

6 Zusammenfassung

Eine dysregulierte inflammatorische Reaktion des Endometriums im Anschluss an eine Belegung könnte für Fruchtbarkeitsstörungen beim Schwein ursächlich sein. Um in diesem Kontext relevante Fragestellungen beantworten zu können, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell etabliert, mit dessen Hilfe der leukozytäre Influx in die Wand und das Lumen der porcinen Gebärmutter unter definierten Bedingungen untersucht werden sollte. Von anästhesierten Tieren wurde der Uterus operativ vorgelagert. Für die Gewinnung luminaler Leukozyten wurde der Uterus mittels entsprechend platzierter Klemmen in einzelne Abschnitte (Uteruskörper, -hörner) unterteilt und nach transzervikaler oder transmuraler Insemination mit Phosphat-gepuffertter Salzlösung (PBS) gespült. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Leukozyten im relativ langen Uterus der Sau sowohl qualitativ als auch quantitativ etwa gleich ist. Außerdem korrelieren Anzahl und Zusammensetzung der luminalen Leukozyten mit der des Endometriums, wie die jeweils zu Versuchsende entnommenen und histologisch geprüften Biopate belegten. Die kontrollierte Trennung der einzelnen Uterusbereiche ermöglichte es, innerhalb des Organs gleichzeitig unterschiedliche Reize zu setzen (Spermien, PBS, rekombinantes humanes Interleukin-8: rhIL-8) und die daraufhin einsetzende uterine Reaktion zu erfassen. Sowohl Spermien, rhIL-8 als auch die PBS-Lösung provozierten einen Einstrom von Leukozyten in das uterine Lumen. Bei starker interindividueller Variabilität induzierten Spermia und rhIL-8 jedoch einen stärkeren Influx als PBS.

Um den zeitlichen Verlauf der uterinen Immunantwort nach Insemination feststellen zu können, erfolgten in definierten Abständen wiederholte Spülungen der Gebärmutter. Nach 45 und 90 min konnte mit 3×10^6 und 6×10^6 Leukozyten nur ein geringer Influx festgestellt werden. Erst 180 min nach Insemination wurde ein massiver Leukozyteninflux (194×10^6 Zellen) registriert. Trotz Blockade des retrograden Rückflusses, konnten 3 Stunden nach der transmuralen Applikation von 625×10^6 Spermien durchschnittlich nur noch 69×10^6 Spermien in der uterinen Spülflüssigkeit nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Bedeutung der immigrierten Granulozyten für die Eliminierung überzähliger Spermien.

Unabhängig von der Art des Infundates in den Uterus dominierten nach 45 und 90 min die mononukleären Zellen unter den intrauterinen Leukozyten (60-70%). Erst mit der zwischen 90 und 180 min *post infusionem* beginnenden Leukozytenimmigration kam es zu einer massiven Anreicherung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN > 80%) im Uterusspülsekret.

Im uterinen Sekret konnten neutrophilen Granulozyten, lymphoide Zellen und monozytoide Zellen, jedoch keine eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden. Die uterinen

Leukozytensubpopulationen unterschieden sich in ihren durchflusszytometrisch ermittelten, morphologischen Parametern (Größe, Granularität) nicht von zeitgleich gewonnenen Blutleukozyten. Nach Membranimmunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen definierte Zelloberflächenstrukturen wiesen die uterinen PMN und monozytoiden Zellen gegenüber den Zellen aus dem autologen, peripheren Blut ein verändertes Expressionsmuster auf. Während einige erkannte Strukturen auf uterinen Leukozyten schwächer exprimiert wurden (z.B. CD18 auf PMN und SWC1 auf Monozyten), war das von mAk 1030-3-16 erkannte Epitop auf den uterinen PMN stärker exprimiert als auf den Blut-PMN. Uterus- und Blut-PMN waren allerdings in vergleichbarer Weise zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fähig, was nicht darauf hindeutete, dass der Prozess der Immigration in den Uterus zu einer Modulation dieser funktionellen Eigenschaft porciner PMN führte. Bei den im uterinen Lumen nachgewiesenen lymphozytären Zellen handelte es sich überwiegend um T-Zellen mit dem Phänotyp CD8⁺/CD6⁺ (80% der Zellen waren CD8⁺; 75% der Zellen CD6⁺). Damit unterschied sich die Zusammensetzung der uterinen lymphoiden Zellen deutlich von der des peripheren Blutes.

Unter der Hypothese, dass Spermakomponenten die Transmigration leukozytärer Zellen in den Uterus *in vivo* modulieren, wurde die Beeinflussung der Transmigration neutrophiler Granulozyten durch Seminalplasma und Spermien *in vitro* geprüft. Gereinigte Spermien waren in keiner der gewählten Versuchsansätze in der Lage, die Transmigration der PMN zu beeinflussen. Auch Seminalplasma erwies sich als nicht direkt chemotaktisch für porcine neutrophile Granulozyten. Allerdings konnte Seminalplasma eine Interleukin-8-induzierte Chemotaxis negativ beeinflussen. Die hierbei beobachteten, z.T. erheblichen interindividuellen Unterschiede lassen darauf schließen, dass dies in der Spezies Schwein nicht einheitlich erfolgt und stark von der individuellen Reaktionsbereitschaft neutrophiler Granulozyten auf chemotaktische Stimuli abhängt. Interessanterweise sezernierten frisch aus dem peripheren Blut separierte porcine MNC konstitutiv chemotaktische Faktoren. Seminalplasma war in der Lage, diese Sekretionsleistung negativ zu beeinflussen und wirkte dadurch indirekt hemmend auf die Chemotaxis porciner PMN. Allerdings zeigt sich die hemmende Wirkung nur bei MNC von Tieren im Interöstrus, was auf die Co-regulation durch hormonelle Faktoren schließen läßt. Weitere *in vitro* Versuche belegten zudem, dass Seminalplasma die Überlebensrate porciner PMN in Abwesenheit von MNC negativ, in Gegenwart von MNC jedoch positiv beeinflusst. Dies deutet auf die mögliche funktionelle Bedeutung der oben erwähnten, zahlenmäßig zwar geringen, aber sehr speziellen Subpopulation mononukleärer Zellen im Uterus hin.

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Tiermodells wurden orientierende Daten zur Einschätzung der Bedeutung von PMN und MNC bei zellulären Prozessen nach uteriner

Besamung erhoben. Die regulative Bedeutung des beobachteten massiven Leukozyteninflux für ein erfolgreiches Befruchtungsgeschehen bleibt allerdings noch spekulativ. Insofern wären weiterführende Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet der Reproduktionsmedizin höchst wünschenswert. Sie sollten sich mit der individuell stark variierenden Reaktionsbereitschaft des Endometriums auf einen intrauterinen Stimulus befassen und die Bedeutung mononukleärer Leukozyten und der Sexualsteroiden für die Steuerung der endometrialen Reaktion speziell bei Mehrfachbesamungen beleuchten.

7 Summary

Jana Zemmrich: **Characterization of the leukocyte influx into the uterus of gilts after insemination. Establishment of an *in vivo* model.**

A dysregulated inflammatory response of the endometrium after insemination may be responsible for fertility disorders in gilts. To obtain answers to relevant questions in this context, an animal model system was established in the first part of this thesis. The model should make it possible to characterize the leukocyte influx into the porcine uterus under defined and controlled conditions. Uteri of anaesthetized animals were placed extracorporally after abdominal surgery and divided in different sections (corpus and uterus horns) with appropriate placed clamps. Uterus sections were flushed with phosphate buffered saline (PBS) after transcervical or transmural insemination. The quantity and distribution of leukocytes in the relatively long organ appeared to be rather uniform. Numbers of immigrated, luminal leukocytes correlated positively with numbers of leukocytes in the endometrium after histological examination of tissue specimens taken after the flushings. The controlled separation of uterine compartments made it possible to apply different stimuli in the two uterus horns of one animal (sperms, PBS, recombinant human Interleukin-8: rhIL-8) and to assess the different uterine responses. Sperm cells, rhIL-8 as well as PBS induced an influx of leukocytes into the uterine lumen. Despite high interindividual variations, sperm cells and rhIL-8 were more potent in this respect.

The time kinetics of the influx was assessed after repeated flushings of the uterine lumen at defined times after insemination. After 45 (3×10^6 leukocytes) and 90 min (6×10^6 leukocytes) the influx was only marginal. However, at 180 min *post insemination* significant numbers of leukocytes could be recovered from the uterine lumen (194×10^6 leukocytes). In spite of blocking the reflux of sperm cells after transmural application of 625×10^6 sperms, 3 hours later only 69×10^6 sperm cells could be counted in uterine flushings. This underlines the importance of the immigrating granulocytes for the elimination of remaining sperm cells.

Independent of the stimulus, mononuclear cells (60-70%) dominated among the recovered uterine leukocytes at 45 and 90 min after intrauterine application. Between 90 and 180 minutes post infusion, granulocytes made up > 80% of the intrauterine leukocytes. Uterine flushings contained neutrophils, lymphoid and monocytoid cells; eosinophils were absent. Morphological characterizations of size and granularity by means of flow cytometry revealed no differences between uterine leukocytes and those separated from autologous blood. After membrane immunofluorescence using specific monoclonal antibodies for defined cell surface structures, uterine PMN and monocytic cells displayed slightly different expression patterns

compared with autologous blood cells. Some molecules were less expressed on uterine leukocytes (e.g. CD18 on PMN and SWC1 on monocytic cells), whereas others appeared to be expressed at higher densities on uterine PMN. However, both uterine and blood PMN did not differ in their ability to generate reactive oxygen species, indicating that the process of immigration into the uterus does not modulate this important functional capacity of porcine PMN. The uterine lymphocytic cells contained mainly T cells expressing CD8 and CD6 (80% of the cells were CD8+; 75% of the cells carried the CD6 molecule). Thus, the composition of uterine and blood lymphoid cells clearly differed. Whether insemination induces the selective attraction of these T cells from the blood or whether an already present endometrial T cell population reaches the lumen could not be resolved.

Hypothesizing that components of sperm modulate the transmigration of leukocytes *in vivo*, the influence of seminal plasma and sperm cells on the transmigration of porcine neutrophils was tested *in vitro*. Purified sperm cells were unable to attract or to inhibit the transmigration of PMN. Seminal plasma was also not directly chemoattractive for porcine neutrophils. However, seminal plasma was able to inhibit the rhIL-8-induced PMN chemotaxis. The observed interindividual differences suggest, that this phenomenon is not common for all pigs and depends on the responsiveness of individual's neutrophils towards chemotactic stimuli. Interestingly, freshly isolated porcine constitutively secreted chemoattractive factors for PMN. Seminal plasma negatively affected this secretion and thus acted indirectly negative on the chemotaxis of porcine neutrophils. However, the inhibition was only observed with MNC of animals in the interoestrus, which points to a co-regulation by hormonal factors. Further *in vitro* assays demonstrated that seminal plasma decreased the survival of purified PMN whereas it increased the survival of PMN in the presence of MNC. This argues for a possible functional role of the above mentioned special subpopulation of uterine mononuclear cells.

The described animal model made it possible to gain first informal data to assess the importance of PMN and MNC during cellular responses after uterine insemination. The regulatory meaning of the observed leukocyte influx for a successful fertilization and fertility rates of sows, however, remains speculative. Further research activities in this field are mandatory and should focus on the variable endometrial reactivity of individuals for intrauterine stimuli, as well as on the role of mononuclear leukocytes and sex steroids for the control of the endometrial reaction especially after repeated inseminations.