da sich das Expressionsmuster einer Zelle im Verlauf der Trophoblastriesenzelldifferenzierung ändert, handelt es sich im Falle des Rinder-

trophoblasten weniger um eine räumliche als um eine zeitliche Trennung der Enzym-expression. Ein Substrataustausch zwischen Zellen scheint somit nicht erforderlich zu sein (SCHULER ET AL. 2008).

2.5 Glucocorticoide und ihre Rezeptoren

Glucocorticoide gehören wie die Mineralocorticoide zu den Corticosteroiden. Sie werden hauptsächlich in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Glucocorticoide fetalen Ursprungs spielen beim Rind und anderen Wiederkäuern eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Geburt (THORBURN ET AL. 1977; HOFFMANN 1994).

Die allgemeinen Charakteristika der Steroidhormone und ihrer Rezeptoren wurden bereits in Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Corticosteroide sind Abkömmlinge des Pregnenolons bzw. Progesterons. Für die glucocorticoide Wirkung ist die Hydroxyl- bzw. Oxogruppe an C-11 entscheidend.

Zu den natürlichen Glucocorticoiden gehören Cortisol und Corticosteron. Letzteres ist beim Rind von untergeordneter Bedeutung. Cortison und Dehydrocorticosteron sind die biologisch inaktiven Formen und entstehen nach Oxidation von Cortisol bzw. Corticosteron durch die 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase II. Umgekehrt kann Cortison durch die 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase I wieder zu Cortisol reduziert werden. Diese Enzyme werden in den Zielzellen exprimiert (BAMBERG 1994; THUN 1994; HORN UND KRÜGER 2003).

Die Biosynthese und Freisetzung von Glucocorticoiden wird über einen hormonellen Regelkreis durch das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System gesteuert. Dabei führt das hypothalamische Corticotropin-Releasing-Hormon zu einer vermehrten Freisetzung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen. ACTH stimuliert wiederum die Synthese und Sekretion von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Der Anstieg der Glucocorticoidkonzentration im Blutplasma hemmt schließlich über ein negatives Feedback die Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon und ACTH (THUN 1994). Die Wirkung der Glucocorticoide ist vielfältig. Unter anderem sind sie entscheidend an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt. Sie fördern die Glykogenolyse und die Gluconeogenese, wirken Protein-katabol und lipolytisch, hemmen die Kalziumresorption im Darm und fördern die Kalziummobilisation aus dem Knochen. Außerdem wirken sie antiproliferativ, antiinflammatorisch, membranstabilisierend und immunsuppressiv.

Die entzündungshemmenden Eigenschaften sind insbesondere auf die Induktion der Lipocortinsynthese zurückzuführen. Das Protein Lipocortin hemmt die Phospholipase A2 und somit die Freisetzung von Arachidonsäure (siehe Abschnitt 2.6.1). Damit steht weniger Substrat für die Bildung entzündungsmediierender Prostaglandine und Leukotriene zur Verfügung (THUN 1994; HORN UND KRÜGER 2003). Fetale Glucocorticoide sind an der Funktion und Entwicklung verschiedener Organsysteme beteiligt. Sie fördern beispielsweise die pränatale Lungenreifung und die Glykogenspeicherung in der Leber (ELSAESSER 1994; HOFFMANN 1994; THUN 1994).

Vom humanen Glucocorticoidrezeptor sind zwei Isoformen bekannt, welche sich in der Aminosäuresequenz der LBD unterscheiden. Die Isoform α stellt den klassischen, durch Glucocorticoide aktivierbaren Rezeptor dar. Die Splicevariante β kann keine Steroide mehr binden. Vielmehr hemmt diese Isoform die GR α -vermittelten Wirkungen. Im Gegensatz zu GR α ist GR β , unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden, primär im Nukleus lokalisiert (BAMBERGER ET AL. 1995; CHARMANDARI ET AL. 2004; DUMA ET AL. 2006). Neuere Untersuchungen haben GR β auch bei der Maus (HINDS ET AL. 2010) und dem Zebrafisch (SCHAAF ET AL. 2008) nachgewiesen, während beim Rind bisher keine Isoform β beschrieben wurde.

Immunhistologisch konnte der Glucocorticoidrezeptor im graviden Uterus des Rindes sowohl in den Plazentomen (BOOS ET AL. 2000) als auch im interkarunkulären Uterusgewebe (BOOS ET AL. 2006; SCHÄUBLI ET AL. 2008) in den meisten Zelltypen detektiert werden. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der Immunreaktivität im Laufe der Gravidität besonders deutlich in Endometriums- und Karunkelepithel nachgewiesen werden (BOOS ET AL. 2000; BOOS ET AL. 2006).

2.6 Prostaglandine als Regelfaktor der Reproduktion beim weiblichen Rind

2.6.1 Metabolismus

Prostaglandine (PG) sind auto-, para- oder endokrin wirkende Gewebeshormone, welche an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. Sie wurden 1935 erstmals im humanen Ejakulat entdeckt (Ulf von Euler). Ursprünglich wurde die Prostata als Synthesestätte angenommen, daher der Name Prostaglandine. Heute ist jedoch bekannt, dass die Biosynthese in nahezu allen Geweben erfolgt. Prostaglandine endometrialen, plazentaren, ovariellen und lutealen Ursprungs sind wesentlich an der Regulation von Zyklus, Trächtigkeit und Geburt beteiligt.

Als Abkömmlinge mehrfach ungesättigter C-20 Fettsäuren gehören sie, wie die Prostacycline, Thromboxane und Leukotriene zur Gruppe der Eikosanoide. Chemisch handelt es sich um einen Cyclopentanring mit zwei Seitenketten. Anhand der Modifikation des Cyclopentanrings unterscheidet man verschiedene Klassen (A – I). So haben beispielsweise Prostaglandine der E-Reihe eine Ketogruppe an C-Atom 9, während Vertreter der F-Reihe an dieser Stelle eine Hydroxylgruppe besitzen. Die weitere Einteilung basiert auf der Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten. Sie wird mittels Indexzahlen 1-3 angegeben (BUDECKE 1994; MEST 1994; HORN UND KRÜGER 2003).

Die Biosynthese beginnt mit der Abspaltung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden durch die Phospholipase A₂. Eine mikrosomale Cyclooxygenase (Prostaglandinsynthase) konvertiert Arachidonsäure über das instabile PGG₂ zu PGH₂, dem gemeinsamen Vorläufer aller Prostaglandine (MEST 1994; KANKOFER 1999a).

Man unterscheidet zwei Isoformen dieser Cyclooxygenasen: Die Cyclooxygenase I wird von fast allen Zellen konstitutiv exprimiert und ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. Beispielsweise stimuliert sie die Synthese von PGE₂, welches wichtig für den Schutz der Magenschleimhaut vor der Magensäure ist. Die Synthese der Cyclooxygenase II (Cox II) wird vor allem durch Endotoxine, Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert. Die gebildeten Prostaglandine sind an der Entstehung von Fieber, Schmerz und Entzündungsreaktionen, aber auch an physiologischen Regelprozessen beteiligt (HORN UND KRÜGER 2003). Auch im weiblichen Reproduktionstrakt überwiegt diese Isoform. Sie ist unter anderem für die endometriale Synthese luteolytischer Prostaglandine bei zyklischen Kühen verantwortlich (AROSH ET AL. 2002). Bei graviden Rindern und Schafen konnte präpartal eine zunehmende Expression im Zytoplasma einkerniger Trophoblastzellen nachgewiesen werden (GYOMOREY ET AL. 2000; MCLAREN ET AL. 2000; SCHULER ET AL. 2006b). Das von den Cyclooxygenasen synthetisierte PGH₂ wird schließlich, abhängig von der Enzymaktivität im entsprechenden Gewebe, von spezifischen Synthasen in den jeweiligen Prostaglandin-Subtyp überführt.

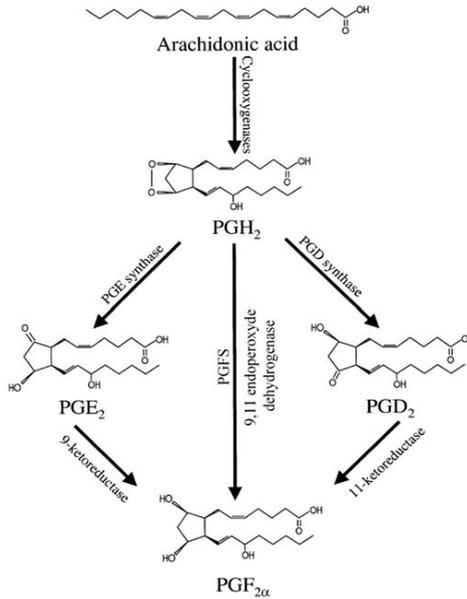


Abbildung 4: PGF_{2α}-Synthesewege (nach Madore et al., 2003)

Besondere Bedeutung bezüglich des weiblichen Reproduktionssystems haben PGF_{2α} und PGE₂. Sie sind sowohl an der Zyklusregulation als auch an Erhalt und Terminierung der Gravidität beteiligt (POYSER 1995; DUBOIS ET AL. 1998).

PGE₂ wird von einer der drei PGE-Synthase-Isoformen aus PGH₂ gebildet. In den Geschlechtsorganen des weiblichen Rindes wurden eine zytosolische (CPGES/PTGES3) und zwei mikrosomale (MPGES1/PTGES und MPGES2/PTGES2) Isoformen beschrieben (AROSH ET AL. 2002; PARENT UND FORTIER 2005), welche eine hohe Homologie zu den entsprechenden humanen Enzymen aufweisen (FILION ET AL. 2001; PARENT UND FORTIER 2005). Alle drei Isoformen konnten sowohl im luminalen Endometriumsepithel als auch im Epithel der Endometriumsdrüsen zyklischer Kühe immunhistologisch detektiert werden. Stromazellen zeigten dagegen nur eine schwache Expression (PARENT UND FORTIER 2005). Die Expression der PGES korreliert im bovinen Endometrium offensichtlich mit der Expression der Cox II (AROSH ET AL. 2002; PARENT ET AL. 2002). Aufgrund entsprechender Beobachtungen *in vitro* wird angenommen, dass die endometriale PGE-Synthese hauptsächlich auf die MPGES1 zurückzuführen ist (AROSH ET AL. 2002; PARENT UND FORTIER 2005).

Wie in Abbildung 4 ersichtlich gibt es drei verschiedene Wege der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese: die 9-Keto-Reduktion von PGE_2 durch die 9-Ketoreduktase, die 11-Keto-Reduktion von PGD_2 durch die 11-Ketoreduktase oder die direkte Konversion von PGH_2 zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthase (PGFS; 9,11-Endoperoxidase-Reduktase). Beim Rind wurden bereits drei Isoformen der PGFS aus Lunge (PGFS1) bzw. Leber (PGFS2, PGFS3) isoliert. PGFS1 und PGFS2 sind zu 99 % homolog und zu 86 % identisch mit PGFS3 (WATANABE ET AL. 1985; KUCHINKE ET AL. 1992; SUZUKI ET AL. 1999). Alle drei Subtypen weisen auch eine 11-Ketoreduktase-Aktivität auf, wobei der Km-Wert bezüglich PGD_2 wesentlich höher ist als für PGH_2 (SUZUKI ET AL. 1999). Außerdem wurde in der bovinen Plazenta und im Endometrium eine PGE -9-Ketoreduktase nachgewiesen, welche zu 92 % mit PGFS1 übereinstimmt (KANKOFER 1999a; ASSELIN UND FORTIER 2000).

Offen bleibt, welche Synthase im Endometrium bzw. in der Plazenta des Rindes für die Synthese des luteolytischen $\text{PGF}_{2\alpha}$ verantwortlich ist. Madore et al. (2003) konnten zeigen, dass in den Endometriumszellen zyklischer Kühe trotz erheblicher $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese keine der bekannten Prostaglandin-Ketoreduktasen signifikant exprimiert werden. Dagegen wurde zum Zeitpunkt der Luteolyse im Endometrium des Rindes eine starke Expression der Aldo-Ketoreduktase AKR1B5 nachgewiesen, welche neben einer 20α -Hydroxysteroiddehydrogenase (20α -HSD)-Aktivität offensichtlich auch eine starke PGFS-Aktivität aufweist. Madore et al. (2003) postulierten daher, dass die AKR1B5 die relevante PGFS für die Produktion luteolytischer Prostaglandine im Rinderendometrium während des Zyklus ist.

Bei trächtigen Kühen konnte AKR1B5 zwischen dem 100. Trächtigkeitstag und der Geburt immunhistologisch ausschließlich in den UTC und in geringerem Ausmaß in unreifen TGC lokalisiert werden. Reife TGC wiesen dagegen keine Signale auf. Da in den UTC AKR1B5 und COX II kolokalisiert sind, ist zu vermuten, dass diese Zellen zur $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese befähigt sind. Demnach stammen die präpartalen luteolytischen Prostaglandine vermutlich aus dem TROPOLASTEN (SCHULER ET AL. 2006b).

Prostaglandine haben eine sehr kurze Halbwertszeit. Die Inaktivierung durch Dehydrogenasen erfolgt hauptsächlich im Gefäßbett der Lunge, aber auch in Plazenta, Leber und Niere. So werden beim Rind ca. 65 % der zirkulierenden Prostaglandine bei einer einzigen Lungenpassage metabolisiert. Beim Schaf sind es sogar über 99 % (MCCRACKEN ET AL. 1999). Zuerst erfolgt die Oxidation durch die NAD^+ -abhängige 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase (HPDH) (KANKOFER 1999a;

MEINECKE 2000). Die bovine HPDH weist eine hohe Homologie zum entsprechenden Enzym des Menschen und der Ratte auf. Im Endometrium zyklischer Kühe wird sie überwiegend im Drüsenepithel, aber auch in Stroma und Endometriumszellen exprimiert (PARENT ET AL. 2006). Peripartal ist die Aktivität überwiegend im fetalen, aber auch im maternalen Teil der Plazenta nachweisbar (KANKOFER ET AL. 1994). Die Aktivität dieses Enzyms ist hinsichtlich der PGE₂- und PGF_{2α}-Inaktivierung vergleichbar (PARENT ET AL. 2006). Die durch Oxidation der 15-Hydroxylgruppe entstandenen 15-Ketometabolite werden durch die 15-Ketoprostaglandin-13-Reduktase zu 13,14-Dihydro-15-Ketoprostaglandinen, sogenannten Prostaglandinmetaboliten (PGEM, PGFM, PG_M) reduziert. Diese haben eine längere Halbwertszeit und eignen sich besser zur Erfassung der Prostaglandinsynthese in Blutproben als die entsprechenden ursprünglichen biologisch aktiven Formen. Nach weiteren Oxidationen werden die Metaboliten überwiegend renal ausgeschieden (MEST 1994; KANKOFER UND WIERCIŃSKI 1999b; PARENT ET AL. 2006).

2.6.2 Prostaglandinrezeptoren

Trotz ihres Lipidcharakters passieren Prostaglandine die Zellmembran kaum, denn durch die chemischen Modifikationen geht die Lipophilie der Arachidonsäure weitgehend verloren (HORN UND KRÜGER 2003). Nach der Synthese werden sie mittels spezieller Transporter aus der Zelle heraus transportiert, während sie zur Inaktivierung wieder in die Zelle eingeschleust werden (BANU ET AL. 2003; BANU ET AL. 2005). Prostaglandine vermitteln ihre Effekte nach Bindung an spezifische membranständige Rezeptoren. Es handelt sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Für die Signaltransduktion sind unterschiedliche second messenger verantwortlich. Man unterscheidet verschiedene Rezeptor-Subtypen und Isoformen, welche lediglich eine Homologie von 20-30 % aufweisen. Dagegen ist die Homologie eines bestimmten Subtyps zwischen Spezies mit ungefähr 80 % relativ hoch (NARUMIYA ET AL. 1999).

Für PGE₂ wurden vier verschiedene Rezeptorsubtypen (EP1, EP2, EP3, EP4) identifiziert, welche von verschiedenen Genen kodiert werden und verschiedene G-Proteine aktivieren. EP2 und EP4 aktivieren über ein G_s-Protein die Adenylatcyclase und führen somit zu einem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Da ihre Stimulation zur Relaxation der glatten Muskulatur führt, werden sie auch als

„relaxierende“ Rezeptoren bezeichnet. EP1, ein „kontraktiler“ Rezeptor, ist an ein G_q-Protein gekoppelt. Die Signalübertragung erfolgt hier durch Aktivierung der Phospholipase C, welche die second messenger Diacylglycerol und Inositol-3-Phosphat bildet und somit die Freisetzung von intrazellulärem Calcium stimuliert (NAMBA ET AL. 1993; COLEMAN ET AL. 1994; NARUMIYA ET AL. 1999; SUGIMOTO UND NARUMIYA 2007).

Die Subtypen EP2, EP3 und EP4 der bovinen PGE-Rezeptoren wurden bereits kloniert und mit Ausnahme von EP4 in der Plazenta nachgewiesen (NAMBA ET AL. 1993; AROSH ET AL. 2003; AROSH ET AL. 2004). Der „hemmende“ Rezeptor EP3 existiert beim Rind in vier Isoformen, die an verschiedene G-Proteine (unter anderem an das hemmende G_i-Protein) gekoppelt sind. Die verschiedenen Isoformen entstehen durch alternatives Splicing des carboxyterminalen, intrazellulären Rezeptorendes (NAMBA ET AL. 1993; AROSH ET AL. 2003; AROSH ET AL. 2004).

PGF_{2α} bindet ebenfalls an einen „kontraktilen“, G_q-Protein gekoppelten Rezeptor (PGFR oder FP). Aus dem Corpus luteum zyklischer Schafe konnte eine zweite Isoform des PGFR, der sogenannte PGFR-B, kloniert werden. Hier handelt es sich ebenfalls um eine Splicevariante, die sich lediglich durch geringfügige Abweichungen in der Primärstruktur des C-Terminus unterscheidet (PIERCE ET AL. 1997). Auch aus dem bovinen Gelbkörper konnte eine neue Variante des FP isoliert werden (FPa), welche im Vergleich zum ursprünglichen FP Unterschiede in der siebten Transmembrandomäne und dem carboxyterminalen Ende aufweist. In FPa-transfizierten Zellen konnte, im Gegensatz zu FP-transfizierten, durch PGF_{2α} kein Anstieg der Proteinkinase C-Aktivität induziert werden. Nach Cotransfektion mit beiden Isoformen wurde eine reduzierte Proteinkinase C-Aktivität festgestellt. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass FPa die FP-vermittelten Effekte reduziert und somit als negativer Regulator des FP fungiert (ISHII UND SAKAMOTO 2001).

Das Expressionsmuster verschiedener Prostaglandinrezeptoren in Uterus und Plazenta tragender Kühe variiert abhängig von Lokalisation (Karunkel, Kötyledone oder interkarunkuläres Uterusgewebe) und Trächtigkeitsstadium. EP2 scheint im Rinderuterus der bedeutendste cAMP-bildende PGE-Rezeptor zu sein, während EP4 dort offensichtlich gar nicht exprimiert wird. EP2 konnte immunhistologisch in Karunkelepithel, Karunkelstroma und im Trophoblasten der Sekundärzotten detektiert werden und wird dort mit der Cox II coexprimiert (AROSH ET AL. 2004).

2.6.3 Wirkungen und Bedeutungen von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2 in der Steuerung weiblicher Fortpflanzungsfunktionen

Die Wirkung der Prostaglandine auf das weibliche Reproduktionssystem im Rahmen physiologischer Vorgänge ist vielfältig und teilweise gegensätzlich. Sie hängt von Prostaglandintyp, Art und Anzahl exprimierter Rezeptoren und Enzymausstattung des entsprechenden Gewebes ab. Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Ovulation und Luteolyse, sowie bei Implantation, Erhalt der Gravidität, Geburtseinleitung und der Uterusinvolution post partum. Die mannigfaltigen Wirkungen werden in der Veterinärmedizin zu therapeutischen und zu biotechnologischen Zwecken genutzt (WEEMS ET AL. 2006; RICHTERICH UND WEHREND 2009).

Sowohl $\text{PGF}_{2\alpha}$ als auch PGE_2 haben eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der Ovulation. Wird die Prostaglandinsynthese unterbunden, zum Beispiel durch Behandlung mit Cox-Inhibitoren, kommt es unter anderem bei Rind, Schwein und Pferd zum Ausbleiben der Ovulation. Es wird postuliert, dass der Anstieg beider Prostaglandintypen in der Follikelflüssigkeit zu einer lokalen Ischämie der Follikelwand führt, wodurch die Ovulation ermöglicht wird (MEINECKE 2000; WEEMS ET AL. 2006).

Endometriales $\text{PGF}_{2\alpha}$ induziert die Regression des Corpus luteum cyclicum bei den meisten polyöstrischen Haussäugetieren (MCCRACKEN ET AL. 1999). Die Synthese und pulsatile Freisetzung der Prostaglandine wird vermutlich durch Stimulation endometrialer, Östrogen-induzierter Oxytocinrezeptoren ausgelöst. Die genauen Regulationsmechanismen der endometrialen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese sind noch nicht vollständig bekannt. In der späten Lutealphase reguliert Progesteron vermutlich seine eigenen Rezeptoren herunter. Es folgt ein verstärkter Östrogeneinfluss. Die Östrogene fördern nach vorausgegangener Progesteronwirkung wiederum die Prostaglandinsynthese durch Steigerung der Phospholipase A_2 -Aktivität im Endometrium, sowie durch Aufregulation endo- und myometrialer Oxytocinrezeptoren. Hypothalamisches (neurohypophysäres) Oxytocin interagiert mit den uterinen Oxytocinrezeptoren und verstärkt die pulsatile $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung aus dem Endometrium. Bei Rind, Schaf und Ziege bildet das Corpus luteum erhebliche Mengen Oxytocin, welches zusätzlich die endometriale Synthese des Luteolysins $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimuliert (POYSER 1995; MCCRACKEN ET AL. 1999; WEEMS ET AL. 2006). Es wird angenommen, dass bei Wiederkäuern initial neurohypophysäres Oxytocin die Bildung

subluteolytischer Mengen an $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Endometrium induziert. Dieses bewirkt nach Bindung an Prostaglandinrezeptoren im Gelbkörper die verstärkte Freisetzung von lutealem Oxytocin, welches die endometriale $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese fördert. Beim Schaf geschieht dies vermutlich durch Aufregulation der Cox II im Endometrium und durch Steigerung der Phospholipase A_2 -Aktivität. Eine vorausgegangene Progesteronexposition ist erforderlich, um die Akkumulation von Lipiden in den Endometriumzellen als Ausgangssubstanzen für die Prostaglandinsynthese zu gewährleisten. Außerdem soll P_4 die Aktivität endometrialer Prostaglandinsynthasen steigern (MCCRACKEN ET AL. 1999; MEINECKE 2000; WEEMS ET AL. 2006).

Bei Schaf gelangt $\text{PGF}_{2\alpha}$ fast ausschließlich und beim Rind überwiegend über einen lokalen Gegenstrom-Austauschmechanismus zwischen Uterinvene und Ovararterie zum Ovar (MEINECKE 2000; MCCRACKEN ET AL. 1999; WEEMS ET AL. 2006). Durch die Umgehung des Körperkreislaufs wird die Inaktivierung der Prostaglandine vor Erreichen des Zielorgans verhindert (MEINECKE 2000). Beim Schwein wird das Ovar auch über die systemische Zirkulation erreicht und beim Pferd ist der Körperkreislauf sogar der Haupttransportweg uteriner Prostaglandine. Offensichtlich ist bei dieser Tierart die Aktivität kataboler Enzyme in der Lunge geringer (MCCRACKEN ET AL. 1999; WEEMS ET AL. 2006).

Aufgrund der durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelösten Hemmung der Lipoproteinaufnahme steht den Lutealzellen weniger Cholesterin für die Steroidbiosynthese zur Verfügung. Folglich sistiert die luteale Progesteronsynthese (MCCRACKEN ET AL. 1999). Man spricht auch von einer funktionellen Luteolyse. Die morphologische Rückbildung des Gelbkörpers setzt erst nach der funktionellen Luteolyse ein. Dabei wird die Apoptose der Lutealzellen zum einen durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierte Vasokonstriktion und zum anderen durch immunologische Mechanismen, die über lokale Mediatoren wie Zytokine (z.B. Interferon γ , TNF α), Endothelin-1 und NO vermittelt werden, ausgelöst (MCCRACKEN ET AL. 1999; WEEMS ET AL. 2006; SKARZYNSKI ET AL. 2008).

Im Falle einer Trächtigkeit muss bei Säugetierarten, bei denen die zyklische Lutealphase durch luteolytische Prostaglandine aus dem Endometrium beendet wird, die Luteolyse unterbunden werden. Bei Rind und Schaf vermittelt embryonales Interferon- τ die maternale Erkennung der Gravidität. Es wird bei diesen Spezies zwischen dem 10. und dem 25. Trächtigkeitstag vom Konzeptus gebildet (SPENCER ET AL. 2004). Durch Reduktion der Bildung endometrialer Oxytocinrezeptoren verhindert es die Oxytocin-induzierte $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese und somit die Luteolyse. Ein

weiterer Mechanismus der antiluteolytischen Wirkung von Interferon- τ ist möglicherweise die Downregulation der 9-Ketoreduktase. Dadurch wird die Konversion von PGE_2 zu luteolytisch wirkendem $\text{PGF}_{2\alpha}$ vermindert (WEEMS ET AL. 2006).

Beim trächtigen Rind stellt auch in der Spätphase Gravidität der Trächtigkeitseigelkörper die Hauptprogesteronquelle dar und der präpartale Progesteronabfall korreliert mit der präpartalen Luteolyse (THORBURN ET AL. 1977; HOFFMANN 1994; MCCRACKEN ET AL. 1999). Wie beim zyklischen wird vermutlich auch beim tragenden Rind die Luteolyse durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgelöst, wobei die Quelle des luteolytischen Signals im Gegensatz zur Situation beim zyklischen Rind bisher weitgehend unklar ist (siehe Abschnitt 2.7).

Eine weitere wichtige Bedeutung hat $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei der Geburt durch die Stimulation der myometrialen Kontraktilität. Letzteres geschieht sowohl direkt als auch indirekt durch Sensibilisierung des Myometriums gegenüber Oxytocin. So ist die Wehentätigkeit zu Beginn der Geburt überwiegend $\text{PGF}_{2\alpha}$ zuzuschreiben. Dagegen erfolgt die Freisetzung größerer Oxytocinmengen aus dem Hypophysenhinterlappen, vermittelt durch einen neuroendokrinen Reflex (Ferguson-Reflex), erst nach Eintritt der Frucht in den Geburtskanal (HOFFMANN 1994).

PGE_2 ist in Abhängigkeit von der Spezies essentiell für die Implantation, die maternale Erkennung der Trächtigkeit und die Graviditätserhaltung. Beim Rind wurde die Bildung erheblicher Mengen während der Trächtigkeit im Trophoblasten (KANKOFER 1999a) und während des Zyklus im Ovar bzw. Corpus luteum nachgewiesen (DÖCKE 1994b; REKAWIECKI ET AL. 2008). Im Gegensatz zu der luteolytischen Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$, werden PGE_2 luteotrope bzw. luteoprotektive Eigenschaften zugeschrieben (PRATT ET AL. 1977; MAGNESS ET AL. 1981; WEEMS ET AL. 2006; REKAWIECKI ET AL. 2008; SKARZYNSKI ET AL. 2008). So antagonisiert es beim zyklischen Schaf die luteolytische Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in vivo (HENDERSON ET AL. 1977). In bovinen Lutealzellen stimuliert es in vitro die Progesteronsynthese (WEEMS ET AL. 2002). Auch beim Schwein scheint PGE_2 , insbesondere während der Etablierung der Gravidität, luteoprotektive Eigenschaften zu haben (MCCRACKEN ET AL. 1999). Außerdem wirkt es immunmodulatorisch. Beim Menschen ist es durch Suppression der Alloreaktivität maternaler Leukozyten am Schutz des Konzeptus vor dem mütterlichen Immunsystem beteiligt (LALA ET AL. 1988, PARHAR ET AL. 1988; LALA 1990). Die langfristige Behandlung mit Indomethacin, einem nicht-steroidalen Antiphlogistikum verhindert die PGE_2 -vermittelte Immunsuppression und führt dementsprechend zum

Trächtigkeitsabbruch bei Mäusen (LALA ET AL. 1986). Peripartal sind Prostaglandine, insbesondere PGE_2 an der Dilatation und Erweichung der Zervix beteiligt (HOFFMANN 1994; MEST 1994; WEEMS ET AL. 2006).

2.7 Endokrine Steuerung der Geburt beim Rind und wichtige beteiligte Faktoren

Voraussetzung für den Eintritt der Geburt ist die Aufhebung des „Progesteronblocks“. Der präpartale Entzug der Progesteronwirkung beruht bei den meisten Säugetieren auf dem Abfall der maternalen peripheren Progesteronkonzentration, welcher in Abhängigkeit von der Hauptprogesteronquelle in der späten Gravidität, Folge einer Luteolyse oder einer Umstellung der plazentaren Steroidbiosynthese ist (ZAKAR UND HERTELENDY 2007).

Die zur Geburt führende Signalkaskade ist bei den meisten Spezies noch weitgehend unbekannt. Bisherige Untersuchungen haben jedoch erhebliche spezies-spezifische Unterschiede erkennen lassen. Da das Schaf über Jahrzehnte als Modelltier der Forschung zur Steuerung der Geburt diente, liegen für diese Spezies umfangreiche Informationen vor. Beim Schaf konnte gezeigt werden, dass die Geburtsauslösung an die Reifung und Funktion der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse gebunden ist. So führt eine Adrenal- oder Hypophysektomie zur Tragzeitverlängerung, während durch Stimulation der fetalen Nebennierenrinde mit ACTH oder durch die Applikation von Glucocorticoiden die Geburt ausgelöst werden kann. Man geht davon aus, dass der präpartale Anstieg fetaler Glucocorticoide zur Aufregulation der Cox II im Trophoblasten und somit zur Synthese von PGE_2 führt. Durch die PGE_2 -induzierte Aufregulation der 17α -Hydroxylase-C17, 20 Lyase kommt es zur Umschaltung der plazentaren Steroidsynthese und es werden anstelle von Progesteron verstärkt Östrogene gebildet. Die beim spätgraviden Schaf einzig bedeutsame Progesteronquelle – die Plazenta – wird folglich als solche ausgeschaltet (LIGGINS 1968, LIGGINS 1969; ANDERSON UND FLINT 1975; THORBURN UND CHALLIS 1979; HOFFMANN 1994; WHITTLE ET AL. 2001). Die plazentaren Östrogene induzieren wiederum die Expression von Oxytocinrezeptoren und der Cox II im Endometrium. Folge ist die Synthese von uterotonem $\text{PGF}_{2\alpha}$. Ferner sensibilisieren sie das Myometrium gegenüber Oxytocin und Prostaglandinen durch die Aufregulation von Calcium-Kanälen im Myometrium, welche eine koordinierte Kontraktion bewirken.

nierte Aktivität der glatten Muskelzellen ermöglichen. Weiterhin sind die Östrogene an der Erweichung des weichen Geburtsweges beteiligt (MASON ET AL. 1989; DÖCKE 1994a, DÖCKE 1994b; CHALLIS ET AL. 1997; WHITTLE ET AL. 2001).

Offensichtlich trifft dieses beim Schaf etablierte Modell der Geburtseinleitung in weiten Teilen auch für das Rind zu (Abbildung 5). Auch beim Rind wurden in Fällen von Entwicklungsstörungen im Bereich der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse pathologisch verlängerte Graviditäten beobachtet (HOLM UND SHORT 1962; HAFNER ET AL. 1991; BUCZINSKI ET AL. 2007). Dies deutet darauf hin, dass auch beim Rind die Ausreifung dieses Organverbunds am Anfang der Signalkaskade steht. Wie bei Schaffeten wurde auch bei Rinderfeten ein steiler präpartaler Anstieg der Cortisolkonzentrationen gemessen (HOFFMANN ET AL. 1973b; HUNTER ET AL. 1977; HOFFMANN ET AL. 1977; HOFFMANN 1993, HOFFMANN 1994). Unterstützt wird die Bedeutung eines präpartalen fetalen Cortisolanstieg als wichtiger Schritt in Zusammenhang mit der Geburtsinduktion durch die Tatsache, dass bei funktionsfähiger Plazenta bei hochträchtigen Rindern effizient die Geburt durch die Applikation von Glucocorticoiden ausgelöst werden kann (HOFFMANN ET AL. 1973b; THORBURN ET AL. 1977; FAIRCLOUGH ET AL. 1981; JOHNSON ET AL. 1981; AURICH UND AURICH 1994). Auch ein steiler präpartaler Anstieg der placentaren P450c17-Expression (SCHULER ET AL. 2006a; BUCZINSKI ET AL. 2007) und Aktivität (SCHULER ET AL. 1994) konnte für das Rind bestätigt werden. In vitro konnte in Untersuchungen unter Verwendung von Plazentahomogenaten gezeigt werden, dass der präpartale Anstieg der placentaren P450c17-Aktivität zu einer erheblichen Steigerung der Östrogen- zu Lasten der Progesteronsynthese führt (SCHULER ET AL. 1994). Der präpartale Östrogenanstieg im maternalen Blut ist beim Rind im Vergleich zum Schaf allerdings nur sehr schwach ausgeprägt (TSANG 1974; HOFFMANN ET AL. 1997).

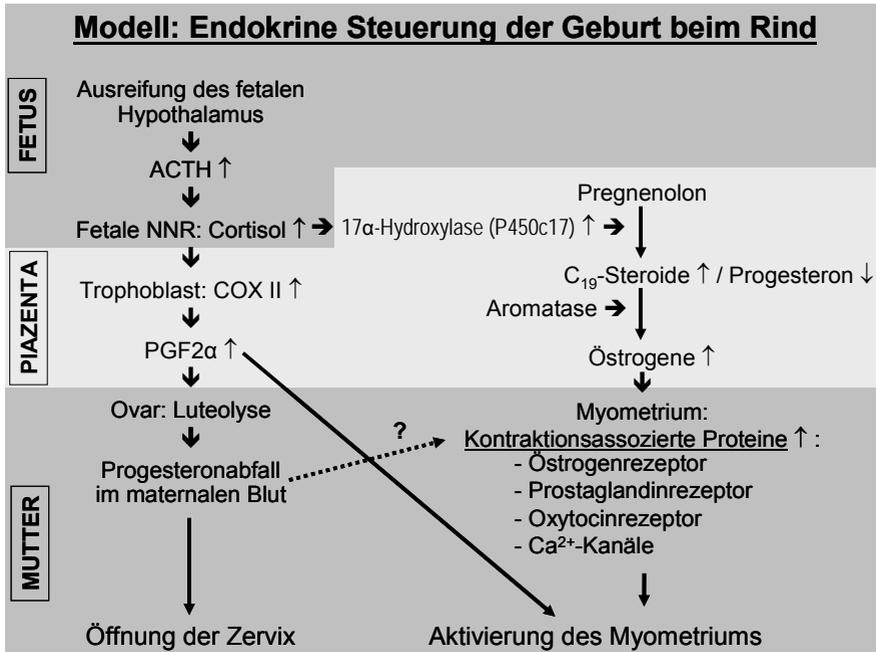


Abbildung 5: Endokrine Steuerung der Geburt beim Rind (Modell).

Ein wesentliches frühes Signal innerhalb der zur Geburt führenden Ereigniskette ist der Anstieg der fetalen Cortisolproduktion. Er führt zu einer zur Bildung von luteolytischem PGF_{2 α} im Trophoblasten. Zum anderen wird durch die Aufregulation der 17 α -Hydroxylase die placentare Steroidsynthese von Progesteron auf Östrogene umgestellt. Die Signalkaskade führt letztendlich zur Öffnung der Zervix und zur Aufnahme der Wehentätigkeit.

Trotz zahlreicher ähnlicher Befunde aus den Untersuchungen zur Geburtsinduktion bei Rind und Schaf kann das beim Schaf etablierte und weitgehend abgesicherte Modell nicht uneingeschränkt auf das Rind übertragen werden. So unterscheiden sich die Ursprungsorte des zirkulierenden Progesterons in der Endphase der Gravidität bei diesen Spezies. Während beim Rind in diesem Zeitraum das Corpus luteum die Hauptprogesteronquelle darstellt (siehe Abschnitt 2.4.3), stammt beim spätgraviden Schaf das Progesteron praktisch ausschließlich aus der Plazenta. Daher führt beim Schaf die Cortisol-induzierte präpartale Umstellung des placentaren

Steroidstoffwechsels direkt zu einem Progesteronentzug, wohingegen beim Rind der physiologische Geburtseintritt an die Luteolyse gebunden ist. Da beim spätgraviden Rind durch Applikation eines PGF_{2α}-Analogons effizient die Geburt induziert werden kann und im Rahmen physiologischer Geburten um den Zeitpunkt der Luteolyse ein geringfügiger Anstieg der PGFM-Konzentrationen stattfindet, ist PGF_{2α} vermutlich, wie beim zyklischen Rind, das für die Gelbkörperregression verantwortliche Luteolysin (EDQUIST ET AL. 1978; BOSU ET AL. 1984; BUSCH 1994; HOFFMANN 1994). Die Quelle des präpartalen luteolytischen Signals konnte beim Rind bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Schuler et al. (2006b) konnten eine starke präpartale Aufregulation der Cox II in den UTC nachweisen. Da die UTC auch eine Aldo-Ketoreduktase mit PGFS-Aktivität exprimieren, vermuteten die Autoren, dass diese zur Produktion erheblicher PGF_{2α}-Mengen befähigt sind (siehe Abschnitt 2.6.1) und die wesentliche Quelle des präpartalen luteolytischen Signals darstellen.

Die Synthese von PGF_{2α} kann auch beim trächtigen Rind durch Oxytocin stimuliert werden. So werden endo- und myometriale Oxytocinrezeptoren im Laufe der Gravidität aufreguliert (FUCHS ET AL. 1992; FUCHS ET AL. 1996; WEEMS ET AL. 2006) und die Applikation von Oxytocin geht mit einem Anstieg der PGFM-Konzentration im Blut einher (FUCHS ET AL. 1996). Ausmaß und Dauer des Oxytocin-induzierten PGFM-Anstiegs nehmen im Laufe der Gravidität zu. Darüber hinaus führt Oxytocin auch zu einer Aufregulation der Cox II im interkarunkulären Endometrium (FUCHS ET AL. 1999). Daher ist nahe liegend, dass der PGFM-Anstieg im Blut nach Oxytocinapplikation auf eine vermehrte Synthese von endometrialen Prostaglandinen zurückzuführen ist. Die Beobachtungen weisen insgesamt auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Oxytocin bzw. den endometrialen Oxytocinrezeptoren und der Prostaglandinsynthese im Endometrium hin. Präpartal wird die Cox II aber unter physiologischen Bedingungen kaum im interkarunkulären Endometrium exprimiert (FUCHS ET AL. 1999; WEHBRINK ET AL. 2008). Dagegen wird sie in den UTC vor der Geburt stark aufreguliert (siehe oben). Die Effekte der Oxytocinbehandlung auf die PGF_{2α}-Synthese im Trophoblasten und auf die Lutealfunktion wurden jedoch in der Studie von Fuchs et al. (1999) nicht überprüft.

2.8 Nachgeburtshaltung beim Rind

2.8.1 Klinische und ökonomische Bedeutung

Die Nachgeburtshaltung des Rindes stellt insbesondere in der Milchviehhaltung ein bedeutendes, mit erheblichen ökonomischen Verlusten verbundenes Problem dar. Die Inzidenz liegt in den Industrieländern bei 3 – 8 %. Sie kann in Problem-betrieben aber auch deutlich höher liegen. Fruchtbarkeitsstörungen, eine reduzierte Milchleistung, Abgabesperre für die Milch betroffener Tiere und Kosten für die tier-ärztliche Behandlung sind mögliche Folgen dieser Erkrankung. Chronische Endo-metritiden können sogar zur vollständigen Unfruchtbarkeit führen und somit die weitere Nutzung des Tieres unmöglich machen (GRUNERT 1993; LAVEN UND PETERS 1996).

Die Effektivität und Wirtschaftlichkeit gängiger therapeutischer Maßnahmen, wie manuelle Abnahme der Nachgeburt, Applikation von Oxytocin oder Prostaglandin-analoga und lokale bzw. systemische Antibiotikagabe wird sehr kontrovers diskutiert. Die Injektion bakterieller Kollagenasen in die Nabelarterie retinierter Plazenten war zwar unter experimentellen Bedingungen erfolgreich, ist aber teuer und unter Praxis-bedingungen wenig praktikabel (PETERS UND LAVEN 1996; BEAGLEY ET AL. 2010).

2.8.2 Fakten und Vermutungen zu Ätiologie und Pathogenese

Physiologischerweise geht die Nachgeburt beim Rind innerhalb von sechs bis acht Stunden nach der Geburt ab. Bei einer Dauer von bis zu zwölf Stunden spricht man von einem verzögerten Abgang. Eine Retention der Nachgeburt oder von Nachgeburtsteilen länger als zwölf Stunden nach der Austreibung der Frucht wird als Nachgeburtshaltung oder Retentio secundinarum bezeichnet (GRUNERT 1993). Andere Autoren definieren dagegen erst eine Retention der Fruchthüllen von über 24 Stunden und länger als pathologisch (LAVEN UND PETERS 1996; BEAGLEY ET AL. 2010). Ätiologie und Pathogenese sind insbesondere auf molekularer Ebene kaum geklärt. Grunert (1993) bezeichnet die Retentio secundinarum als Symptom oder Folge einer Grunderkrankung. Häufig kommt es aber trotz offensichtlich ungestörter Gravidität und komplikationsloser Geburt reifer und gesunder Kälber zur Nachgeburtshaltung, ohne dass eine Ursache ermittelt werden kann (LAVEN UND PETERS 1996). Die Geburt eines vitalen, maturen Kalbes setzt demnach nicht zwangsläufig eine reife Plazenta voraus (WOICKE ET AL. 1986).

Grundsätzlich werden die heute in den Industrieländern seltenen, infektiösen Ursachen (z.B. Brucellose) von den häufigeren, nicht-infektiösen Ursachen unterschieden. Beide führen letztendlich zu einer Störung des Lösungsprozesses an der feto-maternalen Kontaktzone. Daneben werden eine reduzierte Uterusmotilität und in Einzelfällen mechanische Hindernisse mit der Entstehung der Nachgeburtshaltung in Zusammenhang gebracht. Entscheidend für einen vollständigen und termingerechten Abgang der Eihäute ist jedoch der Verlust der feto-maternalen Adhäsion (BJÖRKMAN UND SOLLEN 1960; LAVEN UND PETERS 1996).

Die physiologische Trennung von fetalem und maternalem Anteil der Plazenta setzt offensichtlich Reifungsmechanismen voraus, die mit strukturellen Veränderungen der Plazentomarchitektur einhergehen (siehe Abschnitt 2.3).

Nach Grunert (1993) wird während der Geburt die Lockerung der feto-maternalen Adhäsion durch die Wehentätigkeit gefördert. Weiterhin soll es nach dem Riss der Nabelschnur durch die fehlende Durchblutung zu einer Oberflächenverringering des Chorionepithels kommen. Die Nachgeburtshaltungen fördern die Ausstoßung der Nachgeburt.

Auch wenn die beim Rind zur Nachgeburtshaltung führenden Mechanismen auf molekularer Ebene immer noch unbekannt sind, wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, welche mit einem gehäuften Auftreten von Nachgeburtshaltungen in Zusammenhang gebracht werden. So ist die feto-maternale Separation beeinträchtigt, wenn die Plazentome unreif bzw. überreif sind oder wenn eine Ödematisierung der Chorionzotten vorliegt. Unreife Plazentome findet man beispielsweise nach nichtinfektiösen Aborten, Frühgeburten oder Zwillingsschwangerschaften. Durch die verkürzte Tragzeit soll es zu einer mangelhaften hormonellen und strukturellen Vorbereitung des Gewebes kommen. Überreife Plazentome mit bereits fortgeschrittener Involution treten bei verlängerter Trächtigkeitsdauer auf. Durch proliferative Veränderungen des Karunkelstromas soll es zu einem Einklemmen der Chorionzotten in den karunkulären Krypten kommen. Das gehäuften Auftreten von Nachgeburtshaltungen nach Kaiserschnitten, Torsio uteri oder entzündlichen Plazentaänderungen erklärt man sich durch eine Ödematisierung der Chorionzotten, welche zu einer mechanischen Behinderung des Separationsprozesses führt (GRUNERT 1993; LAVEN UND PETERS 1996).

Weiterhin werden zahlreiche Einflussfaktoren wie Rasse, Stoffwechselstörungen, Stress, Fütterungsfehler, Vitamin-, Mineralstoff- oder Spurenelementmangel und un-

zureichende Bewegung genannt (ZEROBIN ET AL. 1973; PETERS UND POOLE 1992; LAVEN UND PETERS 1996; GRUNERT 1993). Auch die Trennung des Kalbes vom Muttertier unmittelbar nach der Geburt soll durch die verminderte postpartale Oxytocinausschüttung und die damit einhergehende Reduktion der Uteruskontraktionen die Nachgeburtshaltung begünstigen (GRUNERT 1993). Nach Geburtsinduktionen mit Prostaglandinen oder Glucocorticoiden treten gehäuft Nachgeburtshaltungen auf (LAVEN UND PETERS 1996; BEAGLEY ET AL. 2010), wobei deren Anteil annähernd 100 % betragen kann. Beispielweise betrug die Inzidenz nach Geburtsinduktion mit einem PGF_{2α}-Analogon am 270. Tag bei Färsen ca. 90 % (KÖNIGSSON ET AL. 2002). Gross et al. (1986) konnten nach Geburtsinduktion mit Dexamethason fünf Tage vor dem zu erwartenden Geburtstermin eine vergleichbar hohe Inzidenz (90,5 %) beobachten. Auch die Kombination von Dexamethason und Cloprostenol geht mit einem gehäuften Auftreten von Nachgeburtshaltung einher (GARCIA ET AL. 1992; MANSELL ET AL. 2006).

Untersuchungen bezüglich molekularer Mechanismen der Plazentaablösungen fokussierten sich in den letzten Jahren vermehrt auf Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMPs). MMPs sind Zink- bzw. Kalzium-abhängige Proteasen, darunter Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und Kollagenasen (z.B. MMP-1) (CURRY UND OSTEEN 2001). Sie spielen bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Wundheilung, Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle. Durch Abbau der extrazellulären Matrix sind sie an der endometrialen bzw. ovariellen Geweberemodellierung im Laufe des Östrus- bzw. Menstruationszyklus sowie während Implantation und Plazentation, beteiligt (SALAMONSEN 1999; CURRY UND OSTEEN 2001; CURRY UND OSTEEN 2003). Beim Menschen sind zurzeit 23 MMPs und 4 TIMPs bekannt (CURRY UND OSTEEN 2001; NAGASE ET AL. 2006).

MMPs werden als inaktive Proenzyme sezerniert und anschließend durch Proteasen in die aktive Form überführt. TIMPs können die Aktivität der MMPs unterbinden. Die Transkription der MMPs wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Steroidhormone moduliert. Interessant im Kontext dieser Arbeit ist, dass Progesteron die Transkription verschiedener MMPs im humanen Endometrium inhibiert. Diese Hemmwirkung kann durch Progesteronrezeptor-Blocker ausgeschaltet werden (SALAMONSEN 1999; CURRY UND OSTEEN 2001; CURRY UND OSTEEN 2003). In der Rinderplazenta wurden bereits Untersuchungen zu Aktivität bzw. Expression von

MMP-2, MMP-9, MMP-14 sowie TIMP-1 und 2 durchgeführt (MAJ UND KANKOFER 1997; WALTER UND BOOS 2001; TAKAGI ET AL. 2007; DILLY ET AL. 2010; DILLY ET AL. 2011). Neben Karunkel- und Kotyledonengewebe kommen auch Leukozyten als Bildungsort der MMPs in Frage (BEAGLEY ET AL. 2010). Takagi et al. (2007) konnten zeigen, dass die Expression der MMPs in den Karunkeln unmittelbar postpartal höher ist als während der Gravidität. Mit der Expression von TIMP-2 in den Kotyledonen verhielt es sich dagegen umgekehrt. Sie vermuten, dass MMP-2, MMP-9 und TIMP-2 an der Ablösung der Nachgeburt beteiligt sind. Immunhistologisch konnte TIMP-2 während der gesamten Gravidität in den TGC detektiert werden (WALTER UND BOOS 2001). Möglicherweise bedingt der präpartale Progesteronabfall, verstärkt durch die mit dem TGC-Abfall einhergehende reduzierte TIMP-2-Expression, eine erhöhte proteolytische Aktivität im Plazentomgewebe (WALTER UND BOOS 2001; BEAGLEY ET AL. 2010). Hinweise auf eine Bedeutung der Kollagenolyse im Rahmen der Nachgeburtsablösung ergaben sich auch durch den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Kollagenasen bei Nachgeburtsverhalten. Durch Injektion einer 200 000 I.U. enthaltenden Kollagenaselösung in die Nabelarterie 24 – 72 Stunden nach der Kalbung wurde bei 85 % der untersuchten Tiere ein Behandlungserfolg innerhalb von 36 Stunden verzeichnet (EILER UND HOPKINS 1993).

Die Bedeutung des Immunsystems für den Ablösungsprozess der Secundinae wird vielfach diskutiert. Ein neueres Erklärungsmodell geht von der Abstoßung der Nachgeburt als Allotransplantat aus. Dabei werden paternale Antigene vom mütterlichen Immunsystem als fremd erkannt und attackiert.

Normalerweise erfordert der Schutz des Fetus vor einer Abstoßungsreaktion die Unterdrückung der MHC-I-Expression in den Trophoblastzellen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren werden beim Rind im Trophoblasten jedoch im letzten Trimester MHC-I Antigene exprimiert. Die Expression ist aber auf die interplazentomaren Areale und die Chorionplatte beschränkt, während in den Chorionzotten keine MHC-I nachweisbar sind. Eine durch die Aufregulation dieser Antigene induzierte Abstoßung des fetalen Gewebes wäre denkbar, findet aber offensichtlich nicht statt. Trotzdem besteht vermutlich ein Zusammenhang zwischen immunologischen Mechanismen und der Nachgeburtsablösung (DAVIES ET AL. 2000; DAVIES 2007; McNAUGHTON UND MURRAY 2009). Dafür spricht, dass eine Kompatibilität der MHC-I von Muttertier und Kalb die Entwicklung einer Nachgeburtsverhaltung begünstigt (JOOSTEN ET AL. 1991; JOOSTEN UND HENSEN 1992). Bekräftigt wird diese

Hypothese außerdem durch die Beobachtungen von Heuwieser und Grunert (1987) und Gunnink (1984). So konnte in Plazentomen von Tieren mit Nachgeburtshaltung direkt nach der Geburt eine reduzierte chemotaktische Aktivität nachgewiesen werden (HEUWIESER UND GRUNERT 1987) und eine fehlende Leukozytenaktivität im Kotyledonengewebe wurde in Verbindung mit einer Retentio secundinarum regelmäßig festgestellt (GUNNINK 1984). Des Weiteren ist die Konzentration von Interleukin-8, welches für Chemotaxis und Funktion der neutrophilen Granulozyten erforderlich ist, im Blut betroffener Tiere geringer. Auch dies spricht dafür, dass in der Pathogenese der Nachgeburtshaltung eine verminderte Aktivität neutrophiler Granulozyten von Bedeutung sein könnte (KIMURA ET AL. 2002). Insgesamt weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass eine MHC-I-induzierte maternale Immunreaktion in den feto-maternalen Separationsprozess involviert ist. Joosten und Hensen (1992) gehen davon aus, dass die fetalen MHC-I Antigene den initialen Auslöser für die Plazentareifung und den Abgang der Nachgeburt darstellen und dass jegliche Form der temporären Immunsuppression die MHC-initiierten Prozesse unterdrücken oder stören kann. Diese Theorie erklärt gleichzeitig, warum auch bei MHC-Inkompatibilität Nachgeburtshaltung auftritt.

Darüber hinaus sollen eine reduzierte Aktivität antioxidativer Enzyme in der Plazenta bzw. ein Vitamin E/Selenmangel an der Pathogenese der Retentio secundinarum beteiligt sein. Neben der antioxidativen Wirkung stimuliert Vitamin E die Chemotaxis und könnte über eine Erhöhung der Leukozytenkonzentration an der feto-maternalen Kontaktzone den Nachgeburtshaltung fördern (MCNAUGHTON UND MURRAY 2009; BEAGLEY ET AL. 2010).

2.8.3 Morphologische Veränderungen in Rinderplazentomen bei Nachgeburtshaltungen

Beim Vorliegen einer Retentio secundinarum sind die typischen histomorphologischen Veränderungen eines reifen Plazentoms nicht oder nur andeutungsweise erkennbar. Das Karunkel epithel ist weitgehend erhalten. Die Epithelzellen sind kubisch oder nur wenig abgeflacht (WOICKE ET AL. 1986). Auch der bei normalem Nachgeburtshaltung zu beobachtende peripartale Abfall der TGC-Anzahl bleibt aus (WILLIAMS ET AL. 1987; GROSS ET AL. 1991). Selbst zwölf Stunden nach der Geburt ist keine signifikante Reduktion der TGC feststellbar (WILLIAMS ET AL. 1987). In vitro

Versuche zeigten, dass die Empfindlichkeit der TGC gegenüber hypotoner Natriumchloridlösung bzw. die Fragilität der Zellmembran nach termingerechtem Nachgeburtsabgang größer ist als die von Trophoblastriesenzellen retinierter Eihäute (GROSS ET AL. 1991). Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen Anzahl der TGC, deren Degenerationsgrad und den Separationsprozessen an der fetomaternalen Kontaktzone. Dagegen scheinen die Vorgänge, die zur Öffnung der Zervix und zur Austreibung einer lebensfähigen Frucht führen, zumindest teilweise unabhängig von diesen Parametern zu sein. Gross et al. (1991) entwickelten die Hypothese, dass der TGC-Abfall zu einer verminderten Verfügbarkeit von Substanzen führt, die für den Erhalt der Gewebeintegrität verantwortlich sind. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre eine mit dem TGC-Untergang verbundene, vermehrte Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, welche Adhäsionsfaktoren zerstören. Allerdings ist derzeit noch ungeklärt, ob der TGC-Abfall auf einen vermehrten Zelluntergang oder eine verminderte TGC-Differenzierung zurückzuführen ist.

Die Anflutung und Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im Plazentomgewebe ist bei Nachgeburtsverhaltung schwächer ausgeprägt als bei ungestörtem Abgang der Eihäute (WOICKE ET AL. 1986). Diese Beobachtung ist konform mit den unter Abschnitt 2.8.2 beschriebenen Beobachtungen hinsichtlich der Bedeutung des Immunsystems für den Nachgeburtsabgang. Die histochemischen Eigenschaften des Stromakollagens sind dagegen beim Vorliegen einer Retentio Secundinarum nicht verändert und scheinen daher nicht mit der Ablösung der Fruchthüllen in Verbindung zu stehen (BOOS ET AL. 2003b).

2.8.4 Endokrinologische Befunde bei Rindern mit Nachgeburtsverhaltung

Neben den bereits beschriebenen Faktoren werden „endokrinen Imbalancen“ ein bedeutender Stellenwert in der Ätiologie und Pathogenese der Nachgeburtsverhaltung beim Rind zugesprochen. Entsprechend wurden hierzu zahlreiche Studien durchgeführt, deren Ergebnisse jedoch häufig sehr widersprüchlich waren. Demnach trugen diese bisher kaum zur Aufklärung der Entstehungsmechanismen der Nachgeburtsverhaltung bei. Im Falle von in der Plazenta produzierten Hormonen, wie z.B. Östrogenen, Progesteron und Prostaglandinen, liegt ein erhebliches Problem offensichtlich

in der Unterscheidung, ob eine festgestellte Abweichung Ursache oder Folge der Nachgeburtverhaltung ist.

Besonders intensiv wurde eine mögliche Bedeutung der plazentaren Östrogene für den Nachgeburtsabgang untersucht und kontrovers diskutiert (ZDUŃCZYK UND JANOWSKI 1989; LAVEN UND PETERS 1996). Erschwert wird die Beurteilung der Befunde durch die Tatsache, dass im maternalen Blut verschiedene Östrogene (Estron, Estradiol-17 β , Estradiol-17 α), die jeweils in konjugierter oder in freier Form vorliegen können, vorkommen. Durch Unterschiede in den Messverfahren, z.B. durch die unterschiedliche Kreuzreaktivität der in immunologischen Methoden verwendeten Antikörper, sind die erhaltenen Daten nur bedingt vergleichbar. Da die im maternalen Blut in hohen Konzentrationen vorkommenden plazentaren Östrogene vorwiegend biologisch inaktive Formen darstellen (konjugierte Östrogene, Estradiol-17 α), kann außerdem kaum abgeschätzt werden, inwieweit aktive Formen in den Zielzellen verfügbar sind. Grunert et al. (1989) verglichen die Gesamtöstrogenwerte von Tieren mit physiologischem Nachgeburtsabgang und solchen mit Retentio secundinarum in der letzten Woche vor Flumethason-induzierten Geburten (Trächtigkeitsdauer: $266,0 \pm 2,3$ Tage). Zwar war in beiden Gruppen in dem Zeitraum vor der Geburt ein kontinuierlicher Anstieg nachweisbar, doch hatten die Tiere mit Nachgeburtverhaltung signifikant niedrigere Werte. Die retinierten Nachgeburten waren dünner als solche, die termingerecht abgegangen waren. Sie rissen schnell während der manuellen Abnahme. Die Autoren vermuten, dass bei diesen Tieren die Östrogen-induzierte Ödematisierung und Quellung der Stromazellen ausblieb und dadurch eine termingerechte Ablösung der Eihäute erschwert bzw. nicht möglich war (GRUNERT ET AL. 1989). Den Ansichten von Grunert et al. (1989) sind Ergebnisse anderer Autoren entgegenzusetzen, die bei Tieren mit Nachgeburtverhaltung erhöhte (AGTHE UND KOLM 1975) oder nicht nennenswert abweichende Östrogenplasmawerte nachwiesen (CHEW ET AL. 1977).

In der Literatur finden sich auch Studien, in denen durch die Applikation von Östrogenen die Häufigkeit von Nachgeburtverhaltungen vermindert werden konnte. So konnte die Inzidenz der Nachgeburtverhaltung nach Geburtsinduktion mit Dexamethason durch eine zusätzliche Gabe von hochdosiertem Diethylstilböstrol von ca. 62 % auf ca. 24 % reduziert werden (GRUNERT ET AL. 1975). Der Einsatz von Östradiolbenzoat zeigte in der gleichen Studie keine Effekte. Garverick et al. (1974) dagegen beschrieb eine Reduktion der Inzidenz der Retentio secundinarum nach

Dexamethason-induzierten Geburten durch die gleichzeitige Applikation von Östradiolbenzoat von 63 % auf 0 %. Allerdings ist zu bemerken, dass der Nachgeburtsabgang der Tiere dieser Studie erst am dritten Tag nach der Geburt überprüft wurde (GARVERICK ET AL. 1974), während Grunert et al. (1975) die Untersuchung schon in den ersten 12 bis 24 Stunden post partum durchführte. Des Weiteren ist unklar, inwieweit durch die verabreichten hohen Dosen biologisch hochaktiver Östrogene natürliche Regelvorgänge imitiert wurden.

Auch der Zusammenhang zwischen der prä- bzw. intrapartalen Progesteronkonzentration und der Nachgeburtsverhaltung wurde beim Rind mehrfach untersucht, wobei je nach Studie eine positive (CHEW ET AL. 1979; BOSU ET AL. 1984), eine negative (FÜRSTENBERG ET AL. 1990) bzw. keine Korrelation (AGTHE UND KOLM 1975; PETER UND BOSU 1987) festgestellt wurde (Übersicht bei Zduńczyk und Janowski, 1989). In diesen Studien wurden jedoch ausschließlich die peripheren maternalen Blutspiegel gemessen. Die Gewebekonzentrationen in den Plazentomen wurden nicht berücksichtigt. Darüber hinaus wurde einem Missverhältnis von Progesteron und Östrogenen im Blutplasma Bedeutung bezüglich der Entstehung der Nachgeburtsverhaltung zugesprochen (CHEW ET AL. 1979).

Bezüglich der peripheren maternalen Cortisolkonzentration liegen ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse vor. Diese liefern keine eindeutigen Anhaltspunkte, die für einen Zusammenhang mit der Entstehung der Nachgeburtsverhaltung sprechen (ZDUŃCZYK UND JANOWSKI 1989; LAVEN UND PETERS 1996).

Des Weiteren wurde auch eine gestörte Expression von Steroidhormonrezeptoren als möglicher Faktor in der Ätiologie der Nachgeburtsverhaltung diskutiert. Nach Boos (2000) ist die Immunreaktivität von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Plazentagewebe von Tieren mit Nachgeburtsverhaltung höher als von solchen nach normalem Nachgeburtsabgang. Hier ist aber ebenfalls unklar, ob der festgestellte Unterschied eine Bedeutung in der Ätiologie besitzt oder lediglich eine Folge der Nachgeburtsverhaltung darstellt.

Neben Östrogenen werden auch Prostaglandinen, insbesondere $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine Bedeutung in der Steuerung des Nachgeburtsabganges zugesprochen. So konnte durch die Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ innerhalb einer Stunde nach Dexamethason-induzierter Geburt (GROSS ET AL. 1986) bzw. nach Sectio caesarea (STOCKER UND WÄELCHLI 1993) die hohe Inzidenz von Nachgeburtsverhaltung deutlich gesenkt werden. Dem

entgegenzusetzen sind jedoch Ergebnisse anderer Studien, nach denen weder der prophylaktische (GARCIA ET AL. 1992) noch der therapeutische Einsatz von $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analoge, erfolgreich war (PETERS UND LAVEN 1996; STEVENS UND DINSMORE 1997; BEAGLEY ET AL. 2010). Darüber hinaus liegen Studien vor, nach denen die PGFM-Konzentrationen im Blut bei Nachgeburtshaltung peripartal sogar höher waren als bei normalem Nachgeburtshabgang (BOSU ET AL. 1984; KÖNIGSSON ET AL. 2002; PETER UND BOSU 1987). Der bereits sechs Tage vor der Geburt beobachtete Anstieg der PGFM-Plasmakonzentration bei Nachgeburtshaltung wird von den Autoren sogar als möglicher Indikator für das Auftreten einer Retentio secundinarum angesehen (BOSU ET AL. 1984; PETER UND BOSU 1987). Bei Tieren mit physiologischem Abgang der Nachgeburt fand dieser Anstieg erst 48 Stunden vor der Geburt statt. Die Ursache dieses Anstiegs ist jedoch unklar. Bosu et al. (1984) und Königsson et al. (2002) wiesen bei Kühen mit Nachgeburtshaltung einige Tage nach der Geburt erhöhte PGFM-Konzentrationen im Blutplasma nach. Maximale PGFM-Werte wurden bei diesen Tieren ein Tag post partum erreicht, während bei Kühen mit physiologischem Nachgeburtshabgang die höchsten PGFM-Konzentrationen am Tag der Geburt gemessen wurden. Auch Wischral et al. (2001) beobachteten bei Tieren mit Nachgeburtshaltung zum Geburtszeitpunkt niedrigere PGFM-Werte als bei Tieren mit physiologischem Nachgeburtshabgang. Zwölf Stunden nach der Geburt verhielt es sich dagegen umgekehrt. Die Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen dem intrapartalen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Mangel und dem Auftreten einer Retentio secundinarum. Die hohen postpartalen PGFM-Werten bei Nachgeburtshaltung sind möglicherweise auf die häufig auftretenden bakteriellen Infektionen im Rahmen puerpuraler Endometritiden zurückzuführen (KÖNIGSSON ET AL. 2002).

Aufgrund der Beobachtung, dass die plazentare $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gewebekonzentration bei Tieren mit Nachgeburtshaltung zum Zeitpunkt der Geburt geringer ist als bei Kühen mit physiologischem Nachgeburtshabgang (LEIDL ET AL. 1980) entstand die Vermutung, dass ein gesteigerter $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Abbau für diese Differenzen verantwortlich ist und somit bezüglich der Ätiologie des Nachgeburtshaltens von Bedeutung sein könnte. Eine erhöhte HPDH-Aktivität konnte im Plazentagewebe von Kühen mit Retentio secundinarum aber nicht beobachtet werden (KANKOFER ET AL. 1994).

Möglicherweise sind nicht die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen entscheidend, sondern das Verhältnis von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu PGE_2 , welches bei Nachgeburtshaltung peripartal sowohl im Blut (WISCHRAL ET AL. 2001) als auch im Plazentomgewebe (TAKAGI ET AL. 2002)

zugunsten von PGE₂ verschoben sein soll. Dementsprechend zeigten in vitro-Versuche, dass Trophoblastzellen von Kühen mit Nachgeburtsverhaltung mehr Prostaglandine der E-Reihe bilden, während bei ungestörtem Nachgeburtsabgang überwiegend Prostaglandine der F-Reihe produziert werden (GROSS ET AL. 1987; GROSS UND WILLIAMS 1988a).

Offensichtlich wird beim Vorliegen einer Retentio secundinarum weniger PGF_{2α} gebildet, während die PGE₂-Synthese nicht beeinträchtigt ist. Es wird verhältnismäßig sogar mehr PGE₂ gebildet. Daher wäre denkbar, dass eine verminderte Synthese von PGF_{2α} aus PGE₂ stattfindet.

Die Umwandlung von PGE₂ zu PGF_{2α} wird durch die 9-Ketoreduktase katalysiert. Die Aktivität dieses Enzyms ist jedoch sowohl im maternalen als auch im fetalen Anteil des Plazentoms bei Nachgeburtverhaltung signifikant höher als bei normalem Nachgeburtsabgang (KANKOFER ET AL. 2002). Diese Beobachtung spricht gegen eine verminderte Konversion von PGE₂ zu PGF_{2α}.

2.9 Antigestagene: Wirkungsmechanismen und Einsatzmöglichkeiten

Wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben fungieren Steroidhormonrezeptoren als ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription spezifischer Gene beeinflussen.

Steroidhormonrezeptor-Blocker binden kompetitiv und reversibel an die Ligand-bindungsdomäne des Rezeptors, ohne die rezeptorvermittelte genomische Wirkung von Agonisten auszulösen. Die antagonistische Wirkung der Antigestagene ist jedoch nicht nur auf die einfache Blockade der LBD des Rezeptors beschränkt, sondern umfasst verschiedene Mechanismen (LEONHARDT UND EDWARDS 2002). So verhindert die durch das Antigestagen Mifepriston (RU 38486, RU 486) ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors die Rekrutierung von Co-Aktivatoren, während die Bindung von Co-Repressoren gefördert wird. Außerdem werden intermolekulare Wechselwirkung zwischen C- und N-Terminus derart modifiziert, dass die maximale Aktivität des ligandgebundenen Rezeptors nicht mehr erreicht werden kann. Darüber hinaus kann ein Antigestagen-gebundener Rezeptor auch nach Heterodimerisierung mit einem Agonist-gebundenen Rezeptor die Wirkung des Rezeptor-Dimers unterbinden (LU ET AL. 2006; LEONHARDT UND EDWARDS 2002). Bei Anwesenheit bestimmter Co-Regulatoren kann RU 38486 auch, ähnlich einem

selektiven PR-Modulator (siehe unten) als partieller Antagonist bzw. Agonist fungieren (HOFFMANN UND SCHULER 2000; LU ET AL. 2006).

Mifepriston (Abbildung 6), die Pionierssubstanz der Antigestagene, ist ein 11 β -substituiertes 19-Norsteroid und wurde erstmals in den achtziger Jahren synthetisiert. Zunächst galt seiner antiglucocorticoiden Wirkung das Hauptinteresse. Erst später wurde die starke antigestagene Wirkung erkannt. Die Interaktion der Antigestagene sowohl mit Glucocorticoid-, als auch mit Progesteronrezeptoren ist aufgrund der hohen Homologie der C-Termini möglich. Die Affinität zum Androgenrezeptor ist lediglich gering (BAULIEU ET AL. 1987; ZAHRADNIK ET AL. 1991; HOFFMANN UND SCHULER 2000).

Aufgrund des Wirkmechanismus der Antigestagene ist zu erwarten, dass sie nur über klassische nukleäre Progesteronrezeptoren vermittelte Hormoneffekte unterdrücken. Es gibt jedoch Hinweise, dass RU 38486 auch eine Progesteron-antagonistische Wirkung auf nicht-genomischer Ebene (siehe Abschnitt 2.4.1) entfaltet. Offensichtlich reduzieren Antigestagene die intrazelluläre Calciumkonzentration in Spermien. Dadurch hemmen sie Motilität, Akrosomenreaktion und Penetrationsfähigkeit der Spermien. Progesteron dagegen führt mittels nicht-genomischer Wirkung zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und somit zu gegenteiligen Effekten (BAULIEU 1997).

In der Humanmedizin wird Mifepriston in Kombination mit einem PGE₁-Analogon überwiegend zum Schwangerschaftsabbruch bis zur neunten Woche der Gravidität eingesetzt. Das Prostaglandin-Derivat erhöht die Myometriumskontraktilität und fördert demnach die Ausstoßung des Konzeptus (BAULIEU 1996; BAULIEU 1997; MAHAJAN UND LONDON 1997). Liegt eine medizinische Indikation vor, ist auch der Einsatz in späteren Graviditätsstadien möglich. Darüber hinaus wird die erweiternde und erweichende Wirkung des Antigestagens auf die Zervix für gynäkologische Eingriffe bei der Frau genutzt. Weitere derzeit diskutierte Indikationen sind uterine Leiomyome, progesteronresponsive Meningiome, Endometriose und Mammakarzinome. Auch der Einsatz als postkoitales Kontrazeptivum ist möglich. Eine Nutzung der antiglucocorticoiden Wirkung zur Behandlung des Cushing-Syndroms hat sich nicht durchgesetzt, da die Blockierung der zentralen Glucocorticoidrezeptoren das negative Feedback des endogenen Cortisols auf das Hypothalamus-Hypophysensystem unterbindet, was durch eine gesteigerten ACTH-Ausschüttung

zu einem weiteren Anstieg der adrenalen Glucocorticoidsynthese führt (BAULIEU 1997; SPITZ 2003).

Neben Mifepriston gibt es eine Reihe weiterer Antigestagene, die sich strukturell nur geringfügig voneinander unterscheiden. Bei Mifepriston soll der Dimethylamino-phenylsubstituent an C-11 für die Antihormonwirkung entscheidend sein, während die hydrophobe Seitenkette an C-17 für die hochaffine Rezeptorbindung verantwortlich ist. Die Bindungsaffinität unterscheidet sich jedoch abhängig von Rezeptorisoform und Spezies. Beispielsweise werden Progesteronrezeptoren im Oviduct des Huhns von RU 38486 nicht gebunden. Unterschiede bezüglich der Affinität verschiedener Antigestagene zu verschiedenen Steroidrezeptoren sind vermutlich auf strukturelle Abweichungen des Substituenten an C-17 zurückzuführen (ZHRADNIK ET AL. 1991; HOFFMANN UND SCHULER 2000; LEONHARDT UND EDWARDS 2002).

Auch der Zell- bzw. Gewebetyp und die damit assoziierte Verfügbarkeit entsprechender Co-Regulatoren beeinflussen die Wirkung eines PR-Liganden (SMITH UND O'MALLEY 2004; SCARPIN ET AL. 2009). Beispielsweise können sogenannte PR-Modulatoren (Selective Progesterone Receptor Modulator, SPRM) sowohl Co-Aktivatoren als auch Co-Repressoren binden. Ob der SPRM als P₄-Agonist oder P₄-Antagonist fungiert hängt von dem gewebe- bzw. zelltypischen Expressionsmuster an Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren ab.

Aufgrund der gewebespezifischen Wirkung werden die SPRM in der Humanmedizin zunehmend zur Behandlung der Endometriose und des uterinen Leiomyoms eingesetzt (SMITH UND O'MALLEY 2004; SCARPIN ET AL. 2009).

Aglepriston (RU 46534, Alizin[®]) ist das einzige in der Veterinärmedizin verfügbare Antigestagen (Abbildung 6). Es ist zum Trächtigkeitsabbruch bei der Hündin bis zum 45. Tag nach dem Decken zugelassen. Aglepriston bindet den caninen Progesteronrezeptor mit dreifach höherer Affinität als Progesteron (KROKER 2006; VETIDATA 2011; Virbac Schweiz AG 2011). Nach Herstellerangaben weist Aglepriston auch eine ausgeprägte antiglucocorticoide Wirkung auf (KROKER 2006; VETIDATA 2011). Dagegen scheint Mifepriston beim Hund nicht bzw. nur nach dem Einsatz höherer Dosen als GR-Blocker (WADE ET AL. 1988; GERRES UND HOFFMANN 1994) zu fungieren. Offensichtlich gibt es auch bezüglich der antiglucocorticoiden Wirkung der Antigestagene speziesspezifische Unterschiede.

Neben der offiziell nur beim Hund zugelassenen Indikation (siehe oben) hat es sich auch zum Graviditätsabbruch bei anderen Tierarten sowie speziesspezifisch auch bei

der Therapie gestagenabhängiger Erkrankungen bewährt. So wird es beim Hund auch erfolgreich zur konservativen Pyometrabehandlung und zur symptomatischen Therapie PR-exprimierender, benigner Vaginaltumore verwendet (HOFFMANN UND SCHULER 2000; TRASCH ET AL. 2003; HOFFMANN UND SCHULER 2006; WEHREND UND GEORGIEV 2006; ROLLÓN ET AL. 2008). Bei der Katze ist neben den genannten Indikationen die Fibroadenomatose, eine tumorähnliche Gestagen-abhängige Hyperplasie des Gesäuges, Hauptanwendungsgebiet (HOFFMANN UND SCHULER 2000; WEHREND ET AL. 2001; WEHREND UND GEORGIEV 2006). Erste Erfahrungen liegen bereits bezüglich der Anwendung von Aglepriston bei der Pyometra des Meerschweinchens (von BARON ENGELHARDT 2006) und zur Nidationsverhütung bzw. Abort-induktion bei Kaninchen vor (ÖZALP ET AL. 2008; ÖZALP ET AL. 2010).

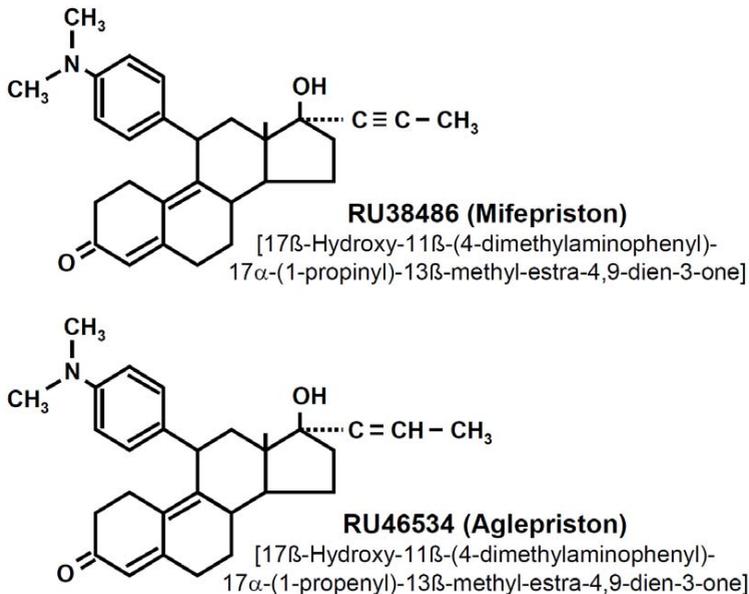


Abbildung 6: Strukturelle Charakteristika der Pioniersubstanz der Antigestagene, Mifepriston (RU 38486), sowie des in der Veterinärmedizin therapeutisch eingesetzten Aglepristons (RU 46534).

Da Antigestagene nicht zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren zugelassen sind, liegen nur wenige Daten bezüglich der Anwendung bei diesen Tierarten

vor. So wurde Aglepriston beim Rind erfolgreich zur Abortinduktion in der Frühgravidität (BREUKELMAN ET AL. 2005) und Mifepriston zur Geburtseinleitung (LI ET AL. 1991b; DLAMINI ET AL. 1995) verwendet. Li et al. (1991b) induzierten durch zweimalige Applikation von Mifepriston (2 mg/kg Körpergewicht) am 277. und 278. Tag der Gravidität bei Kühen die Geburt. Durchschnittlich 55 Stunden nach der ersten Applikation gebaren diese vitale Kälber. Im Gegensatz zu den gängigen Methoden der medikamentellen Geburtsinduktion mit PGF_{2α}-Analoge oder Dexamethason, führte die Behandlung mit dem Antigestagen nicht zu einer erhöhten Inzidenz der Retentio secundinarum. Bei primiparen Tieren reduzierte die Geburtseinleitung mit Mifepriston die Häufigkeit der Dystokien (DLAMINI ET AL. 1995). Auch bei Schafen und Schweinen wurde die Geburt bereits erfolgreich mit Antigestagenen induziert (LI ET AL. 1991a; GAZAL ET AL. 1993).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsaufbau und Probenentnahmen

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere der Rasse Holstein-Friesian mit bekanntem Besamungsdatum verwendet. Sie wiesen bis zum Eintritt in die Versuchsphase eine ungestörte Gravidität auf. Es lagen keine Zwillingssgraviditäten vor.

Um die Auswirkungen einer vollständigen Progesteronrezeptor-Blockade auf den Geburtsvorgang inklusive Nachgeburtsabgang zu untersuchen, wurden drei trächtige, multipare Holstein-Friesian Kühe mit dem kompetitiven Progesteronrezeptor-Blocker Aglepriston (Alizin[®]; freundlicherweise bereitgestellt von Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland) behandelt (Gruppe: D272+Ap). Zum Ausschluss einer unmittelbar bevorstehenden Geburt – gekennzeichnet durch den präpartalen Progesteronabfall – wurde vor der Aglepristonbehandlung die Progesteronplasmakonzentration der Tiere bestimmt (siehe Abschnitt 3.8). Die Ergebnisse dieser Messungen wiesen bei keinem dieser Tiere auf eine unmittelbar bevorstehende Geburt hin. Es erfolgte eine zweimalige Applikation von Aglepriston im Abstand von 24 Stunden, am 270. und 271. Graviditätstag. Jede Kuh erhielt pro Behandlung 3 g Aglepriston gelöst in 100 ml Lösungsmittel (raffiniertes Erdnussöl). Dies entspricht, bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 600 kg, einer Dosierung von 5 mg/kg. Die gewählte Dosierung wurde bereits erfolgreich zur Abortinduktion am 47. und 48. Graviditätstag bei Färsen eingesetzt (BREUKELMAN ET AL. 2005).

Das Antigestagen wurde nach Rasur und Desinfektion der Injektionsstellen in Form von vier subkutanen Depots im Bereich der seitlichen Brustwand appliziert. Um etwaige Geburtsanzeichen frühzeitig erkennen zu können, wurden die Tiere nach Behandlungsbeginn in zweistündigen Intervallen adspektorisch untersucht. Bei äußeren Anzeichen einer unmittelbar bevorstehenden Geburt, wie Unruhe, Abgang größerer Schleimmengen aus der Vulva oder Betätigung der Bauchpresse, erfolgte zusätzlich eine vaginoskopische oder manuelle vaginale Untersuchung.

Da trotz vollständiger Öffnung der Zervix und massivem Einsatz der Bauchpresse bei keinem der Tiere ein wesentlicher Fortschritt bei der Austreibung des Kalbes zu bemerken war, erfolgte zwei Stunden nach der ersten Feststellung einer vollständig geöffneten Zervix ein manueller Auszug. Unmittelbar nach der Extraktion des Kalbes wurden von jeder Kuh mindestens drei Plazentome per vaginam mittels Effeminator

entnommen. Die Plazentome wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS) auf Eis gelagert und zügig weiter verarbeitet.

Weiterhin wurden vom 269. bis zum 274. Tag post inseminationem (p.i.) in zwei-stündigen Intervallen, am 268. und 275. Tag p.i. in achtstündigen Intervallen sowie unmittelbar vor dem Auszug des Kalbes Blutproben aus der Vena jugularis externa gewonnen und in EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Röhrchen aufgefangen. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Blut 10 min bei 2240 g und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abpipettiert und bei –20 °C gelagert.

Die Tiere der Behandlungsgruppe D272+Ap wurden mit zwei unbehandelten Kontrollgruppen verglichen. Dabei diente die Gruppe D272-Ap (n = 3) der Charakterisierung der Situation der späten Gravidität vor dem präpartalen Progesteronabfall. Eine weitere Gruppe bestand aus vier spontan gebärenden Kühen mit einem Abgang der Nachgeburt innerhalb von 12 Stunden nach der Austreibung des Kalbes (Gruppe: Normalgeburt).

Bei den Tieren der Gruppe D272-Ap wurden am 272. Tag p.i. mindestens drei Plazentome im Rahmen einer Sectio caesarea entnommen. Der Operationszeitpunkt (Tag 272 p.i.) entsprach dem bei der Gruppe D272+Ap erwarteten Geburtstermin. Die Operation erfolgte nach der in der Klinik üblichen Standardmethode am stehenden Rind nach Laparotomie in der linken Hungergrube. Die Plazentome wurden in der Nähe der Hysterotomiestelle, also dem Bereich der großen Krümmung des fruchttragenden Uterushornes, jeweils nach Ligatur des Karunkelstiels entnommen. Im Zeitraum von 14 – 26 Stunden nach Entwicklung des Kalbes wurden den Tieren zur Induktion der Luteolyse ein- bis zweimal 150 µg Cloprostenol intramuskulär verabreicht. Die Blutprobenentnahme erfolgten vom 268. – 275. Tag p.i. in achtstündigen Intervallen. Unmittelbar vor Beginn der Sectio caesarea wurde eine zusätzliche Blutprobe entnommen.

Von den Tieren der Normalgeburtsgruppe wurden vom 274. Tag p.i. bis zum Abgang der Nachgeburt alle acht Stunden Blutproben gewonnen. Die Plazentome dieser Tiere wurden unmittelbar nach der Austreibung des Kalbes mittels Effeminator entnommen.

Der beschriebene Tierversuch wurde gemäß des Tierschutzgesetzes beim Regierungspräsidium Gießen beantragt und genehmigt (Aktenzeichen: V54-19c-20-15(I) Gi 18/14-Nr. 41/2007).

3.2 Klinische Untersuchungen

Alle Versuchstiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum täglich klinisch untersucht. Bei den Tieren der Gruppe D272+Ap und der Normalgeburtsgruppe galt den äußeren Anzeichen einer herannahenden Geburt (z.B. Ödematisierung der Vulva und Abgang von Sekret, Ödematisierung des Euters, Milchfüllung der Zitzen), dem Verlauf der Geburt und dem Zeitpunkt des Nachgeburtsabgangs besonderes Interesse. Bei den Tieren der Gruppe D272+Ap wurden parallel zur Blutprobenentnahme rektale Messungen der Körpertemperatur durchgeführt.

Außerdem wurden Entwicklungs- bzw. Reifegrad und Vitalität der Kälber beurteilt (Segmentale neonatale Untersuchung, Blutgasanalyse).

3.3 Gewebefixierung und immunhistologische Untersuchungen

3.3.1 Gewebefixierung in Formol nach Lillie

Die Plazentome wurden in 0,5 – 1,0 cm dicke Scheiben geschnitten und ca. eineinhalb Stunden bei 4 °C in phosphatgepuffertem 4 %-igem Formaldehyd (Formalin nach Lillie) vorfixiert. Danach wurden die Plazentomscheiben in ca. 0,5 x 0,5 x 1 cm³ große, keilförmige Stücke geschnitten und 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Im Folgenden wurden die Gewebeproben dreimal im Abstand von 24 Stunden in PBS gespült. Schließlich wurde das Gewebe je 24 Stunden bei 4 °C in 50 %-igem und 70 %-igem Ethanol dehydriert und in Paraffin eingebettet.

3.3.2 Immunhistologie

3.3.2.1 Prinzip, Färbeprotokoll und Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurde für die immunhistologischen Untersuchungen eine indirekte Immunperoxidasefärbung durchgeführt. Bei dieser Methode bindet der Primärantikörper spezifisch an das zu detektierende Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet. Nach dem Auftragen eines Avidin-Biotin-Peroxidase Konjugats wird das Substrat angeboten. Durch enzymatische Umsetzung der Substratlösung kommt es schließlich zur Farbreaktion. Der Avidin-Biotin-Komplex dient dabei der Signalverstärkung und führt so zu einer Steigerung der Sensitivität dieses Nachweisverfahrens.

An dieser Stelle wird allgemein das für die immunhistologischen Untersuchungen verwendete Protokoll dargestellt. Besonderheiten bei der Verwendung einzelner Primärantikörper sowie die Auswertung der gefärbten Schnitte werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Alle gewählten Primärantikörper wurden bereits erfolgreich im Rahmen immunhistologischer Untersuchungen am Plazentom (Anti-PR- und Anti-GR-Antikörper) bzw. an der interkarunkulären Unterwand (Anti-Cox II-Antikörper) trächtiger Rinder eingesetzt (SCHULER ET AL. 1999; BOOS ET AL. 2000; WEHBRINK ET AL. 2008).

Für immunhistologische Untersuchungen wurden 4 µm dicke Schnitte des formalinfixierten, paraffineingebetteten Plazentomgewebes auf Objektträger aufgebracht und 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte durch Inkubation in Xylol (2 x 4 min) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 2 x 2 min Inkubation in 100 %-igem, 96 %-igem und 70 %-igem Ethanol). Nach 5-minütigem Spülen mit kaltem Leitungswasser wurden die Schnitte 5 min bei Raumtemperatur in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 inkubiert. Es folgte ein 3 x 5-minütiges Kochen der Schnitte in der Mikrowelle bei 560 Watt. Dieser Schritt diente der Demaskierung durch die Fixation vernetzter Epitope. Nach dem Abkühlen der Schnitte für 20 min in Citratpuffer bei Raumtemperatur wurden sie erneut 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach folgte die Inaktivierung endogener Peroxidasen. Dazu wurden die Schnitte 30 min in 0,3 %-igem Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert und erneut 5 min in Immunocytochemistry (ICC)-Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte mit ca. 150 µl von in ICC-Puffer verdünntem Serum der Tierart überschichtet, von der auch der Sekundärantikörper stammte (siehe unten) und 20 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Aufbau einer Flüssigkeitsbarriere wurden die Schnitte mit einem Pap-Pen umfahren. Nach dem Abklopfen der Blockierungslösung und dem Trocknen der Pap-Pen-Umrandung mit fusselfreien Papiertüchern wurde der in ICC-Puffer verdünnte Primärantikörper (ca. 150 µl) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente ein nicht-spezifischer Antikörper des gleichen Isotyps, dessen Herkunftsspezies und Proteinkonzentration mit der des Primärantikörpers übereinstimmten. Nach Ablauf der Inkubationszeit (siehe unten) wurde die Primärantikörper-Lösung wieder abgeklopft, die Pap-Pen-Umrandung getrocknet und die Schnitte in ICC-Puffer gewaschen (5 min auf dem

Schüttler). Nun wurde der 1:200 verdünnte, biotinylierte Sekundäntikörper aufgetragen (ebenfalls ca. 150 µl) und 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer einwirken gelassen. Es folgte erneutes Waschen (5 min in ICC-Puffer auf dem Schüttler) und Trocknen und anschließend eine 30-minütige Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex. Nach erneutem 5-minütigem Waschen wurde die Substratlösung (Nova Red) aufgetragen. Nach einer bestimmten, vom verwendeten Primäntikörper abhängigen Zeit wurde die Farbreaktion gestoppt. Dazu wurden die Objektträger in Leitungswasser überführt und 10 min gespült. Anschließend wurden sie mit Hämatoxylin-Lösung (1:1 verdünnt mit destilliertem Wasser) 2 Sekunden gegengefärbt, weitere 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült und in einer ansteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 2 x 2 min 96 %-iges und 100 %-iges Ethanol, danach 2 x 3 min in Xylol). Schließlich wurden mittels Histokitt Deckgläser auf die Schnitte geklebt.

Allgemein wurde von jedem Tier der Schnitt eines Plazentoms beurteilt. Dabei wurden für alle am Gewebeschnitt beurteilten Parameter sowie für die entsprechenden Untersuchungen auf mRNA-Ebene dasselbe Plazentom verwendet. Die Auswertung sämtlicher immunhistologischer Untersuchungen erfolgte blind. Weder die Bezeichnung des Versuchstieres von dem der Schnitt stammte noch dessen Gruppenzugehörigkeit waren zum Untersuchungszeitpunkt bekannt.

Die Verfahren zur quantitativen Erfassung der Immunfärbung variierten in Anpassung an das Färbemuster des jeweiligen Zielmoleküls. Daher finden sich genaue Informationen zu den Auswertungsverfahren separat für die einzelnen Zielmoleküle in den folgenden Abschnitten.

3.3.2.2 Immunhistologischer Nachweis der Cox II

Färbeprotokoll:

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde 1,5 %-iges Ziegen Serum verwendet. Der Primäntikörper, ein monoklonaler Kaninchenantikörper gegen die Cox II der Ratte, wurde 1:200 in ICC-Puffer verdünnt und die Schnitte mit diesem eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Isotypenkontrolle wurde Kaninchen-IgG in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,1 µg/ml eingesetzt. Als Sekundäntikörper wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, 1:200

verdünnt in 1,5 %-igem Ziegen Serum, verwendet. Die Schnitte wurden 2,5 min mit Nova Red inkubiert.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Lichtmikroskops. Bei 100-facher Vergrößerung wurde die Signalintensität im Zytoplasma der UTC von Chorionplatte sowie von Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten in den folgenden drei Zonen des Plazentoms beurteilt: Zone I: basal (chorionplattennah); Zone II: intermediär; Zone III: apikal (karunkelstielnah) (Abbildung 7).

Die semiquantitative Evaluierung wurde nach dem von Ellenberger et al. (2008) beschriebenen Verfahren in modifizierter Form durchgeführt.

Es wurde der prozentuale Anteil negativer, schwach, mittelstark und stark positiver Zellen in jeder der definierten Lokalisationen geschätzt. Für jede der vier Signalintensitäten wurden vorher entsprechende Standards festgelegt und fotografisch dokumentiert. Durch Multiplikation der prozentualen Anteile mit einem zugehörigen Gewichtungsfaktor (Tabelle 1) und Division durch 100 wurde der sogenannte Immunoreactive score (IRS) berechnet. Der IRS liegt zwischen 0 (keine Signale) und 10 (alle Zellen stark positiv).

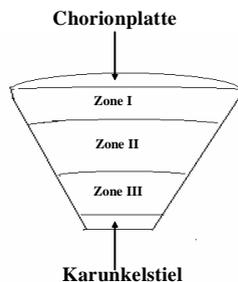


Abbildung 7: Einteilung des Plazentoms in Zonen (schematisch)

Tabelle 1: Intensitäten immunhistologischer Signale und deren Gewichtung

Signalintensität	Gewichtungsfaktor
negativ	0
schwach (+)	1
mittel (++)	5
stark (+++)	10

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung des Cox II-IRS in Abhängigkeit von der Lokalisation im Plazentom erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Aufgrund der asymmetrischen Verteilung der Daten wurden diese zunächst arcus-sinus-transformiert. Dadurch wurde eine annähernde Normalverteilung erreicht. Anschließend wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Lokalisation, unter Verwendung des Statistikprogramms BMDP2V, durchgeführt. Dabei wurden der Einfluss von Versuchsgruppe und Lokalisation sowie die Wechselwirkung zwischen beiden Faktoren (Gruppe x Lokalisation) überprüft. Bei signifikantem Resultat ($p \leq 0,05$) wurden die Gruppen paarweise verglichen. Dargestellt wurden die rücktransformierten Werte von $\bar{x} \pm SD$ (Median und Streubereich).

3.3.2.3 Immunhistologischer Nachweis des Glucocorticoidrezeptors

Färbeprotokoll:

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde mit 1,5 %-igem Ziegen Serum durchgeführt. Der verwendete, polyklonale Anti-GR-Antikörper stammte vom Kaninchen. Er war gegen ein synthetisches, vom N-Terminus des humanen Glucocorticoidrezeptors abgeleitetes Peptid, gerichtet. Nach Herstellerangaben detektiert dieser Antikörper sowohl den Ligand-gebundenen als auch den freien Rezeptor. Er wurde in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Die mit dem verdünnten Primärantikörper überschichteten Schnitte wurden 20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Als Isotypenkontrolle wurde nicht-spezifisches Kaninchen IgG in der gleichen Konzentration verwendet. Die abschließende Inkubation in Substratlösung dauerte 4,5 min.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung. Beurteilt wurde die Immunfärbung in den Kernen von TGC bzw. Karunkelepithelzellen. Es wurden jeweils fünf Querschnitte von Sekundär- oder Tertiärzotten in jeder der oben definierten Plazentomzonen ausgewertet. Dabei wurden wie unter 3.3.2.2 beschrieben negative, schwach, mittelstark und stark positive Zellen unterschieden und für jeden Zottenquerschnitt deren durch Auszählung ermittelten prozentualen Anteile mit den oben definierten Gewichtungsfaktoren multipliziert (Tabelle 1). Beim Durchmustern der Präparate ergab sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Färbemuster und den definierten Zonen im Plazentom. Daher wurden die IRS der einzelnen ausgewerteten Querschnitte eines Gewebeschnittes arithmetisch gemittelt und bei den folgenden Auswertungen auf eine Berücksichtigung der einzelnen Zonen verzichtet. Die Präparate der Normalgeburtsgruppe wurden rein deskriptiv beurteilt, da aufgrund der ausgeprägten prä- und intrapartal auftretenden histomorphologischen Veränderungen (unsichere Identifizierung der Karunkelepithelzellen, inhomogene Verteilung der verbliebenen TGC) eine Beurteilung nach dem beschriebenen Schema als nicht sinnvoll erschien.

Statistische Auswertung:

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) wurde der Einfluss der Versuchsgruppe überprüft. War dieser statistisch signifikant ($p \leq 0,05$), wurden die Gruppen paarweise unter Verwendung des Tukey-Kramer Tests verglichen.

Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert der Versuchsgruppe \pm Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$) dargestellt.

3.3.2.4 Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors

Färbeprotokoll:

Zunächst erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10 %-igem Pferdeserum. Zum Nachweis des Progesteronrezeptors wurde ein monoklonaler, muriner IgG_{2a}-Antikörper verwendet. Dieser ist gegen ein Epitop des hochkonservierten C-Terminus des Progesteronrezeptors gerichtet und erkennt somit die Rezeptorisoformen A und B. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in ICC-Puffer auf die Schnitte aufgetragen. Es erfolgte eine 45-minütige Inkubation

bei Raumtemperatur. Als nicht-spezifischer Isotypenkontrollantikörper wurde ein ebenfalls monoklonaler, irrelevanter muriner IgG_{2a} Antikörper eingesetzt. Als Sekundärintikörper diente ein biotinylierter Pferd-anti-Maus Antikörper. Die abschließende Inkubation mit der Substratlösung dauerte 6 min.

Auswertung:

Pro Schnitt wurden 500 Karunkelstromazellen bei 200-facher Vergrößerung in zufällig ausgewählten, gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilten Gesichtsfeldern beurteilt. Es wurde lediglich eine Unterscheidung zwischen positiven und negativen Zellkernen getroffen und der prozentuale Anteil Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellkerne berechnet.

Die statistische Auswertung entsprach dem unter 3.3.2.3 beschriebenen Verfahren.

3.4 Relative Quantifizierung der Trophoblastriesenzellen nach Lektin-Histochemie

3.4.1 Färbeprotokoll

Zur besseren Identifizierung der TGC wurde die Lektin-Histochemie unter Verwendung von biotinyliertem Phaseolus vulgaris-Leucoagglutinin (PHA-L) angewendet. Dieses markiert auch in späten Graviditätsstadien bzw. peripartal hochspezifisch die glykoproteinreichen Granula der TGC (KLISCH ET AL. 2006). Von den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden zum Entparaffinieren 4 min in Xylol inkubiert und anschließend zur Rehydrierung durch eine absteigenden Alkoholreihe (je 2 min in reinem, 96 %-igem, 80 %-igem und 70 %-igem Ethanol) geführt. Danach erfolgte ein 5-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser und ein 5-minütiges Waschen in ICC-Puffer.

Nun wurden die Objektträger mit Hilfe eines fusselfreien Papiertuchs getrocknet, die Schnitte mit einem PAP-Pen umrandet und mit biotinyliertem PHA-Lektin, 1:200 in ICC-Puffer verdünnt, überschichtet. Als Negativkontrolle wurde ICC-Puffer anstelle der Lektin-Lösung verwendet. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lektin-Lösung auf einem Papierhandtuch abgeklopft, die Objektträger 5 min in ICC-Puffer gewaschen, dann getrocknet und 30 min

mit Avidin-Biotin-Komplex überschichtet. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.3.2.1 beschrieben. Schließlich wurden die Schnitte für 4,5 min mit Nova Red-Substratlösung inkubiert und mit Histokitt Deckgläser auf die Schnitte geklebt.

3.4.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung. Von jedem Tier wurde der Schnitt eines Plazentoms beurteilt. Dazu wurden jeweils gefärbte und ungefärbte Trophoblastzellen von 20 Chorionzottenanschnitten gezählt und der prozentuale Anteil der TGC an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen bestimmt. Die Anschnitte wurden zufällig ausgewählt, wobei eine gleichmäßige Berücksichtigung aller Bereiche des Schnittes angestrebt wurde. Als PHA-L positiv wurden TGC bezeichnet, deren Färbung sich eindeutig von der Hintergrundfärbung abhob. In das Karunkelepithel eingewanderte TGC wurden ebenfalls mitgezählt.

Die statistische Auswertung entsprach dem unter 3.3.2.3 beschriebenen Verfahren.

3.5 Beurteilung des Karunkelepithelabbaus an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitten mittels Morphometrie

3.5.1 HE-Färbung

Zuerst erfolgte eine 20-minütige Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Inkubation je 5 min in 100 %-igem, 96 %-igem, 80 %-igem, 70 %-igem, 60 %-igem, 50 %-igem Ethanol). Nach einer 5-minütigen Inkubation in destilliertem Wasser (Aqua dest.) wurden die Schnitte 10 min in Hämatoxylin (nach Gill; 1:1 in Aqua dest.) gefärbt und anschließend 10 min in Leitungswasser gebläut. Danach wurden sie 5 min mit Eosin G gegengefärbt, mehrfach in Leitungswasser eingetaucht und kurz in 80 %-igem und 96 %-igem Alkohol gedippt.

Anschließend wurden die Schnitte zur Dehydrierung 2 x 2,5 min in absolutem Alkohol und 2 x 10 min in Xylol inkubiert. Schließlich wurde mit Histokitt ein Deckglas aufgeklebt.

3.5.2 Auswertung

Die Beurteilung des Karunkelepithe labbaus erfolgte quantitativ mittels Morphometrie. Die Auswertung fand lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung statt. Es wurden jeweils drei Sekundärzotten in jeder der drei oben definierten Plazentomzonen (Abbildung 7) ausgewertet. Dazu wurde mit Hilfe der Software Leica IM 1000 die auf den Chorionzottenquerschnitt entfallende Fläche (F2) und die von der Basalmembran des umgebenden Karunkelepithe ls eingegrenzte Fläche (F1) gemessen. Die Differenz (F1 – F2) entspricht somit der Karunkelepithe lfäche (Abbildung 8). Schließlich wurde der prozentuale Anteil der Karunkelepithe lfäche an der insgesamt von der Basalmembran des Karunkelepithe ls begrenzten Fläche berechnet. Dieser diente als Maß für die durchschnittliche Höhe des Karunkelepithe ls.

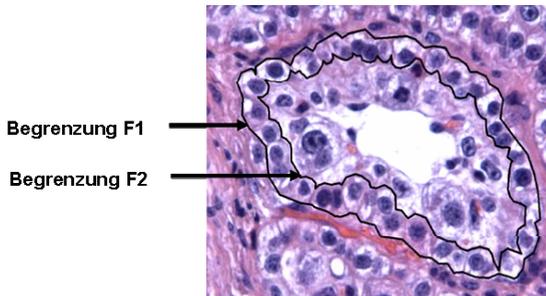


Abbildung 8: Bestimmung des relativen Anteils der Karunkelepithe lfäche an der insgesamt von der Basalmembran des Karunkelepithe ls begrenzten Fläche. Die Karunkelepithe lfäche (%) errechnet sich nach der Formel $(F1 - F2) \times 100/F1$.

Da der prozentuale Anteil der Karunkelepithe lfäche von Form und Flächeninhalt der Zotten bzw. Karunkelkrypten beeinflusst wird, wurden nur Querschnitte mit vergleichbarer Form und Flächengröße beurteilt.

Die ausgewählten Sekundärzottenquerschnitte waren durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

- rundlich bis ovale Gestalt
- Flächeninhalt von F1: $15000 \pm 5000 \mu\text{m}^2$
- mäßiger Anteil an fetalem Stroma; deutlich geringer als bei Primärzotten
- Ursprung aus Primärzotten bzw. annähernd senkrechte Orientierung zu diesen

Die statistische Auswertung entsprach dem unter 3.3.2.3 beschriebenen Verfahren.

3.6 Präparation der cDNA und qualitative RT-PCR

3.6.1 RNA-Isolierung

Die in Alufolie verpackten, tiefgefrorenen Gewebestücke wurden zunächst mit einem sauberen Hammer vorzerkleinert. Die darauf folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis unter Verwendung von vorgekühlten Reagenzien und Materialien durchgeführt. Kleinere Gewebestücke wurden nach Eröffnung der Aluminiumfolie in einen Mörser überführt und mit einem Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerpulvert.

Ungefähr 100 mg des Pulvers wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml Trizol[®] versetzt und mittels Ultraturrax homogenisiert. Danach wurden die Proben 10 min auf Eis belassen, 200 µl Chloroform (vorgekühlt bei -20 °C) zugegeben und nach einer fünfminütigen Ruhephase zentrifugiert (20000 g/15 min, 4 °C). Von den drei entstandenen Phasen wurde die obere transparente Schicht, welche die RNA enthielt, zur sofortigen Weiterverarbeitung abpipettiert. Es wurde ein zweites Mal 200 µl Chloroform zugegeben, 5 min gewartet und zentrifugiert (siehe oben). Der wässrige Überstand wurde mit etwa der gleichen Menge (300 – 400 µl) bei -20 °C vorgekühlten Isopropanols versetzt, geschüttelt und 30 min bei -20 °C stehen gelassen. Nach erneutem Schütteln folgte abermals eine Zentrifugation (20000 g/10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, während dem Pellet 500 µl 70 %-iges Ethanol (vorgekühlt bei -20 °C) zugesetzt wurden. Nach 10 min wurde zentrifugiert (20000 g/10 min, 4 °C) und der Überstand abermals verworfen. Dieser Ethanol-Waschschritt wurde wiederholt. Das gewonnene Pellet wurde 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und danach in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert (vortexen, Inkubation für 10 min im Wasserbad bei 70 °C, vortexen). Zusätzlich wurde der resuspendierten RNA 1 U/ml RNase-Inhibitor zugegeben.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Präparation 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt, in eine Kunststoffküvette überführt und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Weiterhin wurde die Reinheit der RNA-Präparation mit Hilfe des Photometers überprüft. Dabei sollte das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm bzw. 280 nm (E_{260}/E_{280}) bei sauberen RNA-Präparationen zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die RNA-Integrität wurde stichprobenartig anhand de-

naturierender Agarose-Gelelektrophoresen bestätigt. Intakte RNA wiesen zwei diskrete Banden bei 1,8 bzw. 4,8 kb (18S rRNA und 28S rRNA) auf.

Aus der Stammlösung wurde schließlich eine Arbeitsverdünnung von 100 ng/μl hergestellt, welche zur cDNA-Synthese benutzt wurde. Die restliche Stammlösung wurde bei –80 °C und die Arbeitsverdünnung bei –20 °C gelagert.

3.6.2 DNase-Behandlung

Um eine Verfälschung der Real-Time RT-PCR-Daten durch Amplifikation eventuell vorhandener, genomischer DNA zu vermeiden, wurde die gewonnene RNA mit DNase behandelt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde ein DNase-Mix hergestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des DNase-Mixes

Komponente	Volumen (einfacher Ansatz)	Stammlösung
MnCl ₂	1 μl	10 mM
PCR-Puffer	1 μl	10x
DNase I, RNase frei	1 μl	10 U/μl
RNase Inhibitor	0,25 μl	40 U/μl

Anschließend wurden jeweils 3,25 μl des DNase-Mixes mit 6,65 μl der RNA-Arbeitsverdünnung gemischt und in einem Thermocycler nach dem in Tabelle 3 aufgeführten Programm behandelt.

Tabelle 3: Programm für die DNase-Behandlung

Temperatur	Dauer
37 °C	10 min
75 °C	5 min
4 °C	bis zur Weiterverarbeitung

Da DNase-behandelte RNA sehr instabil ist, wurde die Reverse Transkription unmittelbar im Anschluss durchgeführt.

3.6.3 Reverse Transkription (RT)

Die Synthese eines komplementären DNA-Strangs (cDNA) aus der DNase-behandelten RNA (Reverse Transkription) erfolgte nach dem vom Hersteller des verwendeten RT-PCR Core Kits empfohlenen Protokoll. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis statt.

Zunächst wurde ein RT-Mastermix hergestellt (Tabelle 4). Davon wurden pro Ansatz jeweils 8,5 µl mit 1,5 µl DNase-behandelter RNA gemischt und schließlich im Thermocycler nach dem in Tabelle 5 aufgeführten Programm behandelt. Anschließend wurde die gewonnene cDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des RT-Mastermixes

Komponente	Volumen (einfacher Ansatz)	Stammlösung
MgCl ₂	2 µl	25 mM
PCR-Puffer	1 µl	10x
dNTP-Mix	4 µl	10 mM
Random Hexamers	0,5 µl	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5 µl	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl	50 U/µl

Tabelle 5: Programm für die Reverse Transkription (RT)

Temperatur	Dauer
21 °C	8 min
42 °C	15 min
99 °C	5 min
5 °C	5 min
4 °C	bis zur Entnahme

3.6.4 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Funktionalität der für die Realtime RT-PCR verwendeten Primerpaare zu überprüfen und die Bildung eines Produkts mit der erwarteten Größe zu bestätigen, wurde zunächst eine konventionelle PCR durchgeführt. Dabei wurde als Probenmaterial die gepoolte cDNA aller zu untersuchenden Proben (repräsentative Mischprobe) eingesetzt.

Zunächst wurde ein Primermix (Tabelle 7) hergestellt, welcher sich aus einem Prämix (Tabelle 6), dem jeweils genspezifischen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer und einer thermostabilen DNA-Polymerase zusammensetzte.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Prämixes

Komponente	Volumen (einfacher Ansatz)	Stammlösung
MgCl ₂	2 µl	25 mM
PCR- Puffer	4 µl	10x
Aqua bidest. autoklaviert	32,75 µl	-

Tabelle 7: Zusammensetzung des Primermixes

Komponente	Volumen (einfacher Ansatz)	Stammlösung
Prämix	38,75 µl	-
Vorwärtsprimer	0,5 µl	10 pmol/µl
Rückwärtsprimer	0,5 µl	10 pmol/µl
GOLD AmpliTaq	0,25 µl	5 U/µl

Pro Ansatz wurden jeweils 40 µl des Primermixes mit 10 µl cDNA gemischt und nach dem in Tabelle 8 aufgeführten Protokoll im Thermocycler inkubiert.

Tabelle 8: PCR-Protokoll

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung der cDNA und Aktivierung der GOLD AmpliTaq	95 °C	10 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	39 Wiederholungen
Primer-Hybridisierung	60 °C	2 min	
Elongation	72 °C	1,5 min	
finale Elongation	72 °C	10 min	
bis zur Entnahme	4 °C		

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (siehe Abschnitt 3.11), basierend auf bereits bekannten rinderspezifischen Nukleotidsequenzen, selbst entwickelt bzw. es wurde auf bereits publizierte Primerpaare zurückgegriffen (Tabelle 9). Um die Spezifität der Primerpaare für das entsprechende Gen zu gewährleisten, erfolgte ein Sequenzabgleich mit dem bovinen Genom mittels BLAST. Die Synthese der Primer wurde von Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien) durchgeführt.

In Negativkontrollen wurde bei der DNase-Behandlung (siehe Abschnitt 3.6.2) anstelle einer RNA-Präparation DEPC-behandeltes Wasser eingesetzt. Diese Ansätze wurden in den folgenden Schritten wie die eigentlichen Proben behandelt.

Tabelle 9: In der PCR verwendete Primer und Größe der entsprechenden PCR-Produkte in Basenpaaren (bp).

Gen	Primersequenz (5'→3')	Produktgröße	Accession-Nr. bzw. Referenz
GAPDH	forward: GCGATACTCACTCTTCTACCTTCGA reverse: TCGTACCAGGAAATGAGCTTG AC	82 bp	U85042
β-Aktin	forward: TATTGCTGCGCTCGTGGTCG reverse: TGACGATGCCGTGCTCAATGG	218 bp	NM_173979
GR	forward: GGAATGAGACCAGACGTAAGTTCTC reverse: GAGCAGACTAGGCAGAGTTTGGGA	83 bp	AY238475
PR	forward: GAGAGCTCATCAAGGCAA TTGG reverse: CACCATCCCTGCCAATATCTTG	227 bp	Pfaffl et al. (2002)
Cox II	forward: GCACAAATCTGATGTTTGCATTC reverse: GGTCTCGTTCAAATCTGTCT	77 bp	Schuler et al. (2005)

3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten

Zur Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte wurde eine Elektrophorese in einem 2 %-igem Agarosegel durchgeführt. Dazu wurde 1 g Agarose in 50 ml 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer in einer Haushalts-Mikrowelle bei 560 Watt kurz aufgekocht und vollständig gelöst. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf 60 – 80 °C wurden 5 µl einer 1 %-igen SYBR Green I-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde gemischt und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Zur Bildung von Geltaschen wurde ein 10-zähliger Gelkamm eingesetzt. Das Gel wurde bis zum Erstarren (ca. 45 min) ausgekühlt. Nach dem Entfernen des Kamms wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x TAE-Puffer bis ca. 0,5 cm oberhalb des Gels aufgefüllt. Zur Markierung und Erhöhung der Dichte wurden je 12 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Als Größenmarker wurden 2 µl einer DNA-Ladder (50 bp-2000 bp) unter Zusatz von 2 µl Ladepuffer und 8 µl autoklaviertem Wasser verwendet. Anschließend wurden die

Proben der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt (40 min, 125 V). Die Visualisierung des an die Proben-DNA gebundenen SYBR Green I erfolgte mittels UV-Licht (312 nm) im Transluminator. In allen Fällen war jeweils nur eine spezifische Bande mit der erwarteten Produktgröße (Tabelle 9) nachweisbar (Abbildung 9).

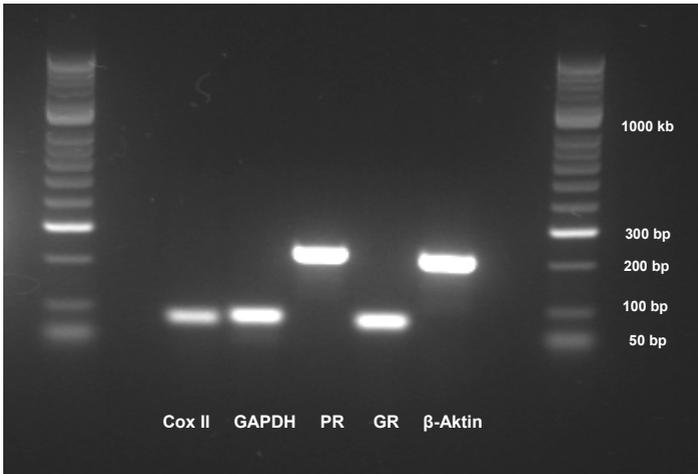


Abbildung 9: Nachweis spezifischer RT-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. Die eingesetzte cDNA stammte aus einer repräsentativen Mischprobe aller zu untersuchenden cDNA-Proben.

3.7 Quantitative RT-PCR

3.7.1 Allgemeines zur Real-Time RT-PCR (SYBR Green-Methode)

Die Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene erfolgte in dieser Arbeit mittels Real-Time RT-PCR unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I. SYBR Green I bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ($\lambda = 497 \text{ nm}$) emittiert der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex grünes Licht ($\lambda = 520 \text{ nm}$). Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Konzentration des PCR-Produkts. Sie wird am Ende jedes Amplifikationsschritts von der entsprechenden Messeinrichtung des Lightcyclers erfasst. Die SYBR Green-Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und eine relativ geringe Spezifität aus. Um die Spezifität der SYBR Green-Methode zu gewährleisten, muss diese durch ergänzende Untersuchungen bestätigt

werden. Neben der Darstellung eines spezifischen Reaktionsproduktes in der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.6.5), ist die Schmelzkurvenanalyse eine einfache, dazu geeignete Methode. Hierbei werden die doppelsträngigen PCR-Produkte durch kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Jedes Produkt ist durch eine spezifische, sequenz- und größenabhängige Schmelztemperatur gekennzeichnet. Der Schmelzpunkt eines Produkts ist dabei definiert als Hochpunkt der negativen Ableitung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur. Der Schmelzpunkt unspezifischer Primer-Dimere ist niedriger als der des spezifischen Produkts. Unter Verwendung eines validen Primerpaares sollte ein PCR-Produkt entstehen, dessen Schmelzkurve einen einheitlichen, deutlich abgegrenzten Peak aufweist. Mehrere Peaks lassen erkennen, dass mehr als ein Amplifikationsprodukt erzeugt wurde.

3.7.2 Auswertung der Daten aus der Real-Time RT-PCR

Die Quantifizierung basiert auf dem vom Realtime-PCR-Gerät gemessenen Ct-Wert. Der Ct-Wert (Threshold Cycle) entspricht dem Zyklus, bei dem die Signalintensität erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt und ist antiproportional zum Logarithmus der Produktkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine effizienzkorrigierte, relative Quantifizierung der mRNA-Expression durchgeführt. Die Auswertung erfolgt in Anlehnung an die von Pfaffl (2001) sowie Vandesompele et al. (2002) beschriebenen Modelle unter Verwendung der Bio-Rad CFX Manager Software.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens zunächst mit Hilfe eines nicht regulierten, konstitutiv exprimierten Referenzgens („Housekeeping Gene“) normalisiert. Durch diese Normalisierung werden äußere Einflussfaktoren wie unterschiedliche RNA-Ausgangskonzentrationen oder unterschiedliche Ausbeuten bei der Reversen Transkription relativiert. Da die Referenzgene jedoch unter bestimmten Bedingungen auch reguliert werden können, sollten im Idealfall zur Normalisierung mehrere davon eingesetzt werden (VANDESOMPELE ET AL. 2002). In dieser Arbeit wurden GAPDH und β -Aktin als Referenzgene verwendet.

Letztendlich wird nach Normalisierung gegen ein oder mehrere Referenzgene die Expression des Zielgens („Target Gene“) in den Proben, relativ zu der Expression des Zielgens in einer beliebig festgelegten Probe (Kalibrator), ermittelt. Wie in der

vorliegenden Arbeit praktiziert, wird als Kalibrator häufig die Probe mit dem höchsten Ct-Wert, d.h. der niedrigsten gemessenen Expression verwendet.

Da es lediglich im Idealfall zu einer exakten Verdopplung des PCR-Produktes nach jedem Zyklus kommt, was einer Effizienz 100 % entspräche, wurde in dieser Arbeit eine Effizienzkorrektur durchgeführt (PFAFFL 2001). Dazu wurde zunächst mittels „Standardkurve“ eine für jedes Primerpaar spezifische Effizienz ermittelt. Die Effizienz E lässt sich mit Hilfe der Geradensteigung m einer „Standardkurve“ berechnen (siehe Abschnitt 3.7.4.2).

Es gilt:

$$E = 10^{(-1/m)} = (\% \text{ Effizienz} \times 0,01) + 1;$$

$$\% \text{ Effizienz} = (E-1) \times 100$$

Im Fall einer 100 %-igen Effizienz beträgt E folglich 2.

Die Effizienz sollte zwischen 90 % und 110 % liegen, was einer Geradensteigung m zwischen -3,58 und -3,1 entspricht (eurogentec).

Schließlich wurde die relative Genexpression (Ratio, RGE) unter Berücksichtigung der Effizienz des Primerpaares ermittelt.

Die RGE wird wie folgt errechnet:

$$RGE_{\text{Target}} = E_{\text{Target}}^{(Ct(\text{Kalibrator}) - Ct(\text{Probe}))}$$

Zur Normalisierung wird ein Normalisierungsfaktor (NF) verwendet. Der NF entspricht dem geometrischen Mittelwert der relativen Expression aller verwendeten Referenzgene in einer bestimmten Probe.

Es gilt:

$$RGE_{\text{normalisiert}} = RGE_{\text{Target}} / \text{NF}$$

Dementsprechend wird der NF bei Verwendung der beiden Referenzgene GAPDH und β -Aktin wie folgt berechnet:

$$NF = (RGE_{GAPDH} \times RGE_{\beta\text{-Aktin}})^{\frac{1}{2}}$$

3.7.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR wurden als relative Genexpression in Bezug zu der Probe mit der niedrigsten Genexpression ($RGE=1$) angegeben. Die vorgesehenen statistischen Auswertungen setzten eine Normalverteilung der Messwerte voraus. Für eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels etablierter, statistischer Verfahren waren die Gruppengrößen jedoch zu gering. Da die Daten aus dem hier angewendeten Real-Time RT-PCR-Verfahren erfahrungsgemäß häufig rechtsschief verteilt sind, wurden die gemessenen RGE-Werte zunächst logarithmisch transformiert. Zur Prüfung des Einflusses der Versuchsgruppen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt. Lag ein signifikanter Einfluss vor ($p \leq 0,05$) wurden die Gruppen paarweise mittels Tukey-Kramer-Test verglichen.

Zur Ergebnisdarstellung wurde der geometrische Mittelwert (X_g) x Streufaktor (SF)⁺¹ verwendet.

3.7.4 Durchführung der Real-Time RT-PCR

3.7.4.1 Protokoll

Zunächst wurden für jedes Primerpaar Reaktionsansätze mit der in Tabelle 10 aufgeführten Zusammensetzung vorbereitet. Dabei wurde berücksichtigt, dass jede Probe im Doppelansatz (Studien zur Genexpression) bzw. Dreifachansatz („Standardkurven“) gemessen werden sollte.

Jeweils 19 μ l des Reaktionsansatzes und 1 μ l cDNA-Lösung wurden in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde eine Präparation verwendet, bei der zur Reversen Transkription autoklaviertes, bidestilliertes Wasser anstelle der RNA-Präparation eingesetzt wurde. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis statt. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und nach dem in Tabelle 11 aufgeführten Programm behandelt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR (pro Reaktion)

Komponente	Volumen (einfacher Ansatz)
iQ SYBR Green Supermix	10 µl
Aqua bidest. autoklaviert	7,8 µl
Vorwärtsprimer 5 µM	0,6 µl
Rückwärtsprimer 5 µM	0,6 µl
cDNA(aus RNA 100 ng/µl)	1µl

Tabelle 11: Programm für die qPCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	39 Wiederholungen
Primer-Hybridisierung und Elongation	60 °C	1 min	

Um die Spezifität der Primerpaare zu überprüfen, wurde nach der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (siehe Abschnitt 3.7.1). Dazu wurde die Temperatur kontinuierlich in 0,5 °C Schritten (alle 5 Sekunden) von 65 °C auf 95 °C erhöht und begleitend die Stärke des Fluoreszenzsignals gemessen.

3.7.4.2 Erstellung von Standardkurven zur Berechnung der Effizienzen

Zur Erstellung der „Standardkurven“ wurde ein Pool aus allen zu untersuchenden cDNA-Proben (repräsentative Mischprobe) hergestellt und eine Verdünnungsreihe der gepoolten cDNA, bestehend aus fünf Verdünnungsstufen (unverdünnt; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000), angefertigt. Wurden die Ct-Werte der jeweiligen Verdünnungsstufe gegen den Logarithmus der relativen Ausgangskonzentration aufgetragen, erhielt man eine Gerade („Standardkurve“). Anhand der Geradensteigung wurde mit Hilfe der Bio-Rad CFX Manager Software die Effizienz ermittelt. Für die

verwendeten Primer-Systeme ergaben sich die in Tabelle 12 aufgeführten Effizienzen:

Tabelle 12: Mittels „Standardkurven“ ermittelte Effizienzen der PCR-Reaktionen für die Zielgene Cyclooxygenase II (Cox II), Glucocorticoidrezeptor (GR), Progesteronrezeptor (PR) sowie die beiden Referenzgene GAPDH und β -Aktin.

Gen	Effizienz	Effizienz (%)
Cox II	1,99	99,0
GR	1,982	98,2
PR	1,937	93,7
GAPDH	1,993	99,3
β -Aktin	1,974	97,4

3.8 Bestimmung der Steroidhormonkonzentrationen im maternalen Blutplasma mittels Radioimmunoassay (RIA)

Die radioimmunologische Bestimmungen der Konzentrationen von Progesteron (HOFFMANN ET AL. 1973a), Estron (GENTZ 1994; HOFFMANN ET AL. 1996), Estronsulfat (GENTZ 1994; HOFFMANN ET AL. 1996) und Estradiol-17 β (KLEIN ET AL. 2003) erfolgten im endokrinologischen Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen nach etablierten Messverfahren mit internen und externen Qualitätskontrollen.

3.9 Bestimmung der 13, 14-Dihydro-15-Keto-PGF_{2α} (PGFM)-Konzentration im maternalen Plasma mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.9.1 Allgemeines

Eigentliches Ziel der Untersuchungen war die Erfassung der PGF_{2α}-Profile im maternalen Blutplasma, um diese in Bezug auf andere Faktoren der zur Geburt führenden Signalkaskade und in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe auszuwerten.

Da die PGF_{2α}-Analytik jedoch mit erheblichen Schwierigkeiten behaftet ist (kurze Halbwertszeit des Analyten, lokale PGF_{2α}-Produktion nach Gefäßpunktion), wurde in den eigenen Untersuchungen der stabile Hauptmetabolit 13,14-Dihydro-15-Keto-PGF_{2α} (PGFM) erfasst.

3.9.2 Prinzip des ELISAs

Die PGFM-Konzentration wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Testkits durchgeführt. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Test fungierte ein Acetylcholinesterase-PGFM-Konjugat als Tracer. Tracer und freies PGFM konkurrierten um die Bindungsstellen eines vom Kaninchen gewonnenen PGFM-Antiserums. Die verwendeten 96-Well-Platten waren bereits mit monoklonalem Maus-anti-Kaninchen-IgG beschichtet. Das als Substratlösung eingesetzte Ellmans-Reagenz enthielt das eigentliche Substrat der Acetylcholinesterase – Acetylthiocholin – sowie 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure). Das nach enzymatischer Hydrolyse aus Acetylthiocholin entstandene Thiocholin band kovalent an die 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), wodurch ein gelbes Farbsignal erkennbar wurde.

3.9.3 Durchführung

Die Vorbereitung der verwendeten Puffer, Reagenzien und der Standards erfolgte nach Herstellerangaben. Die in jedem Test mitgeführte Standardkurve umfasste acht Punkte mit PGFM-Konzentrationen von 2,3 – 5000 pg/ml. Entgegen der Herstellerempfehlung wurde der Test in der vorliegenden Arbeit ohne chromatographische Vorreinigung der Proben durchgeführt.

Neben den Proben und den Standards wurden in jedem Test auch die Bezugspunkte Blank-Wert, die nichtspezifische Bindung (NSB), die totale Aktivität (T_A) und die maximale Bindung (B_0) mitgeführt. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 13 aufgeführt. Als Blank-Wert wurde die Hintergrundabsorption des Ellmans-Reagenz gemessen. Die Ansätze für T_A zeigten die totale enzymatische Aktivität des Acetylcholinesterase-gekoppelten Tracers an und dienen der Bestätigung der Funktionsfähigkeit der Substratlösung. Die Ansätze für NSB geben Informationen über das Hintergrundsignal, welches aus unspezifischen Bindungen des Tracers an die Wände der Wells in Abwesenheit des spezifischen Antikörpers resultiert. Das Signal in den Ansätzen für B_0 resultiert aus der maximalen Menge an Tracer, die vom spezifischen Antikörper in Abwesenheit des Analyten gebunden werden kann.

Die zu untersuchenden Plasmaproben wurden mit dem im Testkit enthaltenen ELISA-Puffer 1:5 verdünnt eingesetzt. Alle Proben, Standardkurvenpunkte sowie die Ansätze für NSB, T_A und Blank wurden im Doppelansatz, der B_0 -Wert im Dreifachansatz bestimmt. Zunächst wurden die einzelnen Komponenten nach dem in Tabelle 13 aufgeführten Pipettierschema in die entsprechenden Wells einpipettiert. Nach Verschluss der Wells mit einer Plastikfolie wurden die Mikrotiterplatten 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Wells geleert und fünfmal mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 200 µl der unmittelbar vor Gebrauch angesetzten Substratlösung (Ellmans-Reagenz) in jedes Well pipettiert. Den T_A -Ansätzen wurden zusätzlich 5 µl Tracer zugefügt. Die Platte wurde abermals mit einer Plastikfolie verschlossen und ca. 90 min im Dunkeln entwickelt. Mit Hilfe eines ELISA-Readers wurde die optische Dichte bei 405 nm bestimmt.

Tabelle 13: Pipettierschema des angewendeten ELISA zur Messung der PGFM-Konzentrationen in Rinderplasma-proben

		ELISA-Puffer	Proben/Standards	Tracer	Anti-serum
Ansatz	Blank (nur Substratzugabe)	-	-	-	-
	Totale Aktivität (T_A)	-	-	5 μ l (nach Substratzugabe)	-
	Nichtspezifische Bindung (NSB)	100 μ l	-	50 μ l	-
	Maximale Bindung (B_0)	50 μ l	-	50 μ l	50 μ l
	Standardkurvenpunkte bzw. Proben*	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l

* 1:5 verdünnt mit ELISA-Puffer

3.9.4 Auswertung

Die Berechnung der PGFM-Konzentrationen in den Proben erfolgte mit Hilfe der Software des verwendeten ELISA-Readers. Zunächst wurde die Hintergrundabsorption (Blank) von der in den restlichen Wells gemessenen Absorption subtrahiert. Dann wurde die Differenz von B_0 und NSB ermittelt. Sie entspricht dem korrigierten B_0 (B_0 korrigiert). Anschließend wurden für die Standardkurvenpunkte und die Proben die Absorptionsrate ($\%B/B_0$) ermittelt, welche das Signal in Relation zu B_0 angibt. Sie errechnet sich mit der folgenden Formel:

$$\%B/B_0 = (S - NSB) \times 100 / (B_0 \text{korrigiert}),$$

wobei S die Absorption der Probe bzw. des Standards darstellt.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden die Absorptionsraten der Standards gegen den Logarithmus der PGFM-Konzentration aufgetragen. Es resultierte eine lineare Standardkurve (linear-log Plot). Nun konnten anhand der Standardkurve und der

Absorptionsrate der Proben die entsprechenden PGFM-Konzentrationen bestimmt werden.

3.9.5 Validierung des ELISAs für die Bestimmung der PGFM-Konzentrationen in Rinderplasma

Die Arbeiten zur Validierung des ELISA-Kits hinsichtlich der direkten Messung der PGFM-Konzentrationen in verdünnten Rinderplasmaproben wurden von Frau Tierärztin Susanne Preißing parallel zu den eigenen Untersuchungen durchgeführt. In deren Dissertationsschrift (Preißing 2012, in Vorbereitung) finden sich detaillierte Angaben zur Testevaluierung. Diese Untersuchungen ergaben, dass mit dem Verfahren reproduzierbare Messungen mit akzeptabler Präzision möglich waren (Intra-assay-Variationskoeffizient bei einer PGFM-Konzentration von $5,45 \pm 0,40$ ng/ml: 7,3 %. Interassayvariationskoeffizient: 16,3 % bzw. 20,2 % bei PGFM-Konzentrationen von $1,61 \pm 0,26$ ng/ml bzw. $4,44 \pm 0,90$ ng/ml).

3.10 Reagenzien, Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterial

3.10.1 Primärantikörper

- Anti-Cox II-Antikörper: monoklonaler Kaninchenantikörper, Typ IgG, Klon SP21, gegen die C-terminale Region des Cox II-Proteins der Ratte (Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA)
- Anti-Glucocorticoidrezeptor-Antikörper: polyklonaler Kaninchenantikörper vom Typ IgG, gegen die N-terminalen Aminosäuren 346 – 367 des humanen Glucocorticoidrezeptors gerichtet, Katalognummer PA1-511A (Affinity BioReagents, Golden, USA)
- Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper: muriner, monoklonaler IgG_{2a}-Antikörper, Klon 10A9, gegen die hochkonservierten C-terminalen Aminosäuren 922 – 933 des humanen Progesteronrezeptors gerichtet (Dianova-Immunotech, Hamburg)

3.10.2 Sekundärantikörper

- Biotinylierter Pferd-anti-Maus-IgG Antikörper (IgG, Vector Laboratories, Burlingame, USA)

- Biotinylierter Ziege-anti-Kanichen IgG Antikörper (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA)

3.10.3 Isotypenkontrollantikörper

- Kaninchen IgG, Produktnummer I -1000 (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Monoklonaler, muriner IgG_{2a}-Antikörper, Klon MRC OX-34 (LINARIS, Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen)

3.10.4 Seren zur Blockierung unspezifischer Bindungen in der Immunhistologie

- Pferdeserum, hitzeinaktiviert 30 min bei 55 °C (eigene Herstellung)
- Ziegenserum (aus VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA)

3.10.5 Puffer und Lösungen

10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für die Mikrowellenbehandlung von Gewebeschnitten:

Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure)

$C_6H_8O_7 \times 2H_2O$	21,01 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Stammlösung B (0,1 M Trinatriumcitrat):

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$	29,41 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua dest.	450 ml

DEPC-Wasser (0,1 %-ig):

DEPC	1 ml
Aqua dest.	1000 ml

12 h bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren

Eosin G-Lösung (1 %-ig) für die Histologie:

Eosin G	1 g
Aqua dest.	100 ml
Eisessig	1 Tropfen

Formaldehyd 4 %-ig, gepuffert, pH 7,4 (Formol nach Lillie) für die Gewebekonservierung:

Formaldehydlösung (40 %-ig)	500 ml
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	20 g
Na ₂ HPO ₄	32,5 g
Aqua dest.	ad 5000 ml

ICC-Puffer pH 7,2-7,4 für die Immunhistologie:

Na ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCL	0,2 g
NaCl	8,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Nach pH Kontrolle Zugabe von 3 ml Triton X-100.

Methanolische H₂O₂-Lösung 0,3 %-ig:

H ₂ O ₂ -Lösung 30-ig	2 ml
Methanol reinst	200 ml

PBS pH 7,2 zur Aufbewahrung der Plazentome während des Transports sowie zum Waschen des Gewebes nach Formalinfixierung:

5x Stammlösung:

NaCl	41 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	11 g

KH ₂ PO ₄	2,75 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

1 x Gebrauchslösung:

5 x PBS	200 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

TAE-Puffer pH 8 für die Gelelektrophorese:

10x Stammlösung:

Tris Base	48,4 g
0,5 M EDTA	20 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

1x Gebrauchslösung:

10x TAE	100ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

3.10.6 Reagenzien und Kits

- 13,14-Dihydro-15-Keto Prostaglandin F_{2α} ELISA Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA)
- ABC-System: VECTASTAIN® PK-6101 Rabbit IgG Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, US)
- Agarose FineRes (Bioline GmbH, Luckenwalde)
- Aglepriston (Alizin®, Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe)
- Chloroform (Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- Di-Natriumhydrogenphosphat, reinst (Merck KGaA, Darmstadt)
- EDTA-Dinatrium-Dihydrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Eosin G (Merck KGaA, Darmstadt)
- Ethanol 99,6 %-ig, DAB 10 (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
- Formaldehydlösung 37 %-ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystem, Foster City, USA)
- Hämatoxylin modifiziert nach Gill (Merck KGaA, Darmstadt)
- Histokitt (Assistent, Osterode)

- Isopropanol (Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt)
- Kaliumhydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)
- Loading Dye 6x (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumchlorid (Fluka, Neu-Ulm)
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Nova Red Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin, biotinyliert (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Quantitas 50 bp-2kb DNA Leiter (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- RNase Inhibitor, 40 U/µl (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- SYBR[®] Green I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- Trinatriumcitrat-dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)
- Triton X-100 (Serva, Heidelberg)
- TRIZMA[®] Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
- TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen GmbH, Darmstadt)
- Ultra pure water EIA Grade (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, Frankreich)
- Wasserstoffperoxid 30 %-ig (Merck KGaA, Darmstadt)
- Xylol (Merck KGaA, Darmstadt)
- Zitronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

3.10.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- CFX 96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Dako-Pen (Dako Deutschland GmbH, Hamburg)
- Einbettautomat (Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg)
- Elektrophoresekammer Agagel Mini (Biometra GmbH, Göttingen)
- Eppendorf Biophotometer (Eppendorf, AG Hamburg)
- Eppendorf Reference[®] Variopipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, AG Hamburg)

- Geldokumentation UV solo (Biometra GmbH, Göttingen)
- Haushaltsmikrowelle Compact Y50 (Moulinex GmbH, Solingen)
- Heraeus Minifuge (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Kimberly-Clark Professional Präzisionswischtücher (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Magnetrührer MR2002 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim)
- Microplate Reader MRXe (Dynex Technologies, Chantilly, USA)
- Microseal[®] PCR-Klebefolien (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Microtomklingen Leica DB 80L (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar)
- MilliQ Laborwasseraufbereitungsanlage, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn)
- Mikroskop Leitz DMRM mit Digitalkamera Leica DC300 und Leica IM Software
- N-DEX Nitril-Handschuhe (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Paraffinausgießstation Histoembedder EG 1160 (Leica Instruments GmbH, Nußloch).
- Parafilm[®] (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- PCR SoftTubes, 0,5 ml (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Pipettenspitzen mit Filter; RNase-, DNA- und Pyrogen- frei; 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- (Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe)
- pH-Meter Inolab (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Pipettenspitzen Ratiolab, 100 µl, 1000 µl (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Pipettenspitzen 10 µl (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße 2 ml, DNase, RNase, pyrogenfrei (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf)
- Rotationsmikrotom RM 2125 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar)
- Sarstedt-Monovette[®] EDTA KE; 9 ml (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
- Schüttler Heidolph Polymax 1040 (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Superfrost Plus Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig)
- THERMO-FAST[®] 96-Well PCR-Platte- (Thermo Fisher Scientific, Hamburg)
- T1 Thermocycler 48 (Whatmann Biometra GmbH, Göttingen)
- Tuttnauer Systec Autoklav 3850 ELC (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg)
- Ultra-Turrax[®] T-8 Dispergierwerkzeug S8 n-5g (IKA-Werke GmbH, Staufen)

- UniGloves® Latex-Untersuchungshandschuhe, puderfrei (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- UV-Einmalküvetten Uvette® 220-1600 nm (Eppendorf, AG Hamburg)
- Vortexer Heidolph REAX control (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf)
- Waage Mettler PJ 300 F.Nr. 33650 (Mettler Toledo, Gießen)
- Wärmeschrank Typ 3-26 (Memmert, Schwabach)
- Zentrifuge Micra 22R (Hettich GmbH, Tuttlingen)

3.11 Verwendete Software

- Bio-Rad CFX Manager Software 1.6: Auswertung der Real-Time RT-PCR-Daten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- GraphPad InStat 3 Software Inc.: einfaktorielle Varianzanalysen (San Diego, USA)
- Leica IM 1000 Software: Morphometrie (Leica GmbH, Bensheim)
- Primer-BLAST: Design von Primern für die Real-Time PCR und Sequenzabgleich gegen das bovine Genom (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)
- Primer Express Software TaqMan PCR, Version 2.0: Design von Primern für die Real-Time RT-PCR (Applied Biosystem, Forster City, USA)
- Revelation Software Version 4,25 (Dynex Technologies, Chantilly, USA): Auswertung der mittels ELISA ermittelten Daten

4. ERGEBNISSE

4.1 Klinische Beobachtungen

Ab dem zweiten Behandlungstag waren bei zwei der mit Aglepriston behandelten Tiere eine deutliche Anbildung des Euters und eine Milchfüllung der Zitzen erkennbar. Die dritte Kuh dieser Gruppe hatte bereits zum Zeitpunkt der Aufstallung (ungefähr zwei Wochen vor Versuchsbeginn) ein ausgeprägtes Euterödem, so dass behandlungsbedingte Veränderungen nicht eindeutig erkennbar waren.

Die Körpertemperatur bewegte sich vor Behandlungsbeginn mit 38,2 bis 39,1 °C bei allen drei Kühen innerhalb des Normbereichs spätgravider Kühe (Abbildung 10). 20 – 30 Stunden nach der ersten Aglepristonbehandlung kam es über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden zu einer vorübergehenden Reduktion der Schwankungsbreite und zu einem geringgradigen Abfall der mittleren Körpertemperatur. So betrug diese in dem Zeitraum zwischen den beiden Aglepristonbehandlungen 38,6 °C. Dagegen wurden am zweiten Behandlungstag um durchschnittlich 0,2 °C niedrigere Werte ($38,4 \pm 0,1$ °C) gemessen. In den ersten Tagen nach der Geburt kam es bei allen drei Tieren der Versuchsgruppe zu einem Anstieg der Körpertemperatur bis in den subfebrilen (ca. 39,1 – 39,5 °C) bzw. febrilen Bereich (> 39,5 °C).

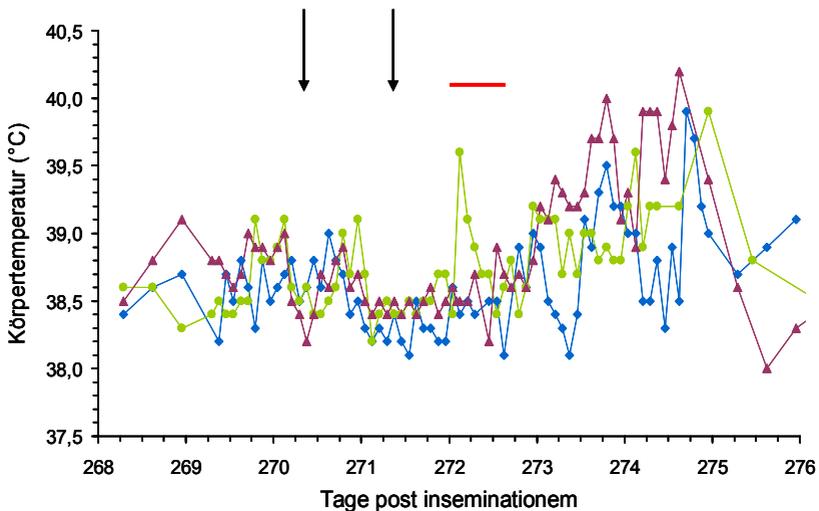


Abbildung 10: Verlauf der Körpertemperatur bei drei Kühen, die am 270. und am 271. Tag post inseminationem mit Aglepriston behandelt wurden.
 roter Balken: Zeitraum, in dem der Auszug der Kälber erfolgte
 schwarze Pfeile: Zeitpunkt der Aglepristonbehandlung

Erste Geburtsanzeichen traten $46,3 \pm 6,0$ Stunden nach Behandlungsbeginn auf. Die Tiere wurden unruhig und hoben die Schwanzwurzel an. Die Zervix war zu diesem Zeitpunkt vollständig geöffnet. In der Folgezeit konnte ein in Frequenz und Intensität zunehmender Einsatz der Bauchpresse beobachtet werden. Lediglich bei einer Kuh waren kurzzeitig die Fruchtblasen in der Schamspalte zu sehen. Ein Blasensprung und ein Abgang der Fruchtwässer fanden jedoch nicht statt. Die Tiere wurden zunehmend nervös. Sie legten sich wiederholt hin und standen wieder auf, traten sich gegen den Bauch und äußerten Unbehagen ausdrückende Laute. Ein weiterer Fortschritt der Geburt fand, offensichtlich bedingt durch eine mangelhafte Aktivität des Myometriums (Wehenschwäche), nicht statt. Etwa zwei Stunden nach Feststellung einer vollständig geöffneten Zervix ($48,5 \pm 7,3$ Stunden nach Behandlungsbeginn) erfolgte ein manueller Auszug der Kälber. Dabei fiel auf, dass das Gewebe des kaudalen weichen Geburtsweges (Hymenabereich, Vulva) bei allen drei Tieren rigide und nur schwer dehnbar war.

Während des Auszugs kam es bei zwei Kühen der Gruppe zu einem spontanen Abgang von Milch. Alle Aglepriston-behandelten Tiere waren unmittelbar nach dem Auszug des Kalbes melkbar. Das direkt nach der Geburt gewonnene Erstgemelk hatte makroskopisch lediglich bei einer Kuh kolostralen Charakter. Bei den anderen beiden Kühen entsprach es in Farbe und Konsistenz normaler Milch.

Alle drei Tiere wiesen eine komplette Nachgeburtshaltung auf. Manuelle Abnahmeversuche, welche ab dem zweiten Tag post partum in Verbindung mit intrauterinen Antibiotikagaben (alle 48 Stunden) durchgeführt wurden, waren nur wenig erfolgreich. Die Kolyedonen waren fest im maternalen Teil der Plazenta verankert, so dass allenfalls kleinere Anteile entfernt werden konnten. Größere Anteile der Eihäute gingen erst nach dem zehnten Tag post partum ab, wobei der Abgang offensichtlich vorwiegend auf autolytische Prozesse und weniger auf Ablösungsvorgänge entlang der feto-maternalen Kontaktfläche zurückzuführen war.

Zwei Kälber dieser Gruppe wiesen nach dem Auszug zunächst ein geringgradig gestörtes und eines ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden auf (festliegend, keine selbstständige Tränkeaufnahme, mittelgradige Dyspnoe). Alle drei waren geringgradig prämatür. So war das Fell im Nabelbereich kurz, die Incisivi waren teilweise noch von Zahnfleisch überzogen und zwei der Neonaten zeigten eine gering- bis mittelgradige Dyspnoe bzw. Tachypnoe. Zwei der drei Kälber machten am Tag der Geburt die ersten erfolgreichen Aufstehversuche. Das dritte Kalb konnte nicht selbstständig stehen. Der Saugreflex war bei allen dreien vorhanden. Sie wurden am ersten Lebenstag mit aufgetautem Fremdkolostrum getränkt. Trotzdem entwickelten sie nach einigen Tagen für prämatüre Kälber typische Krankheitsbilder wie Bronchopneumonie und Diarrhoe. Während die Symptome bei zwei Kälbern nur schwach ausgeprägt waren und diese sich unter einer intensiven Therapie (Infusionstherapie zur Flüssigkeitssubstitution und zum Ausgleich des Säure-Basen-Haushalts, antibiotische Abdeckung, Verabreichung von B-Vitaminen sowie von Vitamin E, Selen und Eisen) schnell erholten, verstarb eines am zweiten Lebenstag. Die pathologisch-anatomischen bzw. -histologischen Untersuchungen am Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen ergaben eine eitrige Meningitis, eine fibrinös-eitrige Omphalitis, eine fibrinöse Polyarthrit und eine Abomasoenteritis. Des Weiteren wurden subepicardiale und subendocardiale petechiale Blutungen sowie Blutungen in die Maulhöhlenschleimhaut festgestellt. Bei

der bakteriologischen Untersuchung wurde *Escherichia coli* in nahezu allen Organen sowie in Gehirn und Gelenken nachgewiesen, wobei hier vermutlich partiell eine Sekundärkontamination mit enteralen Colibakterien vorlag. Insgesamt deuten die Befunde darauf hin, dass das Kalb infolge einer Sepsis verstarb. Die beiden überlebenden Kälber waren nach vollständiger Genesung vital und erlangten im Laufe des mehrwöchigen Klinikaufenthalts einen altersgemäßen Entwicklungszustand.

Die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe (D272-Ap) zeigten bis zum Zeitpunkt des Kaiserschnittes am 272. Tag p.i. keinerlei Anzeichen einer unmittelbar bevorstehenden Geburt. Auch der präpartale Progesteronabfall hatte noch nicht stattgefunden. Die Progesteronkonzentrationen betragen zum Zeitpunkt des Eingriffs $5,9 \pm 1,0$ ng/ml. Die Euter waren angebildet, jedoch nur mäßig ödematisiert. Die Zitzen waren nicht mit Milch gefüllt. Direkt nach dem Kaiserschnitt waren nur geringe Mengen eines serösen Sekrets (Präkolostrium) ermelkbar. Die Laktation setzte erst zwei bis drei Tage später ein. Auch alle Tiere dieser Gruppe wiesen eine komplette Nachgeburtshaltung auf. Die Nachgeburten gingen, trotz der Verabreichung von Prostaglandinen zur Induktion der Luteolyse, bei allen drei Kühen erst ab dem siebten Tag post operationem ab. In den ersten Tagen post operationem kam es zu einem vorübergehenden Anstieg der Körpertemperatur bis in subfebrile Bereiche. Ansonsten zeigten die Muttertiere keine klinischen Auffälligkeiten. Die Kälber dieser Gruppe waren, wie die der Behandlungsgruppe, geringgradig prämaturo. So litten auch zwei dieser Neonaten am ersten Lebenstag unter einer Atemdepression. Sie nahmen kaum alleine Tränke auf und ein selbstständiges Aufstehen war bis zum zweiten Tag post natum nicht möglich.

Lediglich ein Kalb zeigte direkt nach der Geburt ein völlig ungestörtes Allgemeinbefinden. Dieses konnte bereits am Tag der Geburt selbstständig stehen und Tränke aufnehmen. Nach ein- bis zweiwöchiger intensiver, klinischer Betreuung waren alle drei Kälber dieser Gruppe vital und normal entwickelt.

Bei allen vier Kühen der Normalgeburtsguppe ging die Nachgeburt innerhalb von zwölf Stunden nach der spontanen Austreibung eines gesunden, vitalen Kalbes ab. Die durchschnittliche Gravitätätsdauer betrug $280,5 \pm 1,7$ Tage.

4.2 Expression der Cyclooxygenase II in den Plazentomen

4.2.1 Expression der Cyclooxygenase II auf Proteinebene

Die Cox II konnte immunhistologisch in den Plazentomen aller untersuchten Tiere nahezu ausschließlich im Zytoplasma der UTC detektiert werden. Neben den UTC zeigten lediglich Gefäßendothelzellen vereinzelt positive Reaktionen. Karunkel-epithel, maternales und fetales Stroma sowie die TGC waren stets negativ (Abbildung 11 und Abbildung 12). Nach Normalgeburten konnten starke Signale in den UTC des gesamten Plazentoms nachgewiesen werden (Abbildung 12C). Dagegen war die Signalintensität bei den spätgraviden Tieren (D272+Ap, D272-Ap) insgesamt eher moderat und variierte in Abhängigkeit von der Lokalisation im Zottenbaum (Abbildung 12A, B). So waren in den UTC der Chorionplatte und der chorionplatten-nahen Primär- und Sekundärzotten Signale mittlerer bis starker Intensität vorzufinden, während die UTC der intermediären Zone lediglich eine schwache bis mäßige Signalintensität aufwiesen. In der karunkelstielnahen Zone konnte die Cox II bei diesen beiden Gruppen kaum detektiert werden.

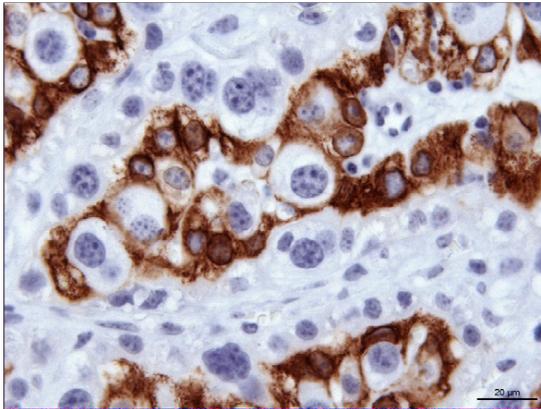
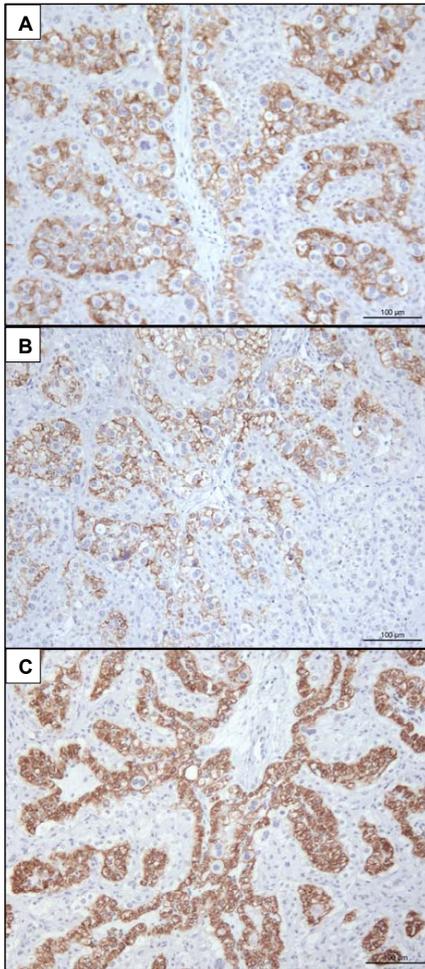


Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis der Cox II in den einkernigen Trophoblastzellen eines Rindes nach Aglepriston-induzierter Geburt (D272+Ap). Schwarzer Balken = 20 µm.



A:
Immunhistologischer Nachweis der Cox II im Plazentom eines Rindes nach Aglepristonbehandlung (D272+Ap).

Die Cox II ist ausschließlich in den einkernigen Trophoblastzellen nachweisbar. Erkennbar ist eine moderate Expression im mittleren Bereich einer Primärzotte und in den Sekundärzotten.

B:
Immunhistologischer Nachweis der Cox II im Plazentom eines Rindes nach Sectio caesarea am 272.Trächtigkeitstag (D272-Ap).

Auch in dieser Gruppe ist lediglich eine schwache Expression der Cox II in den einkernigen Trophoblastzellen nachweisbar.

C:
Immunhistologischer Nachweis der Cox II im Plazentom eines Rindes nach Normalgeburt.

Deutliche Aufregulation der Cox II in den einkernigen Trophoblastzellen. Es sind starke Signale über den ganzen Zottenbaum verteilt nachweisbar.

Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis der Cox II in den einkernigen Trophoblastzellen der Gruppen D272+Ap (A), D272-Ap (B) und Normalgeburt (C). Die Abbildungen entstammen jeweils Zone II des Plazentoms. Schwarze Balken = 100 µm.

Abbildung 13 stellt den IRS in Abhängigkeit von der Lokalisation im Plazentom dar. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,0064$) und der Lokalisation ($p < 0,0001$). Auch die Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren erwies sich als signifikant ($p = 0,0003$). Somit waren Unterschiede zwischen den Gruppen abhängig von der Lokalisation. Die Gruppen D272+Ap und D272-Ap unterschieden sich mit $p = 0,0093$ bzw. $p = 0,016$ signifikant von der Normalgeburtsgruppe. Zwischen diesen beiden Gruppen bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede.

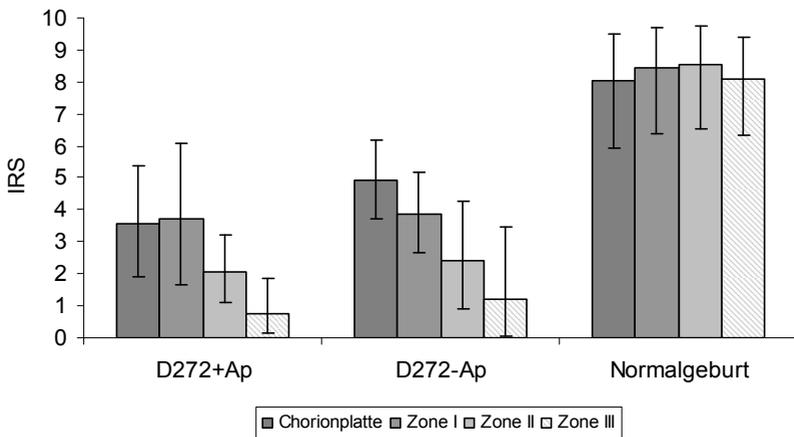


Abbildung 13: Cox II-Immunoreaktivität in den einkernigen Trophoblastzellen in Abhängigkeit von der Lokalisation im Rinderplazentom. Dargestellt ist der Immunoreactive score (IRS) als Median und Streubereich, errechnet nach Rücktransformation von Mittelwert und Standardabweichung der arcus-sinus-transformierten Daten.

- Zone I: basaler Bereich der Chorionzotten (chorionplattennah)
- Zone II: intermediärer Bereich
- Zone III: apikaler Bereich der Chorionzotten (karunkelstiellnah)

4.2.2 Expression der Cox II-spezifischen mRNA

Entsprechend den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchungen war auch die relative Expression der Cox II-spezifischen mRNA (RGE) in den Kotyledonen der Geburtsgruppe mit $13,95 \times 1,17^{\pm 1}$ deutlich höher als in den Gruppen D272-Ap ($2,29 \times 2,86^{\pm 1}$) und D272+Ap ($2,38 \times 1,70^{\pm 1}$) (Abbildung 14). Der Einfluss der Versuchsgruppe auf die Expression der Cox II-mRNA erwies sich als signifikant ($p = 0,0103$). In einem paarweisen Gruppenvergleich war die RGE der Cox II in den Plazentomen der Normalgeburtsgruppe signifikant höher ($p < 0,05$) als bei den Gruppen D272-Ap und D272+Ap. Letztere unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

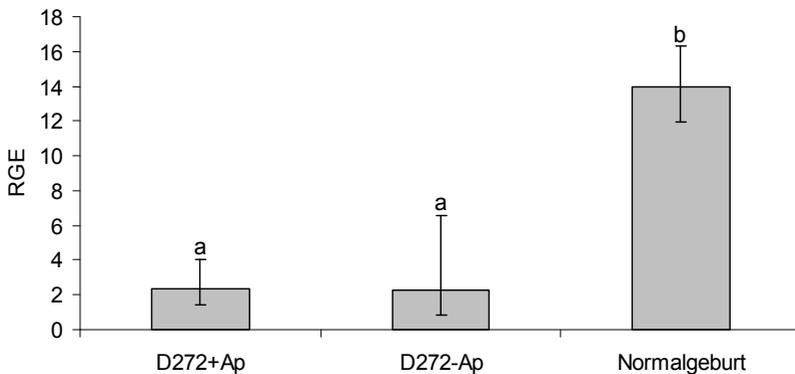


Abbildung 14: Expression der Cox II-mRNA in den Kotyledonen von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; $n = 3$), von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap; $n = 3$) sowie von Rindern nach spontaner termingerechter Geburt ($n = 4$). Dargestellt ist die relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert \times Streufaktor $^{\pm 1}$. Unterschiedlich gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich mit $p < 0,05$.

4.3 Expression des Glucocorticoidrezeptors in den Plazentomen

4.3.1 Expression des Glucocorticoidrezeptors auf Proteinebene

In Plazentomen der Tiere aus den Gruppen D272+Ap bzw. D272-Ap wurden deutliche Signale vorwiegend in den Zellkernen von TGC und Karunkelepithelzellen detektiert (Abbildung 15). Zusätzlich zu den dominierenden nukleären Signalen waren teilweise auch schwächere zytoplasmatische Signale vorhanden. Besonders intensive Signale zeigten sich in den invasiven TGC sowie in feto-maternalen Hybridzellen. Außer in TGC und im Karunkelepithelzellen fanden sich in UTC, Chorionstromazellen, Zellen der Gefäßendothelien und -wände sowie in Karunkelstromazellen ebenfalls positive Reaktionen. Diese betrafen jedoch nur einen geringen Anteil der Zellen und waren im Vergleich zu den in den TGC und Karunkelepithelzellen beobachteten Signalen nur von schwacher Intensität. Daher wurden bei der semiquantitativen Auswertung nur die nukleären Reaktionen in den TGC und den Karunkelepithelzellen berücksichtigt. Auch in den Plazentomen der Normalgeburtsgruppe wurde der GR immunhistologisch vorwiegend in den Kernen der Karunkelepithelzellen und der TGC detektiert (Abbildung 16). Infolge der präpartalen Umbauvorgänge war die Anzahl der Karunkelepithelzellen deutlich reduziert und die verbliebenen Karunkelepithelzellen waren häufig nicht mehr eindeutig identifizierbar. Des Weiteren waren die wenigen verbliebenen TGC in den Plazentomen sehr inhomogen verteilt. Da mit dem verwendeten Auswertungsverfahren bei den Normalgeburtstieren kaum biologisch aussagekräftige Daten zu erwarten waren, wurde hier auf eine semiquantitative Evaluierung verzichtet.

Bei der semiquantitativen Auswertung der Immunfärbung in den Karunkelepithelzellen (Abbildung 17) ergaben sich zwischen den Gruppen D272+Ap ($4,12 \pm 0,63$) und D272-Ap ($3,33 \pm 1,74$) keine signifikanten Unterschiede. Auch die IRS der TGC unterschieden sich mit $2,31 \pm 0,40$ (D272+Ap) bzw. $3,06 \pm 1,25$ (D272-Ap) nicht signifikant voneinander.

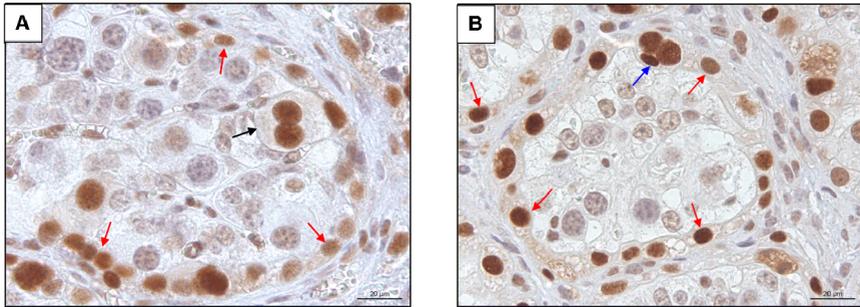


Abbildung 15: Immunhistologischer Nachweis des Glucocorticoidrezeptors im Plazentom eines Rindes nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (A) und im Plazentom eines unbehandelten Tieres nach Sectio caesarea am Tag 272 (B). Deutliche Signale in den Karunkelepithelzellen (rote Pfeile) sowie in einer Trophoblastriesenzelle (schwarzer Pfeil) und in einer feto-maternalen Hybridzelle (blauer Pfeil). Schwarzer Balken = 20 µm.

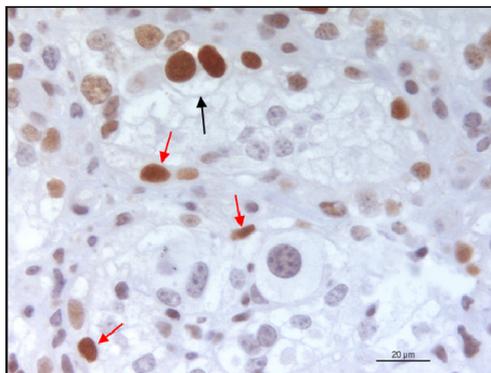


Abbildung 16: Nachweis des Glucocorticoidrezeptors im Plazentom eines Rindes nach Normalgeburt. Deutliche Signale in einer Trophoblastriesenzelle (schwarzer Pfeil) und in den Karunkelepithelzellen (rote Pfeile). Das Karunkelepithel ist bis auf wenige Reste verschwunden. Schwarzer Balken = 20 µm.

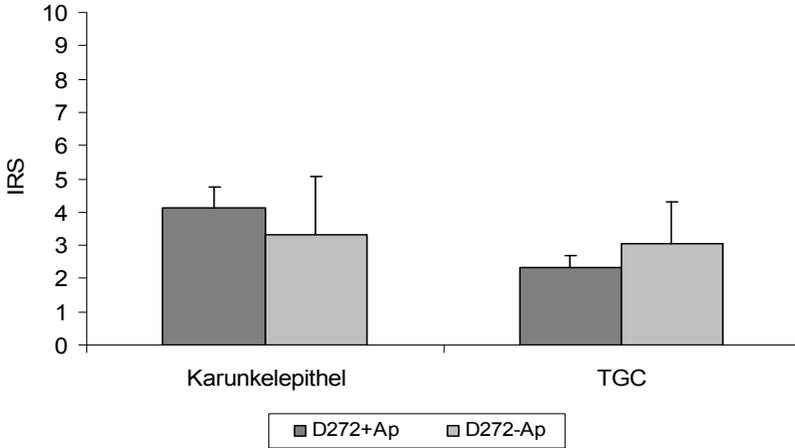


Abbildung 17: Semiquantitative Beurteilung der Glucocorticoidrezeptor-Immuno-reaktivität im Karunkelepitel und in den Trophoblastriesenzellen (TGC) von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; n = 3) und von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap; n = 3). Dargestellt ist der Immuno-reactive score (IRS) als \bar{x} +SD.

4.3.2 Expression der Glucocorticoidrezeptor-spezifischen mRNA

Die Messungen der RGE der GR-mRNA wurde separat in den Karunkeln bzw. Kotyledonen vorgenommen. In den Karunkeln zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 18A). Jedoch hatte die Versuchsgruppe einen signifikanten Einfluss ($p = 0,0337$) auf die Expression der GR-mRNA im fetalen Teil der Plazentome (Abbildung 18B). Dort war die RGE der Normalgeburtsgruppe mit $3,33 \times 1,11^{\pm 1}$ signifikant ($p < 0,05$) höher als in der Gruppe D272+Ap ($1,65 \times 1,55^{\pm 1}$). Die RGE in den Kotyledonen der Gruppe D272-Ap betrug $2,57 \times 1,24^{\pm 1}$ und unterschied sich nicht signifikant von den RGE-Werten der beiden anderen Gruppen.

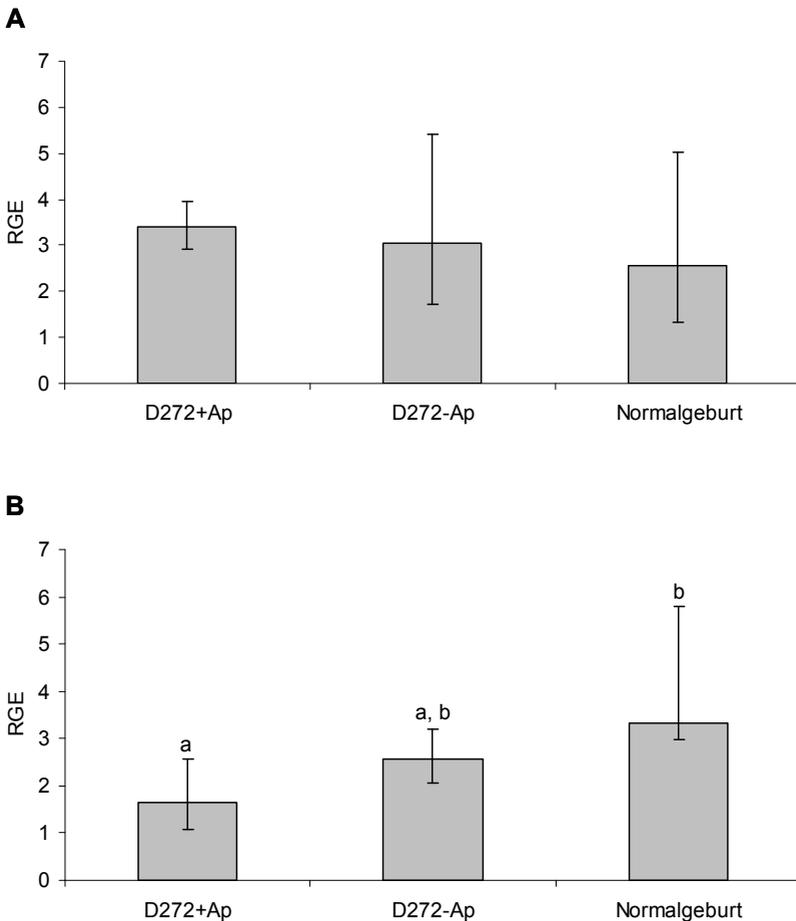


Abbildung 18: Expression der Glucocorticoidrezeptor-spezifischen mRNA in Karunkeln (A) bzw. Kotyledonen (B) von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; n = 3), von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap, n = 3) sowie von Rindern nach spontaner termingerechter Geburt (n = 4). Dargestellt ist die relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert \times Streufaktor⁺¹. Unterschiedlich gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich mit $p < 0,05$.

4.4 Expression des Progesteronrezeptors in den Plazentomen

4.4.1 Expression des Progesteronrezeptors auf Proteinebene

Der PR war fast ausschließlich in den Kernen der Karunkelstromazellen nachweisbar (Abbildung 20). In diesem Zelltyp waren Signale in allen Zonen des Plazentoms einschließlich des Karunkelstiels vorhanden. Bei der Auswertung der Immunfärbung konnte kein signifikanter Einfluss der Gruppe auf den prozentualen Anteil PR-positiver Karunkelstromazellen festgestellt werden. Der arithmetische Mittelwert lag bei allen drei Gruppen zwischen 64 % und 71 % (Abbildung 19). Des Weiteren waren Signale in den Endothelien und Perizyten einiger maternaler und fetaler Gefäße zu erkennen. Einzelne TGC wiesen eine leichte zytoplasmatische Färbung auf. Diese Beobachtungen waren aber insgesamt recht selten und wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

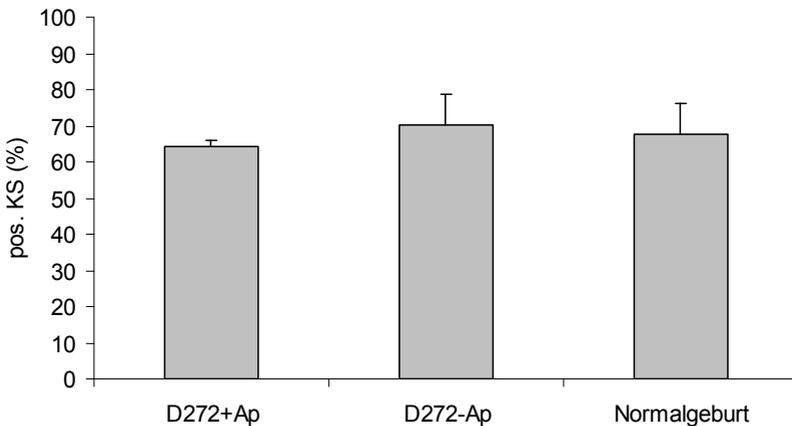


Abbildung 19: Prozentualer Anteil (\bar{x} +SD) Progesteronrezeptor-positiver Karunkelstromazellen (KS) in Plazentomen von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; n = 3), von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap; n = 3) sowie von Rindern nach spontaner termingerechter Geburt (n = 4).

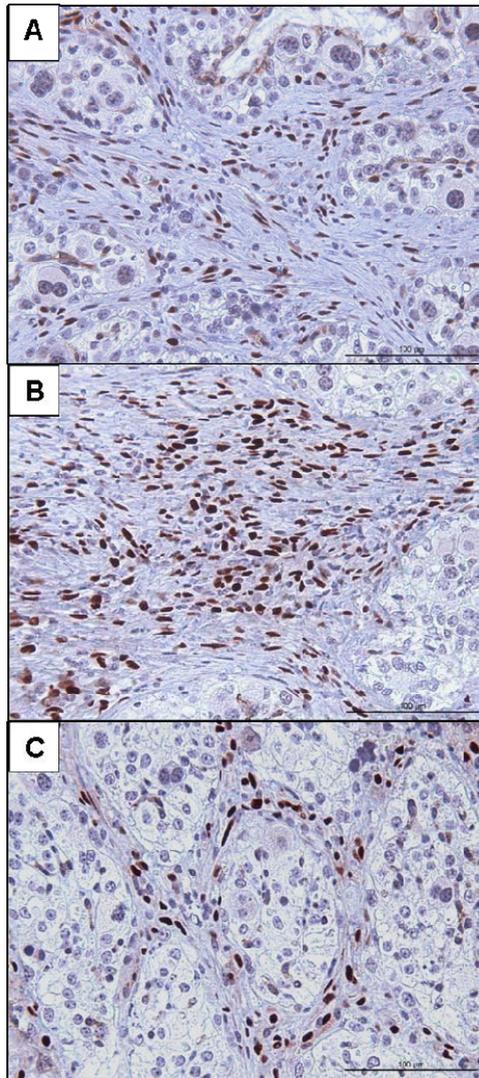


Abbildung 20: Immunhistologischer Nachweis des Progesteronrezeptors im Plazentom eines Rindes nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (A), eines unbehandelten Rindes nach Sectio caesarea am Tag 272 (B) sowie nach spontaner termingerechter Geburt (C). Schwarze Balken = 100 µm.

4.4.2 Expression der Progesteronrezeptor-spezifischen mRNA

Die mittlere relative Expression der PR-spezifischen mRNA betrug in der Gruppe D272+Ap $1,34 \times 1,64^{\pm 1}$, in der Gruppe D272-Ap $1,90 \times 2,09^{\pm 1}$ und in der Normalgeburtsguppe $4,39 \times 1,34^{\pm 1}$ (Abbildung 21). Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,0439$). Die relative Expression der PR-mRNA war bei der Normalgeburtsguppe signifikant höher ($p < 0,05$) als bei der Gruppe D272+Ap. Die RGE der Gruppe D272-Ap unterschied sich dagegen nicht signifikant von den anderen beiden Gruppen.

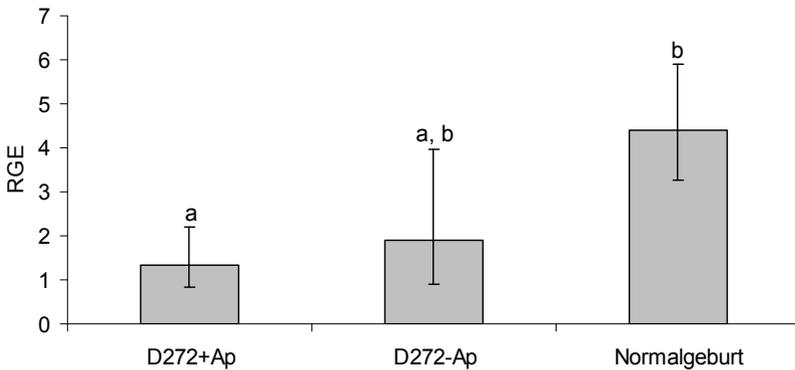


Abbildung 21: Expression der Progesteronrezeptor-mRNA im Karunkelgewebe von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; $n = 3$), von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap; $n = 3$) sowie von Rindern nach spontaner termingerechter Geburt ($n = 4$). Dargestellt ist die relative Genexpression (RGE) als geometrischer Mittelwert \times Streufaktor^{±1}. Unterschiedlich gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich mit $p < 0,05$.

4.5 Reifezustand der Plazentome

4.5.1 Anteil der TGC an den Trophoblastzellen

Der Anteil der TGC an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen betrug in der Gruppe D272+Ap $20,1 \pm 1,4$ %, in der Gruppe D272-Ap $22,1 \pm 4,8$ % und in der Normalgeburtgruppe $9,8 \pm 3,9$ % (Abbildung 22 und Abbildung 23). Eine einfaktorische Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe auf den TGC-Anteil ($p = 0,0059$). Bei einem paarweisen Gruppenvergleich unterschied sich die Normalgeburtgruppe signifikant von den Gruppen D272+Ap ($p < 0,05$) und D272-Ap ($p < 0,01$). Die beiden letzteren unterschieden sich nicht.

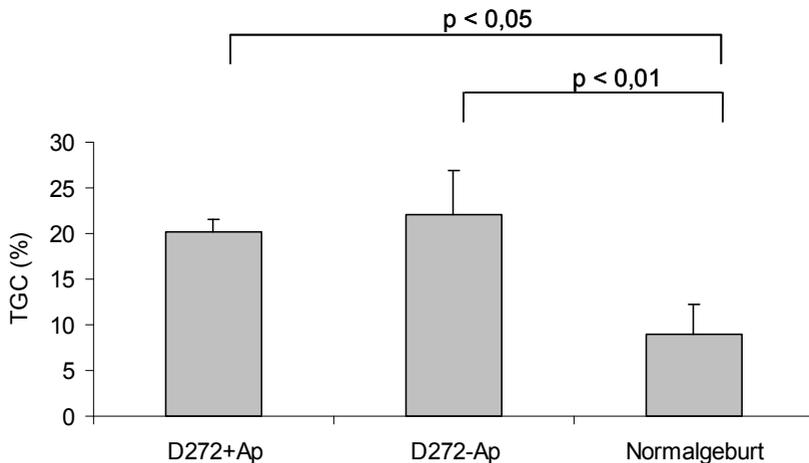


Abbildung 22: Prozentualer Anteil (\bar{x} +SD) der Trophoblastriesenzellen (TGC) an den Trophoblastzellen in Plazentomen von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; $n = 3$), von unbehandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap; $n = 3$) sowie von Rindern nach spontaner termingerechter Geburt ($n = 4$).

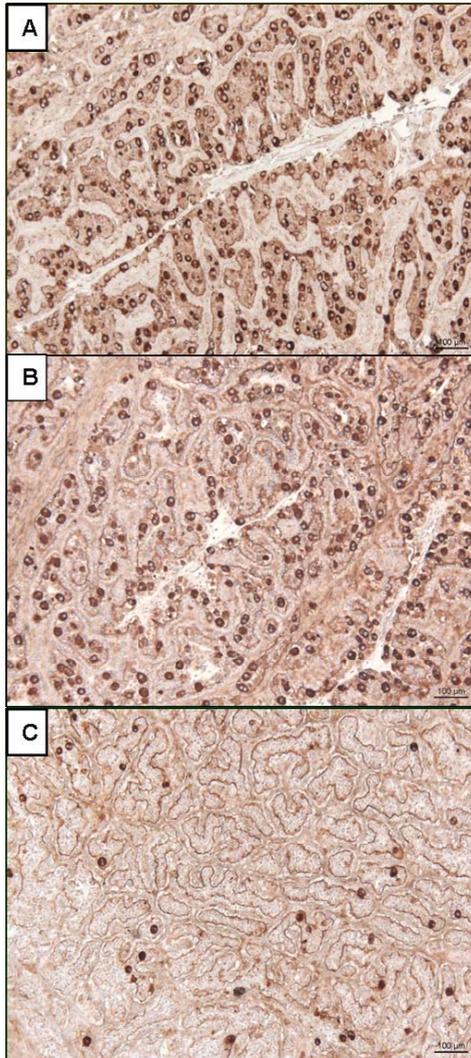


Abbildung 23: Darstellung der Trophoblastriesenzellen (TGC) in Rinderplazentomen mittels Lektin histochemie. Nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (A) ist wie bei unbehandelten Tieren nach Sectio caesarea am Tag 272 (B), eine hohe Dichte der TGC erkennbar. Dagegen ist die TGC-Anzahl in einem murenen Plazentom nach Normalgeburt deutlich reduziert (C). Schwarze Balken = 100 µm.

4.5.2 Reduktion des Karunkelepithels

Der Zustand des Karunkelepithels wurde durch die Aglepristonbehandlung trotz erfolgreicher Geburtsinduktion nicht erkennbar beeinflusst. Histomorphologisch waren bei den Gruppen D272+Ap und D272-Ap insgesamt unreife Plazentome mit einem intakten, meist isoprismatischen Karunkelepithel erkennbar (Abbildung 25A, B). Die reifen Plazentome der Normalgeburtsgruppe wiesen dagegen in weiten Bereichen ein abgeflachtes, teilweise auch lückenhaftes Karunkelepithel auf (Abbildung 25C). Entsprechend unterschied sich der prozentuale Anteil der Karunkelepithelfläche an der von der Basalmembran des Karunkelepithels begrenzten Fläche (siehe Abschnitt 3.5.2) mit $30,5 \pm 3,3$ % in der Behandlungsgruppe (D272+Ap) kaum von dem der unbehandelten Tiere (Gruppe D272-Ap; $31,5 \pm 1,4$ %). Die Messwerte der Normalgeburtsgruppe waren mit $21,1 \pm 6,1$ % deutlich niedriger (Abbildung 24). Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss der Versuchsgruppe ($p = 0,0294$) auf den Zustand des Karunkelepithels. Im paarweisen Gruppenvergleich unterschied sich die unbehandelte Kontrollgruppe D272-Ap signifikant von der Normalgeburtsgruppe ($p < 0,05$), die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe D272+Ap und der Normalgeburtsgruppe war jedoch nicht signifikant.

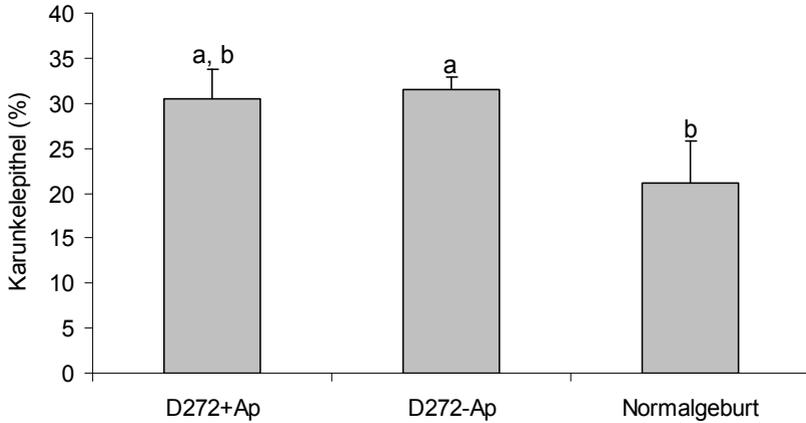


Abbildung 24: Morphometrische Erfassung des Karunkelepitheils von Rindern nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (D272+Ap; n = 3), von un-behandelten Rindern nach Sectio caesarea am Tag 272 (D272-Ap, n = 3) sowie von Rindern nach spontaner termingerechter Geburt (n = 4). Gemessen wurde der prozentuale Flächenanteil des Karunkelepitheils an der von der Basalmembran des Karunkelepitheils umgrenzten Kryptenquerschnittsfläche (\bar{x} +SD). Unterschiedlich gekennzeichnete Gruppen unterscheiden sich mit $p < 0,05$.

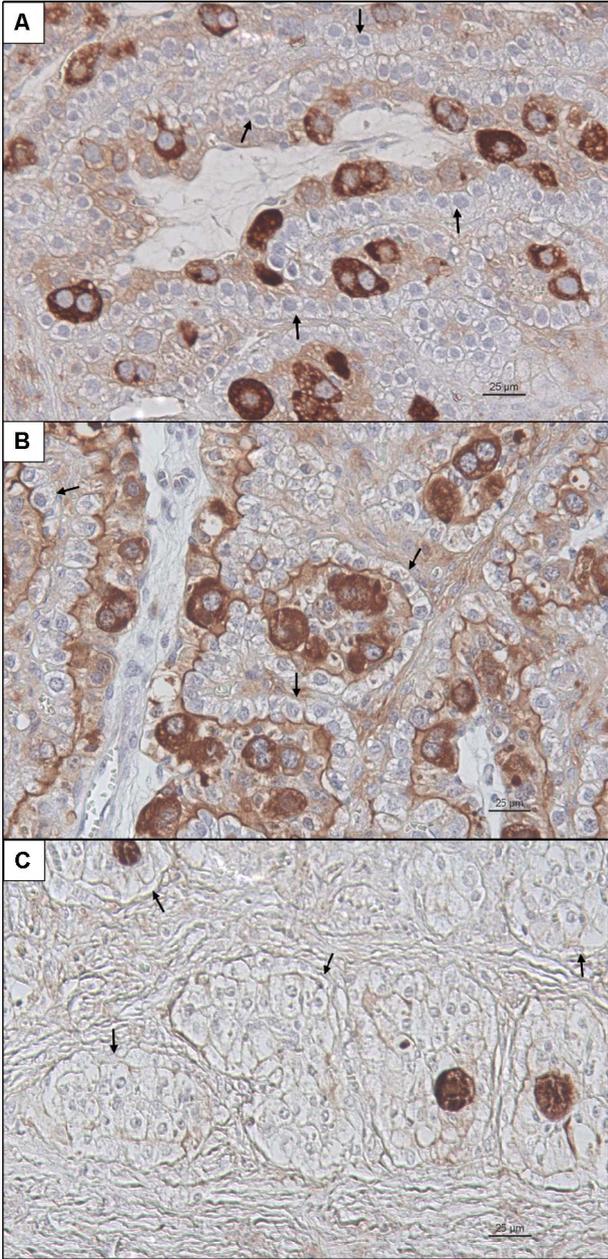


Abbildung 25: Histomorphologie unreifer Plazentome der Gruppen D272+Ap (A) und D272-Ap (B) mit intaktem, isoprismatischem Karunkelepithel (schwarze Pfeile) und zahlreichen Trophoblastriesenzellen (TGC). (C) Das Karunkelepithel eines murenen Plazentoms ist teilweise abgeflacht und lückenhaft und die Anzahl der TGC ist stark reduziert. Lektin histochemie. Schwarze Balken = 25 µm (vorherige Seite).

4.6 Steroidhormonkonzentrationen im maternalen Blutplasma

4.6.1 Freie und konjugierte Östrogene

In der unbehandelten Kontrollgruppe (D272-Ap) waren im Zeitraum zwischen dem 268. Trächtigkeitstag und der Schnittentbindung am 272. Trächtigkeitstag die Konzentrationen an Estron, Estronsulfat und Estradiol-17 β weitgehend konstant (Abbildung 26D – F). In der Gruppe der Aglepriston-behandelten Tiere waren die Konzentrationen an Estron bzw. Estronsulfat zwischen dem 268. Trächtigkeitstag und dem Auszug der Kälber am 272. Trächtigkeitstag ebenfalls relativ konstant (Abbildung 26A, B). Ein Effekt, welcher der Antigestagenbehandlung zuzuordnen wäre, war nicht zu erkennen. Die Estradiol-17 β -Konzentration stieg dagegen zwischen der zweiten Aglepriston-Behandlung und dem Auszug bei allen drei Tieren, im Mittel um 69 %, an (Abbildung 26C). Bei den unbehandelten Kontrollen trat dagegen im entsprechenden Zeitraum, wie oben erwähnt, kein vergleichbarer Anstieg auf (Abbildung 26F).

Nach dem Auszug der Kälber blieben die Östrogenwerte in der Gruppe der Aglepriston-behandelten Tiere über einen Zeitraum von 24 – 36 Stunden weitgehend unverändert, erst danach kam es zu einem deutlichen Abfall der Konzentrationen. Auch in der unbehandelten Kontrollgruppe war bei zwei von drei Tieren nach der Schnittentbindung eine Persistenz der hohen Östrogenkonzentrationen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums festzustellen. Lediglich bei einem Tier dieser Gruppe (rot dargestellt) sanken die Estron- bzw. Estronsulfatkonzentrationen trotz vollständiger Nachgeburtverhaltung innerhalb von ca. 36 Stunden post operationem auf Basalniveau ab.

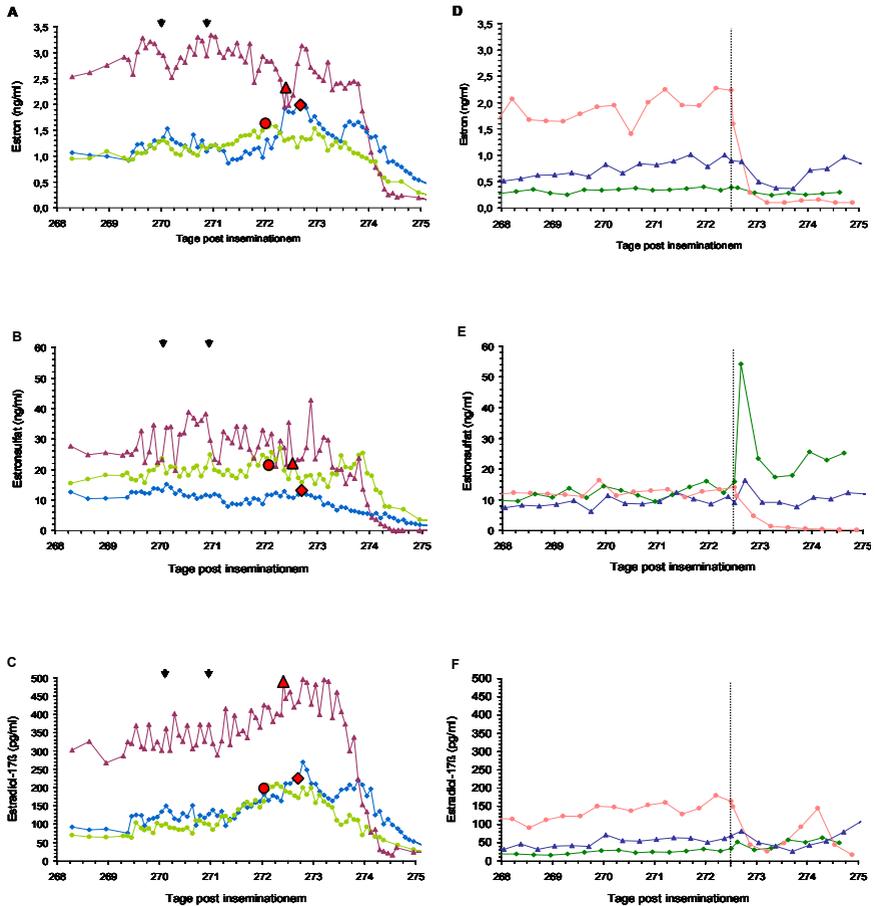


Abbildung 26: Verlauf der Plasmakonzentrationen von Estron, Estronsulfat und Estradiol-17 β bei drei trächtigen Kühen vor/nach Geburtsinduktion mit Aglepriston (A – C) sowie bei drei unbehandelten Kontrolltieren vor/nach Schnittentbindung am Tag 272 (D – F).
 schwarze Pfeile: Zeitpunkte der Aglepristonbehandlung
 rote Symbole: Auszug des Kalbes
 gestrichelte Linien: Zeitpunkt der Schnittentbindung

Bei der Normalgeburtsgruppe änderten sich die Östrogenwerte in den letzten sechs Tagen ante partum insgesamt nur wenig (Abbildung 27A – C). Sie bewegten sich in gleichen Bereichen wie die Werte der anderen beiden Versuchsgruppen vor Beendigung der Gravidität. Die Estronsulfatkonzentrationen wiesen nur geringe Schwankungen auf. Die Konzentrationen von Estradiol-17 β - bzw. Estron stiegen nur bei zwei von vier Tieren (grün und rot dargestellt) im beobachteten präpartalen Zeitraum leicht an. Zum Geburtszeitpunkt betrug die Konzentrationen von Estron $2,4 \pm 0,5$ ng/ml, von Estronsulfat $12,1 \pm 5,9$ ng/ml und von Estradiol-17 β $226,5 \pm 79,7$ pg/ml. Nach der Geburt wurden innerhalb von 24 Stunden bei allen vier Tieren annähernd basale Östrogenwerte gemessen.

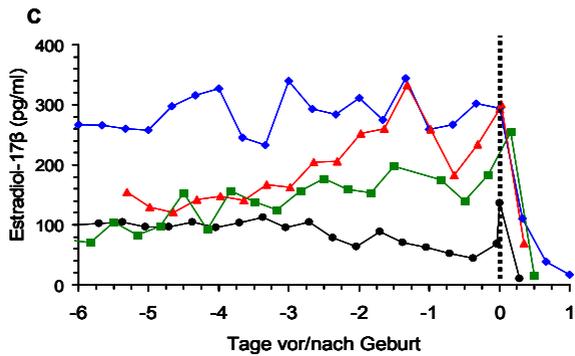
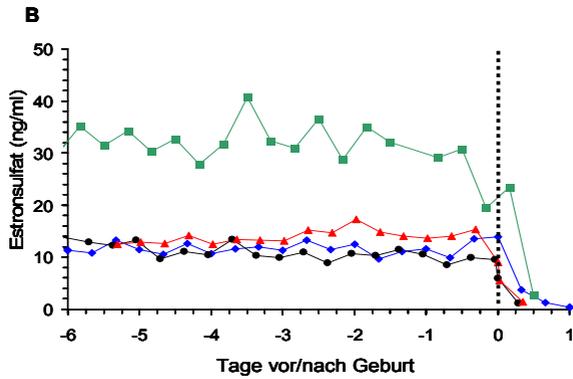
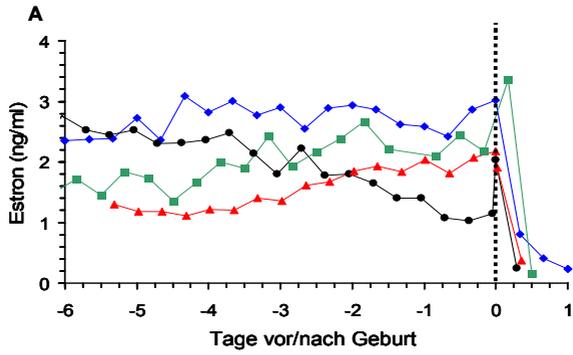


Abbildung 27: Peripartaler Verlauf der Plasmakonzentrationen von Estron, Estronsulfat und Estradiol-17 β bei vier Kühen der Normalgeburtsgruppe.
gestrichelte Linie: Zeitpunkt der Geburt (vorherige Seite)

4.6.2 Progesteron

Nach der Aglepristonbehandlung wurde bei allen drei Tieren ein steiler Abfall der Progesteronkonzentrationen im geburtsnahen Zeitraum beobachtet (Abbildung 28A). Bei zwei Tieren (grün und blau dargestellt) begann dieser Abfall deutlich vor dem Auszug der Kälber. Zum Zeitpunkt des Auszugs wurden Werte von 1,3 ng/ml bzw. 1,6 ng/ml gemessen. Beim dritten Tier dieser Gruppe fand der Auszug bei einem hohen P₄-Wert von 5,2 ng/ml statt. Der P₄-Abfall setzte hier praktisch mit dem Auszug des Kalbes ein. Bei allen drei Aglepriston-behandelten Kühen fielen die Progesteronwerte zunächst steil, innerhalb von 12 – 24 Stunden, auf Werte von ca. 1 ng/ml ab. Innerhalb der nächsten ein bis zwei Tage erfolgte ein weiterer flacher Abfall auf Basalniveau. Bei der Kontrollgruppe (D272-Ap) veränderten sich die P₄-Werte zwischen dem 268. und der am 272. Graviditätstag durchgeführten Schnittentbindung nicht (Abbildung 28B). Zum Zeitpunkt des Kaiserschnittes betrug die mittlere P₄-Konzentration $5,9 \pm 1,0$ ng/ml. Im Zeitraum von 14 – 26 Stunden nach dem operativen Eingriff wurde diesen Tieren Cloprostenol zur Sicherstellung der Luteolyse verabreicht. Die Messung der Progesteronwerte zeigte, dass zum Zeitpunkt der Prostaglandin-Verabreichung bei zwei von drei Tieren (grün und blau dargestellt) die Luteolyse noch nicht eingetreten war. Bei den Tieren dieser Gruppe war der Beginn eines deutlichen Progesteronabfalls frühestens zwölf Stunden post operationem erkennbar.

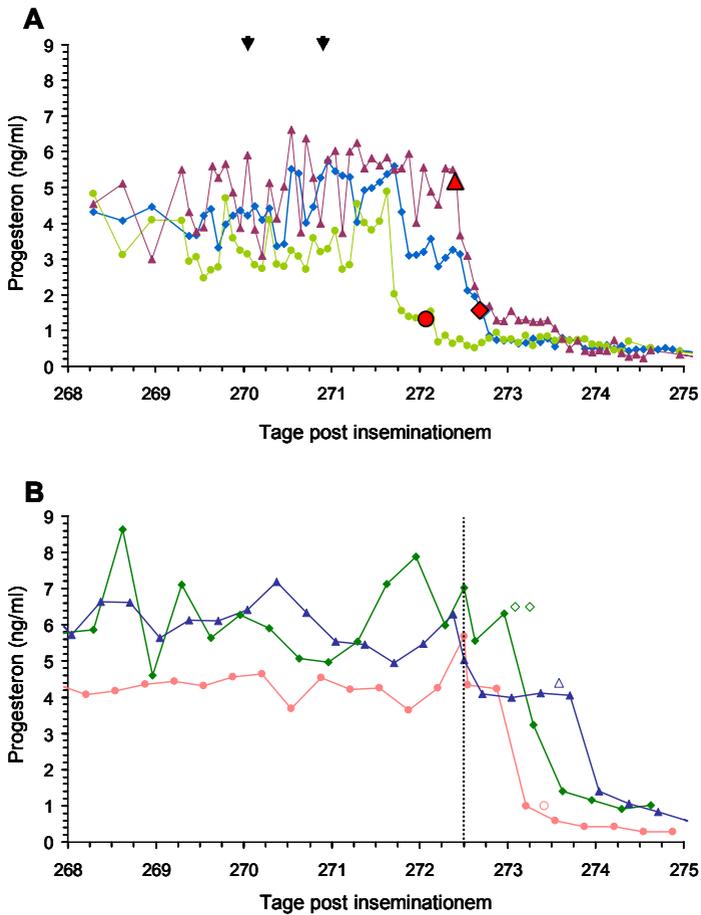


Abbildung 28: Verlauf der Plasmakonzentration von Progesteron bei drei trächtigen Kühen vor/nach Geburtsinduktion mit Aglepriston (A) sowie bei drei unbehandelten Kontrolltieren vor/nach Schnittentbindung am Tag 272 (B).

schwarze Pfeile: Zeitpunkte der Aglepristonbehandlung

rote Symbole: Auszug des Kalbes

unausgefüllte Symbole: Behandlung mit einem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon

gestrichelte Linie: Zeitpunkt der Schnittentbindung

Bei den vier Tieren mit Normalgeburt und physiologischem Abgang der Nachgeburt fielen die Progesteronwerte im Zeitraum zwischen 36 – 12 Stunden ante partum (Abbildung 29) deutlich ab. Die Geburten fanden bei einem mittleren Progesteronwert von $0,5 \pm 0,2$ ng/ml statt.

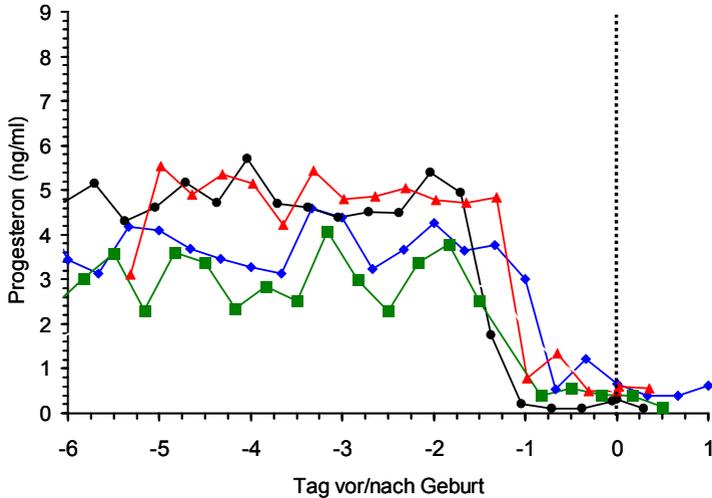


Abbildung 29: Plasmakonzentration von Progesteron bei vier Kühen der Normalgeburtsgruppe.
gestrichelte Linie: Zeitpunkt der Geburt

4.7 13, 14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F_{2α}-Konzentrationen im maternalen Blutplasma

Bei zwei der Aglepriston-behandelten Tiere (grün und rot dargestellt) stiegen die PGFM-Werte im Zeitraum zwischen den Antigestagenapplikationen und dem Auszug der Kälber geringfügig, aber deutlich erkennbar an. Beim dritten Tier dieser Gruppe war dieser Anstieg nur ansatzweise zu erkennen (Abbildung 30A). Der Auszug fand bei PGFM-Werten von $2,14 \pm 1,40$ ng/ml statt. Nach der Geburt stiegen bei allen Tieren dieser Gruppe die PGFM-Werte weiter an. Maximalwerte von $11,46 \pm 5,41$ ng/ml wurden erst $19,6 \pm 4,5$ Stunden nach dem Auszug erreicht. Im erfassten postpartalen Zeitraum blieben die PGFM-Konzentrationen deutlich über Basalniveau. Dieser Verlauf unterschied sich erheblich von dem bei den Tieren der Normalgeburtsgruppe (30C). Bei diesen war bereits vor der Geburt ein stärker ausgeprägter Anstieg der PGFM-Werte feststellbar. Die Geburt fand bei maximalen Konzentrationen von $8,70 \pm 2,20$ ng/ml statt. Unmittelbar nach der Geburt fielen die Werte wieder deutlich ab.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe (D272-Ap) verliefen die PGFM-Konzentrationen vom 268. Trächtigkeitstag bis zur Schnitentbindung am Tag 272 auf Basalniveau (Abbildung 30B). Im Zusammenhang mit der Schnitentbindung war keine Erhöhung der PGFM-Konzentrationen feststellbar. Die Werte betragen zum Zeitpunkt des Kaiserschnitts $1,08 \pm 0,69$ ng/ml. Erst nach der Behandlung mit einem PGF_{2α}-Analogon (14 – 26 Stunden post operationem) bzw. nach Beginn des Progesteronabfalls (Abbildung 28B) konnte bei diesen Tieren ein deutlicher PGFM-Anstieg beobachtet werden.

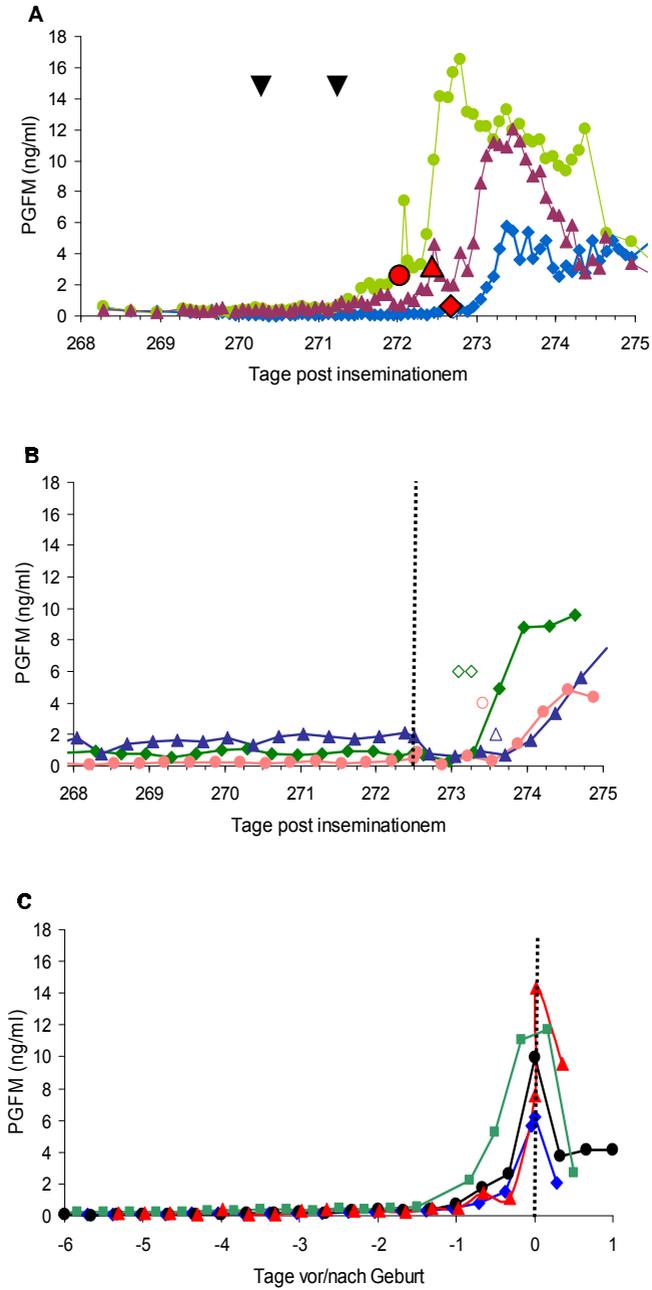


Abbildung 30: Verlauf der maternalen PGFM-Plasmakonzentration von Rindern vor/nach Aglepriston-induzierter Geburt am Tag 272 (A), von unbehandelten Rindern vor/nach Sectio caesarea am Tag 272 (B) sowie von Rindern vor/nach spontaner termingerechter Geburt (C).

schwarze Pfeile: Zeitpunkte der Aglepristonbehandlung

rote Symbole: Auszug des Kalbes

unausgefüllte Symbole: Behandlung mit einem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon

gestrichelte Linien: Zeitpunkt der Schnittentbindung (B) bzw. der Geburt (C)

(vorherige Seite)

5. DISKUSSION

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, die Bedeutung des präpartalen Progesteronzugs innerhalb der beim Rind zur Geburt und zum Nachgeburtsabgang führenden Signalkaskade zu charakterisieren. Besonderes Interesse galt dabei der Frage, ob durch die Blockade der plazentaren Progesteronrezeptoren die zu einem termingerechten Nachgeburtsabgang führenden Mechanismen ausgelöst werden können.

Als experimenteller Ansatz wurde die Verabreichung eines kompetitiven Progesteronrezeptor-Blockers gewählt. Ziel war die Ausschaltung aller rezeptorvermittelten Wirkungen von Progesteron, ungeachtet dessen Ursprungs – Corpus luteum bzw. Plazenta.

5.1 Effekte der Antigestagenbehandlung auf den Geburtsverlauf, das Einsetzen der Laktation und die Vitalität der Kälber

Der in den letzten ein bis zwei Tagen vor Normalgeburten beschriebene Abfall der Körpertemperatur (BIRGEL ET AL. 1994; LAMMOGLIA ET AL. 1997) war auch bei den Tieren der Gruppe D272+Ap ansatzweise erkennbar. Ebenfalls war die bereits beobachtete Reduktion der Variabilität der Körpertemperatur unmittelbar vor der Geburt (LAMMOGLIA ET AL. 1997) bei den Tieren dieser Gruppe deutlich zu erkennen. Birgel et al. (1994) zeigten, dass die Körpertemperatur beim Rind im unmittelbar präpartalen Zeitraum positiv mit dem P_4 -Plasmaspiegel korreliert ist.

Die Veränderungen der Körpertemperaturprofile am zweiten Behandlungstag können, trotz ihrer schwachen Ausprägung, als erste Effekte der Antigestagenbehandlung gewertet werden. Auch bei hochgraviden Hündinnen konnte ca. 24 Stunden nach der Behandlung mit einem P_4 -Antagonisten ein temporärer Abfall der Körpertemperatur beobachtet werden (LINDE-FORSBERG ET AL. 1992; NOHR 1993; CORRADA ET AL. 2005). Um den Geburtszeitpunkt wurden wieder geringfügig höhere Konzentrationen gemessen. Sowohl bei den Versuchskühen der vorliegenden Studie als auch bei Antigestagen-behandelten Hündinnen fand der Temperaturabfall bei P_4 -Plasmakonzentrationen statt, die deutlich über Basalniveau lagen. Corrada et al. (2005) vermuteten, dass durch die Blockade der PR im Hypothalamus oder in

anderen Bereichen des Zentralnervensystems die thermogene Wirkung von P₄ unterbunden wird.

Der postpartale Temperaturanstieg bis in subfebrile bzw. febrile Bereiche ist offensichtlich auf die Puerperalstörungen, die bei allen Aglepriston-behandelten Versuchstieren im Zusammenhang mit den Nachgeburtverhaltungen auftraten, zurückzuführen.

Die Aglepristonbehandlung am 270. und 271. Tag p.i. führte bei allen Tieren der Versuchsgruppe zu einem vorzeitigen Eintritt der Geburt. Am 272. Graviditätstag, 46,3 ± 6,0 Stunden nach Behandlungsbeginn, kam es zur vollständigen Öffnung der Zervix. Die durchschnittliche Trächtigkeitsdauer war bei der Normalgeburtgruppe mit 280,5 ± 1,7 Tagen deutlich länger. Bei allen Antigestagen-behandelten Kühen war nach Feststellung einer vollständigen Zervixöffnung ein starker Einsatz der Bauchpresse zu beobachten. Dieser führte jedoch innerhalb von zwei Stunden nicht zu einem erkennbaren Voranschreiten der Austreibung, so dass ein manueller Auszug der Kälber erforderlich war. Offensichtlich waren die Dystokien überwiegend auf eine Wehenschwäche zurückzuführen. Die mangelhafte Öffnung des kaudalen weichen Geburtsweges, die bei den Versuchstieren zu beobachten war, ist vermutlich auch eine Folge der mangelhaften Wehentätigkeit. Zusätzlich lag aber auch eine verminderte Dehnbarkeit der entsprechenden Gewebe vor.

Die Zeitspanne zwischen Behandlungsbeginn und Geburt entsprach in etwa den Angaben zweier vorausgegangener Studien nach Anwendung des Antigestagens Mifepriston am 277. und 278. Graviditätstag. In diesen trat die Geburt bei Kühen bzw. Färsen einer Fleischrinderrasse 55 ± 3 Stunden bzw. 43 ± 7 Stunden nach Behandlungsbeginn ein (LI ET AL. 1991b; DLAMINI ET AL. 1995). Jedoch war die Antigestagenbehandlung in keiner der beiden Studien mit einer erhöhten Inzidenz an Dystokien verbunden. Bei primiparen Tieren wurde diese durch die Behandlung sogar reduziert.

Entgegen der eigenen Arbeitshypothese entwickelten alle drei Antigestagen-behandelten Kühe eine Retentio secundinarum. Dagegen war die Häufigkeit der Nachgeburtverhaltungen in den beiden oben genannten Studien bei den multiparen Kühen nicht und bei den Erstgebärenden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren mit zwei von sieben Tieren lediglich geringgradig erhöht. Die Autoren dieser Studien definierten zwar eine Retention der fetalen Membranen über mehr als 24 Stunden als

Nachgeburtshaltung, doch auch nach dieser Definition waren alle Antigestagen-behandelten Tiere der eigenen Arbeit betroffen.

Die bedeutenden Unterschiede bezüglich Geburtsverlauf und Nachgeburtshaltung sind möglicherweise auf die Wahl eines früheren Behandlungszeitpunkts in der vorliegenden Studie zurückzuführen. Während Li et al. (1991b) und Dlamini et al. (1995) die Behandlung am 277. Graviditätstag begannen, wurde in der eigenen Arbeit die erste Aglepristonbehandlung am 270. Tag durchgeführt. Absicht war vor dem Eintritt anderer geburtsassoziiierter Vorgänge speziell die durch den P₄-Entzug bedingten Effekte zu untersuchen. Wie die Progesteronmessungen bei den Tieren der Gruppe D272+Ap bestätigten, hatte bis zu Beginn der Antigestagenbehandlung der präpartale P₄-Abfall noch nicht stattgefunden und entsprechend stand eine Spontangeburt nicht unmittelbar bevor. Auch wenn die mittlere Trächtigkeitsdauer der von Li et al. (1991b) und Dlamini et al. (1995) verwendeten Rinderrasse (Kühe: 286 ± 2,3 Tage; Färsen: 284 ± 1,4 Tage) länger ist als die durchschnittliche Tragzeit der in der eigenen Arbeit eingesetzten Holstein-Kühe (280,5 ± 1,7 Tage), sind die beobachteten Differenzen vermutlich auf eine unterschiedliche „Geburtsreife“ bei Behandlungsbeginn zurückzuführen. Entsprechend beobachteten Peters und Poole (1992), dass der Verlauf medikamentell eingeleiteter Geburten stark vom Behandlungszeitpunkt abhängt. Sie induzierten die Geburten bei Holstein-Friesian Kühen mit Dexamethason am 269. bzw. 278. Trächtigkeitstag, das heißt, 14 bzw. 5 Tage vor dem erwarteten Geburtstermin. Die Geburt fand durchschnittlich 59 Stunden nach der frühen Behandlung und 42 Stunden nach der späteren Behandlung statt. Der frühere Behandlungszeitpunkt entsprach in etwa dem der vorliegenden Arbeit (Behandlungsbeginn am 270. Tag). Er ging mit einem deutlich reduzierten Geburtsgewicht der Kälber und einer hohen Inzidenz an Nachgeburtshaltungen einher. So retinierten über 80 % der Versuchstiere die Nachgeburten länger als vier Tage. Außerdem war bei einem Drittel der Tiere aufgrund mangelhafter Erweichung und Weitung des weichen Geburtsweges manuelle Geburtshilfe erforderlich. Dagegen führte die spätere Behandlung zur Geburt normalgewichtiger Kälber und zu einer mit 38 % deutlich geringeren Inzidenz an Nachgeburtshaltungen (PETERS UND POOLE 1992). Dystokien traten bei diesen Tieren nicht vermehrt auf.

Eine gewisse Prä maturität bzw. eine herabgesetzte Vitalität waren sowohl bei den Kälbern der Gruppen D272+Ap als auch bei denen der Gruppe D272-Ap zu beo-

bachten. Offensichtlich handelt es sich hier um Folgen einer vorzeitigen Beendigung der Gravidität und nicht um spezifische, auf die Antigestagenbehandlung zurückzuführende Effekte.

Im Einklang mit den eigenen Beobachtungen zum Geburtsverlauf führte die Verabreichung von Mifepriston an vier Hündinnen zwischen 50. und 57. (physiologische Trächtigkeitsdauer 63 ± 2 Tage) zu einer Öffnung der Zervix. Spontane Wehentätigkeit war nur bei einer der Hündinnen zu verzeichnen. Diese führte lediglich zur Geburt eines einzigen Welpen. Bei allen Hündinnen musste die Geburt durch Schnittentbindungen beendet werden (NOHR 1993; NOHR ET AL. 1993; HOFFMANN ET AL. 1999). Baan et al. (2005) beschrieben dagegen unbeeinträchtigte Geburten bei Hündinnen nach Aglepristonbehandlung am 58. Graviditätstag. Zwar wurde in dieser Studie bei Bedarf manuell eingegriffen bzw. Oxytocin appliziert, die Anzahl der erforderlichen Interventionen unterschied sich aber nicht von der, die bei unbehandelten Kontrolltieren angebracht erschienen.

Eine mangelhafte Myometriumsaktivität tritt offensichtlich bevorzugt bei präterminal induzierten Geburten auf. Vermutlich besteht zu den frühen Behandlungszeitpunkten ein Mangel an uterotonen Substanzen (Oxytocin oder $\text{PGF}_{2\alpha}$), deren Rezeptoren bzw. anderen kontraktionsassoziierten Proteinen.

Untersuchungen zur myometrialen Expression kontraktionsassoziierter Proteine, wie FP, Oxytocinrezeptoren und Connexin 43 konnten im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durchgeführt werden, da entsprechende Proben nicht zur Verfügung standen. Die P_4 -vermittelte Hemmung der Expression dieser Proteine während der Gravidität erfolgt auf genomischer Ebene (MESIANO UND WELSH 2007). Folglich ist anzunehmen, dass diese Hemmwirkung durch die Aglepristonbehandlung aufgehoben wurde. Des Weiteren waren Östrogene, welche die Expression kontraktionsassoziierter Proteine ante partum stimulieren (CHALLIS ET AL. 1997; WHITTLE ET AL. 2001), auch nach Aglepristonbehandlung, in nahezu unverändert hohen Konzentrationen im maternalen Blut vorhanden (siehe Abschnitt 4.6.1). Beides spricht gegen einen Mangel an myometrialen, kontraktionsassoziierten Proteinen. Offensichtlich ist die beobachtete Wehenschwäche auf eine unzureichende Verfügbarkeit bzw. Ausschüttung uterotoner Substanzen zurückzuführen. Da Oxytocin normalerweise erst nach Eintritt der Frucht in die Zervix bzw.

in den Vaginalkanal in wehenfördernden Mengen freigesetzt wird (Ferguson-Reflex) (AURICH UND AURICH 1994, HOFFMANN 1994), ist ein absoluter Oxytocinmangel als Ursache der beobachteten Wehenschwäche eher unwahrscheinlich.

Ein absoluter Mangel an $\text{PGF}_{2\alpha}$ ist dagegen eher wahrscheinlich und passt zu den relativ niedrigen PGFM-Konzentrationen, die im maternalen Plasma zum Zeitpunkt des Auszugs der Kälber gemessen wurden (siehe Abschnitt 5.4).

Neben der Öffnung der Zervix wurde durch die Verabreichung von Aglepriston offensichtlich auch die zweite Phase der Laktogenese induziert. Bei zwei Tieren der Behandlungsgruppe wurde bereits beim Auszug der Kälber ein spontaner Abgang größerer Milchmengen beobachtet. Beim Anmelken unmittelbar nach dem Auszug wurde festgestellt, dass alle Tiere der Behandlungsgruppe laktierten. Das Einsetzen der Laktation ist auf den Wegfall der P_4 -Wirkung zurückzuführen. Dieser führt zu einem Anstieg der Prolaktinfreisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen, wodurch die Synthese spezifischer Milchbestandteile einsetzt (BRUCKMAIER 2007).

Entsprechend war die Antigestagenapplikation zur Abort- bzw. Geburtseinleitung bei der Hündin mit einem Anstieg der Prolaktinplasmakonzentrationen ca. 24 Stunden nach Behandlungsbeginn verbunden (GALAC ET AL. 2000; FIENI ET AL. 2001). Galac et al. (2000) vermuten, dass der Prolaktinanstieg nach Aglepristonbehandlung auf die Blockade zentraler PR zurückzuführen ist. Außerdem wurde die Anbildung der Milchdrüse nach Antigestagenbehandlung bei zyklischen Hündinnen beschrieben, die während der Lutealphase eine Pseudogravidität durchliefen (GERRES UND HOFFMANN 1994). Insgesamt zeigen die eigenen sowie die beim Hund dargestellten Beobachtungen, dass der P_4 -Entzug von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Funktion der Milchdrüse ist.

Bei den Kühen der Gruppe 272-Ap setzte die Laktation erst zwei bis drei Tage nach der Schnittentbindung ein. Ein zunächst weiterhin erhöhter P_4 -Spiegel aufgrund der noch erhaltenen Lutealfunktion nach dem Kaiserschnitt ist vermutlich die Ursache für den verzögerten Einsatz der Laktogenese bei diesen Tieren.

5.2 Effekte der Antigestagenbehandlung auf den Nachgeburtsabgang und die Plazentareifung

Entgegen der eigenen Hypothese trat trotz des funktionellen Progesteronentzugs bei allen Aglepriston-behandelten Kühen eine mindestens zehn Tage andauernde Nachgeburtsverhaltung auf. Eine manuelle Trennung der Kotyledonen von den Karunkeln im Rahmen der postpartal durchgeführten Abnahmeversuche war kaum möglich. Die Symptomatik der Nachgeburtsverhaltung zeigte keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Aglepriston-behandelten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe (D272-Ap). Offensichtlich wurden die zur Nachgeburtsablösung erforderlichen Mechanismen durch die PR-Blockade nicht induziert.

Die Reduktion des Anteils der TGC an den Trophoblastzellen und die Abflachung bzw. der Verlust des Karunkelepithels sind die markantesten, im Rahmen der Plazentareifung auftretenden, histomorphologischen Veränderungen. Daher wurden diese beiden Parameter als Indikator für den Reifezustand der Plazentome genutzt.

Übereinstimmend mit den klinischen Befunden zeigten auch die histologischen Untersuchungen, dass die morphologische Plazentareifung durch die Antigestagenbehandlung nicht induziert wurde. Sowohl der Anteil der TGC an den Trophoblastzellen als auch die morphometrisch bestimmte Karunkelepithelfläche der Gruppe D272+Ap entsprachen denen der Gruppe D272-Ap. Dagegen konnte in der Normalgeburtsgruppe die bereits beschriebenen präpartalen Veränderungen der Plazentomarchitektur (siehe Abschnitt 2.3) bestätigt werden.

Diese Beobachtungen stellen auch die eigene Hypothese infrage, nach der eine hohe lokale Progesteronkonzentration ein Schlüsselfaktor für den Erhalt der Gewebeintegrität an der feto-maternalen Kontaktzone darstellt. Untersuchungen beim Schaf zeigten, dass der TGC-Abfall durch Glucocorticoide induziert werden kann (WOODING ET AL. 1986; WARD ET AL. 2002; BRAUN ET AL. 2007). Vermutlich ist der präpartale Anstieg der fetalen Cortisolproduktion das physiologische Signal für den Abfall der TGC. Da auch beim Rind das fetale Cortisol eine zentrale Bedeutung für das Eintreten einer physiologischen Geburt hat (siehe Abschnitt 2.7) ist anzunehmen, dass auch bei dieser Spezies ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der fetalen Cortisolproduktion und dem TGC-Abfall besteht.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen insgesamt, dass entgegen der eigenen Arbeitshypothese ein präpartaler Entzug rezeptorvermittelter Progesteronwirkungen nicht alleinige Voraussetzung für den termingerechten Nachgeburtsabgang ist. Dennoch kann eine Bedeutung des Progesteronabfalls für die Ablösung der Nachgeburt nicht völlig ausgeschlossen werden. So wäre denkbar, dass neben dem P₄-Entzug zusätzliche Signale oder Bedingungen erforderlich sind, um die Reifungs- bzw. Ablösungsvorgänge zu ermöglichen, diese aber zum Zeitpunkt der Behandlung noch nicht aufgetreten bzw. gegeben waren. Obwohl die Östrogenprofile (siehe Abschnitt 4.6.1) darauf hindeuten, dass die Trophoblastzellen nach dem Auszug der Kälber noch ein bis zwei Tage vital waren, fand eine zum Nachgeburtsabgang führende „Nachreifung“ in diesem Zeitraum nicht statt. Diese Beobachtung legt die Schlussfolgerung nahe, dass die zur Plazentaablösung führenden Signale im Wesentlichen vom „eigentlichen Fetus“ stammen bzw. im Falle eines plazentaren Ursprungs an einen intakten fetoplazentaren Kreislauf gebunden sind.

5.3 Diskussion der Steroidhormonprofile im maternalen Blutplasma

Wie bereits von Li et al. (1991b) und Dlamini et al. (1995) beschrieben, führte die Antigestagenbehandlung auch bei den eigenen Versuchstieren zur Regression des Corpus luteum graviditatis. Die plazentare Östrogensynthese wurde durch die Behandlung offensichtlich nicht beeinträchtigt. Sie blieb sogar nach dem Auszug der Kälber noch ein bis zwei Tage erhalten.

Erkennbar an einem deutlichen Abfall der Progesteronwerte war die Luteolyse bei zwei Tieren zum Zeitpunkt des Auszugs bereits weit fortgeschritten. Beim dritten Tier der Behandlungsgruppe begann der Progesteronabfall zwar erst unmittelbar nach dem Auszug des Kalbes, er trat damit aber immer noch deutlich früher ein als bei den unbehandelten Kontrolltieren. Bei letzteren fand der Abfall der Progesteronkonzentrationen frühestens zwölf Stunden nach dem Kaiserschnitt statt. Dabei war bei zwei Kühen dieser Gruppe ein deutlicher P₄-Abfall erst nach der Behandlung mit einem Prostaglandinanalogen zu beobachten.

Welcher Mechanismus der Antigestagen-induzierten Luteolyse zugrunde lag, ist unklar. In Frage kommen direkte Effekte durch die Blockade lutealer PR oder die Induktion der Synthese luteolytischer Prostaglandine.

Neben dem Luteinisierenden Hormon (LH), verschiedenen Wachstumsfaktoren, Prostaglandinen und Oxytocin ist P_4 selbst an der Regulation der Gelbkörperfunktion beim Rind beteiligt. So verhindert P_4 die Apoptose von bovinen Lutealzellen. Es führt zu einer reduzierten Aktivität der Caspase-3. Diese ist jedoch entscheidend für das Eintreten der Apoptose (REKAWIECKI ET AL. 2008). Entsprechend reduzieren PR-Blocker die Überlebensfähigkeit der Lutealzellen in vitro (SKARZYNSKI ET AL. 2008). In murinen Granulosazellen konnte gezeigt werden, dass RU 38486 zur Downregulation des Progesteronrezeptors und zu einer gesteigerten Aktivität der Caspase-3 führt (REKAWIECKI ET AL. 2008).

Bei der Hündin konnte nach Abortinduktion mit einem Antigestagen, neben dem Abfall der P_4 -Plasmawerte, eine signifikante Reduktion der 3β -HSD und der StAR-Expression im Corpus luteum nachgewiesen werden (KOWALEWSKI ET AL. 2009). Beide sind jedoch für die luteale P_4 -Synthese essentiell. Entsprechend wird in bovinen Lutealzellen, welche zwischen dem sechsten und dem zehnten Zyklustag entnommen wurden, durch P_4 die 3β -HSD und StAR aufreguliert. Antigestagene zeigten gegenteilige Wirkung (REKAWIECKI ET AL. 2008). P_4 stimuliert somit offensichtlich seine eigene Synthese durch Aufregulation der 3β -HSD und von StAR im Gelbkörper. Demnach besteht ein positiver Feedbackmechanismus. Außerdem stimuliert P_4 die Synthese von PGE_2 im bovinen Corpus luteum, welches P_4 -synergistisch wirkt (REKAWIECKI ET AL. 2008).

Neben Uterus und Plazenta ist auch das bovine Corpus luteum selbst zur $PGF_{2\alpha}$ -Synthese befähigt. Die $PGF_{2\alpha}$ -Synthese in den Lutealzellen wird durch P_4 gehemmt (DIAZ ET AL. 2002). Vermutlich ist auch die P_4 -vermittelte Hemmung der lutealen $PGF_{2\alpha}$ -Synthese eine Komponente der antiluteolytischen P_4 -Wirkung. Insgesamt weisen diese Beobachtungen auf eine Bedeutung von P_4 als auto- bzw. parakriner Regelfaktor der Corpus luteum-Funktion hin. P_4 hat offensichtlich luteotrope Eigenschaften. Möglicherweise führte die Aglepristonbehandlung, durch Ausschaltung der luteotropen P_4 -Wirkung, zu einer vermehrten Bildung von lutealem $PGF_{2\alpha}$ und zur Aufregulation der Caspase-3 im Gelbkörper.

Ähnlich wie beim Rind wurde auch bei Schwein (LI ET AL. 1991a) und Hund (KOWALEWSKI ET AL. 2009) im Rahmen Antigestagen-induzierter Geburten eine, offensichtlich durch die Behandlung induzierte, Luteolyse beobachtet.

Nach Antigestagenbehandlung hysterektomierter Sauen mit aktivem Gelbkörper kam es dagegen zu einem Anstieg der P_4 -Konzentration im Blut (LI ET AL. 1991a). Auch bei hysterektomierten Hündinnen wurde die Funktion des Gelbkörpers durch die PR-Blockade offensichtlich nicht beeinträchtigt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Antigestagen-induzierte P_4 -Abfall an das Vorhandensein des Uterus gebunden ist (HOFFMANN UND SCHULER 2000). Beim Rind konnte nach Induktion eines Frühaborts mit Aglepriston sogar ein mehrtägiger Anstieg der P_4 -Plasmapwerte verzeichnet werden (BREUKELMAN ET AL. 2005). Daraus wird ersichtlich, dass eine Antigestagen-induzierte Luteolyse beim trächtigen Rind an bestimmte Bedingungen gebunden ist, die nur in fortgeschrittenen Stadien der Gravidität gegeben sind.

5.4 Diskussion der PGFM-Konzentrationen im maternalen Blutplasma und der Cox II-Expression im Trophoblasten

Nach der Antigestagenbehandlung kam es zwar zu einem Anstieg der PGFM-Konzentrationen im maternalen Blutplasma, die Werte waren aber zum Zeitpunkt des Auszugs mit $2,14 \pm 1,40$ ng/ml deutlich niedriger als während der Normalgeburten. Maximale Konzentrationen wurden bei den Aglepriston-behandelten Tieren erst ca. 20 Stunden später erreicht. Dagegen fanden die Normalgeburten bei Maximalwerten ($8,70 \pm 2,20$ ng/ml) statt, während die PGFM-Konzentrationen bereits 12 Stunden nach der Geburt wieder deutlich abgefallen waren.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ein Mangel an uterotonen Prostaglandinen zum Geburtszeitpunkt für die Wehenschwäche der Aglepriston-behandelten Tiere verantwortlich war. Übereinstimmend mit den eigenen Beobachtungen beschrieben Nohr et al. (1993) nach präterminaler Geburtseinleitung mit Mifepriston bei der Hündin eine vollständige Öffnung der Zervix in Kombination mit einer unzureichenden Wehentätigkeit (siehe Abschnitt 5.1). Auch der bei Spontan-geburten zu beobachtende, massive prä- und intrapartale Anstieg der PGFM-Konzentrationen blieb bei den Antigestagen-induzierten Geburten aus.

Oxytocin ist beim Rind wahrscheinlich auch während der Spätphase der Gravidität bzw. peripartal an der Regulation der $PGF_{2\alpha}$ -Freisetzung beteiligt (siehe Abschnitt 2.7). Möglicherweise ist die Ursache des Prostaglandinmangels, wie im Folgenden erörtert, auf dieser Regulationsebene zu suchen.

P₄ führt während der Gravidität zur Ruhigstellung des Myometriums durch direkte und indirekte Hemmung der Expression kontraktionsassoziiertes Proteine (MESIANO UND WELSH 2007). Es unterbindet die Östrogen-induzierte Aufregulation von Oxytocinrezeptoren im Endometrium. Somit kann die Oxytocin-induzierte Bildung von PGF_{2α} nicht stattfinden. Hier handelt es sich um eine genomische, rezeptorvermittelte Wirkung von P₄, die durch PR-Blocker verhindert werden kann. Möglicherweise unterbindet P₄ aber auch auf nicht-genomischer Ebene die Oxytocin-induzierte PGF_{2α}-Freisetzung während der Gravidität. Dieses Phänomen wurde bereits in Endometriumszellen zyklischer Kühe in vitro beobachtet und ist wahrscheinlich auf die Hemmung der Interaktion von Oxytocin mit seinem Rezeptor zurückzuführen (BOGACKI ET AL. 2002; GRAZZINI ET AL. 1998) (siehe Abschnitt 2.4.3). Diese nicht-genomischen Effekte sind durch die PR-Blockade nicht auszuschalten.

Da die P₄-Konzentrationen bei allen drei Tieren der Gruppe D272+Ap zum Zeitpunkt des Auszugs noch über dem Basalniveau lagen, wäre denkbar, dass noch zirkulierendes P₄ die Oxytocinwirkung auf nicht-genomischer Ebene unterband. Durch die mangelhafte Oxytocinwirkung könnte wiederum die Oxytocin-induzierte PGF_{2α}-Bildung eingeschränkt gewesen sein.

Es bleibt die Frage, warum die Tiere in den vorausgegangenen Studien von Li et al. (1991b) und Dlamini et al (1995) keine Beeinträchtigung der myometrialen Aktivität zeigten. In diesen Studien waren die P₄-Konzentrationen zum Geburtszeitpunkt bereits auf Basalniveau abgefallen. Nicht-genomische P₄-Wirkungen waren daher ausgeschlossen. Demnach könnten die Unterschiede der P₄-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Geburt bzw. des Auszugs den unterschiedlichen Geburtsverlauf in den Studien erklären.

Ob der leichte, präpartale PGFM-Anstieg bei den Aglepriston-behandelten Kühen mit der Luteolyse in Verbindung steht und von welchen Zellen das nachgewiesene PGFM gebildet wurde, bleibt unklar. Bei zyklischen Rindern führt endometriales PGF_{2α} zur Luteolyse. Allgemein wird angenommen, dass auch die präpartale Luteolyse beim Rind durch PGF_{2α} induziert wird. Die zugrunde liegenden Mechanismen sowie der Ursprung der luteolytischen Prostaglandine sind jedoch nicht hinreichend bekannt (siehe Abschnitt 2.6.1 und Abschnitt 2.7). Beim graviden Rind kommt es unmittelbar präpartal, jedoch noch vor dem Progesteronabfall zu einer starken

Aufregulation der Cox II in den UTC. Da diese Zellen auch die Aldo-Ketoreduktase 1B5 (AKR1B5), ein Enzym mit starker Prostaglandin-F-Synthase-Aktivität, exprimieren, vermuteten Schuler et al. (2006b), dass die präpartale Luteolyse durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus dem Trophoblasten induziert wird (siehe Abschnitt 2.6.1). Eine deutliche präpartale Aufregulation der Cox II im Trophoblasten konnte bei den Tieren der Normalgeburtsgruppe in dieser Studie sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eindeutig bestätigt werden. Bei den Tieren der Gruppe D272+Ap war jedoch, wie bei der Gruppe D272-Ap, nur eine moderate Expression nachweisbar. Trotzdem kam es bei den mit Aglepriston behandelten Tieren zur Luteolyse. Es stellt sich die Frage, ob bei den Aglepriston-behandelten Tieren die luteolytischen Prostaglandine, zumindest teilweise, extraplazentaren (z.B. lutealen oder endometrialen) Ursprungs waren oder ob andere Mechanismen, wie die Blockade lutealer PR (siehe Abschnitt 5.3), bei diesen Tieren zur Luteolyse geführt haben.

Entsprechend der Ergebnisse von Schuler et al. (2006b) zeigten Fuchs et al. (1999) mittels RNase-Protection-Assay, dass die Cox II im graviden Uterus überwiegend in den Kotyledonen exprimiert wird und dort eine deutliche präpartale Aufregulation stattfindet. Sie konnten Cox II-spezifische mRNA zwar auch in den Karunkeln nachweisen. Diese stammte aber offensichtlich von Chorionzottenresten, welche bei der Präparation in den maternalen Krypten zurückgeblieben waren. In Endo- und Myometrium konnte bis zum Geburtszeitpunkt kaum Cox II-mRNA detektiert werden. Im Endometrium stieg die Expression erst einige Stunden nach der Geburt, dann aber um ein Vielfaches an. Auch Wehbrink et al. (2008) wiesen lediglich eine schwache Cox II-Immunoreaktivität im interkarunkulären Endometriumsepithel während der Spätgravidität nach. Sie stieg peripartal an und erreichte unmittelbar nach der Geburt Maximalwerte. Die zugrunde liegenden Regelmechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Fuchs et al. (1999) vermuten, dass der Stimulus für die postpartale Cox II-Aufregulation im Endometrium von Zellen des Immunsystems ausgeht, welche aufgrund der Gewebetraumatisierung während der Geburt in den Uterus eingewandert sind.

Möglicherweise wird die Cox II-Expression im interkarunkulären Endometrium auch indirekt durch einen Progesteronenzug stimuliert. Eine direkte Beeinflussung der endometrialen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese durch P_4 ist nicht zu erwarten, weil im Epithel des interkarunkulären Endometriums in fortgeschrittenen Graviditätsstadien keine PR

exprimiert werden (BOOS ET AL. 2006; SCHÄUBLI ET AL. 2008). Vorstellbar wäre aber, dass erst der P_4 -Abfall vor Normalgeburten eine Oxytocin- induzierte $PGF_{2\alpha}$ -Synthese im interkarunklären Endometrium ermöglicht, welche mit einer Aufregulation der Cox II im Endometriumsepithel einhergeht. Entsprechend wäre denkbar, dass der PGFM-Anstieg nach Aglepristonbehandlung, welcher in Abwesenheit einer nachweisbaren Aufregulation der Cox II im Trophoblasten auftrat, auf eine vermehrte Bildung von $PGF_{2\alpha}$ im interkarunklären Endometrium zurückzuführen ist.

Untersuchungen zur Verifizierung dieser Hypothesen konnten jedoch nicht durchgeführt werden, da entsprechendes Probenmaterial nicht zur Verfügung stand.

Fuchs et al. (1999) konnten eine Aufregulation der Cox II im interkarunkulären Endometrium nach Oxytocinapplikation im letzten Trimester der Gravidität feststellen. Parallel stiegen die PGFM-Konzentrationen im Blut an. Diese Beobachtungen bestätigen, dass Oxytocin die $PGF_{2\alpha}$ -Synthese im interkarunkulären Endometrium induziert. Die Versuchstiere dieser Studie waren zum Behandlungszeitpunkt zwischen dem 230. und dem 270. Graviditätstag und hatten demnach P_4 -Plasmakonzentrationen, die deutlich über dem Basalwert lagen. Trotzdem konnte durch Oxytocin die $PGF_{2\alpha}$ -Synthese im Endometrium stimuliert werden. Folglich unterband Progesteron die Oxytocin-induzierte $PGF_{2\alpha}$ -Synthese bei diesen Tieren zumindest nicht vollständig. In diesem Zusammenhang muss allerdings berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Oxytocindosen höher waren als die Mengen an hypophysärem Oxytocin, die nach physiologischen Stimuli freigesetzt werden (FUCHS ET AL. 1999). Ob die Oxytocinbehandlung auch die Prostaglandinsynthese im Trophoblasten beeinflusste, sowie etwaige Effekte auf die Gelbkörperfunktion wurden nicht untersucht.

Bei der Geburtsinduktion des Schafes sind offensichtlich beide Prostaglandinquellen, Trophoblast und interkarunkuläres Endometrium von Bedeutung. Sie unterliegen verschiedenen Regulationsmechanismen. So stimuliert der präpartale Anstieg der fetalen Cortisolproduktion die Cox II-Synthese in den UTC, wodurch wiederum vermehrt PGE_2 gebildet wird (CHALLIS ET AL. 1997; WHITTLE ET AL. 2000). Das plazentare PGE_2 ist überwiegend in der fetalen Zirkulation nachweisbar. Es wird für die Umschaltung der plazentaren Steroidbiosynthese von P_4 auf Östrogene verantwortlich gemacht. Wahrscheinlich reguliert es auf auto- bzw. parakrinem Wege die

Expression der 17 α -Hydroxylase im Trophoblasten auf (CHALLIS ET AL. 1997; WHITTLE ET AL. 2006), wodurch es zu einer verstärkten Bildung plazentarer Östrogenen kommt. Außerdem wirkt es positiv rückkoppelnd auf die fetale Cortisolproduktion (WHITTLE ET AL. 2001).

Die endometriale Expression der Cox II und die daraus resultierende PGF_{2 α} -Synthese findet nur unter Anwesenheit von erhöhten Östrogenkonzentrationen statt. Sie wird durch den Anstieg von PGFM im maternalen Blut widerspiegelt. Anders als beim Rind ist beim spätgraviden Schaf die Plazenta Hauptprogesteronquelle und der präpartale Progesteronabfall erfordert keine Luteolyse. Dem endometrialen PGF_{2 α} wird beim Schaf im Zusammenhang mit der Geburt daher ausschließlich eine kontraktionsfördernde Wirkung auf das Myometrium zugesprochen. Für die Entstehung von Wehen, die bezüglich Frequenz und Amplitude einer normalen Geburt entsprechen, sind Prostaglandine beider Quellen erforderlich (WHITTLE ET AL. 2000). Dabei stimuliert PGE₂ indirekt, durch die Steigerung der plazentaren Östrogensynthese, die Bildung kontraktionsfördernder Proteine, während PGF_{2 α} selbst uterotone Wirkung hat.

Inwieweit dieses beim Schaf etablierte Modell – abgesehen von den unterschiedlichen Mechanismen des präpartalen Progesteronentzugs – auf das Rind übertragen werden kann, ist unklar. Auffällig ist, dass sich im maternalen Blut beim Rind in den letzten Tagen vor der Geburt die Konzentrationen freier und konjugierter Östrogene kaum ändern. Beim Schaf dagegen kommt es in den letzten Stunden vor dem Geburtseintritt zu einem steilen Anstieg der maternalen Östrogenkonzentrationen (TSANG 1974), welcher, wie oben dargestellt, als essentieller Stimulator der uterinen Prostaglandinsynthese angesehen wird.

Bei den unbehandelten Kontrolltieren verliefen die PGFM-Konzentrationen bis zur Schnittentbindung auf einem konstanten niedrigen Niveau. Bei allen Tieren dieser Gruppe war erst nach der Verabreichung des PGF_{2 α} -Analogons Cloprostenol ein steiler Anstieg der maternalen PGFM-Konzentrationen zu erkennen. Da ungefähr zeitgleich mit dem PGFM-Anstieg der Abfall der Progesteronkonzentrationen erfolgte, kann nicht beurteilt werden, ob der PGFM-Anstieg ein direkter Effekt der Cloprostenolapplikation im Sinne einer positiven Rückkopplung war oder sekundär durch den Progesteronabfall induziert wurde. Passend zu einem direkten Prostaglandin-Effekt beobachteten Wehbrink et al. (2008) nach Injektion eines

PGF_{2α}-Analogons während der Spätgravidität eine verstärkte Expression der Cox II im interkarunkulären Endometriumsepithel. Des Weiteren führt PGF_{2α} zur Aufregulation der Cox II im bovinen Corpus luteum cyclicum und folglich zur lutealen PGF_{2α}-Synthese (DIAZ ET AL. 2002). Vermutlich sind diese stimulierenden Effekte über FP-Rezeptoren vermittelt, denn auch diese werden nach einer Prostaglandinbehandlung spätgravider Kühe im luminalen Epithel und im Drüsenepithel sowie im Myometrium verstärkt exprimiert (WEHBRINK ET AL. 2008).

5.5 Diskussion der PR- und GR-Expression

Die eigenen immunhistologischen Untersuchungen bestätigen im Wesentlichen frühere Ergebnisse von Schuler et al. (1999) sowie von Boos et al. (2000), nach denen in den Plazentomen der PR hauptsächlich in den Karunkelstromazellen und daneben in schwächerem Umfang auch in maternalen Gefäßendothelien und -perizyten exprimiert wird. Im Unterschied zu den Beobachtungen von Schuler et al. (1999), die in den Kotyledonen keine eindeutigen Signale beobachteten, fanden sich bei den eigenen Untersuchungen auch vereinzelt Signale in fetalen Gefäßendothelien.

In den eigenen Untersuchungen betrug der Anteil positiver Karunkelstromazellkerne bei allen drei Gruppen etwa 65 %. Dies entspricht annähernd den von Schuler et al. (1999) bei spätgraviden bzw. intrapartalen Tieren ermittelten Werten. Auf mRNA-Ebene konnten dagegen Gruppenunterschiede festgestellt werden. So war die mittlere relative Genexpression in der Normalgeburtstgruppe mit $4,39 \times 1,34^{\pm 1}$ höher als in der Gruppe D272+Ap ($1,34 \times 1,64^{\pm 1}$) und der Gruppe D272-Ap ($1,90 \times 2,09^{\pm 1}$), wobei der Unterschied zwischen der Normalgeburtstgruppe und der Gruppe D272+Ap statistisch signifikant war ($p < 0,05$). Dieser Unterschied zwischen den Ergebnissen auf mRNA- und Proteinebene lässt sich dadurch erklären, dass bei der Auswertung der Immunfärbung lediglich der Anteil positiver Zellen, nicht jedoch die Signalintensität erfasst wurde. Bereits Schuler et al. (1999) berichteten, dass unter der Geburt die Signale in den Karunkelstromazellen von deutlich stärkerer Intensität waren als während der Gravidität. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass keine wesentliche Beeinflussung der PR-Konzentration durch die Antigestagenbehandlung stattfand.

Über das Vorkommen und die Bedeutung unterschiedlicher PR-Isoformen beim Rind liegen bisher keine umfangreichen Informationen vor. Auf Proteinebene konnten mittels Western Blot zwei verschiedene PR-Varianten (PR-A und PR-B; MG 82 kDa bzw. 116 kDa) im Endometrium und im Corpus luteum zyklischer und frühgravider Rinder detektiert werden (KOTWICA ET AL. 2004). Dabei variierte das Verhältnis der beiden Isoformen zueinander abhängig vom Zyklusstadium. Schams et al. (2003) detektieren in der Milchdrüse nicht-tragender Kühe auf Proteinebene drei Isoformen (PR-A, PR-B, PR-C; MG 92 kDa, 116 kDa und 65 kDa), wobei das Molekulargewicht von PR-A mit 92 kDa (SCHAMS ET AL. 2003) bzw. 82 kDa (KOTWICA ET AL. 2004) in beiden Studien geringgradig differierte. Im Euter laktierender Kühe war nur PR-B nachweisbar. Die eingesetzten Antikörper waren gegen den C-Terminus des humanen PRs gerichtet. Aufgrund der hohen Homologie dieser Rezeptorregion ist aber von einer Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper auszugehen. Demnach gibt es auch beim Rind verschiedene PR-Isoformen die vermutlich, wie beim Menschen, unterschiedliche transkriptionelle Aktivität aufweisen.

In der vorliegenden Studie wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene Nachweisverfahren verwendet, die keine Unterscheidung verschiedener PR-Isoformen erlaubten. Ein Einfluss der Antigestagenbehandlung auf das Verhältnis der beiden PR-Isoformen zueinander kann demnach nicht ausgeschlossen werden.

Es gilt als weitgehend gesichert, dass, ähnlich den Verhältnissen beim Schaf, auch beim Rind der präpartale Anstieg der fetalen Cortisolproduktion ein frühes Signal innerhalb der zur Geburt führenden Ereigniskette darstellt. Daher wurde die Expression des GR in den Plazentomen der Versuchstiere auf mRNA- und Proteinebene charakterisiert. Wie von Boos et al. (2000) beschrieben, wurde der GR immunhistologisch in den Kernen mehrerer Zelltypen der Plazentome lokalisiert, wobei die Expression in den Karunkelepithelzellen und in den TGC bei weitem dominierten. Die semiquantitative Evaluierung der Signalintensität dieser Zelltypen nach immunhistologischer Färbung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen D272+Ap und D272-Ap. Entsprechend differierte die relative Genexpression dieser Gruppen weder in den Kotyledonen noch in den Karunkeln. Aus diesen Untersuchungen ergaben sich somit keine Hinweise auf eine Beeinflussung der GR-Expression durch die Antigestagenbehandlung.

Die Quantifizierung der GR-spezifischen mRNA in den Karunkeln ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen, obwohl das Karunkelepithel unter der Geburt bereits deutlich reduziert war. In den Kotyledonen der Normalgeburtsgruppe war, trotz deutlicher Reduktion der TGC-Anzahl, die relative GR-Expression sogar höher als in den beiden anderen Gruppen, wobei der Unterschied zwischen der Normalgeburtsgruppe und der Gruppe D272+Ap signifikant war. Dies deutet darauf hin, dass unter der Geburt der GR in den noch vorhandenen Trophoblastzellen deutlich stärker exprimiert wird als während der Spätgravidität. Die Beobachtungen lassen einen Zusammenhang zwischen dem präpartalen Cortisolanstieg, einer Aufregulation des GRs in TGC und Karunkelepithelzellen und der Plazentareifung bzw. dem Nachgeburtsabgang vermuten. Entsprechend haben Untersuchungen am Schaf gezeigt, dass durch die Applikation von Glucocorticoiden in der späten Gravidität ein deutlicher Abfall der TGC induziert werden kann (siehe Abschnitt 5.2). Gegen die Hypothese einer Bedeutung der Glucocorticoide für die Plazentareifung beim Rind spricht allerdings, dass nach Glucocorticoid-induzierten Geburten häufig Nachgeburtsverhaltungen auftreten (GROSS ET AL. 1986; LAVEN UND PETERS 1996; BEAGLEY ET AL. 2010).

Beim Rind setzt, anders als beim Schaf, die Auslösung der Geburt die Regression des Corpus luteum graviditatis voraus. Diese wird offensichtlich indirekt durch die fetalen Glucocorticoide initiiert (siehe Abschnitt 2.7) und ein Zusammenhang zwischen der fetalen Cortisolproduktion und dem präpartalen Anstieg der placentaren Cox II-Expression bzw. PGF_{2α}-Synthese ist nahe liegend.

Beim Schaf existieren peripartal, wie in Abschnitt 5.4 dargestellt, offensichtlich zwei bedeutende Cox II-Quellen: das Endometrium und der Trophoblast. Whittle et al. (2006) führt die Unterschiede bezüglich der Regulation der placentaren bzw. endometrialen Cox II-Expression beim Schaf auf das differierende Expressionsmuster von Östrogen- und Glucocorticoidrezeptoren in den entsprechenden Geweben zurück. So konnten sie die Östrogenrezeptoren α und β sowie die Cox II im Endometrium nachweisen, während der GR in den UTC detektiert wurde. Folglich wird der GR in der ovinen Plazenta mit der Cox II in den UTC coexprimiert. Es ist anzunehmen, dass fetales Cortisol direkt die Prostaglandinsynthese im Trophoblasten stimuliert, während die endometriale PGF_{2α}-Synthese indirekt durch die gesteigerte Östrogenproduktion ausgelöst wird (WHITTLE ET AL. 2001).

Im Trophoblasten des Rindes konnte der GR immunhistologisch jedoch überwiegend in den TGC lokalisiert werden. Die UTC reagierten dagegen nur schwach positiv oder negativ. Die Cox II ist jedoch nur in den UTC, nicht jedoch in den TGC nachweisbar. Falls auch beim Rind die präpartale Aufregulation der Cox II in den UTC durch fetales Cortisol stimuliert wird, müsste dieser Effekt über parakrine Faktoren vermittelt werden, welche die TGC nach Stimulation ihrer GR ausschütten.

5.6 Schlussfolgerungen

Nach Verabreichung des Progesteronrezeptor-Blockers Aglepriston an hochgravide Rinder konnte nur ein geringer Teil der geburtsassoziierten Veränderungen beobachtet werden, nämlich die Öffnung der Zervix und das Einsetzen der Laktation. Eine Umstrukturierung der Plazentome im Sinne einer „Plazentareifung“ fand nach der Antigestagenbehandlung nicht statt. Auch der Einsatz einer adäquaten Wehentätigkeit und eine ausreichende Erweichung des kaudalen weichen Geburtsweges blieben aus. Überraschenderweise führte die Blockade der Progesteronrezeptoren zu einer Luteolyse. Der in Verbindung mit der Luteolyse beobachtete Anstieg von PGFM im maternalen Blut, ohne parallele Aufregulation der Cox II im Trophoblasten, lässt eine extraplazentare Quelle luteolytischer Prostaglandine bei den mit Aglepriston behandelten Tieren vermuten, wobei insbesondere das interkarunkuläre Endometrium infrage kommt. Daneben oder alternativ könnte eine Antigestagenbedingte Unterbindung auto- bzw. parakriner luteotroper P₄-Effekte im Gelbkörper selbst an dessen Regression beteiligt sein. Möglicherweise verstärkt unter physiologischen Bedingungen, der nach Initiierung der präpartalen Luteolyse einsetzende Progesteronabfall, die Rückbildung des Trächtigkeitsgelbkörpers.

Insgesamt deuten die erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass beim Rind für wesentliche geburtsassoziierte Vorgänge, welche einen physiologischen Geburtsverlauf und einen termingerechten Nachgeburtsabgang ermöglichen, primär Signale aus dem fetalen Kompartiment erforderlich sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Beim Rind wird der präpartale Abfall der maternalen Progesteron (P_4)-Konzentration als wesentliche Voraussetzung für den Eintritt einer physiologischen Geburt angesehen. Präpartale maternale P_4 -Profile spiegeln beim Rind jedoch primär den Funktionsverlust des Trächtigkeitsegelbkörpers wider. Über Dynamik und Bedeutung des Sistierens der plazentaren P_4 -Produktion lagen beim Rind bisher praktisch keine Informationen vor, da die Rinderplazenta in der Endphase der Gravidität kaum noch zu den maternalen P_4 -Spiegeln beiträgt. Vereinzelt Daten aus der Literatur sowie frühere Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe ließen jedoch erkennen, dass die Plazenta auch in der Spätgravidität trotz ihres minimalen Beitrags zu den maternalen P_4 -Spiegeln in der Lage ist, im unmittelbaren Bereich der feto-maternalen Kontaktzone hohe P_4 -Konzentrationen zu erzeugen. Diese könnten, vermittelt über P_4 -Rezeptoren in den maternalen Karunkeln, ein wesentlicher Faktor für die Differenzierung und Funktion der Plazentome sein. Daher wurde die Arbeitshypothese entwickelt, dass der Entzug hoher lokaler P_4 -Konzentrationen, vorwiegend plazentaren Ursprungs, ein wesentliches, übergeordnetes Signal für die Vorbereitung des termingerechten Nachgeburtsabganges darstellt. Entsprechend diesem Konzept könnte ein unvollständiges oder verzögertes Sistieren der plazentaren P_4 -Produktion vor der Geburt eine wesentliche Ursache für das Auftreten idiopathischer Nachgeburtshaltungen sein, die insbesondere bei Milchrindern hohe ökonomische Verluste verursachen. Als experimenteller Ansatz zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde die Verabreichung des Antigestagens Aglepriston (Gruppe D272+Ap, $n = 3$) an gravide Rinder an den Tagen 270 und 271 p. i. (ca. zehn Tage vor dem erwarteten Geburtstermin) gewählt, welches die Ausschaltung rezeptorvermittelter P_4 -Wirkungen unabhängig von der P_4 -Quelle ermöglicht. Als Kontrollen dienten Tiere mit termingerechter spontaner Geburt und termingerechtem Nachgeburtsabgang (Gruppe Normalgeburt, $n = 4$; Trächtigkeitsdauer: $280,5 \pm 1,7$ Tage) sowie unbehandelte Tiere mit Schnittentbindung am Tag 272 (Gruppe D272-Ap, $n = 3$; Charakterisierung der Situation in der Spätgravidität vor dem präpartalen Progesteronabfall). Die Tiere der Gruppe D272+Ap wurden nach Behandlungsbeginn in zweistündigen Intervallen klinisch überwacht und der Geburtsverlauf dokumentiert. Von allen Tieren wurden Blutproben in regelmäßigen Abständen sowie Plazentome unmittelbar im

Anschluss an die Geburt (Gruppen D272+Ap und Normalgeburt) bzw. während der Schnittentbindungen (Gruppe D272-Ap) entnommen. Die Gewebeproben wurden für histologische sowie molekularbiologische Untersuchungen formalinfixiert und in Paraffin eingebettet bzw. bis zur Extraktion von RNA in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. In den Blutproben wurden die Konzentrationen an Progesteron, Estron, Estradiol-17 β sowie Estronsulfat mittels etablierter und validierter radioimmunologischer Verfahren gemessen. Für die Messung der Konzentrationen an 13,14-Dihydro-15-Keto-PGF_{2 α} (PGFM) wurde ein kommerzielles Testkit verwendet. Als Parameter für die präpartale Umstrukturierung der Plazentome wurde der prozentuale Anteil der Trophoblastriesenzellen (Trophoblast Giant Cells, TGC) an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen sowie die Reduktion des Karunkel epithels morphometrisch erfasst. Weiterhin wurde die Expression von Cyclooxygenase II (Cox II), Progesteronrezeptor (PR) und Glucocorticoidrezeptor (GR) auf Protein- und mRNA-Ebene beurteilt (quantitative Auswertung des Färbesignals nach Immunhistologie bzw. Real-Time RT-PCR).

Die Aglepristonbehandlung führte bei allen drei Kühen zu einer vorzeitigen Terminierung der Gravidität. Erste Geburtsanzeichen wie Unruhe, ein Anheben der Schwanzwurzel und das Einsetzen der Bauchpresse traten $46,3 \pm 6,0$ Stunden nach Behandlungsbeginn auf. Die Zervix war zu diesem Zeitpunkt zwar vollständig geöffnet, eine adäquate Wehentätigkeit setzte jedoch innerhalb der folgenden zwei Stunden nicht ein. Folglich wurde ein manueller Auszug der Kälber durchgeführt. Dabei fiel auf, dass der kaudale, weiche Geburtsweg noch sehr rigide war. Alle drei Kühe wiesen – entgegen der eigenen Hypothese – eine komplette Nachgeburtserhaltung auf. Ein Abgang größerer Nachgeburtsteile war in allen Fällen erst zehn Tage später zu beobachten und beruhte offensichtlich eher auf autolytischen Prozessen als auf echten Lösungsvorgängen. Neben der Öffnung der Zervix wurde die Laktogenese durch das Antigestagen induziert. So war bei zwei Kühen schon während des Auszugs ein spontaner Milchabgang zu beobachten. Das dritte Tier war unmittelbar nach der Entwicklung des Kalbes melkbar. Dagegen setzte die Laktation bei den Tieren der Gruppe D272-Ap erst zwei bis drei Tage post operationem ein. Die Kälber der Gruppen D272+Ap und D272-Ap waren gleichermaßen prämaturn und ihre Vitalität gering- bis mittelgradig herabgesetzt. Alle Kühe der Gruppe D272-Ap wiesen, wie die Aglepriston-behandelten Kühe, eine vollständige Nachgeburtser-

verhalten mit ähnlicher Symptomatik auf. Die histomorphologischen Untersuchungen bestätigten, dass durch die Aglepristonbehandlung die präpartale „Plazentareifung“, wie sie bei den Tieren der Normalgeburtsgruppe zu beobachten waren, nicht induziert wurde. So waren im Gegensatz zur Normalgeburtsgruppe in den unreifen Plazentomen der Gruppen D272+Ap und D272-Ap weder ein Rückgang des relativen Anteils der TGC an den Trophoblastzellen noch eine Reduktion des Karunkelepithels nachweisbar. Bei den Tieren der Gruppe D272+Ap begann die Luteolyse, erkennbar an einem steilen Abfall der P_4 -Werte, bereits deutlich vor (zwei Tiere) bzw. während des Auszugs (ein Tier) des Kalbes. Bei den Tieren der Gruppe D272-Ap begann der Abfall der P_4 -Werte dagegen erst deutlich nach der Schnittentbindung. Dies spricht dafür, dass durch die Aglepristonapplikation eine Luteolyse induziert wurde. Korrespondierend mit dem Abfall der P_4 -Konzentrationen wurde bei den Tieren der Gruppe D272+Ap bereits präpartal ein schwacher Anstieg der PGFM-Werte beobachtet. Da bei diesen Tieren, im Gegensatz zur Normalgeburtsgruppe, keine Aufregulation der plazentaren Cox II-Expression nachweisbar war, ist anzunehmen, dass die Antigestagen-induzierte Luteolyse indirekt durch Prostaglandine extraplazentaren, vermutlich endometrialen, Ursprungs ausgelöst wurde. Zum Zeitpunkt des Auszugs waren die PGFM-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Normalgeburten, mit $2,14 \pm 1,40$ ng/ml allerdings relativ gering. Während bei den Tieren der Normalgeburtsgruppe bereits zum Geburtszeitpunkt Maximalwerte ($8,70 \pm 2,20$ ng/ml) messbar waren, wurden diese bei der Behandlungsgruppe ($11,46 \pm 5,41$ ng/ml) erst ca. 20 Stunden nach dem Auszug erreicht. Somit erklärt vermutlich ein Mangel an uterotonem $PGF_{2\alpha}$ die beobachtete Wehenschwäche bei den Aglepriston-behandelten Tieren. Die Östrogensynthese im Trophoblasten wurde durch das Antigestagen nicht beeinträchtigt. Sie blieb sogar nach dem Auszug der Kälber noch ein bis zwei Tage erhalten. Dies spricht dafür, dass die Trophoblastzellen zumindest über diesen Zeitraum noch vital waren. Auch die GR- bzw. PR-Expression in den Plazentomen zeigte keine erkennbaren Effekte der Behandlung.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass ein vollständiger Progesteronenzug nicht zu einer Umstrukturierung der Plazentome im Sinne einer „Plazentareifung“ bzw. zu einem termingerechten Nachgeburtsabgang führt. Die eigene Hypothese wurde somit eindeutig widerlegt. Dennoch erbrachten die durchgeführten Untersuchungen

neue Erkenntnisse zur Steuerung der Geburt beim Rind. So wurde ersichtlich, dass nur ein geringer Teil der geburtsassoziierten Veränderungen direkt durch den präpartalen Progesteronentzug ausgelöst wird, nämlich die Öffnung der Zervix und das Einsetzen der Laktation. Wesentliche geburtsassoziierte Vorgänge wie die Ablösung der Plazenta, die Dehnungsfähigkeit des kaudalen weichen Geburtsweges und die Aufnahme einer adäquaten Wehentätigkeit sind dagegen offensichtlich primär von Signalen aus dem fetalem Kompartiment abhängig, welche zusätzlich zum Progesteronentzug erforderlich sind bzw. diesem vorausgehen müssen.

7. SUMMARY

In cattle the prepartal decline in maternal progesterone (P_4) levels is considered as a prerequisite for the onset of normal parturition. Due to the negligible contribution of the placenta to maternal P_4 levels during late bovine gestation, in peripartal cows P_4 profiles predominantly reflect the loss of luteal function, and virtually no information is available on the dynamics of the collapse of placental P_4 production and its role in the signal cascade leading to parturition. Despite its minimal contribution to maternal P_4 levels, sporadic data from the literature and from previous work of our laboratory indicate that also in late gestation the bovine placenta is capable of producing high P_4 levels locally at the feto-maternal interface, which – mediated by progesterone receptors previously detected in the maternal caruncles – could be an essential factor in placental differentiation and function. Thus, the hypothesis was put forward that a well-timed and complete withdrawal of high local P_4 concentrations primarily of placental origin, is a crucial signal for the timely release of the placenta. According to this concept, a delayed or incomplete cessation of placental P_4 production during the initiation of parturition could be an important factor in the etiology of placental retention, which causes considerable economic losses in the dairy cattle industry. To test for this hypothesis, three cows were treated with the antiprogestin aglepristone (Ap) on days 270 and 271 of gestation (approximately ten days before the expected time of parturition) to abolish receptor mediated effects of P_4 irrespective of its origin (group D272+Ap). As controls, four cows giving spontaneous birth at normal term (280.5 ± 1.7 days group NT) with timely release of fetal membranes (within 12 hours after expulsion of the calf) and three cows undergoing cesarean section on day 272 (group D272-Ap) were included into the study.

Following the onset of treatment, D272+Ap cows were monitored clinically every two hours, and the progress of birth was registered. From all animals, blood samples were taken regularly during the experimental period, and placentomes were removed per vaginam immediately after birth (groups D272+Ap and NT) or during surgery (group 272-Ap). Tissue samples were formalin-fixed and paraffin-embedded for histology and immunohistochemistry or snap frozen for molecular biological investigations. In blood samples, concentrations of P_4 , estrone, estrone sulfate and estradiol- 17β were measured by well established and validated radioimmunoassay

methods, and for the measurement of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGFM) a commercial kit was used. To characterize the prepartal remodeling of placentomal microarchitecture, the percentage of trophoblast giant cells (TGC) was determined after lectin histochemistry, and the reduction of caruncular epithelium was assessed by morphometry. Moreover, the expression of cyclooxygenase II (Cox II), progesterone receptor (PR) and glucocorticoid receptor (GR) was investigated on the protein and mRNA level by quantitative assessment of immunostaining and real-time RT-PCR, respectively.

The application of aglepristone significantly reduced gestational length. First signs of impending parturition such as restlessness, lifting of the tail or use of abdominal press occurred 46.3 ± 6.0 hours after the start of treatment, and vaginal exploration confirmed that the cervix was fully open during this time. Despite a substantial activity of the abdominal press, no progress in the expulsion of the calves could be observed during the following two hours, obviously due to insufficient myometrial activity. Consequently the calves were extracted. During obstetrical manipulations it became obvious that the caudal birth canal was rigid and barely dilatatable. Inconsistent with the working hypothesis, in all cows of the treatment group a severe retention of fetal membranes was observed. A considerable release of placental components was only observed starting on day ten postpartum and was rather due to autolysis than to reduction of feto-maternal adherence. Similar cases of retained fetal membrane were also observed in all D272-Ap cows. Besides a complete opening of the cervix, antiprogestin treatment induced the onset of lactation, as in two D272+Ap cows a spontaneous loss of milk was observed during the extraction of the calf, and milking was successful in the remaining animal of this group immediately after parturition. In contrast, in D272-Ap animals the onset of lactation became only evident two or three days after surgery. Calves from D272+ or -Ap cows were slightly premature to a similar extent and their vitality was moderately reduced.

Consistent with clinical observations histological investigation of placentomes showed that antiprogestin treatment did not induce placental maturation, whereas for the placentomes of NT cows the prepartal decline in TGC numbers and reduction of caruncular epithelium was confirmed. Surprisingly, antiprogestin treatment obviously induced luteolysis, as a significant decline of progesterone concentrations started clearly before (two animals) or during the expulsion of the calf (one animal). In

D272-Ap control cows, a significant decline of progesterone levels was only observed to start from 12 hours after surgical removal of the fetus. Concomitant with the decline in P₄ concentrations in D272+Ap cows an increase of PGFM levels became detectable. The fact that, different from NT animals, no up-regulation of placental Cox II was found suggests that the antiprogestin induced luteolysis indirectly stimulating prostaglandin production from an extraplacental source, presumably the intercaruncular endometrium. However, at parturition PGFM levels in D272+Ap cows were clearly lower in comparison to NT cows (2.14 ± 1.40 ng/ml vs. 8.70 ± 2.20 ng/ml), which suggests that insufficient myometrial activity observed in antiprogestin treated cows was related to a reduced availability of uterotonic PGF_{2 α} . After parturition PGFM levels declined significantly in NT cows but continued to increase in D272+Ap cows reaching maximal concentrations of 11.46 ± 5.41 ng/ml 20 hours postpartum. Placental estrogen production was not affected by antiprogestin treatment and was maintained for another 24–48 hours after extraction of the calves, which indicates that vitality of trophoblast cells persisted for at least this period of time. Moreover, results from immunohistochemistry and real-time RT-PCR did not give any evidence for an effect of antiprogestin treatment on placental GR or PR expression.

In conclusion, the results showed that a complete prepartal P₄ withdrawal is not a crucial factor for the prepartal remodeling of bovine placentomes enabling a timely release of fetal membranes. Thus, the own working hypothesis was clearly disproven. However, results from this study yielded considerable new information on the initiation of parturition in cattle. They clearly demonstrated that only a minor part of the processes related to bovine parturition are directly dependent on P₄ withdrawal which are the opening of the cervix and the onset of lactation. Moreover, they suggest that other important processes such as adequate myometrial activity, softening of the posterior birth canal and timely release of the placenta are predominantly dependent on signals from the fetal compartment, which, however, may have to precede or act in concert with P₄ withdrawal.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Agthe, O., Kolm, H. P. (1975): Oestrogen and progesterone levels in the blood plasma of cows with normal parturition or with a retained placenta. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 43, H. 1, S. 163 – 166.
- Anderson, A. B. M., Flint, A. P. F., Turnbull, A. C. (1975): Mechanism of action of glucocorticoids in induction of ovine parturition: effect on placental steroid metabolism. In: *Journal of Endocrinology*, Jg. 66, H. 1, S. 61 – 70.
- Arai, K. Y., Tanaka, Y., Taniyama, H., Tsunoda, N., Nambo, Y., Nagamine, N., Watanabe, G., Taya, K. (2006): Expression of inhibins, activins, insulin-like growth factor-I and steroidogenic enzymes in the equine placenta. In: *Domestic Animal Endocrinology*, Jg. 31, H. 1, S. 19 – 34.
- Arosh, J. A., Banu, S. K., Chapdelaine, P., Emond, V., Kim, J. J., MacLaren, L. A., Fortier, M. A. (2003): Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. In: *Endocrinology*, Jg. 144, H. 7, S. 3076 – 3091.
- Arosh, J. A., Banu, S. K., Chapdelaine, P., Fortier, M. A. (2004): Temporal and tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, EP3, EP4, FP, and cyclooxygenases 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. In: *Endocrinology*, Jg. 145, H. 1, S. 407 – 417.
- Arosh, J. A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., Fortier, M. A. (2002): Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 67, H. 1, S. 161 – 169.
- Ashley, R. L., Clay, C. M., Farmerie, T. A., Niswender, G. D., Nett, T. M. (2006): Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. In: *Endocrinology*, Jg. 147, H. 9, S. 4151 – 4159.
- Asselin, E., Fortier, M. A. (2000): Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E(2) reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 62, H. 1, S. 125 – 131.
- Atkinson, B. A., King, G. J., Amoroso, E. C. (1984): Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 30, H. 3, S. 763 – 774.

- Aurich, J. E., Aurich, C. (1994): Geburtseinleitung bei Haustieren. In: Der Praktische Tierarzt, Jg. 75, S. 742 – 750.
- Baan, M., Taverne, M. A.M., Kooistra, H. S., Gier, J. de, Dieleman, S. J., Okkens, A. C. (2005): Induction of parturition in the bitch with the progesterone-receptor blocker aglépristone. In: Theriogenology, Jg. 63, H. 7, S. 1958 – 1972.
- Bamberg, E. (1994): Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone. In: Döcke, Friedemann (Hg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 33 – 37.
- Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., Castro, M. de, Chrousos, G. P. (1995): Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. In: The Journal of Clinical Investigation, Jg. 95, H. 6, S. 2435 – 2441.
- Banu, S. K., Arosh, J. A., Chapdelaine, P., Fortier, M. A. (2005): Expression of prostaglandin transporter in the bovine uterus and fetal membranes during pregnancy. In: Biology of Reproduction, Jg. 73, H. 2, S. 230 – 236.
- Banu, S. K., Arosh, J. A., Chapdelaine, P., Fortier, M. A. (2003): Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 100, H. 20, S. 11747 – 11752.
- Baron von Engelhardt, A. (2006): Behandlung des Endometritis/Pyometrakomplexes eines Meerschweinchens mit Aglepristone – ein Fallbericht. In: Der Praktische Tierarzt, Jg. 87, H. 1, S. 14 – 17.
- Baulieu, E. E. (1997): RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996. In: Annals of the New York Academy of Sciences, Jg. 828, S. 47 – 58.
- Baulieu, E. E., Ulmann, A., Philibert, D. (1987): Contragestion by antiprogestin RU 486: a review. In: Archives of Gynecology and Obstetrics, Jg. 241, H. 2, S. 73 – 85.
- Baulieu, E.-E. (1996): The combined use of prostaglandin and antiprogestin in human fertility control. In: European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, Jg. 65, H. 1, S. 115 – 119.
- Beagley, J., Whitman, K., Baptiste, K., Scherzer, J. (2010): Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. In: Journal of Veterinary Internal Medicine, Jg. 24, H. 2, S. 261 – 268.

- Beato, M., Klug, J. (2000): Steroid hormone receptors: an update. In: Human Reproduction Update, Jg. 6, H. 3, S. 225 – 236.
- Beck, F. (1976): Comparative placental morphology and function. In: Environmental Health Perspectives, Jg. 18, S. 5 – 12.
- Ben-David, E., Shemesh, M. (1990): Ultrastructural localization of cytochrome P-450scc in the bovine placentome using protein A-gold technique. In: Biology of Reproduction, Jg. 42, H. 1, S. 131 – 138.
- Benirschke, K. (1983): Placentation. In: The Journal of Experimental Zoology, Jg. 228, H. 2, S. 385 – 389.
- Ben-Zimra, M., Koler, M., Melamed-Book, N., Arensburg, J., Payne, A. H., Orly, J. (2002): Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy. In: Molecular and Cellular Endocrinology, Jg. 187, H. 1-2, S. 223 – 231.
- Birgel, E. H. (1996): Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Anzeichen der nahenden Abkalbung und Steroidhormonprofilen. In: Der Praktische Tierarzt, H. 77, S. 627 – 630.
- Birgel, E. H., Grunert, E., Soares, J. A. (1994): The preliminary stage of labor in cattle in relation to the clinical signs of labor and the course of progesterone secretion for the prediction of the calving time. In: Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, Jg. 101, H. 9, S. 355 – 359.
- Björkman, N. H. (1954): Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. In: Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A, Jg. 22, S. 1 – 91.
- Björkman, N. H. (1969): Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. In: The Anatomical Record, Jg. 163, H. 1, S. 17 – 29.
- Björkman, N. H., Sollen, P. (1960): Morphology of the bovine placenta at normal delivery. In: Acta Veterinaria Scandinavica, H. 1, S. 347 – 362.
- Black, B. E., Holaska, J. M., Rastinejad, F., Paschal, B. M. (2001): DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. In: Current Biology, Jg. 11, H. 22, S. 1749 – 1758.
- Bogacki, M., Silvia, W. J., Rekawiecki, R., Kotwica, J. (2002): Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F(2alpha) from bovine endometrial tissue. In: Biology of Reproduction, Jg. 67, H. 1, S. 184 – 188.

- Boos, A., Janssen, V., Mülling, C. (2003a): Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. In: *Reproduction*, Jg. 126, H. 4, S. 469 – 480.
- Boos, A., Kohtes, J., Janssen, V., Mülling, C., Stelljes, A., Zerbe, H., Hässig, M., Thole, H. H. (2006): Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 91, H. 1-2, S. 55 – 76.
- Boos, A., Kohtes, J., Stelljes, A., Zerbe, H., Thole, H. H. (2000): Immunohistochemical assessment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth with or without retention of fetal membranes. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 120, H. 2, S. 351 – 360.
- Boos, A., Stelljes, A., Kohtes, J. (2003b): Collagen Types I, III and IV in the Placentome and Interplacentomal Maternal and Fetal Tissues in Normal Cows and in Cattle with Retention of Fetal Membranes. In: *Cells Tissues Organs*, Jg. 174, H. 4, S. 170 – 183.
- Bosu, W. T.K., Liptrap, R. M., Leslie, K. E. (1984): Periparturient changes in plasma progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin F₂α concentrations in Holstein cows with or without retained foetal membranes. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 7, H. 6, S. 497 – 510.
- Braun, T., Li, S., Moss, T. J.M., Newnham, J. P., Challis, J. R.G., Gluckman, P. D., Sloboda, D. M. (2007): Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. In: *The Journal of Endocrinology*, Jg. 194, H. 2, S. 337 – 347.
- Breukelman, S. P., Szenci, O., Beckers, J.-F., Kindahl, H., Mulder, E. J.H., Jonker, F. H., van der Weijden, B., Revy, D., Pogany, K., Sulon, J., Némédi, I., Taverne, M. A.M. (2005): Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F₂α-metabolite (PGF₂α-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. In: *Theriogenology*, Jg. 64, H. 4, S. 917 – 933.
- Brown, J. M., Adams, J. B., Beattie, C. W. (1987): Production and characterization of a monoclonal antibody to bovine estrogen sulfotransferase. In: *Hybridoma*, Jg. 6, H. 4, S. 413 – 422.
- Bruckmaier, R. (2007): Laktationsphysiologie. In: Krömker, V. (Hg.): *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Stuttgart: Parey, S. 6 – 10.

- Buczinski, S., Bélanger, A.-M., Fecteau, G., Roy, J.-P. (2007): Prolonged gestation in two Holstein cows: transabdominal ultrasonographic findings in late pregnancy and pathologic findings in the fetuses. In: *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, Jg. 54, H. 10, S. 624 – 626.
- Buddecke, E. (1994): *Grundriss der Biochemie*. 9. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter, S. 368-369.
- Busch, W. (1994): Steuerung der Fortpflanzungsfunktionen mit Hormonen. In: Döcke, Friedemann (Hg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 803 – 820.
- Carter, A. M., Enders, A. C. (2004): Comparative aspects of trophoblast development and placentation. In: *Reproductive Biology and Endocrinology*, Jg. 2, S. 46.
- Challis, J. R., Lye, S. J., Gibb, W. (1997): Prostaglandins and parturition. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jg. 828, S. 254 – 267.
- Challis, J. R.G., Sloboda, D. M., Alfaidy, N., Lye, S. J., Gibb, W., Patel, F. A., Whittle, W. L., Newnham, J. P. (2002): Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. In: *Reproduction*, Jg. 124, H. 1, S. 1 – 17.
- Charmandari, E., Kino, T., Chrousos, G. P. (2004): Glucocorticoid Receptor. In: Luciano Martini (Hg.): *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. New York: Elsevier, S. 229 – 234.
- Chavatte-Palmer, P., Guillomot, M., Roiz, J., Heyman, Y., Laigre, P., Servely, J. L., Constant, F., Hue, I., Ellis, S. A. (2007): Placental expression of major histocompatibility complex class I in bovine somatic clones. In: *Cloning and Stem Cells*, Jg. 9, H. 3, S. 346 – 356.
- Chew, B. P., Keller, H. F., Erb, R. E., Malven, P. V. (1977): Periparturient concentrations of prolactin, progesterone and the estrogens in blood plasma of cows retaining and not retaining fetal membranes. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 44, H. 6, S. 1055 – 1060.
- Chew, B. P., Malven, P. V., Erb, R. E., Zamet, C. N., D'Amico, M. F., Colenbrader, V. F. (1979): Variables associated with peripartum traits in dairy cows. IV. Seasonal relationships among temperature, photoperiod, and blood plasma prolactin. In: *Journal of Dairy Science*, Jg. 62, H. 9, S. 1394 – 1398.
- Coleman, R. A., Smith, W. L., Narumiya, S. (1994): International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. In: *Pharmacological Reviews*, Jg. 46, H. 2, S. 205 – 229.

- Conley, A. J., Bird, I. M. (1997): The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 56, H. 4, S. 789 – 799.
- Conley, A. J., Ford, S. P. (1987): Effect of prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis on in vivo and in vitro progesterone production by individual placentomes of cows. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 65, H. 2, S. 500 – 507.
- Corrada, Y., García, P., La Sota, P. E. de, Huzman, M., Landoni, M. F., Gobello, C. (2005): Decrease of body temperature after aglepristone treatment in bitches. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 87, H. 3-4, S. 295 – 299.
- Curry, T. E., Osteen, K. G. (2001): Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 64, H. 5, S. 1285 – 1296.
- Curry, T. E., Osteen, K. G. (2003): The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. In: *Endocrine Reviews*, Jg. 24, H. 4, S. 428 – 465.
- Davies, C. J. (2007): Why is the fetal allograft not rejected? In: *Journal of Animal Science*, Jg. 85, H. 13 Supplement, S. 32 – 35.
- Davies, C. J., Fisher, P. J., Schlafer, D. H. (2000): Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. In: *Placenta*, Jg. 21, H. 2-3, S. 194 – 202.
- Day, A. M. (1977): Cloprostenol for termination of pregnancy in cattle. A) The induction of parturition. In: *New Zealand Veterinary Journal*, Jg. 25, H. 6, S. 136 – 139.
- Denner, L. A., Weigel, N. L., Maxwell, B. L., Schrader, W. T., O'Malley, B. W. (1990): Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. In: *Science*, Jg. 250, H. 4988, S. 1740 – 1743.
- Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y. L., Rabot, A., Tsai, S. J., Wiltbank, M. C. (2002): Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. In: *Molecular and Cellular Endocrinology*, Jg. 191, H. 1, S. 65 – 80.
- Diczfalusy, E. (2005): Endocrine functions of the human fetoplacental unit. 1964. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Jg. 193, H. 6, S. 2024; Discussion 2025.

- Diedrich, K., Holzgreve, W., Jonat, W., Schneider, K.-T. M., Schultze-Mosgau, A., Weiss, J. M. (2007): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S. 66-69.
- Dilly, M., Hambruch, N., Haeger, J. D., Pfarrer, C. (2010): Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells. In: *Molecular Reproduction and Development*, Jg. 77, H. 7, S. 622 – 629.
- Dilly, M., Hambruch, N., Shenavai, S., Schuler, G., Froehlich, R., Haeger, J. D., Özalp, G. R., Pfarrer, C. (2011): Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-14 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-2 during bovine placentation and at term with or without placental retention. In: *Theriogenology*, Jg. 75, H. 6, S. 1104 – 1114.
- Dlamini, B. J., Li, Y., Anderson, L. L. (1995): Mifepristone (RU 486) induces parturition in primiparous beef heifers and reduces incidence of dystocia. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 73, H. 11, S. 3421 – 3426.
- Döcke, F. (1994a): Hypothalamus-Hypophysen-System. In: Döcke, Friedemann (Hg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 131 – 173.
- Döcke, F. (1994b): Keimdrüsen. In: Döcke, Friedemann (Hg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 426 – 436.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., van de Putte, L. B., Lipsky, P. E. (1998): Cyclooxygenase in biology and disease. In: *The FASEB journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jg. 12, H. 12, S. 1063 – 1073.
- Duello, T. M., Byatt, J. C., Bremel, R. D. (1986): Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. In: *Endocrinology*, Jg. 119, H. 3, S. 1351 – 1355.
- Duma, D., Jewell, C. M., CIDLOWSKI, J. A. (2006): Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Jg. 102, H. 1-5, S. 11 – 21.
- Edqvist, L.-E., Kindahl, H., Stabenfeldt, G. (1978): Release of prostaglandin F₂alpha during the bovine peripartal period. In: *Prostaglandins*, Jg. 16, H. 1, S. 111 – 119.
- Eiler, H., Hopkins, F. M. (1993): Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Jg. 203, H. 3, S. 436 – 443.

- Eley, R. M., Thatcher, W. W., Bazer, F. W. (1979): Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 55, H. 1, S. 181 – 190.
- Ellenberger, C., Wilsher, S., Allen, W. R.; Hoffmann, C., Kölling, M., Bazer, F. W. (2008): Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. In: *Theriogenology*, Jg. 70, H. 5, S. 746 – 757.
- Elsaesser, F. u.P. (1994): Endokrinologie des Fetus. In: Döcke, Friedemann (Hg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 547 – 566.
- Enders, A. C., Carter, A. M. (2004): What can comparative studies of placental structure tell us? – A review. In: *Placenta*, Jg. 25 Supplement A, S. 3 – 9.
- Enders, A. C., Blankenship, T. N. (1999): Comparative placental structure. *Transplacental Drug Delivery*. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, Jg. 38, H. 1, S. 3 – 15.
- Estergreen, V. L., Frost, O. L., Gomes, W. R., Erb, R. E., Bullard, J. F. (1967): Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. In: *Journal of Dairy Science*, Jg. 50, H. 8, S. 1293 – 1295.
- eurogentec (Hg.): Eurogentec qPCR guide. (S.46). Online verfügbar unter www.eurogentec.com/EGT/files/qPCR-guide.pdf.
- Evans, R. W., Leavitt, W. W. (1980): Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 77, H. 10, S. 5856 – 5860.
- Fairclough, R. J., Hunter, J. T., Peterson, A. J., Welch, R. A. (1981): Plasma concentrations of progesterone, oestrogens and prostaglandin F in maternal blood and corticosteroids and oestrogens in foetal blood of cows during dexamethasone-induced deliveries. In: *Acta Endocrinologica*, Jg. 96, H. 3, S. 406 – 412.
- Fieni, F., Marnet, P. G., Martal, J., Siliart, B., Touzeau, N., Bruyas, J. F., Tainturier, D. (2001): Comparison of two protocols with a progesterone antagonist aglepristone (RU534) to induce parturition in bitches. In: *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, Jg. 57, S. 237 – 242.
- Filion, F., Bouchard, N., Goff, A. K., Lussier, J. G., Sirois, J. (2001): Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 276, H. 36, S. 34323 – 34330.

- Fuchs, A. R., Helmer, H., Behrens, O., Liu, H. C., Antonian, L., Chang, S. M., Fields, M. J. (1992): Oxytocin and bovine parturition: a steep rise in endometrial oxytocin receptors precedes onset of labor. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 47, H. 6, S. 937 – 944.
- Fuchs, A. R., Rollyson, M. K., Meyer, M., Fields, M. J., Minix, J. M., Randel, R. D. (1996): Oxytocin induces prostaglandin F₂ alpha release in pregnant cows: influence of gestational age and oxytocin receptor concentrations. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 54, H. 3, S. 647 – 653.
- Fuchs, A. R., Rust, W., Fields, M. J. (1999): Accumulation of cyclooxygenase-2 gene transcripts in uterine tissues of pregnant and parturient cows: stimulation by oxytocin. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 60, H. 2, S. 341 – 348.
- Fürstenberg, A., Busch, W., Fürstenberg, L., Münchow, H. (1990): Aetiology of placental retention in cows. In: *Monatsheft für Veterinärmedizin*, H. 14, S. 493 – 496.
- Galac, S., Kooistra, H. S., Butinar, J., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Voorhout, G., Okkens, A. C. (2000): Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. In: *Theriogenology*, Jg. 53, H. 4, S. 941 – 950.
- Garcia, A., Barth, A. D., Mapletoft, R. J. (1992): The effects of treatment with cloprostenol or dinoprost within one hour of induced parturition on the incidence of retained placenta in cattle. In: *The Canadian Veterinary Journal*, Jg. 33, H. 3, S. 175 – 183.
- Garverick, H. A., Day, B. N., Mather, E. C., Gomez, L., Thompson, G. B. (1974): Use of estrogen with dexamethasone for inducing parturition in beef cattle. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 38, H. 3, S. 584 – 590.
- Gasc, J. M., Delahaye, F., Baulieu, E. E. (1989): Compared intracellular localization of the glucocorticosteroid and progesterone receptors: an immunocytochemical study. Abstract. In: *Experimental Cell Research*, Jg. 181, H. 2, S. 492 – 504.
- Gazal, O. S., Li, Y., Schwabe, C., Anderson, L. L. (1993): Attenuation of antepartum relaxin surge and induction of parturition by antiprogestosterone RU 486 in sheep. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 97, H. 1, S. 233 – 240.
- Gentz, F. (1994): Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Gravidität der Stute. Vet. med. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006): Overview of nomenclature of nuclear receptors. In: *Pharmacological Reviews*, Jg. 58, H. 4, S. 685 – 704.

- Gerres, S., Hoffmann, B. (1994): Investigations on the role of progesterone in the endocrine control of overt pseudopregnancy in the bitch: Application of an antigestagen and effects on corpus luteum function. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 35, H. 3-4, S. 281 – 289.
- Giangrande, P. H., McDonnell, D. P. (1999): The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. In: *Recent Progress in Hormone Research*, Jg. 54, S. 291-313.
- Giangrande, P. H., Pollio, G., McDonnell, D. P. (1997): Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 272, H. 52, S. 32889 – 32900.
- Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B., Zingg, H. H. (1998): Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. In: *Nature*, Jg. 392, H. 6675, S. 509 – 512.
- Green, J. A., Xie, S., Quan, X., Bao, B., Gan, X., Mathialagan, N., Beckers, J. F., Roberts, R. M. (2000): Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 62, H. 6, S. 1624 – 1631.
- Greven, H. (2008): Hydrolyse und Transport sulfatierter Steroide in den Plazentomen des Rindes: Charakterisierung der Expression und der Funktionen von Steroidsulfatase (StS) und des Sodium-dependent Organic Anion Transporters. PhD-Thesis. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Greven, H., Kowalewski, M. P., Hoffmann, B., Geyer, J., Rex-Haffner, M., Ugele, B., Schuler, G. (2007): Bovine placental steroid sulphatase: molecular cloning and expression pattern in placentomes during gestation and at parturition. In: *Placenta*, Jg. 28, H. 8-9, S. 889 – 897.
- Gross, T. S., Williams, W. F. (1988a): Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 38, H. 5, S. 1027 – 1034.
- Gross, T. S., Williams, W. F. (1988b): In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 83, H. 2, S. 565 – 573.
- Gross, T. S., Williams, W. F., Manspeaker, J. E., Lewis, G. S., Russek-Cohen, E. (1987): Bovine placental prostaglandin synthesis in vitro as it relates to placental separation. In: *Prostaglandins*, Jg. 34, H. 6, S. 903 – 917.

- Gross, T. S., Williams, W. F., Moreland, T. W. (1986): Prevention of the retained fetal membrane syndrome (retained placenta) during induced calving in dairy cattle. In: *Theriogenology*, Jg. 26, H. 3, S. 365 – 370.
- Gross, T. S., Williams, W. F., Russek-Cohen, E. (1991): Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. In: *Placenta*, Jg. 12, H. 1, S. 27 – 35.
- Grosser, O. (1927): *Vergleichende Placentationslehre*. In: *Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere*. München: Bergmann Verlag, S. 95-174.
- Grunert, E. (1993): Pathologie des Puerperiums. In: Richter, J.; Grunert, E.; Ahlers, D. (Hg.): *Tiergeburtshilfe*. 4. Aufl. Berlin: Parey, S. 380 – 404.
- Grunert, E., Ahlers, D., Heuwieser, W. (1989): The role of endogenous estrogens in the maturation process of the bovine placenta. In: *Theriogenology*, Jg. 31, H. 5, S. 1081 – 1091.
- Grunert, E., Ahlers, D., Jöchle, W. (1975): Effects of a high dose of diethylstilbestrol on the delivery of the placenta after corticoid-induced parturition in cattle: Preliminary communication. In: *Theriogenology*, Jg. 3, H. 6, S. 249 – 258.
- Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassiné, A., Evain-Brion, D. (2009): Development and hormonal functions of the human placenta. In: *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, Jg. 47, H. 5, S. 35 – 40.
- Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M., Milgrom, E. (1991): Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. In: *The EMBO Journal*, Jg. 10, H. 12, S. 3851 – 3859.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., Milgrom, E. (1989): Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. In: *Cell*, Jg. 57, H. 7, S. 1147 – 1154.
- Gunnink, J. W. (1984): Retained placenta and leucocytic activity. In: *The Veterinary Quarterly*, Jg. 6, H. 2, S. 49 – 51.
- Gyomory, S., Gupta, S., Lye, S. J., Gibb, W., Labrie, F., Challis, J. R. (2000): Temporal expression of prostaglandin H synthase type 2 (PGHS-2) and P450(C17) in ovine placentomes with the natural onset of labour. In: *Placenta*, Jg. 21, H. 5-6, S. 478 – 486.

- Hafner, A., Wanke, R., Schmidt, P., Hänichen, T., Bise, K. (1991): Hypopituitarism as the possible cause of prolonged gestation in cattle. In: Tierärztliche Praxis, Jg. 19, H. 3, S. 258 – 262.
- Hähnel, R., Twaddle, E., Ratajczak, T. (1973): The specificity of the estrogen receptor of human uterus. In: Journal of Steroid Biochemistry, Jg. 4, H. 1, S. 21 – 31.
- Hansen, P. J. (1998): Regulation of uterine immune function by progesterone-lessons from the sheep. In: Journal of Reproductive Immunology, Jg. 40, H. 1, S. 63 – 79.
- Henderson, K. M., Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T. (1977): Simultaneous infusion of prostaglandin E2 antagonizes the luteolytic action of prostaglandin F2alpha in vivo. In: The Journal of Endocrinology, Jg. 72, H. 3, S. 379 – 383.
- Heuwieser, W., Grunert, E. (1987): Significance of chemotactic activity for placental expulsion in cattle. In: Theriogenology, Jg. 27, H. 6, S. 907 – 912.
- Hinds, T. D., Ramakrishnan, S., Cash, H. A., Stechschulte, L. A., Heinrich, G., Najjar, S. M., Sanchez, E. R. (2010): Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a Role in Metabolism. In: Molecular Endocrinology, Jg. 24, H. 9, S. 1715 – 1727.
- Hirayama, H., Sawai, K., Moriyasu, S., Hirayama, M., Goto, Y., Kaneko, E., Miyamoto, A., Ushizawa, K., Takahashi, T., Minamihashi, A. (2008): Excess estrogen sulfoconjugation as the possible cause for a poor sign of parturition in pregnant cows carrying somatic cell clone fetuses. In: Reproduction, Jg. 136, H. 5, S. 639 – 647.
- Hoffman, L. H., Wooding, F. B. (1993): Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. In: The Journal of Experimental Zoology, Jg. 266, H. 6, S. 559 – 577.
- Hoffmann, B. (1993): Endokrinologie der Hochträchtigkeit, während des Partus und im Puerperium. In: Richter, J., Grunert, E., Ahlers, D. (Hg.): Tiergeburtshilfe. 4. Aufl. Berlin: Parey, S. 111 – 120.
- Hoffmann, B. (1994): Gravidität, Geburt und Puerperium. In: Döcke, Friedemann (Hg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 509 – 535.
- Hoffmann, B., Gentz, F., Failing, K. (1996): Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG-concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. In: Reproduction in Domestic Animals, Jg. 31, H. 3, S. 717 – 723.

- Hoffmann, B., Goes de Pinho, T., Schuler, G. (1997): Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. In: *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, Jg. 105, H. 5, S. 296 – 303.
- Hoffmann, B., Kyrein, H. J., Ender, M. L. (1973a): An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. In: *Hormone Research*, Jg. 4, H. 5, S. 302 – 310.
- Hoffmann, B., Riesenbeck, A., Schams, D., Steinetz, B. G. (1999): Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Jg. 34, H. 3-4, S. 219 – 226.
- Hoffmann, B., Schams, D., Giménez, T., Ender, M. L., Herrmann, C., Karg, H. (1973b): Changes of progesterone, total oestrogens, corticosteroids, prolactin and LH in bovine peripheral plasma around parturition with special reference to the effect of exogenous corticoids and a prolactin inhibitor respectively. In: *Acta Endocrinologica*, Jg. 73, H. 2, S. 385 – 395.
- Hoffmann, B., Schuler, G. (2002): The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. In: *Domestic Animal Endocrinology*, Jg. 23, H. 1-2, S. 309 – 320.
- Hoffmann, B., Schuler, G. (2006): Grundlagen der Wirkungsweise und sich daraus ergebende klinische Anwendungen von Antigestagenen bei Hund und Katze. In: *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere*, Jg. 34, H. 6, S. 399 – 408.
- Hoffmann, B., Wagner, W. C., Giménez, T. (1976): Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 15, H. 1, S. 126 – 133.
- Hoffmann, B., Wagner, W. C., Hixon, J. E., Bahr, J. (1979): Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 2, H. 1-3, S. 253 – 266.
- Hoffmann, B., Wagner, W. C., Rattenberger, E., Schmidt, J. (1977): Endocrine relationships during late gestation and parturition in the cow. In: *Ciba Foundation Symposium*, H. 47, S. 107 – 125.
- Hoffmann, B., Schuler, G. (2000): Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 60 – 61, S. 295 – 312.
- Holm, L. W., Short, R. V. (1962): Progesterone in the peripheral blood of Guernsey and Friesian cows during prolonged gestation. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 4, S. 137 – 141.

- Horn, F., Krüger, K. (2003): *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme, S. 337, 365 – 371, 414-417.
- Hradecký, P., Mossman, H. W., Stott, G. G. (1988): Comparative development of ruminant placentomes. In: *Theriogenology*, Jg. 29, H. 3, S. 715 – 729.
- Hunter, J. T., Fairclough, R. J., Peterson, A. J., Welch, R. A. (1977): Foetal and maternal hormonal changes preceding normal bovine parturition. In: *Acta Endocrinologica*, Jg. 84, H. 3, S. 653 – 662.
- Igwebuike, U. M. (2006): Trophoblast cells of ruminant placentas – A minireview. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 93, H. 3-4, S. 185 – 198.
- Ishii, Y., Sakamoto, K. (2001): Suppression of protein kinase C signaling by the novel isoform for bovine PGF₂alpha receptor. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jg. 285, H. 1, S. 1 – 8.
- Janowski, T., Zduńczyk, S., Malecki-Tepicht, J., Barański, W., Raś, A. (2002): Mammary secretion of oestrogens in the cow. In: *Domestic Animal Endocrinology*, Jg. 23, H. 1-2, S. 125 – 137.
- Johnson, W. H., Manns, J. G., Adams, W. M., Mapletoft, R. J. (1981): Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. In: *The Canadian Veterinary Journal*, Jg. 22, H. 9, S. 288 – 290.
- Joosten, I., Hensen, E. J. (1992): Retained placenta: an immunological approach. Clinical trends and basic research in animal reproduction. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 28, H. 1-4, S. 451 – 461.
- Joosten, I., Sanders, M. F., Hensen, E. J. (1991): Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. In: *Animal Genetics*, Jg. 22, H. 6, S. 455 – 463.
- Kankofer, M. (1999a): The enzymes responsible for the metabolism of prostaglandins in bovine placenta. In: *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, Jg. 61, H. 6, S. 359 – 362.
- Kankofer, M., Hoedemaker, M., Schoon, H. A., Grunert, E. (1994): Activity of placental 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase in cows with and without retained fetal membranes. In: *Theriogenology*, Jg. 42, H. 8, S. 1311 – 1322.
- Kankofer, M., Wierciński, J. (1999b): Prostaglandin E₂ 9-keto reductase from bovine term placenta. In: *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, Jg. 61, H. 1, S. 29 – 32.

- Kankofer, M., Wierciński, J., Zerbe, H. (2002): Prostaglandin E(2) 9-keto reductase activity in bovine retained and not retained placenta. In: Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, Jg. 66, H. 4, S. 413 – 417.
- Khatri, P., Frenette, G., Sullivan, R., Hoffmann, B., Schuler, G. (2011): Expression of SUL1E1 protein in bovine placentomes: Evidence for localization in uninucleated trophoblast cells. In: Placenta, Jg. 32, H. 6, S. 431 – 440.
- Kimura, K., Goff, J. P., Kehrl, M. E., JR., Reinhardt, T. A. (2002): Decreased Neutrophil Function as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle. In: Journal of Dairy Science, Jg. 85, H. 3, S. 544 – 550.
- King, W. J., Greene, G. L. (1984): Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. In: Nature, Jg. 307, H. 5953, S. 745 – 747.
- Kindahl, H., Kornmatitsuk, B., Gustafsson, H. (2004): The cow in endocrine focus before and after calving. In: Reproduction in Domestic Animals, Jg. 39, H. 4, S. 217 – 221.
- Klein, R., Schams, D., Failing, K., Hoffmann, B. (2003): Investigations on the re-establishment of the positive feedback of oestradiol during anoestrus in the bitch. In: Reproduction in Domestic Animals, Jg. 38, H. 1, S. 13 – 20.
- Klisch, K., Boos, A., Friedrich, M., Herzog, K., Feldmann, M., Sousa, N., Beckers, J., Leiser, R., Schuler, G. (2006): The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition. In: Reproduction, Jg. 132, H. 5, S. 791 – 798.
- Klisch, K., Hecht, W., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B., Leiser, R. (1999a): DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. In: Placenta, Jg. 20, H. 5-6, S. 451 – 458.
- Klisch, K., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B., Leiser, R. (1999b): Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. In: Anatomy and Embryology, Jg. 200, H. 2, S. 229 – 237.
- Klisch, K., Leiser, R. (2003): In bovine binucleate trophoblast giant cells, pregnancy-associated glycoproteins and placental prolactin-related protein-I are conjugated to asparagine-linked N-acetylgalactosaminyl glycans. In: Histochemistry and Cell Biology, Jg. 119, H. 3, S. 211 – 217.
- Klisch, K., Sousa, N. M. de, Beckers, J.-F., Leiser, R., Pich, A. (2005): Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. In: Molecular Reproduction and Development, Jg. 71, H. 4, S. 453 – 460.

- Königsson, K., Gustafsson, H., Kindahl, H. (2002): 15-Ketodihydro-PGF₂alpha, progesterone and uterine involution in primiparous cows with induced retained placenta and post-partial endometritis treated with oxytetracycline and flunixin. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Jg. 37, H. 1, S. 43 – 51.
- Kotwica, J., Rekawiecki, R., Duras, M. (2004): Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. In: *Bull Vet Inst Pulawy*, Jg. 48, S. 139 – 145.
- Kowalewski, M. P., Beceriklisoy, H. B., Aslan, S., Agaoglu, A. R., Hoffmann, B. (2009): Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogestin induced luteolysis in the bitch. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 116, H. 1-2, S. 129 – 138.
- Kraus, W. L., Montano, M. M., Katzenellenbogen, B. S. (1994): Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. In: *Molecular Endocrinology*, Jg. 8, H. 8, S. 952 – 969.
- Kroker, R. (2006): Hormone und hormonell wirksame Pharmaka. Pharmakologische Beeinflussung der Fortpflanzung und von Fruchtbarkeitsstörungen. In: Löscher, Wolfgang; Ungemach, Fritz Rupert; Kroker, Reinhard (Hg.): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 7. Aufl. Stuttgart: Parey, S. 359.
- Kuchinke, W., Barski, O., Watanabe, K., Hayaishi, O. (1992): A lung type prostaglandin F synthase is expressed in bovine liver: cDNA sequence and expression in *E. coli*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jg. 183, H. 3, S. 1238 – 1246.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J. A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. In: *Endocrinology*, Jg. 138, H. 3, S. 863 – 870.
- Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N. K., Tyagi, R. K. (2006): Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. In: *Molecular and Cellular Endocrinology*, Jg. 246, H. 1-2, S. 147 – 156.
- Lala, P. K. (1990): Interruption of murine pregnancy by activation of antigen-non-specific killer cells in the endometrium with indomethacin, high dose IL-2 or a combination. In: *Research in Immunology*, Jg. 141, H. 2, S. 159 – 164.
- Lala, P. K., Kennedy, T. G., Parhar, R. S. (1988): Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. II. Characterization of the suppressor mechanisms. In: *Cellular Immunology*, Jg. 116, H. 2, S. 411 – 422.

- Lala, P. K., Parhar, R. S., Singh, P. (1986): Indomethacin therapy abrogates the prostaglandin-mediated suppression of natural killer activity in tumor-bearing mice and prevents tumor metastasis. In: *Cellular Immunology*, Jg. 99, H. 1, S. 108 – 118.
- Lammoglia, M. A., Bellows, R. A., Short, R. E., Bellows, S. E., Bighorn, E. G., Stevenson, J. S., Randel, R. D. (1997): Body temperature and endocrine interactions before and after calving in beef cows. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 75, H. 9, S. 2526 – 2534.
- Landers, J. P., Spelsberg, T. C. (1991): Updates and new models for steroid hormone action. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jg. 637, S. 26 – 55.
- Laven, R. A., Peters, A. R. (1996): Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. In: *The Veterinary Record*, Jg. 139, H. 19, S. 465 – 471.
- Laven, R. A., Peters, A. R. (2001): Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. In: *Reproduktion in Domestic Animals*, Jg. 36, H. 6, S. 289 – 296.
- Leavitt, W. W., Takeda, A. (1986): Hormonal regulation of estrogen and progesterin receptors in decidual cells. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 35, H. 2, S. 475 – 484.
- Leidl, W., Hegner, D., Rockel (1980): Investigations on the PGF_{2a} concentration in maternal and foetal cotyledons of cows with and without retained foetal membranes. In: *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, Jg. 27, H. 9-10, S. 691 – 696.
- Leiser, R. (1975): Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind. In: *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe C*, H. 4 (1), S. 63 – 86.
- Leiser, R. (1999): Weibliche Geschlechtsorgane. In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., Frewein, J. (Hg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Eingeweide*. 8. Aufl. Berlin: Parey; Blackwell, S. 410 – 432.
- Leiser, R., Kaufmann, P. (1994): Placental structure: in a comparative aspect. In: *Experimental and Clinical Endocrinology*, Jg. 102, H. 3, S. 122 – 134.
- Leonhardt, S. A., Edwards, D. P. (2002): Mechanism of action of progesterone antagonists. In: *Experimental Biology and Medicine*, Jg. 227, H. 11, S. 969 – 980.

- Li, Y., Huang, C., Klindt, J., Anderson, L. L. (1991a): Divergent effects of antiprogestosterone, RU 486, on progesterone, relaxin, and prolactin secretion in pregnant and hysterectomized pigs with aging corpora Lutea. In: *Endocrinology*, Jg. 129, H. 6, S. 2907 – 2914.
- Li, Y. F., Perezgrovas, R., Gazal, O. S., Schwabe, C., Anderson, L. L. (1991b): Antiprogestosterone, RU 486, facilitates parturition in cattle. In: *Endocrinology*, Jg. 129, H. 2, S. 765 – 770.
- Liggins, G. C. (1968): Premature parturition after infusion of corticotrophin or cortisol into foetal lambs. In: *The Journal of Endocrinology*, Jg. 42, H. 2, S. 323 – 329.
- Liggins, G. C. (1969): Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. In: *The Journal of Endocrinology*, Jg. 45, H. 4, S. 515 – 523.
- Linde-Forsberg, C., Kindahl, H., Madej, A. (1992): Termination of mid-term pregnancy in the dog with oral RU 486. In: *Journal of Small Animal Practice*, Jg. 33, H. 7, S. 331 – 336.
- Lösel, R., Wehling, M. (2003): Nongenomic actions of steroid hormones. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, Jg. 4, H. 1, S. 46 – 56.
- Lu, N. Z., Wardell, S. E., Burnstein, K. L., Defranco, D., Fuller, P. J., Giguere, V., Hochberg, R. B., McKay, L., Renoir, J., Weigel, N. L., Wilson, E. M., McDonnell, D. P., Cidlowski, J. A. (2006): International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. In: *Pharmacological Reviews*, Jg. 58, H. 4, S. 782 – 797.
- Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J. A., Fortier, M. A. (2003): An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 278, H. 13, S. 11205 – 11212.
- Magness, R. R., Huie, J. M., Hoyer, G. L., Huecksteadt, T. P., Reynolds, L. P., Seperich, G. J., Whyson, G., Weems, C. W. (1981): Effect of chronic ipsilateral or contralateral intrauterine infusion of prostaglandin E2 (PGE2) on luteal function of unilaterally ovariectomized ewes. In: *Prostaglandins and Medicine*, Jg. 6, H. 4, S. 389 – 401.
- Mahajan, D. K., London, S. N. (1997): Mifepristone (RU 486): A review. In: *Fertility and Sterility*, Jg. 68, H. 6, S. 967 – 976.

- Maj, J. G., Kankofer, M. (1997): Activity of 72-kDa and 92-kDa matrix metalloproteinases in placental tissues of cows with and without retained fetal membranes. In: *Placenta*, Jg. 18, H. 8, S. 683 – 687.
- Mansell, P. D., Cameron, A. R., Taylor, D. P., Malmo, J. (2006): Induction of parturition in dairy cattle and its effects on health and subsequent lactation and reproductive performance. In: *Australian Veterinary Journal*, Jg. 84, H. 9, S. 312 – 316.
- Mason, J. I., France, J. T., Magness, R. R., Murry, B. A., Rosenfeld, C. R. (1989): Ovine placental steroid 17 alpha-hydroxylase/C-17,20-lyase, aromatase and sulphatase in dexamethasone-induced and natural parturition. In: *The Journal of Endocrinology*, Jg. 122, H. 1, S. 351 – 359.
- McCracken, J. A., Custer, E. E., Lamsa, J. C. (1999): Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. In: *Physiological Reviews*, Jg. 79, H. 2, S. 263 – 323.
- McLaren, W. J., Young, I. R., Rice, G. E. (2000): Immunohistochemical localization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in sheep placenta after glucocorticoid-induced and spontaneous labour. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 120, H. 1, S. 33 – 39.
- McNaughton, A. P., Murray, R. D. (2009): Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes. In: *The Veterinary Record*, Jg. 165, H. 21, S. 615 – 622.
- Meinecke, B. (2000): Reproduktion beim weiblichen Tier. In: von Engelhardt, W., Breves, G. (Hg.): *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke, S. 514 – 535.
- Mesiano, S. (2004): Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. In: *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, Jg. 11, H. 4, S. 193 – 202.
- Mesiano, S., Welsh, T. N. (2007): Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Jg. 18, H. 3, S. 321 – 331.
- Mest, H. J. (1994): Eicosanoide. In: Döcke, Friedemann (Hg.): *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 672 – 688.
- Michel, G. (1995): *Vergleichende Embryologie der Haustiere*. Jena: Gustav Fischer Verlag, S.106-113, 126-134.

- Miller, W. L. (2007): Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, Jg. 1771, H. 6, S. 663 – 676.
- Misao, R., Nakanishi, Y., Iwagaki, S., Fujimoto, J., Tamaya, T. (1998): Expression of progesterone receptor isoforms in corpora lutea of human subjects: correlation with serum oestrogen and progesterone concentrations. In: *Molecular Human Reproduction*, Jg. 4, H. 11, S. 1045 – 1052.
- Monterroso, V. H., Hansen, P. J. (1993): Regulation of bovine and ovine lymphocyte proliferation by progesterone: modulation by steroid receptor antagonists and physiological status. In: *Acta Endocrinologica*, Jg. 129, H. 6, S. 532 – 535.
- Morgan, G., Wooding, F. B. (1983): Cell migration in the ruminant placenta: a freeze-fracture study. In: *Journal of Ultrastructure Research*, Jg. 83, H. 2, S. 148 – 160.
- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. In: *Cardiovascular Research*, Jg. 69, H. 3, S. 562 – 573.
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1993): Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. In: *Nature*, Jg. 365, H. 6442, S. 166 – 170.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. In: *Physiological Reviews*, Jg. 79, H. 4, S. 1193 – 1226.
- Newton, C. J., Buric, R., Trapp, T., Brockmeier, S., Pagotto, U., Stalla, G. K. (1994): The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Jg. 48, H. 5-6, S. 481 – 486.
- Nichols, M., Rientjes, J. M., Stewart, A. F. (1998): Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. In: *The EMBO Journal*, Jg. 17, H. 3, S. 765 – 773.
- Nohr, B. (1993): Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Geburt bei der Hündin unter Anwendung eines Antigestagens. Vet. med. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Nohr, B., Hoffmann, B., Steinetz, B. E. (1993): Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. In: *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, Jg. 47, S. 542 – 543.

- Özalp, G. R., Caliřkan, C., Seyrek-Intař, K., Wehrend, A. (2010): Effects of the progesterone receptor antagonist aglepristone on implantation administered on days 6 and 7 after mating in rabbits. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Jg. 45, H. 3, S. 505 – 508.
- Özalp, G. R., Seyrek-Intař, K., Caliřkan, C., Wehrend, A. (2008): Mid-gestation pregnancy termination in rabbits by the progesterone antagonist aglepristone. In: *Theriogenology*, Jg. 69, H. 9, S. 1056 – 1060.
- Özalp, G. R. (2005): Lokalisation der 17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase (P450c17), 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ 4/5 Isomerase (3 β -HSD) und Aromatase (P450arom) in der Plazenta beim Rind im Verlauf der Gravidität. *Vet. med.* Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gieřen.
- Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., Fortier, M. A. (2002): Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon-tau. In: *Endocrinology*, Jg. 143, H. 8, S. 2936 – 2943.
- Parent, J., Fortier, M. A. (2005): Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 73, H. 1, S. 36 – 44.
- Parent, M., Madore, E., MacLaren, L. A., Fortier, M. A. (2006): 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase in the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. In: *Reproduction*, Jg. 131, H. 3, S. 573 – 582.
- Parhar, R. S., Kennedy, T. G., Lala, P. K. (1988): Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. I. Characterization of suppressor cells and suppressor molecules. In: *Cellular Immunology*, Jg. 116, H. 2, S. 392 – 410.
- Pashen, R. L., Allen, W. R. (1979): The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. In: *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, H. 27, S. 499 – 509.
- Peter, A. T., Bosu, W. T. (1987): Peripartal endocrine changes associated with retained placenta in dairy cows. In: *Theriogenology*, Jg. 28, H. 3, S. 383 – 394.
- Peters, A. R., Laven, R. A. (1996): Treatment of bovine retained placenta and its effects. In: *The Veterinary Record*, Jg. 139, H. 22, S. 535 – 539.
- Peters, A. R., Poole, D. A. (1992): Induction of parturition in dairy cows with dexamethasone. In: *The Veterinary Record*, Jg. 131, H. 25-26, S. 576 – 578.

- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 29, H. 9, S. 2002. – 2007.
- Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., Yamamoto, K. R. (1990): Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. In: *Cell Regulation*, Jg. 1, H. 3, S. 291 – 299.
- Picard, D., Yamamoto, K. R. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. In: *The EMBO Journal*, Jg. 6, H. 11, S. 3333 – 3340.
- Pierce, K. L., Bailey, T. J., Hoyer, P. B., Gil, D. W., Woodward, D. F., Regan, J. W. (1997): Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 272, H. 2, S. 883 – 887.
- Power, R. F., Mani, S. K., Codina, J., Conneely, O. M., O'Malley, B. W. (1991): Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. In: *Science*, Jg. 254, H. 5038, S. 1636 – 1639.
- Poyser, N. L. (1995): The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. In: *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, Jg. 53, H. 3, S. 147 – 195.
- Pratt, B. R., Butcher, R. L., Inskeep, E. K. (1977): Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE₂ in ewes. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 45, H. 4, S. 784 – 791.
- Reimers, T. J., Ullmann, M. B., Hansel, W. (1985): Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 33, H. 5, S. 1227 – 1236.
- Rekawiecki, R., Kowalik, M. K., Slonina, D., Kotwica, J. (2008): Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. In: *Journal of Physiology and Pharmacology*, Jg. 59, Supplement 9, S. 75 – 89.
- Renoir, J. M., Radanyi, C., Jung-Testas, I., Faber, L. E., Baulieu, E. E. (1990): The nonactivated progesterone receptor is a nuclear heterooligomer. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 265, H. 24, S. 14402 – 14406.
- Richterich, P., Wehrend, A. (2009): Einsatz von Prostaglandinen bei Färsen und Kühen. Eine Literaturübersicht. In: *Tierärztliche Praxis Ausgabe G Großtier*, Jg. 37, H. 2, S. 81 – 90.

- Rollón, E., Millán, Y., las Mulas, J. M. de (2008): Effects of alogliptone, a progesterone receptor antagonist, in a dog with a vaginal fibroma. In: *The Journal of Small Animal Practice*, Jg. 49, H. 1, S. 41 – 43.
- Salamonsen, L. A. (1999): Role of proteases in implantation. In: *Reviews of Reproduction*, Jg. 4, H. 1, S. 11 – 22.
- Sartorius, C. A., Melville, M. Y., Hovland, A. R., Tung, L., Takimoto, G. S., Horwitz, K. B. (1994): A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. In: *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), Jg. 8, H. 10, S. 1347 – 1360.
- Savouret, J. F., Bailly, A., Misrahi, M., Rauch, C., Redeuilh, G., Chauchereau, A., Milgrom, E. (1991): Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. In: *The EMBO Journal*, Jg. 10, H. 7, S. 1875 – 1883.
- Scarpin, K. M., Graham, J. D., Mote, P. A., Clarke, C. L. (2009): Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. In: *Nuclear Receptor Signaling*, Jg. 7, e009.
- Schaaf, M. J.M., Champagne, D., van Laanen, I. H.C., van Wijk, D. C.W.A., Meijer, A. H., Meijer, O. C., Spaink, H. P., Richardson, M. K. (2008): Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. In: *Endocrinology*, Jg. 149, H. 4, S. 1591 – 1599.
- Schallenberger, E., Rampp, J., Walters, D. L. (1985): Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. II. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout pregnancy. In: *Acta Endocrinologica*, Jg. 108, H. 3, S. 322 – 330.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B., Pfaffl, M. W., Sinowatz, F. (2003): Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. In: *The Journal of Endocrinology*, Jg. 177, H. 2, S. 305 – 317.
- Schäubli, M., Ritter, N., Hässig, M., Zerbe, H., Bleul, U., Boos, A. (2008): Progesterone receptors, oestrogen receptor alpha and glucocorticoid receptors in the bovine intercaruncular uterine wall around parturition. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 103, H. 3-4, S. 215 – 227.
- Schlafer, D. H., Fisher, P. J., Davies, C. J. (2000): The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 60-61, S. 145 – 160.

- Schmollich, A., Michel, G. (1985): Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 1. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag. S. 255 – 257.
- Schnorr, B., Kressin, M. (2006): Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch. 5. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, S. 80 – 102.
- Schoon, H.-A. (1989): Lungen- und Plazentareifung beim Rind in der Endphase der Gravidität. Vet. med. Habilitationsschrift. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Schuler, G. (2000): Plazentare Steroide beim Rind. Biosynthese und Beziehung zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome. Vet. med. Habilitationsschrift. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Schuler, G., Greven, H., Kowalewski, M. P., Döring, B., Özalp, G. R., Hoffmann, B. (2008): Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation? In: *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, Jg. 116, H. 7, S. 429 – 436.
- Schuler, G., Hartung, F., Hoffmann, B. (1994): Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. In: *Experimental and Clinical Endocrinology*, Jg. 102, H. 3, S. 169 – 174.
- Schuler, G., Özalp, G. R., Hoffmann, B., Harada, N., Browne, P., Conley, A. J. (2006a): Reciprocal expression of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. In: *Reproduction*, Jg. 131, H. 4, S. 669 – 679.
- Schuler, G., Teichmann, U., Kowalewski, M. P., Hoffmann, B., Madore, E., Fortier, M. A., Klisch, K. (2006b): Expression of cyclooxygenase-II (COX-II) and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD)/prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: implications for the initiation of parturition in cattle. In: *Placenta*, Jg. 27, H. 9-10, S. 1022 – 1029.
- Schuler, G., Teichmann, U., Taubert, A., Failing, K., Hoffmann, B. (2005): Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed differently from ERalpha in bovine placentomes. In: *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. Jg. 113, H. 2, S. 107 – 114.
- Schuler, G., Wirth, C., Klisch, K., Failing, K., Hoffmann, B. (2000): Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Jg. 35, H. 3-4, S. 157 – 162.

- Schuler, G., Wirth, C., Klisch, K., Pfarrer, C., Leiser, R., Hoffmann, B. (1999): Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 61, H. 3, S. 797 – 801.
- Schuler, G., Wirth, C., Teichmann, U., Failing, K., Leiser, R., Thole, H., Hoffmann, B. (2002): Occurrence of estrogen receptor alpha in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 66, H. 4, S. 976 – 982.
- Sharpe, K. L., Eiler, H., Cullen, W. C., Hopkins, F. M. (1989): Morphometric analysis of collagen in gestational and retained bovine placentomes. In: *Theriogenology*, Jg. 32, H. 3, S. 485 – 491.
- Skarzynski, D. J., Ferreira-Dias, G., Okuda, K. (2008): Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication. In: *Reproduction in Domestic Animals*, Jg. 43, S. 57 – 65.
- Smith, C. L., O'Malley, B. W. (2004): Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. In: *Endocrine Reviews*, Jg. 25, H. 1, S. 45 – 71.
- Sobiraj, A. (1992): Untersuchungen zur Morphologie sowie zur Histochemie und Biochemie bei Rindern in der frühen postpartalen Periode. *Vet. med. Habilitationsschrift. Justus-Liebig-Universität, Gießen.*
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Bazer, F. W. (2004): Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. In: *Biology of Reproduction*.
- Spitz, I. M. (2003): Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. In: *Steroids*, Jg. 68, H. 10-13, S. 981 – 993.
- Stevens, R. D., Dinsmore, R. P. (1997): Treatment of dairy cows at parturition with prostaglandin F2 alpha or oxytocin for prevention of retained fetal membranes. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Jg. 211, H. 10, S. 1280 – 1284.
- Stocker, H., Waelchli, R. O. (1993): A clinical trial on the effect of prostaglandin F2 alpha on placental expulsion in dairy cattle after caesarean operation. In: *The Veterinary Record*, Jg. 132, H. 20, S. 507 – 508.
- Stormshak, F., Bishop, C. V. (2008): Board-invited review: Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. In: *Journal of Animal Science*, Jg. 86, H. 2, S. 299 – 315.

- Strahl, H. (1906); Die Embryohüllen der Säugetiere und die Placenta. In: Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Jena: Fischer-Verlag, S. 235-368.
- Sugimoto, Y., Narumiya, S. (2007): Prostaglandin E Receptors. In: Journal of Biological Chemistry, Jg. 282, H. 16, S. 11613 – 11617.
- Suzuki, T., Fujii, Y., Miyano, M., Chen, L. Y., Takahashi, T., Watanabe, K. (1999): cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 274, H. 1, S. 241 – 248.
- Takagi, M., Fujimoto, S., Ohtani, M., Miyamoto, A., Wijagunawardane, M. P.B., Acosta, T. J., Miyazawa, K., Sato, K. (2002): Bovine retained placenta: hormonal concentrations in fetal and maternal placenta. In: Placenta, Jg. 23, H. 5, S. 429 – 437.
- Takagi, M., Yamamoto, D., Ohtani, M., Miyamoto, A. (2007): Quantitative analysis of messenger RNA expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2), and steroidogenic enzymes in bovine placentomes during gestation and postpartum. In: Molecular Reproduction and Development, Jg. 74, H. 7, S. 801 – 807.
- Thorburn, G. D., Challis, J. R. (1979): Endocrine control of parturition. In: Physiological Reviews, Jg. 59, H. 4, S. 863 – 918.
- Thorburn, G. D., Challis, J. R., Currie, W. B. (1977): Control of parturition in domestic animals. In: Biology of Reproduction, Jg. 16, H. 1, S. 18 – 27.
- Thun, R. u.S.-P. (1994): Nebennierenrinde. In: Döcke, Friedemann (Hg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 314 – 333.
- Trasch, K., Wehrend, A., Bostedt, H. (2003): Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. In: Journal of Veterinary Medicine Series A, Jg. 50, H. 7, S. 375 – 379.
- Tsang, C. P. (1974): Changes in plasma levels of estrone sulfate and estrone in the pregnant ewe around parturition. In: Steroids, Jg. 23, H. 6, S. 855 – 868.
- Tsumagari, S., Kamata, J., Takagi, K., Tanemura, K., Yosai, A., Takeishi, M. (1994): 3 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity and gestagen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition. In: Journal of Reproduction and Fertility, Jg. 102, H. 1, S. 35 – 39.

- Ushizawa, K., Takahashi, T., Hosoe, M., Ishiwata, H., Kaneyama, K., Kizaki, K., Hashizume, K. (2007): Global gene expression analysis and regulation of the principal genes expressed in bovine placenta in relation to the transcription factor AP-2 family. In: *Reproductive Biology and Endocrinology*, Jg. 5, S. 17.
- Vandesompele, J., Preter, K. de, Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., Paepe, A. de, Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome Biology*, Jg. 3, H. 7, S.1 – 12.
- Verduzco Gomez, A., Miranda, L., Murphy, B., Quero, A. (2007): Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in carucular and cotyledonary tissue during the first half of gestation. In: *Biol Reprod*, Special issue. Abstract book. Society for the Study of Reproduction. 40th Annual Meeting, July 21 – July 25, 2007, San Antonio, Texas.
- Vetidata (2011): Alizin. Online verfügbar unter www.vetidata.de.
- Virbac Schweiz AG (Hg.) (2011): ALIZIN® ad us. vet. - Injektionslösung. Progesteronantagonist für Hunde. Online verfügbar unter www.virbac.ch/ Kleintier/ Fortpflanzungsmedizin/ Alizin.
- Vogel, P. (2005): The current molecular phylogeny of Eutherian mammals challenges previous interpretations of placental evolution. In: *Placenta*, Jg. 26, H. 8-9, S. 591 – 596.
- Von Euler, U.S. (1935): Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekrets. In: *Wiener Klinische Wochenschrift*, Jg. 14, H. 33, 1182 – 1183.
- Wade, C. E., Spitz, I. M., Lahteenmaki, P., Heikinheimo, O., Krieger, D. T., Bardin, C. W. (1988): Effects of the antigluccorticoid RU 486 on adrenal function in dogs. In: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Jg. 66, H. 3, S. 473 – 479.
- Walter, I., Boos, A. (2001): Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. In: *Placenta*, Jg. 22, H. 5, S. 473 – 483.
- Walters, M. R., Nemere, I. (2004): Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*, Jg. 61, H. 18, S. 2309-2321-2321.
- Ward, J. W., Wooding, F. B.P., Fowden, A. L. (2002): The effects of cortisol on the binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. In: *Placenta*, Jg. 23, H. 6, S. 451 – 458.

- Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T., Hayaishi, O. (1985): Enzymatic formation of prostaglandin F₂ alpha from prostaglandin H₂ and D₂. Purification and properties of prostaglandin F synthetase from bovine lung. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 260, H. 11, S. 7035 – 7041.
- Wathes, D. C., Wooding, F. B. (1980): An electron microscopic study of implantation in the cow. In: *The American Journal of Anatomy*, Jg. 159, H. 3, S. 285 – 306.
- Weems, C. W., Weems, Y. S., Randel, R. D. (2006): Prostaglandins and reproduction in female farm animals. In: *The Veterinary Journal*, Jg. 171, H. 2, S. 206 – 228.
- Weems, Y. S., Lewis, A. W., Randel, R. D., Weems, C. W. (2002): Effects of prostaglandins E₂ and F₂alpha (PGE₂; PGF₂alpha), trilostane, mifepristone, palmitic acid (PA), indomethacin (INDO), ethamoxytriphetol (MER-25), PGE₂ + PA, or PGF₂alpha + PA on PGE₂, PGF₂alpha, and progesterone secretion by bovine corpora lutea of mid-pregnancy in vitro. In: *The Chinese Journal of Physiology*, Jg. 45, H. 4, S. 163 – 168.
- Wehbrink, D., Hässig, M., Ritter, N., Zerbe, H., Bleul, U., Boos, A. (2008): Immunohistochemical demonstration of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin receptors EP₂ and FP expression in the bovine intercaruncular uterine wall around term. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 106, H. 3-4, S. 241 – 254.
- Wehling, M. (1997): Specific, nongenomic actions of steroid hormones. In: *Annual Review of Physiology*, Jg. 59, S. 365 – 393.
- Wehrend, A., Georgiev, P. (2006): Erfahrungen mit der Anwendung des Progesteronantagonisten Aglepriston bei der Hündin und der Katze. In: *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere*: Jg. 34, H. 6, S. 409 – 414.
- Wehrend, A., Hospes, R., Gruber, A. D. (2001): Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with a progesterone-antagonist. In: *The Veterinary Record*, Jg. 148, H. 11, S. 346 – 347.
- Wei, L. L., Hawkins, P., Baker, C., Norris, B., Sheridan, P. L., Quinn, P. G. (1996): An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progesterin-induced transcriptional activity. In: *Molecular Endocrinology*, Jg. 10, H. 11, S. 1379 – 1387.
- Wei, L. L., Norris, B. M., Baker, C. J. (1997): An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Jg. 62, H. 4, S. 287 – 297.

- Weigel, N. L. (1996): Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. In: *Biochemical Journal*, Jg. 319, H. 3, S. 657 – 667.
- Weigel, N. L., Zhang, Y. (1998): Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. In: *Journal of Molecular Medicine*, Jg. 76, H. 7, S. 469 – 479.
- Welshons, W. V., Lieberman, M. E., Gorski, J.: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. In: *Nature*, Jg. 307, H. 5953, S. 747 – 749.
- Whittle, W. L., Holloway, A. C., Lye, S., Challis, J. R.G., Gibb, W. (2006): The pattern of glucocorticoid and estrogen receptors may explain differences in steroid dependency of intrauterine prostaglandin production at parturition in sheep. In: *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, Jg. 13, H. 7, S. 506 – 511.
- Whittle, W. L., Holloway, A. C., Lye, S. J., Gibb, W., Challis, J. R. (2000): Prostaglandin production at the onset of ovine parturition is regulated by both estrogen-independent and estrogen-dependent pathways. In: *Endocrinology*, Jg. 141, H. 10, S. 3783 – 3791.
- Whittle, W. L., Patel, F. A., Alfaidy, N., Holloway, A. C., Fraser, M., Gyomory, S., Lye, S. J., Gibb, W., Challis, J. R. (2001): Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. In: *Biology of Reproduction*, Jg. 64, H. 4, S. 1019 – 1032.
- Wikström, A. C., Bakke, O., Okret, S., Brönnegård, M., Gustafsson, J. A. (1987): Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. Abstract. In: *Endocrinology*, Jg. 120, H. 4, S. 1232 – 1242.
- Williams, W. F., Margolis, M. J., Manspeaker, J., Douglass, L. W., Davidson, J. P. (1987): Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. In: *Theriogenology*, Jg. 28, H. 2, S. 213 – 223.
- Wirth, C. (2001): Immunhistologische Untersuchungen zum Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie Charakterisierung der Zelldynamik in den Plazentomen des Rindes in der zweiten Hälfte der Gravidität und unter der Geburt. *Vet. med. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.*
- Wischral, A., Verreschi, I. T., Lima, S. B., Hayashi, L. F., Barnabe, R. C. (2001): Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. In: *Animal Reproduction Science*, Jg. 67, H. 3-4, S. 181 – 188.

- Woicke, J., Schoon, H.-A., Heuwieser, W., Schulz, L.-C., Grunert, E. (1986): Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind. In: *Journal of Veterinary Medicine A*, H. 33, S. 660 – 667.
- Wooding, F. B. (1982): Structure and function of placental binucleate ('giant') cells. In: *Bibliotheca anatomica*, H. 22, S. 134 – 139.
- Wooding, F. B. (1992): Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. In: *Placenta*, Jg. 13, H. 2, S. 101 – 113.
- Wooding, F. B., Beckers, J. F. (1987): Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. In: *Cell and Tissue Research*, Jg. 247, H. 3, S. 667 – 673.
- Wooding, F. B., Flint, A. P., Heap, R. B., Morgan, G., Buttle, H. L., Young, I. R. (1986): Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 76, H. 2, S. 499 – 512.
- Wooding, F. B., Wathes, D. C. (1980): Binucleate cell migration in the bovine placentome. In: *Journal of Reproduction and Fertility*, Jg. 59, H. 2, S. 425 – 430.
- Wooding, F. B.P., Roberts, R. M., Green, J. A. (2005): Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. In: *Placenta*, Jg. 26, H. 10, S. 807 – 827.
- Yamashita, S. (1995): Intranuclear localization of hormone-occupied and -unoccupied estrogen receptors in the mouse uterus: application of 1 nm immunogold-silver enhancement procedure to ultrathin frozen sections. In: *Journal of Electron Microscopy*, Jg. 44, H. 1, S. 22 – 29.
- Yamashita, S. (1998): Localization and functions of steroid hormone receptors. In: *Histology and Histopathology*, Jg. 13, H. 1, 255-270.
- Zahradnik, H., Neulen, J., Breckwoldt, M. (1991): Antigestagene – Grundlagen und Klinik. In: *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Jg. 250, H. 1, S. 861 – 913.
- Zakar, T., Hertelendy, F. (2007): Progesterone withdrawal: key to parturition. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Jg. 196, H. 4, S. 289 – 296.
- Zduńczyk, S., Janowski, T. (1989): The significance of steroid hormones and prostaglandins for the expulsion of the afterbirth in cattle. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Jg. 96, H. 3, S. 143 – 146.

Zerobin, K., Jöchle, W., Steingruber, C. (1973): Termination of pregnancy with prostaglandins E2 (PGE2) and F2alpha (PGF2alpha) in cattle. In: Prostaglandins, Jg. 4, H. 6, S. 891 – 901

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler für die Überlassung des interessanten Themas und für die jederzeit gewährte fachliche Beratung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann möchte ich für sein Engagement sowie seine fachliche und finanzielle Unterstützung herzlich danken.

Bei Frau Prof. Dr. Christiane Pfarrer und Herrn Ph.D. Marc Dilly vom Anatomischen Institut der tierärztlichen Hochschule Hannover möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Jan-Dirk Häger für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenentnahme danken.

Dem Gießener Graduiertenzentrum Lebenswissenschaften und dem PhD-Programm danke ich für die Schaffung der Möglichkeit fachspezifische und fachübergreifende Fähigkeiten und Kenntnisse umfassend zu erweitern.

Herrn Willi Damm und Frau Sabine Feller möchte ich für die Durchführung der RIAs bedanken. Außerdem möchte ich dem „Computerdokter“ für seine Bemühungen PC-Probleme jeglicher Art zu lösen danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biomathematik und Datenverarbeitung möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Den Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie danke ich für die immer gewährte Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine Mitdoktoranden und Kollegen. Danke für das freundliche Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die netten Gespräche, die gemeinsamen „Raucherpausen“ und die gegenseitige Motivation. Astrid, Hanna, Marc, Michael, Michi, Pershotam, Peter, Sandra, Susanne, Caro, Maike, Michele, Saskia, Linda und Yaser: Es war schön mit Euch zusammenzuarbeiten! Ganz besonders möchte ich mich bei meinen „Büromitbewohnern“ Astrid, Hanna und Pershotam für Ihre nette Gesellschaft und die vielfältige Unterstützung danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen guten Freunden, insbesondere Brigitta, Christina und Isabel bedanken. Danke dafür, dass ich immer mit Euch rechnen konnte. Ihr habt mir gezeigt was echte Freundschaft bedeutet!

Mein größter Dank richtet sich an meine Familie, besonders meine Mutter, und Markus. Liebe Mama Du hast mir das Studium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht und hast mich immer in jeder Hinsicht unterstützt. Lieber Markus, danke für Deine Geduld, Dein Verständnis und Deine liebevolle Unterstützung!

Danke dafür, dass Ihr immer für mich da wart! Ohne Euch wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen!

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

ISBN 978-3-86345-084-7



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@divg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>**