

6. Zusammenfassung

Die Dissertation ist Bestandteil eines Gesamtprojektes zur Endometritisforschung beim Rind. Sie umfaßt sowohl eine methodische Neuentwicklung (Punkt 1), als auch inhaltliche Untersuchungen (Punkt 2-5).

In vorausgegangenen Arbeiten waren Methoden zur Bestimmung der phänotypischen (Membranimmunfluoreszenz) und funktionellen (Phagozytose, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies - ROS) Charakterisierung der Granulozyten etabliert worden. Zur umfassenderen Beurteilung der Funktionalität polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) war es jedoch notwendig, zusätzlich ihre zytotoxische Kapazität zu untersuchen.

1. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine empfindliche durchflußzytometrische Methode zur Zytotoxizitätsbestimmung von PMN entwickelt. Dadurch war es nunmehr möglich, mit einem einheitlichen Auswertungsprinzip (Durchflußzytometrie) parallel 6 phänotypische und 5 funktionelle Parameter boviner neutrophiler Granulozyten schnell und objektiv zu bestimmen.

Mit diesem erweiterten Spektrum an immunologischen Kriterien wurden die Eigenschaften neutrophiler Granulozyten von Rindern vor und nach der Geburt sowie mit und ohne Kohlenhydrat-Lipidstoffwechselstörung untersucht.

2. Bei der Ermittlung physiologischer Basiswerte für Eigenschaften neutrophiler Granulozyten aus Blut und Uterus im peripartalen Zeitraum zeigten Kühe ausgehend vom 1. antepartalen Untersuchungszeitpunkt (1-2 Wochen ante partum) bis zum Zeitpunkt der Geburt im Blut eine signifikante Zunahme der Gesamtleukozyten um mehr als 40% und der neutrophilen Granulozyten um fast 100%, gefolgt von einer markanten Reduktion post partum bis auf 75% bzw. 50% des Ausgangsniveaus (1. antepartaler Untersuchungszeitraum).

3. Darüberhinaus konnten starke Schwankungen in der Expressiondichte funktionsassoziierter Oberflächenmoleküle auf Blut-PMN beobachtet werden. Gegenüber antepartalen Messungen wurde bei Neutrophilen im Frühperipartum eine Abnahme der Expression des Rezeptors (CR3) für die Komplementkomponente C3b (um mehr als 30%), des Leukozyten-Funktionsassozierten-Antigen-1 (LFA-1, um etwa 15%) und eines noch nicht näher charakterisierten, aber granulozytentypischen Membranmoleküls (mAk Bo116, um annähernd 40%) festgestellt. Das könnte ein Grund für die postpartal deutlich verringerte funktionelle Kapazität dieser Zellen des Blutes sein. Während das Ingestionsverhalten der PMN nahezu unbeeinflusst blieb, waren post partum bei der Kapazität zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der zellvermittelten Zytotoxizität deutlich geringere Aktivitäten als bei den antepartalen Unter-

suchungen zu beobachten (post partum um bis zu 30% geringere ROS-Bildung und um bis zu 25% schwächere Zytotoxizität)

4 Phänotypisch und funktionell zeigten Granulozyten, die zeitgleich aus dem Uterus isoliert wurden, deutliche Unterschiede im Vergleich zu Blut-PMN. Einige der Oberflächenstrukturen uteriner Granulozyten waren deutlich schwächer exprimiert als auf entsprechenden Blutzellen (z B MHC-I-Molekul um bis zu 90%, Komplementrezeptor CR 4 um fast 80% am 3 / 4 Tag p p, Leukozyten-Funktion-assoziiertes-Antigen-I um bis zu 90%) Dagegen wiesen andere eine erhöhte Expressionsdichte auf (z B CR 3 am 2 postpartalen Untersuchungszeitpunkt um 140%) Außerdem war die Fähigkeit zur Bildung bakterizider ROS (um mehr als 90%) sowie zur Antikörper-unabhängigen (AICC) und zur Antikörper-abhängigen (ADCC) zellvermittelten Zytotoxizität (um bis zu 50%) bei den uterinen neutrophilen Granulozyten deutlich reduziert

5 Kühe mit erhöhtem Leberfettgehalt zeigten post partum gegenüber Kontrolltieren eine deutliche Abnahme der Expression funktionsassoziierter Oberflächenstrukturen auf neutrophilen Granulozyten aus Blut und Uterus (z B CR 3 u CR 4 im Blut um bis zu 60%, CR 3 im Uterus um etwa 10%) Bei Kühen mit einer verfetteten Leber war die PMN-vermittelte Zytotoxizität in Blut und Uterus gegenüber den Kontrolltieren stark reduziert (bis zu 40%) Ebenso verhielt es sich mit den Zellen des Blutes bezüglich der ROS-Bildung nach Stimulation mit Phorbol ester (um > 40%) Dagegen konnten beim Ingestionsverhalten der PMN keine meßbaren Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen festgestellt werden

Diese Untersuchungen liefern erste orientierende Daten zur Einschätzung physiologischer Eigenschaften neutrophiler Granulozyten im peripartalen Zeitraum sowie bezüglich des Einflusses von Kohlenhydrat-Lipidstoffwechselstörungen (erhöhter Triacylglycerid-Gehalt der Leber, erhöhte Serumwerte an freien Fettsäuren u β -Hydroxy-Butyrat) auf Granulozyten-funktionen Auf dieser Grundlage können weitere Untersuchungen zur gezielten Modulation der PMN und zum Studium ihrer Bedeutung bei der Entstehung der Endometritis puerperalis folgen, die zur Überprüfung derzeitiger und zur Entwicklung verbesserter Therapie- und Prophylaxemaßnahmen beitragen

7. Summary

N. U. Schneider: Characterization of bovine neutrophils harvested from blood and uterus during the periparturient period from cows with and without disorders of their carbohydrate and lipid metabolism

This dissertation is part of a research project investigating bovine endometritis. It includes the development of a new technique to monitor cellular cytotoxicity of bovine polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN) by means of flowcytometry (point 1) as well as clinical investigations (points 2-5).

In previous studies methods had been established designed to characterize the phenotype (membrane immunofluorescence) and function (phagocytosis, production of reactive oxygen species) of PMN. However, for a more complete assessment of granulocyte functions it was necessary to evaluate their cytotoxic capacity as well.

1. Therefore, a sensitive assay for the assessment of neutrophil cytotoxicity based on flow cytometry analysis was developed. Upon that, it was feasible to monitor simultaneously measure 6 phenotypic and 5 functional parameters of bovine neutrophils in a quick and objective way, applying flow cytometry as the basic analytical system.

Using such an extended array of immunological criteria, peripartum cows with and without a disorder of their carbohydrate and lipid metabolism were examined.

2. First, physiological values for the different properties of peripheral blood as well as uterine neutrophils were obtained. During the last 1-2 weeks of pregnancy a significant increase of total blood leukocyte numbers of over 40% and, in particular, blood neutrophil numbers of almost 100% was observed. This was followed by a marked postparturient reduction to 75% and 50% of the initial values (first period of examination antepartum), respectively.

3. Moreover, the expression densities of function associated surface molecules on blood neutrophils varied considerably. When compared to preparturient analysis, early postparturient analysis revealed a reduced expression of one receptor (CR 3) for the complement factor C3b (> 30%), of leukocyte-function-associated-antigen-1 (LFA-1, app. 15%) and of a PMN-associated surface molecule not yet fully characterized but detectable by mab Bo116, (app. 40%). These findings might be involved in the postparturiently impaired functional capacity of PMN. In addition, postpartum values of cellular cytotoxicity and of the reactive oxygen species (ROS) producing capacity were markedly reduced (postpartum up to 30% less ROS synthesis).

and up to 25% less cytotoxic activity), whereas the ingestive capacity of neutrophils was not affected

4 By comparison with blood neutrophils, PMN isolated simultaneously from uterine by flushing showed distinct phenotypic and functional differences. Expression densities of some surface molecules were significantly lower on uterine neutrophils as compared to blood neutrophils (MHC-I molecules up to 90%, complement receptor CR 4 up to 80%, LFA-1 up to 90%), whereas others displayed even igher expression densities (e.g. CR 3 up to 140%). Furthermore, the capacity to produce ROS to generate antibody-dependent (ADCC) or antibody-independent (AICC) cellular cytotoxicity was greatly reduced for uterine neutrophils (up to 50%)

5 Postpartum cows with fatty liver syndrome showed a reduced expression of function associated surface molecules on blood and uterine neutrophils when compared to control animals (e.g. CR 3 and CR 4 60% reduction on blood PMN, CR 3 10% on uterine PMN). Moreover, in cows with fatty liver syndrome PMN cytotoxicity was markedly reduced in peripheral blood and uterus. Blood neutrophils were also less capable of ROS synthesis following stimulation with phorbol ester (up to 40% reduction). On the other hand, no differences in the ingestive capacity between the two groups of animals could be detected

These studies provide some basic data for the evaluation of the physiological properties of bovine neutrophils during the periparturient period as well as under the influence of disorders of carbohydrate and lipid metabolism (elevated hepatic triacylglyceride content, elevated serum values of free fatty acids and β -hydroxy-butyrate). Based on these studies further investigations regarding the modulation of neutrophils and evaluating their role in the development of endometritis will provide improved possibilities to re-evaluate current and to develop new therapeutical and prophylactical strategies