

Die Endometritis puerperalis des Rindes ist eine häufige Erkrankung, die bedeutende wirtschaftliche Nachteile für die Tierhalter durch verlängerte Gützeiten, sterilitätsbedingte Abgänge und Behandlungskosten mit sich bringt. In der Literatur wird den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) eine Schlüsselrolle bei der sogenannten endometrialen Selbstreinigung zugesprochen. Um zu effizienteren Therapieformen zu kommen, ist es notwendig, die Regulation und Beeinflussbarkeit von PMN bei ihrer Wanderung aus dem Blut in den Uterus sowie ihre funktionellen und phänotypischen Eigenschaften zu kennen. Zu diesem Zweck wurde ein Modellsystem beim Rind erarbeitet, an dem bei gesunden Färsen unter definierten Bedingungen die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Uterus und deren Eigenschaften nach verschiedenen Gesichtspunkten analysiert werden können.

Bevorzugt PMN werden mittels kontrollierter intrauteriner Infusion einer definierten chemotaktischen Substanz (30 nmo/l Lösung von Leukotrien (LT) B₄) in den Uterus zyklussynchronisierter Färsen gelockt und in Anlehnung an das Embryotransferverfahren nach 24 Stunden herausgespült. Vor der LTB₄-Behandlung erfolgt eine "Nullspülung" zur Bestimmung der individuellen Ausgangssituation. Blutentnahmen vor und nach der gesamten Behandlung eines Tieres dienen der vergleichenden Beurteilung der PMN-Eigenschaften im Blut und der Untersuchung der systemischen Wirkung des intrauterin verabreichten LTB₄. Eine Uterusbiopsie wurde nach der letzten Gewinnung der PMN durchgeführt, um chronische Veränderungen der Gebärmutter Schleimhaut zu erkennen, die die PMN-Migration beeinflussen könnten. Die Isolierung der PMN aus dem Blut und der Uterusspülflüssigkeit erfolgt unter vergleichbaren Bedingungen durch Depletierung des "buffy coat" und hypotone Erythrozytenlyse. Bei In-vitro-Untersuchungen, die eine hohe Reinheit der PMN-Population verlangen, wird zusätzlich die Dichtegradientenzentrifugation mittels Percoll^R eingesetzt.

Außer der Erfassung der Zellzahlen, der Zellvitalität und der Differenzierung der Leukozytenpopulationen werden die PMN phänotypisch anhand der Expression verschiedener Zelloberflächenstrukturen mittels monoklonaler Antikörper und quantitativer Immunfluoreszenz

charakterisiert. Ihre Kapazität zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ohne und nach Aktivierung durch Phorbolster wird mittels Dihydrorhodamin 123 quantifiziert. Die quantitative Aufnahme fluorochrommarkierter Staphylokokken kennzeichnet ihre Phagozytosefähigkeit. All diese Untersuchungsverfahren wurden in umfangreichen Vorversuchen für eine empfindliche und zuverlässige Auswertung am Durchflußzytometer adaptiert.

Untersuchungen an 8 Färsen zeigten, daß neutrophile Granulozyten durch LTB_4 in beachtlicher Zahl in das Uteruslumen zu locken sind. Auf ihrer Oberfläche kommt es unter den hier gewählten Bedingungen zu deutlichen Änderungen der Expression einiger Strukturen, während andere unverändert bleiben (z.B. Komplementrezeptor CR3: Uterus-PMN zeigen im Vergleich zu Blut-PMN eine um 30 % stärkere Expression). Im Vergleich zu Blut war die Phagozytoseaktivität von aus dem Uterus gewonnenen PMN signifikant niedriger (z.B. um 30 % geringerer Anteil phagozytischer Zellen). Dagegen konnten bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Stimulation mit Phorbolster keine signifikanten Unterschiede zwischen PMN aus dem Blut und denen aus dem Uterus festgestellt werden.

Mit diesen Methoden und ersten Untersuchungen wurde das Grundgerüst für ein definiertes Modell zur gezielten Modulation von PMN und zum Studium ihrer Bedeutung bei der Endometritis des Rindes erarbeitet. Nach Ausbau des Untersuchungsspektrums steht ein für In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen geeignetes System zur Überprüfung derzeitiger Behandlungsmaßnahmen und zur Entwicklung verbesserter Therapie- und Prophylaxeformen zur Verfügung.

H. Zerbe: Functional and phenotypic investigations with bovine neutrophilic granulocytes from blood and uterus

Puerperal endometritis, a common reproductive disorder in cows, is associated with high economical losses due to prolonged dry periods, infertility, sterility and high veterinary costs. Polymorphonuclear granulocytes (PMN) play an important role in the maintenance of endometrial health. In order to develop effective therapeutic approaches, it is necessary to understand more about the functional and structural (phenotypic) qualities of PMN and the regulation and possibilities of modulation of their migration from intravascular to the uterine compartment.

In order to achieve the above mentioned objective, this study attempted to develop a model system for cows to facilitate the migration of PMN into uterus under defined conditions allowing the study of their characteristics in many perspectives. The system consisted of a controlled intrauterine infusion of oestrous synchronised heifers with 30 nmol/l Leukotrien B₄ (LTB₄), a physiological chemotactic substance. Uterine flushings were obtained 24 hours after the priming using the embryo transfer instrumentation. A pretreatment uterine lavage was collected as a control. Besides the collection of blood samples before and after the treatment a uterine biopsy was conducted after the uterine washing to evaluate any systemic or local effects of the infusion. The separation of PMN from blood and uterine washings was performed under comparable conditions - with the radical removal of buffy coat followed by hypotonic lysis of erythrocytes. In case of in vitro studies, where a highly pure PMN population was required, further purity was achieved through Percoll gradient.

In addition to cellcounts, viability and differentials, the PMN were characterised in respect of their expression of different cell surface structures using quantitative immunofluorescence employing different monoclonal antibodies. The capacity of the PMN to generate reactive oxygen species (ROS) before and after activation with phorbol ester was quantified using Dihydrorhodamin 123. Their phagocytic activity was measured by the uptake of fluorochrome

labelled staphylococci. Extensive trials were conducted before hand to standardise the flowcytometric methods employed in this study.

In 8 heifers it was observed that the PMN migrate in remarkable numbers into uterus in response to LTB_4 and showed a well distinguished change in the expression of their surface structures (e.g. complement receptor CR3: uterine PMN show an 30 % increased expression in comparison to PMN from blood). Phagocytic activity was found to be significantly lower in PMN from uterine flushing compared with PMN obtained from blood (e.g. 30 % decrease in phagocytic active PMN). The generation of reactive oxygen species after phorbol ester stimulation was not significantly different between PMN from blood and uterus.

This study provides the basis for a defined model for the study of the role of PMN in endometrial disorders, for the exploration of the possibilities of their modulation and the critical evaluation of therapeutic and prophylactic strategies at the level of cellular defence in the uterus.