

6 Zusammenfassung

Oesophagostomum dentatum ist ein im Dickdarm des Schweines parasitierender Nematode. *Oesophagostomum spp.* gelten als Verursacher von wirtschaftlichen Verlusten in Schweinebetrieben. Zwar reagiert das Immunsystem des Schweines mit Antikörperbildung, eine Protektion wird aber nicht oder nur in unzureichender Weise ausgebildet. Über die beteiligten zellulären Mechanismen ist bisher nichts bekannt.

Hier wurde der Frage nachgegangen, ob und in welcher Weise *Oesophagostomum dentatum*-Wurmprodukte einen modulierenden Einfluß *in vitro* auf porcine Leukozyten (mononukleäre Zellen und polymorphkernige Granulozyten des Blutes) nehmen. Insbesondere galt das Interesse einer möglichen, differentiell beeinflussenden Wirkung von Produkten unterschiedlicher Larvenstadien (dritte und vierte Stadien).

Hierfür wurden funktionelle Prüfverfahren für porcine Leukozyten etabliert und angepaßt, um qualitativ und quantitativ potentielle immunmodulatorische Effekte möglichst genau erfassen zu können.

Die Blastogenese und Proliferation porciner mononukleärer Zellen (poMNC) wurde vergleichend mit einem ELISA-System (basierend auf dem Einbau von BrdU in die DNA) und durchflußzytometrischen Verfahren geprüft. Letztere erfassen die Blastogenese und Proliferation über die Bestimmung des prozentualen Anteils und der Absolutzahl induzierter Blasten. Zwischen den durchflußzytometrischen Parametern und dem BrdU-Einbau bestand keine Korrelation. Die beiden Nachweisverfahren können somit nicht fakultativ zur Messung der Blastogenese/Proliferation beim Schwein herangezogen werden.

Das durchflußzytometrische Verfahren erlaubte wesentlich mehr Aussagen an demselben Versuchsansatz als der BrdU-Einbau und zwar qualitativ und quantitativ differenziertere Aussagen über die Prozesse Blastogenese, Proliferation und Zelltod (über die Parameter vitale Zellen und vitale Blasten). Daran gemessen erwies sich von den geprüften Mitogenen in den hier eingesetzten Konzentrationen zur *In-vitro*-Stimulation von poMNC Concanavalin A (Con A) als das potenteste, gefolgt von

Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed Mitogen (PWM). Das Superantigen *Staphylococcus-aureus*-Enterotoxin B (SEB) führte bei 3 Tieren zu keiner Blastogenese, allerdings zum Einbau von BrdU. Dies unterstreicht den Wert komplementärer Verfahren zur Prüfung der *In-vitro*-Proliferation von poMNC.

Für porcine neutrophile Granulozyten (nPMN) wurde ein durchflußzytometrisches Verfahren zur Messung der Antikörper-unabhängigen zellulären Zytotoxizität (AICC) neu etabliert. Als Zielzelle kam eine bovine lymphoblastoide Zelllinie (Anna TA1) zum Einsatz. Die Fähigkeit der nPMN über die AICC Zielzellen zu töten, konnte eindeutig über die Abnahme der Zahl vitaler Zielzellen nach quantitativer durchflußzytometrischer Analyse gemessen werden. Die PMA-stimulierte AICC von porcinen PMN wurde frühestens nach 16stündiger Inkubation erfaßt. Geprüft wurde die 4, 16 und 20stündige Inkubation. Das minimale Effektor-/Zielzell-Verhältnis lag zwischen 0,5-1; die minimal nötige PMA-Konzentration zur Induktion einer nachweisbaren Zytotoxizität von PMN betrug zwischen 5 und 10nmol/l. Larvenprodukte von *Oesophagostomum dentatum* (dritte und vierte Larvenstadien) hatten keinen Einfluß auf die AICC porciner nPMN. Weiterführenden Untersuchungen bleibt es vorbehalten, einen Effekt auf die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) zu prüfen, für die das entwickelte Nachweissystem ebenfalls geeignet erscheint.

Kulturüberstände als auch Homogenate (in Endkonzentrationen von jeweils 0,1-10µg/ml) von vierten Larvenstadien führten hingegen zu einer Blastogenese von *in vitro* kultivierten poMNC. Produkte von dritten Larvenstadien zeigten keinen Effekt. Die Stimulierung erfolgte unabhängig davon, ob es sich um Zellen naiver oder mit *Oesophagostomum dentatum* infizierter Tiere (n=3) handelte. Dies stellt den ersten Hinweis auf einen immunmodulierenden Effekt bestimmter Larvenstadien von *Oesophagostomum dentatum* beim Schwein dar. Verglichen mit der Con-A-induzierten Blastogenese fiel die Larvenprodukt-induzierte quantitativ schwächer aus. Die poMNC nicht-infizierter als auch die infizierter Tieren proliferierten unter Con-A-Einfluß ohne erkennbare Beeinträchtigung durch die zugesetzten Larvenprodukte. Überdies konnte kein Unterschied in der Con-A-induzierten Proliferation zwischen nicht-infizierten und

infizierten Schweinen während eines 19tägigen Beobachtungszeitraumes *post infectionem* beobachtet werden.

Die Versuche zur modulierenden Wirkung von *Oesophagostomum dentatum*-Wurmprodukten erfolgten vergleichend in Kulturmedien mit Zusatz von Schweineserum oder fetalem Kälberserum (FCS). Die modulierenden Effekte von *Oesophagostomum dentatum* Larven-Produkten wurden dadurch nicht oder nur geringgradig beeinflusst. Allerdings fiel die qualitative und quantitative Proliferationsreaktion von pmNC nach Mitogenstimulation in Abhängigkeit von der gewählten Serumquelle und ihrer Konzentration im Kulturmedium deutlich unterschiedlich aus. Insofern konnte kein generell „optimales“ Kultursystem identifiziert und empfohlen werden. Dies gilt es bei weiterführenden Untersuchungen zu beachten.

7 Summary

Ramunas Freigofas

Flow cytometric analyses of functional parameters of porcine leukocytes and the characterization of products of *Oesophagostomum dentatum* regarding their immunomodulating properties.

Oesophagostomum dentatum is a parasitic nematode in the large intestine of pigs and *Oesophagostomum spp.* are regarded as causative agents of economic losses in pig production. The pig immune system responds with antibody production, but protective immunity against an infection with *Oesophagostomum dentatum* is not observed. In addition, nothing is known about involved cellular immune mechanisms.

This work addressed the question whether products of *Oesophagostomum dentatum*, especially those of 3rd and 4th larvae, exert a modulating influence on porcine leukocytes (polymorphonuclear granulocytes and mononuclear blood cells) *in vitro*.

For that purpose, functional assays were established and/or adapted for porcine leukocytes in order to obtain most precise qualitative and quantitative information about potentially immune modulatory effects.

Blastogenesis and proliferation of porcine mononuclear cells (poMNC) were measured comparatively with an ELISA system (based on the incorporation of BrdU into DNA) and by means of flow cytometric procedures. The latter ones were more informative as they permitted determination of percentages and absolute numbers of blast cells as well as parameters of blastogenesis and proliferation for the same test sample. There was no correlation between these flow cytometric parameters and the incorporation of BrdU. Thus, these two detection systems cannot be employed alternatively for the measurement of poMNC blastogenesis and/or proliferation. Since absolute numbers of vital cells and numbers of vital blasts more closely reflect the complex processes of blastogenesis, proliferation and cellular death *in vitro*, flow

cytometric procedures may allow for more precise evaluations of cellular kinetics after *in vitro* stimulation. In these assays, Con A (in tested concentrations) proved to be most potent as mitogen, followed by Phytohemagglutinin (PHA) and Pokeweed Mitogen (PWM). The superantigen *staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) induced no detectable blastogenesis, though it caused enhanced incorporation of BrdU. This emphasises the value of complementary procedures to assess the *in vitro* proliferation or activation of poMNC.

A new flow cytometric procedure was established to measure the antibody independent cellular cytotoxicity (AICC) of porcine neutrophilic granulocytes (nPMN). Bovine lymphoblastoid cells (Anna TA1) served as target cells. The PMA-induced AICC could be sensitively demonstrated by the decline of vital target cells after quantitative flow cytometric analysis. The earliest time the AICC could be seen was 16h after coincubation and triggering of effector and target cells (4, 16 and 20h were tested). The minimal detectable effector/target ratio was 0.5-1. The minimal PMA concentration to induce detectable cytotoxicity of nPMN ranged between 5 and 10nmol/l. Products of *Oesophagostomum dentatum* (3rd and 4th larvae) had no influence on the AICC of porcine nPMN. Further studies may elucidate the potential modulatory effects on the antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), for which the developed test system seems to be suitable as well.

In contrast to the lack of influence on nPMN AICC, culture supernates as well as homogenates (0.1-10µg/ml) of 4th larvae induced blastogenesis of *in vitro* cultivated poMNC (independent of whether the cells derived from naive or from animals infected with *Oesophagostomum dentatum*, n=3). Comparable concentrations of products of 3rd larvae showed no such effect. This is the first indication of an immunomodulatory action of specific stages of *Oesophagostomum dentatum* in the pig system. Compared with the Con A induced blastogenesis, the larvae induced response appeared to be quantitatively lower. In addition, no modulating influence of any of the larvae products was seen on the Con A induced proliferative response of poMNC, irrespective whether the cells had been derived from *Oesophagostomum dentatum* infected or control

animals. Furthermore, the Con A induced poMNC proliferation did not differ between infected and not infected pigs during 19 days *post Infectionem*.

The *in vitro* assays to demonstrate the immunomodulating effects of *Oesophagostomum dentatum* products were performed in culture media containing either swine serum or fetal calf serum. This had no obvious (or just minor) influence on the above described results with larvae products. However, the qualitative and quantitative proliferation reaction of poMNC after mitogen stimulation proved to be very much dependent on the source and the concentration of serum in the culture medium. Therefore, it was not possible to identify or recommend an overall 'optimal' culture system. This should be considered in further studies on immunomodulating effects on porcine cells *in vitro*.