

Aus der Klinik für Wiederkäuer
mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung: Prof. Dr. H. Zerbe

Interaktionen von Inseminatbestandteilen mit Epithelzellen und Leukozyten im Uterus des Rindes

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Susanne Marianne Lechner
aus Nürnberg

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Zerbe
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Gefördert im Rahmen des DFG-Projektes RA 989 3-1 (Interaktionen von Spermatozoen mit Leukozyten und Epithelzellen im Uterus von Rind und Schwein) und dem Förderverein für Biotechnologieforschung (FBF).

Meiner Familie

Inhalt	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
2 Literaturübersicht	8
2.1 Uterine Effekte der Insemination	8
2.1.1 Spermatozoentransport und -selektion	8
2.1.2 Uterine immunologische Mechanismen durch das Inseminat	10
2.1.2.1 Spermatozoen	11
2.1.2.2 Seminalplasma	11
2.1.2.3 Samenverdünner	13
2.2 Subklinische Endometritis beim Rind	14
2.3 Methoden zur Untersuchung endometrialer Mechanismen	16
2.3.1 Tiermodell	16
2.3.2 Uterusepithelzellkultur	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Geräte und Materialien	18
3.1.1 Geräte, Klinik- und Laborbedarf	18
3.1.2 Medikamente, Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien	21
3.1.4 Probanden	22
3.2 Methoden	22
3.2.1 Probennahme und Aufbereitung	22
3.2.1.1 Blutentnahme	22
3.2.1.2 Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus dem Blut	23
3.2.1.3 Endometriale Gewebeproben	23
3.2.1.4 Gewinnung von Uterussekret	23
3.2.1.5 Spermatozoenaufbereitung	24
3.2.1.6 Seminalplasmaaufbereitung	24
3.2.1.7 Gewinnung und Aufbereitung von Samenblasendrüsensekret	24
3.2.1.8 Herstellung von Verdünnungsreihen	25
3.2.2 Funktionelle Charakterisierung neutrophiler Granulozyten	25
3.2.2.1 Vitalität	25
3.2.2.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	25
3.2.2.3 Transmigration	26

3.2.3	Interleukin-8 ELISA	27
3.2.4	Spermatozoencharakterisierung.....	27
3.2.4.1	Grobsinnliche Beurteilung.....	27
3.2.4.2	Motilität	28
3.2.4.3	Vitalität	28
3.2.4.4	FITC-PNA/SYTO 17/PI-Färbung zur Beurteilung von Vitalität und akrosomalem Status von Spermatozoen nach Inkubation mit Kokulturüberständen.....	28
3.2.5	Zellkulturarbeiten.....	29
3.2.5.1	Gewinnung und Präparation primärer boviner Uterusepithel- zellen (pbUEZ).....	29
3.2.5.2	Kultur der pbUEZ	29
3.2.5.3	pbUEZ-Vitalitätsbeurteilung mittels Trypanblau-Färbung.....	30
3.2.5.4	Kokultorexperimente unter Beteiligung der pbUEZ.....	31
3.2.6	Durchflusszytometrie.....	31
3.2.7	Bakteriologische Untersuchungen.....	32
3.2.8	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Methodische Vorarbeiten.....	33
4.1.1	Etablierung der primären bovinen uterinen Epithelzellkultur.....	33
4.1.1.1	Optimierung der Zellkulturbedingungen.....	33
4.1.1.2	Qualitätsprüfung der pbUEZ-Kultur.....	36
4.1.1.3	Konservierung von pbUEZ für spätere Versuche.....	36
4.1.2	Definition interner Standards zur Quantifizierung der chemotakti- schen Aktivität polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) .	37
4.2	Wiederfindung inseminierter Spermatozoen in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitale	40
4.3	Einfluss von Seminalplasma (SP) und Samenblasendrüsensekret (SBS) auf die Funktionalität von bovinen PMN	41
4.3.1	PMN-Vitalität	42
4.3.2	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN	43
4.3.3	Einfluss von SP auf die PMN-Chemotaxis.....	44
4.3.4	Einfluss von SBS auf die PMN-Chemotaxis	49

4.4	Kokulturrexperimente zu Rolle und Modulierbarkeit der pbUEZ	51
4.4.1	Interleukin-8-Bildung durch pbUEZ	52
4.4.2	Zellfunktionelle Effekte der Kulturüberstände stimulierter pbUEZ	53
4.4.2.1	PMN-Chemotaxis.....	53
4.4.2.2	Wirkung von pbUEZ-Kokulturüberständen auf Spermatozoen	56
5	Diskussion	58
5.1	Konzeptionelle Überlegungen zu Untersuchungen über Interaktionen zwischen bovinen uterinen Epithelzellen, Inseminatbestandteilen und PMN.....	58
5.2	Teilschritte zur Erarbeitung von in-vitro-Arbeitsmethoden mit pbUEZ und PMN.....	60
5.2.1	Erarbeitung optimaler Zellkulturbedingungen für pbUEZ.....	60
5.2.2	Erarbeitung einer Methode zur Standardisierung zellfunktioneller Experimente.....	61
5.3	Interaktionen von Inseminatbestandteilen mit uterinen Epithelzellen und PMN.....	62
5.3.1	Einfluss von SP und SBS auf funktionelle Eigenschaften von PMN	62
5.3.2	Einfluss der pbUEZ auf PMN und Spermatozoen in-vitro.....	64
5.4	Wissenschaftliche und praktische Bedeutung der Resultate für die künstliche Besamung	66
6	Zusammenfassung	69
7	Summary	72
8	Literaturverzeichnis.....	75
9	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACScan	fluorescence activated cell scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät)
FKS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL -1,-2,-3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz (1=grün, 2=orange, 3=rot)
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor)
h	Stunde(n)
kg	Kilogramm
KB	Künstliche Besamung
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
MW	Mittelwert
µg	Microgramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
MNC	Mononukleäre Zellen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
pbUEZ	primäre bovine Uterusepithelzellen
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
rhIL-8	rekombinant humanes Interleukin-8
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SBS	Samenblasendrüsensekret
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SP	seminal plasma
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TG	Tiefgefrier-
TGF- β 1	Transforming growth factor - β 1 (Wachstumsfaktor)

1 Einleitung

Die moderne Rinderzucht ist bestrebt, eine wirtschaftlich attraktive Produktion unter Ausnutzung des vorhandenen Tierpotentials bei gleichzeitigem Erhalt der Produktqualität und der Einhaltung der Tierschutz- sowie der Umweltgesetzgebung zu erreichen. Dabei wird unter anderem dahingehend geforscht, die Nutzung der Ejakulate so zu optimieren, dass mit reduzierten Spermatozoenzahlen pro Besamungsdosis höchstmögliche Fertilitätsraten erzielt werden können. Zur Verbesserung bewährter Besamungstechniken und der Etablierung neuerer biotechnologischer Verfahren ist es von ökonomischem Interesse, Interaktionen zwischen dem bovinen Reproduktionstrakt und dem Inseminat detaillierter zu untersuchen.

Von den Spezies Schwein und Pferd ist bekannt, dass Inseminatbestandteile die Spermatozoen während der Uteruspassage nicht nur schützen (TROEDSSON et al. 2005), sondern auch eine endometriale inflammatorische Immunantwort hervorrufen, die für eine Selektion der Spermatozoen im weiblichen Genitale mitverantwortlich ist (ROZEBOOM et al. 2001). Bei der Sau konnte in verschiedenen in-vivo-Versuchsansätzen (BISCHOF et al. 1994, ENGELHARDT et al. 1997, MATTHIJS et al. 2003, O'LEARY et al. 2004, ROZEBOOM et al. 1999, TAYLOR et al. 2007a) ein massiver Einstrom von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) beobachtet werden. Diese primären lokalen Abwehrzellen wurden auch durch Seminalplasmakomponenten angelockt. Dieses Phänomen konnte beim Rind nicht beobachtet werden. Aktuelle Studien (WENDT 2007) zeigen, dass bei Inseminationsversuchen mit unterschiedlichen Spermatozoenpräparationen keine mit dem Schwein und dem Pferd vergleichbare uterine Immunreaktion auftritt. Die Tatsache, dass der Bulle beim Deckakt das Ejakulat in der Vagina absetzt und die Spermatozoen bei der Zervixpassage einer mechanischen und biochemischen Selektion unterzogen werden, die mit der in der utero-tubalen Verbindung anderer Spezies vergleichbar scheint, kann für diesen funktionellen Unterschied erklärend sein. Dagegen platzieren Eber und Hengst den Samen direkt in den Uterus, wodurch dort eine immunologische Spermatozoenselektion induziert wird. Untersuchungen zu Wirkmechanismen von bovinem Seminalplasma (SP) zeigten einen Schutzeffekt für die Spermatozoenvitalität auf (BAAS et al. 1983, GARNER et al. 2001, GWATHMEY et al. 2006).

Ein relativ hoher Prozentsatz von Kühen leidet jedoch an subklinischer Endometritis (KASIMANICKAM et al. 2004). Hier sind immunologisch aktive Zellen, vor allem PMN, zum Zeitpunkt der Bedeckung oder künstlichen Besamung bereits im Uterus vorhanden. Mögliche immunregulatorische und spermatozoenschützende Mechanismen durch eine optimal zusammengesetzte Besamungsportion, die die Konzeptionschancen in solchen Fällen erhöhen können, müssen intensiver untersucht werden.

In der vorliegenden in-vitro-Studie sollte erstens die Fragestellung bearbeitet werden, ob und wie Seminalplasma (SP) auf diese spezielle immunologische Situation in der bovinen Gebärmutter Einfluss nimmt. Ein Schwerpunkt war daher, den Effekt von SP auf funktionelle Eigenschaften von PMN zu untersuchen (Vitalität, Bildung bakterizider reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Chemotaxis). In einem zweiten Schritt sollte in Kokultorexperimenten untersucht werden, wie uterine Epithelzellen des Rindes auf Kontakt mit besamungsrelevanten Stimuli reagieren und dabei die uterine zelluläre Situation beeinflussen.

Differenzierte Kenntnisse über die Effekte einzelner Inseminatbestandteile sowie genauere Informationen zu Zell-Zell-Interaktionen in der östrischen Gebärmutter können zukünftig zur Optimierung im Besamungsmanagement, insbesondere zur Steigerung der Fertilitätsraten bei subklinisch an Endometritis erkrankten Tieren beitragen.

2 Literaturübersicht

Die künstliche Besamung (KB) ist in der Rinderpraxis seit über sechs Jahrzehnten gängige Praxis. Während zu Anfang dabei die Bekämpfung venerischer Erkrankungen im Vordergrund stand, gelten heute bei der KB vorrangig tierzüchterische und wirtschaftliche Interessen. Die Erzeugung von vielen Nachkommen wertvoller Zuchtlinien gelingt beim Rind aufgrund der Spermatozoeneigenschaften sowie der relativ einfachen Besamungstechnik deutlich besser als bei anderen Tierarten. Im Rinderbereich ist die Entwicklung daher weit fortgeschritten. So gibt es bereits seit einiger Zeit die Möglichkeit gesextes Sperma zu verwenden, tief intrauterine Besamungen durchzuführen und damit nach massiver Ejakulatverdünnung mit geringerer Spermatozoendichte hohe Fertilitätsraten zu erzielen. Der Besamungserfolg hängt jedoch entscheidend von der Situation im weiblichen Genitale ab. Dort gibt es sowohl natürliche Selektionsmechanismen als auch immunologische Besamungseffekte, die die Konzeption beeinflussen.

2.1 Uterine Effekte der Insemination

Zahlreiche Faktoren beeinflussen den Spermatozoentransport im weiblichen Genitale. Zum einen bestehen tierartlich sowie tierindividuell unterschiedliche anatomische Voraussetzungen im weiblichen Reproduktionstrakt (Größe, Muskulatur, Sekretion, Epitheloberflächenstruktur), zum anderen modulieren funktionelle Mechanismen, endokrine und neurale sowie biochemische und immunologische Einflüsse das Geschehen (DROBNIS und OVERSTREET 1992).

2.1.1 Spermatozoentransport und -selektion

Das Zustandekommen einer ausreichenden Spermatozoenpopulation am Ort der Befruchtung ist maßgeblich vom zeitgerechten, erfolgreichen Spermatozoentransport durch den weiblichen Reproduktionstrakt abhängig. Bei einigen Tierarten ist der Transport der Spermatozoen in eine initiale schnelle Transportphase und eine langsamere zweite Phase, die in der Regel die befruchtungsfähigen Spermatozoen beinhaltet, unterteilt. Dadurch können z.B. bei der Sau schon wenige Minuten nach der Besamung Spermatozoen an der utero-tuberalen Verbindung festgestellt werden (SCHNORR 1989). Da es sich dabei aber um nicht kapazitierte Spermatozoen

handelt, sind sie für die Befruchtung irrelevant (HAWK 1983). Mit der zweiten Welle ankommende Spermatozoen bewegen sich langsamer und nehmen auf ihrem Weg Kontakt mit dem Endometrium (LOVELL und GETTY 1968) sowie mit Immunzellen (TAYLOR et al. 2007a) auf. Zyklische endokrine Veränderungen beeinflussen die physiologischen Transportmechanismen (RUCKEBUSCH und BAYARD 1975). TROEDSSON et al. (2005) zeigten, dass Prostaglandine als Bestandteile des Seminalplasmas die myometriale Aktivität steigern können. Auch Uterusflüssigkeit und Zilienaktivität der Uterusepithelzellen tragen zum passiven Spermatozoentransport bei. Beim Schwein wurde ein hoher Spermatozoenverlust durch starken Rück- und Ausfluss über Zervix und Scheide aufgrund peristaltischer Uteruskontraktionen nachgewiesen (SCOTT und OVERSTREET 1995; STEVERINK et al. 1998). Retrograde passive Spermatozoenbewegungen finden beim Rind nach Besamung in dem Maße statt, dass Spermatozoen durch Uteruskontraktionen nach kaudal transportiert werden, sich im Zervikalschleim sammeln und dann in die Vagina zurückfließen (MITCHELL et al. 1985; NELSON et al. 1987; LARSSON 1986). Die bei einer natürlichen Bedeckung auftretenden neuralen und taktilen Reize (VAN DEMARK und HAYS 1952) fehlen bei der künstlichen Besamung und bleiben als Stimuli für Kontraktionen der Gebärmutter aus. Der Bulle ejakuliert im Natursprung in die Scheide; bei der KB wird das Inseminat dagegen oft direkt im Uterus abgesetzt. Die Zervix, die erste selektive Barriere (SENGER 1993) bei Rind und Schaf, wird somit teilweise übersprungen. Im Östrus ist die Zervix hormonell bedingt geöffnet. Motile Spermatozoen können von der Vagina und der Zervix aus in den Uterus eindringen und adhären am Uterusepithel, in Schleimhautfalten sowie Zervikalkrypten (HAWK 1987). Letztere dienen nach den schon 1966 erfolgten Untersuchungen von MATTNER bei Wiederkäuern als Spermatozoenreservoir und halten im Basalbereich ein Spermatozoenfreundliches Milieu bereit, während der oberflächliche Zervikalschleim gelartig und spermizid ist. Die Zervix hält nicht-spermatozoengebundene Seminalplasmaanteile und andere mit dem Ejakulat eingebrachte Fremdpartikel vom Eintritt in den Uterus ab. Der Zervikalschleim sorgt zudem für die Ausschleusung von morphologisch sowie funktionell veränderten Spermatozoen (MITCHELL et al. 1985; KARABINUS und SAACKE 1987).

2.1.2 Uterine immunologische Mechanismen durch das Inseminat

Das Spermium wird beim Deckakt tierartlich unterschiedlich im weiblichen Reproduktionstrakt abgesetzt. Bei den „Scheidenbesamern“ Rind, Schaf, Ziege, Kamel, Kaninchen und Primat findet die Ejakulation im kranialen Teil der Vagina statt, wohingegen Pferd und Schwein als „Uterusbesamer“ ihre Spermatozoen transzervikal im Uterus deponieren. Dementsprechend ist der Weg für die Spermatozoen zum Ort der Befruchtung im Eileiter unterschiedlich. Bei Uterusbesamern ist bekannt, dass wenige Stunden nach der Besamung inflammatorische Reaktionen der Gebärmutter einsetzen, die in Form eines massiven Leukozyteneinstroms beobachtet werden können. Insbesondere PMN, die ersten Zellen, die bei einer unspezifischen Immunabwehr vor Ort sind, wurden dabei im Uterus gefunden (LOVELL u. GETTY 1968; ROZEBOOM et al. 1998). Ein solcher Effekt konnte von WENDT (2007) in Besamungsversuchen beim Rind in dem Maße nicht nachgewiesen werden.

PMN stellen beim Rind nach den Lymphozyten mit 25-35% die zweitgrößte Fraktion der Blutleukozytenpopulation dar (LIEBICH 1993). Sie gelten als Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems und sind dafür zuständig, Partikel zu phagozytieren sowie diese dann unter anderem durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abzutöten (JANEWAY et al. 2002). In ihrer Aktivität unterscheiden sich jedoch autologe Blut-PMN von mammären und uterinen Abwehrzellen (ZERBE et al. 2000; MEHRZAD et al. 2001). TROEDSSON et al. (1995) vermuten nach Versuchen mit Hengstspermatozoen, die für sich alleine keinen migrationsfördernden Einfluss hatten, dass PMN durch Komplementaktivierung zur Migration angeregt werden, während ROZEBOOM et al. (2001) an Eberspermatozoen zeigten, dass eine komplementunabhängige, spermatozoeninduzierte Chemotaxis von PMN stattfindet. Entzündungsmediatoren (z.B. Interleukin-8 (IL-8), Leukotrien B₄) wirken u.a. auf PMN chemoattraktiv (ZERBE et al. 1996, 2003). Über die Expression unterschiedlicher Moleküle wird die Diapedese der Zellen durch die Endothelwände zum Ort der Entzündung möglich (JANEWAY et al. 2002). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Epithelzellen im Uterus IL-8 bilden und sezernieren (KAYISLI et al. 2002; SHEN et al. 2004), was zu einem verstärkten PMN-Einstrom führen kann, da IL-8 für PMN das stärkste Chemokin darstellt.

2.1.2.1 Spermatozoen

In humanmedizinischen Studien wurde belegt, dass es nach Insemination von toten und geschädigten Spermatozoen zu einer besonders schnellen Anlockung und Aktivierung von PMN kommt. Im Gegensatz zu Versuchen mit vitalen Spermatozoen sind schon nach vergleichsweise kurzer Zeit PMN im Uterus nachweisbar (VOGELPOEL und VERHOEF 1985). Uterusspülungen beim Pferd lieferten Informationen, dass dort 6 h nach Insemination die höchste Zahl an Leukozyten zu finden ist (GÖRGENS et al. 2005b). Eine gezielte Selektion der Spermatozoen durch PMN im Uterus ist hingegen nicht bekannt. Auch bei der Sau fanden MATTHIJS et al. (2000) sowie WOELDERS und MATTHIJS (2001) eine rasch einsetzende Phagozytoseaktivität nach Kontakt mit toten oder geschädigten Spermatozoen. TAYLOR et al. (2007a) fanden in ihren Untersuchungen beim Schwein Hinweise auf eine transiente Bindung der PMN an Spermatozoen. Für uterine Spermatozoenverluste scheint trotzdem die Phagozytose ein wichtiger Faktor zu sein, weil dabei $\text{PGF}_{2\alpha}$ freigesetzt wird, was wiederum die Uteruskontraktilität und damit die uterine Reinigung fördert. KOTILAINEN et al. (1994) postulieren, dass PMN eher durch Spermatozoen als durch Bakterien angelockt werden. Zu diesem Ergebnis kommen die Autoren nach Besamungsexperimenten sowohl mit Frischsperma als auch mit Tiefgefriersperma. Eine erhöhte Reaktivität des Uterus nach Insemination mit Tiefgefriersperma kann dabei auf unterschiedliche Verdünnereigenschaften und/oder fehlende Seminalplasmakomponenten zurückgeführt werden. Durch Seminalplasmaentfernung und damit verbundenes Fehlen von Prostaglandinen bleibt die myometriale Aktivität möglicherweise ungenügend. Die an sich physiologische immunologische Reaktion der Gebärmutter wird kompensatorisch verstärkt und führt dann zum Bild der Endometritis. Auch die Veränderung der Spermatozoenmembranstruktur nach Kryokonservierung wird als chemoattraktiver Reiz für die Immunabwehr diskutiert (KATILA 1997).

2.1.2.2 Seminalplasma

Dem aus den verschiedenen Anteilen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zusammengesetzten Seminalplasma wird primär die Rolle als Transport- und Schutzmedium für die den Uterus durchwandernden Spermatozoen zugeschrieben. In diversen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass dieses komplex

zusammengesetzte Medium sowohl Zytokine als auch weitere bioaktive Substanzen enthält, die mit spezifischen Zielzellen innerhalb des Reproduktionstrakts interagieren und somit die Fertilitätsrate beeinflussen können. Einerseits können Proteine des Seminalplasmas den Erhalt der Spermatozoenmotilität positiv beeinflussen (GWATHMEY et al. 2006), andererseits erhöht die Zugabe von Seminalplasma zu hoch verdünnten Besamungsdosen die Vitalität der Spermatozoen (GARNER et al. 2001). Bereits 1976 untersuchten CLARK und KLEBANOFF die Hemmung der Komplementaktivierung und damit die suppressive Wirkung von Seminalplasma auf die PMN-Chemotaxis. Unter in-vitro-Bedingungen stellte STRZEMIENSKI (1989) fest, dass eine nicht-lysiere Komponente im Seminalplasma die Spermatozoenphagozytose durch PMN inhibiert. Auch FAHMI et al. (1985) erkannten eine immunsuppressive Wirkung von bovinem Seminalplasma. In ihren in-vitro-Experimenten fanden die Autoren heraus, dass durch Seminalplasma unterschiedlicher Konzentration die Blastogenese von Lymphozyten unterdrückt wird, und dass unverdünntes Seminalplasma sogar zytotoxisch wirkt. THALER (1989) bestätigt, dass Seminalplasma die T- und B-Zellproliferation, die Phagozytoseaktivität von PMN und Makrophagen sowie die Killerzell-Aktivität unterdrückt. Neuere Untersuchungen von LAZAREVIC et al. (1995) zeigen, dass vorrangig sekrethaltige Vesikel im Seminalplasma für die Hemmung von Phagozytose und Lymphozytenproliferation verantwortlich sind. Eine reduzierte Chemotaxis und Hemmung der zellvermittelten Zytotoxizität unter Seminalplasmaeinfluss fanden ROZEBOOM et al. (1999, 2000) beim Schwein sowie ALGHAMDI et al. (2004) beim Pferd. Nach Untersuchungen von ALLEN und ROBERTS (1986) besitzt auch humanes Seminalplasma zytotoxische Kapazität, die jedoch serumabhängig ist. MARONI et al. (1972) beschrieben hingegen eine Chemoattraktivität von Seminalplasma für PMN bei Beteiligung von Serum oder Plasma. Die verminderte Bildung bakterizider Sauerstoffspezies durch PMN nach Seminalplasmazugabe ist bei mehreren Spezies bekannt (SCHOPF et al. 1984; LAZAREVIC et al. 1995). TREMELLEN et al. (1998) fanden bei Experimenten an Mäusen, dass Faktoren des Samenblasendrüsensekrets wie TGF- β 1 bei Epithelzellen im Uterus die Synthese von GM-CSF stimulieren und damit eine Abwehrreaktion durch Entzündungszellen angeregt wird. Die Expression des für die Anlockung von PMN hauptverantwortlichen Zytokins IL-8 wird nach Untersuchungen von ROBERTSON (2005) ebenfalls durch Kontakt von Seminalplasma mit dem Endometrium induziert. Zudem gibt es

Hinweise, dass Seminalplasmafaktoren sowohl den Ovulationszeitpunkt (WABERSKI et al. 1999) als auch die Gelbkörperentwicklung beeinflussen können (ROBERTSON 2005). Auch bei Scheidenbesamern sind uterine Seminalplasmaeffekte zu erwarten, da Bestandteile des Seminalplasmas durch Bindung an die Spermatozoen via Zervixpassage in die Gebärmutter eingeschleust werden.

2.1.2.3 Samenverdünner

Der Einfluss von Samenverdünnern auf die immunologischen Reaktionen im weiblichen Reproduktionstrakt ist bislang wenig erforscht. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Verdünnermedien ist von verdünnerspezifischen Reaktionen auszugehen. Magermilch-Eidotter-Verdünner, die häufig in der Pferdebesamungspraxis angewandt werden, üben einen starken chemoattraktiven Reiz auf PMN aus, der jedoch durch Seminalplasmazugabe effektiv gehemmt werden kann (GÖRGENS et al. 2005a). Bei in-vivo-Versuchen fanden KOTILAINEN et al. (1994) nach Insemination von Frischsamenverdünner akkumulierte PMN in der Gebärmutter. Beim Schwein verursacht Androhep™ im in-vivo-Experiment einen deutlichen uterinen PMN-Influx, während der Verdünner im in-vitro-Versuch, ausgelöst durch den Zitratbestandteil, die PMN-Migration signifikant hemmte (TAYLOR et al. 2007b). Die in der Rinderpraxis verwendeten Eigelbverdünner können unter bestimmten Bedingungen durch den Zusatz von Antioxidantien wie z.B. Glutathion-Reduktase, Ascorbinsäure, Hypotaurin oder Superoxiddismutase Spermatozoen vor oxidativem Stress und damit vor Schädigung schützen (ALVAREZ und STOREY 1983, 1989; BILODEAU et al. 2001). Die Zugabe dieser Substanzen zu Samenverdünnern auf Vollmilchbasis erreichte keine antioxidative Schutzwirkung (FOOTE et al. 2002). Durch die aus wirtschaftlichem Interesse angestrebte maximale Ejakulatverdünnung und den damit einhergehenden Verlust oder die Einschränkung der immunregulierenden Funktion des Seminalplasmas sind die möglicherweise ungünstigen immunologischen Effekte bestimmter Verdünnerbestandteile schwer absehbar.

2.2 Subklinische Endometritis beim Rind

Vor allem im Zusammenhang mit Geburt, unter Umständen auch bei Bedeckung oder Besamung erfolgt eine vorübergehende Keimbesiedlung der bovinen Gebärmutter. Die dabei eindringenden meist unspezifischen, ubiquitären Erreger werden normalerweise innerhalb kurzer Zeit wieder eliminiert. Ein Krankheitsgeschehen entwickelt sich erst dann, wenn mehrere Faktoren das Eindringen und Haften der Keime im Uterus begünstigen. Insbesondere Komplikationen während des Partus und im Puerperium (Schwergewürten, Aborte, unsachgemäße Geburtshilfe, Geburtsverletzungen, Retentio secundinarum) kommen hier als Ursachen in Frage. Prädisponierend sind außerdem Haltungs- und Fütterungsfehler, sowie Zyklusstörungen. Zervix und Vulva bilden eine wichtige Schranke gegen aufsteigende Infektionen. Gebärmuttermotorik, der nach außen gerichtete Sekretfluss, sowie immunologische Faktoren (PMN, Lymphozyten, Makrophagen, Immunglobuline, Opsonine, bakterizide Peptide etc.) tragen zur Erregerelimination bei. Unter Östrogeneinfluss kommt es während der Brunst zu erhöhter Gebärmuttermotilität und lokaler Leukozytose, wodurch Erreger rasch entfernt werden können. Es werden zudem immunsuppressive Substanzen (z.B. IL-8, Komplementkomponenten, Leukotrien B₄ etc.) in das Uteruslumen sezerniert. Im Diöstrus, bei geschlossener Zervix, ist die Uterusmotorik herabgesetzt; die Abwehrmechanismen sind damit geringer als im Östrus. Folgen einer bakteriellen Besiedlung des Uterus sind nicht nur Entzündung und histologische Veränderungen des Endometriums, sondern auch Unterdrückung der hypophysären LH-Sekretion, Störung des postpartalen Follikelwachstums und der Follikelfunktion, die die Ovulation negativ beeinträchtigen können (OPSOMER et al. 2000; PETER und BOSU 1988; SHELDON et al. 2002). Uterine Infektionen sind daher mit niedrigeren Konzeptionsraten, verlängerten Rast- und Gützeiten, sowie erhöhten Abgangsraten aufgrund erfolgloser Besamungen assoziiert (BORSBERRY und DOBSON 1989; LE BLANC et al. 2002). Bei den Erregern von endometrialen Entzündungen handelt es sich um eine große Anzahl unspezifischer Keimarten. Oft liegen Mischinfektionen vor. Auffällige Befunde wie vaginaler Ausfluss oder bereits gestörtes Allgemeinbefinden ergeben sich jedoch nur bei klinisch apparenten Gebärmutterentzündungen. Die subklinische Endometritis wird nach KASIMANICKAM et al. (2004) und SHELDON et al. (2006) über den prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten (PMN) in zytologisch untersuchten

Uterusspülproben (uterine Lavage) definiert. KASIMANICKAM et al. (2004) untersuchten hierfür Proben an Tag 20-33 sowie an Tag 34-47 post partum. Eine subklinische Endometritis lag dann vor, wenn in der ersten Probe $>18\%$, in der zweiten $>10\%$ PMN zu finden waren. Diese Angaben waren jeweils mit einer signifikant reduzierten Trächtigkeitsrate verknüpft. Tiere, bei denen post partum eine subklinische Endometritis diagnostiziert wird, sind möglicherweise derart immungeschwächt, dass sie bei einer Neubelegung einer höheren Infektionsgefahr ausgesetzt sind oder die bestehende Infektion und Entzündung im Rahmen der Belegung sogar verstärkt wird. GILBERT et al. (2005) werteten das Vorhandensein von $>5\%$ PMN im Uterus 40-60 Tage post partum als Anzeichen für eine subklinische Endometritis, die in einer verlängerten Günstzeit von durchschnittlich 39 Tagen resultiert. Eine definitive Diagnose subklinischer Endometritiden ist aufgrund der fehlenden äußerlichen klinischen Symptome am ehesten über die Zytologie mit Hilfe der Cytobrush-Methode möglich. Hier wird zur Zellgewinnung ein kleines Bürstchen verwendet, das unter rektaler Kontrolle im Schutz eines Plastikkatheters in den Uterus eingeführt, am Endometrium entlanggerollt und wieder zurückgezogen wird. Nach Fixation und Färbung der Zellen erfolgt die Diagnose durch mikroskopische Beurteilung. Der Grenzwert für einen gesunden Uterus wird jedoch unterschiedlich definiert. Ein negativer Effekt auf die Fruchtbarkeit durch subklinische Endometritiden wird dabei von mehreren Autoren bestätigt (GILBERT et al. 2005, HAMMON et al. 2001, KASIMANICKAM et al. 2004, MEE et al. 2004, RAAB et al. 2004). In einer neueren Studie von LENZ et al. (2007) wird eine Ultraschalluntersuchungsmethode beschrieben, die an Tag 21-27 post partum durchgeführt wird und einen hierbei gemessenen Durchmesser des Uteruslumens von $>0,2$ cm als Anzeichen einer subklinischen Endometritis wertet. LINCKE et al. (2007) verglichen in ihrer Arbeit Studien zur subklinischen Endometritis und stellten fest, dass derzeit keine effektive einheitliche Behandlung durchführbar ist. Ebenso müssen Risikofaktoren für die Entstehung subklinischer Endometritiden definiert und eine zuverlässige Diagnostik erarbeitet werden.

Bislang bleibt eine persistierende subklinische Infektion deshalb oft unentdeckt. Von Nutzen kann hier die Durchsicht klinischer Aufzeichnungen sein, die zumindest eine gewisse Risikoabschätzung für das Einzeltier ermöglicht (MARKUSFELD 1987).

2.3 Methoden zur Untersuchung endometrialer Mechanismen

Modellhafte Untersuchungen zu Fragestellungen bezüglich interaktiver Mechanismen bei der Besamung oder bei Infektionen im weiblichen Reproduktionstrakt werden bereits seit mehreren Jahrzehnten durchgeführt. In-vivo-Studien haben dabei den Vorteil, dass der physiologische Rahmen erhalten bleibt. Andererseits können durch die anatomische Komplexität des Genitaltrakts ebenso wie durch individuelle Einflüsse lokale Effekte am Ort der Interaktion überdeckt werden. Im in-vitro-Experiment sind zudem standardisierte Versuchsbedingungen sowie zeitliche Unabhängigkeit gegeben, die es ermöglichen verschiedene Situationen in einem Experiment zu beobachten. Zur besseren Charakterisierung der unterschiedlichen uterinen Mechanismen bedarf es der genaueren Untersuchung einzelner Gebärmutterabschnitte und der lokalen Zellfraktionen.

2.3.1 Tiermodell

Entscheidend für die Qualität eines Tiermodells ist die Strenge der Modellgrenzen. Für die Versuchsdurchführung ist es notwendig, genügend geeignete Tiere (Alter, Gesundheitszustand, Zyklus etc.) zur Verfügung zu haben, die je nach Fragestellung zyklussynchronisiert oder entsprechend ihrer Exposition in Gruppen eingeteilt werden. Bei den jeweiligen Besamungs- oder Spülexperimenten muss auf einheitliche Verweildauer des Inseminats im Probanden sowie auf die Verwendung gleicher Prüfsubstanzen inklusive deren identischer Volumina und Konzentrationen geachtet werden. GÖRGENS et al. (2005b) und WENDT (2007) haben für die finale Datenerhebung zur Feststellung des optimalen Zeitpunktes der Uterusspülung bei Stute bzw. Kuh zunächst eine Reihe von Vorversuchen durchführen müssen. Für Fragestellungen zur Endometritis gibt es bereits etablierte Modelle, die potente körpereigene chemotaktische Stoffe zur Anlockung neutrophiler Granulozyten in den Uterus verwenden. Sowohl ENGELKE et al. (1999) als auch ZERBE et al. (2003) arbeiteten mit IL-8 als Chemoattraktivum. Für beide Modellsysteme evaluierten die Autoren in begleitenden in-vitro-Experimenten den direkten Einfluss der chemotaktischen Substanz auf weitere funktionelle Parameter von PMN. Zur Beurteilung des Wanderungsverhaltens von PMN wurden von FRANK dazu Transmigrationsversuche durchgeführt, die IL-8 in einer Konzentration von 100ng/ml als geeignetes Lockmittel identifizierten.

2.3.2 Uterusepithelzellkultur

Die Separation und Kultur von primären bovine Uterusepithelzellen (pbUEZ) ist bereits bei mehreren Spezies einschließlich Mensch (LIU und TSENG 1979), Ratte (McCORMACK und GLASSER 1980), Kaninchen (FORTIER et al. 1987) und Rind (SKARZYNSKI et al. 2000) beschrieben worden. Scheinbar sind dabei kaum tierartige Unterschiede in der Zellmorphologie der kultivierten Zellen zu finden (VARMA et al. 1982; RICKETTS et al. 1983). HYTTEL (1985) beschreibt die Ultrastruktur des Epithels nach Untersuchung boviner Endometriumsbiopate zum Zeitpunkt der Brunst und stellt eine erhöhte Endozytosekapazität der Zellen fest. Zur Evaluierung funktioneller Eigenschaften der pbUEZ können die Zellen isoliert, frisch kultiviert und dabei mit verschiedenen Substanzen exponiert werden. Anschließend erfolgt die Messung funktionsassoziierter Zellparameter. Neben der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie können die Zellen durchflusszytometrisch beurteilt werden (z.B. zur Vitalitätsbeurteilung). In Kulturüberständen sucht man meist mittels ELISA gezielt nach bioaktiven Substanzen, wie z.B. nach Zytokinen, während in der in-vitro-Transmigrationskammer Effekte auf PMN im Bioassay geprüft werden. FORTIER et al. (1988) haben pbUEZ enzymatisch isoliert, stimuliert und die Prostaglandinsyntheseaktivität gemessen. Eine neuere Studie von HERATH et al. (2006) bestätigt die endokrine Funktionskompetenz der pbUEZ und zeigt, dass die Zellen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) Prostaglandine sezernieren. Von DE MORAES et al. (1999) wurde die Rolle von GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Colony-Stimulating-Faktor) immunhistochemisch untersucht. Die Autoren beschreiben ebenso wie eine humanmedizinische Gruppe (SHEN et al. 2004) dieses intrazelluläre Molekül als potentes Zytokin zur Regulation der endometrialen Reinigungsmechanismen. Die Synthese von Entzündungsmediatoren und die damit verbundene Rekrutierung von Leukozyten wurde auch in Zellkulturversuchen anderer Gewebe untersucht (SHUSTER 1997, BOUDJELLAB 2000). Die Resultate belegen die Bedeutung verschiedener Komplementfaktoren sowie Zytokine als initiale Immunregulatoren.

Ein System zur Konservierung der Zelllinien für standardisierte, zeitunabhängige Versuchsreihen wurde von MURAKAMI et al. (2003) etabliert. Zur Überprüfung der Zellfunktionalität wurde dabei erneut die Prostaglandinsynthese als Messparameter herangezogen. Die Autoren geben an, dass eine Verwendung der pbUEZ nach einmaliger Kryokonservierung für funktionelle Studien geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte, Klinik- und Laborbedarf

Geräte

Autoklav D65	Fa. Systec, Wettenberg
Durchflusszytometer mit Computereinheit FACScan (Fluorescence Activated Cell Analyser)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine ZBE 70-35	Fa. Ziegra, Isernhagen
Heizblock Thermostat 5320	Fa. Eppendorf, Hamburg
Laborwaage SBC 22	Fa. Scaltex Instruments, Heiligenstadt
Mikroskop DM IL mit Kamera DFC 320 Software Imagic 500 und UV-Filter (490-520nm)	Fa. Leica Microsystems, Wetzlar
Minishaker MS1	Fa. IKA, Staufen
Pipetten, einstellbar (1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml)	Fa. Biohit, Köln
Photometer Spectra Classic	Fa. Tecan, Crailsheim
Reinstwassersystem GenPure	Fa. TKA, Niederelbert
Rüttler für Mikrotiterplatten MTS 4	Fa. IKA, Staufen
Tischzentrifuge Mikro 200	Fa. Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 32R	Fa. Hettich, Tuttlingen

Geräte für Zellkulturarbeiten

CO ₂ -Brutschrank Forma 3121	Fa. Thermo Electron, Dreieich
Gefriertruhe -80°C Forma ULT Freezer	Fa. Thermo Electron, Dreieich
Heiztisch HT50	Fa. Minitüb, Tiefenbach
Präparierbesteck	Fa. Hauptner, Herberholz
Sicherheitswerkbank Biowizard 130 GL	Fa. Kojair, Vilppula, Finnland
Spatel	Fa. Roth, Karlsruhe

Transmigrationskammer, 10-well mit Polycarbonatmembran 25 x 80 mm, Porengröße 3 µm	Fa. NeuroProbe, Gaithersburg, USA
Wasserbad WBU-45	Fa. Memmert, Schwabach
Zellzählkammer nach Bürker	Fa. Roth, Karlsruhe

Klinikbedarf

Abstrichbesteck	Fa. Seidel medipool, Gauting
Kanülen (17 G, 19 G)	Fa. BSN medical, Hamburg
Ernährungs-sonde, Harnkatheter, Gr.2	Fa. Rüschi, Kernen
Faden, Silkam white (6 metric)	Fa. Braun-Aesculap, Tuttlingen
Spritzen, Terumo Syringe, 20 ml	Fa. BSN medical, Hamburg
Vacutainer Brand Luer Adapters	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Vacutainer-Röhrchen (10 ml) mit Natrium-Heparin (170 IU)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

Laborbedarf

Becherglas, 250 ml	Fa. Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,5 ml	Fa. Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen, 5 ml	Fa. Roth, Karlsruhe
Laborflaschen mit Gewinde (250 ml, 1000 ml)	Fa. Roth, Karlsruhe
Objektträger	Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim
Pipettenspitzen Brandt (weiß, gelb und blau)	Fa. Zefa Laborservice, Harthausen
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Röhrchen, 15 ml, Polypropylen	Fa. Greiner, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml, Polypropylen	Fa. Greiner, Frickenhausen
TruCount tubes, 5 ml	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten, 24-well	Fa. Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 50 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen

3.1.2 Medikamente, Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien

BamBanker	Fa. Wako Chemicals, Osaka, Japan
Biocoll®	Fa. Biochrom, Berlin
Bromphenolblau	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Columbia Schafsblut-Agar	Fa. Oxoid, Wesel
Dihydrorhodamin 123 (DHR 123)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM, Dulbeccos Modified Eagle's Medium	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Edwards Schafsblut-Agar	Fa. Oxoid, Wesel
Ethanol, 70%	Fa. Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum Lot F7524 (FKS)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
FITC-Antikörper F1010	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Gassner-Agar	Fa. Oxoid, Wesel
HEPES (N-(Hydroxyethyl)piperazin-N'(ethan-sulfonsäure))	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Interleukin-1 β	Fa. CellConcepts, Umkirch
Interleukin-8, human, rekombinant Lot #030318	Fa. CellConcepts, Umkirch
L-Glutamin	Fa. Biochrom, Berlin
Lipopolysaccharid (LPS) von E.coli	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Matrigel	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumchlorid	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
NaHCO ₃ , Natriumhydrogenkarbonat	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Nigrosin	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicilin-G (10.000 U/ml)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll®	Fa. Biochrom, Berlin
PI, Propidiumjodid	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Quantikine, IL-8 ELISA	Fa. R+D Systems, Minneapolis, USA
RPMI	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Sheath-fluid für Durchflusszytometrie	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Streptomycin (10 mg/ml)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

SYTO-17	Fa. Molecular Probes, Oregon, USA
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin 2,5%	Fa. Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Phosphatpuffer (PBS)

NaCl	8,000 g/l	137,00 mmol
Na ₂ HPO ₄	1,092 g/l	7,70 mmol
KH ₂ PO ₄	0,200 g/l	1,46 mmol
KCl	0,200 g/l	2,68 mmol
pH 7,4		

EDTA-Puffer 0,76% zum Ablösen von Zellen

100 ml PBS-Puffer
+ 0,76 g EDTA

Trypsin-EDTA-Lösung 0,25%

Trypsin (2,5%)	5	ml
EDTA (1 mmol)	45	ml

RO+Medium

RPMI Medium	
+ 18 mM Hepes	468,54 mg/100 ml
+ 2 mM L-Glutamin	29,23 mg/100 ml
+ 15 mM NaHCO ₃	126,02 mg/100 ml
+ Streptomycin	10,00 mg/100 ml
+ Penicillin-G	6,30 mg/100 ml

Bromphenolblau-Nigrosin

Bromphenolblau	2	g
Nigrosin	10	g
Aqua dest.	100	ml

FITC/PNA (100 µg/ml) + SYTO 17 (0,5 mmol) + PI (2,99 mmol)

Propidiumiodid 10 mg

Aqua dest. Ad 5 ml

SYTO 17 250 µl

DMSO 2250 µl

FITC/PNA 1 mg

H2O 10 ml

3.1.4 Probanden

Blutproben für die Präparation von PMN wurden von 13 16-20 Monate alten, klinisch gesunden schwarzbunten Holstein-Friesian-Kühen aus der Klinik für Wiederkäuer der LMU München gewonnen. Alle Kühe waren nicht tragend und laktierend (4-6 Monate post partum). Insgesamt 12 klinisch gesunde Fleckviehbullen aus zwei bayrischen Besamungsstationen (niederbayrische Besamungsgenossenschaft Landshut-Pocking eG und Zweckverband II für künstliche Besamung der Haustiere, Greifenberg) und der Klinik für Wiederkäuer der LMU München lieferten Ejakulate für die Seminalplasmagewinnung. Die Tiere waren im Alter von 1-5 Jahren und wiesen damit unterschiedliche Zuchterfahrung auf.

3.2 Methoden**3.2.1 Probennahme und Aufbereitung****3.2.1.1 Blutentnahme**

Bovines Blut wurde mit Hilfe des Vacutainersystems unter sterilen Bedingungen aus der Vena coccygea media entnommen. Dabei wurden Vacutainer-Röhrchen mit Natrium-Heparin-Zusatz als Antikoagulanzen verwendet.

3.2.1.2 Isolierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus dem Blut

Nach der Entnahme wurde das Blut entweder sofort weiterverarbeitet oder bei 4°C maximal 1 Stunde aufbewahrt. Für die Gewinnung der PMN wurden jeweils 10 ml Blut 1:2 mit PBS verdünnt und in ein 50 ml Probenröhrchen über 15 ml Biocoll® geschichtet. Bei 10°C und 1300 xg wurde für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Danach konnte man das Serum und die Interphase mit den mononukleären Zellen abnehmen und das Erythrozytensediment mit den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten gewinnen. Die Erythrozyten wurden durch hypotone Lyse entfernt. Dazu wurden 20 ml Aqua dest. zu 10 ml Erythrozytensediment gegeben und 20 sec geschwenkt. Mit 20 ml doppelt konzentrierter PBS wurde die Isotonie wieder hergestellt. Nach Zentrifugation (4°C, 220 xg, 8 min) wurde diese Prozedur nach Entfernung des Überstandes und Resuspension des Pellets wiederholt um noch verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Die so gewonnene Zellfraktion wurde mit 25 ml PBS gewaschen und letztmalig zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in der Bürker-Kammer ausgezählt und auf eine der Fragestellung entsprechende definierte Zelldichte eingestellt ($2-5 \times 10^6$ Zellen/ml).

3.2.1.3 Endometriale Gewebeproben

Organe für die Gewinnung uteriner Epithelzellen stammten von frischtoten Kühen bzw. Färsen vom Schlachthof Fürstenfeldbruck, sowie von zum Zwecke anderer Forschungsarbeiten getöteten schwarzbunten Erstkalbinnen aus der Klinik für Wiederkäuer der LMU München.

Nach möglichst keimarmer Freipräparation der Gebärmutter wurde diese im Bereich der Zervix zur Vermeidung sekundärer Kontaminationen abgebunden, in einem sterilen Thermobehälter sofort ins Labor verbracht und dort innerhalb von maximal 2 Stunden weiterbearbeitet (s. 3.2.5).

3.2.1.4 Gewinnung von Uterussekreten

Für Ex-vivo-Versuche wurden klinikeigene, östrische Versuchstiere (n=4) eine halbe Stunde vor der Schlachtung jeweils mit 2 Pailletten (500 µl) TG-Sperma besamt. Der Genitalapparat wurde direkt nach dem Freilegen von beiden Seiten her abgebunden.

Im Labor wurde die Gebärmutter so in Teile geschnitten, dass der Brunstschleim separat aus der Cervix und den beiden Uterushörnern gewonnen werden konnte. Es erfolgte eine Untersuchung hinsichtlich Schleimanteil, Zellfraktionen, Spermatozoengehalt und sonstigen Beimengungen durch Begutachtung eines Ausstriches unter dem Mikroskop. In einem weiteren Schritt wurden die Uterus-Teilstücke mit PBS durchspült und erhaltene Proben ebenfalls untersucht.

3.2.1.5 Spermatozoenaufbereitung

Mehrere Ejakulate von Bullen der niederbayrischen Besamungsgenossenschaft Landshut-Pocking eG (n=3) wurden in Form von TG-Sperma für die Kokultur-Experimente (Uterusepithelzellen/Spermatozoen) verwendet. Es handelte sich dabei um Ejakulate, die in synthetischem Verdünnermedium (Andromed™) gelagert waren. Die 250- μ l-Pailetten wurden 20 sec bei 37°C aufgetaut. Motilität und Vitalität der Spermatozoen wurden mittels Mikroskopie beurteilt und die Spermapräparationen bis zur weiteren Verwendung im Inkubator (37°C) bereitgehalten.

3.2.1.6 Seminalplasmaaufbereitung

Für die Seminalplasmagewinnung wurden während der morgendlichen Routine an den Besamungsstationen Ejakulate abgegriffen; zudem wurden klinikeigene Bullen abgesamt. Für entsprechende in-vitro-Experimente wurden nur grobsinnlich und labordiagnostisch unauffällige Ejakulate verwendet (s. 3.2.4). Die Proben wurden bei 4°C gelagert und anschließend im Labor verarbeitet. Hierzu wurde bei 3800 xg 10 min bei Raumtemperatur zweimal zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand als Seminalplasma klassifiziert. Bis zur experimentellen Verwendung wurden davon Aliquots bei -20°C eingefroren.

3.2.1.7 Gewinnung und Aufbereitung von Samenblasendrüsensekret

Samenblasendrüsensekret konnte am Versuchstierschlachthof Grub durch Organpräparation von bei der Lebendtieruntersuchung und der Begutachtung post mortem allgemein- und genitalgesunden Bullen der Rassen Fleckvieh, Holstein-Friesian, Braunvieh sowie Gelbvieh gewonnen werden. Die paarigen Drüsen wurden einzeln freipräpariert und äußerlich mit PBS gewaschen. Mit sanftem manuellen

Druck konnte aus den sichtbaren Ausführungsgängen Sekret ausgepresst und in 5 ml Probenröhrchen aufgefangen werden. Von jedem Organ wurden auf diese Weise 100 – 1000 µl Flüssigkeit gewonnen, aliquotiert und bei –20°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.2.1.8 Herstellung von Verdünnungsreihen

Für die Versuchsreihen zur Wirkung unterschiedlicher Volumina von SP und SBS wurden Verdünnungsreihen verschiedener Stufen benötigt. Ausgehend von einem Volumen von 200 µl wurden jeweils für die Anzahl der gewünschten Verdünnungen 100 µl PBS in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Zum Anmischen der Stammlösung wurden SP und SBS jeweils mit RO+ (für die Versuche in der Transmigrationskammer; s. 3.1.3) oder PBS (für Experimente zur ROS-Bestimmung; s. 3.1.3) im Verhältnis 1:3 vorverdünnt. Die Reihe wurde durch wiederholte 1:2 Verdünnung hergestellt.

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung neutrophiler Granulozyten

3.2.2.1 Vitalität

Für die Einschätzung der Zellvitalität wurden die isolierten PMN, mit dem für die intakte Zellmembran impermeablen Farbstoff Propidiumiodid (PI, 6 µmol) gefärbt. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Proben lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Rot fluoreszierende (= PI-positive) Zellen wurden als beschädigt/tot deklariert.

3.2.2.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Zur Bestimmung der ROS-Bildung durch PMN wurde eine für Rind und Schwein (Zerbe et al. 2000) angepasste Methode aus dem humanen System verwendet. Nach Exposition der PMN gegenüber unterschiedlichen Seminalplasmakonzentrationen, variierend von 0,1 – 10 µl wurde die ROS-Bildung vergleichend mit der nach Stimulation mit dem rezeptorunabhängigen ROS-Stimulator PMA bestimmt. Alle Experimente wurden im Doppelansatz durchgeführt. Jeweils 200 µl einer PMN-Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml PBS) wurden in 5 ml Polystyrolröhrchen pipettiert

und für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Danach folgten die Zugabe der Testsubstanzen (SP, SBS) in aufsteigender Verdünnung und gleichzeitig die Stimulation der Granulozyten mittels PMA in einer finalen Konzentration von 10 µmol/l. Die homogene Vermischung der Flüssigkeiten wurde durch kurzes Schwenken der Röhrchen auf dem Minishaker erreicht. Als Negativkontrolle diente eine Zellsuspension ohne PMA-Zugabe, als Positivkontrolle ein Ansatz mit PMA ohne Testsubstanz. Die Aktivierung der Zellen erfolgte bei der nachfolgenden 10minütigen Inkubation. Um die Bildung von ROS nachzuweisen, wurden anschließend pro Ansatz 5 µl DHR zugegeben, das durch die Anwesenheit von Myeloperoxidase in das grünfluoreszierende Rhodamin 123 umgebaut wird. Da dieses Oxidationsprodukt an den Membranen der Zelle haftet und sie nicht verlassen kann, sind Granulozyten mit erhöhtem Sauerstoffmetabolismus aufgrund ihrer Grünfluoreszenz durchflusszytometrisch differenzierbar.

Nach erneutem Rütteln folgte eine weitere Inkubation für 10 min. Die Reaktion wurde durch Abkühlung der Röhrchen in Eiswasser gestoppt. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils 200 µl PBS-PI (6 µmol) zupipettiert, um so zusätzlich eine Differenzierung zwischen vitalen und membrangeschädigten PMN zu ermöglichen.

3.2.2.3 Transmigration

Versuche zum Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten wurden in einer 10-well Transmigrationskammer durchgeführt. Diese setzt sich aus vier Komponenten zusammen: einer Acrylbodenplatte, einer Acryldeckplatte, einer Silikondichtungsmatte und 6 Schraubenmuttern. In die Bodenplatte sind 10 Rundboden-Vertiefungen mit einem Volumen von 415 µl eingelassen. Sie korrespondieren mit den durchgehenden Bohrungen der Deckplatte. Beim Zusammenbau werden die Kompartimente der Boden- und der Deckplatte durch eine zwischengelegte Polycarbonatmembran getrennt, die somit den Boden für die Vertiefungen der Deckplatte bildet. Die entsprechend den Bohrungen der Acrylplatten mit Löchern ausgestattete Silikonmatte wird zwischen beiden Platten platziert und dient der Abdichtung. In der Bodenplatte sind sechs Gewindestangen verankert, die beim Zusammenlegen durch entsprechende Einsparungen der Silikonmatte und der Deckplatte führen. Mit Hilfe der Schraubenmuttern werden die

beiden Acrylplatten mäßig fest aneinander gepresst. Angelockt von einer chemoattraktiven Substanz müssen Zellen aus der oberen Kammer die Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von $3\mu\text{m}$ aktiv durchwandern, um sich in der unteren Kammer anzusammeln. In der vorliegenden Arbeit wurden die unteren Wells jeweils mit $300\ \mu\text{l}$ Testsubstanz gefüllt und mit $120\ \mu\text{l}$ Percoll unterschichtet bis sich ein Flüssigkeitsmeniskus bildete, um zu gewährleisten, dass die Membran vollständig mit Probenflüssigkeit benetzt war. Die Percollschicht diente dazu, eine Adhäsion von Zellen an die Wand der Kammer zu verhindern. Das obere Kompartiment wurde mit $200\ \mu\text{l}$ einer PMN-Zellsuspension (5×10^6 PMN/ml) beschickt. Die Kammer wurde für 2 Stunden in einer Feuchtkammer bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der oberen Kammer entleert und verworfen, während exakt $390\ \mu\text{l}$ der Flüssigkeit aus der unteren Kammer in vorgekühlte und mit $110\ \mu\text{l}$ RO+-Medium befüllte TruCount Tubes überführt wurde (gesamtes Probenvolumen = $500\ \mu\text{l}$). Zur Quantifizierung migrierter PMN wurden die Proben mittels der in 4.1.2 beschriebenen Methode durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.3 Interleukin-8 ELISA

Für die Ermittlung der Interleukin-8 Konzentration der Überstände aus Koinkubationen uteriner Epithelzellen mit unterschiedlichen Substanzen wurde ein ELISA-Kit aus der Humanmedizin verwendet, der Literaturangaben zufolge bovines IL-8 erkennt (SHUSTER et al. 1997; BOUDJELLAB et al. 2000). Es handelt sich um einen quantitativen Sandwich-ELISA mit einer Intraassayvarianz von $4,4\%$ und einer Interassayvarianz von $8,1\%$. Die untere Nachweisgrenze liegt im Mittel bei $3,5\ \text{pg/ml}$ ($0\text{-Standard} + 2\ \text{SD}$). Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers angewandt.

3.2.4 Spermatozoencharakterisierung

3.2.4.1 Grobsinnliche Beurteilung

Die makroskopische Ejakulatuntersuchung umfasste die Messung des Volumens, sowie die Beurteilung von Farbe, Konsistenz, Beimengungen und Geruch.

3.2.4.2 Motilität

Die Untersuchung des Spermias erfolgte mikroskopisch nach klinikeigenem Protokoll. Bei 400facher Vergrößerung, Phasenkontrast und einer Tischtemperatur von 37°C wurde die Einzelbewegung der Spermatozoen geschätzt. Dazu wurde ein Tropfen auf einen vorgewärmten Objektträger verbracht und mit einem Deckglas versehen. Das in den beschriebenen Versuchen verwendete Sperma wies jeweils eine Motilität von 60 - 70% auf.

3.2.4.3 Vitalität

Zur Bestimmung der Spermatozoenvitalität wurde eine Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin durchgeführt. Hierzu wurde ein Tropfen Sperma mit der gleichen Menge Farbstoff mit einem Deckglas auf einem Objektträger vermischt, ein Ausstrich angefertigt und getrocknet. Bei 1000facher Vergrößerung in Immersionsöl war eine Lebend/Tot-Beurteilung der Spermatozoen aufgrund der Blaufärbung membrangeschädigter Zellen möglich. Mittels der Türck-Kammer wurden 300 Spermatozoen (Vorverdünnung 1:100) ausgezählt und der Anteil der Toten in Prozent ausgedrückt.

3.2.4.4 FITC-PNA/SYTO 17/PI-Färbung zur Beurteilung von Vitalität und akrosomalem Status von Spermatozoen nach Inkubation mit Kokulturüberständen

Jeweils 6 Pailletten eines Bullen (n=2) wurden für den Versuch aufgetaut und gepoolt. Pro Ansatz wurde eine Spermatozoenmenge von $2,5 \times 10^6$ gewählt und dafür aus der 15×10^6 Spermatozoen/Palette gezählten Konzentration 33 μ l in die Kulturüberstandsproben sowie in Nullwertproben, die nur mit Zellkulturmedium gefüllt waren, von je 400 μ l einpipettiert. Nach 30 min bzw. 3 h Inkubation bei 37° C wurden die Ansätze mit 5 μ l FITC-PNA (100 μ g/ml) und 3 μ l SYTO 17 (0.5 mmol) beschickt, weitere 10 min inkubiert und abschließend für 5 min außerdem mit 3 μ l PI-Lösung (2,99 mmol) gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Zählung von 10000 Spermatozoen im Durchflusszytometer.

3.2.5 Zellkulturarbeiten

3.2.5.1 Gewinnung und Präparation primärer boviner Uterusepithelzellen (pbUEZ)

Für die Präparation von pbUEZ wurden die Organe innerhalb von 2 h nach Schlachtung im Labor bearbeitet (s. 3.2.1.3). Alle dabei verwendeten Medien wurden im Vorfeld auf 37°C erwärmt. Nach Beurteilung des Zyklusstandes wurde das zum Gelbkörper bzw. Follikel ipsilaterale Horn ausgewählt, von angrenzendem Gewebe freipräpariert und mit PBS und Alkohol gewaschen. Dann wurde das Organ mit Küchenkrepp abgetrocknet und die Hornspitze zur Entnahme einer Tupferprobe für die bakteriologische Untersuchung großzügig abgeschnitten. Mit 20 ml Spritzen wurde das Gebärmutterhorn von der Spitze aus viermal mit PBS durchgespült. Anschließend wurde ein Polyvinylkatheter eingeführt um das Horn nach Ligatur der Spitze zum Anlösen der Epithelzellen mit 0,76%iger EDTA-Lösung zu befüllen. Es folgte eine Inkubation über eine Stunde bei 37°C in PBS. Die nach Bebrütung im Lumen verbliebene Flüssigkeit wurde dann vorsichtig ausmassiert, das Horn mittels einer Schere eröffnet und mit sterilen Injektionskanülen auf einer festen sterilen Unterlage fixiert. Ein Metallspatel diente dazu, die oberflächliche Schicht des Endometriums vorsichtig abzuschaben und in ein 50 ml Probenröhrchen mit DMEM + 10% FKS zu verbringen. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 150 xg 8 min dreimalig mit DMEM + Antibiotikazusatz (1% Penicillin/Streptomycin) gewaschen, resuspendiert und die Zelldichte nach Aufnahme in 2 ml DMEM + 10% FKS in der Bürker-Zählkammer ausgezählt.

3.2.5.2 Kultur der pbUEZ

Kulturbedingungen

Zur Anzucht der pbUEZ wurden diese in 24-well Zellkulturplatten respektive Zellkulturflaschen kultiviert. Diese waren vorher mit Matrigel (200 µl/cm², 1:8 verdünnt) beschichtet worden. Die Zellsuspension wurde auf 1 x 10⁶ Zellen/ml DMEM + 10% FKS eingestellt und pro Well 800 µl, pro Kulturflasche 10 ml ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Medienwechsel fanden alle 48 h statt. Konfluenz und Zellmonolayer wurden jeweils zwischen Tag 8 und 10 erreicht.

Trypsinisierung kultivierter pbUEZ

Nach Erreichen eines konfluierenden Zellmonolayers wurde zweimalig mit PBS gewaschen, um serumhaltiges Medium zu entfernen. Die Epithelzellen wurden zum Ablösen aus den Zellkulturwells bzw. -flaschen mit 0,25%iger Trypsinlösung (100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, verdünnt in 1 mmol EDTA) bei 37°C je nach Reaktionsgeschwindigkeit für 2 - 10 min inkubiert, Um die Reaktion zu stoppen, mussten pro Ansatz jeweils 200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ DMEM + 10% FKS zugegeben werden. Der gesamte Inhalt der Wells wurde in Probenröhrchen überführt. Es erfolgte dann eine erneute Spülung mit PBS. Bei schlechtem Ablöseverhalten der Zellen wurde der Trypsinierungsschritt mehrmals wiederholt und/oder die Platte bzw. die Kulturflasche sanft gegen die Tischkante geklopft. Die Zellsuspension wurde schließlich bei 170 xg für 4 min zentrifugiert, das gewonnene Zellpellet in 1 ml DMEM + 10% FKS aufgenommen und dessen Dichte in einer Bürker-Zählkammer bestimmt.

Kryokonservierung und Reseed von pbUEZ

Trypsinisierte pbUEZ wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml für die Kryokonservierung in BamBanker-Medium suspendiert und in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

Der Auftauvorgang erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad. Durch Zugabe von 1 ml DMEM und Zentrifugation bei 150 xg über 8 min wurde das Kryomedium entfernt. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen in 10% FKS-haltigem Kulturmedium aufgenommen, mit Hilfe der Bürker-Zählkammer ausgezählt, in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in 24-well-Kulturplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Ein erster Medienwechsel erfolgte nach 36 h, die folgenden alle 24 h. Die Kultur erreichte zwischen Tag 4 bis 6 Konfluenz.

3.2.5.3 pbUEZ-Vitalitätsbeurteilung mittels Trypanblau-Färbung

Eine intakte Zellmembran ist für den Farbstoff Trypanblau impermeabel.

Nach Herstellung einer Zellsuspension ($\approx 1 \times 10^6$ pbUEZ/ml) mittels Trypsinisierung oder Zentrifugation bzw. Resuspension und Vorbereitung einer Bürker-Zählkammer wurde jeweils 1 Tropfen Zellsuspension mit 1 Tropfen Trypanblau (0,4%ig) vermischt und die Zählkammer beschickt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte sofort im Anschluss, da Trypanblau bei längerer Einwirkung (> 2 min) zytotoxisch wirkt. Durch

Auszählen der Gesamtzellzahl sowie der angefärbten Zellen konnte der Prozentanteil vitaler pbUEZ berechnet werden.

3.2.5.4 Kokulturrexperimente unter Beteiligung der pbUEZ

Bei Erreichen von mindestens 90% Zellkonfluenz wurden die pbUEZ bis zu 24 h mit unterschiedlichen Medien, Inseminatbestandteilen, Stimulantien und verschiedenen PMN-Präparationen koinkubiert (1×10^6 pbUEZ/ml Medium). Zur Probengewinnung für Transmigrationsversuche wurden die Zellen zunächst viermal mit PBS gewaschen, um für die spätere Analyse der Kokulturüberstände im Durchflusszytometer störendes FKS zu eliminieren. Experimente zur Gewinnung von Kulturüberständen für den IL-8-ELISA wurden in Anwesenheit von FKS durchgeführt. Die genauen Kokulturzusammensetzungen und Inkubationszeiten sind in Kapitel 4.4.2 aufgeführt.

3.2.6 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist die apparative Basis für eine zuverlässige und schnelle Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Bei dieser Methode werden Einzelzellen in einem Probenführungssystem durch den Strahlengang eines Argon-Ionen-Lasers (Wellenlänge 488 nm) geschickt. Gestreutes Licht wird in Richtung des Strahls als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder im 90°-Winkel dazu, als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), erfasst. Durch die Vorwärtsstreuung werden die Größe des Partikels und dessen Refraktionsindex, durch die Seitwärtsstreuung die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) charakterisiert. Die Signale werden von Detektoren aufgefangen und an den angeschlossenen Computer weitergeleitet. Mit Hilfe dieses Computers werden die Geräteeinstellungen kontrolliert, Messereignisse erfasst und gespeichert. Partikel, die eine hohe Eigenfluoreszenz aufweisen oder mit Fluorochromen markiert worden sind, werden von weiteren Detektoren mit hoher Sensitivität für bestimmte Wellenlängenbereiche erfasst. Hierbei werden die fluoreszierenden Substanzen durch den Laserstrahl angeregt und emittieren dann Lichtquanten mit für das Fluorochrom charakteristischer Wellenlänge. Das verwendete Durchflusszytometer erlaubt die Erfassung von Grün- (FL1, Wellenlänge 515 – 545 nm), von Orange- (FL2,

Wellenlänge 564 – 606 nm) und von Rotfluoreszenzintensitäten (FL3, > 650 nm). Jede Zelle oder jeder Partikel wird folglich durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3) charakterisiert und als ein Messereignis festgehalten. Mittels der Analysesoftware „CellQuest“ (Fa. BD, Heidelberg) erfolgt die computergestützte Auswertung der Daten. Die Ergebnisse werden entweder als korrelierte Punktediagramme („Dotplot“) oder als Histogramme dargestellt. Da die Messwerte einzelner Parameter stark von den Detektoreinstellungen abhängen, wurden nur solche Messungen miteinander verglichen, die mit identischen Geräteeinstellungen erfasst wurden. Zur Definition einzelner Untergruppen der Messereignisse („Events“) wurden nach der Messung softwaregestützt elektronische Fenster (sog. „Gates“) gesetzt und zum Teil mehrere Fenster logisch miteinander verknüpft.

3.2.7 Bakteriologische Untersuchungen

Aus jedem für die Zellkultur verwendeten Uterus wurde eine Tupferprobe entnommen und eine bakteriologische Untersuchung eingeleitet. Dazu wurde wie in 3.2.5.1 beschrieben die Probe entnommen und im BU-Labor auf drei unterschiedlichen Nährböden ausgestrichen (Columbia-Schafblut-Agar, Gassner-Agar, Edwards-Agar). Nach 24-stündiger Bebrütung (37°C) wurde das Ergebnis abgelesen und protokolliert. Nur pbUEZ aus bakteriologisch negativ geprüften Uteri wurden in die nachfolgenden Kokultorexperimente einbezogen.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von Excel (MS, www.microsoft.com) und SPSS (version 15, www.spss.com) vorgenommen. Für die Herausarbeitung von Unterschieden wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test angewandt, wobei Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant galten. Für die Darstellung der verschiedenen Prozentanteile der relevanten Parameter wurden 95% Konfidenzintervalle gebildet. Mittels linearer Regression wurden die Werte für 50% Migrationsraten ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Vorarbeiten

4.1.1 Etablierung der primären bovinen uterinen Epithelzellkultur

Für den Einsatz der primären bovinen Uterusepithelzellen (pbUEZ) in den Versuchen der vorliegenden Arbeit war es notwendig eine möglichst gute Reproduzierbarkeit der Kulturansätze im Hinblick auf Reinheit, Vitalität und Wachstumsverhalten der Zellen zu erreichen. Deshalb wurden zur Zellgewinnung frisch tote Schlachtorgane allgemein- und genitalgesunder Tiere, unabhängig von Zyklusstand, Alter und Rasse verwendet.

4.1.1.1 Optimierung der Zellkulturbedingungen

Die Gewinnung der pbUEZ erfolgte grundsätzlich nach dem Präparationsprotokoll von ROTTMAYER (2006, persönliche Mitteilung). Je Uterushorn wurden zwischen $18 \pm 5,9$ und $77 \pm 11,6 \times 10^6$ (MW \pm SD) pbUEZ pro ml Präparationsmedium gewonnen (Tab.1). Dabei wurden tendenziell bei östrischen Tieren geringere Ausbeuten erzielt als bei diöstrischen.

Tabelle 1: pbUEZ-Gewinnung in verschiedenen Sexualzyklusstadien

Zyklusstadium	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Diöstrus
präparierte Uterushörner (n)	4	10	3	19
pbUEZ x 10^6 /ml (MW \pm SD)	$77 \pm 11,6$	$33 \pm 20,3$	$18 \pm 5,9$	$57 \pm 31,6$

Ausgewertet wurden insgesamt 36 präparierte Uterushörner; der Zyklusstand wurde nach makroskopischer Befundung des Funktionszustandes der Eierstöcke definiert. Abkürzungen: MW, Mittelwert; SD, standard deviation (Standardabweichung).

Mit einer Aussaatmenge von $0,8 \times 10^6$ pbUEZ/Well konnte ein kontinuierliches, gleichmäßiges Wachstum erzielt werden. Dabei hafteten in den ersten 1 bis 2 Inkubationstagen Einzelzellen und wenige Zellen zählende Konglomerate (Abb.1) am Zellkulturplattenboden. Mit zunehmender Inkubationsdauer wuchsen diese „Zellnester“ in konzentrischer Richtung (Abb.2) zu einem dichten Zellrasen und

bildeten nach 8-10 Tagen einen Monolayer (Abb.3). Die pbUEZ wurden dann entweder trypsinisiert und für spätere Versuche eingefroren oder sofort in Kokulturrexperimenten eingesetzt. Bis auf die initiale Waschprozedur der Zellen (s. 3.2.5.1) wurde auf eine antibiotische Supplementierung im Zellkulturmedium verzichtet. Diese Vorgehensweise bot den Vorteil, eine mögliche Beeinflussung der Experimente und Resistenzentwicklung gegenüber eingesetzter Antibiotika zu vermeiden. Mit der Verwendung von jeweils zum Wechselzeitpunkt frisch hergestelltem Medium konnte das Keimverschleppungsrisiko eingeschränkt und somit die Kulturbedingungen weiter verbessert werden. Ebenso wurde mit PBS als Waschmedium verfahren.

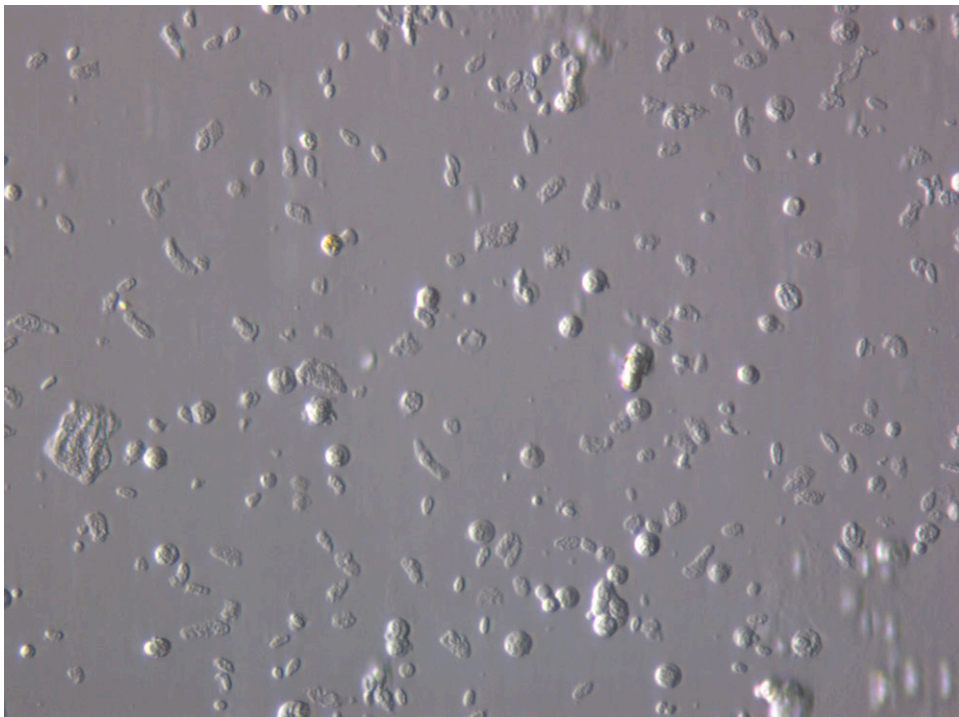


Abbildung 1: pbUEZ nach der Aussaat im Well einer Zellkulturplatte (Kulturtag 1): Die Zellen liegen einzeln oder in Konglomeraten vor.

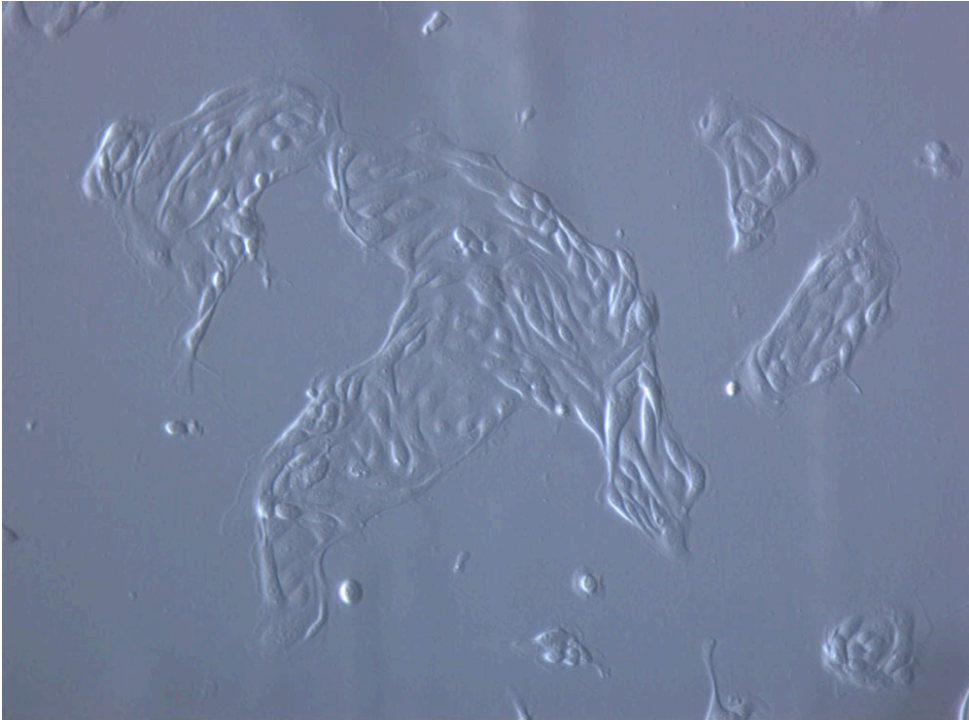


Abbildung 2: Zwei bis drei Tage kultivierte pbUEZ: Das Zellwachstum resultiert in einer konzentrischen Ausbreitung.

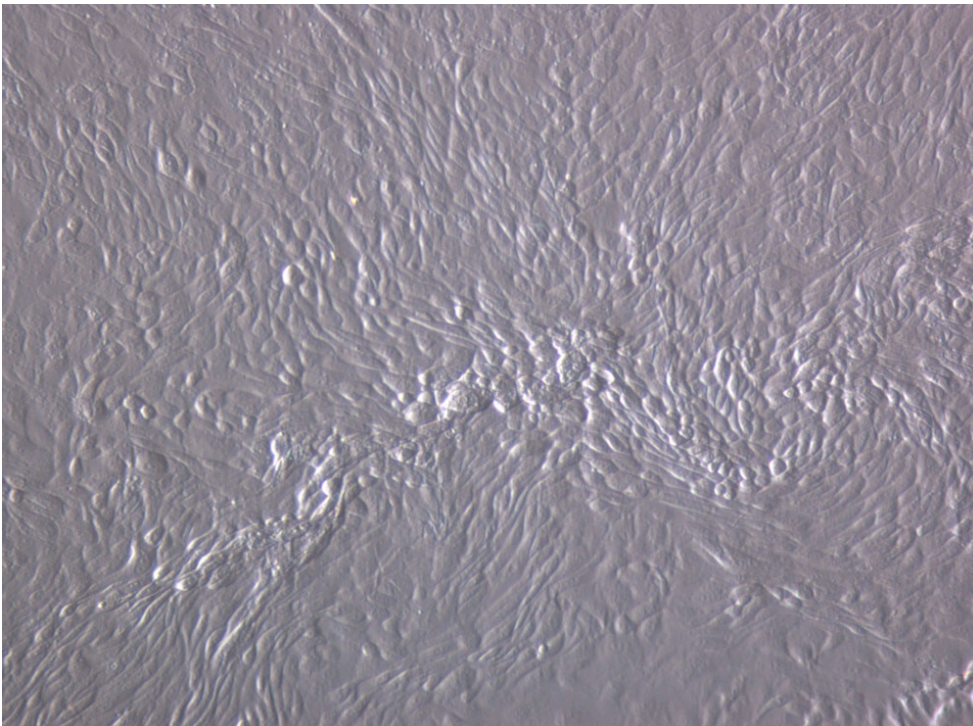


Abbildung 3: Konfluenten Monolayer von pbUEZ (Kulturtag 8).

4.1.1.2 Qualitätsprüfung der pbUEZ-Kultur

Für die Weiternutzung der einzelnen pbUEZ-Chargen war die Bewertung der Kulturqualität nach laboreigenen morphologischen Gütekriterien entscheidend. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Kultur bei Aussaat, sowie vor und nach jedem Medienwechsel begutachtet. Die Ergebnisse bezüglich Zellwachstum und –aussehen wurden sowohl schriftlich als auch fotodokumentarisch protokolliert. Als Qualitätskriterien für in Kokulturversuchen einsetzbare Zellen wurde festgelegt, dass eine rund-ovale Zellkonformität ohne Vakuolenbildung und ohne Zellauflagerungen sowie kontinuierliches Wachstum innerhalb von 8-10 Tagen zu 90%iger Konfluenz vorhanden sein muss. Auf eine gesonderte Vitalitätsfärbung (z.B. mit Trypanblau) wurde nach anfänglichen exemplarischen Versuchen verzichtet, da diese zeigten, dass nur lebende pbUEZ zur Vermehrung in der Lage sind.

4.1.1.3 Konservierung von pbUEZ für spätere Versuche

MURAKAMI et al. (2003) zeigten die prinzipielle Eignung von tiefgefrorenen primären bovinen Uterusepithelzellen (TG-pbUEZ) für Zellkulturexperimente. Unterschiede im Wachstumstempo bis zum Erreichen des Monolayers (Tag 4-6 bei Verwendung von TG-pbUEZ gegenüber Tag 8-10 bei frischen pbUEZ) lassen eine gewisse Selektion vitaler Zellen durch den Einfriervorgang vermuten. Die Verwendung von TG-pbUEZ gewährleistete eine weitgehende labortechnische Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit geeigneter Frischpräparate. Der mögliche Einsatz von Zellmaterial einer Präparation über einen längeren Versuchszeitraum verringerte zudem präparationsbedingte Testvariationen. Für die Kryokonservierung mussten die Zellen jedoch einmalig Konfluenz erreicht haben. Nachdem die frischen pbUEZ zu einem Monolayer herangewachsen waren, wurden sie in 4 Trypsinisierungsschritten aus den Kulturgefäßen gelöst, gewaschen und in einer Dichte von jeweils 1×10^6 pbUEZ/ml in BamBanker-Medium eingefroren. Dieses Medium wurde nach dem Auftauvorgang herausgewaschen, die Zellen in Kulturmedium DMEM mit 10% FKS-Anreicherung (s. 3.1.2) aufgenommen, ausgezählt und in einem Zehntel der Aussaatmenge, verglichen mit der frischen Zellpräparation, ausgesät. Bis zum Erreichen von mindestens 90% Zellkonfluenz dauerte es im Schnitt 4-6 Tage. Mit frisch präparierten und anschließend sofort tiefgefrorenen Zellen ließ sich bislang

kein erfolgreiches Reseeding durchführen. In Tab.2 ist dargestellt, welches Schema angewandt wurde, um die pbUEZ für nachfolgende Experimente zu standardisieren.

Tabelle 2: Schema zur Standardisierung der Kryokonservierung

Kulturtage insgesamt	Trypsinierungs-schritte	Aussaatmenge bei Reseed (x 10 ⁶ /Well)	Kulturtage bis zum Erreichen von Konfluenz
12-15	4	0,08	4-6

Es wurden Präparationen aus östrischen (n=2) sowie diöstrischen (n=2) Schlachtorganen ausgewertet.

4.1.2 Definition interner Standards zur Quantifizierung der chemotaktischen Aktivität polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN)

Zur Etablierung eines zuverlässigen Versuchssystems war sicherzustellen, dass Experimente mit unterschiedlichen PMN-Präparationen reproduzierbare und plausible Ergebnisse liefern. Deshalb wurde ein interner Standard definiert. Für die Auswertung am Durchflusszytometer wurden als Probenröhrchen TruCOUNT Tubes (s. 3.1.1) verwendet. Diese Einmalröhrchen enthalten ein gefriergetrocknetes Pellet fluoreszierender Beads, das unter einem Metallgitter am Röhrchenboden liegt. Pro Charge enthalten die Röhrchen jeweils die gleiche Anzahl Beads. Diese Beads sind durchflusszytometrisch von PMN unterscheidbar (Abb.4A) und dienen als Referenzwert für die Quantifizierung der Zellen in der Probenflüssigkeit. Die Anzahl an PMN, die bei einer Zählrate von 6.000 Beads in der Positivkontrolle (IL-8, 100 ng/ml) in der Transmigrationskammer wanderten, diente als 100%-Wert für die Migrationsrate. Alle PMN-Präparationen, unbeschadet unterschiedlich hoher PMN-Konzentrationen, waren prinzipiell für den Einsatz im Transmigrationssystem geeignet. Jedoch wanderten in der oben genannten Positivkontrolle, die bei jedem Versuch in jeder Transmigrationskammer mitgeführt wurde, präparationsabhängig jeweils unterschiedlich viele PMN (Abb.4B).

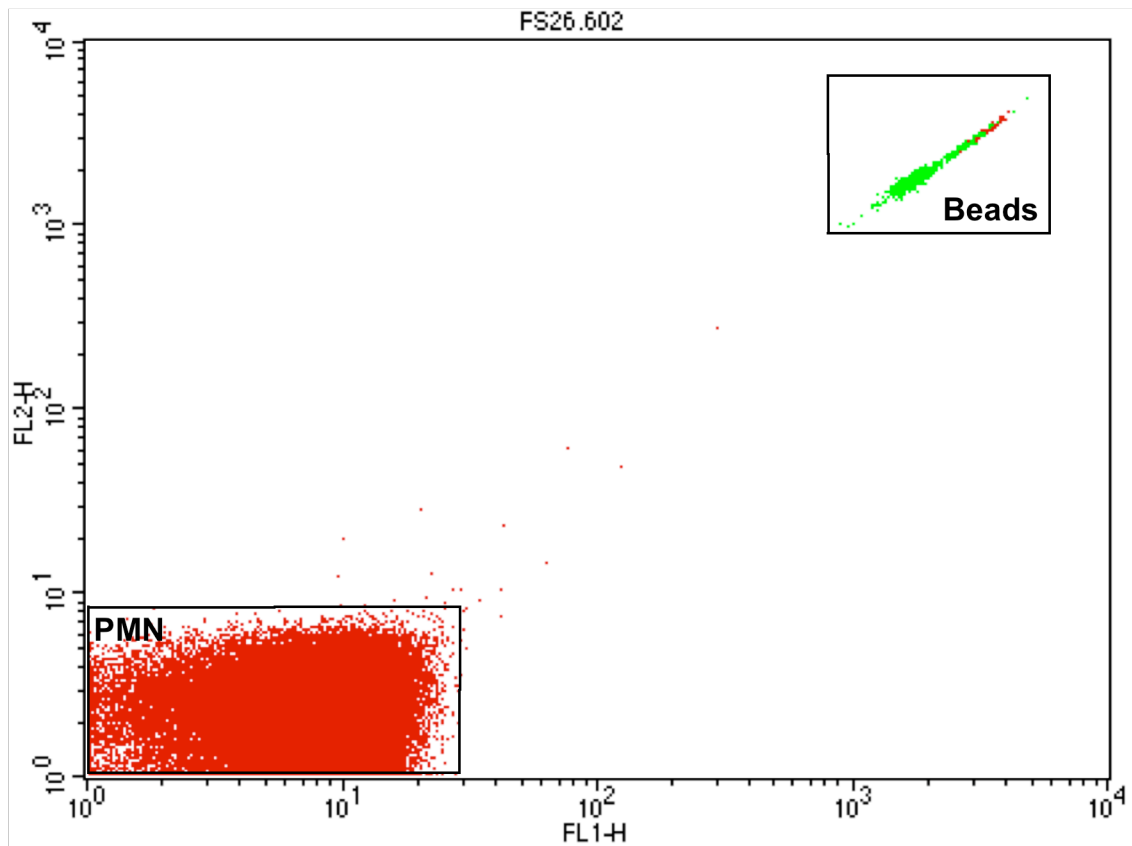


Abbildung 4A: Charakteristische durchflusszytometrische Zweiparameterdarstellung von PMN und Referenz-Beads

Die Abbildung zeigt ein Punktediagramm („Dot Plot“) nach Erfassung von 6.000 Beads im Durchflusszytometer. Dargestellt sind zum einen die gemessenen Referenzereignisse (Beads), die eine deutliche Grün(FL1)-Orangene(FL2)-Fluoreszenz (s. 3.2.6) aufweisen, und zum anderen die fluoreszenz-negative PMN-Population, deren Zellzahl in der Probe bestimmt werden soll.

Abkürzungen: PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten.

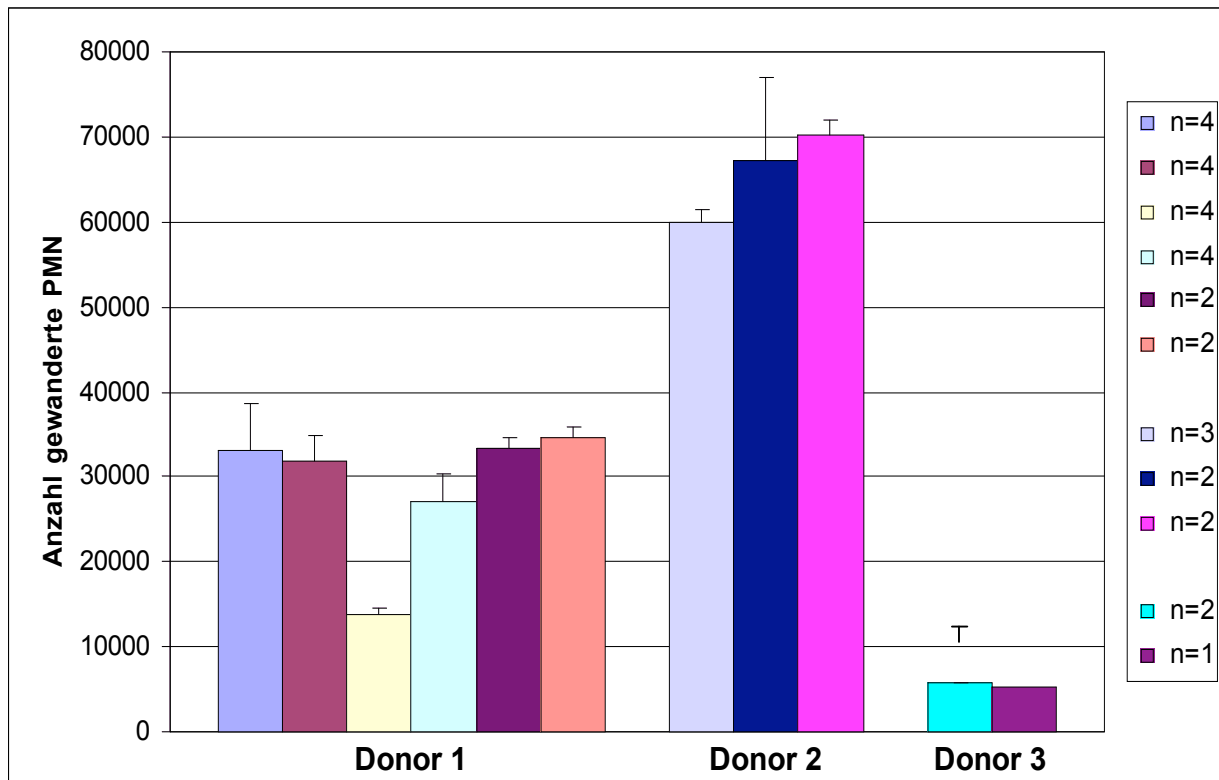


Abbildung 4B: Migrationsraten von PMN verschiedener Spendertiere in der Positivkontrolle (IL-8)

Dargestellt sind Absolutzahlen gewandelter PMN (Migration nach Anlockung mit IL-8, 100 ng/ml) \pm SD bei 11 unterschiedlichen PMN-Präparationen von 3 Blutdonoren. Diese wurden jeweils unterschiedlich oft pro Versuchstag (n-Zahlen) im Transmigrationsversuch eingesetzt. Abkürzungen: IL-8, Interleukin-8; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SD, standard deviation (Standardabweichung).

Für möglichst homogene Resultate wurde deshalb für jeden Versuchstag eine PMN-Präparation von nur einer Spenderkuh hergestellt. Zur Evaluation der Interassayvarianz wurde ein Transmigrationsversuch mit Samenblasendrüsensekret (SBS) eines Bullen parallel in 4 Kammern mit einer Charge PMN durchgeführt. Für die unterschiedlichen SBS-Konzentrationen wurden 95% Konfidenzintervalle (KI) der Migrationsraten gebildet. Mittels linearer Regression wurde der Wert für die eingesetzten SBS-Volumen ermittelt, bei dem 50% der auf die Positivkontrolle IL-8 (100 ng/ml) gewanderten PMN gezählt wurden. Diese betrug 0,14 μ l SBS (95% KI: 0,12 – 0,16 μ l). Damit lag die Abweichung vom Mittelwert hier bei 14% (Abb.4C).

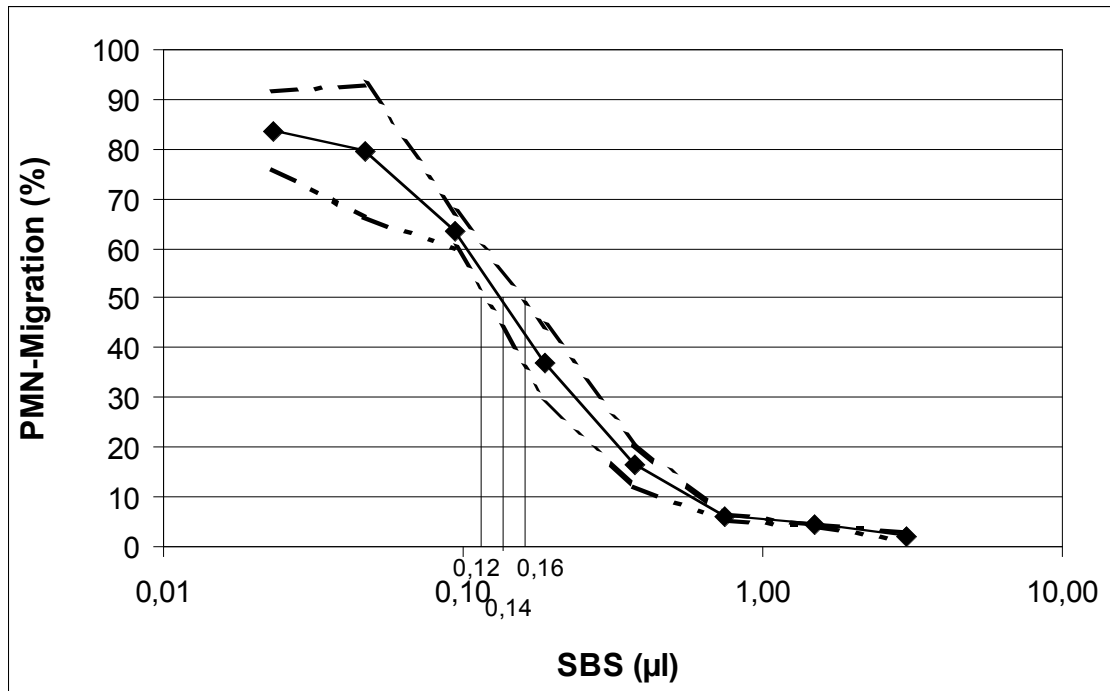


Abbildung 4C: Bestimmung der Interassayvarianz im Transmigrationsversuch

Dargestellt ist das 95% Konfidenzintervall der prozentualen PMN-Wanderung in der Transmigrationskammer in Abhängigkeit von der Zugabe von SBS (0,023 – 3,000 µl, s. 3.2.1.8). 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml).

Abkürzungen: PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SBS, Samenblasendrüsensekret.

4.2 Wiederfindung inseminierter Spermatozoen in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitale

Im ex-vivo-Versuch sollte der Verbleib von Spermatozoen nach KB von TG-Sperma bei 4 Kühen untersucht werden (s. 3.2.1.4). Dabei stand primär die Spermatozoenlokalisierung 30-60 min nach intrauteriner Insemination von TG-Sperma (20×10^6 Spermatozoen in Eidotter-Verdünner) im Vordergrund. Mittels mikroskopischer Betrachtung der Sekretproben konnten neben Erythrozyten und Epithelzellen sowohl in der Zervix als auch in beiden Uterushörnern Spermatozoen gefunden werden (Tab.3). Vor allem im Zervikalschleim fanden sich relativ viele Spermatozoen; geringere Mengen konnten aber auch im Schleim der beiden Uterushörner lokalisiert werden. Besonders auffallend war, dass ausschließlich in der ausmassierten Probenfraktion mit ausgeprägtem Schleimanteil Spermatozoen angetroffen wurden. In keiner der mit PBS durchgeführten nachfolgenden Spülungen konnten Spermatozoen gefunden werden, ebensowenig nach einstündiger Inkubation der Teilstücke mit 0,76%iger EDTA-Lösung. Durch die Lokalisation im

Schleim entzogen sich die Spermatozoen auch einer genaueren Quantifizierung mittels durchflusszytometrischer Methoden.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Genitalsekret 60 min nach KB

Lokalisation:	pbUEZ	Spermatozoen	Schleim
Zervix	+--	++-	+++
Zervix nach Spülung mit PBS	++-	-	+--
Uterushorn kontralateral	-	++-	+++
Uterushorn kontralateral nach Spülung mit PBS	+--	-	-
Uterushorn ipsilateral	++-	++-	+++
Uterushorn ipsilateral nach Spülung mit PBS	+--	-	-
Cervix und Uterushörner nach EDTA-Inkubation	+++	-	+--

Mikroskopisch beurteilt und ausgewertet wurden jeweils zwei Objektträgerausstriche jedes Gebärmutterabschnittes; die Proben waren 60 min nach KB (n=4) gewonnen worden.
Symbole: - = nicht nachweisbar; +-- = wenig; ++- = mäßig viel; +++ = viel;

4.3 Einfluss von Seminalplasma (SP) und Samenblasendrüsensekret (SBS) auf die Funktionalität von bovinen PMN

Für eine repräsentative Aussage über die Wirkung von SP und SBS auf die funktionelle Kapazität boviner PMN wurden unterschiedliche relevante Zellparameter analysiert. Hierfür standen bereits etablierte durchflusszytometrische Verfahren zur Verfügung. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob SP und SBS das Verhalten

von PMN direkt beeinflussen können oder ob Effekte indirekt durch Kontakt mit uterinen Epithelzellen (s. 4.4.2.1) moduliert werden.

4.3.1 PMN-Vitalität

Die Anfärbung der Granulozyten mit Propidiumiodid (s. 3.2.2.1) lässt eine Differenzierung in vitale, nicht fluoreszierende sowie membrangeschädigte Zellen zu, in die der Farbstoff eindringen und sich an die DNA anlagern kann. Der Anteil dieser permeablen PMN wird im Durchflusszytometer als Rotfluoreszenz (FL3, s. 3.2.6) gemessen. Die Zugabe von SP (n=10) in einer Menge von 0,012 – 0,188 µl zu PMN-Zellsuspensionen (4×10^5 PMN in 200 µl PBS) zeigte keinen Einfluss auf die Vitalität von PMN. Die Anzahl der Zellen, die durchflusszytometrisch als rotfluoreszierend, also membrangeschädigt gezählt wurden, blieb konstant niedrig ($4,2 \pm 1,4\%$). Erst ab einer Zugabe von SP in Höhe von 0,375 – 6,000 µl war die Zahl rot-fluoreszierender und damit zellmembrangeschädigter Zellen signifikant erhöht (Abb.5).

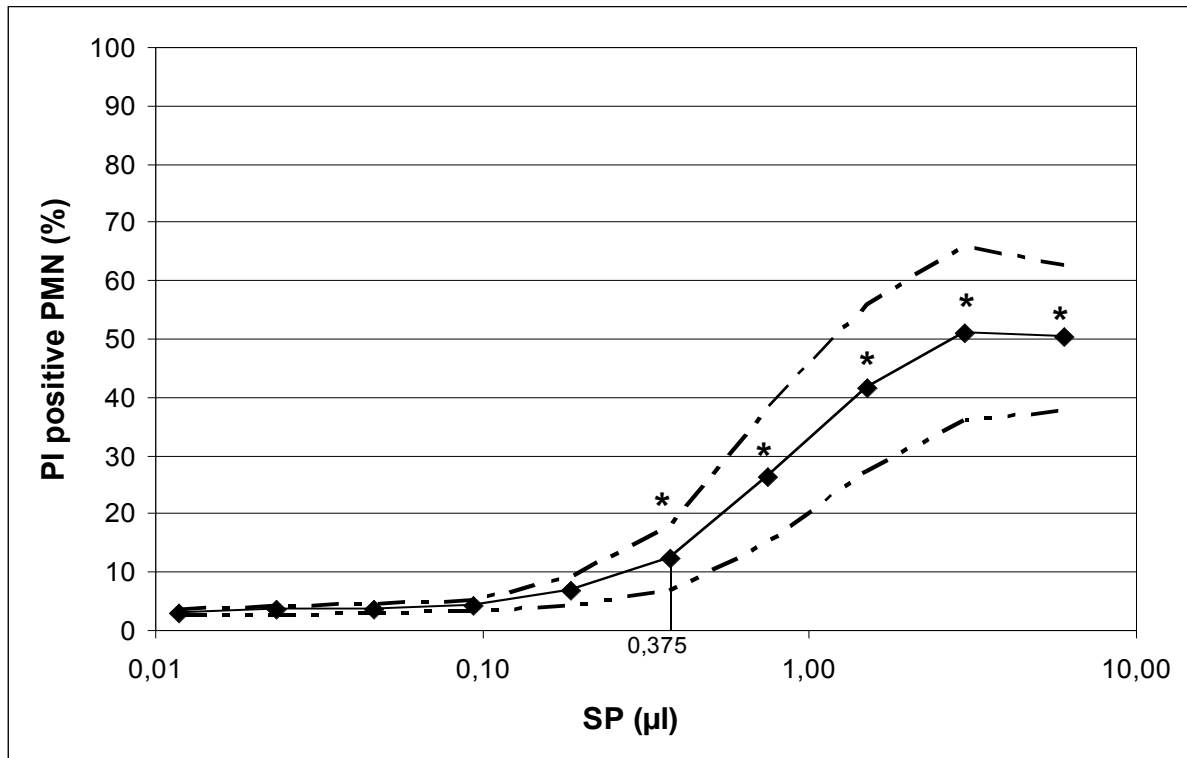


Abbildung 5: Einfluss von SP auf die Vitalität von PMN

Dargestellt ist das 95% Konfidenzintervall des prozentualen Anteils PI-positiver und damit membrangeschädigter PMN nach Zugabe von SP-Präparationen (n=10) in 10 unterschiedlichen Konzentrationen (0,012 – 6,000µl, s. 3.2.1.8). 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml). * = statistisch signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle ohne SP; p<0,05. Abkürzungen: PI, Propidiumiodid; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

4.3.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch PMN

PMN setzen zur Abtötung phagozytierter Mikroorganismen reaktive Sauerstoffspezies frei. Die Stimulation der Effektorzellen (PMN) mit einem Phorbol ester (PMA, s. 3.1.2) regt diesen Abwehrmechanismus ebenso an. Der intrazelluläre Gehalt an Wasserstoffperoxid als Maß für die ROS-Bildung kann mittels einer Myeloperoxidase-abhängigen Oxidation von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 (grünfluoreszent) durchflusszytometrisch erfasst werden. In diesem Versuch wurde der Einfluss von SP und SBS auf eine durch PMA stimulierte ROS-Produktion untersucht. Bereits eine Zugabe von SP (n=10) bzw. SBS (n=4) jeweils in einer Menge von 0,012 µl pro 200 µl Zellsuspension (4×10^5 PMN) bewirkte einen signifikanten Rückgang der Oxidation von Dihydrorhodamin 123, der sich in einer verminderten Grünfluoreszenz zeigt. Die 10 untersuchten Verdünnungsstufen (0,012 – 6,000 µl) reduzierten die ROS-Produktion der PMN um etwa 30 - 90%. Jede SP-Konzentration lieferte einen signifikant unterschiedlichen Wert zur Positivkontrolle

(mit PMA stimulierte PMN – kein Zusatz von SP oder SBS) (Abb.6). Eine Zugabe von Samenblasendrüsensekret (SBS) in denselben Verdünnungsstufen wie SP wirkte ebenso effektiv hemmend auf die ROS-Produktion durch PMA-stimulierte PMN (Daten nicht gezeigt).

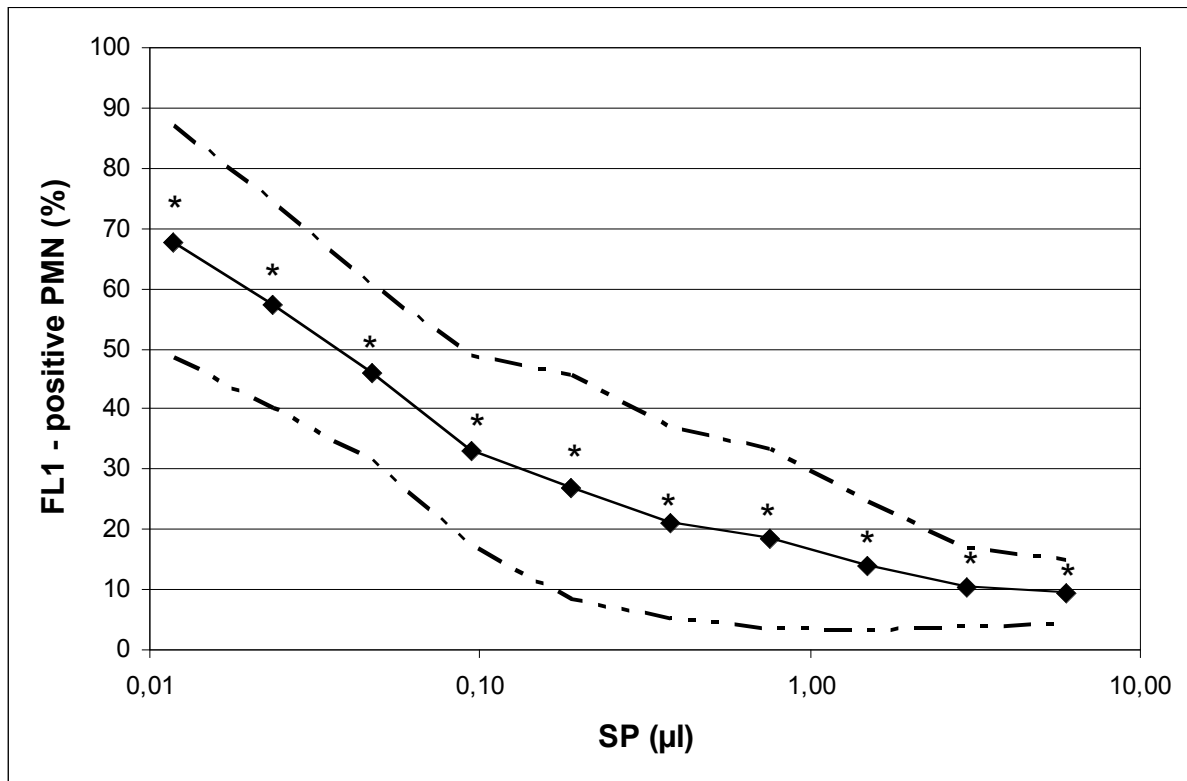


Abbildung 6: Einfluss von SP auf die ROS-Produktion durch PMN

Dargestellt ist das 95% Konfidenzintervall der Stärke der ROS-Produktion durch PMN gemessen anhand der Grünfluoreszenz (FL1, s. 3.2.6) von Rhodamin 123 nach Zugabe von SP (n=10) in unterschiedlichen Konzentrationen. Alle 10 eingesetzten SP-Konzentrationen (0,012 – 6,000 µl, s. 3.2.1.8) unterschieden sich statistisch von der Positivkontrolle (PMN + PMA ohne SP-Zugabe = 100%). *=statistisch significant unterschiedlich zur Positivkontrolle ohne SP; p<0,05.

Abkürzungen: PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; SP, Seminalplasma.

4.3.3 Einfluss von SP auf die PMN-Chemotaxis

Die durch rhIL-8 (rekombinantes humanes Interleukin 8; in der Folge „IL-8“) (s. 3.1.3) induzierte Transmigration von PMN wurde durch bovines SP dosisabhängig gehemmt. Dabei zeigte sich ein deutlicher tierindividueller Blockeffekt der PMN-Migration (vgl. Abb. 7A, 7B). Auch die Zwischenlagerung des Ejakulates über 24 h bei 4°C hatte einen Einfluss auf die Modulation der Zellmigration. Außerdem wurden unterschiedliche Gewinnungsmethoden von SP verglichen. Dabei hemmte frisch

abzentrifugiertes und anschließend 24 h bei 4°C gelagertes SP (Abb.7A) die PMN-Chemotaxis wesentlich stärker als SP, das aus einem gelagerten (24 h, 4°C) Ejakulat (Abb.7B) gewonnen wurde. Bei niedriger Verdünnung waren die Variationen des SP-Hemmeffektes auf die PMN-Migration gering, während sich die Werte bei höheren Verdünnungsstufen (z.B. Stufe 5, 7 und 8) zwischen den Bullen deutlich, jedoch nicht signifikant unterschieden (z.B. Bulle A und B, Abb.7A). Wurde das Seminalplasma einen Tag als Gesamtejakulat gelagert, differierte der Hemmeffekt von SP auf die IL-8 induzierte PMN-Chemotaxis zwischen $46,9 \pm 7,1\%$ (MW \pm SD; Stufe 1) und $83,4 \pm 1,4\%$ (MW \pm SD; Stufe 6) (Abb.7B) und war für die Verdünnungsstufen 1 – 4 und 6 signifikant niedriger als bei vergleichbar gelagertem SP ($12,3 \pm 7,8\%$, Stufe 1 und $59,2 \pm 18,1\%$, Stufe 6; MW \pm SD).

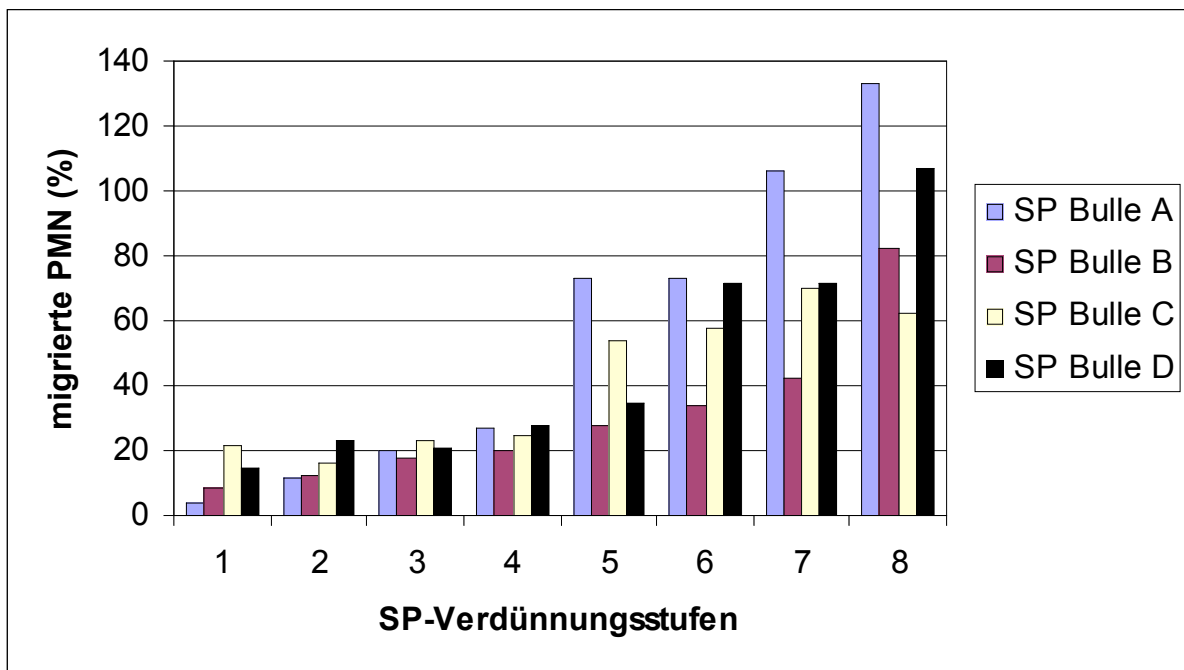


Abbildung 7A: PMN-Chemotaxis nach Zugabe von gelagertem SP (24 h, 4°C)

Dargestellt ist der Prozentsatz gewanderter PMN im Transmigrationsversuch. Es wurden 8 unterschiedliche Verdünnungsstufen (1,500 – 0,012 μ l, s. 3.2.1.8) von SP (initial abgetrennt vom Gesamtejakulat; n=4) untersucht, das 24 h bei 4°C gelagert worden war. 100% entsprechen der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml).

Abkürzungen: IL-8, Interleukin-8; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

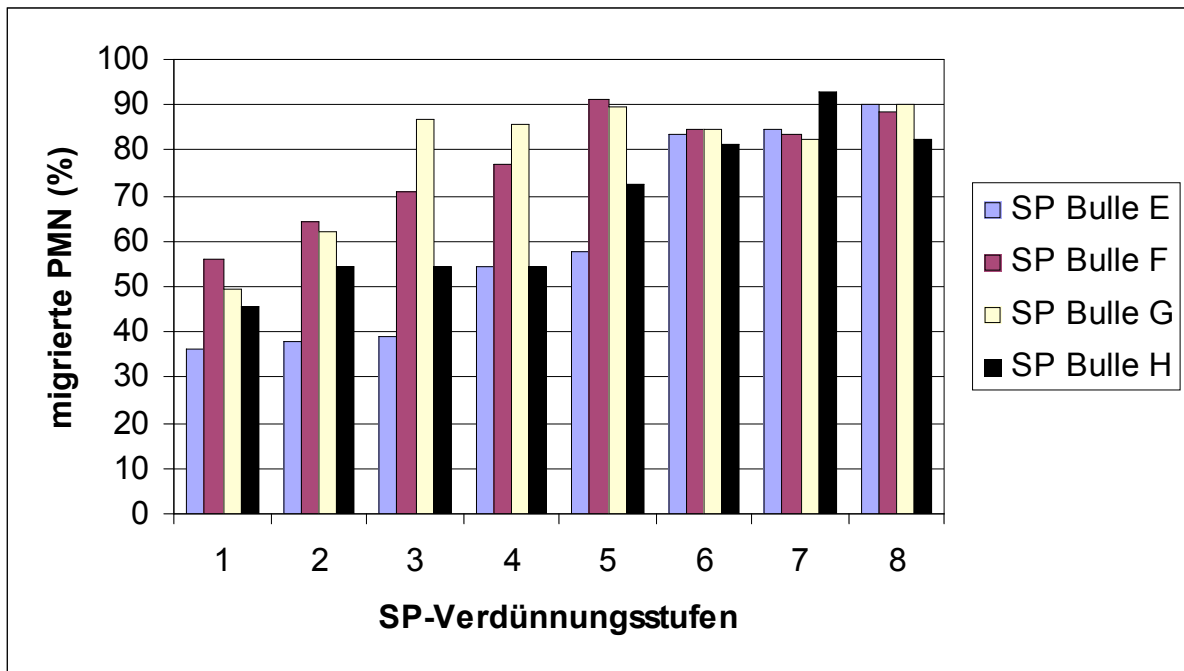


Abbildung 7B: PMN-Chemotaxis nach Zugabe von SP gewonnen aus gelagertem Ejakulat (24h, 4°C)

Dargestellt ist der Prozentsatz gewanderter PMN in der Transmigrationskammer. SP (n=4), das aus über 24 h bei 4°C gelagertem Gesamtejakulat gewonnen worden war, wurde in 8 verschiedenen Verdünnungsstufen (0,012 – 1,500 µl, s. 3.2.1.8) in der Migrationskammer eingesetzt. 100% entsprechen der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml).
Abkürzungen: IL-8, Interleukin-8; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

Die Testsubstanz SP wurde in aufsteigender Konzentration zusammen mit migrationsförderndem IL-8 in die unteren Wells der Transmigrationskammer eingesetzt. Bei einem der Bullen genügte eine Zugabe von nur 0,03 µl SP pro 420 µl Testvolumen, um die PMN-Migration um 50% zu blocken. Das errechnete 95% Konfidenzintervall der 50%-Hemmdosis (verglichen mit der 100% Migrationsrate auf IL-8, 100 ng/ml) zwischen den verschiedenen Bullen reichte von 0,10 – 0,44 µl (0,24‰ bis 1,05‰) zugegebenem SP pro Ansatz (Abb.8).

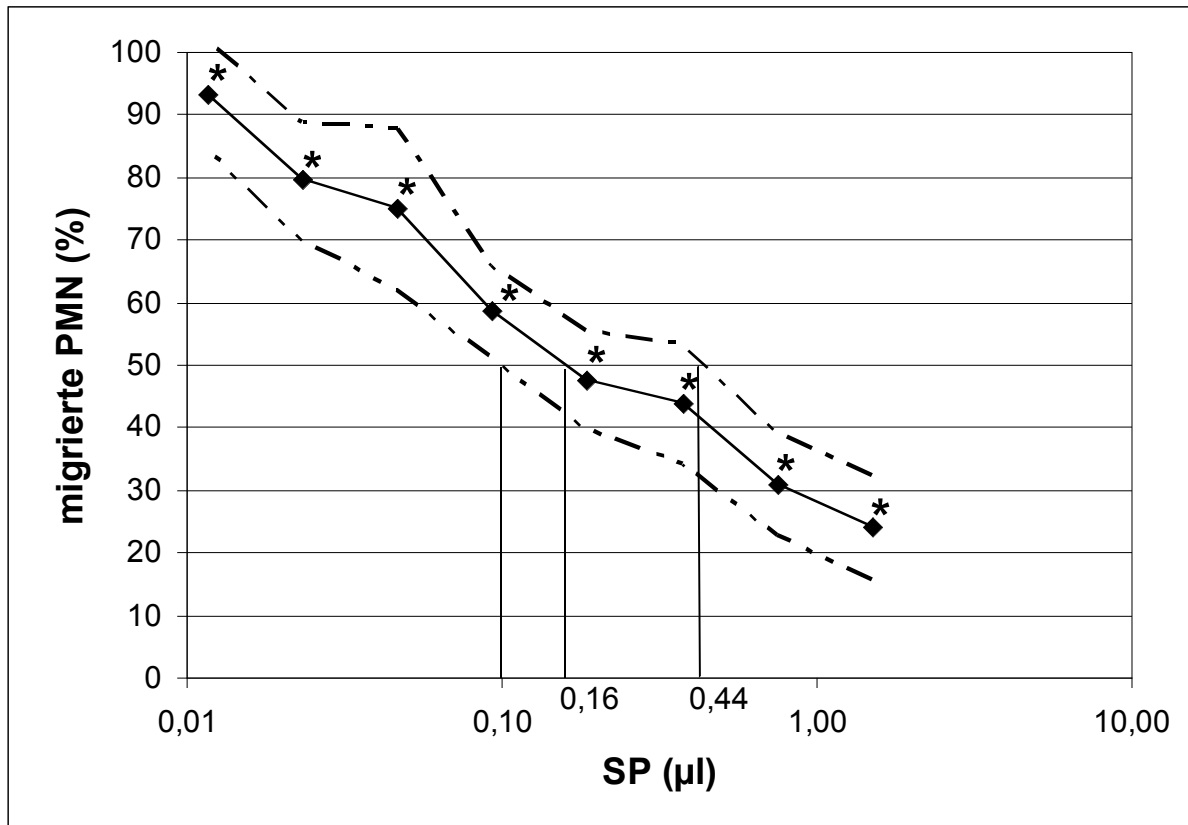


Abbildung 8: Inhibierender Effekt von SP auf die Transmigration boviner PMN

Dargestellt ist das 95% Konfidenzintervall des Prozentsatzes der in der Chemotaxiskammer auf IL-8 gewanderten PMN nach Zugabe von SP (n=10) in 8 verschiedenen Verdünnungsstufen (0,012 – 1,500 µl; s. 3.2.1.8). 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml). * = statistisch signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle ohne SP; p<0,05.

Abkürzungen: IL-8, Interleukin-8; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

Chemotaxishemmung durch verschiedene SP-Chargen eines Bullen

SP eines Bullen wurde an 4 aufeinanderfolgenden Tagen gewonnen. Die Resultate bestätigen durchgängig die dosisabhängige Inhibition der IL-8-induzierten PMN-Chemotaxis durch SP. Der prozentuale Anteil gewandelter PMN variierte in Abhängigkeit vom zugesetzten SP-Volumen (Abb.9). Dabei wurden Variationskoeffizienten von 8,8% bis 38,0% errechnet. Bei niedrigen Verdünnungsstufen (1 - 3) lagen die Werte für die Migrationsraten der 4 Proben noch nahe beieinander (Schwankungen zwischen 9% und 18%). Beim Einsatz höherer Verdünnungsstufen (6 – 8) wurden vermehrt Unterschiede zwischen den Ejakulaten sichtbar (Schwankungen zwischen 25% und 73%).

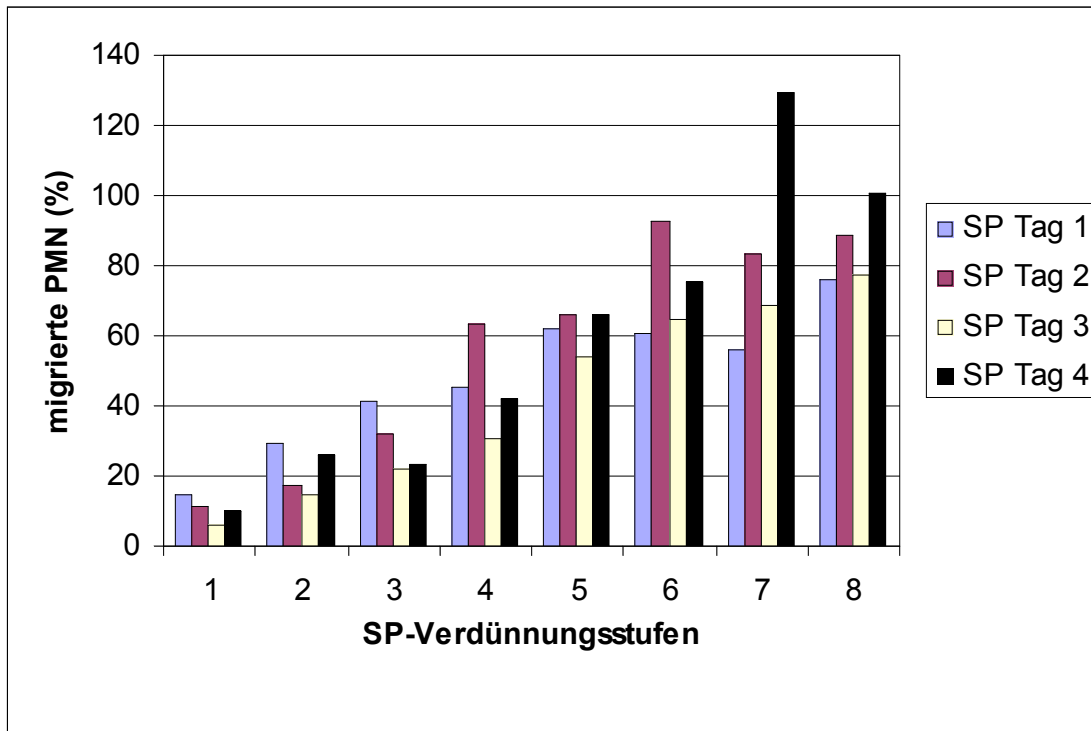


Abbildung 9: PMN-Chemotaxishemmung durch SP aus 4 Absamungen eines Bullen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil gewanderter PMN. Hier wurde SP aus den Ejakulaten eines Bullen, die an 4 aufeinanderfolgenden Tagen gewonnen wurden, in 8 Verdünnungsstufen (1,500 – 0,012 µl; s. 3.2.1.8) im Transmigrationsversuch eingesetzt. 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml).

Abkürzungen: IL-8, Interleukin-8; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

Einfluss frequenter Absamungen auf die PMN-Chemotaxishemmung durch SP

Für die Untersuchung zum Einfluss der Absamungsfrequenz auf die Hemmung der PMN-Transmigration durch SP wurde ein Bulle innerhalb von 5 h viermal beprobt. Dabei wurde von Sprung zu Sprung die Menge des Gesamtejakulates geringer, der SP-Anteil höher und die Flüssigkeit immer klarer. Es zeigte sich, dass die PMN-Chemotaxis grundsätzlich dosisabhängig durch das SP gehemmt werden konnte. Die Variationskoeffizienten reichten dabei von 5,8% bis 47,9%. Zwischen den Sprüngen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Transmigrationsrate festgestellt. Damit gab es keine Tendenz, dass in diesem „Ermüdungsversuch“ später gezogene Proben geringere oder höhere PMN-Migrationsraten bewirkten, als die jeweils vorangegangene Probe (Abb.10).

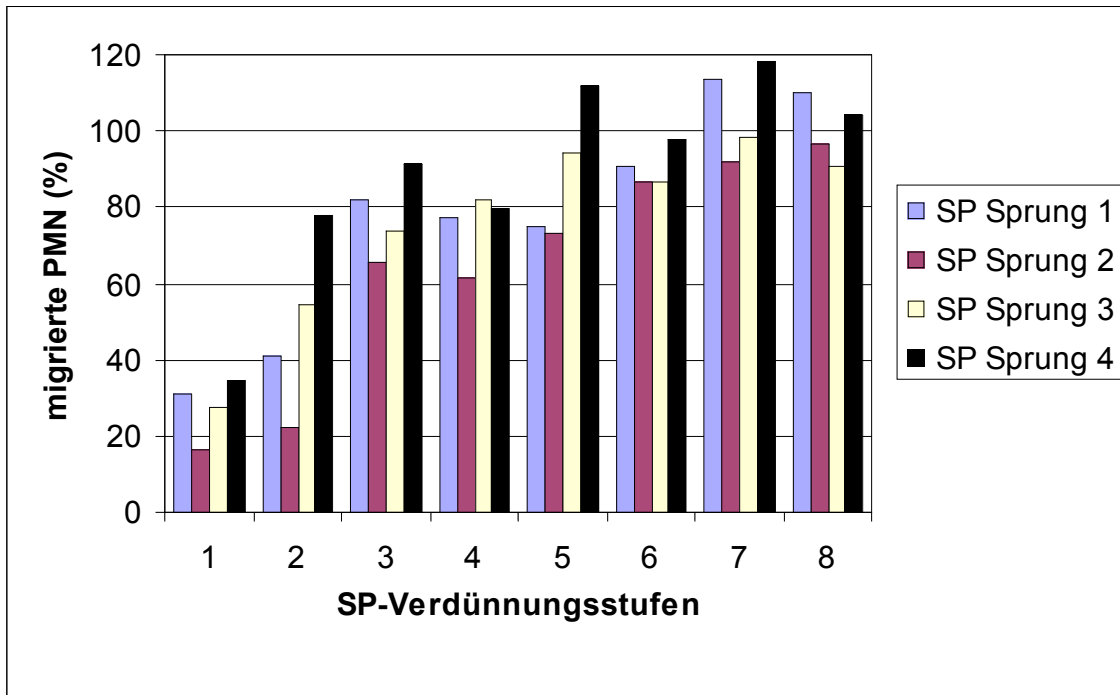


Abbildung 10: Einfluss frequenter Absamungen auf die PMN-Chemotaxis-hemmung durch SP

Von 4 aufeinanderfolgenden Sprüngen eines Bullen an einem Versuchstag wurde aus den Ejakulaten jeweils SP gewonnen und im Transmigrationsversuch getestet. Es wurden 8 unterschiedliche Verdünnungsstufen (0,012 – 1,500 μ l; s. 3.2.1.8) in der Transmigrationskammer eingesetzt. 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml).

Abkürzungen: PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

4.3.4 Einfluss von Samenblasendrüsensekret (SBS) auf die PMN-Chemotaxis

In einem nächsten Schritt wurde das Sekret der Samenblasendrüse von Schlachttieren (n=7) untersucht. Analog dem SP wurde ebenfalls ein dosisabhängiger signifikanter Hemmeffekt auf die Granulozytenwanderung gegenüber dem Lockstoff IL-8 festgestellt (Abb.11). Die Zugabe von SBS-Verdünnungen ergab eine relativ geringe Variation zwischen den Bullen hinsichtlich der Inhibition der Chemotaxis (vgl. Abb.8). Die 50% Hemmdosis wurde durch Zugabe von 0,15 – 0,22 μ l SBS erreicht (95% KI: 0,36 bis 0,53%). Der Mittelwert für einen 50%igen Blockeffekt der PMN-Transmigration durch SBS ist demnach mit dem von SP (Abb.8) vergleichbar. Das Konfidenzintervall ist bei zugegebenem SP jedoch deutlich größer.

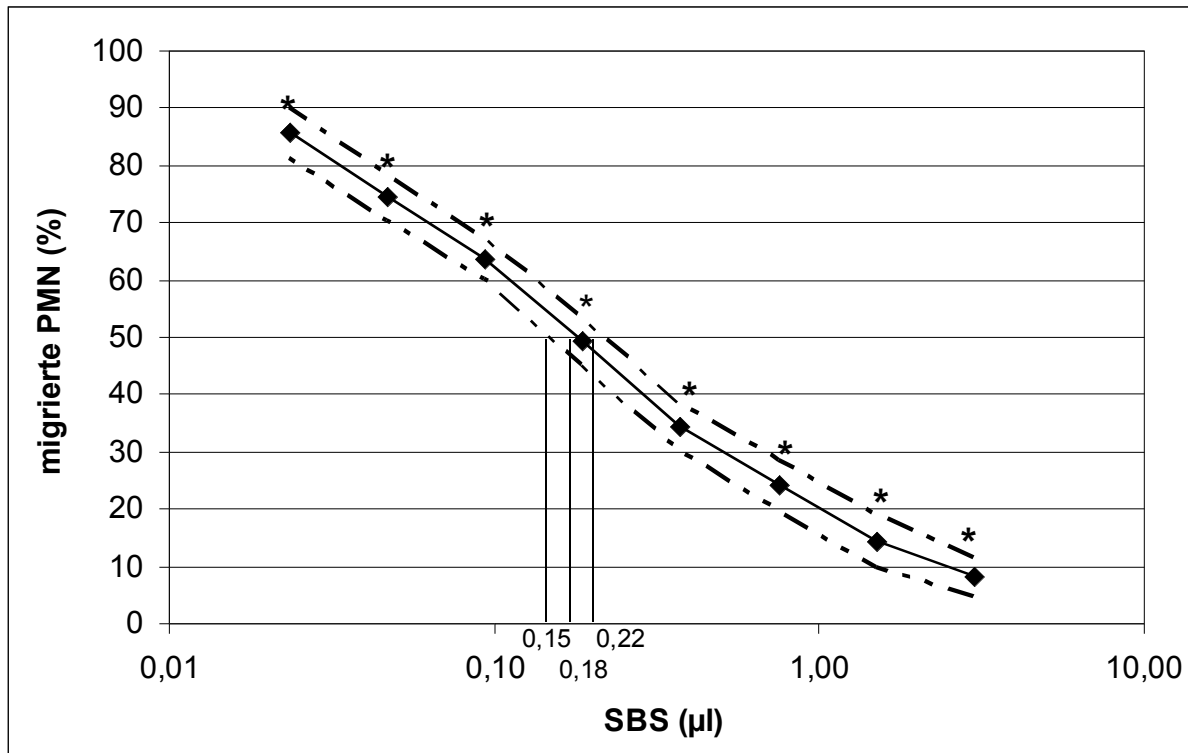


Abbildung 11: PMN-Transmigrationshemmung durch Zugabe von SBS

Dargestellt ist das 95% Konfidenzintervall des Prozentsatzes migrierter PMN induziert durch IL-8, dem SBS (n=7) in 8 verschiedenen Konzentrationen (0,023 – 3,000 µl) zugegeben wurde. 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml). *= statistisch signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle ohne SBS; $p < 0,05$.

Abkürzungen: IL-8, Interleukin-8; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SBS, Samenblasendrüsensekret.

SP und SBS eines Bullen im Vergleich

Von einem klinikeigenen Bullen konnten wir sowohl SP als auch SBS gewinnen und untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass der Hemmeffekt der beiden Sekrete bei 6 von 7 Verdünnungsstufen annähernd gleich gut war. Bei der höchsten Verdünnung lagen die Werte deutlich auseinander. SBS zeigte hier einen höheren Hemmeffekt auf die PMN-Transmigration (Tab.4).

Tabelle 4: Hemmwirkung von SP und SBS eines Bullen auf die PMN-Chemotaxis

	Verdünnungsstufen von SP und SBS						
	1	2	3	4	5	6	7
SP (MW±SD)	22,3±8,6	29,4±9,5	36,4±5,1	38,8±23,7	56,6±17,2	67,9±9,6	62,4±42,4
SBS (MW±SD)	21,6±7,2	33,8±5,5	39,8±8,3	46,2±25,7	60,7±17,3	74,0±28,4	86,4±21,0

Dargestellt ist die prozentuale PMN-Chemotaxisaktivität als MW ± SD (n=3) in Abhängigkeit von SP und SBS eines Bullen in 7 Verdünnungsstufen (1,500 – 0,023 µl; s. 3.2.1.8), die im Transmigrationsassay eingesetzt worden waren. 100% entspricht der Granulozytenwanderung induziert durch IL-8 (100 ng/ml).

Abkürzungen: MW, Mittelwert; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SD, standard deviation (Standardabweichung); SP, Seminalplasma; SVF, Samenblasendrüsensekret

4.4 Kokulturrexperimente zu Rolle und Modulierbarkeit der pbUEZ

In diesen Kokulturrexperimenten sollte untersucht werden, wie uterine Epithelzellen des Rindes auf den Kontakt mit relevanten Stimuli reagieren. Die Resultate sollen Anhaltspunkte dafür geben, wie dabei die uterine zelluläre Situation beeinflusst werden kann. Zur Kokultivierung mit pbUEZ wurden Medium mit und ohne FKS als Nullwert sowie Präparationen mit PMN, LPS und SP als Stimulantien herangezogen. Kulturen mit > 90% konfluent gewachsenen pbUEZ wurden 10-16 h inkubiert, die Überstände aliquotiert und eingefroren. Die Probenanalyse fand schließlich mittels IL-8-ELISA (s. 4.4.1) und Transmigrationsassay (s. 4.4.2) statt.

Bei Kokulturrexperimenten mit hohem PMN-Gehalt (PMN > 4 x 10⁶/ml) konnten mikroskopisch deutliche morphologische Veränderungen der pbUEZ beobachtet werden, die sich durch zunehmende Vakuolenbildung in Verbindung mit Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen darstellte.

4.4.1 Interleukin-8-Bildung durch Stimulation der pbUEZ

Im ersten Schritt war zu prüfen, ob pbUEZ durch entsprechende Stimulation zur Bildung des für PMN stark chemoattraktiven IL-8 in der Lage ist. Damit soll der Frage nachgegangen werden, ob und wie es zu einem chronischen PMN-Influx in die Gebärmutter kommen kann, der für die subklinische Endometritis kennzeichnend ist, auch bei Abwesenheit von Bakterien. Für die Versuche zur Untersuchung der IL-8-Bildung durch pbUEZ wurden ausschließlich Uteri präpariert, die von östrischen Kühen stammten. Kokultiviert wurden für diesen Versuch pbUEZ mit PMN-Suspensionen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) und LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) jeweils mit und ohne FKS im Kulturmedium. Medium ohne Stimulanz, aber mit pbUEZ wurde als Kontrolle mitgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die Anwesenheit von FKS im Koinkubationsmedium eine förderliche Rolle für die zu erwartende Zytokinausschüttung spielt. So war bei der Inkubation von vitalen PMN mit pbUEZ und dem Zusatz von FKS die IL-8-Konzentration im Kulturüberstand gegenüber den Ansätzen mit Puffer (DMEM = Nullkontrolle) um das 31fache erhöht. Demgegenüber betrug sie nach Inkubation von vitalen PMN mit pbUEZ ohne FKS im Medium nur das 3fache (Tab.4). Die IL-8-Freisetzung war andererseits auch von der jeweiligen PMN-Präparation abhängig. Der Mittelwert der mitgeführten Positivkontrollansätze (IL-8, $250 \text{ pg}/\text{ml}$) lag bei einem Wert von $297,2 \pm 93,4 \text{ pg}/\text{ml}$ ($n=6$). Koinkubationen von toten PMN mit pbUEZ führten gegenüber vergleichbaren Ansätzen mit vitalen PMN zu einer deutlich geringeren IL-8-Freisetzung (-21%) durch die pbUEZ. Die im IL-8-Assay messbare IL-8-Aktivität lag bei alleiniger Inkubation der PMN ohne pbUEZ im Bereich der mit Puffer ermittelten Werte. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen war damit für die IL-8-Freisetzung zwingend eine Beteiligung der pbUEZ an der Kokultur nötig. Auch LPS in Verbindung mit FKS-haltigem Medium erwies sich als wirksamer Stimulus für die pbUEZ und führte zu einer deutlich messbaren IL-8-Synthese und -Freisetzung ins Kulturmedium (Tab.5).

Tabelle 5: IL-8-Produktion nach Koinkubation von pbUEZ mit verschiedenen Stimulanzen und die unterstützende Wirkung von FKS

	IL-8 (pg/ml; MW \pm SD)	
	Medium + 10% FKS	Medium + 0% FKS
DMEM + pbUEZ (Nullkontrolle)	6,7 \pm 0,5 (n=2)	4,0 \pm 0,4 (n=3)
PMN vital (1 x 10 ⁶ /ml) mit pbUEZ	207,7 \pm 137,2 (n=8)	67,5 \pm 76,2(n=4)
PMN tot (1 x 10 ⁶ /ml) mit pbUEZ	43,8 (n=1)	1,9 (n=1)
PMN vital (1 x 10 ⁶ /ml) ohne pbUEZ	2,2 \pm 1,4 (n=2)	-
LPS (1 μ g/ml) mit pbUEZ	128,7 \pm 17,7 (n=3)	5,1 \pm 3,6 (n=2)

Zur Auswertung kamen Versuche, bei denen die Stimulanzen mit wiederausgesäten kryokonservierten östrischen pbUEZ koinkubiert wurden.

Abkürzungen: DMEM, Dulbeccos modified Eagles Medium (Zellkulturmedium); FKS, fetales Kälberserum; LPS, Lipopolysaccharid; pbUEZ, primäre bovine Uterusepithelzellen; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten.

4.4.2 Zellfunktionelle Effekte der Kulturüberstände stimulierter pbUEZ

4.4.2.1 PMN-Chemotaxis

Für Transmigrationsversuche mit Überständen aus pbUEZ-Kokulturen wurden nur Präparationen verwendet, bei denen ohne FKS im Medium koinkubiert worden war. Grund ist die eigene Beobachtung, dass FKS auch alleine, ohne eine Koinkubation mit Zellen chemoattraktiv für PMN ist (Migrationsrate: 28,9% der migrierten PMN transmigrierten). Dies lässt sich durch die Zugabe von Seminalplasma jedoch effektiv blocken (Migrationsrate sinkt auf 1,7%). Da aber zur Anzucht der pbUEZ-Kulturen in jedem Falle FKS-haltiges Medium verwendet werden musste, wurden die Wells nach der Anzüchtung der pbUEZ und vor der Koinkubation jeweils viermal durch Waschen mit PBS von FKS-haltigem Medium befreit. Die Migration von PMN induziert durch IL-8 (100 ng/ml) wurde jeweils als 100%-Wert angesehen. Die IL-8-

Verdünnungslösungen wurden für jeden Versuch neu hergestellt, jedoch nicht koinkubiert. Die Ergebnisse der Chemotaxisversuche sind in Tab.6 dargestellt. Der Einsatz von mit pbUEZ koinkubiertem Medium in Wells ohne weitere Testsubstanzen lockte in der Transmigrationskammer bereits deutlich Granulozyten an. Koinkubation von SP und Medium führte dagegen zu keiner PMN-Migration. Vitale PMN, die in unterschiedlicher Konzentration mit pbUEZ koinkubiert worden waren, induzierten eine starke Granulozytenwanderung. Präparationen mit 4×10^6 PMN/ml lockten nach Kokultur mit pbUEZ beispielsweise nahezu 100% PMN in Relation zur IL-8-Positivkontrolle an. Beim Einsatz toter PMN im Kokulturansatz lag die Migrationsrate im anschließenden Kammerversuch auch bei 100%. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der IL-8-Messungen im Überstand der Kokultur von pbUEZ mit toten PMN (s. Tab.6). Folglich muss es sich hier um die chemoattraktive Wirkung eines anderen Stoffes als IL-8 handeln. Wurde LPS im Medium mit den pbUEZ inkubiert, ergab sich in der Transmigrationskammer eine konzentrationsabhängige Steigerung der PMN-Migration. Die Migrationsraten waren dabei mit der eingesetzten Menge LPS im Kokulturansatz positiv korreliert.

Tabelle 6: PMN-Transmigration durch Kulturüberstände aus Kokulturen von pbUEZ mit unterschiedlichen Stimulantien

Kokulturbestandteile	Relative Chemotaxisaktivität (migrierte PMN, %)	n
Positivkontrolle: IL-8 (100 ng/ml DMEM)	100,0	5
Negativkontrolle: DMEM	0,4 ± 0,5	5
DMEM mit pbUEZ	48,6 ± 5,6/1,7	3/1*
SP 10 µl	0,9	1
PMN vital (1 x 10 ⁶ /ml) mit pbUEZ	74,6 ± 37,5	8
PMN vital (2 x 10 ⁶ /ml) mit pbUEZ	57,2 ± 46,3	3
PMN vital (4 x 10 ⁶ /ml) mit pbUEZ	98,1 ± 26,2	3
PMN tot (1 x 10 ⁶ /ml) mit pbUEZ	100,0 ± 13,8	2
LPS (10 µg/ml)	75,1 ± 13,5	3
LPS (1 µg/ml)	57,7 ± 1,9	3

Dargestellt sind die MW ± SD (n=5) der relativen PMN-Chemotaxisaktivität aus Transmigrationsversuchen, bei denen Überstände aus verschiedenen Koinkubationsversuchen mit unterschiedlichen Testsubstanzen in die unteren Wells eingesetzt worden waren. (*n=4)
 Abkürzungen: DMEM, Dulbeccos modified Eagles medium (Zellkulturmedium); IL-8, Interleukin-8; LPS, Lipopolysaccharid; pbUEZ, primäre bovine Uterusepithelzellen; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten; SP, Seminalplasma.

4.4.2.2 Wirkung von pbUEZ-PMN-Kokulturüberständen auf Spermatozoen

Der Einfluss von pbUEZ-Kokulturüberständen auf die Vitalität und den akrosomalen Status von Spermatozoen wurde mit einer FITC-PNA/SYTO17/PI-Färbung untersucht (s. 3.2.4.4). Zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5 h und 3 h) wurden die Proben gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Verwendet wurden dazu Pailletten mit tiefgefrorenen Spermatozoen ($75 \times 10^6/\text{ml}$; $n=2$), dem Andromed™ als eidotterfreies Verdünnermedium zugesetzt wurde, um in der durchflusszytometrischen Analyse die bekannten Störungen durch Eidotter zu vermeiden. Die Fluoreszenzmarkierung ermöglichte eine Einteilung der einzelnen Spermatozonenfraktionen in vital (PI-negativ, PNA-negativ), tot (PI-positiv und PNA-negativ = rotfluoreszierend, FL3, s. 3.2.6), und plasmamembrangeschädigt (=akrosomenreagierte Spermatozoen: PI- und PNA-positiv; grün-rotfluoreszierend, FL1, s. 3.2.6) (Abb.12).

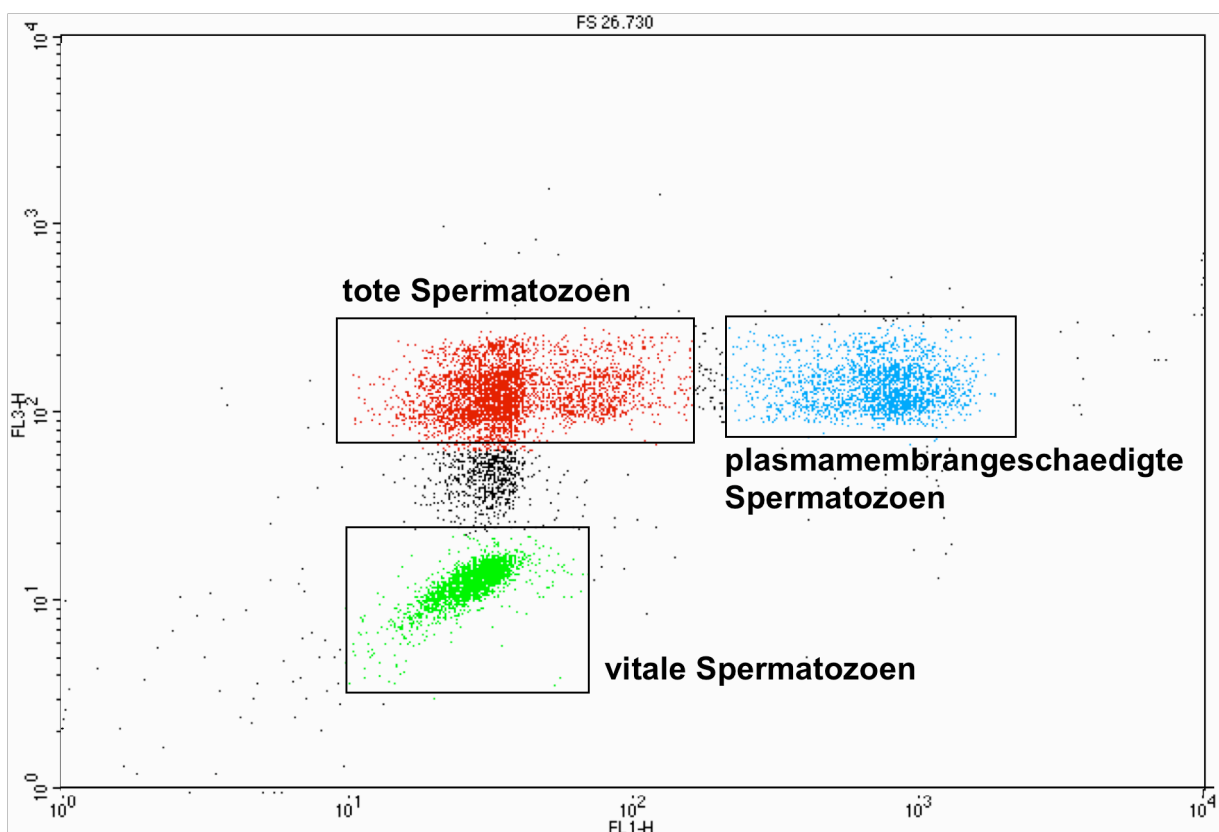


Abbildung 12: Zweiparameterdarstellung („Dot Plot“) der Spermatozonenfraktionen nach Färbung mit FITC-PNA/SYTO 17/PI (s. 3.2.4.4)

Vitale Spermatozoen zeigen keine Fluoreszenz (FL1 und FL3 negativ), tote Spermatozoen sind rotfluoreszierend (FL1 negativ und FL3 positiv) und plasmamembrangeschädigte Spermatozoen stellen sich grün-rotfluoreszierend dar (FL1 und FL3 positiv; s. 3.2.6).

Da die Akrosomenreaktion physiologischerweise nur mit der Zona pellucida stattfindet (Fertilisation), im Uterus befindliche tote und akrosomenreagierte Spermatozoen für die Befruchtung folglich nicht relevant sind, wurde nur der Anteil vitaler Spermatozoen ausgewertet (Tab.7). Es ließen sich zeitabhängige signifikant negative Effekte der Kokulturüberstände auf die Vitalität der Spermatozoen beider Bullen feststellen. Im Vergleich zu nicht zellexponiertem Zellkulturmedium kam es nach 30minütiger Kokultur mit Medium aus der Kokultur von pbUEZ und PMN bei einem der Probanden zu einem signifikanten Verlust der Spermatozoen-Vitalität. Bei dem zweiten Bullen war dieser Effekt nicht darstellbar.

Tabelle 7: Vitalität von Spermatozoen nach Kokultur mit verschiedenen Zellzusammensetzungen

	DMEM		DMEM + pbUEZ		DMEM + pbUEZ + PMN (1 x 10 ⁶ /ml)	
	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 1	Bulle 2
0,5 h	28,57 ^{ac} ± 1,25	31,70 ^d ± 1,58	26,15 ^{be} ± 2,03	30,68 ^f ± 1,88	20,22 ^{ab} ± 2,56	29,19 ^g ± 2,44
3,0 h	19,29 ^c ± 0,60	23,73 ^d ± 0,73	18,80 ^e ± 1,96	20,40 ^f ± 6,75	18,21 ± 2,51	17,59 ^g ± 3,07

Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Spermatozoen (MW ± SD) nach Auswertung von 10.000 Spermatozoen, die nach Fluoreszenzfärbung mit FITC-PNA/SYTO17/PI im Durchflussszytometer als ungefärbt gemessen wurden. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0.05$).

Abkürzungen: DMEM, Dulbeccos modified Eagles medium (Zellkulturmedium); pbUEZ, primäre bovine Uterusepithelzellen; PMN, polymorphkernige neutrophile Granulozyten.

5 Diskussion

5.1 Konzeptionelle Überlegungen zu Untersuchungen über Interaktionen zwischen bovinen uterinen Epithelzellen, Inseminatbestandteilen und PMN

Die sich nach dem natürlichen Deckakt oder der KB anschließende lokale zelluläre Reaktion in der Gebärmutter ist in der Vergangenheit wiederholt Gegenstand von Forschungsarbeiten gewesen. Insbesondere bei den „Uterusbesamern“ Schwein und Pferd wurden in den letzten Jahren mehrere Studien durchgeführt, um die lokalen Abwehrmechanismen der Gebärmutter besser verstehen und gegebenenfalls auch steuern zu können. Auslöser der lokalen immunologischen Reaktionen sind sowohl Spermatozoen und Seminalplasma als auch Verdünnerbestandteile. Entscheidend ist dabei einerseits die antimikrobielle Abwehrfunktion der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) mittels Phagozytose und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (JANEWAY et al. 2002; LIU et al. 1985). Andererseits sind die Mechanismen der Eliminierung des veränderten Uterussekretes durch Myometriumkontraktionen von großer Bedeutung und wurden entsprechend wissenschaftlich bearbeitet (u.a. LE BLANC 1997). Beim Rind als Scheidenbesamer unterscheidet sich der weibliche Reproduktionstrakt sowohl anatomisch als auch funktionell in wesentlichen Abschnitten von den beiden oben genannten Spezies. Insofern reagiert der Uterus des Rindes auf intrauterine Inseminatbestandteile anders, als das bei Uterusbesamern der Fall ist. Ein erhöhter intrauteriner Immunzellgehalt, der bei Schwein und Pferd nach einer KB nachgewiesen ist (BISCHOF et al. 1994; ENGELHARDT et al. 1997; ROZEBOOM et al. 1998, 1999; GÖRGENS et al. 2005b; TAYLOR et al. 2007a), kann beim Rind in vivo nicht registriert werden (WENDT 2007). Die Eliminierung überschüssiger Spermatozoen und anderer Inseminatbestandteile bedarf im Rinderuterus unter physiologischen Bedingungen also keiner inflammatorischen Gewebereaktion, sondern wird auf anderem Wege erreicht (MATTNER 1966; MITCHELL et al. 1985; NELSON et al. 1987; LARSSON 1986). Hier steht der intensive Selektionsprozess in der Zervix des Rindes im Vordergrund, der wahrscheinlich nur befruchtungskompetente Spermatozoen in den Uterus entlässt (KARABINUS u. SAACKE 1987; SENGER 1993).

Andererseits weisen aber etwa 30-40% der intensiv gehaltenen Milchkühe 6-7 Wochen post partum subklinische Endometritiden auf (Kasimanickam et al. 2004, Raab 2004). In diesen Fällen sind zum Zeitpunkt von Deckakt oder KB bereits PMN in der Gebärmutter präsent. Diese unphysiologische intrauterine Ansammlung von Immunzellen ist als persistierende endometriale Entzündung anzusehen, die auf eine ungenügende postpartale Keimeliminierung oder auf sich selbst aufrechterhaltende „sterile Entzündungen“ zurückzuführen ist. Dies kann sich jeweils negativ auf die Fruchtbarkeitsaussichten der Kühe auswirken.

In der vorliegenden Arbeit wurden in-vitro-Modellsysteme für die Untersuchungen beim Rind etabliert sowie bestehende in-vitro-Methoden angepasst. In dieser Grundlagenarbeit sollten unter gut definierten ex-vivo- (Probandenauswahl) und in-vitro-Bedingungen (gut reproduzierbare Verfahren) erste Erkenntnisse über die Effekte von physiologischen Inseminatbestandteilen auf relevante uterine Zellpopulationen gewonnen werden.

In diesem ersten Schritt eines wissenschaftlichen Gesamtkonzeptes zur Erforschung von Pathogenese sowie Prophylaxe und Therapie der subklinischen Endometritis beim Rind wurden deshalb modulierende Effekte von Seminalplasma bzw. Samenblasendrüsensekret auf neutrophile Granulozyten und uterine Epithelzellen untersucht.

Die Resultate sollen einerseits mögliche modulierende Effekte des Seminalplasmas auf den Verlauf einer subklinischen Endometritis aufdecken. Auf der anderen Seite sollen mit der Arbeit methodische Voraussetzungen für weiterführende in-vitro- und in-vivo-Studien der Arbeitsgruppe geschaffen werden, in denen weitere Komponenten der komplexen uterinen Situation im Falle von KB bei subklinischer Endometritis wie Effekte von Samenverdünnern, verschiedene Zell-Zell-Interaktionen, etc. untersucht werden können. Fernziel des Konzeptes ist es praxisrelevante Verbesserungsvorschläge für biotechnologische Verfahren in die Hand zu bekommen, die zukünftig die Fertilität betroffener Tiere positiv beeinflussen können.

5.2 Teilschritte zur Erarbeitung von in-vitro-Arbeitsmethoden mit uterinen Epithelzellen und PMN

5.2.1 Erarbeitung optimaler Zellkulturbedingungen für pbUEZ

Grundvoraussetzung für in-vitro-Untersuchungen zu Interaktionen von uterinen Epithelzellen mit Inseminatbestandteilen und PMN war die Etablierung einer primären Zellkultur boviner Uterusepithelzellen, die konstantes Wachstum aufwiesen und untereinander vergleichbar in den jeweiligen Experimenten eingesetzt werden konnten. ROTTMAYER (unveröffentlichte Ergebnisse) beschrieb eine Methode zur Präparation von pbUEZ, die als Basis für die Anzucht der primären Zellkultur diente. In Vorversuchen wurde geklärt, ob die Gewinnung, die Menge der gewonnenen pbUEZ und das Wachstumsverhalten unter identischen Bedingungen reproduzierbar sind. Die angewandten Methoden (s. 3.2.5.1) lieferten dazu überzeugende Ergebnisse. Das Intervall für den Medienwechsel wurde routinemäßig auf 48 h gesetzt, um eine entsprechende Kontinuität in der Nährstoffbereitstellung sowie Entfernung von nichtadhärenten Zellen und Stoffwechselprodukten zu gewährleisten (s. 3.2.5.2). In diesen Versuchen zeigte sich, dass der jeweilige Sexualzyklusstand ein entscheidender Faktor bezüglich der Menge der gewinnbaren pbUEZ ist. Gegenüber Organen diöstrischer Kühe war die Zellausbeute bei „östrischen Uteri“ deutlich geringer (s. 4.1.1.1). Einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen hatte der Zyklusstand jedoch nicht. Für die Hauptversuche wurden trotz der geringeren Zellausbeute ausschließlich pbUEZ aus Präparationen östrischer Gebärmutterhörner herangezogen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass diese Zellen der Physiologie zum Zeitpunkt einer KB am ehesten entsprechen.

Für eine zeitunabhängige Versuchsdurchführung mit pbUEZ wurde die Möglichkeit der Kryokonservierung der isolierten Zellen geprüft. Experimente von MURAKAMI et al. (2003) haben gezeigt, dass die Zellfunktionalität nach einmaligem Einfrieren in einem definierten Kryomedium weitgehend erhalten bleibt. In der vorliegenden Arbeit waren eine bereits erfolgte Anzucht der pbUEZ zum Monolayer und ein sich anschließender mehrmaliger Trypsinisierungszyklus Vorbedingungen für ein erfolgreiches „Reseeding“ (s. 4.1.1.3). Die Ernte aus den Primärkulturen war ausreichend ergiebig für das Anlegen eines pbUEZ-Pools für die geplanten Kokultivierungsversuche. Jedoch ließen sich frisch präparierte unkultivierte Zellen nach direktem Einfrieren nicht erfolgreich anzüchten.

5.2.2 Erarbeitung einer Methode zur Standardisierung zellfunktioneller Experimente

Um in vitro verschiedene funktionelle Eigenschaften von PMN (Vitalität, ROS, Chemotaxis) zu untersuchen, wurden für alle Experimente PMN aus dem peripheren Blutkreislauf gewonnen und isoliert. Zwar ist bekannt, dass sie sich bezüglich Immunphänotyp und funktioneller Aktivität von uterinen PMN in einigen Punkten unterscheiden können (ZERBE et al. 1996, 2003). Trotzdem bieten sie sich aufgrund der guten Zugänglichkeit und der gut definierbaren Gewinnungsbedingungen als Modellzellen für dieses und ähnliche Versuchsvorhaben an.

Um einzelne PMN-Präparationen, die untereinander eine erhebliche Variation hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens aufwiesen (s. Abb.4B), miteinander vergleichen zu können, wurde durch Zugabe definierter Mengen fluoreszierender Referenzbeads ein interner Standard für die durchflusszytometrische Quantifizierung der migrierten PMN etabliert. Mit Hilfe der obligat mitgeführten Positivkontrolle (IL-8, 100 ng/ml) wurde eine 100%-Migrationsrate ermittelt und die Versuchsansätze daran gemessen als relative Migrationsrate ausgegeben. Damit waren trotz wechselnder Blutdonoren vergleichbare Werte für die Modulation der PMN-Chemotaxis zu erzielen.

Schon fetales Kälberserum (FKS) allein löste ohne Zugabe von zusätzlichen Stimulatoren zur Zellkultur in der Transmigrationskammer eine PMN-Migration aus (s. 4.4.2.1). Daher wurde bei Kokulturen, deren Überstände in der Transmigrationskammer untersucht werden sollten, während der Koinkubationszeit auf den Einsatz von FKS im Zellkulturmedium verzichtet. Bei Experimenten zur Messung der IL-8-Synthese durch pbUEZ nach Kokultur z.B. mit PMN im ELISA zeigte dem Medium zugegebenes FKS eine positiv verstärkende Wirkung auf die IL-8-Konzentration im Kulturmedium (s. 4.4.1), während es alleine keine IL-8 Reaktion hervorrief. Auch SHEN et al. (2004) beschrieben in ihrer Studie die Koinkubation mit serumhaltigem Medium zur Stimulation von primären humanen UEZ.

5.3 Interaktionen von Inseminatbestandteilen mit uterinen Epithelzellen und PMN

Die Frage nach dem Einfluss einer subklinischen Endometritis auf das Inseminat und umgekehrt war der Hintergrund der Untersuchungen zu Reaktionen uteriner Epithelzellen und neutrophiler Granulozyten mit Bestandteilen des bovinen Inseminats. Immunkompetente Zellen sind im Falle einer vorliegenden Endometritis bereits im Gebärmutterlumen vorhanden. Der Frage, ob die beschriebenen Spermatozoen-protektiven Eigenschaften des Seminalplasmas (CLARK u. KLEBANOFF 1976; GARNER et al. 2001; GWATHMEY et al. 2006) Spermatozoen auch vor zytotoxischen Effekten der PMN schützen können, sollte in den hier vorgestellten Experimenten nachgegangen werden.

5.3.1 Einfluss von Seminalplasma (SP) und Samenblasendrüsensekret (SBS) auf funktionelle Eigenschaften von PMN

Um die Kapazität von SP zur funktionellen Modulation der PMN bewerten zu können, war initial zu klären, ob die im Versuch eingesetzten Konzentrationen von SP (und SBS) die Vitalität der PMN signifikant beeinflussen können. Die entsprechenden Experimente zeigten, dass SP in höheren Verdünnungen (0,012 – 0,188 $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ PBS mit 4×10^5 PMN) (s. 4.3.1) die Vitalität der PMN nicht negativ beeinflusste. Damit war gesichert, dass zellfunktionelle Experimente unter diesen Bedingungen tatsächlich mit vitalen PMN vorgenommen werden können. Bei geringerer Verdünnung von SP kommt es konzentrationsabhängig zunehmend zur Membranschädigung der PMN (s. 4.3.1). Man kann daraus folgern, dass bovines Seminalplasma ein direktes zytotoxisches Potential gegenüber neutrophilen Granulozyten hat. Diese richtet sich also gegen die Zellen, die im Falle einer klinischen oder subklinischen Gebärmutterentzündung zu den oben beschriebenen Konzeptionsstörungen führen können. Allein diese zytotoxischen Effekte sind potentiell für den Einsatz von SP-Komponenten oder analogen Wirkstoffen in biotechnologischen Anwendungen in Betracht zu ziehen.

In den Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass SP in der Lage ist, die ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten zu reduzieren (s. 4.3.2). Eine humanmedizinische Studie von KIM und PARTHASARATHY (1998) macht die von PMN und Spermatozoen generierten ROS für irreparable Membranschädigungen bei

Spermatozoen verantwortlich. In der Folge wirkt sich dies negativ auf Motilität und Morphologie der Spermatozoen sowie auf die Spermatozoon-Oozyten-Fusion aus (ALVAREZ u. STOREY, 1982; AITKEN et al. 1989; AITKEN et al. 1994). Die Reaktion der mit PMA zur ROS-Bildung angeregten PMN wurde schon durch die Zugabe sehr geringer Mengen SP signifikant unterdrückt. Dieselbe deutliche Reaktion nach Zugabe von SBS lässt den Schluss zu, dass Bestandteile aus der Samenblasendrüse direkt an der antioxidativen Reaktion beteiligt sind. LAZAREVIC et al. (1995) zeigten, dass extrazelluläre sekretorische Vesikel im SP PMN-Funktionen in-vitro beeinträchtigen. Der Bildungsort dieser Membranvesikel ist bisher nicht geklärt. AGRAWAL und VANHA-PERTTULA (1987) vermuten die Herkunft der von ihnen untersuchten Vesikel in der Samenblasendrüse von Bullen. Sie sprechen diesen eine Rolle bei der Akrosomenreaktion sowie einen unterstützenden Einfluss auf die Spermatozoenmotilität zu. Es ist zu beachten, dass die anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata und Bulbourethraldrüse) in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurden, da sie sich für eine Präparation nicht eigneten. Der die Chemotaxis hemmende Einfluss von SP und SBS ist in allen beschriebenen Experimenten jedoch deutlich und zwischen beiden vergleichbar erkennbar: Mit Zugabe minimaler Dosen sowohl von SP als auch von SBS wurde die durch den Lockstoff IL-8 ausgelöste PMN-Migration effektiv geblockt (s. 4.3.3). Bei dem bedingt geeigneten Vergleich von SP und SBS eines Bullen (s. Tab.4) deutet sich ein höheres chemotaxishemmendes Potential bei SBS an (höhere Verdünnungen). Damit liegt die Vermutung nahe, dass das PMN-hemmende Potential von SP seine Quelle v.a. im SBS hat und die Sekrete der anderen akzessorischen Geschlechtsdrüsen diesbezüglich möglicherweise einen verdünnenden Effekt haben. Für die Nutzung der beiden Sekrete in der weiteren Forschung z.B. zum Design effektiver Verdünnermedien sind diese Erkenntnisse zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von SP auf funktionelle Eigenschaften von PMN sowohl interindividuell als auch intraindividuell z.T. relativ deutlich differierte. Selbst die Ejakulate eines Bullen variierten tagesabhängig sowie von Sprung zu Sprung. Um einen Bullen bzw. sein SP bezüglich der hier diskutierten Eigenschaften bewerten zu können, müssen mehrere Ejakulate eines Bullen über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Ursache für Variationen in der Seminalplasmazusammensetzung können z.B. saisonale Einflüsse, Fütterungseinflüsse oder Wartezeiten zwischen einzelnen

Ejakulationen sein (SETCHELL et al. 1994). Auch proteolytische Enzyme im SP, die eine Freisetzung von Peptiden und Aminosäuren bewirken sowie die Stoffwechselaktivität der im SP vorhandenen Spermatozoen können beträchtliche Variabilitäten hervorrufen (SETCHELL et al. 1994). Letzteres konnte in eigenen Versuchen zur unterschiedlichen Lagerung des SP (s. Abb.7A+B) nachvollzogen werden. Die SP-Proben, dies als Ejakulat gelagert waren (s. Abb.7B) konnten die PMN-Migration schon bei niedrigen Verdünnungsstufen kaum hemmen, während das gelagerte abzentrifugierte SP eine deutliche Inhibition hervorrief (s. Abb.7A). Für die ausbleibende Hemmwirkung auf die PMN-Migration kann die Stoffwechselaktivität und damit der Verbrauch von SP-Bestandteilen durch die im Ejakulat enthaltenen Spermatozoen ursächlich in Betracht gezogen werden. Die Erkenntnisse über die PMN-beeinflussenden Effekte des SP lassen vermuten, dass eine potentielle dosisabhängige SP-Schutzwirkung für das Überleben und den Erhalt der funktionellen Potenz der Spermatozoen in einem bereits entzündlich veränderten Uterus besteht. Über einzelne Seminalplasmafaktoren, die für diese Effekte verantwortlich sind, lassen sich zu diesem Zeitpunkt keine konkreten Aussagen treffen. An potentiell antioxidativ wirksamen Substanzen ist im SP von Wiederkäuern Ascorbinsäure in einer Konzentration von 0,3 mmol/ml nachgewiesen worden (SETCHELL et al. 1994). Der hoch konzentrierte Anteil an Zitronensäure (18-52 mmol/ml) stammt vorwiegend aus dem Sekret der Samenblasendrüse. Eine neuere in-vitro-Studie beim Schwein von TAYLOR et al. (2007b) bestätigt auch bei dieser Spezies einen deutlich hemmenden Effekt von SP in geringen Konzentrationen auf die PMN-Migration. Außerdem stellten die Autoren fest, dass im Verdünnermedium Androhep™ vorhandene Zitronensäure für die Hemmung der Granulozytenwanderung hauptverantwortlich zu sein scheint.

Weitergehende Studien zur Identifizierung von PMN-modulierenden Wirkstoffen im SP scheinen deshalb auch beim Rind lohnenswert.

5.3.2 Einfluss der pbUEZ auf PMN und Spermatozoen in-vitro

Im Schrifttum gibt es Hinweise für eine IL-8-Sekretion durch pbUEZ, die zu einem verstärkten PMN-Einstrom in den Uterus führen kann (KAYSILI et al. 2003; SHEN et al. 2004). Mit entsprechenden Kokulturversuchen sollten in der vorliegenden Arbeit erste Erkenntnisse gewonnen werden, wie etwaige Sekretionsprodukte der uterinen

Epithelzellen, insbesondere im Falle einer entzündlichen Situation, auf lokale PMN und Spermatozoen wirken können. Die Analyse der Kulturüberstände im ELISA ergab die stärkste IL-8-Freisetzung bei einer Koinkubation von pbUEZ mit vitalen PMN (s. 4.4.1). Dabei zeigte sich ein beträchtlicher modulierender Einfluss von FKS im Kulturmedium. Dass es sich um eine kokulturabhängige Produktion von IL-8, also um eine Interaktion zwischen PMN und pbUEZ handelt, beweisen die Ergebnisse der jeweiligen Einzelansätze, wo nur sehr geringe IL-8-Konzentrationen gemessen wurden. Die Tatsache, dass die Koinkubation von pbUEZ sowohl mit LPS als auch mit vitalen PMN eine deutlich messbare IL-8-Konzentration im Kulturmedium erbrachte, legt nahe, dass die pbUEZ für die Synthese und Sekretion des Zytokins verantwortlich sind. In anderen Geweben konnte die IL-8-Ausschüttung beim Rind bereits nachgewiesen werden. BOUDJELLAB et al. (2000) beschrieben die erfolgreiche Stimulation mammärer Epithelzellen zur IL-8-Sekretion durch LPS und IL-1 in-vitro, während SHUSTER et al. (1997) bei einer *Escherichia coli*-induzierten Mastitis eine Komplement- sowie Zytokinausschüttung des Milchdrüsenepithels beobachteten.

Im nächsten Schritt sollte im Biosassay in vitro modellhaft geprüft werden, wie sich die Kokultur von pbUEZ mit relevanten zellulären und löslichen Komponenten auf die chemoattraktive Wirkung des Uterussekrets auswirken kann. Für die Transmigrationsversuche mit Überständen aus pbUEZ-Kokulturen wurden nur Präparationen ohne FKS im Medium verwendet. Grund ist die Beobachtung, dass FKS auch alleine, ohne eine Koinkubation mit Zellen, chemoattraktiv für PMN ist. Der Einsatz der in diesen Versuchen generierten Kokulturüberstände in der Transmigrationskammer lässt folgende Schlussfolgerungen zu (s. 4.4.2.1): Zellkulturmedium unstimuliert koinkubierter pbUEZ bewirkt verglichen mit der Positivkontrolle (IL-8, 100 ng/ml) bereits eine 50%ige PMN-Migration, die offenbar abhängig von der Kulturcharge ist. Da im IL-8-ELISA jedoch für diesen Ansatz keine IL-8-Ausschüttung gemessen werden konnte (s. 4.4.1), scheint für die Auslösung der PMN-Migration ein anderer Lockstoff als IL-8 verantwortlich zu sein. Die Beteiligung eines zweiten Chemoattraktivums wird zudem durch das Ergebnis bestärkt, dass beim Transmigrationsversuch mit dem Kulturüberstand aus mit pbUEZ kokultivierten toten PMN 100% der Granulozyten wanderten, während im IL-8-Assay für denselben Ansatz nur niedrige IL-8-Werte gemessen wurden. Die Anwesenheit von LPS in

verschiedenen Konzentrationen in den Kokulturen mit pbUEZ resultierte auch in einer konzentrationsabhängig effektiveren PMN-Migration. Bei pbUEZ-PMN-Kokulturen mit unterschiedlichen PMN-Konzentrationen wurde eine starke Anlockung von PMN durch die Überstände festgestellt. Die PMN-Zahl in der Kokultur war maßgeblich für den nachgeordneten Transmigrationserfolg. Damit lassen sich persistierende uterine Entzündungen erklären, bei denen sich der Entzündungsprozess laufend durch Rekrutierung weiterer PMN selbst aufrecht erhält. Insgesamt scheint das Transmigrationssystem als Bioassay sensitiver auf die Probenansätze zu reagieren, als der kommerzielle IL-8-ELISA. Letzterer wurde zwar nicht explizit für bovines IL-8 getestet, in einigen Studien (SHUSTER et al. 1997; BOUDJELLAB et al. 2000) aber bereits für die Untersuchung des bovinen Zytokins eingesetzt.

Auf die Vitalität der Spermatozoen nahmen die Kokulturüberstände tierindividuell und zeitabhängig Einfluss (s. 4.4.2.2). Bekannt ist dazu, dass humane Spermatozoen in einer Kokultur mit humanen oder bovinen Eileiterepithelzellen eine höhere Vitalität und Motilität aufwiesen als bei alleiniger Kultur (ELLINGTON et al. 1998). Der zeitabhängige Vitalitätsverlust der Spermatozoen im hier vorgestellten Experiment beruhte sicherlich teilweise auf den für die Spermatozoen nicht optimalen Bedingungen im Zellkulturmedium. Die Anzahl der vitalen Spermatozoen nahm allerdings bei einem der Bullen durch Inkubation mit Kokulturüberständen von pbUEZ mit und ohne PMN signifikant ab, während der zweite Proband eine stabile Spermatozoenvitalität aufwies. Die Ergebnisse sind damit als orientierende Erstbeobachtungen zu bewerten, die jedoch ein großes Potential für weiterführende Studien andeuten, welche Erklärungen für die komplexe uterine Situation im Falle einer KB bei bestehender Endometritis liefern können.

5.4 Wissenschaftliche und praktische Bedeutung der Resultate für die künstliche Besamung

Ergebnisse aus Studien bei Schwein und Pferd (ROZEBOOM et al. 1998; WOELDERS u. MATTHIJS 2001; GÖRGENS et al. 2005a,b) die zeigten, dass nach KB eine starke immunologische uterine Reaktion auf das Inseminat stattfindet, erforderten die Überprüfung etwaiger besamungsbedingter, möglicherweise spermaschädlicher Immunreaktionen auch beim Rind. Vor dem Hintergrund, dass

vermehrt Bullensperma mittels neuer Besamungstechniken, z.B. tief intrauterin, teilweise gesext sowie in hoher Verdünnung eingesetzt wird, erhöhte den Bedarf an Detailkenntnissen über die intrauterine Situation nach KB. Entsprechende in-vivo-Versuche mit unterschiedlichen Spermapräparationen wurden in einem Parallelprojekt durch einen Kooperationspartner bereits durchgeführt (WENDT 2007). Diese ergaben kaum Hinweise auf eine immunologisch induzierte Selektionsfunktion des bovinen Uterus gegenüber Spermatozoen. Aus reproduktionsphysiologischer Sicht scheint dies auch nicht zwingend notwendig, da der Bulle als „Scheidenbesamer“ das Ejakulat in der Vagina absetzt. Auf ihrem Weg in das Gebärmutterlumen werden die Spermatozoen bereits bei der Zervixpassage mechanischen und biochemischen Selektionsmechanismen unterzogen (s. auch Resultate, KARABINUS u. SAACKE 1987; MULLINS u. SAACKE 1989; SENGER 1993). So gelangt nur eine ausgewählte Spermatozoen-Fraktion in den Uterus. Der Brunstscheid spielt bei dieser Selektion eine entscheidende Rolle (MATTNER 1966; MITCHELL et al. 1985; KARABINUS u. SAACKE 1987).

Der in dieser Arbeit beschriebene ex-vivo-Versuch (s. 4.2) zeigte, dass Spermatozoen vor allem im Zervikalschleim, aber auch im Uterussekret gefunden werden können. Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von WENDT (2007), der in der Uterusspülflüssigkeit 6 h nach KB keine Spermatozoen mehr nachweisen konnte. Dieser Unterschied erklärt sich offenbar durch die sehr früh nach KB durchgeführte ex-vivo-Analyse in der vorliegenden Arbeit (30-60 min nach KB). Dies lässt den Schluss auf eine bislang offenbar unterschätzte Dynamik in der Spermatozoenwanderung bzw. -elimination zu. Eine weitere Annäherung an die physiologischen Verhältnisse im Rinderuterus könnte die Erweiterung der Zellkulturversuche um uterines Drüsenepithel erbringen. Offensichtlich hat die Schleimproduktion besonders im Östrus eine essentielle Bedeutung im Bezug auf die Reproduktionsleistung des Rindes.

Beim Rind kommt es also in Abhängigkeit von der Insemination zu keiner verstärkten immunologischen Reaktion des Uterus im Sinne des für andere Spezies typischen PMN-Influx (WENDT 2007). In den letzten Jahren wurden jedoch eine Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten veröffentlicht, die eine überraschend hohe Prävalenz subklinischer Endometritiden und deren eindeutigen Zusammenhang mit verringerten Fertilitätsraten belegen (GILBERT et al. 2005; KASIMANICKAM et al. 2004; LINCKE et al. 2006). Unter Praxisbedingungen ist es allerdings äußerst schwierig, diese

Diagnose zu stellen (LENZ et al. 2006). Man muss auch für die Zukunft davon ausgehen, dass eine große Anzahl von Kühen mit bestehender subklinischer Endometritis besamt wird. Die hier vorgestellten Experimente zum Einfluss von Inseminatbestandteilen auf PMN-Funktionen wurden deshalb durchgeführt, um erste Anhaltspunkte für neue methodisch-biotechnologische Wege zu bekommen, die es ermöglichen, durch eine optimierte Gestaltung der Inseminatbestandteile trotz eines vorhandenen Entzündungsgeschehens verbesserte Fruchtbarkeitserfolge zu erreichen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten das protektive Potential von Seminalplasma für Spermatozoen gegenüber einem von Entzündung geprägten Uterusmilieu an. Die Kapazität aktivierter PMN zur Produktion Spermatozoenschädlicher ROS wird durch SP ebenso herunterreguliert wie auch die PMN-Migrationsfähigkeit. Letztere Beobachtung gibt Anlass zur Hoffnung, dass die sich selbst unterhaltende subklinische Endometritis durch Rekrutierung von PMN durch aktivierte PMN von Seminalplasmakomponenten unterbrochen werden kann. Der Verdünnungseffekt einzelner SP-Komponenten, der bei der Konfektionierung von Besamungspailletten jedes Ejakulates auftritt, muss deshalb kritisch hinterfragt werden. In den hier dargestellten Experimenten wurde mit SP-Volumina gearbeitet, die den potentiellen Konzentrationen pro Paillette entsprechen. Eine weitere Ausverdünnung der Ejakulate zur Erhöhung des wirtschaftlichen Ertrages pro Sprung könnte sich negativ auf die positiven Effekte des SP und die Fertilitätsraten auswirken. Dagegen könnte der gezielte Zusatz natürlicher oder entsprechender synthetischer Seminalplasmakomponenten die Situation verbessern. Aus diesem Grund sollten in Nachfolgeprojekten die beobachteten Effekte in vivo validiert und die Wirkstoffe identifiziert werden.

6 Zusammenfassung

Susanne Lechner (2008): Interaktionen von Inseminatbestandteilen mit Epithelzellen und Leukozyten im Uterus des Rindes

Subklinische Endometritiden sind bei einem hohen Prozentsatz von Kühen evident und stellen vor allem in Hochleistungszuchten bedingt durch verringerte Fertilitätsraten ein wirtschaftliches Problem dar. In der vorliegenden Studie wird anhand eines vereinfachten in-vitro-Modells geprüft, ob bei der künstlichen Besamung von Kühen mit subklinischer Endometritis eingebrachte Inseminatbestandteile einen Einfluss auf das entzündliche Geschehen im Uterus haben.

Hierzu wurde eine Kultur primärer boviner Uterusepithelzellen (pbUEZ) etabliert, die nach einer one-step-TG-Konservierungsmethode wieder aufgetaut wurde und binnen 4-6 Tagen zu 90%iger Konfluenz und damit zum Einsatz für Kokultivierungsversuche führte. Zur Quantifizierung der in einer Transmigrationskammer gewanderten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) wurde ein interner Standard definiert. Er diente zur Vergleichbarkeit des unterschiedlichen Migrationsverhaltens der einzelnen PMN-Präparationen aus peripherem Blut.

Mittels eines ex-vivo-Versuchs wurde anhand der Präparation besamter und 30-60 min nach KB geschlachteter Kühe die Lokalisation von Spermatozoen untersucht. Überwiegend fanden sich Spermatozoen in den Schleimfraktionen von Zervix sowie kontra- und ipsilateralem Uterushorn. Auch durch nachfolgende Spülungen mit PBS ließen sich keine weiteren Spermatozoen mehr gewinnen.

Potentielle modulierende Einflüsse von Seminalplasma (SP) und Samenblasendrüsensekret (SBS) auf PMN-Funktionen wurden überprüft. Dabei zeigte die Zugabe von SP (n=10) zu PMN-Suspensionen (2×10^6 /ml) in Konzentrationen von 0,06‰ bis 3% erst ab einer Konzentration von 0,19% eine signifikante ($p < 0.05$) Erhöhung zellmembrangeschädigter PMN. Somit kommt SP eine zytotoxische Bedeutung zu. Der Zusatz von SP oder SBS zu einer mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) stimulierten PMN-Zellsuspension vermindert auch die Fähigkeit der PMN zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). So bewirkte schon die Zugabe von 0,6‰ SP (n=10) eine signifikante Reduktion der ROS-Produktion um 30% gegenüber der Positivkontrolle. Diese starke antioxidative

Wirkung konnte mit SBS (n=4) auf selbem Niveau nachvollzogen werden. Die durch rhIL-8 (100 ng/ml; Positivkontrolle) induzierte PMN-Transmigration wurde sowohl durch SP als auch durch SBS dosisabhängig signifikant gehemmt. Im Mittel wurde bei einer Zugabe von 0,16 µl (0,4‰) von SP (n=10) die PMN-Migration um 50% reduziert. Derselbe Effekt konnte durch Zugabe von SBS (n=7) bei annähernd gleichen Volumina (0,18 µl; 0,4‰) erreicht werden.

Der prozentuale Anteil gewanderter PMN variierte für an 4 Tagen gewonnenen SP-Chargen abhängig vom eingesetzten Volumen von 9% - 38%. Bei SP von 4 binnen 5 h konsekutiv gewonnenen Ejakulaten eines Bullen war unabhängig von der gewählten Verdünnungsstufe kein systematischer Unterschied der PMN-Migrationshemmung feststellbar. Die Hemmwirkung ließ nach, wenn das SP nicht unmittelbar aus dem Ejakulat gewonnen wurde. Eine Lagerung über 24 h bei 4°C von separiertem SP war hingegen dem ungelagert eingefroren/aufgetautem SP vergleichbar.

Zur Untersuchung der Reaktion von pbUEZ auf den Kontakt mit PMN, SP und Lipopolysaccharid (LPS) wurden Koinkubationen über 10-16 h durchgeführt. Anschließend wurden die Kulturüberstände auf die Bildung des für PMN stark chemoattraktiven IL-8 überprüft. pbUEZ produzierten nur in Kokultur mit einem Stimulans (PMN, LPS) messbare IL-8-Konzentrationen. Hierbei regten vitale PMN (1×10^6 /ml) die Zellen am stärksten an (31fach gegenüber dem Nullwert, 5fach gegenüber toten PMN (1×10^6 /ml), 2fach gegenüber LPS (1 µg/ml)). Das serumhaltige (10% fetales Kälberserum, FKS) Zellkulturmedium erwies sich dabei als stark stimulationsfördernd. Per se übte es jedoch keinen Einfluss auf die IL-8-Produktion der pbUEZ aus.

Für den Einsatz in der Transmigrationskammer kamen hingegen nur serumfreie Kokulturüberstände in Frage, da das zugesetzte FKS für PMN selbst chemoattraktiv wirkte. Der Überstand aus mit serumfreien Medium inkubierten pbUEZ zeigte mit 50% migrierten PMN beträchtliche Chemoattraktivität. Eine Koinkubation von pbUEZ mit SP blockierte diesen lockenden Einfluss vollkommen. Kokulturüberstände von vitalen PMN sowie LPS mit pbUEZ veranlassten PMN in der Transmigrationskammer konzentrationsabhängig unterschiedlich stark zur Wanderung (bis 100%). Auch tote PMN lockten vergleichbar der Positivkontrolle (100%).

Eine Wirkung von pbUEZ-PMN-Kokulturüberständen auf Spermatozoen ($2,5 \times 10^6$) wurde in einem Tastversuch (n=2) bei einem Bullen festgestellt. Eine 0,5 h

Koinkubation reduzierte den Anteil vitaler, nicht akrosomenreagierter Spermatozoen von 29% auf 20% (n=1). Der zweite Bulle blieb hingegen unbeeinflusst.

Bei Annahme durchschnittlicher Ejakulatmengen (8 ml, 75% SP, Dichte $1,2 \times 10^6 / \mu\text{l}$, verdünnt abgefüllt in 480 Pailletten) werden durch transzervikale KB also ca. 12 μl SP im Uterus deponiert. Dies entspricht dem 1000fachen der in der vorliegenden in-vitro-Studie wirksamen mittleren Dosis von SP.

Die erarbeiteten Ergebnisse deuten das protektive Potential von Seminalplasma für Spermatozoen gegenüber einem von Entzündung geprägten Uterusmilieu an.

7 Summary

Susanne Lechner (2008): Interactions of inseminate components with epithelial cells and leukocytes in the bovine uterus

Evidentially a high percentage of cows suffers from subclinical endometritis. This leads to lower fertility rates and represents a significant economic challenge especially in high producing herds. The present study examines the impact of inseminate components brought into the inflammatory uterine environment of cows with subclinical endometritis via artificial insemination by using a simple in-vitro model.

For this we established a culture of isolated primary bovine uterine epithelial cells (pbUEC). The pbUEC were preserved in a one-step frozen-thawed storage method. In the time of 4-6 days, after reaching 90% confluency, the cells were ready for cocultural experimentation usage. Besides an internal standard was defined to quantify the number of polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN) that migrated within a transmigration chamber system. This standard served to draw comparison between various migration rate performances of single PMN preparations from peripheral blood.

An ex-vivo trial with prepared uteri of cows that were artificially inseminated 30-60 min prior to slaughter showed the localization of spermatozoa. Predominantly the spermatozoa were found in mucus fractions of the cervix as well as of the contralateral and ipsilateral uterine horn. Even subsequent flushings with PBS did not ascertain further spermatozoa.

Initially potential modulating influences of seminal plasma (SP) and seminal vesicle fluid (SVF) on PMN functions were analysed. The addition of SP (n=10) to PMN cell suspensions (2×10^6 /ml) in concentrations of 0.06‰ to 3% did not reveal any significant ($p < 0.05$) rise of cell membrane damaged PMN in concentrations of less than 0.19%. Thus illustrated the cytotoxic effect of SP. Adding SP or SVF to a PMN cell suspension stimulated with PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) also reduced the ability of PMN to produce reactive oxygen species (ROS). Inserting 0.06‰ SP (n=10) already caused a significant reduction of ROS production by 30% compared to the positive control. A repeatability of this strong antioxidative effect on a similar level was reached with SVF (n=4). The PMN transmigration induced by rhIL-8 (100

ng/ml; positive control) was inhibited significantly by SP as well as by SVF depending on their dose. On average the PMN migration was reduced by 50% adding 0.16 μl (0,4‰) of SP (n=10). An identical effect was attained with addition of SVF (n=7) using almost equal volumes (0.18 μl ; 0,4‰).

Depending on the inserted SP quantity, the percentage of migrated PMN varied from 9% to 38% for SP charges collected on 4 different days. Independent of the chosen dilution, no systematic variations in inhibiting PMN migration could be found in SP acquired from 4 ejaculates of one bull consecutively taken within 5 h. The inhibiting agency decreases when SP is not separated directly from the ejaculate. The storage effect of isolated SP for 24 h at 4°C can be compared to non-stored frozen-thawed SP.

Coincubating tests of 10 to 16 h were accomplished to study the reaction of pbUEC brought in contact with PMN, SP and Lipopolysaccharid (LPS). Afterwards the culture supernatants were tested on their production of IL-8 which is known as a strong chemoattractant for PMN. pbUEC produced measurable IL-8 concentrations in coculture with a stimulant (PMN, LPS) only. Vital PMN (1×10^6 /ml) stimulated the cells in the strongest way (31 times compared to the blank value, 5 times compared to dead PMN (1×10^6 /ml), 2 times compared to LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)). In this connection cell culture medium containing serum (10% Fetal calf serum, FCS) turned out to be highly stimulating. FCS alone did not have any influence on the IL-8 production of pbUEC.

Since FCS itself acted as a chemoattractant for PMN, only serum free coculture supernatants were relevant for an application in the transmigration chamber. The supernatant resulting from serum free medium incubated with pbUEC proved a considerable attraction of 50% migrated PMN. Coincubation of pbUEC with SP totally blocked this strong influence. Coculture supernatants of vital PMN and LPS with pbUEC caused a dose dependent PMN migration (up to 100%). Dead PMN caused a migration comparable to the positive control (100%).

In a first attempt (n=2) an effect of pbUEC-PMN-coculture supernatants on spermatozoa (2.5×10^6) was noticed in one bull. 0.5 h of coincubation reduced the rate of vital, non acrosome reacted spermatozoa from 29% to 20% (n=1). However, the second examined bull remained unaffected.

Assuming average ejaculate quantities (8 ml, 75% SP, density 1.2×10^6 / μl , diluted and filled into 480 straws) approximately 12 μl SP are deposited in the uterus by

transcervical insemination. This is equivalent to a multiplication factor of 1,000 of the average effective SP dose in the presented in-vitro study.

The elaborated results imply a protective potential of SP for spermatozoa meeting an inflammatory uterine environment.

8 Literaturverzeichnis

AGRAWAL, Y. u. T. VANHA-PERTTULA (1987):

Effect of secretory particles in bovine seminal vesicle secretion on sperm motility and acrosome reaction.

J. Reprod. Fertil. 79, 409-419

AITKEN, R.J., J.S. CLARKSON u. S. FISHEL (1989):

Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm.

Biol. Reprod. 41, 189-197

AITKEN, R.J. u. H.FISHER (1994):

Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk.

Bioessays 16, 259-267

ALGHAMDI, A.S., D.N. FOSTER u. M.H. TROEDSSON (2004):

Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri.

Reproduction 127, 593-600

ALLEN, R.D. u. T.K. ROBERTS (1986):

The relationship between the immunosuppressive and cytotoxic effects of human seminal plasma.

Am. J. Reprod. Immun. Microbiol. 11, 59-64

ALVAREZ, J.G. u. B.T. STOREY (1982):

Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility.

Biol. Reprod. 27, 1102-1108

ALVAREZ, J.G. u. B.T. STOREY (1983):

Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility.

Biol. Reprod. 29, 548-555

ALVAREZ, J.G. u. B.T. STOREY (1989):

Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation.

Gamete Res. 23, 77-90

BAAS, J.W., P.C. MOLAN u. P. SHANNON (1983):

Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 68, 275-280

BILODEAU, J.F., S. BLANCHETTE, C. GAGNON u. M.A. SIRARD (2001):

Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen.

Theriogenology 56, 275-286

- BISCHOF, R.J., M.R. BRANDON, C.S. LEE u. E. MUSEEN (1994):
Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma.
J. Reprod. Immunol. 26, 131-146
- BORSBERRY, S. u. H. DOBSON (1989):
Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds.
Vet. Rec. 124, 217-219
- BOUDJELLAB, N., H.S. CHAN-TANG u. Z. ZHAO (2000):
Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8.
Comp. Biochem. Physiol. Part A 127, 191-199
- CLARK, A. u. S.J. KLEBANOFF (1976):
Generation of a neutrophil chemotactic agent by spermatozoa: role of complement and regulation by seminal plasma factors.
J. Immun. 117, 1378-1386
- DE MORAES, A.A.S., F.F. PAULA-LOPES, N. CHEGINI u. P.J. HANSEN (1999):
Localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the bovine reproductive tract.
J. Reprod. Imm. 42, 135-145
- DROBNIS, E.Z. u. J.W. OVERSTREET (1992):
Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproduction tract.
Oxf. Rev. Reprod. Biol. 14, 1-45
- ELLINGTON, J.E., A.E. JONES, C.M. DAVITT, C.S. SCHNEIDER, R.S. BRISBOIS, G.A. HISS u. R.W. WRIGHT JR (1998):
Human sperm function in co-culture with human macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers.
Human Reprod. 13 (10), 2797-2804
- ENGELHARDT, H., B.A. CROY u. G.J. KING (1997):
Role of uterine immune cells in early pregnancy.
J. Reprod. Fertil. 52, Suppl. 115-131
- ENGELKE, F., H. ZERBE, E. KLUG u. W. LEIBOLD (1999):
A new model system for endometritis in mares – preliminary results.
Pferdeheilkunde 6, 579-583
- FAHMI, H.A., A.G. HUNTER, R.J.F. MARKHAM u. B.E. SEGUN (1985):
Immunosuppressive activity of bovine seminal plasma on bovine lymphocytes in vitro.
J. Dairy Sci. 68, 2315-2321
- FOOTE, R.H., C.C. BROCKETT u. M.T. KAPROTH (2002):
Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants.
Anim. Reprod. Sci. 71, 13-23

- FORTIER, M.A., M. BOULANGER, A.P BOULET u. R.D. LAMBERT (1987):
Cell specific localization of prostaglandin E2 sensitive adenylate cyclase in rabbit endometrium.
Biol. Reprod. 36, 1025-1033
- FORTIER, M.A., L.A. GUIBAULT u. F. GRASSO (1988):
Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows.
J. Reprod. Fertil. 83, 239-248
- FRANK, J. (2000):
Wanderungsverhalten neutrophiler Granulozyten in einem Transmigrationsverfahren.
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Dissertation
- GARNER, D.L., D.A. THOMAS, C.G. GRAVANCE, C.E. MARSHALL, J.M. DELAMETTE u. C.H. ALLEN (2001):
Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm.
Theriogenology 56, 31-40
- GILBERT, R.O., S.T. SHIN, C.L. GUARD, H.N. ERB u. M. FRAJBLAT (2005):
Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows.
Theriogenology 64, 1879-1888
- GÖRGENS, A., W. LEIBOLD, E. KLUG, H.J. SCHUBERTH, G. MARTINSSON u. H. ZERBE (2005a):
Influence of repeated artificial insemination (IS) on functional properties of uterine neutrophils of mares.
Anim. Reprod. Sci. 89, 258-261
- GÖRGENS, A., W. LEIBOLD, E. KLUG, H.J. SCHUBERTH, G. MARTINSSON u. H. ZERBE (2005b):
Inseminate components are modulating the chemotactic activity of uterine polymorphonuclear granulocytes (PMN) of mares.
Anim. Reprod. Sci. 89, 308-310
- GWATHMEY, T.M., G.G. IGNOTZ, J.L. MUELLER, P. MANJUNATH u. S.S. SUAREZ (2006):
Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDA share functional roles in storing sperm in the oviduct.
Biol. Reprod. 75, 501-507
- HAMMON, D.S., G.R. HOLYOAK, J. JENSON u. H.R. BINGHAM (2001):
Effects of endometritis at the beginning of the breeding period on reproductive performance in dairy cows.
Proceedings of the 34th Conf. Am. Ass. Bovine Pract. Vancouver, Canada, 13.-15. September 2001, 142-143
- HAWK, H.W. (1983):
Sperm survival and transport in the female reproductive tract.
J. Dairy Sci. 66, 2645-2660

HAWK, H.W. (1987):

Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle.

J. Dairy Sci. 70, 1487-1503

HERATH, S., D.P. FISCHER, D. WERLING, E.J. WILLIAMS, S.T. LILLY, H. DOBSON, C.E. BRYANT u. I.M. SHELDON (2006):

Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus.

Endocrinology 147(1), 562-570

HYTTEL, P. (1985):

The epithelium of uterine biopsies from cyclic dairy cattle: ultrastructure and endocytotic activity.

Acta anat. 123, 93-100

JANEWAY, J.R., C.A., P. TRAVERS, M. WALPORT u. M.J. SHLOMCHIK (Hrsg.) (2002):

Immunologie.

5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

KARABINUS, D.S. u. R.G. SAACKE (1987):

Selection of spermatozoa across the bovine cervix.

J. Dairy Scil. 70 (Suppl.), 248.

KASIMANICKAM, R., T.F. DUFFIELD, R.A. FOSTER, C.J. GARTLEY, K.E. LESLIE, J.S. WALTON u. W.H. JOHNSON (2004):

Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows.

Theriogenology 62, 9-23

KATILA, T. (1997):

Interactions of the uterus and semen.

Pferdeheilkunde 13, 508

KAYISLI, U.A., R. DEMIR, G. ERGULER u. A. ARIKI (2002):

Vasodilator-stimulated phosphoprotein expression and its cytokine-mediated regulation in vasculogenesis during human placental development.

Mol. Hum. Reprod. 8, 1023-1030

KIM, J.G. u. S. PARTHASARATHY (1998):

Oxidation and the spermatozoa.

Seminars Reprod. Endocrin. 16 (4), 235-239

KOTILAINEN, T., M. HUHTINEN u. T. KATILA (1994):

Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus.

Theriogenology 41, 629-636

LARSSON, B. (1986):

Transuterine transport of spermatozoa after artificial insemination in heifers.

Anim. Reprod. Sci. 12, 115-122

- LAZAREVIC, M., G. SKIBINSKI, R.W. KELLY u. K. JAMES (1995):
Immunomodulatory effects of extracellular secretory vesicles isolated from bovine semen.
Vet. Immun. Immunopath. 44, 237-250
- LE BLANC, M.M. (1997):
Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid.
Pferdeheilkunde 5, 483-485
- LE BLANC, S.J., T.F. DUFFIELD, K.E. LESLIE, K.G. BATEMAN, G.P. KEEFE u. J.S. WALTON (2002):
Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows.
J. Dairy Sci. 85, 2223-2236
- LENZ, M., M. DRILLICH u. W. HEUWIESER (2007):
Evaluation of diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle with ultrasound.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 237-244
- LIEBICH, H.G. (1993):
Funktionelle Histologie.
2. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 117-120
- LINCKE, A., M. DRILLICH u. W. HEUWIESER (2007):
Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on reproductive performance – a review on recent publications.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 245-250
- LIU, H.C. u. L. TSENG (1979):
Estradiol metabolism in isolated human endometrial epithelial glands and stromal cells.
Endocrinology 104, 1674-1681
- LIU, I.K.M., A.T.W. CHEUNG, E.M. WALSH, M.E. MILLER u. P.M. LINDENBERG (1985):
Comparison of peripheral blood 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
- LOVELL, J.W. u. R. GETTY (1968):
Fate of semen in the uterus of the sow: histologic study of endometrium during 27 hours after natural service.
Am. J. Vet. Res. 29, 609-625
- MARKUSFELD, O. (1987):
Periparturient traits in seven high performance dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits.
J. Dairy Sci. 70, 158-164

MARONI, E.S., D.N.K. SYMON u. P.C. WILKINSON (1972):

Chemotaxis of neutrophil leukocytes towards spermatozoa and seminal fluid.

J. Reprod. Fertil. 28, 359-368

MATTHIJS, A., W. HARKEMA, B. ENGEL u. H. WOELDERS (2000):

In vitro phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows.

J. Reprod. Fertil. 120, 265-273

MATTHIJS, A., B. ENGEL u. H. WOELDERS (2003):

Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender.

Reproduction 125, 357-367

MATTNER, P.E. (1966):

Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant.

Nature 212, 1479.

MC CORMACK, S.A. u. S.R. GLASSER (1980):

Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol.

Endocrinology 106, 1634-1649

MEE, J., F. BUCKLEY u. P. DILLON (2004):

Utero-ovarian status prior to first service – 1. Relationships with dairy cow fertility.

Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress, Quebec, Canada, 11.-16. Juli 2004, 99.

MEHRZAD, J., H. DOSOGNE, F. VANGROENWEGHE u. C. BURVENICH (2001):

A comparative study of bovine blood and milk neutrophil functions with luminol-dependent chemiluminescence.

Luminescence 16, 343-356

MITCHELL, J.R., P.L. SENGER u. J.L. ROSENBERGER (1985):

Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract.

J. Anim. Sci. 61, 956-967

MULLINS K.J. u. R.G. SAACKE (1989):

Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport.

Anat. Rec. 225, 106-117

MURAKAMI, S., M. SHIBAYA, K. TAKEUCHI, D.J. SKARZYNSKI u. K. OKUDA (2003):

A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells.

J. Reprod. Dev. 49, 531-538

NELSON, V.E., E.P. AALSETH, C.H. HAWMAN, G.D. ADAMS, L.J. DAWSON u. R.W. MCNEW (1987):

Sperm discharge and distribution within the cow's reproductive tract after A.I.
J. Anim. Sci. 65, suppl 1, 401

O'LEARY, S., M.J. JASPER, G.M. WARNES, D.T. ARMSTRONG u. S.A. ROBERTSON (2004):

Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig.
Reproduction 128, 237-247

OPSOMER, G., Y.T. GROHN, J. HERTL, M. CORYN, H. DELUYKER u. A. DE KRUIF (2000):

Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study.
Theriogenology 53, 841-857

PETER, A.T. u. W.T.K. BOSU (1988):

Relationship of uterine infections and folliculogenesis in dairy cows during early puerperium.
Theriogenology 30, 1045-1051

RAAB, D. (2004):

Evaluierung der Cytobrush-Methode zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden und Auswirkungen der Entzündung auf die folgende Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen.
Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation

RICKETTS, A.P., M. Hagensee und D.W. Bullock (1983):

Characterization in primary monolayer culture of separated cell types from rabbit endometrium.
J. Reprod. Fertil. 67, 151-160

ROBERTSON, S.A. (2005):

Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract.
Cell Tissue Res. 322, 43-52

ROZEBOOM, K. J., M.H.T. TROEDSSON u. B.G. CRABO (1998):

Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination.
J. Reprod. Fertil. 114, 195-199

ROZEBOOM, K.J., M.H. TROEDSSON, T.W. MOLITOR u. B.G. CRABO (1999):

The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts.
J. Anim. Sci. 77, 2201-2206

ROZEBOOM, K.J., M.H. TROEDSSON, H.H. HODSON, G.C. SHURSON u. B.G. CRABO (2000):

The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine.
J. Anim. Sci. 78, 443-448

- ROZEBOOM, K.J., G. ROCHA-CHAVEZ u. M.H.T. TROEDSSON (2001):
Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows.
Reproduction 121, 567-572
- RUCKEBUSCH, Y. u. F. BAYARD (1975):
Motility of the oviduct and uterus of the cow during the oestrous cycle.
J. Reprod. Fertil. 43, 23-32
- SCHNORR, B. (1989)
Embryologie der Haustiere.
2.Aufl. Verlag Enke, Stuttgart, S. 31-35
- SCHOPF, R.E., P. SCHRAMM, P. BENES u. B. MORSCHE (1984):
Seminal plasma-induced suppression of the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes and monocytes.
Androl. 16, 124-128
- SCOTT, M.A., I.K.M. LIU u. J. W. OVERSTREET (1995):
Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical implications.
Proc. Am. Assoc. Eq. Pract. 41, 1-2
- SENGER, P.L. (1993):
Site of semen deposition and its effect on fertility and sperm retention: a review.
Reprod. Fertil. Dev. 5, 659-663
- SETCHELL, B.P., S. MADDOCKS, D.E. BROOKS (1994)
The physiology of reproduction by E. Knobil and J.D. Neill.
Second Edition, Raven Press Ltd., New York, S. 1141-1143
- SHELDON, I.M., D.E. NOAKES, A.N. RYCROFT, D.U. PFEIFFER u. H. DOBSON (2002):
Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle.
Reproduction 123, 837-845
- SHELDON, I.M., G.S. LEWIS, S.J. LE BLANC u. R.O. GILBERT (2006):
Defining postpartum uterine disease in cattle.
Theriogenology 65(8), 1516-1530
- SHEN, L., J.V. FAHEY, S.B. HUSSEY, S.N. ASIN, C.R. WIRA u. M.W. FANGER (2004):
Synergy between IL-8 and GM-CSF in reproductive tract epithelial cell secretions promotes enhanced neutrophil chemotaxis.
Cellular immunology 230, 23-32
- SHUSTER, D.E., M.E. KEHRLI JR, P. RAINARD u. M. PAAPE (1997):
Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with Escherichia coli.
Infection and Immunity 65(8), 3286-3292

- SKARZYNSKI, D.J., Y. MIYAMOTO u. K. OKUDA (2000):
Production of prostaglandin F₂ α by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor- α : cell type specificity and intracellular mechanisms.
Biol. Reprod. 62, 1116-1120
- STEVERINK, D.W., N.M. SOEDE, E.G. BOUWMAN u. B. KEMP (1998):
Semen backflow after insemination and its effect on fertilization results in sows.
Anim. Reprod. Sci. 54, 109-119
- STRZEMIENSKI, P.J. (1989):
Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. 87, 519-528
- TAYLOR, U., D. RATH, Z. ZERBE u. H.J. SCHUBERTH (2007a):
Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage.
Reprod. Domest. Anim. (in press)
- TAYLOR, U., H.J. SCHUBERTH, D. RATH, H.W. MICHELMANN, C. SAUTER-LOUIS u. H. ZERBE (2007b):
Influence of inseminate components on porcine leukocyte migration in vitro and in vivo after pre- and post-ovulatory insemination.
Reprod. Domest. Anim. (submitted)
- THALER, C.J. (1989):
Immunological role for seminal plasma in insemination and pregnancy.
Am. J. Reprod. Immun. 21, 147-150
- TREMELLEN, K.P., R.F. SEAMARK u. S.A. ROBERTSON (1998):
Seminal transforming growth factor β 1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus.
Biol. Reprod. 58, 1217-1225
- TROEDSSON, M.H.T., A. DESVOUSGES, A.S. ALGHAMDI, B. DAHMS, C.A. DOW, J. HAYNA, R. VALESCO, P.T. COLLAHAN, M.L. MACPHERSON, M. POZOR, W.C. BUHI (2005):
Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination.
Anim. Reprod. Sci. 89, 171-186
- TROEDSSON, M.H.T., B.N. STEIGER, N.M. IBRAHIM, D.N. FORSTER, u. B.G. CRABO (1995):
Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare.
Biol. Reprod. 52, Suppl. 91
- VAN DENMARK, N.L. u. R.L. HAYS (1952):
Uterine motility responses to mating.
Am. J. Physiol. 170, 518-521

VARMA, V.A., S.A. MELIN, T.A. ADAMEC, B.H. SIEGFRIED, I.S. WALTON, L.A. CORNEY, C.R. NORTON und D.G. KAUFMAN (1982):

Monolayer cultures of human endometrium: methods of culture and identification of cell types.

In vitro 18, 911--918

VOGELPOEL, F.R. u J. VERHOEF (1985):

Activation of polymorphonuclear leukocytes by spermatozoa.

Arch. Androl. 14, 123-131

WABERSKI, D., H. KREMER, G. BORCHARDT-NETO, P.W. JUNGBLUT, E. KALLWEIT u. K.F. WEITZE (1999):

Studies on a local effect of boar seminal plasma on ovulation time in gilts.

Zentralbl. Vet. Med. 46, 431-438

WENDT, H. (2007):

Interaktionen von Spermatozoen mit Immunzellen des Rinderuterus.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Dissertation

WOELDERS, H. u. A. MATTHIJS (2001):

Phagocytosis of boar spermatozoa in vitro and in vivo.

Reprod. Suppl. 58, 113-127

ZERBE, H., H.J. SCHUBERTH, , M. HOEDEMAKER, E. GRUNERT u. W. LEIBOLD (1996):

A new model system for endometritis: basic concept and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils.

Theriogenology 46, 1339-1356

ZERBE, H., N. SCHNEIDER, W. LEIBOLD, T. WENSING, T.A.M. KRUIP u. H.J. SCHUBERTH (2000):

Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver.

Theriogenology 54, 771-786

ZERBE, H., H.J. SCHUBERTH, F. ENGELKE, J. FRANK, E. KLUG u. W. LEIBOLD (2003):

Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares.

Theriogenology 60, 209-223

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Sein persönliches Engagement für die Förderung dieses Projektes und seine fortwährende moralische und wissenschaftliche Unterstützung trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Frank Weber für die hervorragende Betreuung und die gute Zusammenarbeit, herzliche Atmosphäre und Förderung der Arbeit. Seine fachliche Kompetenz, seine kritischen Fragen, sein allzeit bereitest Ohr und seine unkomplizierte und fröhliche Art haben mir sehr geholfen, so manche Hürde zu meistern.

Für die intensive Einarbeitung, das stets gute Arbeitsklima, ihre Geduld und die jederzeit gewährleistete Hilfestellung ein riesiges Dankeschön an Frau Heidrun Mayrhofer.

Herrn Dr. Breitner und den Mitarbeitern vom Schlachthof Fürstenfeldbruck danke ich für die Bereitstellung von schlachtfrischen Uteri zur Präparation, ebenso Herrn Dr. Reichenbach und den Mitarbeitern vom Versuchstierschlachthof in Grub für die Möglichkeit zur Entnahme der akzessorischen Geschlechtsdrüsen frischgeschlachteter Bullen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Aumüller und den Mitarbeitern der niederbayrischen Besamungsgenossenschaft Landshut und Herrn Dr. Wollgarten von der Besamungsstation in Greifenberg für die Bereitstellung der Ejakulate zur Seminalplasmagewinnung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München für geduldiges Halten und Bändigen der Tiere bei der Blutentnahme sowie dem Führen der Bullen für die Spermagewinnung.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Carola Sauter-Louis für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Außerdem möchte ich mich bei unserer Lehrstuhlsekretärin Frau Radloff dafür bedanken, dass sie mir geholfen hat alle besonderen Anliegen zügig und erfolgreich zu bearbeiten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Marie Bazant, Stefanie Heil, Daniel Mehne, Martina Amberger, Eva Kemeter und Tobias Pfister, die mir nicht nur oft genug bei der Probenentnahme geholfen haben, sondern auch konstruktive Kritik, Hilfe bei Computerproblemen und nicht zu vergessen etliche Hundesitting-Stunden beigesteuert haben.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Familie und Dir, Sascha: Danke, dass ihr mich immer unterstützt und mir die Kraft gegeben habt, diese Arbeit fertigzustellen.