

Inken Sander (1995):

Untersuchungen zum Leukozytentransformationstest unter Verwendung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) an peripheren Blutleukozyten des Huhnes (*Gallus gallus domesticus*)

E. Zusammenfassung

Immundiagnostische Erfahrungen mit dem Leukozytentransformationstest (LTT) unter Verwendung von MTT (LTT [MTT]) an peripheren Blutleukozyten des Huhnes, insbesondere von kommerziell gehaltenen Tieren, liegen nicht vor. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, die Testbedingungen zu standardisieren. Abschließend erfolgte ein Vergleich von LTT [MTT] und LTT [³H-Thymidin].

Zunächst wurden drei verschiedene Lösungsmittel (0,04 N HCl in Isopropanol, 90%iges Ethanol und 99%iges DMSO) verglichen, wobei mit allen eine Proliferation zu messen war.

Weiterhin wurden drei verschiedene MTT-Konzentrationen (10 µl MTT, 20 µl MTT und 40 µl MTT-Zugabe / Leukozytenkultur) verglichen, die bei jüngeren Tieren (21-28 Lebenswochen) keinen Einfluß auf die Höhe der Stimulationsraten hatten. Der Einsatz der niedrigeren Konzentrationen erwies sich jedoch bei älteren Tieren (67-75 Lebenswochen) als geeigneter. In den durchgeführten Versuchen wurden 20 µl MTT-Lösung / Leukozytenkultur verwendet.

Von den drei eingesetzten ConA-Konzentrationen 1,8 µg, 3,6 µg und 18,2 µg / ml im Endansatz (10 µg, 20 µg und 100 µg ConA / ml Mitogengebrauchslösung) erwies sich die höchste Konzentration, welche in den durchgeführten Versuchen verwendet wurde, statistisch signifikant ($p < 0,05$) als optimal. Bei einem Vergleich der drei PHA-Konzentrationen 18,2 µg, 36,4 µg und 54,6 µg / ml im Endansatz (100 µg, 200 µg und 300 µg PHA / ml Mitogengebrauchslösung) wurden in einem größeren Konzentrationsbereich von 200 µg PHA / ml bis 300 µg PHA / ml erkennbare Stimulationsraten gemessen. Die optimale PHA-Konzentration war höher als die ConA-Konzentration. In den durchgeführten Versuchen wurden 200 µg PHA / ml verwendet.

Der Vergleich der beiden LTT-Methoden ergab statistisch signifikante ($p < 0,05$) Zusammenhänge zwischen den Originalwerten (LTT [MTT]: optische Dichte; LTT [^3H -Thymidin]: counts per minute). Die Rangkorrelationskoeffizienten der berechneten Werte (LTT [MTT]: % Zellproliferation; LTT [^3H -Thymidin]: Stimulationsindex) lagen niedriger.

Die erstellten Proliferationsprofile von zwei Tiergruppen zeigten Fluktuationen mit einem deutlichen jahreszeitlichen Tiefstand im September / Oktober.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der LTT [MTT] im Vergleich zum LTT [^3H -Thymidin] eine Alternative zur Messung der Zellproliferation ist und unter den oben genannten Versuchsbedingungen dazu verwendet werden kann, die Proliferation von peripheren Blutleukozyten des Huhnes zu messen. Hierdurch wird ein Beitrag zur Reduzierung des Einsatzes von Isotopen geleistet. Da die Stimulationsraten individuell und innerhalb der getesteten Tiergruppen, die kommerzieller Herkunft waren, stark variierten, sollten noch weitere Untersuchungen an Inzuchtlinien stattfinden, um abzuklären, ob dies durch den genetischen Hintergrund der Tiere oder andere Faktoren bedingt war.

Inken Sander (1995):

Investigations about the leucocyte transformation assay (LTA) using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and peripheral blood leucocytes of chickens (*Gallus gallus domesticus*)

F. SUMMARY

There are no experiences with the leucocyte transformation assay (LTA) using MTT (LTA [MTT]) for immunodiagnostic purposes in chicken peripheral blood leucocytes, especially in commercially available chicken lines. Therefore, investigations were undertaken in order to standardize the assay. Finally, a comparison with the LTA [³H-thymidine] was made.

In the experiments, three different solvents (0.04 n HCl in isopropanol, ethanol (90%) and DMSO (99%)) were used. All generated measurable cell proliferation.

None of the three different MTT-concentrations (10 µl, 20 µl and 40 µl MTT-solution per well) had influence on the stimulation rates of peripheral leucocytes from young chickens (21-28 weeks of age). However, the use of lower MTT-concentrations was more useful to measure stimulation of leucocytes from older animals (67-75 weeks of age). Therefore, 20 µl MTT-solution per well were employed.

In experiments with three different ConA-concentrations (1,8 µg, 3,6 µg and 18,2 µg / ml = 10 µg, 20 µg and 100 µg ConA / ml mitogen solution), the highest concentration proved to be most effective ($p < 0,05$) and was employed in the following tests. Comparing three different PHA-concentrations (18,2 µg, 36,4 µg and 54,6 µg / ml = 100 µg, 200 µg and 300 µg PHA / ml mitogen solution), a concentration of 200 µg up to 300 µg PHA ml mitogen solution was necessary for an optimal stimulation. Thus, 200 µg PHA / ml mitogen solution were used in the experiments.

The comparison of both LTA methods resulted in high statistically significant ($p < 0,05$) correlations between the original values (LTA [MTT]: optical density; LTA [³H-thymidine]: counts per minute). The Spearman correlation coefficients

of the calculated values (LTA [MTT]: % cell proliferation; LTA [³H-thymidine]: stimulation index) were lower but mostly statistically significant.

The cell proliferation profile of two chicken groups exhibited fluctuations with a distinct seasonal decrease in August / September during the experimental phase.

Compared to the conventional LTT using ³H-thymidine, the LTA [MTT] is an alternative to measure cell proliferation and thus contributes to the reduction of isotope use in cell biology. The assay can be employed to evaluate stimulation of peripheral blood lymphocytes of chickens using the above mentioned test conditions. Further investigations using highly inbred chicken lines are pending to find out whether distinct individual fluctuations and varying stimulation rates within the groups are attributable to genetic factors or other influences.