

Isolierung und Gefrierkonservierung von immunkompetenten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zur Endometritisbehandlung beim Pferd

L.F.F. Castilho¹, H. Zerbe², U. Rabe³, W. Leibold³ und E. Klug¹

¹Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover

²Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Rindes, Tierärztliche Hochschule Hannover

³Arbeitsgruppe Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Zusammenfassung

Aus Spenderblut von 6 Stuten wurden neutrophile Granulozyten mittels hypotoner Erythrozytenlyse und Zentrifugation separiert und tiefgefroren in Makrotüb konserviert. Für den Einfriervorgang wurde ein Kryoprotektivum bestehend aus Pferde-Blutplasma und DMSO (5%) sowie ein Protokoll mit einer Einfriertemperaturkurve (4 bis -70°C $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; -71 bis -140°C $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$; -141 bis -196°C Tauchen in flüssigen Stickstoff) entwickelt. Vitalität, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Phagozytoseaktivität der aufgetauten PMN wurden mittels durchflußzytometrischer Meßmethoden mit frischen, nicht gefrorenen Zellen des identischen Spendertieres verglichen.

Im Vitalitätstest wurden mit 95,5% resp. 94,5% membranintakten PMN gleichwertige Resultate bei den Kontrollen resp. gefrorenen/aufgetauten PMN-Populationen gemessen. 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 Ergebnisse dieser Studie demonstrieren die Brauchbarkeit des Verfahrens zur Gewinnung und Gefrierkonservierung einer vitalen und immunkompetenten PMN-Population für den geplanten therapeutischen Einsatz bei bakteriell bedingter equiner Endometritis.

Schlüsselwörter: Stute, Endometritis, neutrophile Granulozyten, Kryokonservierung

Separation and Cryopreservation of Immune Competent Polymorphonuclear Granulocytes (PMN) for Intrauterine Inoculation in Equine Endometritis

PMN from blood of 6 mares were separated using hypotonic lysis of erythrocytes and centrifugation. After addition of a solution of equine plasma and DMSO (5%) the PMN were frozen. A method for freezing was developed with control of temperature decreasing rate. Temperature curve was 4 to -70°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, -71 to -140°C at $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, -140 to -196°C diving. To verify cell survival rate after thawing as well as its functional capacity i.e. phagocytosis and respiratory burst (ROS) an experiment using flow cytometry assay was performed. 95.5 % resp. 94.5 % of propidium iodide negative PMNs indicate cell membrane integrity of both the fresh and frozen/thawed PMN populations.

Phagocytosis of opsonized bacteria was similar in both populations of cells i.e. 81.0 % resp. 80.0 % of the fresh resp. frozen/thawed PMNs. Increasing capacity for generation of reactive oxygen species after stimulation by PMA was observed with frozen/thawed neutrophils.

The results of this study indicate the practicability of the method for achieving and cryopreservation of a vital and immune competent PMN population for intended therapeutic use in susceptible mares for endometritis.

keywords: mare, endometritis, neutrophil granulocytes, cryopreservation

Einleitung

Das Endometrium der Stute ist nach den Untersuchungen von Schoon und Schoon (1996) und Ricketts und Alonso (1991a) nur bei jungen, nulliparen Stuten morphofunktionell intakt. In Abhängigkeit von Lebensalter und Zuchtalter stellen sich nach und nach Änderungen der morphologischen Strukturen im Endometrium ein, die durch individuelle Endometriumerkrankungen (Entzündungen) und/oder durch iatrogene Eingriffe verstärkt und in ihrer Entwicklung beschleunigt werden können. Die zyklischen und graviditätsbedingten Umbauprozesse hinterlassen histologisch nachweisbare Reaktionen chronischer Art in den endometrialen, den vaskulären (Grüniger 1996) und wahrscheinlich auch den myometrialen Strukturen, die insgesamt zu einer graduell zunehmenden Reduzierung der metrialen, insbeson-

dere der endometrialen Funktionen führen. Besondere Risikophasen für eine Kontamination des Endometriums der Stute sind die Geburt, das Puerperium, der Deckakt und –bei unsachgemäßer Durchführung – auch die gynäkologische Untersuchung (Vandeplassche et al. 1972; Merkt et al. 1980; Ricketts u. McKintosh 1987; Medice et al. 1991), wobei es über eine mikrobielle Besiedlung zu einer akuten und chronischen Entzündung des Endometriums kommen kann (Kenney 1993), die von vielen Autoren als eine der wichtigsten Sterilitätsursachen bei der Stute eingeschätzt wird (Mattos 1989; Merkt et al. 1991). Die Bedeutung der chronisch-infiltrativen und -degenerativen endometrialen Veränderungen (Ricketts und Alonso 1991b), die nach dem Vorschlag des ersten Workshops in Newmarket 1992 als

Endometrose (Kenney 1993) zusammengefaßt werden, für die Fruchtbarkeitsaussichten der Zuchtstuten sind zwar offensichtlich, bedürfen jedoch noch einer genauen Quantifizierung.

Eine wichtige Rolle in der Etablierung von Endometriumerkrankungen spielt die Resistenzlage der Stute, die im wesentlichen durch immunologische Vorgänge bestimmt wird. In klinischen Untersuchungen beobachteten Hughes und Loy (1969) in Stutenpopulationen Individuen, die auch nach mikrobiellen Exponierungen der beschriebenen Art nicht erkrankten im Unterschied zu Stutenindividuen, die bereits nach geringster Exponierung mit endometrialen Entzündungen reagierten und nur wenig Therapietüchtigkeit zeigten. Seither wird eine grundsätzliche Resistenz (resistant mares) oder eine Krankheitsempfänglichkeit (susceptible mares) bei Zuchtstuten unterstellt und definiert. Es war folgerichtig, daß sich die klinische Forschung alsbald mit den physikalischen, humoralen und zellulären Abwehrprinzipien im Zusammenhang mit der Endometrititsbehandlung befaßte.

Die physikalischen Abwehrmechanismen werden vorwiegend in der Prävention des Keimeindringens in den Genitaltrakt von außen durch eine morphofunktionell integrierte Perineo-Vulvo-Vestibular-Konfiguration wirksam. Es liegen viele Untersuchungen über die Bewertung und die operative Sanierung dieses anatomischen Komplexes vor, von denen hier die von Caslick (1937), Götze (1949), Pascoe (1979, 1992), Pouret (1982) und mit einer neueren Studie die von Schubert (1994) genannt werden sollen. Zu den physikalisch-allgemeinen Abwehrvorgängen gehört auch die Kontraktilität des Myometriums. Auch dieses Prinzip wurde für Diagnostik und Therapieversuche eingesetzt. Untersuchungen über die Clearance der Gebärmutter liegen vor von Frauenfelder (1987), LeBlanc (1994), Pycock (1994) und Rasch et al. (1996).

In der Diagnostik und Therapie mikrobiell bedingter endometrialer Erkrankungen wurde bereits relativ früh auf immunologische Wirkungsmechanismen zurückgegriffen. Asbury (1984) sowie Adams und Ginther (1989) introduzierten und überprüften die homologe und heterologe intrauterine Blutplasmainsfusion zur Unterstützung der Opsonisierung bei der endometrialen Phagozytose. Waelchli und Winder (1987, 1991) befaßten sich in intensiven Studien mit humoralen und zellulären immunologischen Reaktionen und ihrer Bedeutung für die Endometrititsdiagnostik. Untersuchungen zu spezifischen humoralen Abwehrvorgängen im Endometrium liegen auch von Watson et al. (1987) und Silva (1989) vor.

Unter den zellulären Abwehrfunktionen spielt die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) die größte Rolle. Dieser nach jeder Kontamination des Endometriums sehr rasch einsetzende Prozeß wird durch eine unverzüglich einsetzende Migration zirkulierender PMN in das Endometrium und das Uteruslumen eingeleitet. Durch die Untersuchungen von Liu et al. (1985, 1986), Watson et al. (1987) und Watson (1988) wurde aufgedeckt, daß die ins Endometrium migrierten PMN wesentliche Anteile ihrer immunologischen Kompetenz eingebüßt haben, ein Phänomen, das ursächlich nicht geklärt ist. In

ihren modellhaften Studien zu zellulären Abwehrmechanismen im Uterus beim Rind zeigten Zerbe et al. (1996), daß sogar in den gesunden Uterus migrierte neutrophile Granulozyten neben einer verringerten Phagozytosekapazität auch einen deutlich veränderten Immunphänotyp (Rezeptorausstattung) aufweisen.

Basierend auf dieser Beobachtung des Verlusts der immunologischen Kompetenz wurde von Castilho (1994) der Versuch unternommen, zirkulierende PMN zu separieren und sofort bakteriell kontaminierten Stuten intrauterin zu infundieren. Die Studien zeigten, daß mit diesem Verfahren in vivo eine signifikante Verbesserung der Keimeliminierung im Vergleich zu anderen uterinen Behandlungen (homologe Plasmainsfusion, uterine Irrigation mit 0,9 %iger NaCl) erreicht wurde. Da diese Methode der intrauterinen Verabreichung frisch isolierter Leukozyten bezüglich ihrer Praktikabilität Nachteile aufweist, schien es notwendig, ein Verfahren zur Konservierung der aus dem Blut isolierten Leukozyten zu erarbeiten. Außerdem galt es anhand objektiver Untersuchungskriterien zu überprüfen, wie durch diese Manipulation die zelluläre Funktionalität beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Isolierung von Leukozyten aus dem Blut und die Gefrierkonservierung dieser Zellen für ihre spätere therapeutische Verfügbarkeit zur homologen oder heterologen intrauterinen Infusion berichtet. Als funktionelle Prüfparameter dienten die Vitalität der PMN und ihre Fähigkeit zur Phagozytose sowie zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

Material und Methoden

Gewinnung und Isolierung von Leukozyten aus dem Blut von Spenderpferden

Als Spenderpferde dienten 6 klinisch gesunde Warmblutstuten im Alter von 7 bis 11 Jahren, die in üblicher Boxen-Auslaufhaltung und üblicher Fütterung gehalten wurden.

Die Blutentnahme erfolgte mittels Vacutainersystem durch Punktion der Vena jugularis. Je Spender wurden 50 ml Blut in EDTA-Vacutainerblutröhrchen aufgenommen. Bis zur Leukozytenseparation wurde das Blut bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um die Aktivierung der PMN während den Bearbeitungsgängen vor und zwischen den Funktionsprüfungen einzuschränken, wurden die Zellsuspensionen dann stets bei etwa 4°C bearbeitet. Für die Leukozytenseparation wurden jeweils 40 ml Blut eingesetzt. Die verbleibenden 10 ml dienten der Gewinnung von Plasma, das später als Kryoprotektivum genutzt wurde.

Die Erythrozyten wurden durch eine hypotone Lyse eliminiert. Dazu wurden je 10 ml Blut zunächst 20 ml Aqua tridest und 10 Sekunden später 20 ml PBS (doppelkonzentriert) zugegeben, um die Isotonie wieder herzustellen. Dieses Gemisch wurde 8 min zentrifugiert (220 x g, 4°C). Nach weitgehender Entfernung des Überstands wurde das Zentrifugat mit dem verbliebenen Rest des Überstands resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Zellen auf die finale Konzentration von 2×10^6 Leukozyten pro ml PBS eingestellt und auf Eis bereitgehalten.

Vorbereitung und Zugabe des Kryoprotektivums

Das Gefrierschutzmittel wurde aus Plasma (95%) und Dimethylsulfoxid (DMSO, 5%) hergestellt. Dazu wurden das zuvor abgeteilte Blut (10 ml) zentrifugiert (1000 x g, 10 min) um ein partikelfreies Ausgangsmaterial zu erhalten. Das endgültig gefertigte Kryoprotektivum wurde auf Eis bereitgehalten und unmittelbar vor der Konfektionierung in Makrotüb (*Martin et al. 1979*) und dem Gefrierprozeß in einem Gefrierautomaten (Minidigicool 700, J.M.V. L'AIGLE) der gewaschenen Leukozytensuspension im Sturz zugegeben. Das 4 ml fassende Makrotüb erlaubte die sichere Identifizierung der Probe.

Einfrierung und Auftauung

Das Einfrieren der Makrotüb erfolgte in einem Einfrierautomaten mit der nachfolgend aufgeführten Temperaturkurve:

4°C	bis	-70°C	-	1°C pro min
-71°C	bis	-140°C	-	10°C pro min
-141°C	bis	-196°C	-	tauchen in flüssigen Stickstoff

Das Auftauen erfolgte in einem Schritt bei 37°C im Wasserbad. Nach dem Auftauen mußte das Kryoprotektivum, das bei Temperaturen über 0°C zytotoxisch wirkt, langsam ausverdünnt werden. Der Inhalt eines Makrotüb (4 ml) wurde deshalb in 50 ml PBS aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Es schloß sich die Zentrifugation (220 x g, 4°C) über 8 min an. Das Pellet wurde vorläufig in 5 ml PBS resuspendiert, darin der relative PMN-Gehalt bestimmt, dann durch weiteres Zugeben von PBS auf die finale Konzentration von 2×10^6 Leukozyten pro ml PBS eingestellt und auf Eis bereitgehalten.

Die frisch gewonnenen Leukozyten wurden ebenfalls auf diese Endkonzentration eingestellt.

Methoden zur Beurteilung der funktionellen Kapazität der neutrophilen Granulozyten

Die funktionelle Prüfung der gefrorenen/aufgetauten PMN erfolgte im Vergleich mit frischen PMN aus der jeweils identischen Spenderstute. Durch die oben aufgeführten Zellschrittsschritte wurden zwar die Erythrozyten eliminiert; es waren aber noch alle Leukozytensubpopulationen in der Zellsuspension enthalten. Die Methode der Durchflußzytometrie ermöglicht jedoch die separate Bewertung der Vitalität sowie funktioneller Parameter (Ingestionsvermögen, Bildung mikrobizider ROS) der neutrophilen Granulozyten.

Vitalitätsprüfung

Zur Vitalitätsbestimmung wurde Propidiumjodid (PJ, Calbiochem Novabiochem GmbH, Bad Soden) eingesetzt. Propidiumjodid ist ein Fluorchrom, das nichtintegre Zellmembranen passiert und mit nukleärer DNA interkaliert. Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität im roten Bereich werden im Durchflußzytometer (FACScan® = Fluorescence

Activated Cell Analyser, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) registriert und sind somit von Zellen mit intakten Membranen differenzierbar. Bei jeder Meßprobe wurden 2000 Leukozyten in die Auswertung einbezogen.

Phagozytose

Die Messung der Phagozytosefähigkeit neutrophiler Granulozyten erfolgte mit einer modifizierten Methode nach *Zerbe et al. (1996)*. Die zur Verfügung stehende Streptococcus zooepidemicus-Suspension (Omnisorbin®, Calbiochem Novabiochem GmbH, Bad Soden) wurde dabei mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Sigma, Deisenhofen) markiert und mit 1:10 mit PBS verdünntem Poolserum für 15 min opsonisiert. PMN, die bei der 60minütigen Inkubation markierte Streptokokken aufnehmen, sind durch ihre erhöhte Grünfluoreszenz von phagozytosenegativen Granulozyten durchflußzytometrisch abgrenzbar. Leukozyten und Streptokokken wurden in einem Verhältnis von 1:100 eingesetzt.

Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN erfolgte in Anlehnung an die Methode nach *Zerbe et al. (1996)*. Phorbol-myristat-acetat (PMA; Sigma, Deisenhofen), ein nichtrezeptorabhängiger Aktivator der Proteinkinase C und damit auch der ROS-Bildung, wurde in verschiedenen Endkonzentrationen (100 nmol/l, 300 nmol/l, 1 µmol/l, 3 µmol/l) eingesetzt. Die Nachweissubstanz, das nichtfluoreszierende Dihydrohodamin (DHR) 123 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) wird von Zellen aufgenommen und durch Oxidation (katalysiert durch Myeloperoxidase) zum grünfluoreszierenden Rhodamin 123 umgewandelt. Granulozyten, die ROS produziert haben, zeigen eine durchflußzytometrisch meßbare erhöhte Grünfluoreszenzintensität.

Erste Ergebnisse

Im Ergebnis von umfangreichen hier nicht dargestellten Vorversuchen wurde die bei früheren Untersuchungen von *Castilho (1994)* eingesetzte Dextrosesedimentation zur Leukozytenseparation durch die oben beschriebene hypotone Erythrozytenlyse ersetzt. Diese Methode ist zeitsparend und praktikabel. Außerdem wird durch die Waschgänge eine Ausdünnung freien Hämoglobins in der Zellsuspension erreicht. Entsprechende Experimente zeigten, daß Hämoglobin einen negativen Einfluß auf die Funktionalität der PMN hat.

In den Vorversuchen wurde außerdem nach einer optimalen Kryoschutzmittel-Konzentration gesucht und verschiedene Methoden zur Einfrierung isolierter Leukozyten verglichen. Die Ergebnisse zeigten, daß bei einer DMSO-Konzentration von 5% und dem oben dargestellten Einfrierregime die Vitalität der wieder aufgetauten Leukozyten inklusive der PMN am höchsten war. Die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

In den nachfolgenden Experimenten wurde deshalb ausschließlich diese Methodik angewendet. Beim Vergleich der Vitalitätsraten zwischen frischen und aufgetauten Leukozyten wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die absolute Zellzahl der Leukozyten eines Makrotüb unmittelbar nach dem Auftauen etwa 10% niedriger lag als vor dem Einfrieren. Durch die nachfolgenden Waschgänge kam es zur Eliminierung von Fragmenten toter Leukozyten. Somit beziehen sich die angegebenen Vitalitätswerte auf die aufgereinigten Zellsuspensionen.

Die Vitalität der Gesamtleukozytenpopulationen (mononukleäre Zellen und Granulozyten) lag nach beiden Behandlungsregimen bei etwa 97%. Diese etwas höheren Werte gegenüber der PMN-Vitalität (etwa 95%; s. Abb. 1) ergeben sich aus der besseren Vitalität der Lymphozytenpopulation. Die Resultate zeigen jedoch deutlich, daß die Konservierungsprozedur einen erstaunlich geringen negativen Einfluß auf die Integrität der PMN-Membranen (Maß für die Vitalität) hat. Im folgenden war zu klären, ob die für die uterinen

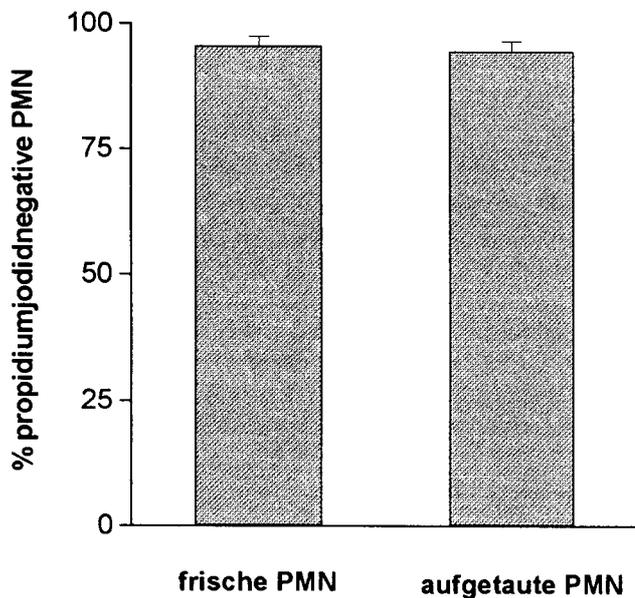


Abb. 1: Einfluß des Einfrier- und Auftauprozesses auf die Vitalität von PMN im Vergleich zu frisch isolierten Zellen (n=6). Dargestellt sind Mittelwerte (Standardabweichungen des prozentualen Anteils propidiumjodidnegativer PMN nach unterschiedlichen Behandlungsverfahren. Propidiumjodidnegative Zellen sind vital.

Viability (% of propidium iodide negative cells) of PMNs in freshly isolated and frozen/thawed samples (n=6). The values represent the means (standard deviations of percent proportion of propidium iodide negative PMNs after different cell treating procedures. Propidium iodide negative cells are viable.

Clearanceprozesse wichtige PMN-Funktionalität durch die Konservierung beeinflusst wurde.

Auch bezüglich der Kapazität der PMN zur Ingestion in vitro angebotener Streptokokken konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen frischen und aufgetauten Zellen be-

obachtet werden. Unabhängig vom Zellbearbeitungsverfahren zeigten etwa 80% der neutrophilen PMN eine Ingestion, wenn die Bakterien vor der Koinkubation mit den PMN mit 1:10 verdünntem nativem Serum opsonisiert wurden. Ohne

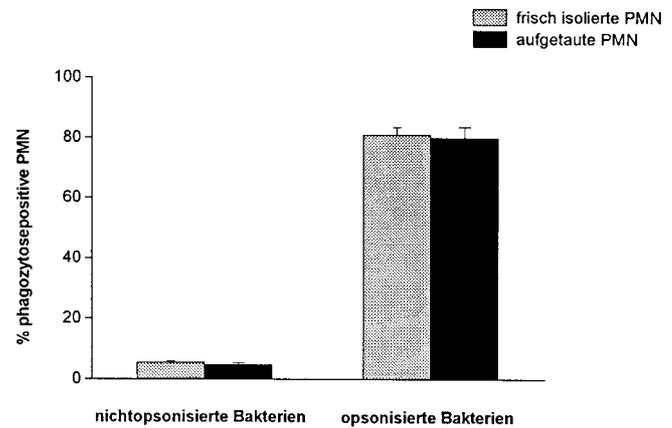


Abb. 2: Vergleich der Phagozytosekapazität frischer und gefrorener/aufgetauter PMN (n=6).

Dargestellt sind Mittelwerte (Standardabweichungen des relativen Anteils phagozytosepositiver PMN ohne und mit Opsonisierung (mit nativem Serum) der zur Phagozytose angebotenen Streptokokken nach unterschiedlichen Zellbearbeitungsverfahren. Die Streptokokken wurden mit einem Fluorochrom markiert. Somit sind phagozytosepositive PMN (grünfluoreszierend) von phagozytosenegativen PMN durchflußzytometrisch differenzierbar.

Phagocytic capacity of PMNs in freshly isolated and frozen/thawed samples (n=6).

The values represent the means (standard deviations of percent proportion of phagocytic positive PMNs after incubation with opsonized or nonopsonized streptococci after different cell treating procedures. The bacteria were fluorochrom labeled. Phagocytic positive PMNs (green fluorescent) could distinguished from nonphagocytosing cells.

Opsonisierung lag die unspezifische Ingestionsrate jeweils bei etwa 5% (s. Abb. 2).

Abbildung 3 zeigt, daß neutrophile Granulozyten, die aus dem Blut isoliert, eingefroren und anschließend wieder aufgetaut wurden, im Vergleich zu frisch aus dem Blut des identischen Spendertieres separierten PMN eine erhöhte Kapazität zur Bildung mikrobizider reaktiver Sauerstoffspezies nach Stimulation mit PMA aufweisen.

Bei Fehlen der den Sauerstoffmetabolismus rezeptorunabhängig stimulierenden Substanz PMA wird die Nachweis substanz DHR 123 durch frische wie aufgetaute PMN nur in geringem Maße umgesetzt. Dadurch ist die mittlere Grünfluoreszenzintensität der PMN-Population vergleichsweise niedrig.

Die Zellen sind jedoch im Anschluß an das jeweilige Bearbeitungsverfahren durch die Zugabe von PMA dosisabhängig zur erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten in der Lage. Auffallend ist, daß zwischen den Konzentrationsstufen 1 und 3 µmol PMA / l keine nennenswerte Steigerung der Zellreaktivität gemessen werden konnte. Entscheidend ist jedoch, daß PMN, die einer Konservie-

rungsprozedur ausgesetzt wurden, eine signifikant höhere Kapazität zur Bildung der für die Abtötung aufgenommenen

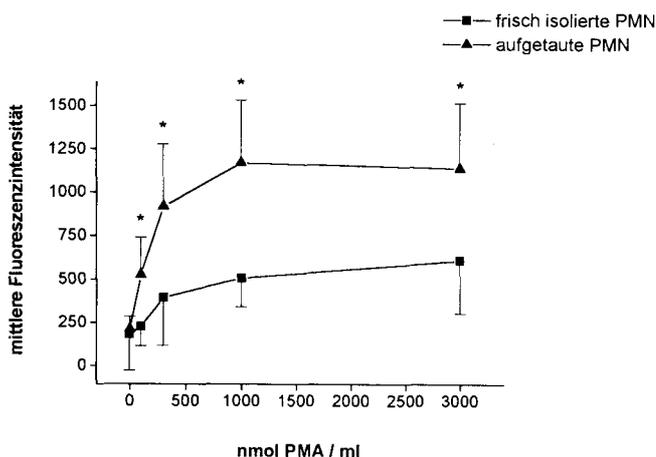


Abb. 3: Vergleich der Kapazität frischer und gefrorener/aufgetauter PMN zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (n=6). Dargestellt sind Mittelwerte (Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzintensität der PMN als Maß für ihre ROS-Bildung nach Stimulation mit PMA unter dem Einfluß unterschiedlicher Zellbearbeitungsverfahren (* unterschiedlich mit $p < 0,01$ zwischen frischen und aufgetauten PMN bei gleicher Stimulation).

Generation of reactive oxygen species (ROS) of PMNs in freshly isolated and frozen/thawed samples (n=6). The values represent the means (standard deviations of the green fluorescence intensity of PMNs (= degree of ROS-generation after stimulation by PMA) after different cell treating procedures (* different with $p < 0.01$ between freshly isolated and frozen/thawed PMNs after equal stimulation).

Mikroorganismen wichtigen ROS aufweisen als frisch isolierte.

Diskussion

Mit dem in vorliegender Studie eingesetzten Einfrierprotokoll für PMN – eine Anpassung an die Kryokonservierung von Lymphozyten – wurde erstmals der Versuch unternommen, separierte equine PMN in gefrorenem Zustand zu konservieren. Das Ziel war, die Abwehrfunktionen dieser Zellen im Verlauf der einzelnen Schritte des Konservierungsprozesses zu stabilisieren und den Erfolg möglichst objektiv zu beurteilen. Hierzu bot sich die Überprüfung der Vitalität, der In-Vitro-Kapazität zur Phagozytose und zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies der PMN an. Dieses breite Beurteilungsspektrum ist notwendig für eine repräsentative Beurteilung der Abwehrkapazität der PMN (Rotho et al. 1983; Winter und Buschmann 1987; Zerbe et al. 1996). Einerseits bilden die Messungen in Verbindung mit der Gefrierkonservierung der PMN einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung mikrobiell verursachter Endometritiden beim Pferd. Andererseits bietet die Überprüfung dieser Parameter die Möglichkeit, die jeweilige Funktionstüchtigkeit der für die unspezifische körpereigene Abwehr bedeutsamen neutrophilen Granulozyten einzuschätzen und könnte daher diagnostisch genutzt werden.

Die Isolierung der Leukozyten aus dem Spenderblut mittels hypotoner Erythrozytenlyse ist ohne großen Aufwand durchführbar und liefert eine funktionstüchtige Zellpopulation, die den weiteren Aufbereitungsprozessen zugeführt werden kann. Die Separation der Leukozyten mittels Dextrosesedimentation (Castilho 1994) lieferte geringere Zellausbeuten und dauerte wesentlich länger. Außerdem stört das in diesem Verfahren nicht vollständig zu entfernende Hämoglobin die Funktionalität der PMN.

Die Technik des Einfrierprozesses erfordert für die Reproduzierbarkeit eine vorgegebene Einfrier-Temperaturkurve (Castilho, unveröffentlicht), die nur unter Nutzung einer steuerbaren Sollkurve in einem Einfrierautomaten erreichbar ist. Das Makrotüb bietet ausreichend Oberfläche, die zur Identitätssicherung der Proben erforderlich ist.

Für einen späteren therapeutischen Einsatz eingefrorener und kurz vor Gebrauch wieder aufgetauter PMN zur Substitution in der Gebärmutter war es wichtig, Kenntnisse über den Einfluß des Konservierungsverfahrens auf die Vitalität und In-Vitro-Funktionalität der PMN zu erlangen. In entsprechenden Untersuchungen wurden deshalb frische und aufgetaute neutrophile Granulozyten gleicher Spender mit Hilfe der oben genannten Parameter zeitgleich beurteilt.

Die Untersuchungsergebnisse zur Vitalität der PMN belegen, daß deren Membranintegrität durch alle Prozesse des Einfrierens und Auftauens, die starke osmotische Belastungen für die Zellen mit sich bringen, relativ schwach beeinträchtigt wird. Vergleichbare Untersuchungen sind im Schrifttum nicht zu finden. Es ist anzumerken, daß der Prozentsatz membranintakter PMN in Höhe von etwa 95% in der aufgetauten PMN-Population als überraschend hoch eingestuft werden muß. Allerdings muß beachtet werden, daß etwa 10% der PMN im frischen Zustand im Verlauf der PMN-Isolierung bereits vorgeschädigt, durch die Kryokonservierung zerstört und während der Waschgänge nach dem Auftauen eliminiert werden.

In-Vitro-Assays zum Ingestionsverhalten und zur Bildung mikrobizider ROS durch frische und aufgetaute PMN dienten in diesen Experimenten zur Beurteilung des Einflusses der Konservierung auf die PMN-Funktionalität. Erstaunlicherweise zeigten dabei die ehemals konservierten neutrophilen Granulozyten keine schlechtere Abwehrkapazität. Der prozentuale Anteil phagozytosepositiver PMN nach Koinkubation mit opsonisierten Streptokokken war bei beiden Zellpopulationen etwa gleich hoch. Die Ergebnisse weisen zudem darauf hin, daß phagozytosevorbereitende Funktionen, wie Erkennung und Bindung der Bakterien durch den Einfrier- und Auftauvorgang nicht beeinträchtigt werden, da die Phagozytoseaktivität praktisch erst unter Zusatz von Opsoninen erfolgte.

Erstaunlicherweise war die Kapazität zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei aufgetauten PMN sogar signifikant höher als bei frisch isolierten Zellen. Da der Sauerstoffmetabolismus ohne Zusatz der stimulierenden Substanz PMA bei beiden Zellpopulationen etwa gleich niedrig war und erst nach PMA-Stimulation die stärkere ROS-Bildung durch aufgetaute PMN sichtbar wurde, kann man davon ausgehen, daß es sich bei dem beobachteten Phänomen nicht

um eine Vorstimulation der PMN sondern um einen „Priming“-Effekt handelt. Vermutlich versetzen Zellmediatoren, die im Zusammenhang mit dem oben erwähnten Zerfall eines geringen Anteils der konservierten Leukozyten frei werden, die PMN in einen Zustand höherer potentieller Reaktivität. Dies ist insofern von Bedeutung, weil im Falle eines therapeutischen Einsatzes der aufgetauten PMN die auch für das körpereigene Gewebe gefährlichen reaktiven Sauerstoffspezies erst nach Kontakt mit einer adäquaten Stimulanz (z.B. Bakterien) freigesetzt werden.

Möglicherweise könnte eine Stimulationsbeschleunigung auch durch intrazelluläre Veränderungen im Verlauf des Einfrier- und Auftauprozesses für die stärkere Reaktivität der PMN verantwortlich sein. Aus der Kryokonservierung von Spermien sind ähnliche Phänomene der Funktionsaktivierung der Samenzellen durch den Konservierungsprozeß bekannt, sodaß Analogieschlüsse berechtigt und erlaubt sind (Weitze u. Petzold 1992).

Die Ergebnisse aus allen drei Prüfparametern belegen einen hohen Grad an Vitalität und Funktionalität der separierten und gefrierkonservierten PMN. Hiermit ist die In-Vitro-Basis für eine mögliche therapeutische Anwendung des Verfahrens geschaffen, die in der intrauterinen Inokulation vitaler und immunkompetenter, homologer oder heterologer PMN bei bakteriell endometritisserkrankten Stuten bestehen wird. Felduntersuchungen an suszeptiblen Stuten liegen inzwischen vor (Castilho 1994; Mattos et al. 1997). Nach der Bedeckung wurden aus dem Blut frisch separierte PMN intrauterin appliziert. Die Stuten erzielten ein günstigeres Konzeptionsergebnis als Kontrollstuten mit konventioneller Behandlung. Auf Nachteile dieser Methodik wurde hier bereits hingewiesen – die Gewinnung und sofortige Separation sowie Verabreichung von Leukozyten scheint höchstens unter Klinikbedingungen praktikabel. Weitere Experimente, die Kenntnisse über die zeitabhängige Belastbarkeit der PMN unter uterinen Bedingungen erbringen sollen, sind angelaufen. Deren Ergebnisse werden in Kürze veröffentlicht.

Außerdem soll das methodische Spektrum zur Charakterisierung von PMN-Eigenschaften unserer Arbeitsgruppe in Zukunft noch erweitert werden. Geplant sind Untersuchungen, die neue Erkenntnisse zur Pathogenese der equinen Endometritis erbringen, die Voraussetzung für eine gezielte Diagnostik und Therapie der Erkrankung sind.

Literatur

- Adams, G.P. und Ginter, O.J. (1989): Efficacy of intrauterine infusion of plasma for treatment of infertility and endometritis in mares. JAVMA 194 n°3 february 1, 372–378.
- Asbury, A.C. (1984): Uterine defense mechanism in the mare: the use of intrauterine plasma in the management of endometritis. Theriogenology 21, 387–399.
- Caslick, E.A. (1937): The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. Cornell Vet. v.27, 178–187.
- Castilho, L.F.F. (1994): Endometrite na Egua: Plasma Homologo Acrescido de Leucocitos como Forma de Tratamento. MS Thesis, UFRGS-Faculdade de Veterinaria. 81 p.
- Frauenfelder, H.C. (1987): Cervical Abnormalis. In: Robinson, E.W. Current Therapy in Equine Medicine 2. Philadelphia, Lea & Febiger, 516–518.
- Götze, R. (1949): Besamung und Unfruchtbarkeit der Hausäugetiere. Verlag Schaper.
- Grüniger, U. (1996): Zur Pathogenese von Angiopathien im Endometrium der Stute. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen. Univ. Leipzig Vet. Med. Diss .
- Hughes, J.P. und Loy, R.G. (1969): Investigations on the effect of intrauterine inoculation of Streptococcus zooepidemicus in the mare. In: Annual Congress of American Assoc. Equine Practice 15. Proceedings, Huston-Texas, 289–326.
- Kenney, R.M. (1993): Equine Endometritis In: JP Hughes Int. Workshop. Equine Vet J. 25 (3), 184.
- LeBlanc, M. (1994): Oxytocin the new Wonder Drug for Treatment of Endometritis? Equine Vet. Education 6 (1), 39–43.
- Liu, I.K.M., Cheung, A.T.W., Walsh, E.M., Ayin, S. (1986): The Functional Competence of Uterine-derived Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) from Mares Resistant and Susceptible to Chronic Uterine Infection: A Sequential Migration Analysis. Biology of Reprod. 35, 1168–1174.
- Liu, I.K.M.; Cheung, A.T.W., Walsh, E.M., Miller, M.E. (1985): Comparison of Peripheral and Uterine-derived Polymorphonuclear Leukocytes from Mares Resistant and Susceptible to Chronic Endometritis: Chemotactic and Cell Elastimetry Analysis. Am. J. Vet. Res. 46 (4), 917–920.
- Mattos, R.C. (1989): Manejo Reprodutivo da Egua. In: Taranto, J.R.; Sangue e Raca. Rio de Janeiro-RJ Ed, Index Ltda, 69–81.
- Mattos, R.C. et al. (1997): Effect of different pot-breeding treatments on fertility on thoroughbred mares. Pferdeheilkunde, in press.
- Martin, J.C., Klug, E., Günzel, A.R. (1979): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J. Rep. Fert. Suppl. 27, 47–51.
- Medice, E.B., Merkt, H., Pohlenz, J.F., Brunkhorst, D. (1991): Considerations on the Use of Ancillary Diagnostic Aids in the Diagnosis of Endometritis due to Infection in Mare. J. Reprod. Fert. Suppl. 44, 700–703.
- Merkt, H., Bisping, W., Günzel, A.R., Kirpal, G. (1980): Die Tupferprobe in der Gynäkologie der Stute. Prakt. Tierarzt 61, 301–308.
- Pascoe, D.R. (1979): Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. J. Reprod. Fert. Suppl. 27, 299–305.
- Pascoe, D.R. (1992): Uterine Defense Mechanisms and Associated Intrauterine Treatment. Proceedings of a course on Equine Reproduction, Massey Univ. 143, 9–15.
- Pouret, E.J.M. (1982): Surgical Technique for the Correction of Pnuemo- and Urovagina. Equine Vet. J. 14 (3), 249–250.
- Pycock, J.F. (1994): Assessment of Oxytocin and Intrauterine Antibiotics on Intrauterine Fluid and Pregnancy Rates in the Mare. AAEP Proceedings 40th An Conv, 19–20.
- Rasch, K., Schoon, H.A., Sieme, H., Klug, E. (1996): Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rates in mares. Equine Vet. J. 28 (6), 455–460.
- Ricketts S.W. (1975): The Technique and Clinical Application of Endometrial Biopsy in the Mare. Equine Vet. J. 7 (2), 102–108.
- Ricketts, S.W. und Alonso, S. (1991a): The Effect of Age and Parity on the Endometrial Development of Equine Chronic Endometrial Disease. Equine Vet. J. 23 (3), 189–192.
- Ricketts, S.W. und Alonso, S. (1991b): Assessment of the Breeding Prognosis of Mares using Paired Endometrial Biopsy Techniques. Equine Vet. J. 23 (3), 185–188.
- Ricketts, S.W. und McKintosh, M.E. (1987): Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. J. Reprod. Fert. Suppl. 35, 343–351.
- Roth, J.A., Kaerberle, M.L., Loren, L.H. (1983): Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. Am. J. Vet. Res. 49, 247–253.

Schoon, H.A. und Schoon, D. (1996): Fertilitätsrelevante Pathomechanismen im Stutenendometrium – Verlauf, Diagnose und Prognose. Samstag-Akademie, Univ. Leipzig

Silva, C.A.M. (1989): Infecções uterinas na equa. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 8. Belo Horizonte. Palestra Proferida.

Schubert, S. (1994): Mikrobiologische und zytologische Untersuchungen des Genitalkanals sowie Konzeptionsrate nach Insemination bei Stuten mit mangelhaftem Schammschluß vor und nach chirurgischer Korrektur durch eine Vulva- und Vestibulumplastik. TiHo-Hannover, Diss.

Vandeplassche, M. (1976): Die puerperale Metritis. Arbeitstagung der Fachgruppe Pferdkrankheiten der DVG, München 1975, 1–4.

Watson, E.D. (1988): Uterine Defence Mechanism in Mares Resistant and Susceptible to Persistent Endometritis: A Review. Eq. Vet. J. 20 (6), 307–400.

Watson, E.D., Stockes, C.R., Bourne, F.J. (1987): Cellular and Humoral Defence Mechanisms in Mares Susceptible and Resistant to Persistent Endometritis. Vet. Immunol. Immunopathol. 16, 107–121.

Waelchli, R.O. und Winder, C. (1987): Immunohistochemical Evaluation of the Equine Endometrium during the Oestrus Cycle. Equine Vet. J. 19 (4), 299–302.

Waelchli, R.O. und Winder, C. (1991): Mononuclear Cell Infiltration of the Equine Endometrium – Immunohistochemical Studies. Equine Vet. J. 23 (6), 470–474.

Weitze, C.F. und Petzold, R. (1992): Preservation of Semen. J. Reprod. Sc. 28, 229–235.

Winter, M. U. Buschmann, H.G. (1987): Measuring Phagocytosing Capacity in Polymorphonuclear Cells of the Pig – a Comparison between Different Assays. Zbl. Veterinärmed. B. 34, 504–508.

Zerbe, H., Schubert, H.J., Hoedemaker, M. Grunert, E. Leibold, W. (1996): A New Model System for Endometritis: Basic Concept and Characterization of Phenotypic and Functional Properties of Bovine Uterine Neutrophils. Theriogenology, 46, 1339–1356.

L.F.F. Castilho
E. Klug

Klinik für Pferde
Tierärztl. Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel.: 0511/ 856 7233
Fax: 0511/856 7688

H. Zerbe

Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Rindes
Tierärztl. Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel.: 0511/ 856 7242
Fax: 0511/856 7691

U. Rabe
W. Leibold

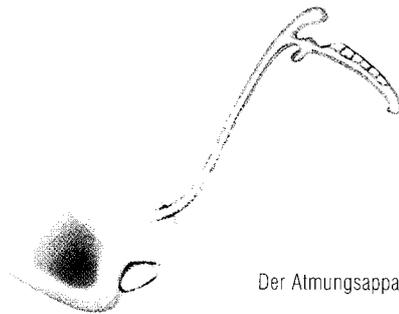
Arbeitsgruppe Immunologie
Tierärztl. Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel.: 0511/ 856 7241
Fax: 0511/856 7682

KEINE HALBEN SACHEN!

EQUISTRO SECRETA PRO

Für Abwehrkraft und das Bronchialsystem



Der Atmungsapparat

Kräuter und Vitamine dienen im Rahmen der Ernährung dem Aufbau und Erhalt der natürlichen Abwehrkräfte. Durch veränderte Umweltbedingungen ist das natürliche Angebot und die Vielfalt an Kräutern und Vitaminen stark zurückgegangen, wodurch sich die Infektionsanfälligkeit des Pferdes erhöht hat. **EQUISTRO SECRETA PRO** enthält ein Konzentrat aus 20 biologisch wirksamen Kräutern sowie die Vitamine A, E und C. Die naturbelassene Form und das schonende Herstellungsverfahren (keine Pellets) gewährleisten einen hohen Wirkungsgrad. **EQUISTRO SECRETA PRO** reaktiviert und stabilisiert die natürlichen Abwehrkräfte und das Bronchialsystem.

Zusammensetzung / kg:

Kräuterkonzentrat
mit hochkonzentriertem Irish Moos
Vitamin A: 300.000 IE
Vitamin E: 3.000 mg
Vitamin C: 5.000 mg

Fütterungsempfehlung:

Fohlen / Jährlinge: 6 g - 12,5 g / Tag
Pferde: 12,5 g - 25 g / Tag

Handelsform: 800 g / 2.400 g

Alleinvertreib für Deutschland:

Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH - Postfach 214 - D-06855 Roßlau - Tel. 034901/885-0 - Fax: 034901/885 323
The equine care system by **PHARMEDICA GmbH** - D-48157 Münster

IDT **IMPFSTOFFWERK**
DESSAU-TORNAU GmbH