



Doctoral Thesis

## Chemiluminescence of animal granulocytes

**Author(s):**

Grob, Markus

**Publication Date:**

1986

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000409927> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

26. Nov. 1986

Diss. ETH No. 8091

**CHEMILUMINESCENCE OF ANIMAL GRANULOCYTES**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

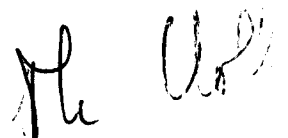
Doctor of Natural Sciences

presented by

Markus Grob  
Dipl. Natw. ETH  
born in Herisau  
citizen of Wattwil, SG

accepted on the recommendation of  
Prof. Th. Koller, examiner  
Prof. H.M. Eppenberger, co-examiner  
Prof. E. Peterhans, external referee

1986



## KURZFASSUNG

Luminol-abhängige Chemilumineszenz (Cl) als Methode zum Nachweis von reaktiven Sauerstoffverbindungen, die im sogenannten respiratorischen Burst von phagozytierenden weissen Blutzellen entstehen, hat seit ihrer Einführung im Jahre 1976 eine immer weitere Verbreitung erfahren, insbesondere in Zusammenhang mit menschlichen neutrophilen Granulozyten. Die besonderen Vorteile der Cl liegen in ihrer grossen Empfindlichkeit gegenüber anderen Nachweissystemen wie etwa Spektrophotometrie oder Fluoreszenzphotometrie. Dadurch lassen sich auch kleine Zellzahlen untersuchen oder schwach stimulierende Agentien. Insbesondere in der Erforschung von Interaktionen zwischen physiologischen Stimulatoren wie Viren oder Antikörperkomplexen und Zellen leisten Cl-Studien einen wichtigen Beitrag. Die hohe Empfindlichkeit ist aber nicht problemlos. So konnte an mehreren Beispielen gezeigt werden, dass Cl von Zellen wie Erythrozyten, B und T Lymphozyten, Thymozyten eine Folge von Kontaminationen mit Granulozyten oder Makrophagen ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die Chemilumineszenz von animalen Granulozyten untersucht. Die Cl wird verglichen mit anderen Nachweissystemen für reaktive Sauerstoffverbindungen und eine positive Korrelation konnte gefunden werden. Eine Gruppe von Experimenten befasst sich mit der Quelle der Cl, denn trotz der oben erwähnten weiten Verbreitung ist der Ursprung der Lichtentwicklung noch nicht ganz geklärt. Experimente mit Inhibitoren des Arachidonsäure-Metabolismus haben auch die Frage aufgeworfen, ob nicht die Lipoxygenase, ein Enzym, welches in der Entstehung der Leukotriene involviert ist, eine Quelle von Licht sein könnte. Diese Frage konnte mit Experimenten, welche versuchten, die Lichtentwicklung mit der Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten zu korrelieren, verneint werden. Obwohl Lipoxygenase in einem zellfreien System fähig zur Lichtentwicklung ist, scheint sie in der zellulären Cl keine Rolle zu spielen.

Neben der Untersuchung von verschiedenen animalen neutrophilen Granulozyten, speziell derjenigen der Rinder, werden in dieser Arbeit auch eosinophile Granulozyten von Pferden untersucht. Analog wie im Rindersystem konnte auch mit den

Eosinophilen gezeigt werden, dass die Lipoxxygenase Reaktion keinen signifikanten Beitrag zur zellulären Cl liefert. Mittels sehr reiner Eosinophilen Präparationen von gesunden Tieren konnten signifikante Unterschiede in der Cl gegenüber Neutrophilen beobachtet werden. Dies ist besonders bemerkenswert, da bereits mit kleinen Kontaminationen von Neutrophilen in der Eosinophilen-Population diese Unterschiede nicht mehr bemerkbar sind.

Zusammenfassend ist diese Arbeit ein Beitrag zum besseren Verständnis der Cl von Tiergranulozyten. Viele Befunde können aber auch auf die Arbeit mit menschlichen Granulozyten übertragen werden. Wir versuchen aufzuzeigen, dass wegen der hohen Empfindlichkeit der Methode grösste Vorsicht anzuwenden ist in der Interpretation von Resultaten, die mit gemischten Zellpopulationen gefunden wurden.

## ABSTRACT

The measurement of luminol-dependent chemiluminescence (Cl) was introduced in 1976 as a method to detect reactive oxygen production by phagocytic cells. This method has been extensively used in particular in studies with human polymorphonuclear leukocytes. Cl measurement is several orders more sensitive than spectrophotometric or fluorimetric methods in the detection of reactive oxygen formation. Consequently, only low cell numbers are required and cell activation by weakly stimulating agents can be detected by Cl measurement. This is particularly important in the study of the interaction with phagocytic cells of viruses, immune complexes and virally-infected target cells. However, the high sensitivity of Cl measurement in the past has caused several problems. For example, luminol-dependent Cl was described in erythrocytes, T and B lymphocytes, thymocytes and was later found to originate from phagocytes present in low numbers in the cell suspensions.

In the present work, we have compared the pattern of Cl in granulocytes of various animal species. Cl measurement was compared with conventional assay methods for reactive oxygen and was found to correlate when potent, but not when weakly activating agents (i.e. Sendai virus) were used.

Experiments were conducted to elucidate the mechanism of Cl in bovine polymorphonuclear and horse eosinophilic leukocytes. In particular, we have investigated whether part of the Cl emitted by these cells originates from lipoxigenase activity. Our experiments showed that lipoxigenase activity leads to Cl in a cell-free system but is not a direct source of the Cl emitted by intact cells.

The Cl response of the horse eosinophils to various agents was found to differ from that of bovine neutrophils. We compared in detail the reaction of the horse eosinophils and neutrophils isolated from the same batches of blood. This study revealed clear differences in "surface recognition" between the two cell types. Of particular interest, we were able to show that suspensions of eosinophils react neutrophil-like already with some 10-15% contaminating neutrophils. This may explain why other studies have shown quantitative,

but not qualitative differences between the two cell types. In summary, our work demonstrates that extreme caution must be exerted in the interpretation of Cl data obtained from mixed cell populations. Moreover, the approach taken and observations made in the study of the mechanism of Cl in horse eosinophilic and bovine neutrophilic leukocytes may be relevant also to human Cl-positive cells.