

Silke Braune (1993):

Immunologische Untersuchungen an Silbermöwen (*Larus argentatus*)

E. ZUSAMMENFASSUNG

Silbermöwen zählen zu Bioindikatoren mariner Ökosysteme. Innerhalb dieser Lebensräume vorhandene Schadstoffe vermögen biologische Regelkreise, zu denen auch das Immunsystem als wesentlicher Bestandteil der Arterhaltung zu rechnen ist, nachhaltig zu beeinträchtigen. In bisher durchgeführten Untersuchungen an Bioindikatoren ist jedoch der immunologische Aspekt unberücksichtigt geblieben. Daher wurden in den vorliegenden Untersuchungen erstmalig durch Prüfung unspezifischer und spezifischer Immunparameter an Silbermöwen zweier Altersgruppen Grundlagen zum immunologischen Reaktionsvermögen dieser Tiere erarbeitet. In der dem methodischen Teil der vorliegenden Arbeit vorangestellten Literaturübersicht wurden Untersuchungen zur Schadstoffbelastung (PCB's, Schwermetalle, Öl, Müll) und zum Infektionsstatus (Bakterien, Viren, Endoparasiten) der Möwen erörtert, um potentielle Störfaktoren des Immunsystems vorzustellen.

In den eigenen Untersuchungen wurde zur Prüfung unspezifischer Abwehrleistungen der Saccharomyces - Zytotoxizitätstest (SZT) eingesetzt. Die Ermittlung der zytotoxischen Leistungen peripherer Blutzellen gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* in vitro zeigte, daß sich das zytotoxische Potential des Möwenvollblutes mit 7 % bis 21 % in der gleichen Größenordnung bewegte wie das von Hühnern. Individualspezifische Extremwerte der zytotoxischen Leistungen wurden auf die immungenetische Heterogenität innerhalb der untersuchten Möwenpopulationen zurückgeführt. Der in der frühen Phase nach Antigenbelastung (NDV, SRBC) beobachtete Anstieg der Zytotoxizität des Möwenvollblutes reflektierte die Aktivität unspezifischer Immunreaktionen.

Die Prüfung zellvermittelter Immunreaktionen erfolgte durch Prüfung der Blastogenesefähigkeit im Lymphozytentransformationstest (LTT) unter Verwendung der T-Zellmitogene Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA).

Aufgrund der zahlreichen die Mitogenstimulation peripherer Blutleukozyten beeinflussenden Faktoren wurden Vorversuche unter verschiedenen experimentellen Variablen durchgeführt, um für zukünftige Untersuchungen eine standardisierte Methodik anbieten zu können. Sie wiesen zum einen die Langsamzentrifugation gegenüber der Ficoll - Technik als die schonendere Art der Leukozytengewinnung aus und zum anderen zeigten sie, daß die Zellzahl in den Leukozytenkulturen aufgrund der limitierten Blutmenge, die von den Möwen zu entnehmen war, auf 0.8×10^6 Zellen / ml begrenzt werden mußte, um die Standardisierung des LTT an den Möwen zu gewährleisten.

Im Hauptversuch wurden die mitogenstimulierten Leukozytenkulturen 48 h unter Zusatz von 10 % igem Möwenserum inkubiert und weitere 18 h unter Zusatz von ^3H - Thymidin. Die ermittelten SI lagen nach Con A - Stimulation in einem Bandbereich zwischen 0,57 und 15,32 und nach PHA - Stimulation zwischen 0,93 und 34,75. Einflüsse der geprüften Mitogenkonzentrationen (10 - 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für Con A, 20 - 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für PHA) auf den SI konnten nicht festgestellt werden. Demgegenüber wurden wiederum altersabhängige und individualspezifische Extremwerte festgestellt, die auf die immungenetische Heterogenität der Möwenpopulation hindeuteten.

In orientierenden Untersuchungen zur Ermittlung des Serumeinflusses auf die mitogeninduzierte Blastogenese stellte sich heraus, daß die Con A - Stimulation unter Serumzusatz höhere SI erbrachte und dabei die Zugabe heterologen (10 % iges SPF - Hühnerserum) gegenüber homologem Serum vorteilhafter war. Nach PHA - Stimulation wurden die höchsten Blastogeneseraten in serumfreien Leukozytenkulturen ermittelt.

Humorale Immunparameter wurden einerseits anhand der Immunglobulin-G-Bestimmung in der radialen Immundiffusion erfaßt und andererseits durch Messung spezifischer hämagglutinationshemmender Antikörper im HAH - Test nach Vaccination mit einer Newcastle Disease Virus - (NDV) - Lebendvaccine und durch Messung hämagglutinierender Antikörper im HA - Test nach Verabreichung von Schaferythrozyten (SRBC).

Die IgG - Gehalte der Möwenseren lagen im fast zweijährigen Untersuchungszeitraum durchschnittlich um 4 g/l und zeigten im Vergleich mit freilebenden Möwen signifikante Unterschiede innerhalb der untersuchten Altersstufen. Seren von freilebenden Silbermöwen - Nestlingen (2 - 3 Wochen) wiesen IgG - Gehalte zwischen 1 g/l und 2 g/l auf, Seren von freilebenden ca. 6 Monate alten Möwen IgG - Gehalte zwischen 6 g/l und 7 g/l und in den Serumproben adulter freilebender Möwen (> 4 Jahre) wurden IgG - Gehalte zwischen 4 g/l und 7 g/l ermittelt.

Die nach NDV - Vaccination ermittelten Titerkennzahlen (TKZ) blieben unterhalb der Spezifitätsgrenze des HAH - Tests. Mögliche Ursachen dieser Ergebnisse wurden diskutiert. Demgegenüber ermöglichte die Detektion der Serumantikörper nach Verabreichung der SRBC eine Beurteilung des Antikörperbildungsvermögens. Ein möglicherweise altersbedingter Unterschied in der spezifischen Immunantwort wurde festgestellt, der wie schon im LTT unter Berücksichtigung der genetischen Determination und individuellen Variabilität des immunologischen Reaktionsvermögens betrachtet wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Untersuchungsverfahren vermitteln erste Informationen über das immunologische Reaktionsvermögen von Silbermöwen und stehen somit für weiterführende Untersuchungen zur immunologischen Analytik, insbesondere an freilebenden Möwen, zur Verfügung.

Silke Braune (1993):

Immunological investigations on Herring Gulls (*Larus argentatus*)

F. SUMMARY

Herring Gulls are well recognized as bioindicators of marine ecosystems. Pollutants or microbial agents present in these ecosystems, may significantly alter biological compartments, one of which is the immune system as an elementary part of the survival of a species. Up to now investigations on bioindicators, have neglected this immunological aspect. Therefore, the experiments presented herein were performed to investigate unspecific and specific immunological parameters on two age groups of herring gulls. It was the aim of these investigations to provide basic informations on unspecific and specific immune reactivity of these animals. In the first part, a literature review is given on pollutants such as PCB's, heavy metals, oil, various wastes, and on the status of infection by bacteria, viruses, endoparasites on seagulls, which may be considered as potential factors detrimental for immune functions.

In order to investigate unspecific immune mechanisms, the saccharomyces - cytotoxicity assay was employed. Measuring the cytotoxicity of peripheral blood cells in - vitro by using saccharomyces cerevisiae as target microorganism, the cytotoxic effect of gull blood was found active in a range of 7 % until 21 %, thus exhibiting orders of magnitude in common with cytotoxicity activities known from the chicken. Individual high - or low - responders may be attributable to the immunogenetic heterogeneity within the herring gull populations under test. Following administration of Newcastle Disease Virus and Sheep Red Blood Cells as antigens, there was an increase of cytotoxicity, which may reflect an enhanced activity of unspecific immune reactions following stimulation with these antigens.

Investigations of cell - mediated immune reactions were performed by testing the ability of peripheral blood lymphocytes to undergo blastogenesis in lymphocyte - transformation tests (LTT's) using T - cell mitogens Concanavalin A (Con A) and Phytohemagglutinin (PHA).

In view of numerous factors which are known to exert an effect on in-vitro blastogenesis assays various experimental variables were investigated in order to standardize this procedure for future investigations. Slow-speed-centrifugation was found advantageous compared to Ficoll-centrifugation. Another experience of these experiments was that, in order not to exceed the amount of blood obtained from the seagulls, the LTT's had to be performed using 0.8×10^6 cells/ml.

Mitogen-stimulated leucocytes cultures were kept for 48 h in the presence of 10 % sterile filtered and heat-inactivated seagull-serum, followed by an incubation for 18 h in the presence of ^3H -Thymidin. The stimulation indices (SI) in Con A-stimulated cultures ranged between 0,57 and 15,32, in the presence of PHA between 0,93 and 34,75. Effects of the mitogen concentrations used (10 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Con A, 20 to 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for PHA) on the SI were not observed. However, individual high- and low-responders with high or low stimulation indices, respectively, were observed, possibly attributable to the immunogenetic heterogeneity of the seagull populations.

Also, preliminary investigations were performed to examine the effect of serum on the blastogenesis. Con A-stimulation resulted in higher SI in the presence of serum, especially when heterologous (10 % SPF-chicken serum) was used compared to homologous serum (seagull). The highest PHA-induced SI were observed in serum-free cultures.

Humoral immune reactivity was investigated by measuring the Immunglobulin G (IgG) content in the serum employing radial immunodiffusion and measuring the humoral immune response following vaccination with Newcastle Disease Virus as live antigen and by measuring hemagglutinating antibodies following administration of sheep red blood cells as non-multiplying corpuscular antigens. During the observation-period of two years, the IgG level of the sera exhibited means of 4 g/l, thus significantly differing from free-living seagulls. Sera from free-living herring gull nestlings (2-3 weeks) contained IgG between 1 g/l and 2 g/l, sera from free-living gulls aged nearly 6 months IgG between 6 g/l and 7 g/l and sera obtained from free-living adults (> 4 years) between 4 g/l and 7 g/l.

Humoral antibodies following vaccination with Newcastle Disease Virus were not detected. The possible cause for this observation is discussed. Serum antibodies, however, were observed following administration of sheep red blood cells. Differences, however humoral antibodies against SRBC were observed, possibly attributable to different age groups and immunogenetically determined variability within the Herring Gull populations.

The methods employed in the experiments presented herein provide first informations on the immunological reactivity of Herring Gulls and are now at hand for further immunological investigations, especially on free - living gulls.