

6 Zusammenfassung

Die Endometritis puerperalis ist eine häufige Erkrankung bei Milchrindern mit nachhaltigen Folgen für Fertilität und Milchleistung. Den neutrophilen Granulozyten (PMN) wird bei der antimikrobiellen Abwehr im postpartalen Uterus eine wichtige Rolle zugesprochen. Diese Arbeit ist Teil eines Gesamtprojektes zur Erforschung der Endometritis des Rindes.

Hier sollte geprüft werden, ob und wie das Lochialsekret sowie die Produkte dominierender uteriner Keime bovine PMN beeinflussen können. Die Immunphänotypen (nachgewiesen durch monoklonale Antikörper, mAk) und funktionelle Eigenschaften der PMN (Phagozytose; Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, ROS; antikörperunabhängige zelluläre Zytotoxizität, AICC) wurden mit Hilfe durchflußzytometrischer Verfahren charakterisiert.

Eine mittel- und hochgradige bakterielle Kontamination des Uterus war in der Hauptsache durch die Präsenz von *E. coli* und *A. pyogenes* charakterisiert. Mit steigender bakterieller Uteruskontamination konnten erhöhte PMN-Zahlen im Uterus nachgewiesen werden. Dies korrelierte im Blut mit verminderten PMN-Konzentrationen. In Abhängigkeit von der Uteruskontamination mit *E. coli* und *A. pyogenes* war die AICC der reisolierten, lochialen PMN herabgesetzt. Zudem waren die von mAk IL-A110 erkannte Oberflächenstruktur sowie CD11b signifikant stärker exprimiert.

Aus dem Blut isolierte PMN wurden in ihrem Phänotyp und in ihren funktionellen Leistungen durch bakteriologisch negative Lochialsekrete kaum beeinflusst. Im Gegensatz dazu induzierten bakteriologisch positive Lochialsekrete, die vor der Präparation vermehrungsfähige *E. coli* oder *A. pyogenes* enthielten, eine deutlich verstärkte Expression der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) sowie eines granulozytentypischen Membranmoleküls (mAk IL-A110). Andere untersuchte Membranstrukturen blieben unbeeinflusst (MHC-Klasse-I, CD11a/CD18) oder zeigten eine verminderte Expression (mAk Bo116). Die Kapazität zur Bildung von ROS war unter dem Einfluß von bakteriologisch positiven Lochialsekretpräparationen massiv reduziert. Alle eingesetzten Lochialsekrete beeinflussten die Phagozytoseleistung dagegen nicht deutlich. Interessanterweise wiesen *E. coli*- oder *A. pyogenes*-kontaminierte Lochialsekrete vergleichbare Effekte auf neutrophile Granulozyten auf.

Für den Nachweis direkter bakterieller Einflüsse auf Blut-PMN wurden *E. coli* und *A. pyogenes* in Reinkultur gezüchtet. Geprüft wurden lösliche Produkte, die in den Kulturüberstand abgegeben wurden, als auch bakterielle Fragmente abgetöteter Keime auf ihre konzentrations- und zeitabhängigen Einflüsse auf PMN.

Unterschiede zwischen Bakterienfragmenten und löslichen Produkten waren rein quantitativer Natur. Meist bewirkte die langfristige Exposition (24h) der PMN mit partikulären Bakterienprodukten den stärksten Effekt. Die Produkte von *E. coli* und *A. pyogenes* wirkten sehr ähnlich. Sie führten *in vitro* zu einer verringerten Vitalität der PMN und zu einer deutlich gesteigerten Expression des Oberflächenmoleküls CD11b und der von mAk IL-A110 erkannten Struktur. Andere Membranmoleküle zeigten keine Veränderungen (MHC-Klasse-I, CD11c) oder in Abhängigkeit von der Inkubationszeit divergente Modulationen (CD11a, mAk B0116).

Nach 24stündiger Vorinkubation mit Produkten von *E. coli* und *A. pyogenes* wurde ein deutlicher Abfall der untersuchten funktionellen PMN-Kapazität verzeichnet (Phagozytose, ROS, AICC). Eine Ausnahme stellten die löslichen Produkte von *A. pyogenes* dar. Sie stimulierten nach 24stündiger Inkubation die untersuchten Funktionen der Zellen. Kurze Inkubationszeiten (1-3 h) führten teilweise zu einer gesteigerten *in vitro* Funktionalität der PMN (Phagozytose, ROS).

Die Resultate dieser Arbeit belegen, daß gramnegative *E. coli*- und grampositive *A. pyogenes*-Keime in ganz ähnlicher Weise immunphänotypische und funktionelle Parameter von bovinen PMN modulieren können. Ausgelöst werden die Veränderungen bei neutrophilen Granulozyten durch direkten Kontakt der Bakterien mit den PMN.

Es liegt nahe, daß beide Keime damit den Verlauf der Endometritis puerperalis aktiv beeinflussen. Die negativen Effekte dieser Bakterien auf die Leistungsfähigkeit der PMN könnten in einer dauerhaften und starken Aktivierung der Zellen begründet sein, die eine funktionelle Erschöpfung mit sich bringt. Außerdem deuten die Ergebnisse daraufhin, daß *E. coli* und *A. pyogenes* zur Akkumulation von PMN im Entzündungsgebiet beitragen und damit die Regulation der inflammatorischen Prozesse negativ beeinflussen.

7 Summary

C. Obadnik: Investigations of *E. coli* and *A. pyogenes* on phenotypic and functional properties of bovine neutrophils from blood and uterus

Endometritis puerperalis is a frequent disease of dairy cattle with lasting consequences for fertility and milk yield. This work is part of a research project dealing with the endometritis of cattle and focuses on neutrophilic granulocytes (PMN). Since PMN are considered to be the major players in the antimicrobial defence in the postpartal uterus, it was investigated, whether lochial secretions and products of dominant bacteria exert an influence on these cells. The immune phenotypes (determined with monoclonal antibodies, mAbs) and functional properties of PMN (phagocytosis, generation of reactive oxygen species, ROS; antibody-independent cellular cytotoxicity, AICC) were characterized with flow cytometric procedures.

Average and high grade uterine contamination were always associated with the presence of *E. coli* and *A. pyogenes*. Rising contamination was correlated with increasing uterine PMN numbers and decreasing PMN concentrations in the blood. Depending on the uterine contamination with *E. coli* and *A. pyogenes*, reisolated lochial PMN displayed a reduced AICC. Furthermore, CD11b and the surface structure detected by mAb IL-A110 were expressed significantly stronger on these cells.

When added to blood PMN *in vitro*, bacteriological negative lochial secretions hardly modulated their phenotype or their functional properties. In contrast, sterile-filtered lochial secretions which contained *E. coli* or *A. pyogenes* before preparation resulted in a significantly enhanced expression of complement receptor CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) and a granulocyte-specific membrane molecule (mAb IL-A110). Other surface structures remained unaltered (MHC class I; CD11a/CD18) or displayed reduced expression (mAb Bo116). The capacity to generate ROS was severely depressed under the influence of filtered lochial secretions which were previously contaminated. All secretions did not modulate the phagocytosis capacity markedly. Interestingly, *E. coli*- or *A. pyogenes*-contaminated lochial secretions showed comparable effects on neutrophilic granulocytes.

For the proof of direct bacterial influences on blood-derived PMN, *E. coli* and *A. pyogenes* were grown pure in cultures. PMN were then incubated with soluble products (secreted by the bacteria into the culture supernatant) and bacterial fragments of killed bacteria

Bacterial fragments and soluble products differed in their effects only quantitatively. Usually, long-time exposure (24h) of PMN with fragments induced the strongest effects. Products of *E. coli* and *A. pyogenes* acted in a very similar way. They reduced the vitality of PMN *in vitro* and induced an enhanced expression of CD11b and of the membrane molecule detected by mAb IL-A110. Other surface structures remained unaltered (MHC class I, CD11c) or were modulated differently depending on the incubation time (CD11a, mAb Bo116)

Functional capabilities of PMN (phagocytosis, ROS generation, AICC) declined considerably after preincubation for 24 hours with products of *E. coli* and *A. pyogenes*. Only soluble products of *A. pyogenes* stimulated these functions after an incubation for 24h. Short incubation times (1-3h) sometimes resulted in an enhanced *in vitro* functionality (phagocytosis, ROS generation)

Overall, the results supply evidence for similar modes of action of the gram-negative *E. coli* and the gram-positive *A. pyogenes* on bovine PMN. Changes in PMN are triggered by direct contact between bacteria and PMN. Thus, it is fair to assume that both micro-organisms actively influence the course of an endometritis puerperalis. A strong and sustained activation of PMN by bacteria, resulting in a functional exhaustion could be causative for the observed negative effects on PMN. Furthermore, *E. coli* and *A. pyogenes* also seem to contribute to an accumulation of PMN in the inflamed region, and consequently to a dysregulation of the local inflammatory process