

Eine wichtige Ursache für Fertilitätsstörungen bei der Stute ist die Endometritis. Man geht davon aus, daß es vor allem bei der Abfohlung, dem Deckakt, der künstlichen Besamung und der gynäkologischen Untersuchung zur bakteriellen Kontamination der Gebärmutter kommt. In der Regel sind die lokalen uterinen Abwehrkräfte, insbesondere die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Lage, die Keime in wenigen Stunden bis Tagen zu inaktivieren und zu eliminieren.

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil eines Gesamtkonzeptes zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte für die Behandlung der Endometritis der Stute, aber auch zur Erforschung pathogenetischer Grundlagen der Erkrankung. In vorausgehenden Arbeiten wurde gezeigt, daß durch die intrauterine Applikation von frisch aus dem Blut isolierten PMN eine Verbesserung der Fruchtbarkeitsaussichten bei sogenannten Problemstuten erreicht werden kann. Da diese Methode bezüglich ihrer Praktikabilität Nachteile aufweist, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Methoden für die Separation und Kryokonservierung von zirkulierenden equinen neutrophilen Granulozyten etabliert werden.

Mit der hypotonen Erythrozytenlyse wurde eine Leukozytenseparationsmethode ausgewählt, die sich durch geringen technischen und materiellen Aufwand auszeichnet. Beim Vergleich mit der Dextranedimentation zeigte sich, daß die Vitalität der isolierten Zellen bei beiden Verfahren über 95% lag. Mittels hypotoner Erythrozytenlyse konnten jedoch mehr Leukozyten aus dem Blut isoliert werden.

Im Ergebnis dieser Arbeit liegt ein Verfahren zur Einfrierung und Auftauung von aus dem Blut isolierten equinen Leukozyten vor, das für die Applikation in den Uterus vitale und funktionell kompetente neutrophile Granulozyten bereitstellt. Das Kryoschutzmittel setzt sich aus 95% autologem Plasma und 5% Dimethylsulfoxid zusammen. Nach der Konfektionierung im Makrotüb[®] werden die Zellen mit Hilfe eines Einfrierautomaten und einer definierten Temperaturkurve eingefroren (+4°C bis -70°C 1°C pro min; -70°C bis -140°C 10°C pro min; Tauchen in flüssigen Stickstoff). Die Auftauung erfolgt im Wasserbad bei 37°C für eine Minute. Vitalität, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Phagozytoseaktivität der aufgetauten PMN wurden mittels durchflußzytometrischer Meßmethoden mit frischen, nicht gefrorenen Zellen des identischen Spendertieres verglichen. Die Vitalität der aufgetauten Zellen

lag über 90%. Die Phagozytoseaktivität opsonisierter Bakterien war mit 81,0 % resp. 80,0 % in den frischen resp. gefrorenen/aufgetauten PMN-Populationen identisch. Die gefrorenen/aufgetauten PMN zeigten eine signifikant höhere Kapazität zur ROS-Bildung nach Stimulation mit PMA.

Die Experimente zur Beurteilung des Einflusses dieses Kryokonservierungsverfahrens auf die Vitalität, die Ingestionskapazität und die Fähigkeit zur Bildung mikrobizider reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) der PMN zeigten, daß zumindest bis 6 Stunden nach der Verbringung der Zellen in den Uterus eine therapeutische Wirkung erwartet werden kann. So waren nach 6stündiger *in-vitro*-Inkubation noch etwa 75% der aufgetauten PMN zur Phagozytose in der Lage. Das entsprach der Leistung der Kontrollzellen, die vor der Inkubation frisch aus dem Blut isoliert worden waren. Eine ähnliche Tendenz wurde bei der Fähigkeit zur ROS-Bildung beobachtet. Nach 24 Stunden verringerte sich die Phagozytosekapazität bei frisch isolierten und aufgetauten PMN deutlich (<10% phagozytosepositive PMN). Im Vergleich zu den Messungen nach 6 Stunden sanken die Werte der ROS-Bestimmungen in Abhängigkeit von der Konzentration der Stimulatorsubstanz PMA auf 25-50%. Uterusspülflüssigkeit, die von gesunden Stuten im Östrus und Diöstrus gewonnen wurde, beeinflusste weder die Vitalität noch die Funktionalität der neutrophilen Granulozyten.

Bei einem weiteren Experiment zeigte sich, daß der durch die alleinige PBS-Uterusinfusion induzierte PMN-Influx in die Gebärmutter durch Leukozyten in der Infusionssuspension nicht verstärkt wurde. Damit wird die Hypothese gestärkt, daß der Behandlungserfolg der in vorausgehenden Experimenten durch die Infusion von frisch isolierten PMN erreicht wurde, vorwiegend auf deren Abwehrreaktion im Uterus zurückzuführen ist und nicht primär auf der Anlockung zirkulierender PMN basiert.

Im Rahmen des Gesamtkonzeptes der Untersuchungen zur Endometritis der Stute sind Experimente geplant, in denen die therapeutische Wirkung intrauterin applizierter kryokonservierter Leukozyten mit anderen Therapieformen verglichen werden. Parallel dazu sollen modellhafte Arbeiten durchgeführt werden, die zum Verständnis pathogenetischer Mechanismen bei der Entstehung der Endometritis der Stute beitragen.

7 SUMMARY

Luis Fernando Fiori Castilho:

Studies of separation and cryopreservation of cyculatory polymorphonuclear neutrophilic granulocytes for treatment of endometritis in horses

One of the most important causes for infertility in the mare is endometritis. Natural contamination of the genital tract occurs after foaling, breeding, artificial insemination and gynaecological manipulations. Under normal situations, local uterine defense mechanisms, especially polymorphonuclear neutrophilic granulocytes (PMNs) are capable of inactivating and eliminating bacteria within a few hours or days.

The studies presented here demonstrate that uterine infusion of freshly isolated neutrophils improved fertility rates, especially in "problem mares". In spite of these positive results, the application of this method has some practical limitations. The goal was to reduce these limitations by the use of cryopreserved leukocytes

Two methods for the separation of circulating blood leukocytes were compared: dextrane-sedimentation and hypotonic erythrolysis. Vital cells (>95%) were obtained by both methods.

However, the absolute numbers of separated cells were significantly greater after hypotonic lysis. After addition of equine plasma (95%) and DMSO (5%) the PMNs were frozen. Optimal cooling rates were determined empirically and chosen as follows: from +4 to -70°C at 1°C/min and from -70°C to -140°C (10°C/min). Subsequently the cells were placed in liquid nitrogen (-196°C).

Cell survival rates and the retaining of functional capacities after thawing, membrane integrity, phagocytosis and the generation of reactive oxygen species (respiratory burst) were verified by flow cytometry. After thawing, more than 90% of the cells were shown to be vital as judged by propidium iodide exclusion. Phagocytosis of opsonized bacteria was similar in both populations of cells (e.g. 81% resp. 80% of

the fresh resp. frozen/thawed PMNs). Frozen and thawed PMNs even showed an increased capacity for generating reactive oxygen species after stimulation with PMA.

After 6 hours of in vitro incubation, 75% of the PMNs (fresh or thawed) still displayed normal functional capacity, whereas after 24 hours the percentage in both groups had dropped to 10%. These comparable results between fresh and frozen and thawed PMNs demonstrate the high practicability of the presented method of separation and cryopreservation of vital and immunocompetent PMNs.

The intrauterine infusion of PBS induced influx of circulating PMNs into the uterus. However, when labeled PMNs were used instead of PBS, influx of circulating PMNs was only slightly enhanced. Therefore it is speculated, that the success of intrauterine PMN infusion is mainly based on the activities of the infused rather than the attracted PMNs.

Future experiments will compare this treatment regime to other methods. Furthermore, the establishment of new model systems shall add to our understanding of the pathogenetic mechanisms in the development of equine endometritis.