Aus der Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hat die Belastung gestillter Kinder mit persistenten organischen Schadstoffen Einfluss auf natürliche Killerzellen?

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Ralf Husain
aus Frankfurt am Main

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Priv. Doz. Dr. med. Klaus Abraham

2. Prof. Dr. med. Hildegard Przyrembel

3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dieter Schrenk

Datum der Einreichung: 28.11.2003

Datum der Promotion: 21.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Persistente organische Schadstoffe 2

1.1.1 Aufnahme und Metabolismus 9

1.1.2 Toxizität 10

1.1.3 Immuntoxizität 13

1.2 Natürliche Killerzellen 15

1.2.1 Zell-Marker 16

1.2.2 Funktion 17

1.2.3 Zytotoxische Aktivität 17

1.2.4 Klinische Bedeutung 19

1.3 Messmethoden der zytotoxischen Aktivität 20

1.4 Einflüsse persistenter organischer Schadstoffe auf NK-Zellen und NK-Aktivität 23

1.4.1 NK-Zellen 23

1.4.2 NK-Aktivität 25

1.5 Fragestellung 31

2 Methodik 33

2.1 Studienkonzept und Probandenauswahl 33

2.2 Studienkollektiv 35

2.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung, regionale Herkunft 35

2.2.2 Ernährung 35

2.2.3 Infekte und Zigarettenrauch-Exposition 35

2.2.4 Wiederholungsuntersuchung 36

2.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials 36

2.4 Bestimmung zellulärer Parameter 36

2.5 Durchflusszytometrie 37

2.6 Immunphänotypisierung 38

2.7 Zytotoxizitäts-Assay 39

2.7.1 Isolation der Effektorzellen 39

2.7.2 Langzeit-Kultur und Präparation der Targetzellen 40

2.7.3 Kryokonservierung und Auftauen der Targetzellen 41

2.7.4 Färbung der Targetzellen 42

2.7.5 Testansatz und Inkubation 42

2.8 Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen 43

2.9 Assay-Ausschlussgründe 45

2.10 Analyse der persistenten organischen Schadstoffe 45

2.11 Zusätzliche Untersuchungen bei Erwachsenen 47

2.12 Berechnungen und statistische Verfahren 47

2.13 Datenverarbeitung 48

2.14 Grafische Darstellung 48

3 Ergebnisse 49

3.1 Leukozyten und Lymphozyten 49

3.2 Natürliche Killerzellen 51

3.3 Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen 55

3.4 Persistente organische Verbindungen 59

3.4.1 Statistische Analyse POPs und NK-Zellen 60

3.4.2 Statistische Analyse: POPs und Zytotoxizitäts-Assay 62

3.5 Reproduzierbarkeit 66

3.6 Zusätzliche Untersuchungen bei Erwachsenen 67

4 Diskussion 72

4.1 Leukozyten und Lymphozyten 72

4.2 Natürliche Killerzellen 73

4.3 Natürliche Killerzellen und POPs 75

4.4 Zytotoxische Aktivität 77

4.5 Zytotoxische Aktivität und POPs 84

4.6 Erwachsene 85

4.7 Schlussfolgerung 87

Zusammenfassung 89

Abkürzungen 92

Literaturverzeichnis 94

Abbildungsverzeichnis 110

Tabellenverzeichnis 111

Danksagung 112

Forschungsförderung 113

Erklärung an Eides Statt 114

1 Einleitung

Das Vorkommen von chemischen Verbindungen künstlichen Ursprungs in der Muttermilch sorgt immer wieder für Diskussionen unter Experten und Verunsicherungen bei Müttern und Vätern. Dabei kommt beständig die Frage auf, ob die Kontamination der Frauenmilch mit einigen dieser Verbindungen einen potenziell negativen Effekt auf gestillte Säuglinge hat. Aufgrund ihrer besonderen chemisch-physikalischen Eigenschaften ist dabei eine Gruppe von Verbindungen von besonderem Interesse, die als persistente organische Schadstoffe[1] (Persistent Organic Pollutants, POPs) bezeichnet werden. Die POPs sind eine heterogene Gruppe polyhalogenierter Kohlenwasserstoffe und zeichnen sich durch eine große biologische sowie chemische Stabilität und hohe Lipophilität aus. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation dieser Schadstoffe in der Nahrungskette und letztlich einer Anreicherung im Fettgewebe des Menschen. Aus diesem Kompartiment können POPs durch Gewichtsabnahme mobilisiert werden. Auch beim Stillen werden diese Substanzen aus dem Fettgewebe freigesetzt und über die Frauenmilch an das gestillte Kind abgegeben. Von Abraham et al. konnte gezeigt werden, dass nach mehrmonatiger Stillzeit sogar höhere Konzentrationen einiger POPs beim gestillten Kind im Vergleich zur Mutter vorlagen [Abraham et al. 1996].

Es ist nachgewiesen, dass das Stillen viele Vorteile für Mutter und Kind bietet. Die Frauenmilch enthält alle notwendigen Nährstoffe für eine optimale Entwicklung des Säuglings, ist überall verfügbar, immer richtig temperiert, steril und preisgünstig. Die in der Muttermilch enthaltenen humoralen und zellulären Abwehrstoffe unterstützen das Immunsystem. Das Stillen fördert außerdem eine harmonische Mutter-Kind-Beziehung [Curran/Barness 2000a]. Ferner besteht für gestillte Säuglinge eine längerfristige Risikominderung hinsichtlich des Auftretens von Allergien und atopischen Erkrankungen gegenüber nicht gestillten Kindern [Koletzko/Schroten 1999]. Die aktuelle Stillempfehlung der Nationalen Stillkommission am Bundesinstitut für Risikobewertung besagt, dass Säuglinge für vier bis sechs Monate voll gestillt werden sollten [Nationale Stillkommission 2002].

---

[1] Hier ist anzumerken, dass „Schadstoff“ in Ermangelung eines passenderen Begriffs im Deutschen verwandt wird, dieser suggeriert allerdings a priori eine schädliche Wirkung. Als toxikologisches Grundprinzip gilt hingegen, dass Wirkungen einer Substanz Dosis-abhängig sind.

Durch die oben erwähnte Akkumulation von POPs bei gestillten Kindern ergeht wegen eines zum Teil großen toxischen Potenzials einiger Verbindungen der Auftrag an die Wissenschaft, die Frage möglicher negativer Effekte auf den kindlichen Organismus zu klären. Falls diese tatsächlich vorliegen sollten, könnte dies zu einer Einschränkung der bestehenden Stillempfehlung führen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Teilaspekt von Effekten der persistenten organischen Schadstoffe auf das Immunsystem und geht auf die spezielle Frage von potenziellen Auswirkungen auf natürliche Killer (NK)-Zellen und deren Funktion ein.

1.1 Persistente organische Schadstoffe

POPs sind besonders stabile Verbindungen natürlichen oder anthropogenen Ursprungs, die nur schwer abbaubar sind. Sie führen aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit und hohen Fettlöslichkeit zu einer Bioakkumulation in Fettgeweben lebender Organismen. POPs werden durch natürliche Mechanismen über große Distanzen transportiert. Dies resultiert in einer Verteilung über die gesamte Erde, einschließlich Regionen in denen POPs nie benutzt wurden. Somit werden weltweit Menschen und andere Lebewesen, in vielen Fällen über ausgedehnte Zeiträume, POPs ausgesetzt. Da von diesen Substanzen ein mögliches Gefährdungspotential für Menschen aufgrund ihres toxischen Potenzials ausgeht, wurde nach internationalen Verhandlungen in den 1990er Jahren auf einer Tagung des Umweltprogramms der Vereinten Nationen in Stockholm, Schweden im Mai 2001 ein globales Verbot der Produktion und Benutzung von vorerst zwölf POPs durch 127 Regierungen beschlossen. Es handelt sich dabei um die Pestizide Aldrin, Chlordan, Dichlordiphenyltrichlorethan, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Hexachlorbenzol, Mirex und Toxaphen, sowie die Industriechemikalien polychlorierte Biphenyle und die Nebenprodukte polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und polychlorierte Dibenzofurane [UNEP 2001]. Bereits 1998 wurden auf einer Tagung der Wirtschaftskommission der Vereinten Nationen für Europa vier weitere POPs als mögliche Verbots-Kandidaten genannt: die Pestizide Chlordecon und Hexachlorcyclohexan, die Industriechemikalie Hexabrombiphenyl und die Nebenprodukte polyzyklische aromatische Wasserstoffe [UNECE 1998]. Es ist davon auszugehen, dass hier weitere Substanzen hinzukommen, die den Kriterien der Persistenz, Bioakkumulation, Verteilung und Gefährdung genügen.

Zu den am besten untersuchten POPs gehören die zur Klasse der polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (PHAHs) zählenden polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs) und polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs), für die auch die Sammelbezeichnung „Dioxine“ bzw. „Furane“ benutzt wird. PCDDs und PCDFs sind eine heterogene Gruppe von chemischen Substanzen mit ähnlicher Struktur, verwandten physikalischen und chemischen Eigenschaften und gleichartiger Toxizität, welche auch „dioxinartig“ genannt wird. Aufgrund unterschiedlicher Chlorierungsgrade der beiden Benzolringe und unterschiedlicher Isomerie der Verbindungen gibt es 75 verschiedene PCDDs und 135 verschiedene PCDFs, wobei die einzelnen Verbindungen als „Kongenere“ bezeichnet werden. Nur die 17 2,3,7,8-chlorierten Kongenere (7 PCDDs und 10 PCDFs) akkumulieren und besitzen eine dioxinartige Toxizität. Die Verbindung mit der höchsten toxischen Potenz ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Die Strukturformel der PCDDs wird in Abbildung 1-1 und der PCDFs in Abbildung 1-2 dargestellt. PCDDs und PCDFs entstehen als unerwünschte Nebenprodukte bei der Herstellung bestimmter chlorhaltiger Chemieprodukte wie z. B. Hexachlorbenzol und polychlorierten Biphenylen (PCBs), beim Bleichen von Zellstoff und Papier, sowie bei der Verbrennung bestimmter chlorierter Kohlenwasserstoffe (z. B. PCBs) und kommen in verunreinigten Herbiziden und PCB-Ölen vor.

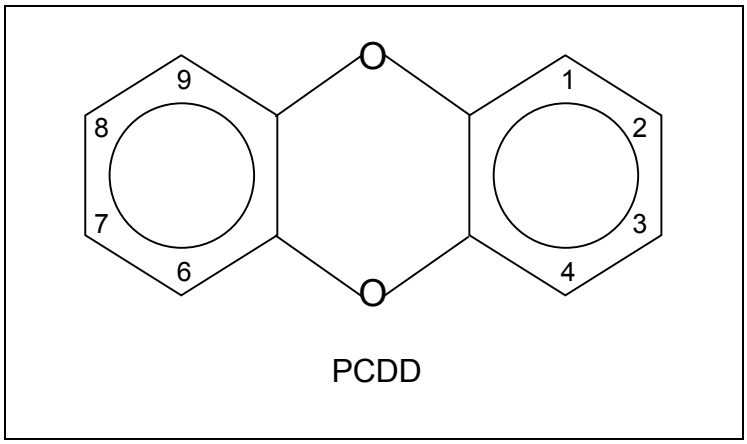

Abbildung 1-1: Strukturformel der polychlorierten Dibenzodioxine (PCDDs), mit Bezifferung der chlorsubstituierbaren Ringpositionen

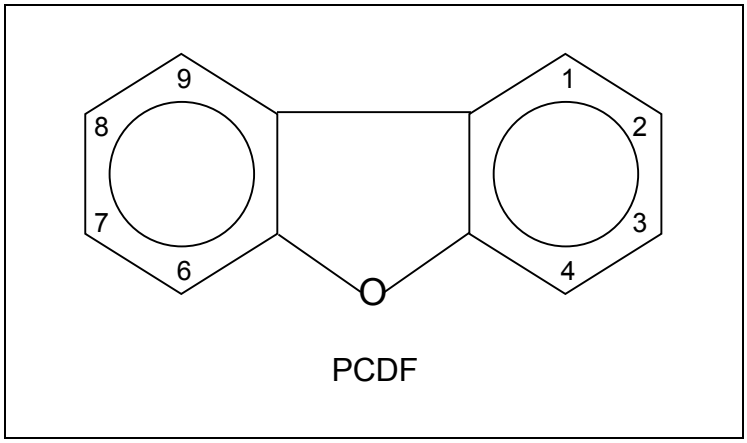

Abbildung 1-2: Strukturformel der polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs), mit Bezifferung der chlorsubstituierbaren Ringpositionen

Von den polychlorierten Biphenylen (PCBs) gibt es 209 Kongenere, die sich durch Anzahl und Lage der Chloratome am Biphenylringsystem unterscheiden, wobei 12 Kongenere eine dioxinartige Toxizität besitzen. Die Strukturformel der PCBs wird in Abbildung 1-3 dargestellt. PCBs wurden als Gemische wegen ihrer hohen thermischen Stabilität, der elektrischen Isolationseigenschaft und der geringen Entflammbarkeit unter anderem in Kühl-, Isolier- und Hydraulikflüssigkeiten, Kondensatoren und Transformatoren, Flammschutzmitteln, Textilhilfsmitteln und Weichmachern in Lacken eingesetzt. Diese PCB-Gemische sind häufig mit PCDFs kontaminiert. Die Herstellung und Benutzung von PCBs wurde in der BRD seit 1978 weitgehend eingeschränkt und 1989 verboten.

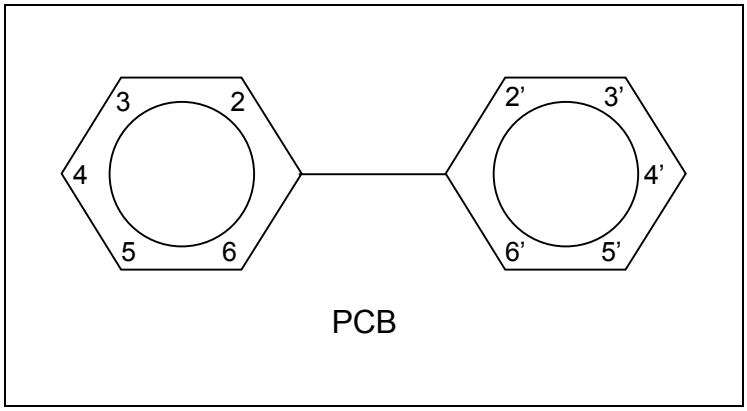

Abbildung 1-3: Strukturformel der polychlorierten Biphenyle (PCBs), mit Bezifferung der chlorsubstituierbaren Ringpositionen

Während die PCDDs, PCDFs und ein Teil der PCBs im Hintergrundbereich in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen, kommen als Insektizide eingesetzte chlorierte zyklische Kohlenwasserstoffe und deren Abbauprodukte im Hintergrundbereich in wesentlich höheren Konzentrationen vor. Auch sie akkumulieren im Fettgewebe von Mensch und Tier. Es handelt sich dabei unter anderem um Hexachlorbenzol, pp'-Dichlordiphenyldichlorethylen und β-Hexachlorcyclohexan, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

Die chlorierte aromatische Verbindung Hexachlorbenzol (HCB) wurde als Fungizid, Saatgutbeizmittel, Weichmacher und Ausgangssubstanz für Pentachlorphenol (PCP) verwendet, das unter anderem als Holzschutzmittel eingesetzt wurde. Die Anwendung ist seit 1981 in der BRD verboten. Die Strukturformel von HCB wird in Abbildung 1-4 dargestellt.

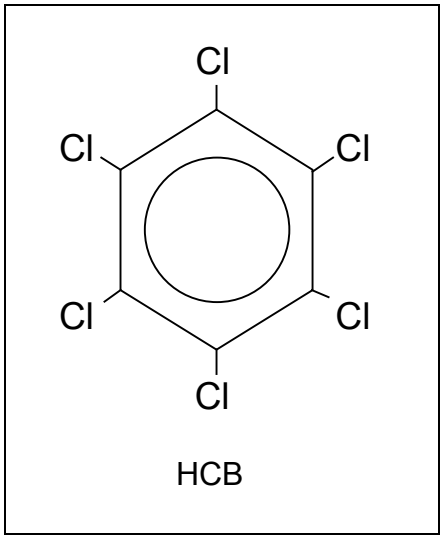

Abbildung 1-4: Strukturformel von Hexachlorbenzol (HCB)

Die Substanz pp'-Dichlordiphenyldichlorethylen (pp-DDE) ist der Hauptmetabolit von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT). Durch seine besonders lange Halbwertszeit ist heute vornehmlich pp-DDE nachweisbar. Das breit wirksame Insektizid DDT wurde vor allem in der Landwirtschaft und zur Bekämpfung des Malaria-Vektors eingesetzt. Während es 1972 in der BRD verboten wurde, setzte es die ehemalige DDR bis in die 1980er Jahre ein. In einigen tropischen Ländern ist es weiterhin in Benutzung. Die Strukturformel von pp-DDE wird in Abbildung 1-5 dargestellt.

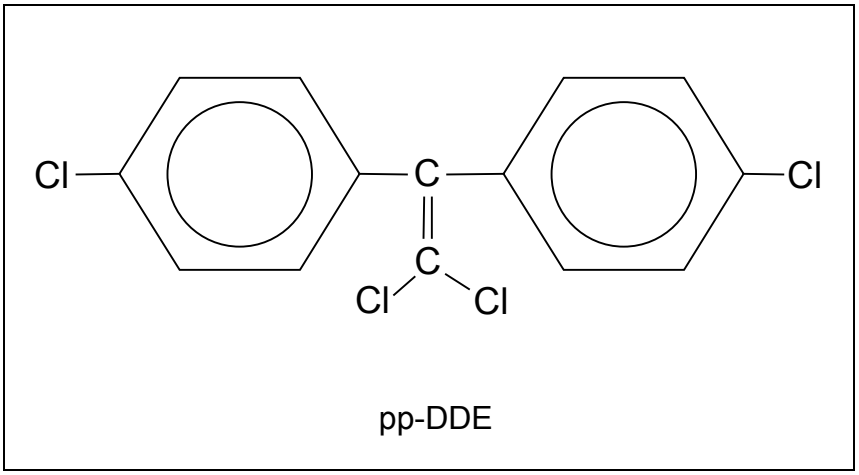

Abbildung 1-5: Strukturformel von pp'-Dichlordiphenyldichlorethylen (pp-DDE)

Bei der Herstellung des Insektizides Lindan (Hexachlorcyclohexan, HCH) fällt ein Gemisch von acht Isomeren an. Das einzige insektizid wirksame Isomer γ-HCH hat daran nur einen Anteil von ungefähr 15 %. Eine umwelttoxikologische Relevanz besitzen die bei der Lindan-Produktion in großen Mengen anfallenden Isomere α-HCH und ß-HCH, wobei das ß-HCH im größten Ausmaß akkumuliert. Die Strukturformel von ß-HCH wird in Abbildung 1-6 dargestellt. Neben der früheren Verwendung von Lindan als Pflanzen-, Holz- und Textilschutzmittel wird es weiterhin in der Humanmedizin als antiparasitäres Mittel gegen Krätzmilben, Kopf-, Filz- und Kleiderläuse und in der Veterinärmedizin verwendet. Die Anwendung von HCH-Isomerengemischen mit weniger als 99 % γ-HCH-Gehalt wurde 1981 in der Europäische Union verboten.

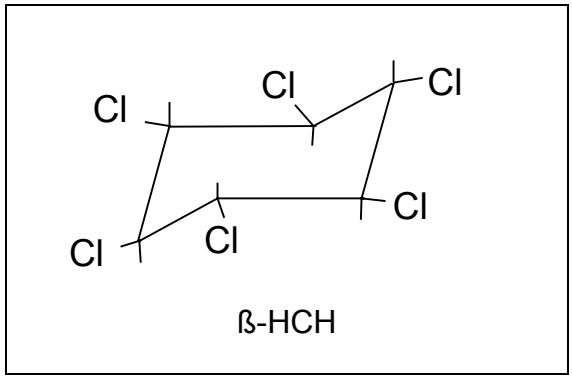

Abbildung 1-6: Strukturformel von β-Hexachlorcyclohexan (ß-HCH)

Neben diesen häufig vorkommenden und recht gut untersuchten Verbindungen und Verbindungsgruppen existieren noch unzählige andere POPs, über deren Wirkungen zum Teil weniger bekannt ist.

Um unterschiedliche Dioxinmischungen hinsichtlich ihrer Gesamt-Toxizität beurteilen zu können, hat 1988 eine NATO-Arbeitsgruppe Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren (TEFs) etabliert, die es für das einzelne Kongener ermöglichen, eine in der Wirkung zu TCDD äquivalente Konzentration zu berechnen [NATO/CCMS 1988]. Diese TEFs repräsentieren die relative Toxizität der Verbindungen gegenüber TCDD, dem aufgrund seiner großen toxischen Potenz ein TEF-Wert von 1 zugeteilt wird, während andere dioxinartige Kongenere Faktoren zwischen 0 und 1 erhalten. Die Konzentration jedes Kongener wird mit seinem TEF-Wert multipliziert und ergibt so das TEq (Toxizitäts-Äquivalent). Die Ergebnisse von Dioxin-Messungen werden dann als I-TEq

(Internationales TEq) mitgeteilt, bei Hintergrundbelastung mit der Einheit Pikogramm pro Gramm (pg/g) Fett. Das TEF-Konzept bezieht sich allerdings nur auf Dioxin-Wirkungen, die über einen bestimmten Rezeptor vermittelt werden (siehe 1.1.2). Von einer WHO (Weltgesundheitsorganisation)-Arbeitsgruppe wurden 1998 nach einer aktuellen Risikobewertung neue TEFs eingeführt, die neben einigen leicht veränderten PCDD/PCDF-TEFs zusätzlich TEFs für co-planare und mono-ortho-PCBs beinhalten, da diese auch eine dioxinartige Toxizität besitzen [Van den Berg et al. 1998]. Die Ergebnisse, die auf diesen veränderten TEFs basieren, werden als Gesamt-WHO-TEq mitgeteilt. In Tabelle 1-1 wird ein Überblick über die WHO-TEFs gegeben. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen Studien wurden sowohl I-TEqs als auch WHO-TEqs mitgeteilt und in den entsprechenden statistischen Analysen verwandt.

Tabelle 1-1: WHO-Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren (WHO-TEFs) der PCDD/PCDF/PCB-Kongenere

PCDD-Kongener	**WHO-TEF**	**PCDF-Kongener**	**WHO-TEF**
2,3,7,8-T4CDD	1	2,3,4,7,8-P5CDF	0,5
1,2,3,7,8-P5CDD	1	1,2,3,4,7,8-H6CDF	0,1
1,2,3,4,7,8-H6CDD	0,1	1,2,3,6,7,8-H6CDF	0,1
1,2,3,6,7,8-H6CDD	0,1	2,3,4,6,7,8-H6CDF	0,1
1,2,3,7,8,9-H6CDD	0,1	1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	0,01
1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	0,01		
OCDD	0,0001		
PCB-Kongener	**WHO-TEF**		
3,3’,4,4’,5-P5CB (PCB 126)	0,1		
3,3’,4,4’,5,5’-H6CB (PCB 169)	0,01		
2,3’,4,4’,5-P5CB (PCB 118)	0,0001		
2,3,3’,4,4’,5-H6CB (PCB 156)	0,0005		

1.1.1 Aufnahme und Metabolismus

Der Mensch nimmt 90–95 % der Dioxine über die Nahrung auf, wobei ungefähr zwei Drittel dieser Aufnahme aus Fleisch und Milchprodukten stammen. Die transdermale und inhalative Aufnahme von Dioxinen ist für nicht beruflich exponierte Personen vernachlässigbar. Ein Erwachsener nimmt in Deutschland etwa 0,5 pg I-TEq pro Kilogramm Körpergewicht und Tag (kg KG/d) auf (Stand 2000) [Umweltbundesamt 2000]. Den TDI-Wert (Tolerable Daily Intake) für Dioxine, Furane und dioxinähnliche PCBs hat die WHO 1998 auf 1– 4 pg WHO-TEq/kg KG/d festgelegt [WHO 2000].

Die oben beschriebene hohe Lipophilität und große biologische Stabilität resultiert in einer langen Halbwertszeit der POPs im menschlichen Organismus. Nach Flesch-Janys et al. beträgt die Halbwertszeit von Dioxinen im menschlichen Körper im Mittel 7,2 Jahre für TCDD, zwischen 3,7 und 15,7 Jahren für verschiedene PCDDs und zwischen 3,0 und 19,6 Jahren für PCDF-Verbindungen [Flesch-Janys et al. 1996]. Wolff et al. beschrieben eine Halbwertszeit der PCBs zwischen 5 und 15 Jahren im menschlichen Körper [Wolff et al. 1992]. Deshalb kommt es trotz einer relativ niedrigen täglichen Aufnahme der POPs über Nahrungsmittel zu relativ hohen POP-Werten im Fettgewebe. Die Schadstoff-Konzentrationen im Körperfettgewebe einer Mutter entsprechen den Konzentrationen im Milchfett der Muttermilch [Abraham et al. 1996]. Daher enthält die Muttermilch hohe POP-Konzentrationen, welche beim Stillen an den Säugling abgegeben werden. Die tägliche Muttermilch-Trinkmenge von Säuglingen beträgt 10–15 % ihres Körpergewichtes, womit sie ihren hohen Flüssigkeitsbedarf und den hohen Energiebedarf von 80–120 kcal/kg KG/d (19–29 kJ/kg KG/d) im ersten Lebensjahr decken [Curran/Barness 2000b]. Dadurch nehmen gestillte Säuglinge im Vergleich zu Erwachsenen wesentlich höhere Mengen an POPs auf. Für gestillte Kinder hatten Beck et al. eine mittlere Aufnahme von 17 pg TCDD/kg KG/d und 142 pg I-TEq/kg KG/d errechnet [Beck et al. 1994]. Patandin et al. hatten in ihrer Arbeit für die ersten sechs Lebensmonate eine mittlere Dioxin- und PCB-Aufnahme von 852 pg I-TEq/d ermittelt [Patandin et al. 1999]. In einer Untersuchung von Abraham et al. wurde eine bis zu 50-fach höhere Dioxin-Aufnahme von gestillten im Vergleich zu nicht gestillten Kindern beschrieben. Dabei wurde intestinal eine nahezu vollständige Absorption von PCDDs/PCDFs im ersten Lebensjahr beobachtet [Abraham et al. 1996].

Die Bund-Länder-Arbeitsgruppe Dioxine berichtete, dass auch noch bei 9–11jährigen Kindern Unterschiede zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern erkennbar waren, wobei die Gruppe gestillter Kinder im Mittel 20 % höhere Dioxingehalte im Blut aufwies [Umweltbundesamt 2002].
Hier soll noch auf die ungewöhnlich unterschiedlichen Halbwertszeiten von TCDD bei verschiedenen Tierspezies hingewiesen werden. Bei Nagetieren beträgt diese wenige Wochen, bei Affen mehrere Wochen bis Monate und bei Menschen wie oben erwähnt ungefähr 7 Jahre [Van den Berg 1994].

Päpke stellte in einer Untersuchung fest, dass die Hintergrundbelastung mit PCDDs/PCDFs in Deutschland von 1986 bis 1996 deutlich abgenommen hatte. Dieser Rückgang sei auf gesetzliche Regelungen und Verbote zurückzuführen. Trotz dieses Trends sei die hohe Exposition von Säuglingen mit PCDDs/PCDFs während der Stillzeit ein Grund zur Sorge und rechtfertige weitere Maßnahmen zur Reduktion von PCDD/PCDF-Emissionen in die Umwelt [Päpke 1998], was entsprechend auch für andere Verbindungen gilt.

1.1.2 Toxizität

Die Toxizität von Dioxinen kommt vermutlich vor allem durch die Bindung an den zytoplasmatischen Arylhydrocarbon (Ah)-Rezeptor zustande [Poland et al. 1976] [Vorderstrasse et al. 2001]. Während es auch andere xenobiotische Liganden wie Furane, Biphenyle und Anthracene gibt, sind endogene Liganden und die physiologische Funktion des Ah-Rezeptors noch nicht bekannt. Da er allerdings bei allen Säugetieren sowie Fischen, Würmern und Insekten vorkommt, ist eine fundamentale Rolle in der zellulären Physiologie naheliegend. Der Ah-Rezeptor ist Teil einer Funktionseinheit, die unter anderem Hitzeschockproteine beinhaltet. Nach Bindung oben genannter Substanzen an den Ah-Rezeptor, löst sich dieser von den anderen Proteinen und bildet einen Komplex mit dem Protein ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transferase). Dieser aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex bindet reversibel an spezifische DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenzen, die so genannten DREs (Dioxin-Response Elements). Durch die Modifikation der Transkription dieser Gene kommt es zu einer gesteigerten Synthese von spezifischen Proteinen, z. B. von Zytochrom P-450 1A und Gluthation-*S*-Transferase-Ya.

Es wird vermutet, dass die Induktion von spezifischen Proteinen die biochemischen und toxischen Effekte von Dioxinen und verwandten Substanzen vermittelt.

Die toxische Potenz der Dioxine und Furane korreliert mit der Bindungsaffinität zum Ah-Rezeptor, wobei TCDD die höchste Affinität und somit höchste Toxizität aufweist [DeVito/Birnbaum 1994] [Poellinger 2000].

Bei experimenteller Behandlung von Versuchstieren mit Dioxinen variierten die beobachteten toxischen Effekte je nach Stamm und Spezies erheblich. Zu den bei verschiedenen Tierspezies beschriebenen Auswirkungen gehörten Gewichtsverlust (wasting syndrome), Thymusatrophie, Immuntoxizität, Hepatotoxizität, toxische Wirkung auf Reproduktivität, Entwicklungsstörungen, Teratogenität und Karzinogenität. Zwischen den unterschiedlichen Spezies bestehen extreme Variationen bezüglich der TCDD-Dosis, welche eine akute Letalität hervorruft. Die LD_{50} (Letaldosis einer Chemikalie, die 50 % der damit behandelten Tiere tötet) beträgt bei dem TCDD-empfindlichsten Tier, dem Meerschweinchen, ungefähr 0,6 µg/kg KG. Der Hamster hingegen ist am wenigsten TCDD-sensibel und weist eine LD_{50} von mehr als 3.000 µg/kg KG auf. Bei anderen Spezies wie Affen, Kaninchen, Ratten, Mäusen und Hunden beträgt die LD_{50} zwischen 100 und 300 µg/kg KG [DeVito/Birnbaum 1994]. Diese Variation der LD_{50} von TCDD zwischen verschiedenen Spezies ist beispiellos im Vergleich zu anderen untersuchten chemischen Verbindungen. Die Übertragung von Ergebnissen tierexperimenteller Studien auf den Menschen ist aufgrund dieser Spezies-abhängigen unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Beziehungen, Halbwertszeiten und Effekt-Muster der Dioxine hoch problematisch.

Vor allem Unfälle haben Dioxine als gesundheitsgefährdende Substanzen für den Menschen in das öffentliche Bewusstsein gebracht. Der bekannteste Unglücksfall mit TCDD geschah 1976 in Seveso (Italien) bei einem Unfall in einer chemischen Fabrik. Hier traten ungefähr 200 Chlorakne-Fälle auf, während insgesamt mehrere zehntausend Personen exponiert waren [Bertazzi et al. 1998]. Seitdem trägt TCDD auch den Trivialnamen „Seveso-Gift“. Ein weiterer schwerer Unfall mit TCDD geschah 1953 in einer Industrieanlage in Ludwigshafen, wobei mehrere Dutzend Arbeiter an Chlorakne erkrankten [Zober et al. 1994]. Unfälle mit durch PCBs und PCDFs kontaminiertem Reisöl traten 1968 in Japan und 1979 in Taiwan auf, wobei jeweils mehrere hundert Patienten an Chlorakne erkrankten. Diese Massenvergiftungen

bekamen in Japan den Namen „Yusho“ und in Taiwan „Yu-Cheng“ [Masuda 1985]. Bekanntheit erlangten Dioxine auch, als im Rahmen von Entlaubungsaktionen im Vietnamkrieg in den 1960er und 1970er Jahren sehr große Mengen des Herbizids „Agent Orange“ eingesetzt wurden. Agent Orange bestand aus einer 1:1-Mischung von 2,4-Dichlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol, welches in hohem Maße mit TCDD kontaminiert war [Michalek et al. 1999]. In jüngerer Zeit gab es wiederholt Fälle, bei denen mit Dioxinen kontaminierte PCB-Öle in Tierfutter gelangten und verfüttert wurden, z. B. 1999 in Belgien [Bernard et al. 2002].

Der einzige beim Menschen gesicherte akute klinische Effekt von PCDDs und PCDFs ist die Entstehung von Chlorakne. Die Chlorakne ist eine schmerzhafte und schwer heilende Erkrankung der Talgdrüsen mit akneartigen, follikulären Hyperkeratosen, Komedonen, Zysten sowie Hyperpigmentationen. Diese tritt außer beim Menschen nur bei Affen, Kaninchenohren und der „hairless mouse“ auf. Die Chlorakne entwickelt sich nach Exposition mit obigen und anderen chlorierten Verbindungsgruppen innerhalb von einigen Wochen und bleibt zum Teil noch Jahrzehnte nach Exposition bestehen [DeVito/Birnbaum 1994]. Dabei gibt es anscheinend erhebliche interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit des Menschen. Bei Exponierten des Seveso-Unfalls wurden schwere Fälle von Chlorakne schon ab einer Konzentration von ungefähr 800 pg TCDD/g Blutfett beobachtet [Mocarelli et al. 1991], während eine Patientin nach akzidenteller Belastung Werte von initial 26.000 pg TCDD/g Blutfett aufwies, aber nur an einer milden Chlorakne erkrankte [Geusau et al. 2001]. Darüber hinaus gab es erstaunlicherweise auch bei extrem hohen Dioxin-Belastungen keine gesicherten akuten klinischen Wirkungen auf den menschlichen Organismus.
Nach dem Yu-Cheng-Unfall mit PCBs/PCDFs wurden bei Exponierten unter anderem folgende klinische Beobachtungen gemacht: Chlorakne, Hyperpigmentation von Haut, Schleimhaut und Nägeln, sowie Augensymptome wie Absonderungen und Lidödeme [Lü/Wu 1985]. Bei Kinder die in Folge des Yu-Cheng- und Yusho-Unfalls pränatal mit PCBs/PCDFs exponiert waren, wurden unter anderem niedrige Geburtsgewichte, geringere Geburtslängen, dunkelbraune Haut- und Schleimhaut-Pigmentationen („Cola-Baby“), Gingivahyperplasien, frühe Dentitionen, deformierte Nägel und Schädelkalzifikationen beobachtet [Yamashita/Hayashi 1985] [Rogan et al. 1988].
Bezüglich chronischer Wirkungen von TCDD wurden von Bertazzi et al. nach einer 20jährigen Beobachtung von Betroffenen des Seveso-Unfalls sowohl karzinogene

Wirkungen als auch kardiovaskuläre und endokrin-assoziierte Effekte beschrieben [Bertazzi et al. 2001]. In weiteren veröffentlichten Arbeiten über Effekte von Dioxinen auf den Menschen wurden in Ermangelung anderer Populationen vornehmlich (ehemals) beruflich exponierte Personen untersucht. Watanabe et al. berichten in ihrem Review von fünf Studien über karzinogene Dioxin-Effekte und ermitteln insgesamt ein relatives Risiko von 1,4 für maligne Neoplasien. Die unterschiedlichen Lokalisationen der Neoplasien (Lunge, Lymphsystem, Weichteile, Gastro-Intestinal-Trakt) und lange Latenzzeiten weisen dabei auf eine Rolle der Dioxine als Kokanzerogene hin. Bezüglich kardiovaskulärer Effekte berichten sie von drei Studien mit signifikant erhöhten Risiken für ischämische und chronische Herzerkrankungen sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen. Eine Studie über endokrine TCDD-Effekte teilt eine signifikante negative Korrelation mit Testosteron und positive Korrelationen mit Follikelstimulierendem Hormon und Luteinisierendem Hormon mit. Zwei Studien berichten von einer erhöhten Diabetes mellitus-Inzidenz [Watanabe et al. 1999]. Über Studien, welche Dioxin-Effekte auf das Immunsystem untersuchten, wird im folgenden Kapitel (1.1.3) berichtet.
Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss man allerdings berücksichtigen, dass ein Hauptproblem dieser epidemiologischen Untersuchungen die Mischexposition mit unterschiedlichen chemischen Substanzen ist. Die Beurteilung von möglichen Effekten einzelner Verbindungen auf den menschlichen Organismus wird dadurch erheblich erschwert bzw. unmöglich gemacht.

1.1.3 Immuntoxizität

In tierexperimentellen Studien wurden bei Behandlung mit Dioxinen bei unterschiedlichen Spezies Thymusatrophie, Wirkungen auf zelluläre und humorale Immunparametern, sowie erhöhte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten beobachtet. Die Untersuchungen wurden vor allem mit Nagetieren durchgeführt, aber auch mit Meerschweinchen, Kaninchen und Affen [Kerkvliet 1994] [Kerkvliet 1995]. Hier ist darauf hinzuweisen, dass die Thymusatrophie, welche bei allen untersuchten Spezies auftrat, durch eine direkte Thymus-Epithelschädigung entsteht, woraufhin es zu sekundären immuntoxischen Effekten kommt. Der Thymus spielt eine entschiedende Rolle in der Entwicklung der zellulären Immunität, da in diesem die prä- und postnatale Reifung und Differenzierung der T-Lymphozyten stattfindet [Kerkvliet 1994]. Aufgrund des Auftretens von suppressiven Effekten auf T-Zell- und B-Zell-vermittelte

Immunantworten bei relativ geringen TCDD-Dosierungen (ohne das andere offenkundige toxische Wirkungen eintraten), wurden diese Effekte als besonders sensitive Indikatoren einer TCDD-Exposition bezeichnet. Immunsuppressive Dioxin-Effekte traten ferner bei niedrigeren Dosierungen in der Prä- und Postnatal-Periode im Vergleich zu erwachsenen Nagetieren auf. Das in Entwicklung befindliche Immunsystem von Tieren wurde daraufhin als besonders empfindlich für die Dioxin-Toxizität bezeichnet [Holsapple et al. 1991]. Dabei ist zu beachten, dass die beobachteten Effekte auf lymphozytäre Immunfunktionen von Jungtieren vermutlich teilweise auf die epitheliale Thymusschädigung zurückzuführen sind. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden supprimierende TCDD-Effekte auf zellvermittelte Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktionen, Graft-versus-host-Reaktionen und T-Zell-Mitogen-Stimulationen bei Nagetieren beschrieben. Im Bereich des humoralen Immunsystems wurden supprimierende Wirkungen z. B. im Plaque-forming-cell-Test (mit IgG-bildenden Plasmazellen) und in Antigen-Antikörper-Reaktionen beobachtet. Bei Mäusen und Kaninchen waren die Gesamt-Immunglobuline bzw. IgG im Serum bei Belastung mit niedrigen TCDD-Dosen erhöht und bei hohen Dosen erniedrigt. Experimentelle Studien bezüglich TCDD-Einflüssen auf die Wirtsresistenz von Mäusen zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit Streptokokken, Salmonellen, Listerien, Influenza-Viren, Herpes simplex-Viren und Plasmodien [Holsapple et al. 1991]. Die in Tierexperimenten beobachtete Dioxin-Toxizität hatte vor allem suppressive, aber auch stimulative Effekte auf das Immunsystem. Dabei konnte kein allgemeiner Wirkmechanismus und kein durchgängiges Wirkmuster erfasst werden [DeVito/Birnbaum 1994].

Bezüglich möglicher Dioxin-Effekte auf das humane Immunsystem existieren vor allem Untersuchungen an akzidentiell exponierten Personen. Dabei wurden verminderte T-Lymphozyten-Werte, eine verminderte Zell-vermittelte Immunantwort und erniedrigte Thymosin-α-1-Werte, aber auch erhöhte Lymphozytenzahlen, verstärkte lymphoproliferative Antworten, erhöhte Serum-IgA-Spiegel und erhöhte Komplement-Protein-Werte beobachtet. Die Interpretation dieser Einzelbeobachtungen wird dadurch erschwert, das meist Mischexpositionen vorlagen, lange Latenzzeiten zwischen Exposition und Untersuchung bestanden, die Messung der individuelle Dioxin-Belastung fehlte bzw. nur geschätzt wurde, zahlreiche Confounder (Einflussfaktoren) zu berücksichtigen waren und sich die Veränderungen der Laborparameter teilweise nicht reproduzieren ließen [Kerkvliet 1995]. Baccarelli et al. untersuchten knapp 20 Jahre

nach dem Seveso-Unfall exponierte Personen. Dabei bestand ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen TCDD-Belastung und Serum-IgG-Werten. Diese Assoziation bestand auch nach weitergehender statistischer Analyse unter Einschluss von wichtigen Confoundern und Ausschluss von Personen mit Infektionen sowie Gebrauch von Antibiotika und nicht-steroidaler Antiphlogistika [Baccarelli et al. 2002]. Die mit PCBs und PCDFs exponierten Yu-Cheng-Personen wiesen bei Untersuchungen erniedrigte Serum-IgA- und IgM-Spiegel, einen verminderten Anteil von T-Lymphozyten und T-Helferzellen, einen vermehrten Anteil von T-Suppressorzellen und eine supprimierte Typ-IV-Reaktion auf. Es wurden aber auch verstärkte lymphoproliferative Antworten und erhöhte Komplement-Protein-Werte gefunden. Diese Veränderungen waren nur vorübergehend und die PCB/PCDF-Mischexposition erschwerte wiederum die Interpretation [Lü/Wu 1985]. Bei In-vitro-Untersuchungen von TCDD-Effekten auf humane Lymphozyten wurden supprimierte T- und B-Lymphozyten-Werte und eine verminderte Antikörper-Produktion beschrieben [Kerkvliet 1995].
Zusammenfassend gibt es zwar Hinweise, dass Dioxine einen immuntoxischen Effekt beim Menschen haben könnten, dies ist aber für eine reine TCDD-Exposition nicht nachgewiesen. Es gibt keinen eindeutig identifizierten Wirkungsmechanismus der Immuntoxizität von Dioxinen und außerdem keinen eindeutigen immuntoxischen Effekt auch bei höheren Gewebe-Konzentrationen.

1.2 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen erkennen sowohl virusinfizierte und maligne entartete körpereigene Zellen als auch körperfremde Zellen – im Folgenden Targetzellen genannt – und sind in der Lage, diese durch Lyse zu töten. Als Effektorzellen der angeborenen Immunität benötigen die NK-Zellen im Gegensatz zu T-Lymphozyten keine vorherige Sensibilisierung zur Aktivierung und sind zudem Thymus-unabhängig [Herberman/Holden 1978]. NK-Zellen werden sofort nach Pathogenkontakt und somit noch vor den spezifischen humoralen und zellulären Immunantworten aktiv und nehmen dadurch eine besondere Stellung im Abwehrsystem des Menschen ein. Die Aktivität von NK-Zellen wird dabei durch bestimmte Entzündungsmediatoren verstärkt, wodurch weitere Zellen des Immunsystems angelockt und aktiviert werden. Die spontane zytotoxische Aktivität von NK-Zellen ist dadurch charakterisiert, dass sie nicht MHC-restriktiert ist [West et al. 1977]. Der vorwiegende Zelltyp, der diese „nicht-MHC“

abhängige Lyse vermittelt, ist der CD3 (Cluster of Differentiation)-negative und CD56/CD16-positive große granuläre Lymphozyt (LGL) [O'Shea/Ortaldo 1992]. Aus morphologischer Sicht werden NK-Zellen als LGLs wegen eines Durchmessers von 12–15 µm, des hohen Zytoplasma-zu-Kern-Verhältnisses mit nierenförmigem Kern und ausgeprägten azurophilen Granula beschrieben. Da wie bei anderen Zelltypen eine Heterogenität existiert, gibt es auch NK-Zellen, die diese morphologischen Charakteristika nicht aufweisen [Trinchieri 1989] [Wahn 1999].

NK-Zellen stammen von hämatopoetischen Vorläufer-Stammzellen aus dem Knochenmark ab [Lanier 2000], differenzieren sich im peripheren Blut weiter aus und erreichen einen ruhenden, nicht-proliferierenden Zustand entweder im Blut oder in anderen Körpergeweben [O'Shea/Ortaldo 1992]. Sie kommen vor allem im peripheren Blut und in der roten Pulpa der Milz vor [Trinchieri 1989], ferner in der Duodenalschleimhaut, im Dickdarmgewebe und der Dezidua [Möller et al. 1998]. Außerdem können NK-Zellen in der Bronchialmukosa, in der Leber und in der Marginalzone der Lymphknoten nachgewiesen werden [Wahn 1999], sowie solide Tumoren infiltrieren und dort akkumulieren [Herberman/Ortaldo 1981].

1.2.1 Zell-Marker

Die Zelloberflächen-Antigene CD56 und CD16 werden allgemein am häufigsten als NK-Zell-Marker benutzt. CD56 ist das N-CAM (neurale Zelladhäsionsmolekül), welches von NK-Zellen und zu 5 % von CD3-positiven Lymphozyten exprimiert wird [Lanier et al. 1989]. Als CD16 wird der IgG-bindende Rezeptor FcγRIII bezeichnet. Dieser wird von NK-Zellen exprimiert und kann auch auf CD3-positiven Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten vorhanden sein [Lanier et al. 1983] [Lanier et al. 1986]. Durch Anwendung von Fluorochrom-tragenden Antikörpern in Kombination können NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie selektiv identifiziert und quantifiziert werden (siehe auch 2.5 und 2.6). Sie sind in der Laborroutine als CD3-negative und CD56-positive und/oder CD16-positive Zellen ($CD3^{-}CD56/16^{+}$) definiert, die sich aus den Lymphozyten-Subpopulationen mit den Oberflächenantigenen $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$, $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ und $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$ zusammensetzen. Dadurch können NK-Zellen als distinkte dritte Gruppe der Lymphozyten, neben den T- und B-Lymphozyten, identifiziert werden.

Nach Lanier et al. haben bei Erwachsenen die NK-Zell-Subpopulationen einen Anteil von ungefähr 10 % an den Lymphozyten ($CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$: 1 %; $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$: 8 %; $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$: < 1 %) [Lanier et al. 1986].

1.2.2 Funktion

In tierexperimentellen Modellen wurde eine Rolle der NK-Zellen bei der Immunabwehr von Infektionen, bei der Elimination von neoplastischen Zellen und der Regulation der Hämatopoese nachgewiesen [Trinchieri 1989] [Robertson/Ritz 1990]. Auch beim Menschen wurde die Bedeutung der NK-Zellen als Effektorzellen der angeborenen Immunität, und hier vor allem bei viralen Infektionen, durch In-vivo-Studien beschrieben [Trinchieri 1989] [Biron 1999]. Neben der Fähigkeit humaner NK-Zellen, verschiedene Targetzellen direkt zu lysieren, wurde in-vitro auch die Produktion von diversen löslichen Faktoren beobachtet. Aktivierte NK-Zellen produzieren unter anderem die Zytokine Interferon (IFN)-γ, Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Interleukin (IL)-5, IL-8, IL-10, IL-13 sowie die Chemokine Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1α, MIP-1ß und Lymphotaktin. Dadurch sind sie in der Lage, Effektorzellen des erworbenen Immunsystems anzulocken und zu aktivieren [Lanier 2000]. Die NK-Aktivität wiederum kann durch IFN-α/ß und IL-2 induziert und verstärkt werden [Biron 1999]. Ferner sind NK-Zellen in der Lage, die hämatopoetischen Faktoren Granulozyten-Makrophagen-Kolonienstimulierenden Faktor (GM-CSF), Makrophagen-Kolonienstimulierenden Faktor (M-CSF) und IL-3 zu bilden [Murphy/Longo 1996].

1.2.3 Zytotoxische Aktivität

Schon in den 1960er Jahren wurde eine Reaktivität von Blutzellen gesunder Individuen gegen Tumorzell-Linien in-vitro beobachtet. Diese „normale Reaktivität“ wurde aber zunächst für ein Artefakt gehalten [Oldham 1982]. Die Erstbeschreibung der NK-Aktivität wurde 1972 von Rosenberg et al. veröffentlicht. Hier wurde beobachtet, dass frisch isolierte Lymphozyten unimmunisierter gesunder Spender allogene Tumorzellen lysieren konnten [Rosenberg et al. 1972].

Die Zytotoxizität von NK-Zellen wird durch eine Balance von positiven und negativen Signalen reguliert. Damit es zur Lyse von Targetzellen durch NK-Zellen kommen kann, benötigen diese sowohl das Fehlen eines Inhibitionssignales als auch das Vorhandensein eines Aktivierungssignals. NK-Zellen können über Rezeptoren

MHC Klasse-I Moleküle auf anderen Zellen erkennen, woraufhin Signale übermittelt werden, welche die NK-Aktivität inhibieren. Das bedeutet, dass NK-Zellen nur solche Zellen lysieren, die entweder nie MHC Klasse-I Moleküle besaßen, diese verloren haben oder insuffiziente Mengen davon exprimieren („missing self"-Theorie) [Ljunggren/Kärre 1990]. Eine Niederregulation von MHC-Liganden kann z. B. durch virale Infektion oder maligne Transformation erfolgen.
Von den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren sind mittlerweile drei unterschiedliche Rezeptor-Familien charakterisiert worden: KIRs (Killerzell-inhibitorische Rezeptoren), CD94/NKG2 und Ly49 [Lanier 1998].
Einige der für die Aktivierung der NK-Zellen verantwortlichen NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors) wurden ebenfalls vor kurzem identifiziert. Bestimmte NCRs (NKp30, NKp46) kommen auf ruhenden und aktivierten NK-Zellen vor, während ein anderer NCR (NKp44) nur von IL-2-aktivierten NK-Zellen exprimiert wird. Die korrespondierenden Liganden auf den Targetzellen sind noch nicht identifiziert [Moretta et al. 2000] [Moretta et al. 2001].
Bei einer gleichzeitigen Ligation von aktivierenden und inhibierenden NK-Rezeptoren kommt es zu einer Dominanz der Inhibition. Weiterhin existieren diverse synergistische Rezeptoren und kostimulatorische Adhäsionsmoleküle (u. a. NKG2D, 2B4, NKp80), die NK-Zytotoxizität oder Zytokin-Sekretion anregen können [Lanier 2000] [Lanier 2001]. Hier sind folgende Liganden auf Targetzellen bekannt: MICA/B (major histocompatibility complex class I chain-related) Oberflächen-Antigene für NKG2D und CD48 für 2B4 [Moretta et al. 2001].

Der Vorgang der Zelltötung durch NK-Zellen läuft typischerweise wie folgt ab: Nach Erkennung der Targetzelle und Bindung an diese wird die Targetzell-Membran beschädigt, die Defragmentierung der Targetzell-DNA induziert und der Inhalt der Targetzelle freigesetzt. Nach der Lyse der Targetzelle „recycelt" sich die NK-Zelle, um neue lytische Interaktionen zu initiieren [Berke 1994].
Folgende direkte Mechanismen der Zytotoxizität werden postuliert: Nach Exozytose des Proteins Perforin aus Sekretgranula der Effektorzelle bindet dieses in Anwesenheit von Kalzium an die Membran der Targetzelle, fügt sich in die Lipid-Doppelschicht ein und polymerisiert schließlich zu Poren-artigen Komplexen, die als tubuläre Läsionen in der Zellmembran imponieren. Die Porenbildung führt zur Lyse der Targetzelle durch osmotische Effekte, Kalziumeinstrom und Energieverlust. Weiterhin werden Serin-

Esterasen, so genannte Granzyme, aus Vesikeln der Effektorzellen freigesetzt, die vermutlich innerhalb der Targetzelle Prozesse der DNA-Defragmentierung aktivieren [Lowin et al. 1995].

Daneben gibt es einen nicht-sekretorischen zytotoxischen Mechanismus, der möglicherweise über eine Mediator-vermittelte Triggerung von Targetzell-Oberflächenmolekülen [Berke 1994] beziehungsweise direkte Zellmembran-Interaktionen zwischen Effektor- und Targetzell-Liganden [Vujanovic et al. 1996] zur Apoptose führt.

NK-Zellen können auch eine ihnen eigene Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) über den IgG-Rezeptor CD16 vermitteln, wenn die Zielzellen mit dem entsprechenden Immunglobulin überzogen sind [Trinchieri 1989].

1.2.4 Klinische Bedeutung

Es gibt Menschen mit einem selektiven Mangel an NK-Zellen, die eine Neigung zu rekurrierenden schweren Infektionen, vor allem mit Herpesviren, haben. Biron et al. veröffentlichten 1989 die Erstbeschreibung einer Patientin mit einem kompletten selektiven NK-Zell-Mangel, die an schweren Varicella-Zoster-Virus-, Zytomegalie-Virus- und Herpes simplex-Virus-Infektionen erkrankte [Biron et al. 1989].
Erhöhte NK-Zellzahlen können bei einer chronischen NK-Zell-Lymphozytose und der sehr seltenen NK-Zell-ALL (akute lymphatische Leukämie) auftreten [Trinchieri 1989].

Fleisher et al. beschrieben schon 1982 eine fehlende NK-Aktivität bei zwei Geschwistern, die an schwersten Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektionen erkrankten, woran bereits ein anderer Bruder verstorben war. Hierbei wurden keine Angaben zu NK-Zellzahlen gemacht [Fleisher et al. 1982]. Komiyama et al. berichteten 1990 von zwei männlichen Geschwistern mit selektiv fehlender NK-Aktivität bei normalen NK-Zellzahlen, wobei die NK-Zellen zwar an Targetzellen banden, diese aber nicht lysieren konnten. Beide Kinder wiesen häufige Infekte der oberen Atemwege auf, eines der Kinder befand sich in Remission nach M. Hodgkin [Komiyama et al. 1990]. Bei Patienten mit X-chromosomalem lymphoproliferativem Syndrom besteht aufgrund einer Genmutation eine Dysfunktion des 2B4-Rezeptors, woraufhin die NK-Zellen unfähig sind, EBV-infizierte B-Lymphozyten zu lysieren.

Diese Patienten sterben häufig an EBV-Infektionen und EBV-induzierten B-Zell-Malignitäten [Moretta et al. 2001]. Die NK-Zellzahl ist dabei nicht verändert [Lanier 2001].

Reduzierte NK-Zellzahlen und eine mangelnde oder fehlende NK-Aktivität sind bei den unterschiedlichsten Krankheitszuständen beschrieben worden. Diese reichen von immunologischen über maligne Erkrankungen bis hin zu psychischen Krankheiten [Trinchieri 1989]. Whiteside und Herberman wiesen aber darauf hin, dass Defizite der natürlichen Immunität, die sich durch mangelnde oder fehlende NK-Aktivität wiederspiegeln, allgemeine Anzeichen einer Krankheit oder möglicherweise sogar Prediktoren für die Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen seien [Whiteside/Herberman 1989].

Seit vielen Jahren gibt es Versuche, aktivierte NK-Zellen in der experimentellen Immuntherapie von malignen Tumoren und Metastasen einzusetzen. Dabei wurden entweder NK-Zellen in-vitro IL-2-stimuliert und als so genannten LAK (lymphokine-activated killer)-Zellen reinfundiert oder IL-2 wurde subkutan zur in-vivo NK-Zell-Stimulation appliziert. Die klinische Effizienz dieser NK-Zell-Therapien beim Menschen wurde allerdings noch nicht bewiesen [Miller 2001].

1.3 Messmethoden der zytotoxischen Aktivität

Die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität von NK-Zellen ist der Chrom-Release-Assay [Brunner et al. 1968], der als „Goldstandard“ angesehen wird. Dabei werden Targetzellen durch Bindung von radioaktivem $Na_2{}^{51}CrO_4$ an intrazelluläre Proteine markiert und in-vitro mit Effektorzellen inkubiert. Meist werden K562-Zellen als Targetzellen eingesetzt. Diese stammen aus einer Zell-Linie eines Patienten in der Blastenkrise einer chronisch-myeloischen Leukämie, die als besonderes Merkmal das Fehlen von MHC Klasse-I und -II-Antigenen aufweisen und sensitiv auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen reagieren [Lozzio/Lozzio 1973]. Bei der Lyse von Targetzellen durch die Effektorzellen kommt es zur Freisetzung des Isotops aus den Targetzellen in das Medium. Nach 4 Stunden Inkubationszeit wird zellfreier Überstand entnommen und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem Gammacounter gemessen. Die Menge des freigesetzten ^{51}Cr ist direkt proportional zu dem Anteil der getöteten Targetzellen.

Diese Methode weist allerdings eine Reihe von Nachteilen auf:

- hohe Kosten aufgrund der kurzen Halbwertszeit der radioaktiven Reagenzien,
- Einsatz von radioaktivem Material mit potenzieller Gesundheitsgefährdung und Entsorgungsproblematik,
- hohe spontane Freisetzung von ^{51}Cr aus den Targetzellen,
- zeitliche Diskrepanz zwischen der eigentlichen Zellschädigung und der Freisetzung von ^{51}Cr-gebundenen intrazellulären Proteinen in den Überstand,
- langwierige Markierungs- und Inkubationsprozeduren.

Aus diesen Gründen gab es Bestrebungen eine Alternative zu dem Chrom-Release-Assay zu finden. Hier hat sich die Technik der Durchflusszytometrie angeboten. Die Durchflusszytometrie kann mit einem optischen Mess-System Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften, Licht zu streuen, unterscheiden. Außerdem können Lymphozyten-Subpopulationen nach Markierung von Zell-Oberflächenantigenen mit an monoklonale Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen differenziert werden (siehe auch 2.5 und 2.6). Gegenüber dem Chrom-Release-Assay bietet die Durchflusszytometrie folgende Vorteile:

- Vermeidung von radioaktiven Reagenzien,
- Erkennung des Zelltodes in einer früheren Phase des Tötungsprozesses,
- Möglichkeit zur weiteren Charakterisierung der NK-Zellen durch Immunphänotypisierung,
- Erkennung von Zytotoxizität auf Einzel-Zell-Niveau im Gegensatz zum Chrom-Release-Assay, der nur die Zytotoxizität von ganzen Zellpopulationen messen kann.

Das grundlegende Element aller flowzytometrischen Methoden ist die Möglichkeit, NK-Zellen von sowohl lebenden als auch toten Targetzellen zu unterscheiden. Dabei haben verschieden Arbeitsgruppen unterschiedliche Ansätze benutzt:
Vitale et al. haben eine Methode entwickelt, bei der die unterschiedlichen Zellpopulationen durch Streulichteigenschaften unterschieden wurden und Zytotoxizität durch Veränderungen der Streulichteigenschaften von Targetzellen gemessen wird [Vitale et al. 1989]. McGinnes et al. haben Targetzellen mit dem Fluorochrom c'FDA markiert und die Fluoreszenzabnahme nach Lyse der Targetzellen zur Bestimmung der

Zytotoxizität verwandt [McGinnes et al. 1986]. Die Arbeitsgruppen von Zarcone [Zarcone et al. 1986], Papa [Papa et al. 1988] und Racz [Racz et al. 1990] nutzten neben Streulichteigenschaften zur Zelldiskriminierung die Aufnahme des DNA-Farbstoffes Propidiumjodid (PI) in tote Targetzellen, um Zytotoxizität zu messen. Andere Arbeitsgruppen wandten Methoden an, bei denen zur Zelldiskriminierung die Targetzellmembran durch ein Fluorochrom markiert und die Lyse von Targetzellen durch Aufnahme von PI gemessen wurde. Zum Einsatz kamen die Fluorochrome PKH-1 [Slezak/Horan 1989], PKH-26 [Hatam et al. 1994], FDA [Shi et al. 1987], F-18 [Radosevic et al. 1990], DiO [Chang et al. 1993] [Kane et al. 1996], DIOC18 [Lötzerich/Hirt 1997] [Piriou et al. 2000] und D275 [Kroesen et al. 1992] [Johann et al. 1995]. Flieger et al. gebrauchten eine Methode, die neben dem Einsatz von PI mit der Färbung von Effektorzellen mit PKH-26 und Targetzellen mit PKH-2 arbeitete [Flieger et al. 1995]. Anfärbung von Effektorzellen mit Anti-CD56-PE zur Zelldiskriminierung und Zytotoxizitätsmessung durch Veränderungen der Streulichteigenschaften wurde von Zamai et al. eingesetzt [Zamai et al. 1998]. Godoy-Ramirez et al. färbten Effektorzellen mit FITC-Anti-CD45 und maßen Zytotoxizität durch Aufnahme von PI [Godoy-Ramirez et al. 2000]. Papadopoulos et al. setzten das Fluorochrom Calcein AM und als DNA-Färbung EH-1 ein [Papadopoulos et al. 1994]. Streulichteigenschaften und Abnahme der Fluoreszenz von FITC-Anti-CD71 markierten Targetzellen bei Lyse wurden von Hoshino et al. zur Zytotoxizitätsbestimmung angewandt [Hoshino et al. 1991]. Goldberg et al. hatten eine Methode vorgestellt, bei der Effektorzellen durch einen PE-konjugierten monoklonalen Antikörper identifiziert wurden und der Targetzelltod mit dem an einen frühen Apoptose-Marker bindenden Annexin-V FITC gemessen wurde [Goldberg et al. 1999].

Die 21 oben angegebenen Arbeitsgruppen hatten ihre Methoden jeweils mit dem Chrom-Release-Assay verglichen, wiesen auf eine hohe Korrelation mit diesem hin (Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}82–0{,}99$, Signifikanzniveau $p < 0{,}05 – < 0{,}001$), und ferner auf hohe Sensitivität und Zeitersparnis hin. Es gab jedoch je nach methodischem Ansatz Probleme mit Überschneidung der Streulichteigenschaften von Effektor- und Targetzellen, spektraler Überlappung der Fluorochrome, geringer Stabilität des Farbstoffes und spontaner Freisetzung des Fluorochroms bei längeren Inkubationszeiten.

Hatam et al. sehen den Chrom-Release-Assay im Vorteil, wenn unter experimentellen Arbeitsbedingungen eine große Anzahl (> 100) Proben analysiert werden muss und ein automatisierter Radionukleotidzähler eingesetzt wird. Falls jedoch in einem klinischen Labor 3 bis 4 Patienten pro Tag auf NK-Aktivität hin untersucht werden, sei die flowzytometrische Methode eine zeitsparende Alternative, die zudem eine teure Vorhaltung eines Isotops mit kurzer Halbwertszeit unnötig mache [Hatam et al. 1994].

1.4 Einflüsse persistenter organischer Schadstoffe auf NK-Zellen und NK-Aktivität

Es gibt eine Reihe von experimentellen Arbeiten mit Tieren, die sich mit den Einflüssen von Dioxinen und anderen POPs auf NK-Zellen und NK-Aktivität beschäftigen. Studien über Effekte von Dioxinen auf den Menschen wurden vor allem bei beruflich exponierten Industriearbeitern durchgeführt. Außerdem befassten sich hinsichtlich der NK-Zellzahlen zwei Arbeiten mit durch Nahrungsmittel aus dem Meer besonders exponierten Personen, eine Arbeit mit beruflich exponiertem Militärpersonal und zwei weitere Arbeiten mit Jugendlichen bzw. gestillten Kindern, die im Rahmen der allgemeinen Hintergrundbelastung exponiert waren.

1.4.1 NK-Zellen

Ernst et al. fanden bei einer Untersuchung von Arbeitern aus Deutschland (n = 19, Kontrollgruppe n = 28), die u. a. mit TCDD (Median 116 ng TCDD/kg KG bzw. 252 ng I-TEq/kg KG) belastet waren, keine signifikanten Unterschiede des relativen Anteils von $CD16^{+}$-Zellen zwischen Probanden und Kontrollpersonen [Ernst et al. 1998].
Jennings et al. hatten 17 Jahre nach einem Industrieunfall mit TCDD belastete englische Arbeiter (n = 18, Kontrollgruppe n = 15) untersucht und berichteten eine signifikant höhere absolute NK-Zellzahl, die sie mit dem monoklonalen Antikörper CD57 identifiziert hatten. Dies entspricht nicht der gängigen Praxis, da dieser Marker zu ungefähr 60 % auf NK-Zellen, aber auch auf T-Lymphozyten-Subpopulationen zu finden ist. Allerdings wurden ansonsten keine Veränderungen der T-Lymphozyten-, T-Helferzell- oder T-Supressorzell-Zahlen gefunden [Jennings et al. 1988].

Jung et al. hatten bei Arbeitern (n = 149) einer deutschen Pestizid-Fabrik, die mit PCDDs/PCDFs (Median 36 pg TCDD/g Fett bzw. 104 pg I-TEq/g Fett) belastet waren, keine Korrelation zwischen den TCDD- bzw. I-TEq-Werten und der Zahl von $CD3^{-}/CD16(56)^{+}$-NK-Zellen gefunden [Jung et al. 1998].

Bei einer Untersuchung von Kitamura et al. bei japanischen Arbeitern (n = 94), die mit PCDDs, PCDFs und Co-PCBs belastet waren (Median 40 pg I-TEq/g Fett), wurde keine signifikante Assoziation mit $CD56^{+}$-Zellen beobachtet [Kitamura et al. 2000].

Lovik et al. hatten bei einer Untersuchung von Freizeit-Fischern (n = 24, Kontrollgruppe n = 10), die mit POPs kontaminierte Krebse aus einem belasteten norwegischen Fjord konsumierten, keine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von $CD56^{+}$-Zellen und PCB/PCDD/PCDF-Werten beobachtet [Lovik et al. 1996].

Michalek et al. hatten US-amerikanische Kriegsveteranen untersucht, die in Vietnam im Rahmen von Entlaubungsaktionen teilweise mit TCDD belastet wurden. Die Veteranen wurden in 3 Kategorien eingeteilt: niedrige (> 10–94 ppt; n = 100) und hohe (> 94 ppt; n = 104) Exposition, sowie Hintergrundbelastung (≤ 10 ppt; n = 149) und mit einer Vergleichsgruppe (≤ 10 ppt; n = 450) verglichen. Hierbei konnten sie keinen Effekt der TCDD-Belastung auf die absoluten und relativen Zahlen der $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen beobachten [Michalek et al. 1999].

Neubert et al. hatten Arbeiter (n = 89) einer deutschen chemischen Fabrik, welche mit PCDDs/PCDFs (Median 42 ppt TCDD bzw. 133 ppt I-TEq) belastet waren, bezüglich Auswirkungen auf Lymphozyten-Subpopulationen hin untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Effekt auf die Anzahl von $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen nachgewiesen werden [Neubert et al. 1993].

Ott et al. hatten deutsche Arbeiter (n = 138) untersucht, welche nach einem Industrieunfall zum Teil hoch mit TCDD exponiert waren (< 1 bis 553 ppt). Dabei wurde ein geringfügig höherer NK-Zellanteil bei TCDD-Belasteten ohne Signifikanz beobachtet. Eine geringfügige signifikante negative Assoziation bestand zwischen dem Chlorakne-Status der Arbeiter und dem relativen NK-Zellanteil [Ott et al. 1994].

Svensson et al. hatten schwedische Probanden (n = 23, Kontrollgruppe n = 17) untersucht, die aufgrund von starkem Fischkonsum aus dem baltischen Meer mit POPs (PCDDs/PCDFs Median 64 pg/g Blutfett) belastet waren.

Dabei wurden signifikant verringerte absolute und relative $CD3^{-}CD56^{+}$-Zellzahlen in Assoziation mit PCB 118, PCB 126 und DDT beobachtet, während die negative Assoziation mit PCDDs/PCDFs statistisch nicht signifikant war [Svensson et al. 1994]. Van Den Heuvel et al. untersuchten belgische Jugendliche (n = 200) bezüglich immunologischer Effekte der Hintergrundbelastung unter anderem mit PCBs (PCB 138, PCB 153, PCB 180) und Dioxin-artigen PHAHs. Dabei wurde eine signifikante negative Assoziation des relativen NK-Zell-Anteils mit den Serumkonzentrationen der obigen Verbindungen beobachtet. Die Serum-Werte wurden dabei in CALUX-TEqs (chemical-activated luciferase gene expression assay) mitgeteilt, eine Methoden-spezifische Einheit, in welche Dioxine, Furane und co-planare PCBs eingehen [Van Den Heuvel et al. 2002].
Weisglas-Kuperus et al. hatten immunologische Effekte der Hintergrundbelastung niederländischer Säuglinge mit Dioxinen und PCBs untersucht. Als Maß der pränatalen Belastung der Säuglinge wurden pränatal erhobene maternale Plasma-PCB-Werte (Mittelwert 2,1 µg/l; n = 48) verwandt. Die postnatale Belastung wurde als Produkt aus PCDD/PCDF/PCB-TEq-Werten in der Muttermilch (WHO-TEq Mittelwert 64 pg/g Fett; n = 19) und der Stilldauer in Wochen berechnet. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der absoluten Zahlen von $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen zum Zeitpunkt der Geburt, nach 3 und 18 Monaten im Hinblick auf die prä- und postnatale PCB/Dioxin-Belastung beobachtet [Weisglas-Kuperus et al. 1995].

In ihrer tierexperimentellen Arbeit hatten Neubert et al. Marmosets (*Callithrix jacchus*, Weißbüscheläffchen; n = 11, Kontrollgruppe n = 24) einmalig TCDD subkutan verabreicht und Auswirkungen auf Lymphozyten-Subpopulationen untersucht. Dabei wurde 15 Wochen nach Applikation von 10 µg TCDD/kg KG ein geringfügiger signifikanter Anstieg der absoluten und relativen Anzahl von $CD56^{+}$-Zellen beobachtet [Neubert et al. 1990].
Die Ergebnisse der vorangegangenen Arbeiten sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst.

1.4.2 NK-Aktivität

Bezüglich der Auswirkungen von Dioxinen und anderen POPs auf die Aktivität von NK-Zellen wurden vor allem experimentelle Arbeiten mit Mäusen und Ratten, aber auch zwei Arbeiten mit Rhesusaffen und zwei epidemiologische Studien beim Menschen, veröffentlicht und im Folgenden zitiert.

Mantovani et al. hatten in ihrer Studie Mäuse (*Mus musculus*, C57BL/6J) intraperitoneal einmalig mit 30 µg TCDD/kg KG behandelt und anschließend die Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten gemessen. Die NK-Aktivität der Splenozyten blieb unverändert, wohingegen die Splenozytenzahl der behandelten Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant vermindert war. Die Autoren sprachen hier von einer signifikanten Reduktion der gesamten zytotoxischen Kapazität. Diese Reduktion war 47 Tage nach TCDD-Gabe komplett reversibel [Mantovani et al. 1980].

House et al. hatten in einer Untersuchung Mäuse (B6C3F1) intraperitoneal einmalig mit 0,1, 1,0 oder 10,0 µg TCDD/kg KG behandelt und konnten nach 7 bis 10 Tagen keinen signifikanten Effekt auf die Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten beobachten [House et al. 1990].

Funseth und Ilbäck hatten Mäuse wiederholt intraperitoneal mit einer Gesamtdosis von 9,26 µg TCDD/kg KG behandelt. Die Gesamt-NK-Aktivität stieg nach 28 Tagen im peripheren Blut signifikant um das 3,4-fache und in der Milz um das 2,2-fache an, wobei diese Effekte noch nach 120 Tagen persistierten [Funseth/Ilbäck 1992].

Kerkvliet et al. hatten das Futter von Mäusen (C57Bl/6) über 8 Wochen mit 100, 250 oder 500 ppm (parts per million) T-PCP (technical grade Pentachlorophenol) versetzt, welches mit PCDDs/PCDFs verunreinigt ist. Dabei kam es zu einem geringen Anstieg der Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten im Vergleich zu Kontrolltieren, ohne dass Signifikanzniveau erreicht wurde [Kerkvliet et al. 1985].

ß-HCH, das Abbauprodukt von Lindan, wurde von Cornacoff et al. in seiner Wirkung auf die Gesamt-NK-Aktivität untersucht. Dabei wurden Mäuse (B6C3F1) oral mit 100 oder 300 mg ß-HCH/d über 30 Tage behandelt. Es kam zu einer signifikanten Erhöhung der Lymphozytenzahlen bei beiden ß-HCH-Dosen und einer Reduktion der zytotoxischen Aktivität um 12 % (nicht signifikant) bzw. 45 % (signifikant) [Cornacoff et al. 1988].

Ross et al. hatten mit PCDDs, PCDFs und PCBs kontaminiertes (0,3 und 2,1 ng I-TEq/kg KG) bzw. zusätzlich mit TCDD versetztes (134 ng I-TEq/kg KG) Fischöl an schwangere Ratten (*Rattus norvegicus*, PVG) verfüttert und anschließend deren Nachwuchs untersucht. Bei den mit den höchsten Dosen behandelten Ratten-Jungen wurde eine signifikant reduzierte Virus-assoziierte Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten beobachtet [Ross et al. 1997].

Smialowicz et al. untersuchten die Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten von Ratten (Fischer-344), die 15 Wochen lang oral mit 0,1, 1, 10 oder 25 mg PCBs/kg KG behandelt wurden.

Dabei beobachteten sie eine signifikant reduzierte NK-Aktivität bei Behandlung mit 10 und 25 mg PCBs/kg KG [Smialowicz et al. 1989].

Talcott et al. hatten Ratten (Sprague-Dawley) 10 Wochen mit 50 oder 500 ppm PCBs als Futterzusatz behandelt und anschließend eine signifikant supprimierte Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten in-vivo und in-vitro nachgewiesen, wobei die mit 500 ppm PCBs behandelten Ratten auch eine geringere Zellzahl in der Milz aufwiesen [Talcott et al. 1985].

Yang et al. hatten Ratten (Fischer-344) oral mit 3, 10 oder 30 µg TCDD/kg KG behandelt. Während die spontane Gesamt-NK-Aktivität in Lunge und Milz im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert blieb, bewirkte die TCDD-Gabe nach Infektion der Tiere mit dem Influenza-Virus eine signifikante Suppression der NK-Aktivität in der Lunge, nicht aber in der Milz [Yang et al. 1994].

Van Loveren et al. konnten nach oraler Behandlung mit 150 oder 450 mg HCB/kg KG über 6 Wochen eine dosis-abhängige Suppression der Gesamt-NK-Aktivität in der Lunge von untersuchten Ratten (Wistar-RIV:Tox) nachweisen. Diese hatte bei den mit 450 mg HCB behandelten Ratten Signifikanzniveau [Van Loveren et al. 1990].

Omara et al. behandelten Ratten-Splenozyten (Fischer-344) 24 bis 72 Stunden in-vitro mit unterschiedlichen Gemischen aus PCDDs/PCDFs (1 oder 15 pg/ml Kulturflüssigkeit) oder PCBs (0,01 oder 0,5 µg/ml Kulturflüssigkeit). Dabei wurde keine Wirkung auf die Gesamt-NK-Aktivität der Splenozyten beobachtet [Omara et al. 1998].

Wade et al. behandelten Ratten oral über 70 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Gemisches aus POPs (u. a. TCDD, PCBs, pp-DDE, HCB) und Metallen (Blei und Cadmium). Dabei zeigte sich eine biphasische Wirkung auf die Gesamt-NK-Aktivität bei der höheren eingesetzten E:T-Ratio (Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnis), mit einer Aktivitätssteigerung bei der niedrigsten (mit einer Hintergrundbelastung vergleichbaren) Dosis und einer Aktivitätsminderung bei höheren Dosen, bis hin zu einer Suppression der Aktivität bei der höchsten Dosis unter Kontrollwerte [Wade et al. 2002].

Hong et al. hatten erwachsene Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und deren Junge über vier Jahre mit 5 bzw. 25 ppt TCDD/d als Futterzusatz behandelt und konnten dabei keine Veränderung der Gesamt-NK-Aktivität beobachten [Hong et al. 1989].

Tryphonas et. al hatten Rhesusaffen 55 Monate lang mit 5, 20, 40 oder 80 µg PCBs/kg KG/d im Futter behandelt und eine Dosis-abhängige Zunahme der Gesamt-NK-Aktivität beobachtet, die nur bei der höchsten E:T-Ratio signifikant war [Tryphonas et al. 1991].

Kitamura et al. untersuchten japanische Arbeiter, die mit PCDDs, PCDFs und Co-PCBs belastet waren. Hierbei wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen PCDD-Werten bzw. WHO-TEq (Mittelwert 99,7 pg/g Blutfett) und Gesamt-NK-Aktivität gefunden [Kitamura et al. 2000].
Lovik et al. hatten bei einer Untersuchung von Freizeit-Fischern, die mit POPs kontaminierte Krebse aus einem belasteten norwegischen Fjord konsumierten, keine Korrelation zwischen der Gesamt-NK-Aktivität und PCB/PCDD/PCDF-Werten beobachtet [Lovik et al. 1996].
Eine zusammenfassende Übersicht der vorangehenden Arbeiten wird in Tabelle 1-3 gegeben.

Die oben zitierten tierexperimentellen Arbeiten unterscheiden sich zum Teil erheblich im Studienaufbau. Es wurden bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Testsubstanzen, Dosen, Verabreichungswege, Behandlungszeiträume, Untersuchungszeitpunkte und Messmethoden benutzt. Die Studiendesigns der obigen epidemiologischen Untersuchungen am Menschen differierten naturgemäß stark voneinander. Hier lagen immer Mischexpositionen vor, wobei der Expositionszeitpunkt teilweise mehrere Jahrzehnte zurücklag. Einige Arbeiten hatten nur Schätzwerte der Dioxinexposition benutzt, zum Teil weil zu dem Untersuchungszeitpunkt noch nicht die technischen Möglichkeiten einer POP-Bestimmung in-vivo bestanden. Die Arbeitsgruppen benutzten außerdem keine einheitliche Definition der NK-Zellen und hatten zum Teil nur $CD16^+$- oder $CD56^+$-Zellzahlen angegeben. Bei diesen Vorraussetzungen erscheint es nicht verwunderlich, dass die obigen Arbeiten zum Teil widersprüchliche POP-Effekte berichteten. Selbst bei Betrachtung einer Spezies ist es daher nicht möglich, einen immunsuppressiven oder immunstimulativen Einfluss von Dioxinen bzw. PCBs zu identifizieren. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei diesen Beobachtungen überhaupt um echte POP-Effekte handelt.

Tabelle 1-2: Studien über POP-Wirkungen auf NK-Zellzahl

(⇓: vermindert, ⇔: unverändert, ⇑: gesteigert, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Spezies	POPs	NK-Zellzahl	Autoren
Marmoset	TCDD	⇑ *	Neubert 1990
Mensch	PCBs, DDT	⇓ *	Svensson 1994
	PCDDs, PCDFs	⇓	
Mensch	PCDDs, PCDFs, PCBs	⇓ *	Van Den Heuvel 2002
Mensch	TCDD	⇔	Ernst 1998
Mensch	TCDD	⇔	Jung 1998
Mensch	PCDDs, PCDFs, PCBs	⇔	Kitamura 2000
Mensch	PCDDs, PCDFs, PCBs	⇔	Lovik 1996
Mensch	TCDD	⇔	Michalek 1999
Mensch	PCDDs, PCDFs	⇔	Neubert 1993
Mensch	PCDDs, PCDFs, PCBs	⇔	Weisglas-Kuperus 1995
Mensch	TCDD	⇑	Ott 1994
Mensch	TCDD	⇑ **	Jennings 1988

Tabelle 1-3: Studien über POP-Wirkungen auf NK-Aktivität

(⇓: vermindert, ⇔: unverändert, ⇑: gesteigert; *: $p < 0{,}05$, **: $p < 0{,}01$, ***: $p < 0{,}001$,

CR: Chrom-Release-Assay, FCM: Flowzytometrie-Assay,

k. A.: keine Angabe, [1]: initial Aktivitätssteigerung)

Spezies	POPs	NK-Aktivität	Assay	Autoren
Maus	ß-HCH	⇓*	CR	Cornacoff 1988
Maus	TCDD	⇔	CR	Mantovani 1980
Maus	TCDD	⇔	CR	House 1990
Maus	TCDD	⇑ **	CR	Funseth/Ilbäck 1992
Maus	T-PCP (PCDDs/PCDFs)	⇑	CR	Kerkvliet 1985
Ratte	PCDDs/PCDFs/PCBs	⇓ **	CR	Ross 1997
Ratte	PCBs	⇓ *	CR	Smialowicz 1989
Ratte	PCBs	⇓ **	CR	Talcott 1985
Ratte	TCDD	⇓ *	CR	Yang 1994
Ratte	HCB	⇓ *	CR	Van Loveren 1990
Ratte	POPs und Metalle	⇓*** (1)	FCM	Wade 2002
Ratte	PCDDs/PCDFs, PCBs	⇔	FCM	Omara 1998
Rhesusaffe	TCDD	⇔	k. A.	Hong 1989
Rhesusaffe	PCBs	⇑ *	CR	Tryphonas 1991
Mensch	PCBs/PCDDs/PCDFs	⇔	CR	Lovik 1996
Mensch	PCDFs, PCBs	⇔	k. A.	Kitamura 2000
	PCDDs	⇑ *		

1.5 Fragestellung

Studien über die Auswirkungen von persistenten organischen Schadstoffe auf den menschlichen Organismus sind unter anderem in der Sorge über mögliche unerwünschte Wirkungen dieser Substanzen auf Säuglinge begründet, denn Kinder sind in der Stillzeit diesen Verbindungen gegenüber besonders exponiert. Hierbei ist unter anderem zu klären, ob mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden Effekte von POPs bei Konzentrationen im Hintergrundbereich auf Parameter des Immunsystems nachweisbar sind. Da keine bestimmten sensiblen Parameter bekannt sind, muss eine epidemiologische Untersuchung in diesem Bereich möglichst breit angelegt sein. Hier haben allgemein gesehen funktionelle Untersuchungen eine besondere Bedeutung, da sie eine höhere Aussagekraft besitzen als nicht-funktionelle Untersuchungen. Dadurch sind die Ergebnisse zudem einfacher zu interpretieren.

Für das menschliche Immunsystem existieren diverse funktionelle Untersuchungen. Das spezifische zelluläre Abwehrsystem kann z. B. mittels Proliferationstest der T-Lymphozyten nach Mitogen/Antigen-Stimulation untersucht werden. Die spezifische humorale Immunität kann z. B. durch Messung spezifischer Antikörper, die von B-Lymphozyten nach einer Impfung gebildet werden, untersucht werden.
Für die vorliegende Arbeit wurde die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen als eine Funktion des unspezifischen zellulären Abwehrsystems analysiert. Die dafür nötigen Untersuchungen wurden im Rahmen der Studie „Belastung von Säuglingen mit polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (PCDDs), Dibenzofuranen (PCDFs) und Biphenylen (PCBs) und deren Auswirkung auf sensible biologische Parameter“ (Studienleiter PD Dr. med. Klaus Abraham, Kinderklinik der Charité; im Folgenden „Dioxin-Studie“ genannt) durchgeführt. Diese hatte zum Ziel, durch Erhebung zuverlässiger Daten die Frage zu klären, ob und gegebenenfalls oberhalb welcher Konzentration Veränderungen von sensiblen biologischen Parametern durch postnatale Exposition von gestillten Säuglingen mit PCDDs, PCDFs und PCBs auftreten. Dabei wurden unter anderem folgende Laborparameter bestimmt: Blutbild, Klinische Chemie, Immunglobuline, Lymphozyten-Subpopulationen, Lymphozyten-Proliferation, spezifische Antikörper, Zytokin-Produktion, Granulozytenfunktion und Schilddrüsen-Parameter [Abraham 2000].

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit sind die Zellzahlen der Leukozyten, Lymphozyten und der NK-Zellen, sowie die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen bei gestillten und nicht gestillten Kindern.
Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob es durch Belastung mit persistenten organischen Schadstoffen über die Muttermilch zu messbaren Unterschieden der Zellzahlen der NK-Zellen sowie der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen bei höher belasteten gestillten und niedriger belasteten nicht gestillten Kinder kommt. Ferner werden mögliche Einflüsse auf vorgenannte Parameter durch Infektanamnese und Geschlecht untersucht.
Mit einer vergleichbaren Fragestellung bezüglich NK-Zellzahlen bei Kindern hat sich bisher nur eine veröffentlichte Arbeit befasst [Weisglas-Kuperus et al. 1995]. Weitere Studien in diesem Bereich erbrachten keine konsistenten Ergebnisse über supprimierende oder aktivierende Effekte von POPs auf NK-Zellzahlen und NK-Aktivität bei Mensch und verschiedenen Tierspezies. Dabei bestanden große Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Kollektive, Substanzen und Expositionsarten. Für die vorliegende Arbeit sollen durch ein gesundes Probandenkollektiv mit einer quantifizierten POP-Belastung sowie möglichst umfassende Confounder-Kontrolle ideale Testbedingungen geschaffen werden, um eine möglichst große Aussagekraft hinsichtlich der Fragestellung zu erhalten.
Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte durch Standard-Labormethoden. Für die Messung der NK-Aktivität wurde ein durchflusszytometrischer Assay eingesetzt, der gegenüber dem klassischen Chrom-Release-Assay logistische, zeitliche und finanzielle Vorteile bot, unter anderem durch den Verzicht auf radioaktive Markierungssubstanzen (siehe auch 1.3).

Unabhängig davon wurden zwölf erwachsene Probanden untersucht, von denen zwei Probanden extrem hoch mit TCDD belastet waren. Hier sollten mögliche Effekte von weit über der allgemeinen Hintergrundbelastung liegenden Expositionskonzentrationen auf Zellzahlen sowie Aktivität der NK-Zellen untersucht werden.

2 Methodik

2.1 Studienkonzept und Probandenauswahl

Ausgehend von der Annahme dosis-abhängiger Effekte von POPs auf das menschliche Immunsystem, bestand die Notwendigkeit, Probanden zu rekrutierten, die voraussichtlich vergleichsweise hohe bzw. niedrige POP-Belastungen aufweisen. Die POP-Konzentrationen beim Kind wird vor allem durch die Stilldauer und POP-Konzentrationen in der Muttermilch bestimmt, wobei ältere Mütter höhere Konzentrationen gegenüber jüngeren aufweisen [Abraham et al. 1996]. Deshalb wäre ein Kind mit erwarteter relativ hoher POP-Belastung das erste gestillte Kind einer Mutter mit relativ hohem Lebensalter oder das Kind einer Mutter aus einer Region mit bekanntermaßen erhöhter Exposition [Abraham et al. 1998a]. Üblicherweise kommt es durch lokale Emissionsquellen von POPs kaum zu erhöhten POP-Werten bei Anwohnern, denn die Hauptaufnahme von POPs im Hintergrundbereich erfolgt, wie bereits genannt, über Nahrungsmittel. Die relativ geringe Streuung von gemessenen POP-Konzentrationen bei Erwachsenen erklärt sich durch die derzeit in Deutschland überwiegende Nahrungsmittelversorgung durch Supermarktketten (weite Verteilung der Lebensmittel), hohe überregionale Mobilität (kein lebenslanges Wohnen an einem Ort) und lange Halbwertszeiten der Verbindungen [Abraham 2002]. Eine Sondersituation besteht in der Region Ilsenburg/Sachsen-Anhalt, in der eine hohe Bodenkontamination durch eine Industrieanlage vorliegt und es eine hohe Selbstversorger-Rate bei geringer überregionaler Mobilität gab. Die erhebliche Emission von PCDDs/PCDFs erfolgte beim Kupfer-Recycling (durch PVC-Verbrennung ohne Filteranlagen) in der Kupferhütte Ilsenburg, welche nach Bekanntwerden dieser Situation 1990 stillgelegt wurde. Aufgrund dieser Überlegungen wurden möglichst lange gestillte Kinder aus der Region Ilsenburg in die Untersuchung einbezogen. Demgegenüber wurden kürzer gestillte Kinder aus Berlin und Umgebung gesucht, deren Mütter bereits andere Kinder gestillt hatten. Bei diesen Kindern wurden relativ niedrigere POP-Konzentrationen erwartet [Abraham et al. 1998b]. Zusätzlich wurden nicht gestillte Kinder aus Berlin rekrutiert, die nur im Rahmen der allgemeinen Hintergrundbelastung mit Dioxinen exponiert waren.

Die Teilnahme von geeigneten Probanden erfolgte freiwillig, die Blutentnahme und weitere Untersuchungen wurden nur nach Zustimmung beider Elternteile durchgeführt.

Die Ethik-Kommission der Charité hatte zuvor ein positives Votum zu der geplanten Studie abgegeben.

Um neben Unterschieden aufgrund der Stilldauer über ein möglichst homogenes Kollektiv zu verfügen, wurde die Probandenrekrutierung nach den folgenden Kriterien eingeschränkt:

Allgemeine Auswahlkriterien:

– Abstammung von Eltern aus dem deutschsprachigen Raum (zur Verringerung von genetischer und kultureller Variabilität),
– Lebensalter zwischen 11 und 12 Monaten (zur Gewährleistung der Entnahmemöglichkeit der benötigten Blutmenge und zur Einschränkung von altersabhängigen Parameterunterschieden),
– für gestillte Kinder: äquivalente Vollstillzeit von mindestens 4 Monaten (Teilstillzeiten wurden anteilsmäßig angerechnet),
– für nicht gestillte Kinder: Stillversuch kürzer als 2 Wochen,
– normale Entwicklung des Kindes,
– Diphtherie-Tetanus-Impfungen gemäß den Impfempfehlungen.

Allgemeine Ausschlusskriterien:

– akute fieberhafte Infekte in den letzten zwei Wochen (geringe Zeichen von Luftwegsinfekten wurden akzeptiert),
– chronische Erkrankungen,
– Früh- oder Mangelgeburt,
– angeborene Fehlbildungen,
– Medikamenteneinnahme, außer Vitamin D und Fluor,
– Exposition gegenüber Zigarettenrauch, d. h. Aufenthalt des Kindes in Räumen, in denen geraucht wird (außer nicht gestillte Kinder mit passiver Zigarettenrauch-Exposition).

2.2 Studienkollektiv

Insgesamt wurden für die oben genannte Studie 101 Kinder rekrutiert. Bei 70/101 (69 %) Kinder war es möglich, einen Zytotoxizitäts-Assay durchzuführen. In die vorliegende Auswertung wurden 66/70 (94 %) Kinder aufgenommen.

Vier der durchgeführten Zytotoxizitäts-Assays mussten aufgrund nicht verwertbarer Daten verworfen werden (siehe 2.9).
Der Untersuchungszeitraum betrug insgesamt 558 Tage (inklusive Wiederholungsuntersuchungen, siehe 2.2.4), wobei entsprechend dem Mess-Tag den einzelnen Messungen im folgenden Untersuchungstag 1 bis 559 zugewiesen wurden.

2.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung, regionale Herkunft

Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung war 352 ± 7 Tage (Mittelwert ± Standardabweichung) bzw. 11,5 Monate (Median 350 Tage, Spannweite 341–369 Tage).
Männlichen Geschlechtes waren 33/66 (50 %) der Kinder.
Aus Berlin stammten 50/66 (76 %) Kinder, aus der Region Ilsenburg/Sachsen-Anhalt 13/66 (20 %) und aus anderen Orten in der ehemaligen DDR 3/66 (5 %).

2.2.2 Ernährung

Gestillt waren 50/66 (76 %) Kinder, wobei die Stilldauer im Mittel 32 ± 6 Wochen betrug (Median 33 Wochen, Spannweite 18–42 Wochen).
Nach obiger Definition waren 16/66 (24 %) Kinder nicht gestillt. Diese wurden im Mittel 2,6 ± 3,9 Tage gestillt (Median 0,5 Tage, Spannweite 0–12 Tage).

2.2.3 Infekte und Zigarettenrauch-Exposition

Alle Kinder waren gemäß den Auswahlkriterien nach allgemeinen Gesichtspunkten gesund, das heißt es bestanden bisher nur banale Infekte vorwiegend der Atemwege. Die Anzahl der bisherigen Infekte der Kinder lagen im Mittel bei 4,6 ± 2,3 (Median 4, Spannweite 1–10) und damit im üblichen Rahmen. Davon waren im Mittel 1,8 ± 1,4 fieberhaft (Median 2, Spannweite 0–6) und der letzte Infekt lag im Mittel 6 ± 8 Wochen zurück (Median 3 Wochen, Spannweite 2–34 Wochen).

Minimale Infektzeichen im Sinne einer leicht behinderten Nasenatmung oder von zweimaligem leichtem Husten während der Blutentnahme wiesen 25/66 (38 %) Kinder auf.
Mit Zigarettenrauch waren 8/66 (12 %) nicht gestillte Kinder passiv exponiert.

2.2.4 Wiederholungsuntersuchung

Bei 36/101 (36 %) Kindern der Dioxin-Studie wurde zur Überprüfung auffälliger (nicht immunologisch relevanter) Laborparameter eine zweite Blutentnahme durchgeführt. Dabei war am häufigsten die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma über die Norm (> 700 U/l) erhöht. Die zweite Probengewinnung wurde bei 14/66 (21 %) Kindern der vorliegenden Arbeit durchschnittlich 29 ± 12 Tage nach der ersten Blutentnahme durchgeführt (Spannweite 14–52 Tage), sodass die intraindividuelle Variation der untersuchten Parameter ermittelt werden konnte. Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme bestanden minimale Infektzeichen bei 5/14 (36 %) Kindern.

2.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Den Kindern wurde in der eigenen Wohnung morgens zur individuellen Aufwachzeit ein Lokalanästhetika-Pflaster (EMLA®-Pflaster, Astra, Wedel) auf beide Handrücken geklebt. Nach einer Wartezeit von 45 Minuten, in der das Kind untersucht und die Eltern zu Anamnese, Schwangerschaft, Geburt und Kindesentwicklung befragt wurden, erfolgte eine venöse Blutentnahme von 0,5 ml EDTA-Blut und 15 ml Heparinblut. Diese wurde meistens parallel zum Frühstück einer Milchmahlzeit durchgeführt, um das Kind abzulenken. Anamneseerhebung, klinische Untersuchung und Blutentnahme wurden vom Leiter der Dioxin-Studie durchgeführt. Die Weiterverarbeitung des Untersuchungsmaterials erfolgte spätestens 4 Stunden nach der Probengewinnung. Im Folgenden wurden alle Arbeitsschritte – soweit nötig – unter sterilen Bedingungen an einem Laminar-Air-Flow-Arbeitsplatz ausgeführt.

2.4 Bestimmung zellulärer Parameter

Die Leukozyten- und Lymphozytenzahl wurde mit einem automatisierten Zellzähler (Cell Dyn® 3500, Abbot Diagnostics, Abbot Park, USA) in EDTA-Blut und in der Suspension von isolierten Lymphozyten/Monozyten (siehe 2.7.1) bestimmt.

2.5 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem FACScan™-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Mess-System für Zellen unterschiedlicher Art, welches zwei Streulichtsignale und bis zu drei Fluoreszenzsignale einzelner Zellen registriert. Dazu müssen die zu analysierenden Zellen in einer Suspension vorliegen, um nach Erzeugung einer laminaren Strömung einzeln an einem Messpunkt vorbeigeführt zu werden. Hier trifft ein fokussierter monochromatischer Lichtstrahl auf die Zelle, die dabei entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden durch Photodetektoren gemessen.

Hierbei wird zum einen ein Vorwärtsstreulicht (forward angle light scatter, FSC) im Bereich von 0–10° erfasst, welches Auskunft über die Zellgröße gibt und zum anderen ein Seitwärtsstreulicht (side angle light scatter, SSC) im Bereich von 90°, welches Informationen über Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle liefert. Dadurch lassen sich Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden.

Zusätzlich werden Fluoreszenzsignale von drei Fluoreszenzdetektoren (FL1, FL2, FL3) erfasst. Nach Anfärbung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) und Absorption der energiereichen Laserstrahlung kommt es durch Exzitation zu einer rasch abklingenden Lichtemission, der so genannten Fluoreszenz. Diese Lichtemission hat eine höhere Wellenlänge als die Exzitationswellenlänge. Dieses Phänomen wird zum Nachweis von Differenzierungsantigenen von Leukozyten benutzt. Dazu werden die Oberflächenantigene von Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern (mAbs) markiert, die mit den Fluorochromen Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythin (PE) oder Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) konjugiert sind. Diese spezifisch an Differenzierungsantigene konjugierte Fluorochrome werden durch den Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und weisen spezifische Emissionsspektra mit Maxima bei 525 nm (FITC), 578 nm (PE) und 680 nm (PerCP) auf, die von den entsprechenden Detektoren FL1 (grün), FL2 (rot) bzw. FL3 (dunkelrot) registriert werden [Raffael et al. 1994]. Durch Kombination der verschiedenen mAbs können die Zellen in ihrer Antigen-Expression nach CD-Nomenklatur unterschieden werden.

Zur Gewährleistung der Messgenauigkeit und zur Justierung der Geräteeinstellungen des FACScan™ -Durchflusszytometers wurde vor den Messungen eine Kalibrierung mit CaliBRITE™ Beads (BD Biosciences, San Jose, USA) vorgenommen.

2.6 Immunphänotypisierung

Zur Zelltypisierung wurden der Lymphozyten-Marker CD3, der Monozyten-Marker CD14, der Panleukozyten-Marker CD45 und die NK-Zell-Marker CD16 und CD56 eingesetzt. Eine Kombination von Anti-CD45 FITC und Anti-CD14 PE (Simultest™ LeucoGATE™, BD Biosciences) wurde benutzt um Zelltrümmer, Monozyten und Granulozyten zu identifizieren und ein optimales Analyse-Fenster (Gate) für Lymphozyten auf dem Durchflusszytometer zu setzen. Die Fluorochrome Anti-CD3 PerCP, Anti-CD16 FITC und Anti-CD56 PE (alle von BD Biosciences) wurden in Kombination zur Identifikation der NK-Zellen eingesetzt.

Es wurden jeweils 25 µl heparinisiertes Vollblut in Röhrchen (Falcon 2053, BD Labware Europe, Le Pont De Claix, France) gegeben, in welche 4 µl LeucoGATE™ bzw. 3 µl CD3 PerCP-, 4 µl CD16 FITC- und 4 µl CD56 PE-Antikörper vorpipettiert waren. Die einzelnen Ansätze wurden mit einem Vortexer (Laborgerät zur Mischung von z. B. Suspensionen) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um eine stabile Fixation der Antikörper an die Zellen zu erreichen. Dann wurde zur Lysierung von Erythrozyten jeweils 2 ml Lyse-Reagenz (Ortho-mune®, Ortho-Clinical-Diagnostics, Neckargemünd) hinzugegeben und sofort gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Ansätze bei 500 g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellpellets mit dem Vortexer gemischt. Im Anschluss wurde jeweils 4 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories, Linz, Österreich) dazugegeben und die Ansätze nochmals gewaschen. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Auch nach der in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut wurde analog eine Immunphänotypisierung durchgeführt, wobei auf den Einsatz des Lyse-Reagenz verzichtet werden konnte.

2.7 Zytotoxizitäts-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Version der bereits beschriebenen Zytotoxizitäts-Assays von Slezak und Horan [Slezak/Horan 1989], Hatam et al. [Hatam et al. 1994] und Lötzerich und Hirt [Lötzerich/Hirt 1997] eingesetzt. Dabei wurde die Fähigkeit einer bestimmten Anzahl von NK-Zellen, innerhalb eines bestimmten Zeitraumes eine bestimmte Anzahl von NK-sensitiven Targetzellen zu lysieren, gemessen. NK-Zellen (Effektorzellen) wurden mit K562-Zellen (Targetzellen) inkubiert und anschließend der Anteil der lysierten Targetzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Um eine Zellsuspension mit einem relativ hohen Anteil an NK-Zellen einsetzen zu können, wurden die Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten von dem Vollblut-Untersuchungsmaterial getrennt. Diese Separation wurde nach dem Dichtegradienten-Verfahren durchgeführt [Böyum 1968] (siehe 2.7.1). Als Effektorzellen kamen somit mononukleäre Zellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) zur Anwendung, die vor allem aus Lymphozyten und Monozyten bestehen und einen NK-Zellanteil von ca. 10 bis 20 % haben. Die K562-Zelllinie wurde freundlicherweise von dem Labor der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Kinderklinik der Charité zur Verfügung gestellt. Zur Markierung der Targetzellen wurde der grünfluoreszierende Farbstoff PKH2-GL (Sigma BioSciences, St.Louis, USA) eingesetzt, der in die Lipide der Zellmembran stabil aufgenommen und bewahrt wird [Horan et al. 1990], und der ein Emissionsmaximum von 504 nm aufweist. Im Anschluss an die Präparation der beiden Zellarten wurden für den Assay unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Effektorzellen zu Targetzellen (E:T-Ratios) hergestellt. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurde der rotfluoreszierende DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PI) hinzugefügt, um die durch die Effektorzellen lysierten Targetzellen zu identifizieren. PI kann nur in Zellen eindringen, deren Zytoplasmamembran geschädigt ist, bindet dann spezifisch an die DNA und führt nach Exzitation zu einer messbaren Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 585 nm [Yeh et al. 1981].

2.7.1 Isolation der Effektorzellen

Zur Gewinnung der PBMC wurde das Heparinblut mit dem Kulturmedium AIM V (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Großbritannien) 1:1 verdünnt. AIM V hatte dabei je 500 ml als Zusatz 5 ml Glutamin (L-Glutamin, Seromed®, Biochrom, Berlin) sowie 2,5 ml Fungizone® (Amphoterecin B 250 µg/ml und Sodiumdesoxycholate 205 µg/ml, Gibco

BRL). Zur Separation der mononukleären Zellen durch Dichteunterschiede wurden 3 ml Ficoll (Dichte 1,077; Lymphoprep™, Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen) in Röhrchen (Cellstar®, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) vorsichtig mit 3 ml dieser Blutverdünnung mit sterilen Pasteur-Einmalpipetten (Transferpipetten, 3,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) überschichtet. Anschließend wurde bei 700 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Mit Pasteur-Pipetten wurde der Lymphozytenring, der sich nach der Zentrifugation zwischen Plasma und Ficoll befindet, vorsichtig abpipettiert und in Röhrchen mit AIM V aufgefüllt. Anschließend wurde bei 500 g für 15 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet mit einem Vortexer gemischt. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit Zentrifugation. Der Überstand wurde nun mit einer Pipette abgezogen, es wurde mit 1000 µl AIM V aufgefüllt und wiederum mit dem Vortexer gemischt. Zur Einstellung der Zellzahl wurden 50 µl entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß (safe-lock 1,5 ml, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) gegeben und 200 µl AIM V hinzugefügt. Die Zellzahl wurde mit einem automatisierten Zellzähler (Cell Dyn® 3500, Abbot Diagnostics) bestimmt und auf eine Konzentration von 5×10^6 PBMC/ml eingestellt, wobei mit AIM V aufgefüllt wurde.

2.7.2 Langzeit-Kultur und Präparation der Targetzellen

Die K562-Zellen wurden in einem Brutschrank (BB 6220/02, Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 in Langzeit-Kultur gehalten. Als Komplettmedium wurde RPMI 1640 (Gibco BRL) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS, Gibco BRL), 1 % L-Glutamin (Seromed®) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ 10.000 µg/ml, Seromed®) benutzt. Es wurden jeweils 20 ml K562-Zellsuspension in Zellkulturflaschen (250 ml tissue culture flask, Falcon, BD Labware Europe) in einer Konzentration von 3×10^5 K562-Zellen/ml angesetzt. Die Vitalität der Zellen wurde regelmäßig am Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 10, Carl Zeiss, Oberkochen) und mit Trypanblau (0,5 %, Seromed®) am Lichtmikroskop überprüft. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der nur über eine defekte Zellmembran in das Zellinnere vordringen kann.

Für den Zytotoxizitäts-Assay wurden pro Proband 10 ml K562-Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen entnommen, in zwei Röhrchen (Cellstar®, Greiner Labortechnik) gegeben und mit auf 30 °C vorgewärmtem RPMI 1640 aufgefüllt. Anschließend wurde mit 400 g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und

das Zellpellet mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig verwirbelt. Danach wurde noch zweimal mit RPMI 1640 gewaschen, da FKS-Reste die Membranfärbung behindern würden. Zur Zellzählung wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI 1640 resuspendiert, davon wurden 20 µl entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, in das 80 µl Trypanblau vorpipettiert war. In einer Neubauer-Zählkammer wurde der Anteil der vitalen, nicht blau angefärbten K562-Zellen bestimmt, der mindestens 85 % betragen musste. Anschließend wurde für den Testansatz eine Konzentration von $1{,}0 \times 10^6$ K562-Zellen/ml mit Komplettmedium eingestellt.

2.7.3 Kryokonservierung und Auftauen der Targetzellen

Um optimale Bedingungen für den Zytotoxizitäts-Assay zu schaffen, wurden die in einer kontinuierlichen Wachstumsphase gehalten K562-Zellen alle 5 Wochen ausgetauscht. K562-Zellen besitzen die Fähigkeit zur spontanen Differenzierung in erythrozytäre, granulozytäre und monozytäre Vorläuferzellen [Lozzio et al. 1981]. Dadurch kann die Sensitivität für die lytische NK-Aktivität herabgesetzt werden. Deshalb wurden gut wachsende Zellen aus der Kultur eingefroren und zum routinemäßigen Austausch wieder aufgetaut. Dies war auch bei mangelnder Vitalität oder bakterieller Kontamination erforderlich. Dazu wurden aus den Kulturflaschen 80 ml Zellsuspension entnommen, gewaschen, mit RPMI 1640 resuspendiert und die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 0,1 ml dieser Zellsuspension in eisgekühlte 1 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) gegeben, mit 0,9 ml Einfriermedium aufgefüllt, gemischt und sofort in einem Styroporkästchen bei –80 °C eingefroren. Das Einfriermedium bestand zu 90 % aus FKS und zu 10 % aus DMSO (Dimethylsulfoxid, PAA Laboratories). Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen in flüssigen Stickstoff übergeführt. Dort können sie bei Bedarf jahrelang gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese sofort nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 9 ml RPMI 1640 übergeführt. Dann wurde bei 400 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit Komplettmedium resuspendiert. Nach nochmaligem Waschen mit RPMI 1640 wurde die K562-Zellsuspension wieder in Zellkulturflaschen in einer Konzentration von 3×10^5 K562-Zellen/ml angesetzt.

2.7.4 Färbung der Targetzellen

Zur Herstellung der Targetzell-Färbelösung wurden 1 µl PKH2-GL zu 1 ml PBS in ein Reagenzröhrchen (Polypropylen Reagenzröhrchen, Falcon, BD Labware Europe) gegeben und der Färbeansatz mit dem Vortexer gemischt. Nun wurden 10^6 Targetzellen (1 ml) zu der Färbelösung gegeben, mit der Pipette gut gemischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Auch im Folgenden wurden die angefärbten Targetzellen lichtgeschützt weiterverarbeitet. Nach 5 min wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 2 ml FKS abgestoppt und 1 min inkubiert. Es wurde mit RPMI 1640 aufgefüllt und mit 400 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Zellpellet mit RPMI 1640 resuspendiert und die markierten Targetzellen in ein neues Reagenzröhrchen überführt, um das Einwirken von etwaigen Färbelösungsresten zu verhindern. Danach wurde noch dreimal mit RPMI 1640 gewaschen und eine Konzentration von $1{,}0 \times 10^5$ K562-Zellen/ml mit Komplettmedium eingestellt.

2.7.5 Testansatz und Inkubation

Je 100 µl Targetzellen in einer Konzentration von $1{,}0 \times 10^5$/ml wurden in 11 Reagenzröhrchen pipettiert. Röhrchen # 1 enthielt zur Überprüfung von Autofluoreszenz, d. h. ein Vorhandensein von Fluoreszenz ohne Markierung mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, nur Targetzellen. In Röhrchen # 2 und # 3 wurden zur Überprüfung der so genannten spontanen Lyse zum Zeitpunkt Null (t_0), d. h. Zelltod ohne Einwirkung von Effektorzellen, Targetzellen mit 20 µl Propidiumjodid (PI, BD Labware) versetzt. Diese wurden auf dem Vortexer gemischt, in ein Eiswasserbad gestellt und vor der Messung 10 min lichtgeschützt inkubiert. Röhrchen # 4 und # 5 wurden zur Überprüfung der spontanen Lyse nach zweistündiger Inkubation mit PI versetzt. Somit wurde der Zelltod ohne Einwirkung von Effektorzellen nach zweistündiger Inkubation (t_2) gemessen. Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen wurden zu den Targetzellen in je zwei Röhrchen (# 6 – # 11) 100 µl, 50 µl bzw. 25 µl Effektorzellen in einer Konzentration von 5×10^6/ml gegeben, um Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnisse (E:T-Ratios) von 50/1, 25/1 und 12,5/1 herzustellen. Mit Komplettmedium wurde anschließend aufgefüllt, sodass alle Reagenzröhrchen einen Inhalt von 200 µl hatten. Die Röhrchen # 4 – # 11 wurden 3 min bei 120 g zur Erleichterung der Konjugatbildung von Effektor- und Targetzellen zentrifugiert und 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 2-1 gibt eine Übersicht über das Pipettierschema. Insgesamt kamen $1{,}75 \times 10^6$ Effektorzellen und $1{,}1 \times 10^5$ Targetzellen zum Einsatz.

Tabelle 2-1: Pipettierschema Zytotoxizitäts-Assay

#	Ansatz/ E:T-Ratio	Effektorzellen (µl)	Targetzellen (µl)	Medium (µl)	PI (µl)	Inkubationszeit (Stunden)
1	Autofluoreszenz	0	100	100	0	0
2	Spontane Lyse t_0	0	100	100	20	0
3	Spontane Lyse t_0	0	100	100	20	0
4	Spontane Lyse t_2	0	100	100	20	2
5	Spontane Lyse t_2	0	100	100	20	2
6	50/1	100	100	0	20	2
7	50/1	100	100	0	20	2
8	25/1	50	100	50	20	2
9	25/1	50	100	50	20	2
10	12,5/1	25	100	75	20	2
11	12,5/1	25	100	75	20	2

2.8 Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der Software CellQuest™ (Becton Dickinson) auf dem Computersystem Macintosh® Quadra 650 (Apple Computers, Cupertino, USA) erfasst und analysiert. Unmittelbar vor Messung am Durchflusszytometer wurde das jeweilige Röhrchen mit dem Vortexer kurz gemischt, um Zellkonjugate zu lösen und wieder eine Zellsuspension zu erhalten. Zum Ausschluss von Zelltrümmern von der Analyse wurde bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung in der korrelierten Zweiparameterdarstellung (FSC/SSC) individuell ein elektronischer Schwellenwert (Threshold) im Vorwärtsstreulichtkanal gesetzt, oberhalb dessen der Messvorgang ausgelöst wurde.

Zur Immunfluoreszenzmessung wurden pro Röhrchen 50.000–75.000 Zellen erfasst. Durch Setzen eines Gates in der FSC/SSC-Zweiparameterdarstellung und anschließende Kontrolle der weitgehenden CD45-Positivität (Panleukozyten-Marker) und CD14-Negativität (Monozyten-Marker) mittels des LeucoGATE™-Kombinationsfarbstoffes im Einparameter-Histogramm wurde ein optimales Lymphozyten-Auswertefenster gewählt. Unter Beibehaltung dieses Gates wurden die Anti-CD3/CD16/CD56-gefärbten Zellen analysiert. In der Einparameter-Histogrammdarstellung wurden durch Setzen eines Gates $CD3^{-}$-Zellen ausgewählt, die dann im Punktewolkenhistogramm nach Setzen von Marken auf CD16- und/oder CD56-Positivität hin quantifiziert wurden. Die Anzahl dieser Ereignisse wurde dann anteilsmäßig auf die Lymphozytenanzahl bezogen. Die Werte der $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen wurden durch Addition der Werte der Untergruppen $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$, $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ und $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$ errechnet. Die absolute Zahl der $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen wurde aus der Leukozytenzahl berechnet.

Zur Zytotoxizitätsmessung wurden pro Röhrchen 100.000–500.000 Zellen erfasst. In der Einparameter-Histogrammdarstellung wurden im FL1-Kanal mindestens 5.000 Zellen mit starker Grünfluoreszenz (K562-Zellen) durch Setzen eines Gates ausgewählt und anschließend im FL3-Kanal der Anteil der Zellen mit starker Rotfluoreszenz (lysierte K562-Zellen) bestimmt. Diese Lyserate, die den prozentualen Anteil der lysierten Targetzellen im Röhrchen repräsentierte, wurde jeweils doppelt bestimmt und gemittelt. Anschließend wurde der Prozentwert der ohne Einwirkung von Effektorzellen lysierten Targetzellen (Mittelwert Röhrchen #4 und #5) – die so genannte spontane Lyse – abgezogen, um die spezifische Lyserate zu ermitteln. Nachdem dies bei den drei E:T-Ratios 50/1, 25/1 und 12,5/1 erfolgte, wurden die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays mit PSL 50/1, PSL 25/1 und PSL 12,5/1 (Prozent der spezifischen Lyse) präsentiert.

Neben der Veröffentlichung von Rohdaten, wie bei der vorliegenden Arbeit, wird die Aktivität von zytotoxischen Zellen von einigen Arbeitsgruppen mittels so genannter Lytischer Einheiten (LU, lytic units) [Pross et al. 1981] angegeben. Hierbei wird z. B. nach Bryant et al. per Formel aus den verschiedenen PSLs ein Score errechnet, um das Ergebnis von Zytotoxizitäts-Assays mit einem einzigen numerischen Wert mitteilen zu können [Bryant et al. 1992]. Diese Vorgehensweise hat substanzielle Kritik erfahren, da die eingesetzten Rechenverfahren von der Annahme einer nicht-linearen Dosis-Wirkungsbeziehung ausgehen, die in einer inakkuraten Zytotoxizität im Vergleich zu

den tatsächlich beobachteten zytotoxischen Daten resultieren kann [Pollock et al. 1990]. Deshalb wurde bei der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung von Lytischen Einheiten zur Datenanalyse und Ergebnisdarstellung verzichtet.

2.9 Assay-Ausschlussgründe

Erhöhte Werte der spontane Lyserate sprechen für eine gestörte Vitalität der Targetzellen und haben möglicherweise falsch hohe Lyseraten im NK-Assay zur Folge. Die spontane Lyserate der K562-Zellen muss deshalb unter 12 % liegen. Ein Wert in dieser Größenordnung wird auch von anderen Arbeitsgruppen als Grenzparameter angesehen [Hatam et al. 1994] [Whiteside et al. 1990].
Friberg et al. fordern für ein gültiges Testergebnis eines in-vitro NK-Assays eine ansteigende Dosis-Wirk-Beziehung zwischen PSL und ansteigender E:T-Ratio [Friberg et al. 1996]. Eine höhere Lyserate der Targetzellen bei einer niedrigeren eingesetzten Effektorzellzahl widerspricht dem Dosis-Wirkungs-Prinzip und somit einem nachvollziehbaren Effekt.

Als Ausschlusskriterien für die Ergebnisse des NK-Assays galten somit:

– spontane Lyserate ≥ 12 %.
– PSL 25/1 ≥ PSL 50/1, PSL 12,5/1 ≥ PSL 50/1, PSL 12,5/1 ≥ PSL 25/1.

2.10 Analyse der persistenten organischen Schadstoffe

Im Rahmen der oben erwähnten Dioxin-Studie wurden zur Erfassung der individuellen Belastung POP-Analysen aus dem Plasma der Probanden von der ERGO Forschungsgesellschaft (Hamburg) durchgeführt. Aufgrund der nur im begrenzten Rahmen zur Verfügung stehenden Probenmenge musste die bisher gebräuchliche Isotopenverdünnungsmethode neu entwickelt werden [Päpke 1997]. Die davon abgewandelte Methode wird im Folgenden kurz beschrieben:
Aus dem Plasma der Probanden erfolgte durch mehrfache Extraktionsschritte die Elution der Fette, welche die Dioxine und andere unpolare Kontaminaten enthielten. Anschließend wurden planare (PCDDs/PCDFs und dioxinähnliche Moleküle) von nicht-planaren Molekülen getrennt. PCDDs/PCDFs wurden getrennt von mono- und di-ortho PCBs und anderen Chlorkohlenwasserstoffen weiterverarbeitet, d. h. eluiert und über spezielle Säulensysteme zur Adsorption gegeben. Hiernach erfolgte die

POP-Messung mittels gekoppelter High Resolution Gas Chromatography und High Resolution Mass Spectrometry (HRGC/HRMS). Die Analytik wurde von einem umfassenden Qualitätssicherungsprogramm begleitet. Die mitgeteilten POP-Werte sind auf das Gesamt-Fett im Plasma bezogen, welches mittels Formel [Phillips et al. 1989] aus den Cholesterin- und Triglycerid-Werten im Plasma berechnet wurde.

Von den insgesamt 37 analysierten Verbindungen waren für die vorliegende Arbeit 3 Verbindungsgruppen sowie 3 Einzelsubstanzen relevant. Das Hauptinteresse lag aufgrund obiger Überlegungen auf PCDDs und PCDFs, die zur Beurteilung wie oben beschrieben als Verbindungsgruppe in I-TEqs angegeben wurden (siehe auch 1.1). Die drei PCB-Kongenere 138, 153 und 180 geben als so genannte Indikator-PCBs, mit einem Anteil von ungefähr 60 % an den PCBs, einen Hinweis auf die Gesamt-PCB-Exposition. Die Konzentrationen der drei Kongenere wurden addiert und als Summe wiedergegeben (Σ PCB 138, 153, 180; ng/g Fett). PCDD-, PCDF- und PCB-Konzentrationen wurden ferner nach der ebenfalls oben beschriebenen WHO-Methode zusammengefasst und in WHO-TEFs angegeben. Die Einzelsubstanzen ß-HCH, HCB und pp-DDE wurden aufgrund der höchsten gemessenen Einzelkonzentrationen ausgewählt.

Im Einzelnen wurden für die vorliegende Arbeit folgende Substanzen gemessenen:

– sieben 2,3,7,8-substituierte PCDDs: 2,3,7,8-T4CDD, 1,2,3,7,8-P5CDD, 1,2,3,4,7,8-H6CDD, 1,2,3,6,7,8-H6CDD, 1,2,3,7,8,9-H6CDD, 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD, OCDD.
– fünf 2,3,7,8-substituierte PCDFs: 2,3,4,7,8-P5CDF, 1,2,3,4,7,8-H6CDF, 1,2,3,6,7,8-H6CDF, 2,3,4,6,7,8-H6CDF, 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF.
– zwei mono-ortho PCBs: 2,3’,4,4’,5-P5CB (PCB 118; Nummer nach International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)-Nomenklatur), 2,3,3’,4,4’,5-H6CB (PCB 156),
– drei di-ortho PCBs: 2,2',3,4,4',5'- H6CB (PCB 138), 2,2',4,4',5,5'-H6CB (PCB 153), 2,2',3,4,4',5,5'-H7CB (PCB 180),
– zwei co-planare PCBs: 3,3’,4,4’,5-P5CB (PCB 126), 3,3’,4,4’,5,5’-H6CB (PCB 169),
– ß-HCH (beta-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan),
– HCB (Hexachlorbenzol),
– pp-DDE (pp'-Dichlordiphenyldichlorethylen).

Diese Verbindungen waren bei allen gestillten Kindern messbar.

2.11 Zusätzliche Untersuchungen bei Erwachsenen

Unabhängig von den Untersuchungen der vorgenannten Probanden konnten zwei erwachsene Personen untersucht werden, die aus unbekannten Gründen extrem hoch mit TCDD belastet waren. Die 30 (Person 1) bzw. 27 Jahre (Person 2) alten Frauen wurden durch eine Chlorakne auffällig und arbeiteten beide in einem Büroraum eines Textilforschungs-Instituts in Österreich. Möglicherweise kam es dort zu einer akzidentellen enteralen TCDD-Exposition, das aus 2,4,5-Trichlorphenol stammen könnte, mit welchem in dem Instituts-Labor gearbeitet wurde. Ein krimineller Hintergrund ist nicht ausgeschlossen. Person 1 hatte eine schwere Chlorakne, palmoplantare Hyperkeratosen, gastrointestinalen Symptome und eine sekundäre Amenorrhoe. Sie wurde unter anderem mit Methylprednisolon (4 – 40 mg täglich), Analgetika und Antibiotika behandelt. Bei Person 2 traten neben einer milden Chlorakne ebenfalls gastrointestinale Symptome auf, sie wurde mit einem topischen Retinoid behandelt. Beide Personen waren Nichtraucherinnen. Person 1 hatte mit maximal 144.000 pg TCDD/g Fett den höchsten jemals aufgezeichneten individuellen TCDD-Wert eines erwachsenen Menschen, während Person 2 einen Wert von maximal 26.000 pg TCDD/g Fett aufwies [Abraham 2002] [Geusau et al. 2001]. Durch die Untersuchung dieser Personen war es möglich, die Auswirkungen einer TCDD-Belastung, welche weit über der üblichen Hintergrundbelastung lag, auf die NK-Zytotoxizität zu untersuchen.

Neben diesen beiden Personen wurden aus Vergleichsgründen zehn nach allgemeinen Gesichtspunkten gesunde erwachsene Probanden untersucht. Die im Folgenden als „Erwachsenengruppe“ bezeichneten erwachsenen Probanden waren im Mittel 34 ± 8 Jahre alt, 6/10 (60 %) waren männlich, 4/10 (40 %) weiblich und 9/10 (90 %) waren Nichtraucher.

2.12 Berechnungen und statistische Verfahren

Zur Prüfung möglicher linearer Zusammenhänge wurde in der bivariaten Korrelationsanalyse der Spearman Rho-Korrelationskoeffizient r_s mit zweiseitigem Signifikanzniveau p errechnet.

Im Falle des Vorliegens von Kovariablen wurden mit der multivariaten linearen Regressionsanalyse die standardisierten Regressionskoeffizienten $ß$ mit dem Einschlussverfahren berechnet.

Beim Vergleich zweier Merkmale der Gesamtgruppe wurde der t-Test für abhängige Stichproben und zum Vergleich zweier Gruppen anhand eines Merkmales der t-Test für unabhängige Stichproben verwandt.
Von einem statistisch signifikanten Ergebnis der oben genannten Testverfahren wurde bei *p*-Werten unterhalb von 0,05 ausgegangen.

Zur Ermittlung der intraindividuellen Reproduzierbarkeit y_R bei Wiederholungsuntersuchungen wurde der Mittelwert der durchschnittlichen Abweichung der zu zwei Zeitpunkten bestimmten Parameter durch die Anzahl der Probanden des Gesamtkollektivs geteilt und dies in Relation zur Standardabweichung des Gesamtkollektivs gesetzt:

$$y_R = \left(\quad |x_1 - x_2| / n \right) / s$$

y_R : Intraindividuelle Reproduzierbarkeit
x_1, x_2 : Wert des Parameters x bei der ersten bzw. zweiten Bestimmung
n : Anzahl der Probanden mit Wiederholungsbestimmung
s : Standardabweichung des Parameters für die Gesamtgruppe

2.13 Datenverarbeitung

Zur Speicherung, statistischen Analyse und tabellarischen bzw. grafischen Darstellung der während der Studie gewonnenen Daten wurde die Computersoftware Word und Excel 97/2000 (Microsoft®, Redmond, USA) und SPSS® für Windows 10 (SPSS, Chicago, USA) benutzt.

2.14 Grafische Darstellung

Zur Darstellung der Verteilung einzelner Variablen wurden Histogramme mit Normalverteilungskurve und Kreisdiagramme erstellt.
Bei der Prüfung von Assoziationen und zur Darstellung von zwei Variablen wurden Streudiagramme verwandt.
Zur Veranschaulichung mehrerer Variablen wurden Boxplots mit Median, Interquartilbereich und Ausreißern erstellt. Hierbei wurden Ausreißer durch einen Kreis markiert und als die Werte definiert, die 1,5 bis 3 Interquartilsabstände vom oberen oder unteren Quartil entfernt waren.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen der Leukozyten-, Lymphozyten- und natürliche Killerzell-Werte sowie der Zytotoxizitäts-Assays dargestellt. Bei Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung steht in den Ergebnis-Tabellen SD für Standardabweichung.

Von den 70 untersuchten Kindern mussten 4 Kinder gemäß den in Kapitel 2.9 angeführten Kriterien von der Auswertung ausgeschlossen werden. Im Einzelnen lag bei einem Assay die spontane Lyserate zu hoch (Proband # 4: t_0 11,9 %, t_2 21,2 %), und bei drei Probanden lagen Lyseraten niedrigerer E:T-Ratios über den Lyseraten höherer E:T-Ratios (Proband # 26: PSL 50/1 7,5 %, PSL 25/1 8,0 %, PSL 12,5/1 7,2 %; # 45: PSL 50/1 11,8 %, PSL 25/1 7,6 %, PSL 12,5/1 8,4 %; # 74: PSL 50/1 28,5 %, PSL 25/1 30,8 %, PSL 12,5/1 30,0 %). Die mitgeteilten Ergebnisse beziehen sich deswegen auf die 66 verbliebenen Kinder.

3.1 Leukozyten und Lymphozyten

Die gemessenen absoluten und relativen Leukozyten- und Lymphozyten-Zahlen sind in Tabelle 3-1 angegeben. Vor der Durchführung des Zytotoxizitäts-Assays wurden, zur Steigerung des NK-Zell-Anteils im Untersuchungsmaterial, mononukleäre Zellen (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells) isoliert. In der PBMC-Fraktion befanden sich neben Lymphozyten auch Monozyten. Der deutlich erhöhte Lymphozytenanteil in PBMCs im Vergleich zu Vollblut ist in Tabelle 3-1 und Abbildung 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Leukozyten- und Lymphozytenzahlen
([1]: in Vollblut, [2]: in isolierten PBMCs; n = 66)

Parameter	Einheit	Mittelwert	SD	Median	Spannweite
Leukozyten[1]	/nl	9,2	2,2	8,8	4,8–16,8
Lymphozyten[1]	/nl	5,4	1,5	5,2	3,2–9,8
Lymphozyten[1]	% Leuko.	59,0	10,0	60,0	32,7–80,5
Lymphozyten[2]	% PBMCs	86,0	9,7	88,1	49,6–97,9

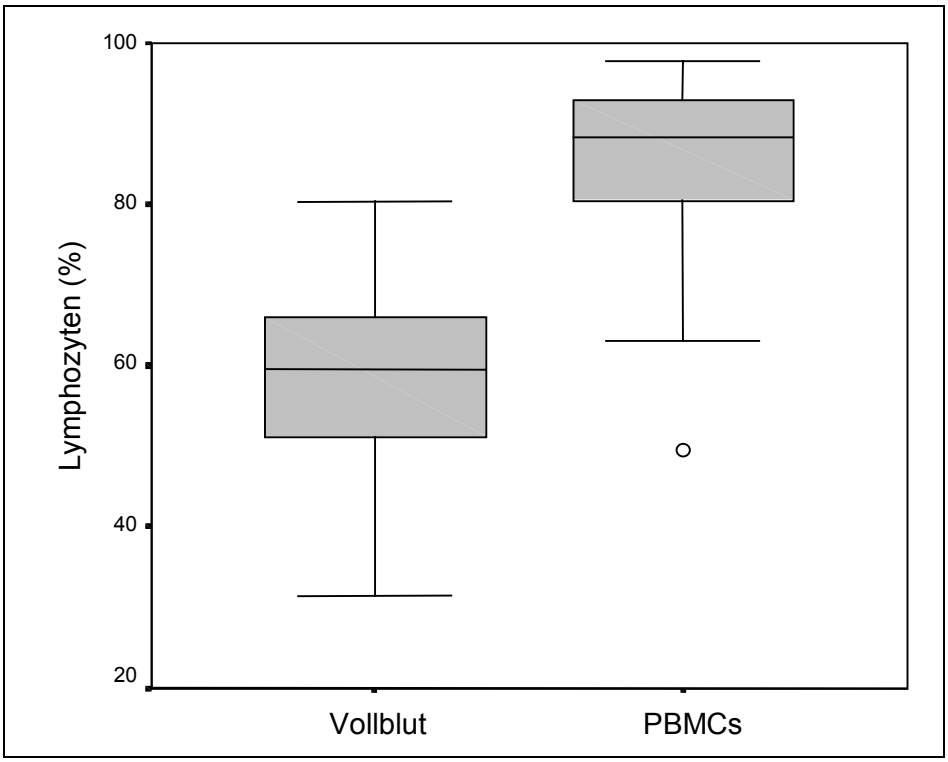

Abbildung 3-1: Boxplots des Lymphozytenanteils in Vollblut und PBMCs, deutliche Steigerung des Lymphozytenanteils durch die PBMC-Isolation aus Vollblut (n = 66, ○: Ausreißer)

3.2 Natürliche Killerzellen

Die relativen und absoluten Zellzahlen der $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen der Kinder wurden durch Addition der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen errechnet. Diese sind in Tabelle 3-2 für Vollblut und in Tabelle 3-3 für PBMCs wiedergegeben.

Tabelle 3-2: NK-Zell-Zahlen in Vollblut (n = 66)

NK-Zellpopulation	Einheit	Mittelwert	SD	Median	Spannweite
$CD3^{-}CD56/16^{+}$	% Lym.	6,4	2,4	6,0	1,5–15,0
$CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$	% Lym.	1,1	0,4	1,0	0,3–2,2
$CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$	% Lym.	3,8	1,9	3,6	0,6–11,5
$CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$	% Lym.	1,6	0,6	1,4	0,5–2,7
$CD3^{-}CD56/16^{+}$	/nl	0,35	0,19	0,30	0,12–1,10
$CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$	/nl	0,06	0,03	0,05	0,02–0,17
$CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$	/nl	0,21	0,14	0,17	0,05–0,81
$CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$	/nl	0,08	0,04	0,07	0,02–0,25

Tabelle 3-3: NK-Zell-Zahlen in PBMC (n = 66)

NK-Zellpopulation	Einheit	Mittelwert	SD	Median	Spannweite
$CD3^{-}CD56/16^{+}$	% PBMCs	6,4	2,8	5,5	1,2–14,6
$CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$	% PBMCs	1,2	0,5	1,0	0,3–2,9
$CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$	% PBMCs	3,3	1,7	3,0	0,6–9,8
$CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$	% PBMCs	2,0	1,3	1,5	0,3–6,3

Darstellungen der typischerweise leicht linksschiefen Häufigkeitsverteilung von $CD3^{-}CD56/16^{+}$-Zellen sind in Abbildung 3-2 (Vollblut relativ), Abbildung 3-3 (Vollblut absolut) und Abbildung 3-4 (PBMCs relativ) wiedergegeben.

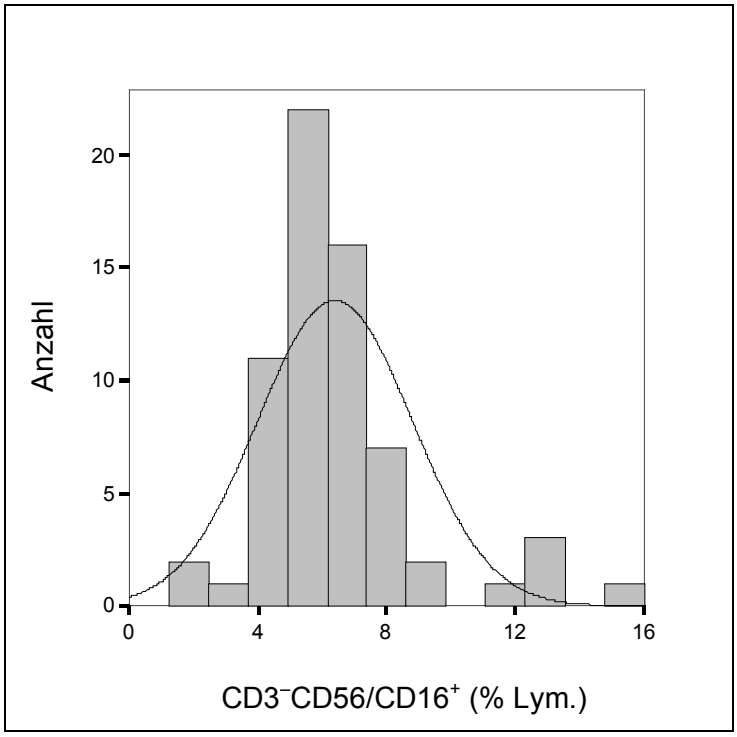

Abbildung 3-2: Häufigkeitsverteilung der NK-Zellen in Vollblut (% der Lymphozyten; n = 66)

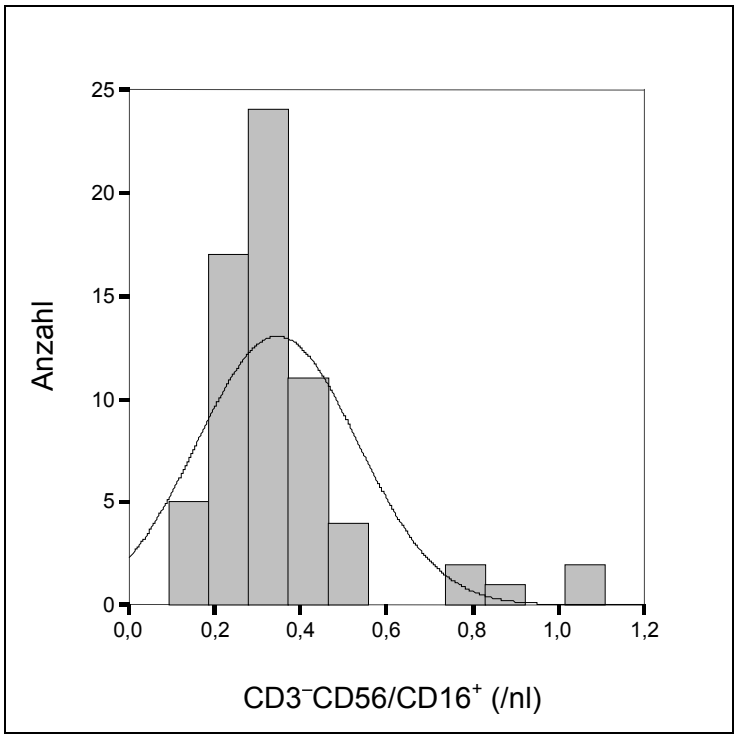

Abbildung 3-3: Häufigkeitsverteilung der NK-Zellen in Vollblut (Zellen/nl; n = 66)

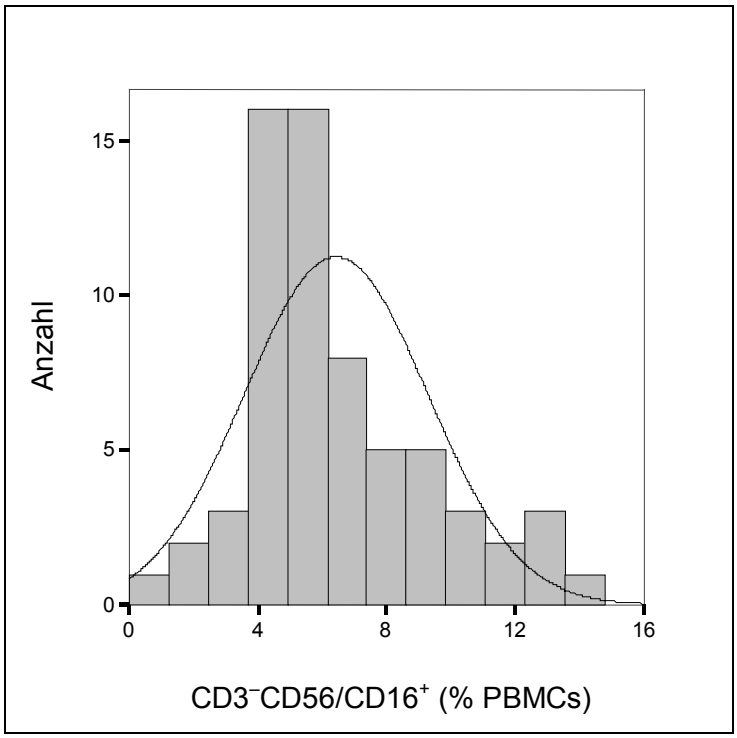

Abbildung 3-4: Häufigkeitsverteilung der NK-Zellen in PBMCs (% der PBMCs; n = 66)

Die prozentualen Anteile der Subpopulationen an den CD3–CD56/16^{+}-Zellen sind in der Abbildung 3-5 für Vollblut und Abbildung 3-6 für PBMCs dargestellt.

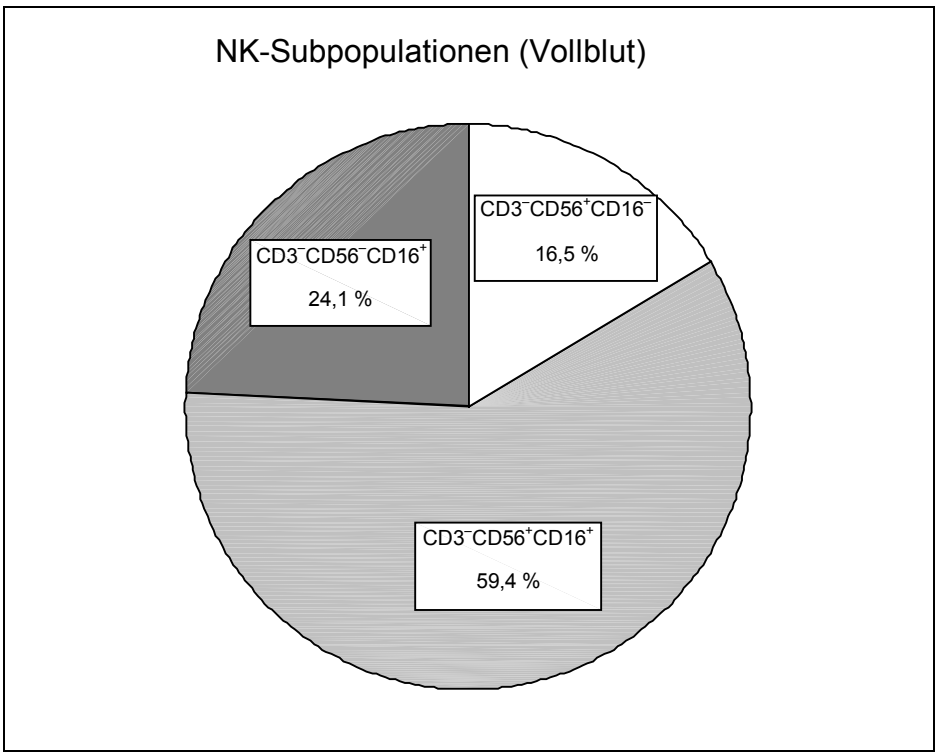

Abbildung 3-5: Kreisdiagramm Median Vollblut-Subpopulationen (n = 66)

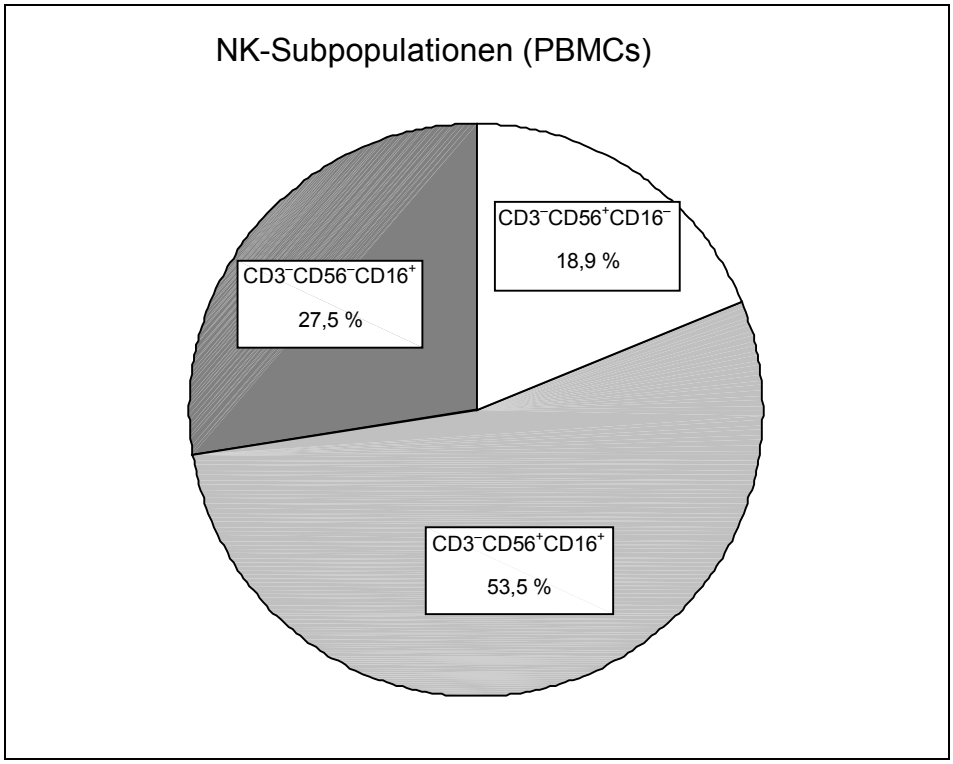

Abbildung 3-6: Kreisdiagramm Median PBMC-Subpopulationen (n = 66)

Für den in-vitro Zytotoxizitäts-Assay wurden aus Vollblut isolierte PBMCs eingesetzt. Deshalb wurde die Häufigkeitsverteilung der NK-Subpopulationen vor und nach PBMC-Isolation auf Unterschiede mit dem t-Test für abhängige Stichproben untersucht. Dabei zeigte sich nach PBMC-Isolierung eine Abnahme der Häufigkeit der größten NK-Zell-Subpopulation ($CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$) von 59,4 % auf 53,5 %, während die Fraktion der $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$-Zellen von 24,1 % auf 27,5 %, und die der $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$-Zellen von 16,5 % auf 18,9 % zunahm. Für alle drei NK-Subpopulationen waren diese Unterschiede mit $p < 0{,}05$ signifikant.
Im t-Test für unabhängige Stichproben wiesen die NK-Zell-Subpopulationen in Vollblut nach Testung mit den Gruppenvariablen Stillen, Geschlecht und aktuelle Infektzeichen keine signifikanten Unterschiede auf.
In der Spearman-Korrelationsanalyse bestanden keine signifikanten Assoziationen der NK-Zell-Subpopulationen mit dem Untersuchungstag, der äquivalenten Vollstillzeit, der Anzahl bisheriger Infekte mit und ohne Fieber und dem Abstand des letzten Infektes.

3.3 Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der NK-Aktivität sowie die dazugehörenden Korrelations- und Regressionsanalysen wiedergegeben. Wie oben erwähnt, mussten 4 der 70 untersuchten Kinder gemäß den in Kapitel 2.9 angeführten Kriterien von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Die spontane Lyse wurde durch den Anteil toter Targetzellen ermittelt, der ohne Einwirkung von Effektorzellen zum Zeitpunkt Null (t_0) und nach zweistündiger Inkubation (t_2) durch PI-Anfärbung mittels Flowzytometer als lysiert detektiert wurde. Die spontane Lyse betrug zum Zeitpunkt t_0 im Mittel 3,7 ± 4,1 % und zum Zeitpunkt t_2 3,8 ± 2,8 %.
Nach durchflusszytometrischer Messung der einzelnen Lyserate wurde durch Subtraktion der spontanen Lyserate t_2 von der Lyserate der jeweiligen E:T-Ratio (50/1, 25/1 und 12,5/1) die spezifischen Lyseraten (PSL 50/1, PSL 25/1 und PSL 12,5/1) berechnet. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung der spezifischen Lyseraten durchgeführt und der Mittelwert dieser beiden Messungen in der Auswertung verwendet. Die PSLs geben den Anteil der durch die Effektorzellen lysierten Targetzellen und damit die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wieder. Die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays sind in Tabelle 3-4 und zum direkten Vergleich mittels Boxplots in Abbildung 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-4: Spezifische Lyseraten in % (n = 66)

	PSL 50/1	PSL 25/1	PSL 12,5/1
Mittelwert	12,51	7,51	4,23
SD	9,46	5,47	3,41
Median	9,76	5,84	3,34
25. Perzentil	4,45	3,11	1,78
75. Perzentil	16,74	10,26	5,48
Min	1,28	0,82	0,08
Max	40,01	21,99	15,25

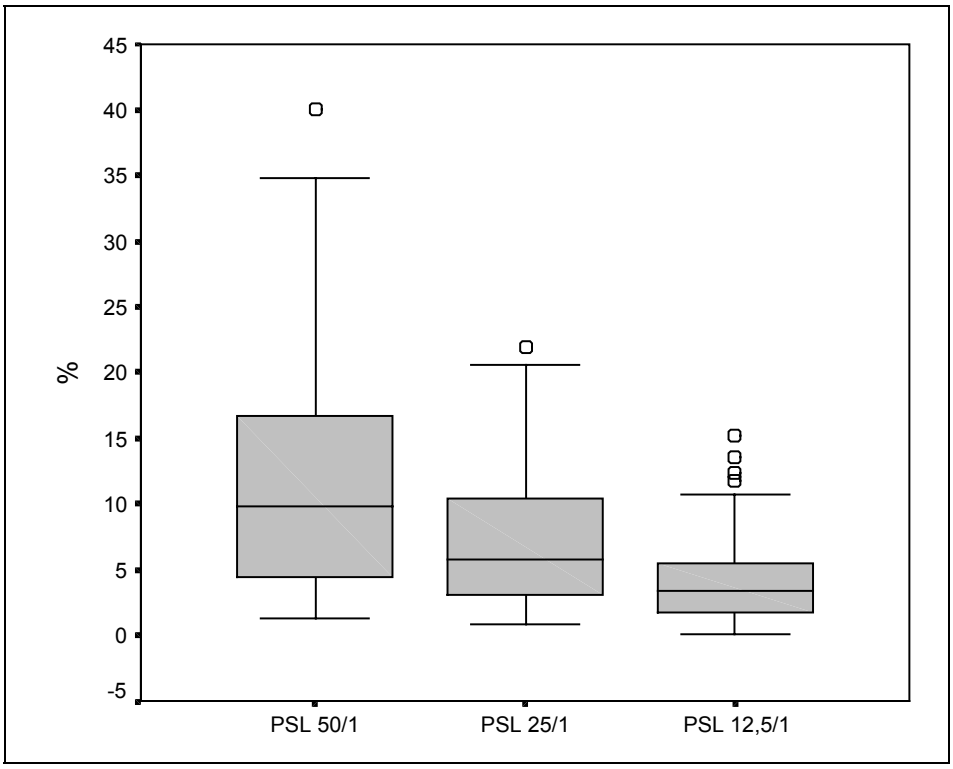

Abbildung 3-7: Boxplots der spezifischen Lyseraten (PSL) als Maß der NK-Aktivität bei den drei eingesetzten Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnissen (n = 66, ○: Ausreißer)

Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays wurden nach Spearman-Rho auf Korrelation hin untersucht. Dabei zeigten die spezifischen Lyseraten erwartungsgemäß eine hohe signifikante positive Assoziation untereinander, mit PSL 50/1 vs. PSL 25/1 $r_s = 0{,}946$, PSL 50/1 vs. PSL 12,5/1 $r_s = 0{,}882$ und PSL 25/1 vs. PSL 12,5/1 $r_s = 0{,}939$ (alle $p < 0{,}01$).

Die Zytotoxizitäts-Assays der 66 Probanden wurden in einem Zeitraum von über eineinhalb Jahren durchgeführt. Bei Betrachtung der Messwerte fiel ein Anstieg der gemessenen Lyseraten über die Zeit auf. Abbildung 3-8 gibt einen Überblick über die zeitlichen Veränderungen, wobei jeder Punkt im Streudiagramm die PSL 50/1 eines Probanden repräsentiert. Für die gestillten und nicht gestillten Kinder wurden unterschiedliche Symbole verwandt.

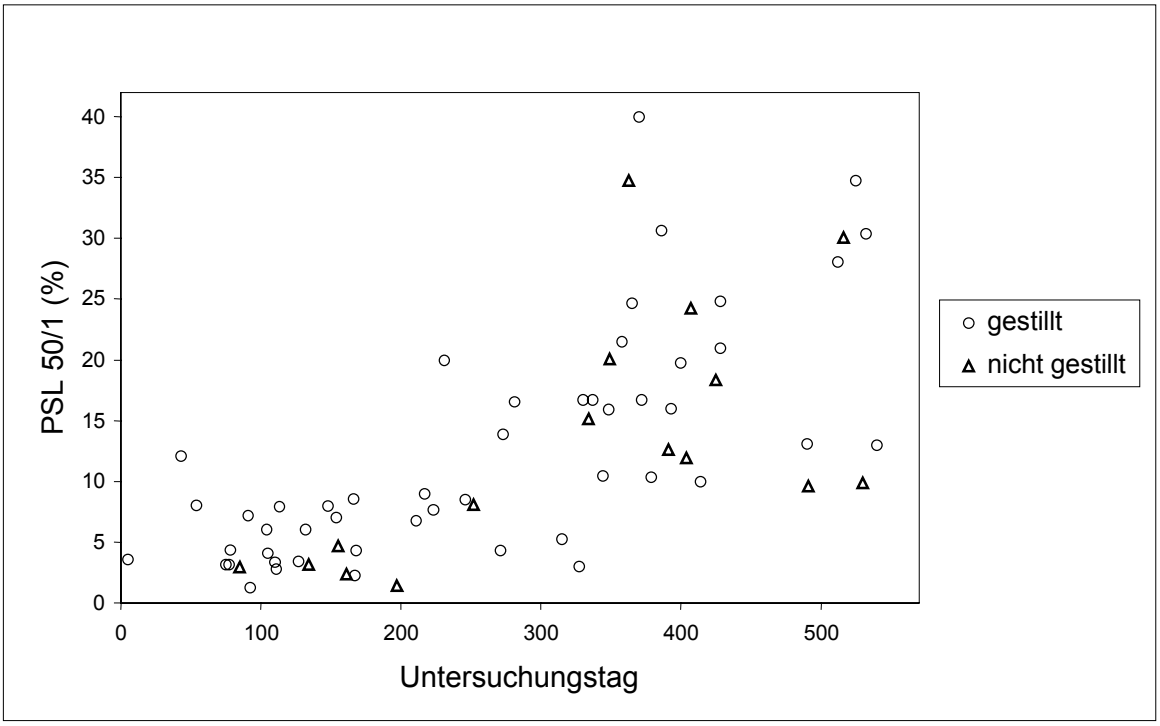

Abbildung 3-8: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Lyserate 50/1 (n = 66; 50 gestillt, 16 nicht gestillt), Hinweis auf fehlende zeitliche Stabilität des Zytotoxizitäts-Assays (PSL vs. Untersuchungstag: $r_s = 0{,}747$, $p < 0{,}01$)

Alle drei PSLs zeigten dabei eine signifikante positive Assoziation mit dem Untersuchungstag in der Spearman-Rho-Korrelationsanalyse mit $p < 0{,}01$. Daher wurde der Untersuchungstag bei der weiteren statistischen Auswertung berücksichtigt.

Im Gruppenvergleich mit dem t-Test für unabhängige Stichproben wiesen die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays keine signifikanten Unterschiede nach Testung gegen die Gruppenvariablen Geschlecht, Stillen und aktuelle Infektzeichen auf.

In der Spearman-Rho-Korrelationsanalyse fanden sich positive Assoziationen aller drei PSLs mit dem zeitlichen Abstand des letzten Infektes von der Untersuchung (r_s = 0,248–0,287; $p < 0,05$) und der Anzahl bisheriger fieberhafter Infekte mit PSL 50/1 und PSL 25/1 (r_s = 0,315 bzw. 0,275; $p < 0,01$ bzw. $< 0,05$), während die Gesamtanzahl bisheriger Infekte und die äquivalente Vollstillzeit keine signifikanten Assoziationen mit der NK-Aktivität aufwiesen.

Wegen des signifikanten Einflusses der Kovariablen Untersuchungstag ($p < 0,01$) auf den NK-Assay, wurde anschließend eine multivariate Regressionsanalyse mit der jeweiligen PSL als abhängiger Variablen unter Einbeziehung des Untersuchungstags durchgeführt. Hier fand sich kein signifikanter Einfluss von Infektanamnese, Geschlecht und Stillen auf die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays.

Die zytotoxische NK-Aktivität wurde nach Spearman-Rho auf Korrelation mit den NK-Zellpopulationen in PBMCs untersucht. Hier bestanden, bis auf eine signifikante positive Assoziation der PSL 50/1 mit den $CD3^-CD56^-CD16^+$-Zellen ($p < 0,05$), keine signifikanten Korrelationen. Tabelle 3-5 gibt die Spearman Rho-Korrelations-Koeffizienten wieder.
In der multivariaten Regressionsanalyse unter Einbeziehung der Kovariablen Untersuchungstag waren keine signifikanten Assoziationen der NK-Aktivität mit den NK-Zellen in PBMCs nachweisbar.

Tabelle 3-5: Spearman Rho-Korrelationskoeffizienten r_s der NK-Zellpopulationen (PBMCs relativ) vs. PSLs (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$)

r_s	**$CD3^-$ $CD56/16^+$**	**$CD3^-$ $CD56^+CD16^-$**	**$CD3^-$ $CD56^+CD16^+$**	**$CD3^-$ $CD56^-CD16^+$**
PSL 50/1	0,071 ^{ns}	0,114 ^{ns}	< 0,001 ^{ns}	0,279 *
PSL 25/1	0,039 ^{ns}	0,130 ^{ns}	–0,046 ^{ns}	0,242 ^{ns}
PSL 12,5/1	–0,027 ^{ns}	0,053 ^{ns}	–0,061 ^{ns}	0,131 ^{ns}

3.4 Persistente organische Verbindungen

Bei allen 50 gestillten Kindern wurden individuelle POP-Analysen bei der ERGO Forschungsgesellschaft (Hamburg) durchgeführt. Für die 16 nicht gestillten Kinder wurde eine gepoolte Analyse durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3-6 wiedergegeben. Die gestillten Kinder waren erwartungsgemäß deutlich höher mit persistenten organischen Verbindungen belastet als die nicht gestillten Kinder. Dieser Unterschied zwischen den Probanden war für alle POPs im t-Test für unabhängige Stichproben hoch signifikant ($p < 0{,}001$). Die mittleren POP-Werte der gestillten Kinder lagen 6,6-fach (ß-HCH) bis 28,7-fach (pp-DDE) und die höchsten POP-Werte 19,9-fach (ß-HCH) bis 106,1-fach (pp-DDE) höher als die entsprechenden Pool-Werte der nicht gestillten Kinder. Die Kinder mit den höchsten PCDD/PCDF-Werten kamen wie erwartet aus der Region Ilsenburg/Sachsen-Anhalt.

Tabelle 3-6: POP-Werte der gestillten (n = 50) und nicht gestillten (n = 12) Kinder mit deutlich höherer Belastung der gestillten Probanden

		gestillt				**nicht gestillt**
POP	**Einheit**	**Mittelwert**	**SD**	**Median**	**Spannweite**	**Pool-Wert**
I-TEq (PCDD/PCDF)	pg/g Fett	30,6	17,3	26,9	8,1–107,0	2,5
Gesamt-WHO-TEq	pg/g Fett	64,9	29,4	59,7	14,3–173,9	4,0
Σ PCB 138, 153, 180	ng/g Fett	458	273	422	51–1.489	23,9
ß-HCH	ng/g Fett	65,8	36,2	59,2	11,0–197,4	9,9
HCB	ng/g Fett	204	177	148	11–826	11,9
pp-DDE	ng/g Fett	685	534	538	75–2.536	23,9

3.4.1 Statistische Analyse POPs und NK-Zellen

Die NK-Zellpopulationen in Vollblut wurden nach Spearman-Rho auf Korrelation mit den POPs untersucht. Eine Subpopulation zeigte dabei mit ß-HCH, HCB und pp-DDE (relative Zellzahlen), bzw. zwei Subpopulationen z. T. mit I-TEq, WHO-TEq, ß-HCH, HCB und pp-DDE (absolute Zellzahlen) signifikante negative Assoziationen ($p < 0{,}05$ bis $< 0{,}01$). Die Korrelations-Daten werden in Tabelle 3-7 (Relativwerte) und Tabelle 3-8 (Absolutwerte) mit Signifikanzniveau wiedergegeben. In Abbildung 3-9 wird exemplarisch das Streudiagramm einer NK-Zell-Subpopulation und pp-DDE gezeigt. Anschließend wurde eine multivariate lineare Regressionsanalyse unter Einschluss aller POPs sowie anamnestischer Parameter durchgeführt. Hier zeigten sich für die relativen und absoluten Zellzahlen der $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$-Zellen ebenfalls signifikante Assoziationen, die für ß-HCH negativ ($p < 0{,}05$) und für HCB positiv (relativ $p < 0{,}01$, absolut $p < 0{,}001$) waren. Bei den $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$-Zellen bestanden keine signifikanten Assoziationen.

Tabelle 3-7: Spearman Rho-Korrelationskoeffizienten r_s
NK-Zellpopulationen (relativ, in Vollblut) vs. POPs
(ns: nicht signifikant; *: $p < 0{,}05$)

r_s	**$CD3^{-}$ $CD56/16^{+}$**	**$CD3^{-}$ $CD56^{+}CD16^{-}$**	**$CD3^{-}$ $CD56^{+}CD16^{+}$**	**$CD3^{-}$ $CD56^{-}CD16^{+}$**
I-TEq (PCDD/PCDF)	–0,051 ns	–0,180 ns	–0,044 ns	–0,240 ns
Gesamt-WHO-TEq	–0,090 ns	–0,186 ns	–0,011 ns	–0,238 ns
Σ PCB 138, 153, 180	–0,134 ns	–0,201 ns	–0,082 ns	–0,235 ns
ß-HCH	–0,051 ns	–0,151 ns	0,059 ns	–0,265 *
HCB	–0,036 ns	–0,131 ns	0,092 ns	–0,249 *
pp-DDE	–0,091 ns	–0,239 ns	0,002 ns	–0,253 *

Tabelle 3-8: Spearman Rho-Korrelationskoeffizienten r_s
NK-Zellpopulationen (absolut, in Vollblut) vs. POPs
(ns: nicht signifikant; *: $p < 0{,}05$, **: $p < 0{,}01$)

r_s	**CD3⁻ CD56/16⁺**	**CD3⁻ CD56⁺CD16⁻**	**CD3⁻ CD56⁺CD16⁺**	**CD3⁻ CD56⁻CD16⁺**
I-TEq (PCDD/PCDF)	–0,151 ns	–0,268 *	–0,085 ns	–0,302 *
Gesamt-WHO-TEq	–0,119 ns	–0,243 *	–0,072 ns	–0,273 *
Σ PCB 138, 153, 180	–0,079 ns	–0,170 ns	–0,059 ns	–0,197 ns
ß-HCH	–0,088 ns	–0,223 ns	0,004 ns	–0,306 *
HCB	–0,128 ns	–0,242 ns	–0,026 ns	–0,334 **
pp-DDE	–0,166 ns	–0,303 *	–0,085 ns	–0,320 **

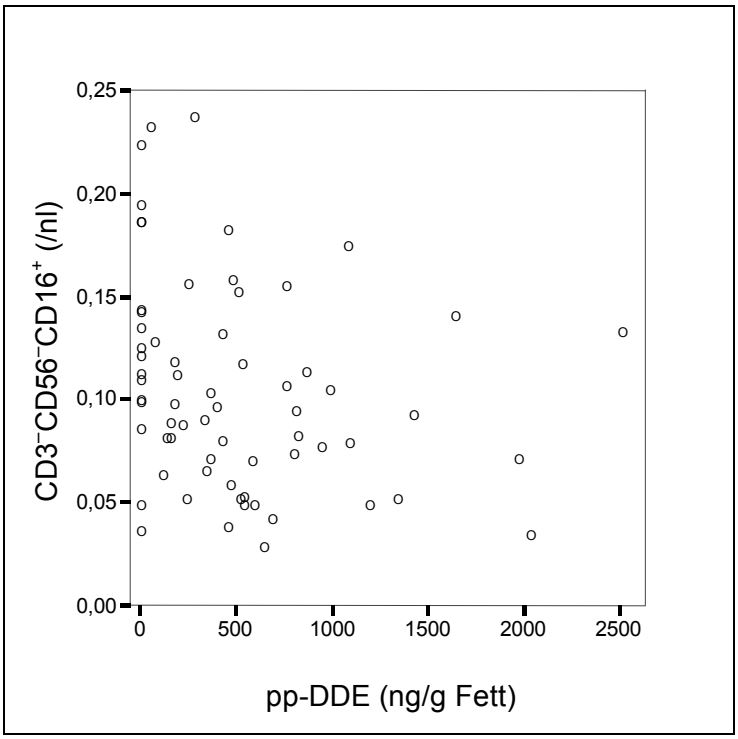

Abbildung 3-9: Streudiagramm NK-Zellen ($CD3^-CD56^-CD16^+$) vs. pp-DDE (n = 66)

3.4.2 Statistische Analyse: POPs und Zytotoxizitäts-Assay

Die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays wurden nach Spearman-Rho auf Korrelation mit den persistenten organischen Schadstoffen untersucht. Hierbei bestanden keine signifikanten Korrelationen der PSL-Werte mit den 3 Verbindungsgruppen und 3 Einzelsubstanzen der POPs. Ein Trend zur linearen Abhängigkeit war bei der Korrelationsanalyse von PSL 50/1 und Σ PCB 138, 153, 180 ($r_s = -0{,}229$; $p = 0{,}065$) sowie von allen PSLs und ß-HCH ($r_s = -0{,}229$ bis $-0{,}209$ und $p = 0{,}064$ bis $0{,}095$) erkennbar, ohne das Signifikanzniveau erreicht wurde.

Aufgrund des Einflusses der Kovariablen Untersuchungstag auf die Höhe der Lyseraten wurde eine multivariate Regressionsanalyse der Lyseraten und POPs mit dieser Kovariablen durchgeführt. Alle PSLs zeigten wie erwartet eine hoch signifikante Abhängigkeit vom Untersuchungstag ($p < 0{,}001$). Ein signifikanter Einfluss der POPs auf die NK-Aktivität konnte nicht beobachtet werden. Der stärkste Hinweis auf einen Einfluss ohne Signifikanz bestand bei pp-DDE bezüglich der PSL 25/1 ($ß = 0{,}441$, $p = 0{,}076$), und weniger deutlich bei PSL 50/1 ($ß = 0{,}418$, $p = 0{,}104$) und PSL 12,5/1 ($ß = 0{,}379$, $p = 0{,}172$). Im Folgenden ist exemplarisch der Zusammenhang zwischen PSL 50/1 und den verschiedenen POPs in Streudiagrammen (Abbildung 3-10 bis Abbildung 3-15) dargestellt.

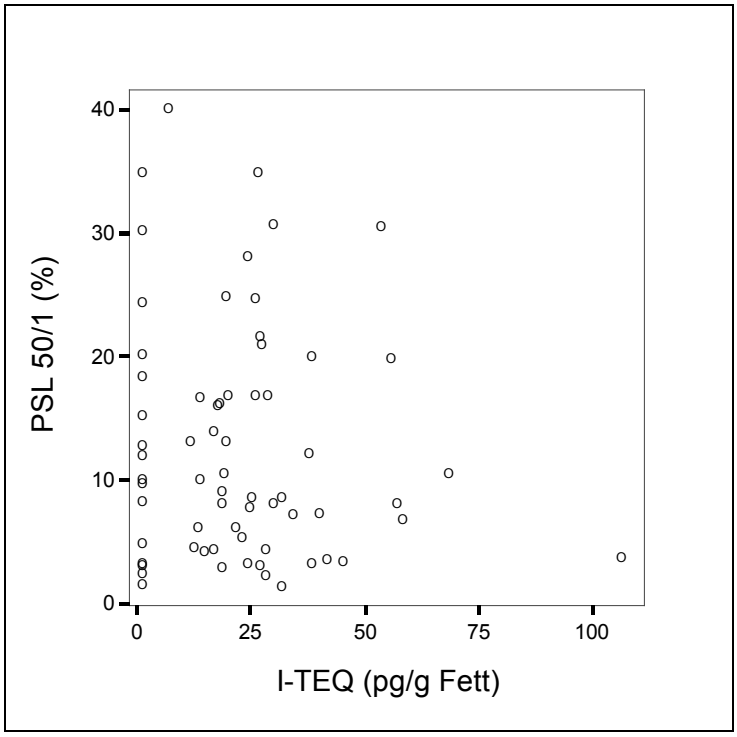

Abbildung 3-10: NK-Aktivität (PSL) und I-TEq PCDD/PCDF (n = 66)

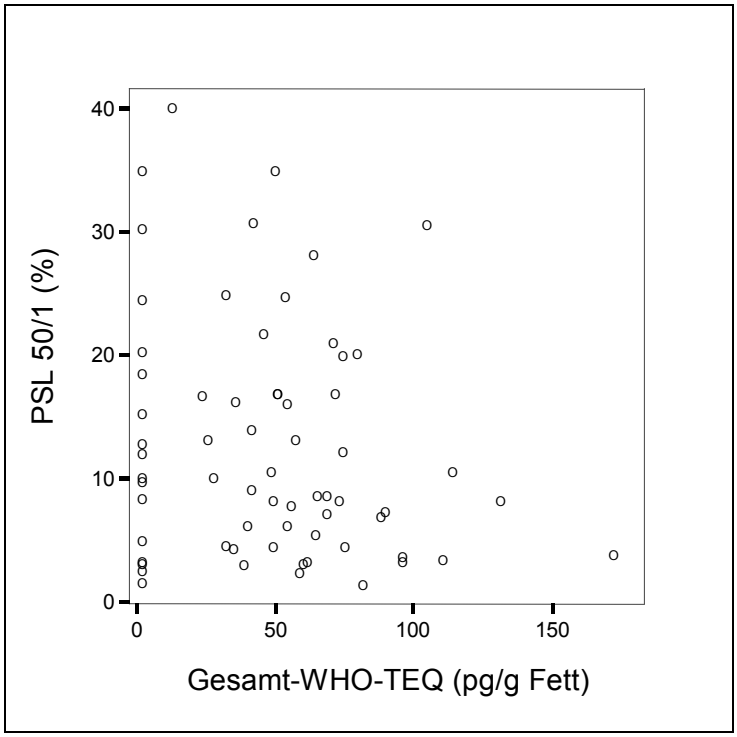

Abbildung 3-11: NK-Aktivität (PSL) und Gesamt-WHO-TEq (n = 66)

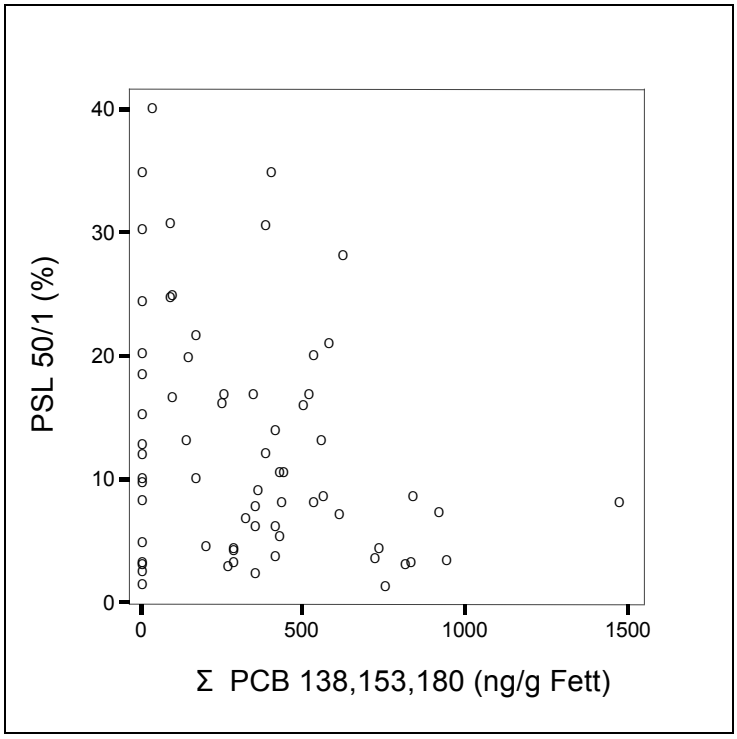

Abbildung 3-12: NK-Aktivität (PSL) und Σ PCB 138, 153, 180 (n = 66)

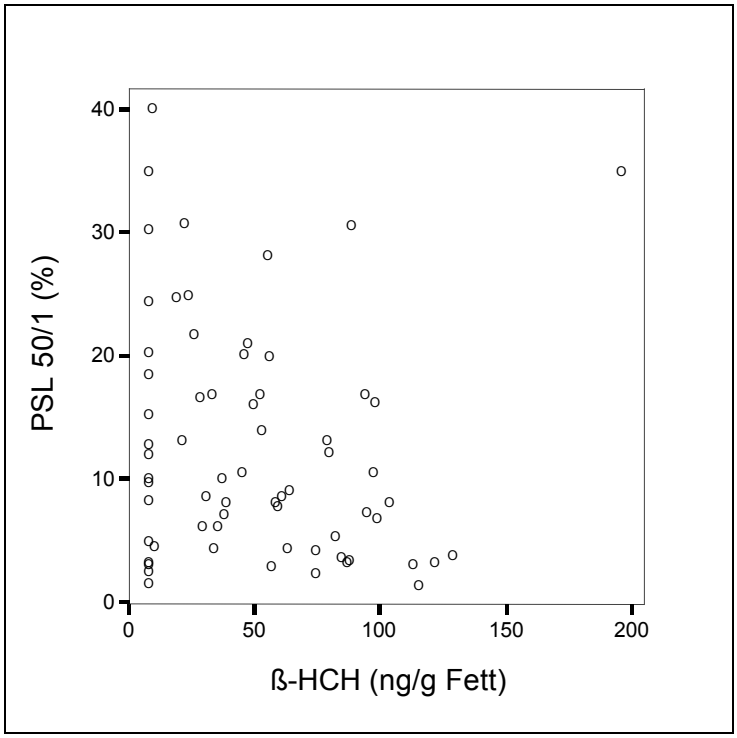

Abbildung 3-13: NK-Aktivität (PSL) und ß-HCH (n = 66)

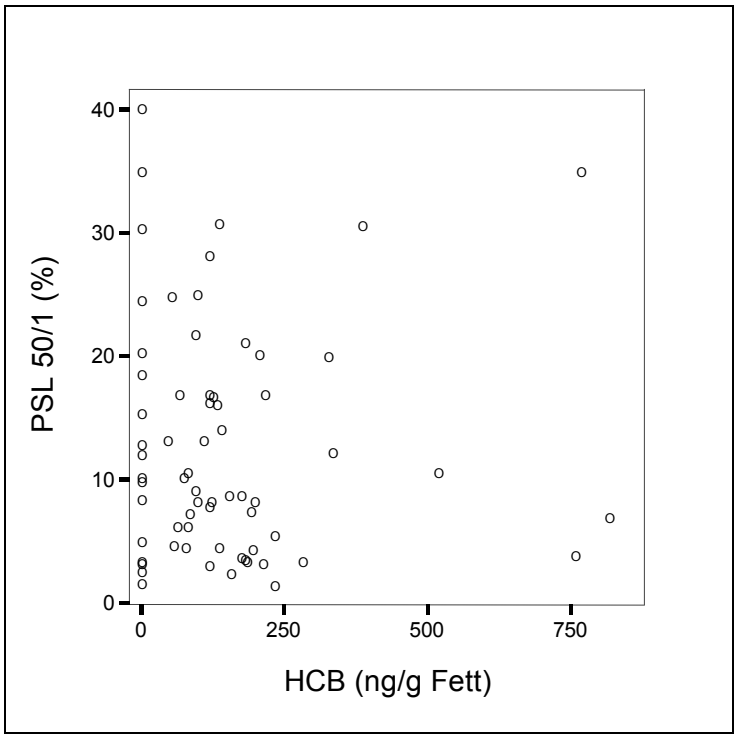

Abbildung 3-14: NK-Aktivität (PSL) und HCB (n = 66)

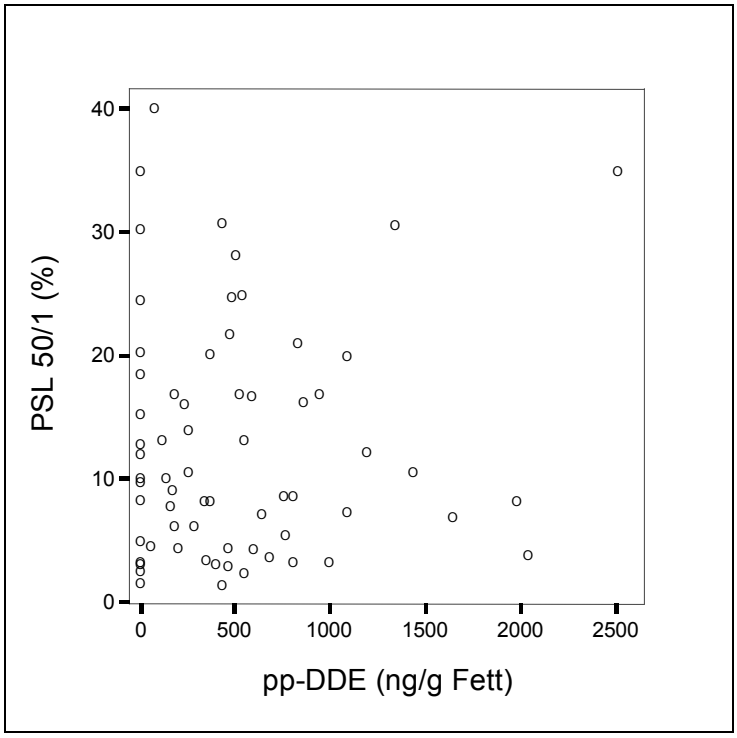

Abbildung 3-15: NK-Aktivität (PSL) und pp-DDE (n = 66)

3.5 Reproduzierbarkeit

Bei 14/66 (21 %) Kindern wurde wegen auffälliger Laborparameter (siehe 2.2.4) durchschnittlich 29 ± 12 Tage nach der ersten Blutentnahme eine zweite Blutentnahme durchgeführt. Dadurch konnten die intraindividuellen Variabilitäten der zellulären Parameter und Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays bei 14 Kindern ermittelt werden. Diese Wiederholungsmessungen-Messungen fanden zwischen Untersuchungstag 271 und 559 statt. In der Spearman-Rho-Korrelationsanalyse bestand unter Berücksichtigung aller Erst-Messungen in diesem Zeitraum (n = 35) keine signifikante Abhängigkeit der NK-Assay-Ergebnisse vom Untersuchungstag, da ungefähr ab Untersuchungstag 200 vor allem höhere Lyseraten gemessen wurden. Abbildung 3-16 stellt die im zeitlichen Abstand bestimmten Messwerte dar.

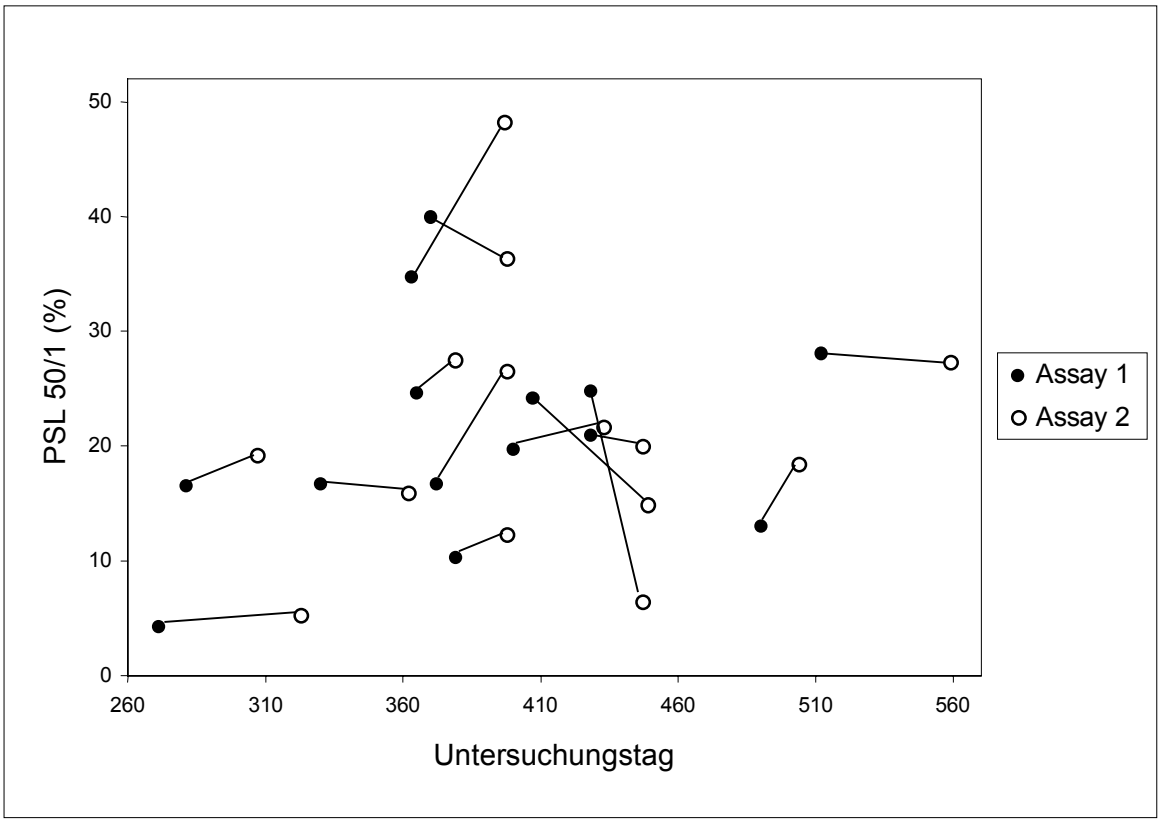

Abbildung 3-16: Wiederholungsmessungen der PSL 50/1 bei 14 Probanden

Zur Bestimmung der intraindividuellen Reproduzierbarkeit (y_R) der gemessenen Parameter wurde y_R als Quotient aus dem Mittelwert der absoluten Differenzwerte zwischen erster und zweiter Bestimmung und der Standardabweichung der Werte im

Gesamtkollektiv berechnet (siehe 2.12). y_R-Werte unter 0,5 weisen mit einer durchschnittlichen Differenz von weniger als dem 0,5-fachen der Standardabweichung auf eine gute Reproduzierbarkeit hin. In Tabelle 3-9 wird y_R als Maß der Reproduzierbarkeit wiedergegeben.

Tabelle 3-9: Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Messwerte (2 Messungen, n = 14)

Parameter (Einheit)	y_R	Parameter (Einheit)	y_R
Lymphozyten (/nl)	0,397	$CD3^-CD56^-CD16^+$ (/nl)	0,678
$CD3^-CD56/16^+$ (/nl)	0,458	$CD3^-CD56^+CD16^+$ (% Lym.)	0,700
PSL 25/1 (%)	0,472	PSL 12,5/1 (%)	0,710
$CD3^-CD56^+CD16^+$ (/nl)	0,487	$CD3^-CD56/16^+$ (% Lym.)	0,724
Leukozyten (/nl)	0,529	Lymphozyten (% Leuko.)	0,733
PSL 50/1 (%)	0,549	$CD3^-CD56^+CD16^-$ (% Lym.)	0,852
$CD3^-CD56^+CD16^-$ (/nl)	0,556	$CD3^-CD56^-CD16^+$ (% Lym.)	1,013

3.6 Zusätzliche Untersuchungen bei Erwachsenen

Von zwei mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) hochbelasteten Personen (im Folgenden Person 1 und Person 2) wurden im Abstand von zwei Monaten jeweils zwei Blutproben (Messung a und b) entnommen. Die zehn nicht belasteten erwachsenen Probanden wurden ein- bis fünfmal pro Individuum untersucht. Zur univariaten Darstellung der Ergebnisse wurden individuelle Mittelwerte der mehrfach bestimmten Parameter gebildet. Als Erwachsenengruppe wurde im Folgenden das Kollektiv aus den zehn nicht belasteten erwachsenen Probanden bezeichnet. Die gemessenen Werte der Leukozyten, Lymphozyten und NK-Zellen mit Referenzwerten (laboreigene Referenzwerte: PD Dr. med. A. Lun, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité, persönliche Mitteilung) sowie die spezifischen Lyseraten sind in Tabelle 3-10 dargestellt. Die Messungen wurden vom Untersuchungstag 204 bis 537 durchgeführt. Eine statistisch signifikante Abhängigkeit der Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays vom Untersuchungstag bestand dabei in der Spearman-Rho-Korrelationsanalyse nicht.

Im Vergleich zu den Normwerten wies Person 1 deutlich höhere absolute Leukozyten- und Lymphozytenwerte, normale absolute NK-Zellzahlen sowie grenzwertig niedrige relative NK-Zellzahlen auf. Bei Person 2 wurden normale Leukozyten- und Lymphozytenwerte, sowie normale absolute und relative NK-Zellzahlen gemessen. Es fiel auf, dass bei beiden Personen die relativen NK-Zellzahlen deutlich niedriger als die Werte der Erwachsenengruppe lagen.
Im Vergleich zur Erwachsenengruppe wurden bei Person 1 deutlich verminderte und bei Person 2 leicht verminderte spezifische Lyseraten gemessen.

Bei den zwei hochbelasteten erwachsenen Personen wurden TCDD-Messungen (ERGO Forschungsgesellschaft) durchgeführt. Bei der ersten Blutentnahme (Messung a) wies Person 1 einen Wert von 89.800 pg TCDD/g Fett und Person 2 von 19.700 pg TCDD/g Fett auf. Bei einer Wiederholungsbestimmung zwei Monate später (Messung b) betrugen die Werte 65.000 (Person 1) bzw. 17.200 (Person 2) pg TCDD/g Fett. Die Abbildungen Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18 geben die absolute bzw. relative NK-Zellzahl im Vergleich zu den TCDD-Werten wieder. Neben den gemessenen Werten der Personen 1 und 2 wurden auch die gemittelten NK-Zellzahlen der 10 nicht hochbelasteten erwachsenen Probanden angegeben und mit einem anzunehmenden hypothetischen TCDD-Wert an der Nachweisbarkeitsgrenze (10 pg TCDD/g Fett) dargestellt.

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Parameter der TCDD-exponierten Personen 1 und 2 und der Erwachsenengruppe (n = 10)
Normwerte: Virchow-Klinikum (laboreigene Referenzwerte, – : keine Normwerte vorhanden)

Parameter	**Einheit**	**Normwerte** (5.–95. Perzentil)	**Erwachsenengruppe** (Mittelwert ± SD)	**Person 1**		**Person 2**	
				Messung a	Messung b	Messung a	Messung b
Leukozyten	/nl	4,1–9,6	7,1 ± 0,6	19,7	16,9	10,6	7,5
Lymphozyten	/nl	1,1–2,7	2,1 ± 0,4	6,6	5,1	3,2	2,8
Lymphozyten	% Leuko.	18,1–41,0	29,3 ± 5,2	33,5	29,9	30,2	37,8
$CD3^-CD56/16^+$	/nl	0,08–0,44	0,29 ± 0,07	0,32	0,30	0,23	0,17
$CD3^-CD56^+CD16^-$	/nl	–	0,03 ± 0,01	0,13	0,06	0,06	0,05
$CD3^-CD56^+CD16^+$	/nl	–	0,18 ± 0,06	0,15	0,15	0,14	0,08
$CD3^-CD56^-CD16^+$	/nl	–	0,07 ± 0,02	0,04	0,09	0,03	0,05
$CD3^-CD56/16^+$	% Lym.	4,9–22,4	14,8 ± 2,3	4,9	5,9	7,1	6,1
$CD3^-CD56^+CD16^-$	% Lym.	–	1,4 ± 0,6	2,0	1,1	1,8	1,7
$CD3^-CD56^+CD16^+$	% Lym.	–	10,2 ± 3,8	2,2	2,9	4,2	2,7
$CD3^-CD56^-CD16^+$	% Lym.	–	2,9 ± 1,2	0,7	1,9	1,0	1,7
PSL 50/1	%	–	27,4 ± 9,9	3,9	6,4	18,7	13,2
PSL 25/1	%	–	14,4 ± 7,4	2,3	4,1	15,4	8,8
PSL 12,5/1	%	–	7,4 ± 4,5	1,4	2,5	6,5	6,1

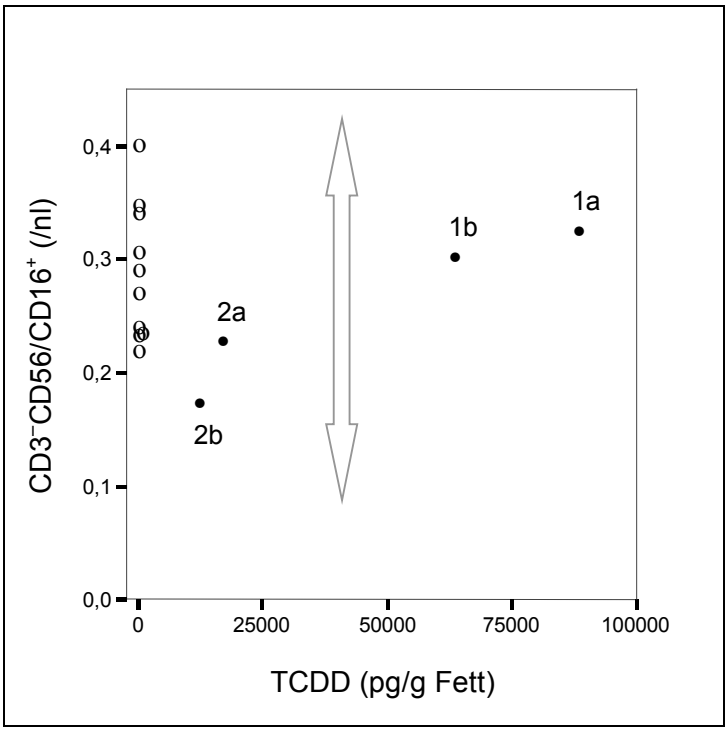

Abbildung 3-17: Streudiagramm NK-Zellen absolut vs. TCDD-Belastung (individuelle Mittelwerte der Erwachsenengruppe und Einzelwerte der Messungen a und b der Personen 1 und 2; Doppelpfeil: Normwerte, 5.–95. Perzentil)

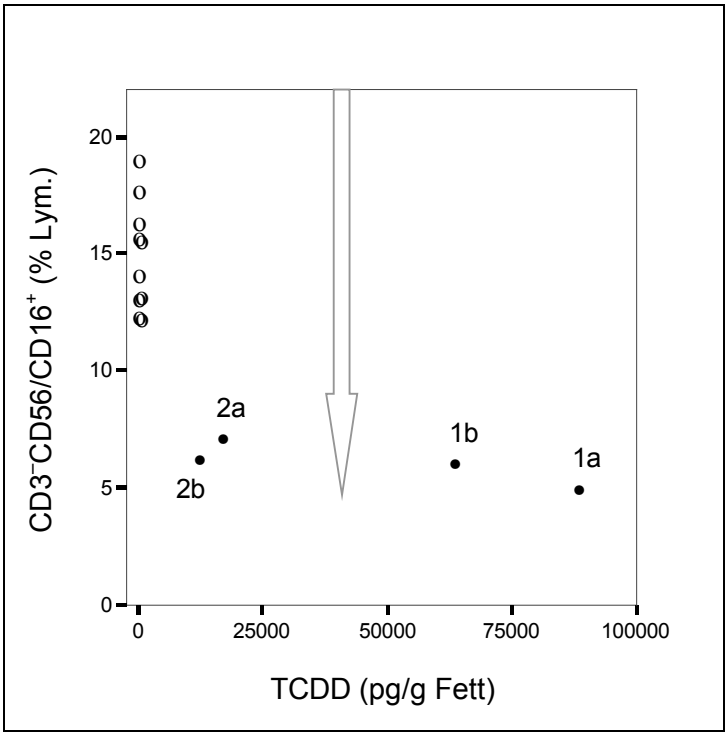

Abbildung 3-18: Streudiagramm NK-Zellen relativ vs. TCDD-Belastung (individuelle Mittelwerte der Erwachsenengruppe und Einzelwerte der Messungen a und b der Personen 1 und 2; Pfeil: Normwerte, > 5. Perzentil)

In Abbildung 3-19 wird ein Parameter des Zytotoxizitäts-Assays exemplarisch den TCDD-Werten der erwachsenen Probanden gegenübergestellt. Auch hier wurden die PSL-Werte der 10 unbelasteten erwachsenen Probanden angegeben und mit den hypothetischen TCDD-Werten dargestellt. Hier fiel eine deutlich geringere NK-Aktivität der TCDD-belasteten Person 1 im Vergleich zu den anderen erwachsenen Probanden auf, während die PSL-Werte der Person 2 im unteren Wertebereich der Erwachsenengruppe lagen.

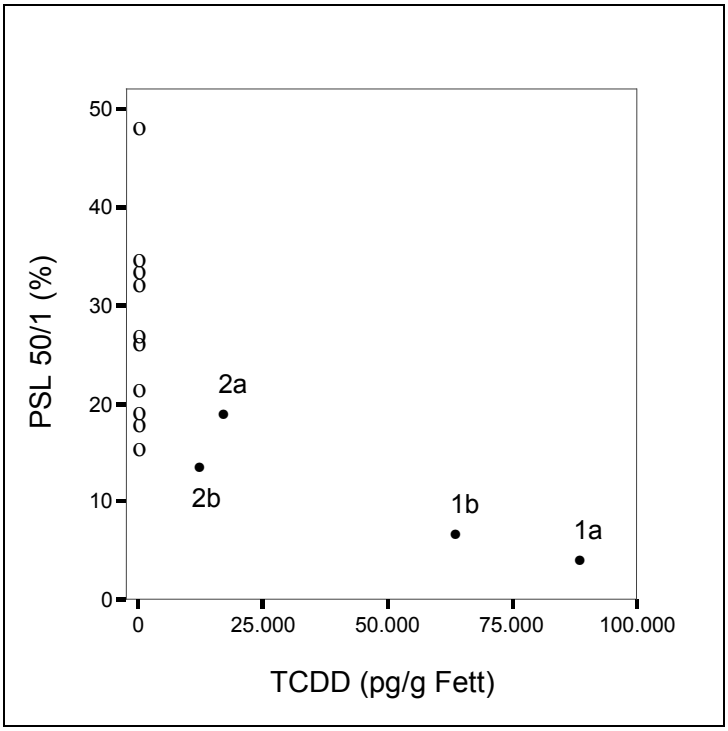

Abbildung 3-19: Streudiagramm NK-Aktivität vs. TCDD-Belastung (individuelle Mittelwerte der Erwachsenengruppe und Einzelwerte der Messungen a und b der Personen 1 und 2)

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Messung der NK-Zellzahlen und der NK-Aktivität bei gestillten und nicht gestillten Kindern und die Untersuchung möglicher Unterschiede dieser Parameter aufgrund unterschiedlicher Belastung mit persistenten organischen Schadstoffen. Die Umsetzung dieses Studienkonzeptes verlief weitgehend problemlos. Die 66 untersuchten Kinder der vorliegenden Arbeit waren ein Teilkollektiv der oben genannten Dioxin-Studie (n = 101). Da diese Untersuchungen länger dauerten als ursprünglich geplant, mussten nach 558 Tagen die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit abgebrochen werden. Die Messungen selbst konnten bei einer gewissen Aufwändigkeit der durchflusszytometrischen Methode problemlos durchgeführt werden. Die Analyse der erhobenen Daten war durch die fehlende zeitliche Stabilität der Werte des Zytotoxizitäts-Assays erschwert, deren genaue Ursache ungeklärt blieb.

4.1 Leukozyten und Lymphozyten

Da die NK-Zellen eine Subpopulation der Lymphozyten darstellen, sind zur Interpretation der absoluten NK-Zellzahlen Messungen des weißen Blutbildes nötig und Auffälligkeiten dieser zellulären Parameter von Interesse. Bei den 66 untersuchten Kindern fanden sich im Mittel 9,2 Leukozyten/nl und 5,4 Lymphozyten/nl (relativ 59 %). Diese Kinder sind eine Teilgruppe des Kollektivs der oben erwähnten Dioxin-Studie, welches bei insgesamt 101 Kindern im Mittel Werte von 9,1 ± 2,4 Leukozyten/nl (Median 8,7) und 5,3 ± 1,7 Lymphozyten/nl (Median 5,0; relativ 58,0 ± 10,8 %) aufwies [Abraham 2000]. Die Ergebnisse der Teilgruppe waren erwartungsgemäß vergleichbar mit denen des Gesamtkollektivs.

Es existieren keine Referenzwerte für genau 11 Monate alte Kinder, sondern häufig nur Normalwerte für das gesamte erste Lebensjahr. Da sich aber in diesem Zeitraum große physiologische Veränderungen der Lymphozytenzahlen abspielen [De Vries et al. 1999], macht ein Vergleich mit solchen Referenzwerten nur begrenzt Sinn. Eine Veröffentlichung von Comans-Bitter et al. gab für den am ehesten vergleichbaren Alterszeitraum von 9 bis 15 Monaten einen Normalwert im Median von 5,5 Lymphozyten/nl (2,6–10,4; 5.–95. Perzentil) an [Comans-Bitter et al. 1997], womit die beim vorliegenden Kollektiv gefundenen Lymphozytenwerte gut übereinstimmen. Zudem ist zu beachten, dass diese Studien Confounder wie Stress und leichte Infekte

vermutlich weniger beachtet und demzufolge nicht kontrolliert hatten. Die Dioxin-Studie ist die einzige Arbeit, die für den Alterszeitpunkt des vorliegenden Kollektivs Blutbild-Werte unter optimalen Bedingungen erhoben hat. Dabei wurde nicht nur hinsichtlich der Auswahl von allgemein gesunden und weitgehend infektfreien Probanden, sondern auch bei der Schaffung von bestmöglichen Bedingungen bei der Blutentnahme mit größter Sorgfalt gearbeitet. Diese wurde immer nach Anwendung eines Lokalanästhetika-Pflasters parallel zum ersten Frühstück des Kindes zu Hause durchgeführt. Dadurch konnte bei 88/101 (87 %) Kindern aus der Dioxin-Studie ein längeres Schreien aufgrund der Blutentnahme vermieden werden. Bei 13/101 (13 %) Kindern bestanden wahrscheinlich aufgrund von Schreien höhere Leukozytenwerte [Abraham 2000], im Sinne einer so genannten Stress-Leukozytose.

Durch die angewandte Standardmethode zur Isolation von mononukleären Zellen aus Vollblut musste vor den durchflusszytometrischen Messungen keine Lyse zur Entfernung der Erythrozyten durchgeführt werden. Es kam zu einer Steigerung des Lymphozyten-Anteils von durchschnittlich 59 % (Vollblut) auf 86 % (PBMC-Zellsuspension).

4.2 Natürliche Killerzellen

Bei den 66 Kindern fanden sich im Mittel 0,35 $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen/nl, die somit einen Anteil von 6,4 % an den Lymphozyten besaßen. Die 101 Kinder der Dioxin-Studie wiesen gemittelt 0,30 $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen/nl und anteilsmäßig 5,8 % der Lymphozyten auf [Abraham 2000]. Bei dem Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen Veröffentlichungen sind wiederum obige Anmerkungen bezüglich der Normwerte zu beachten. Comans-Bitter et al. gaben für $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen im Lebensalter von 9 bis 15 Monaten (n = 70) einen Normalwert im Median von 0,4 Zellen/nl (0,2–1,2; 5.–95. Perzentil) an [Comans-Bitter et al. 1997]. De Vries et al. hatten bei einer Längsschnitt-Studie $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellzahlen von Kindern (n = 10) untersucht und im 12. Lebensmonat Medianwerte von 0,4 Zellen/nl (Spannweite 0,3–0,9) sowie einen Anteil von 5 % (Spannweite 3–11) an den Lymphozyten gefunden [De Vries et al. 2000]. Hawkes et al. hatten in einer Studie die NK-Zellzahlen von gestillten (n = 79) und nicht gestillten (n = 69) Kindern im 6. Lebensmonat verglichen. Dabei wiesen gestillte Kinder im Median 0,5 $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen/nl (0,1–1,5; 5.–95. Perzentil) und einen Anteil im Median von 9,7 % (4,0–20,0; 5.–95. Perzentil) der Lymphozyten auf. Nicht gestillte

Kinder besaßen ebenfalls im Median 0,5 $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen/nl (0,2–1,0; 5.–95. Perzentil). Deren relativer NK-Zell-Anteil war mit im Median 7,1 % (3,0–15,0; 5.–95. Perzentil) der Lymphozyten signifikant niedriger ($p < 0{,}001$) [Hawkes et al. 1999]. Carver et al. konnten hingegen bei gestillten (n = 7) und nicht gestillten (n = 11) Kindern im 6. Lebensmonat keinen signifikanten Unterschied der relativen NK-Zellzahlen ($CD3^{-}CD16^{+}$) beobachten, wobei die Fallzahl relativ klein war [Carver et al. 1991b].
Wie bei den Leukozyten- und Lymphozyten-Werten lagen die NK-Zellzahlen der für die vorliegende Arbeit untersuchten Kinder im unteren Bereich der veröffentlichten Normalwerte von obigen Arbeitsgruppen [Comans-Bitter et al. 1997] [De Vries et al. 2000]. In der statistischen Analyse bestanden bei dem vorliegenden Untersuchungskollektiv im Gruppenvergleich mittels t-Test zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der absoluten und relativen NK-Zellzahlen (Gesamt- und Subpopulationen). Auch bei der Korrelationsanalyse der Zellzahlen mit der äquivalenten Vollstillzeit bestanden keine signifikanten Assoziationen. Das vorliegende Untersuchungskollektiv wurde im Vergleich zu den oben erwähnten Studien nicht während der (Voll-)Stillperiode untersucht, aufgrund des Studiendesigns waren die Probanden zum Untersuchungszeitpunkt teilgestillt oder bereits abgestillt. Falls es sich bei den oben zitierten Zellzahl-Unterschieden nur um einen transitorischen Effekt während der Vollstillzeit handeln sollte, konnte dieser somit nicht erfasst werden.

Einige wenige Arbeitsgruppen haben NK-Zellzahlen bei erwachsenen Männern und Frauen verglichen, wobei zum Teil keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gefunden wurden [Tollerud et al. 1989] [Yovel et al. 2001] und zum Teil Männer signifikant höhere NK-Zellzahlen als Frauen aufwiesen [Lee 1996] [Reichert et al. 1991]. Da es keine Veröffentlichungen über geschlechtsspezifische Variationen im Altersbereich der untersuchten Kinder gibt, kann über eine Übertragbarkeit der obigen Ergebnisse auf Kinder und Säuglinge nur spekuliert werden. Eine Assoziation der NK-Zellzahlen mit dem Geschlecht ließ sich bei dem vorliegenden Studienkollektiv nicht nachweisen.

Die Reproduzierbarkeit der NK-Zellzahlen konnte bei 14 von 66 Probanden durch Wiederholungsuntersuchungen evaluiert werden. Bei einem Untersuchungsabstand von durchschnittlich 29 Tagen waren die absoluten NK-Zellzahlen besser als die relativen

NK-Zellzahlen reproduzierbar, wobei nur die größte NK-Zell-Subpopulation – wie auch die absolute Lymphozytenzahl – eine gute Reproduzierbarkeit im Sinne der oben genannten Kriterien aufwies (siehe 2.12 und 3.5).

Die prozentualen Anteile der NK-Subpopulationen zeigten vor und nach PBMC-Isolation im t-Test signifikante Unterschiede. Hier kam es anscheinend durch die Standardmethode zur Isolation von mononukleären Zellen aus Vollblut zu einem geringen selektiven Zellverlust der $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$-Subpopulation mit entsprechendem relativen Zugewinn der anderen beiden Subpopulationen. Diese Veränderung ist als geringfügig einzustufen, zeigt aber, dass das PBMC-Untersuchungsmaterial des in-vitro Zytotoxizitäts-Assays signifikante Unterschiede zum ursprünglichen Vollblut-Untersuchungsmaterial hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der NK-Subpopulationen aufwies. Eine direkte Messung der NK-Aktivität aus Vollblut wäre hier zwar wünschenswert, aber alle diesbezüglichen Methoden weisen praktische Probleme durch den geringen relativen Anteil der NK-Zellen im Vollblut auf.

4.3 Natürliche Killerzellen und POPs

Bei der Korrelationsanalyse der einzelnen NK-Subpopulationen mit den persistenten organischen Schadstoffen waren zum Teil signifikante negative Assoziationen ersichtlich. Bei Betrachtung der NK-Gesamtpopulation bestanden hingegen keine signifikante Korrelationen. Auch bei dem Gesamtkollektiv der Dioxin-Studie ließen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen NK-Gesamtpopulation und POPs nachweisen. In der weitergehenden statistischen Analyse mittels multivariater linearer Regression ließen sich signifikante negative Assoziationen von ß-HCH mit den relativen und absoluten Zellzahlen der $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$-Zellen nachweisen. Auch mit HCB bestanden hier signifikante Assoziationen, die im Gegensatz zu der Korrelationsanalyse allerdings positiv waren.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, existiert nur eine geringe Anzahl an Veröffentlichungen über Einflüsse von POPs auf NK-Zellzahlen. Dabei hatten zwei Arbeitsgruppen signifikant niedrigere Zellzahlen in Bezug auf Exposition mit PCBs und DDT bzw. Dioxin-artigen PHAHs gefunden [Svensson et al. 1994] [Van Den Heuvel et al. 2002], während weitere Studien keinen signifikanten Effekt einer POP-Belastung auf NK-Zellzahlen beobachten konnten. Insbesondere die Veröffentlichung von Weisglas-Kuperus et al., welche vom Studienkollektiv der vorliegenden Arbeit am nächsten kam,

konnte keine signifikanten Dioxin/PCB-Effekte auf die NK-Zellzahlen gestillter Kinder beobachten [Weisglas-Kuperus et al. 1995]. Bei Erwachsenen beschrieb eine weitere Arbeitsgruppe eine signifikante negative Assoziation der NK-Zellzahlen mit dem Chlorakne-Status belasteter Arbeiter, nicht aber mit der TCDD-Exposition [Ott et al. 1994]. Eine andere Arbeitsgruppe fand bei TCDD-Exponierten signifikant höhere Zahlen von $CD57^+$-Zellen, die zu ungefähr 60 % NK-Zellen sind, aber auch zu T-Lymphozyten-Subpopulationen gehören können [Jennings et al. 1988]. Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeiten ist dabei durch verschiedene Faktoren erschwert. Es lagen sehr unterschiedliche individuelle Dosierungen und Arten der Exposition vor, wobei es sich zudem meist um Mischexpositionen mit verschiedenen POPs und zum Teil auch anderen chemischen Substanzen handelte. Im Rahmen der epidemiologischen Studien am Menschen können keine Aussagen über kausale Effekte von POPs gemacht werden, demzufolge ist für eine einzelne Substanz keine Aussage bezüglich ihrer Wirkung z. B. auf NK-Zellzahlen möglich. Ferner haben zwar einige Arbeitsgruppen Confounder wie Lebensalter, Krankheiten und Alkoholkonsum kontrolliert, häufig sind aber andere wichtige Einflussfaktoren wie das Zigarettenrauchen im Studiendesign nicht berücksichtigt worden.

Zusammenfassend gesehen liegen keine Berichte über konsistente POP-Effekte auf NK-Zellzahlen beim Menschen vor. Einflüsse auf einzelne NK-Subpopulationen wurden nicht untersucht. Bei dem vorliegenden Kollektiv war ein kausaler signifikanter Zusammenhang zwischen der POP-Exposition und einer Veränderung der NK-Zellzahlen nicht ersichtlich. Die oben genannten signifikanten Assoziationen zweier NK-Subpopulationen waren teilweise inkonsistent und möglicherweise zufallsbedingt. Dabei lagen die beobachteten mittleren Konzentrationen im Hintergrundbereich. Ausgehend von der Annahme einer dosis-abhängigen Wirkung, lagen die POPs hier möglicherweise nicht in einem ausreichend hohen Konzentrationsbereich vor, um messbare Unterschiede hervorzurufen. Es kann nicht ausgeschlossen werde, dass es im Bereich höherer Konzentrationen doch zu signifikanten Effekten kommen kann. Da es in Deutschland aber aufgrund der bereits erwähnten gesetzlichen Regelungen insgesamt zu einer rückläufigen Hintergrundbelastung kommt, erscheint eine Entwarnung bezüglich potenzieller Effekte der vorliegenden POPs auf NK-Zellzahlen gerechtfertigt.

4.4 Zytotoxische Aktivität

Die Zytotoxizitäts-Messungen erbrachten für die 66 Probanden im Mittel Lyseraten der PSL 50/1 von 12,5 %, der PSL 25/1 von 7,5 % und der PSL 12,5/1 von 4,2 %. Die PSLs wiesen untereinander erwartungsgemäß einen hohen Grad an Korrelation auf und entsprachen auch dem erwarteten Konzentrations-abhängigen Wertemuster der eingesetzten Effektorzell-zu-Targetzell-Ratios. Die drei unterschiedlichen E:T-Ratios dienten dabei vor allem zur testinternen Kontrolle, während die höchste E:T-Ratio (PSL 50/1) Unterschiede zwischen den Probanden am deutlichsten abbildete und somit als wichtigster Parameter anzusehen war. Die eingesetzte durchflusszytometrische Methode zur Messung der zytotoxischen NK-Aktivität erwies sich als relativ schnell durchführbar, innerhalb von 8 Stunden lagen jeweils die ersten Messergebnisse vor. Allerdings zeigte sich im Laufe des Untersuchungszeitraumes von über eineinhalb Jahren eine fehlende zeitliche Stabilität der Messergebnisse. In der daraufhin durchgeführten weitergehenden statistischen Analyse zeigte sich eine signifikante Korrelation ($r_s = 0{,}747$, $p < 0{,}01$) zwischen den Lyseraten und dem Untersuchungstag. Auch die äquivalente Vollstillzeit wies in der Spearman-Korrelationsanalyse eine signifikante Assoziation mit dem Untersuchungstag auf ($r_s = -0{,}280$, $p < 0{,}05$). Im t-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied nach Testung des Untersuchungstages gegen die Gruppenvariable Stillen. Dies bedeutet, dass die gestillten und nicht gestillten Kinder im Untersuchungszeitraum nicht signifikant unterschiedlich verteilt waren, aber Kinder mit einer längeren Vollstillzeit eher zu Anfang des Untersuchungszeitraumes untersucht wurden. Da es allerdings keine signifikanten Korrelationen zwischen der äquivalenten Vollstillzeit und den Lyseraten gab, war ein diesbezüglicher kausaler Einfluss unwahrscheinlich.

Fünf der sechs gemessenen POPs bzw. POP-Verbindungsgruppen wiesen signifikante negative Assoziationen in der Spearman-Korrelationsanalyse mit dem Untersuchungstag auf: I-TEq ($r_s = -0{,}256$, $p < 0{,}05$), WHO-TEq ($r_s = -0{,}317$, $p < 0{,}05$), Σ PCB 138, 153, 180 ($r_s = -0{,}344$, $p < 0{,}01$), ß-HCH ($r_s = -0{,}292$, $p < 0{,}05$) und HCB ($r_s = -0{,}246$, $p < 0{,}05$). Ferner waren alle POPs in der Spearman-Rho-Korrelationsanalyse erwartungsgemäß hoch signifikant mit der äquivalenten Vollstillzeit assoziiert ($p < 0{,}001$). In der multivariaten Regressionsanalyse wurde dann die Assoziation der einzelnen POPs mit dem Untersuchungstag und der äquivalenten Vollstillzeit untersucht. Hier ergaben sich jeweils hoch signifikante negative

Assoziationen mit der äquivalente Vollstillzeit ($p < 0{,}001$), während sich nur bei Σ PCB 138, 153, 180 eine signifikante Assoziation mit dem Untersuchungstag fand ($p < 0{,}05$). Ein kausaler Einfluss der POPs auf den beobachteten Anstieg der Lyseraten im Untersuchungszeitraum erscheint somit unwahrscheinlich (siehe auch 3.4).

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die ansteigenden Lyseraten wurden alle denkbaren Confounder überprüft. Dabei zeigte sich, dass anscheinend weder ein Selektions-Bias bezüglich des Kollektives vorlag, noch ein systematischer Messfehler aufgrund der benutzten Geräte. Möglicherweise kam es im Rahmen des routinemäßigen Austausches der in Langzeit-Kultur befindlichen K562-Targetzellen zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber der zytotoxischen NK-Aktivität der Effektorzellen. Die jeweils eingesetzten Targetzellen wiesen allerdings weder morphologische Auffälligkeiten (am Phasenkontrastmikroskop) noch einen geringeren Vitalitätsgrad (in der Trypanblau-Färbung) im Vergleich zum Beginn der Untersuchung auf. Auch die spontane Lyserate, die als Neigung der eingesetzten Targetzellen eine Membranschädigung ohne äußere Einwirkung zu erleiden angesehen werden kann, zeigte keine signifikante Änderung im Untersuchungszeitraum. Alle anderen eingesetzten Materialien konnten als Bestandteile eines systematischen Fehlers ausgeschlossen werden. Die genaue Ursache dieses Anstiegs der Messwerte war letztlich trotz genauer Prüfung der jeweiligen Testbedingungen nicht ermittelbar.

Gegenüber Funktionstests anderer Leukozyten-Fraktionen, wie z. B. einem Proliferationstest der T-Lymphozyten nach Mitogen/Antigen-Stimulation, ist man bei der Messung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen oder auch von zytotoxischen T-Lymphozyten auf die Verwendung von Targetzellen angewiesen. Da sich diese zumeist in Langzeit-Kultur befinden, können sie keine stabilen bzw. zeit-unabhängigen Eigenschaften besitzen. Dies kann sich vor allem bei längeren Studienzeiträumen und Längsschnitt-Beobachtungen negativ als Confounder auswirken. Dementsprechend müsste man optimalerweise alle Untersuchungen an einem Tag durchführen, dies war jedoch Methoden- und Ressourcen-abhängig nicht möglich. Aufgrund dieser Problematik der Störanfälligkeit waren mit der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten durchflusszytometrischen Methode zur NK-Aktivitäts-Messung vor allem qualitative oder semiquantitative Aussagen möglich.

Nur wenige veröffentlichte Studien befassten sich mit der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen bei gesunden Kindern. Da die jeweiligen Ergebnisse zudem stark methodenabhängig sind, ist es hier grundsätzlich nicht möglich, Referenzwerte anzugeben. Das für die vorliegende Arbeit parallel untersuchte Kollektiv von erwachsenen Probanden (n = 10) wies im Mittel Lyseraten der PSL 50/1 von 27,4 %, der PSL 25/1 von 14,4 % und der PSL 12,5/1 von 7,4 % auf. Diese Werte lagen 14,9 %, 6,9 % bzw. 3,2 % höher als die Mittelwerte der untersuchten Kinder. Dabei ist zu beachten, dass die Erwachsenen niedrigere absolute NK-Zell-Zahlen im Vergleich zu den Kindern besaßen. Hierzu stehen die höheren Lyseraten nicht unbedingt im Widerspruch, denn eine Altersabhängigkeit der NK-Aktivität wurde beschrieben. Noble und Warren berichteten, dass bei ihren Untersuchungen die NK-Aktivität von bis zu 4jährigen Kindern (n = 19) im Vergleich zu 21- bis 39jährigen Erwachsenen (n = 38) signifikant niedriger war. Dabei waren Alter und Höhe der NK-Zytotoxizität in den ersten fünf Lebensjahren direkt miteinander korreliert. Die Höhe der entsprechenden NK-Zellzahlen wurde dabei nicht mitgeteilt [Noble/Warren 1985]. Yabuhara et al. beschrieben, dass trotz sehr niedriger NK-Aktivität in der Neonatalperiode fast das Erwachsenen-Niveau im 1. bis 5. Lebensmonat erreicht wurde. Bei Messungen der NK-Aktivität betrug die PSL 20/1 von Kindern zur Geburt 15 ± 6 % (MW± SD; n = 26), am 1.–3. Lebenstag 22 ± 8 % (n = 7), im 1.–5. Lebensmonat 36 ± 12 % (n = 7), im 6.–12. Lebensmonat 42 ± 9 % (n = 12), im 1.–4. Lebensjahr 41 ± 8 % (n = 23), im 5.–8. Lebensjahr 40 ± 8 % (n = 13), im 9.–13. Lebensjahr 38 ± 8 % (n = 19) und bei Erwachsenen 38 ± 8 % (n = 42). Hierbei wurden folgende NK-Zellzahlen angegeben: Geburt 1,2 ± 0,5 $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen/nl (n = 11), 1.–5. Lebensmonat 1,4 ± 0,7 Zellen/nl (n = 6), 6.–12. Lebensmonat 1,4 ± 0,6 Zellen/nl (n = 7), 1.–4. Lebensjahr 1,2 ± 0,6 Zellen/nl (n = 8), 5.–8. Lebensjahr 0,9 ± 0,3 Zellen/nl (n = 6), 9.–13. Lebensjahr 0,9 ± 0,4 Zellen/nl (n = 7) und Erwachsene 0,7 ± 0,4 Zellen/nl (n = 12). Es zeigte sich somit eine mit dem Lebensalter ansteigende NK-Aktivität bei gleichzeitig abfallenden absoluten NK-Zellzahlen [Yabuhara et al. 1990]. Das vorliegende Kollektiv wies im Mittel deutlich niedrigere Lyseraten der PSL 50/1 und PSL 25/1 im Alter von 11 Monaten im Vergleich zu den von Yabuhara et al. beobachteten Werten der PSL 20/1 in jedem untersuchten Lebensalter auf.

Eine Arbeitsgruppe teilte Normalwerte der NK-Aktivität bei gesunden erwachsenen Probanden (n = 46) mit, die mittels eines durchflusszytometrischen Assays erhoben wurden. Bei einer E:T-Ratio von 40:1 wurden im Median eine Aktivität von 77,4 ± 2,6 % (65,2–85,3; 25.–75. Perzentil), bei 20:1 eine Aktivität von 62,7 ± 3,9 % (46,9–70,7), bei 10:1 eine Aktivität von 43,1 ± 4,2 % (24,0–51,3) und bei 5:1 eine Aktivität von 22,8 ± 3,1 % (11,8–31,5) gemessen [Donnerstag et al. 1993].
Diese Ergebnisse sind aufgrund der oben angeführten Abhängigkeit von Methoden und Lebensalter nicht übertragbar, während die Messwerte von Yabuhara et al. aufgrund der geringen Fallzahlen und der japanischen Abstammung der Probanden nicht vorbehaltlos auf das vorliegende Kollektiv übertragbar sind. Oft ist die Interpretation der Ergebnisse wegen der meist kleinen Fallzahl im Kleinkindalter erschwert. Viele Arbeitsgruppen geben bei der Untersuchung der NK-Aktivität leider keine NK-Zellzahlen an. Obwohl es keine eindeutigen Hinweise auf einen strengen Zusammenhang zwischen Anzahl und Aktivität der NK-Zellen gibt, ist eine genaue Kenntniss der eingesetzten Effektorzellen bei der Auswertung vonnöten. Letztlich war ein quantitativer Vergleich mit anderen veröffentlichten Werten auch aufgrund des vorliegenden Bias der Lyseraten nicht möglich.

Wegen grundsätzlicher biologischer Überlegungen bezüglich der lytischen Aktivität der einzelnen NK-Zelle, war ein Einfluss der Höhe der NK-Zellzahlen auf die Gesamt-NK-Aktivität zu erwarten. Whiteside und Herberman schrieben in einem Review, dass bei einem von ihnen untersuchten Kollektiv von gesunden Erwachsenen eine entsprechende signifikante positive Korrelation zwischen relativem Anteil und zytolytischer Gesamtaktivität der NK-Zellen bestehe. Möglicherweise aufgrund sich ändernder Aktivitäts-Stadien der NK-Zellen sei diese Beziehung aber nicht sehr robust, wobei keine nähere Definition dieses Begriffes gegeben wird [Whiteside/Herberman 1989].
Bei dem vorliegenden Kollektiv wies in der Korrelationsanalyse nur eine NK-Zell-Subpopulation mit der PSL 50/1 einen signifikanten positiven Zusammenhang auf. In der multivariaten Regressionsanalyse unter Einschluss der Kovariablen Untersuchungstag war dieser Effekt hingegen nicht mehr nachweisbar.

Carver et al. berichteten über NK-Aktivität bei gestillten und nicht gestillten Kindern im Rahmen einer Untersuchung über Effekte von Nukleotiden, die natürlicherweise in der Muttermilch vorkommen und Säuglingsanfangs- sowie Folgenahrungen zugefügt sind.

Sie beobachteten dabei eine höhere NK-Aktivität bei Säuglingen im 2. Lebensmonat, die gestillt wurden (41,7 ± 4,8 %, E:T-Ratio 50:1; n = 9) bzw. deren Nahrung mit Nukleotiden ergänzt wurde (32,2 ± 3,4 %, E:T-Ratio 50:1; n = 13) im Vergleich zu nicht gestillten Kindern ohne entsprechende Nahrungsergänzung (21,7 ± 2,2 %, E:T-Ratio 50:1; n = 15). Diese Aktivitäts-Erhöhung war bei den E:T-Ratios 50:1 und 25:1 signifikant, nicht jedoch bei 12,5:1. Im 4. Lebensmonat war ein signifikanter Effekt nur noch zwischen gestillten und Nukleotid-frei ernährten Säuglingen bei den E:T-Ratios 50:1 und 25:1 nachweisbar [Carver et al. 1991a]. Dies scheint auf eine externe Einflussmöglichkeit auf die NK-Aktivität bei Säuglingen hinzuweisen, wobei das Ausmaß des Effektes verwunderlich ist.
Die Höhe der NK-Aktivität der für die eigene Arbeit untersuchten Probanden wies keine signifikante Assoziation mit der äquivalenten Vollstillzeit auf. Auch im Gruppenvergleich bestanden keine signifikanten Unterschiede der NK-Aktivität bei gestillten und nicht gestillten Probanden.

Es gibt Arbeitsgruppen, die über eine Assoziation der zytotoxischen NK-Aktivität zum Geschlecht berichten. Horikoshi beobachtete, dass die NK-Aktivität bei Mädchen primär hoch war und mit höherem Lebensalter abfiel, während bei Jungen die höchste NK-Aktivität ab dem 20. Lebensjahr erreicht wurde. Dabei hatten z. B. 1 bis 9 Jahre alte Mädchen eine höhere NK-Aktivität als 10 bis 19 Jahre alte Mädchen und 1 bis 9 Jahre alte Jungen [Horikoshi 1985]. Die spontane zell-vermittelte Zytotoxizität wurde von Santoli et al. bei Männer als annähernd doppelt so hoch wie bei Frauen beschrieben [Santoli et al. 1976] während Pross und Baines eine geringfügig höhere NK-Aktivität bei Männern beobachteten, wobei dies bereits im Nabelschnurblut nachweisbar war [Pross/Baines 1982].
In der statistischen Analyse ließen sich bei dem untersuchten Kollektiv jedoch keine signifikanten Assoziationen der zytotoxischen NK-Aktivität mit dem Geschlecht nachweisen.

Durch Wiederholungsuntersuchungen bei 14 Probanden konnte die Reproduzierbarkeit der NK-Aktivität untersucht werden. Dabei war die PSL 25/1 besser als die PSL 50/1 und PSL 12,5/1 reproduzierbar. Dabei kann nur die PSL 25/1 als gut reproduzierbar im Sinne des benutzten statistischen Verfahrens bezeichnet werden. Im Vergleich zu anderen gemessenen Parametern waren die NK-Aktivitätswerte schlechter als die absolute Lymphozytenzahl und besser als die relative Lymphozytenzahl reproduzierbar.

Die biologische Variabilität der NK-Aktivität bei diesen Probanden blieb im Rahmen der anderen gemessenen Parameter. Die schlechtere Reproduzierbarkeit der PSL 50/1 im Vergleich zur PSL 25/1 konnte erwartet werden, da wie oben erwähnt Unterschiede der lytischen Aktivität von der PSL 50/1 am deutlichsten abgebildet wurden.
Horikoshi führte in einem mittleren Abstand von 5,6 Monaten zwei Messungen der NK-Aktivität bei bis zu 10jährigen Kindern (n = 12) durch. Dabei bestanden im t-Test für abhängige Stichproben keine signifikanten Unterschiede der individuellen NK-Aktivitäten [Horikoshi 1985].
In ihrem Review berichten Whiteside et al., dass durch Wiederholungsmessungen der NK-Aktivität bei gesunden Erwachsenen (n = 93) so genannte „low“ und „high responder“ definiert werden konnten. Dass heisst es wurden Individuen identifiziert, die über einen längeren Zeitraum ein niedrigere bzw. höherer NK-Aktivität aufwiesen. Die Höhe der Aktivität könne aber auch von Alter, Geschlecht, zirkadianer Rhythmik, körperlicher Aktivität und anderen generellen Gesundheitsfaktoren beeinflusst werden. Unter den Vorraussetzungen, dass ein Individuum keine Infektion habe, nicht unter starkem Stress leide und keine Medikamente wie Kortikosteroide oder andere Hormone einnehme, sei die Höhe der intraindividuellen NK-Aktivität allerdings stabil über die Zeit. In diesem Review wurden allerdings keine Zahlenwerte oder Ergebnisse statistischer Verfahren angegeben [Whiteside et al. 1990]. Pross und Baines hatten bei gesunden erwachsenen Probanden (n = 539) über einen Zeitraum von 7 Jahren die NK-Aktivität bis zu 213-mal gemessen. Dabei schrieben auch sie von einer möglichen Untergruppierung von Individuen in beständige „low“ und „high NK donors“. Diese Beständigkeit der individuellen NK-Aktivität bleibe über Jahre erhalten, obwohl die Aktivität der einzelnen Assays in Abhängigkeit von der Sensitivität der Targetzellen erheblich schwanken könne [Pross/Baines 1982]. Zu diesen Feststellungen passt die Beobachtung von Moretta et. al, dass die Dichte der vor kurzem entdeckten aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren (NCRs) auf der Zelloberfläche direkt mit der Höhe der NK-Aktivität korreliert. Dabei kann man zwischen Individuen unterscheiden, die konsistent eine hohe bzw. eine niedrige Dichte an NCRs aufweisen, was in einer deutlich differenten Zytotoxizität resultiert [Moretta et al. 2001]. Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse obiger Studien so beurteilen, dass die NK-Aktivität relativ gut reproduzierbar ist, wobei in der Interpretation einflussnehmende individuelle Faktoren und eine Methodenvariation von Tag zu Tag zu beachten sind.

Die für die vorliegende Arbeit eingesetzte durchflusszytometrische Methode in Anlehnung an Methoden von drei Arbeitsgruppen [Slezak/Horan 1989], [Hatam et al. 1994] [Lötzerich/Hirt 1997] ist als Test z. B. geeignet um bei klinisch auffälligen Kindern mit Verdacht auf Immundefekt eine deutliche Minderfunktion bzw. einen Mangel der NK-Aktivität zu erkennen. Wie bereits mehrfach weiter oben angeführt, ist höchstwahrscheinlich methodenbedingt ein direkter Vergleich der Messwerte, welche zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben wurden, erschwert. Trotz dieser Schlussfolgerung muss weiterhin auf die Vorteile der durchflusszytometrischen Methoden gegenüber dem klassischen Chrome-Release-Assay hingewiesen werden (siehe 1.3). Als mögliche methodische Alternative zur Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen könnte in der Laborroutine ein kommerzielles Test-Kit dienen (NKTEST®, ORPEGEN Pharma, Heidelberg). Dieses Kit enthält kryokonservierte membrangefärbte K562-Targetzellen und eine DNA-Färbelösung und arbeitet mit einer der vorliegenden Arbeit vergleichbaren durchflusszytometrischen Methode. Die benötigten Targetzellen werden kurz vor Durchführung des Zytotoxizitäts-Assays aufgetaut und sofort zur Messung der NK-Aktivität eingesetzt. Trotz Bedenken bezüglich einer erhöhten Empfindlichkeit der Targetzellen gegenüber der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen durch den Auftauprozess und die nicht vorhandene Erholungszeit der Zellen in einer Kultur, könnte dieser Test aufgrund von möglicherweise stabileren intratest-spezifischen Bedingungen von Vorteil sein. Mittlerweile wird dieser kommerzielle Test im Labor der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité zur Bestimmung der zytotoxischen NK-Aktivität eingesetzt.

Neben den vorwiegend eingesetzten DNA-Farbstoffen gibt es auch neuere Entwicklungen wie z. B. Farbstoff-konjugierte monoklonale Antikörper, welche an frühe Apoptose-Marker auf der Zelloberfläche binden. In diesem Bereich bestehen fortdauernde rege Forschungsaktivitäten, wobei eine Ablösung des Chrome-Release-Assays als „Goldstandard“ durch eine bestimmte durchflusszytometrische Methode nicht in unmittelbarer Zukunft stattzufinden scheint.

4.5 Zytotoxische Aktivität und POPs

Bei der Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho bestanden keine signifikanten Korrelationen der Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays mit der Belastung durch persistente organische Schadstoffe. Eine multivariate statistische Analyse wurde durchgeführt, um mögliche signifikante Assoziationen aufzudecken, die durch die signifikante Abhängigkeit der Lyseraten vom Untersuchungszeitpunkt verdeckt worden sein konnten. Mit dieser Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit der Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays von den POP-Konzentrationen unter Einbeziehung der Kovariablen Geschlecht, Stillen, Infektanamnese und Untersuchungstag untersucht. Neben der erwarteten hoch signifikanten Abhängigkeit aller PSL-Raten vom Untersuchungstag konnte für die POPs sowie die oben genannten Kovariablen kein signifikanter Einfluss auf die NK-Aktivität gezeigt werden.

Generell lagen bezüglich der Wirkung von persistenten organischen Schadstoffen auf die NK-Aktivität des Menschen wenig Informationen vor (siehe 1.4). Eine Veröffentlichung berichtete über eine Steigerung der NK-Aktivität, die signifikant mit der TCDD-Belastung exponierter Arbeiter korrelierte [Kitamura et al. 2000], während eine Studie mit über Nahrungsmittel mit POPs exponierten Erwachsenen keinen Effekt auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nachweisen konnte [Lovik et al. 1996]. Die Interpretation dieser Ergebnisse wurde wiederum durch die vorliegenden Mischexpositionen und andere Faktoren, wie den langen zeitlichen Abstand zwischen Exposition und Untersuchung, erschwert. Die Ergebnisse von tierexperimentellen Studien erbrachten kein durchgängiges Muster der toxischen POP-Wirkung auf die NK-Aktivität. Hier bestanden erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies mit supprimierenden, aktivierenden oder nicht beobachteten POP-Effekten, bei Einsatz von zum Teil sehr hohen POP-Dosen. Zusammenfassend lässt sich für das vorliegende Kollektiv sagen, dass im Rahmen der Hintergrundbelastung gestillter Kinder mit POPs keine signifikanten kausalen Assoziationen mit der NK-Aktivität beobachtet wurden.

4.6 Erwachsene

Die zusätzlichen Untersuchungen bei Erwachsenen wurden durchgeführt, da hier die Möglichkeit bestand, die NK-Zellzahlen und NK-Aktivität zweier sehr hoch mit TCDD belasteter Personen zu untersuchen. Im Folgenden werden die Ergebnisse zusammengefasst, welche bereits in Tabelle 3-10 präsentiert wurden, und mit den Werten einer Erwachsenengruppe von 10 gesunden nicht hochbelasteten Personen verglichen. Person 1 war bei zwei Messungen mit 89.800 bzw. 65.000 pg TCDD/g Fett belastet und hatte deutlich erhöhte Leukozytenzahlen (19,7 bzw. 16,9/nl), deutlich erhöhte absolute Lymphozytenzahlen (6,6 bzw. 5,1/nl), normale relative Lymphozytenwerte (33,5 bzw. 29,9 %), normale absolute NK-Zellzahlen (0,32 bzw. 0,30/nl) und grenzwertig niedrige relative NK-Zellzahlen (4,9 bzw. 5,9 %). Person 2 war mit 19.700 bzw. 17.200 pg TCDD/g Fett belastet und wies grenzwertig erhöhte Leukozytenzahlen (10,6 bzw. 7,5/nl), grenzwertig erhöhte absolute Lymphozytenzahlen (3,2 bzw. 2,8/nl), normale relative Lymphozytenwerte (30,2 bzw. 37,8 %) sowie normale absolute (0,23 bzw. 0,17/nl) und relative (7,1 bzw. 6,1 %) NK-Zellzahlen auf. Eine statistische Analyse entfiel wegen der geringen Fallzahl.

Die laboreigenen Referenzwerte für $CD3^{-}CD16/56^{+}$-Zellen bei Erwachsenen (n = 80) betragen 0,22 ± 0,11/nl (0,08–0,44; 5.–95. Perzentil) und 12,4 ± 6 % (4,9–22,4; 5.–95. Perzentil) der Lymphozyten (PD Dr. med. A. Lun, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité, persönliche Mitteilung). Für $CD3^{-}CD16/CD56^{+}$-Zellen wurde von Reichert et al. bei Erwachsenen (n = 271) ein Mittelwert von 14,2 ± 6,1 % (Median 13,0 %, 5,8–29,3 %, 5.–95. Perzentil) mitgeteilt [Reichert et al. 1991]. Die folgenden Referenzwerte sind nicht vorbehaltlos auf die untersuchten Probanden zu übertragen, da nicht die gleichen Lymphozyten-Subpopulationen als NK-Zellen definiert waren. Hulstaert et al. gaben für $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$-Zellen bei Erwachsenen (n = 85) Median-Werte von 0,17 /nl (0,13–0,25; 25.–75. Perzentil) und 11 % (8–15) an [Hulstaert et al. 1994]. Friberg et al. gaben mittlere Werte von 0,28 ± 0,25 /nl und 13 ± 6 % für $CD3^{-}CD56^{+}$-Zellen bei Erwachsenen an (n = 107) [Friberg et al. 1996].

Zusammenfassend bedeutete dies, dass die relativen NK-Zell-Werte der Person 1 im unteren Normbereich lagen, während die anderen zellulären Werte der Personen 1 und 2 und die der zum Vergleich untersuchten Erwachsenengruppe im Normbereich lagen. Ob die relativ niedrigen Zellwerte von Person 1 im Zusammenhang mit der TCDD-

Exposition stehen, ist im Rahmen dieser Einzelbeobachtungen nicht zu klären, ein Einfluss kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Bei den weiter oben erwähnten elf Studien konnte nur in einem Fall ein signifikanter negativer Einfluss von POPs auf NK-Zellzahlen beobachtet werden (siehe 1.4). Ferner muss hier die Korikosteroid-Therapie der Person 1 beachtet werden, denn Steroid-Effekte auf das Blutbild im Sinne einer Neutrophilie und relativen Lymphopenie sind bekannt. Zwei Arbeitsgruppen berichten von supprimierten NK-Zellzahlen bei Steroid-Therapie [Alamartine 1994] [Pountain 1993].

Wie bereits ebenfalls in Tabelle 3-10 präsentiert, wies Person 1 eine deutlich verminderte NK-Aktivität (PSL 50/1 3,9 bzw. 6,4 %) im Vergleich zu der Erwachsenengruppe auf. Bei Person 2 lag die NK-Aktivität im Bereich der Werte der Erwachsenengruppe (PSL 50/1 18,7 bzw. 13,2 %). Der oben erwähnte Bias des Untersuchungszeitpunktes auf die Lyseraten der Kinder besaß im Untersuchungszeitraum der Erwachsenen keinen statistisch signifikanten Einfluss. Die NK-Aktivität der extrem hoch TCDD-belasteten Person 1 war zwar vermindert, dies kann aber wegen der zum Untersuchungszeitpunkt durchgeführten Kortikosteroid-Therapie nicht als alleiniger TCDD-Effekt angesehen werden. Eine inhibierende Wirkung von Kortikosteroiden auf die NK-Aktivität mit einer Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in-vitro beschrieben [Gatti et al. 1987] [Nair/Schwartz 1984] [Pedersen/Beyer 1986]. Auf den möglichen Zusammenhang zwischen NK-Zellzahlen und NK-Aktivität wurde bereits weiter oben eingegangen (siehe 4.4). Ob die leicht verminderten NK-Zellzahlen der Person 1 kausal mit der niedrigen NK-Aktivität zu tun haben, ist letztlich nicht eindeutig geklärt.

Einflüsse von POPs auf die NK-Aktivität bei Erwachsenen wurden in zwei Veröffentlichungen untersucht, welche bereits weiter oben zitiert wurden. Dabei konnten Lovik et al. keinen Zusammenhang zwischen Gesamt-NK-Aktivität und POP-Belastung beobachten [Lovik et al. 1996], während Kitamura et al. eine signifikante positive Korrelation der POP-Belastung mit der Gesamt-NK-Aktivität beschrieben (siehe 1.4). Die hier beobachtete TCDD-Belastung bewegte sich in einem Bereich, der deutlich über der Letaldosis für Meerschweinchen, dem TCDD-empfindlichsten Tier (siehe auch 1.1.2), lag (Person 1 ca. 25 µg/kg KG; Person 2 ca. 6 µg/kg KG) [Abraham 2002]. Trotz dieser extrem hohen TCDD-Belastung ließen sich im Rahmen dieser Einzelbeobachtungen keine eindeutigen Effekte auf NK-Zellen nachweisen. Die relativ niedrigen NK-Aktivitäten waren möglicherweise durch andere Faktoren, wie z. B. die

Steroid-Applikation, bedingt. Leider lagen hier keine präexpositionellen Ausgangswerte vor, welche die Bewertung der Messergebnisse erleichtert hätten. Ein ursächlicher Effekt kann hier allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die weitergehenden Untersuchungen der belasteten Probanden durch Abraham erbrachten keine eindeutigen Effekte auf das Immunsystem. Die bisherige Nachbeobachtung ergab auch keinen Anhalt für eine Beeinträchtigung des Immunsystems [Abraham 2001]. Zusammenfassend kann man aufgrund der umfassenden Untersuchungsergebnisse der beiden hoch belasteten Probanden folgern, dass das Immunsystem des Menschen nicht als besonders TCDD-empfindlich gelten kann.

4.7 Schlussfolgerung

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob es durch Belastung mit persistenten organischen Schadstoffen über die Muttermilch zu messbaren Veränderungen der Zellzahlen sowie der zytotoxischen Aktivität der natürlichen Killerzellen bei (höherbelasteten) gestillten im Vergleich zu (niedrigerbelasteten) nicht gestillten Kindern kommt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen keine statistisch signifikanten Effekte von persistenten organischen Schadstoffen in der Muttermilch auf NK-Zellen und deren Aktivität bei gestillten Kindern erkennen. Auch bei anderen untersuchten Parametern der oben genannten Dioxin-Studie ließen sich keine signifikanten Einflüsse von POPs auf das Immunsystem nachweisen. In verschiedenen weiter oben zitierten Veröffentlichungen konnten keine konsistenten kausalen Wirkungen auf Zellzahl und Aktivität der natürlichen Killerzellen berichtet werden. Daher kann die bestehende Stillempfehlung der Nationalen Stillkommission bekräftigt werden. Diese Empfehlung besagt, dass für vier bis sechs Monate voll gestillt und anschließend aus ernährungsphysiologischen Gründen mit der Einführung von Beikost begonnen werden sollte. Auch danach könne trotz gewisser Rückstände in der Frauenmilch ohne gesundheitliches Risiko für den Säugling weiter gestillt werden [Nationale Stillkommission 1996]. Obwohl die von der WHO veröffentlichte zulässige tägliche Aufnahmemenge (TDI) an Dioxinen von gestillten Säuglingen überschritten wird, empfiehlt auch diese das Stillen, da der TDI-Wert für eine lebenslange Aufnahme gilt. Trotz der Unterstützung dieser Empfehlung, die auch auf einer Risikobewertung nach Informationen über den Rückgang der POP-Belastung über die Nahrungsmittelkette in

den letzten Jahren beruht, sollte weiter aktiv daran gearbeitet werden, den Eintrag dieser Substanzen in die Umwelt zu reduzieren und damit die Schadstoff-Körperlast zu vermindern. Denn im günstigsten Falle sind die persistenten organischen Schadstoffe nur ohne Nutzen im menschlichen Organismus, während einige Veröffentlichungen über entwicklungsneurologische Defizite nach pränataler PCB-Exposition berichten. Mögliche Langzeiteffekte dieser Verbindungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Diese sollten aber für eine abschließende Risikobewertung in Betracht gezogen werden und könnten Untersuchungsziel von weiteren Studien sein.

Die Messwerte der NK-Aktivität wiesen in der vorliegenden Arbeit eine fehlende zeitliche Beständigkeit auf. Dieser Bias war möglicherweise auf die eingesetzten Targetzellen zurückzuführen. Da man im Vergleich zu Funktionstests der B- und T-Lymphozyten bei Zytotoxizitäts-Assays der NK-Zellen auf Targetzellen angewiesen ist, die natürlicherweise keine neutralen Eigenschaften besitzen, sind diese als möglicher Störparameter immer Bestandteil eines Zytotoxizitäts-Assays.

Die bei zusätzlichen Untersuchungen an zwei hochbelasteten Erwachsenen beobachteten leichten Veränderungen der NK-Zellzahlen und NK-Aktivität konnten kausal nicht eindeutig der TCDD-Exposition zugeordnet werden. Zusammen mit anderen weitergehenden Untersuchungen, wiesen diese Ergebnisse nicht auf eine starke Empfindlichkeit des menschlichen Immunsystems, selbst bei extrem hohen TCDD-Belastungen, hin.

Zusammenfassung

Alle Menschen sind heutzutage aufgrund des ubiquitären Vorkommens von persistenten organischen Schadstoffen (POPs) in der Umwelt mit diesen Verbindungen belastet. Aufgrund ihrer besonderen chemisch-physikalischen Eigenschaften akkumulieren POPs in der Nahrungskette und letztendlich im menschlichen Fettgewebe. Über die Muttermilch sind gestillte Kinder besonders stark exponiert und nehmen dabei im Vergleich zu Erwachsenen wesentlich höhere POP-Mengen pro Kilogramm Körpergewicht auf. Bisher sind mögliche Effekte dieser Verbindungen auf den kindlichen Organismus kaum untersucht. Aus tierexperimentellen Studien gibt es Hinweise auf eine besondere Empfindlichkeit des sich entwickelnden Immunsystems für POPs. Zur Klärung der Frage, ob Effekte von POP-Konzentrationen im Hintergrundbereich auf Parameter des Immunsystems nachweisbar sind, wurden für die vorliegende Dissertationsschrift potenzielle Einflüsse dieser Verbindungen auf natürliche Killerzellen und deren Aktivität bei gestillten im Vergleich zu nicht gestillten Kindern untersucht.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind zytotoxische Lymphozyten und spielen als Effektorzellen der natürlichen Immunität eine wichtige Rolle im Abwehrsystem des Menschen, da sie noch vor den spezifischen humoralen und zellulären Immunmechanismen aktiv werden. Sie können ohne vorherige Sensibilisierung und Thymus-unabhängig virusinfizierte und maligne Zellen töten. Die klinische Bedeutung dieser Zellen wird bei Patienten ersichtlich, die einen Mangel an Anzahl oder Funktion der NK-Zellen aufweisen: diese können z. B. an schweren viralen Infektionen oder B-Zell-Malignitäten erkranken.

Entsprechend des Studienkonzeptes sollten mindestens 4 Monate lang voll gestillte Kindern sowie ungestillte Kinder im Alter von 11 Monaten untersucht werden. In einem Zeitraum von über eineinhalb Jahren wurden insgesamt 66 gesunde Kinder untersucht, welche die strengen Auswahlkriterien erfüllten. Davon waren 16 Kinder nicht gestillt (d. h. weniger als 2 Wochen gestillt). Aus einer Region mit bekannter erhöhter PCDD/PCDF-Belastung stammten 13 gestillte Kinder.

Das Untersuchungsmaterial wurde aus peripher-venösem Blut gewonnen und mit Standardmethoden weiterverarbeitet. Die Zellzahlen der NK-Zellen wurden mittels Immunphänotypisierung am Durchflusszytometer bestimmt.

Die Aktivität der NK-Zellen wurde mit einem durchflusszytometrischen Zytotoxizitäts-Assay in Anlehnung an vorbeschriebene Methoden gemessen. Dieser wurde alternativ zu dem klassischen Chrom-Release-Assay, der u. a. durch Verwendung von Radioaktivität Nachteile besitzt, eingesetzt. Dazu wurden aus dem Untersuchungsmaterial mononukleäre Zellen isoliert und mit so genannten Targetzellen inkubiert. Diese Targetzellen sind ausschließlich für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen sensitiv, nicht für die der zytotoxischen T-Lymphozyten. Anschließend konnte durch den Einsatz von fluoreszierenden Membran- und DNA-Farbstoffen der Anteil der lysierten Targetzellen durchflusszytometrisch bestimmt werden, was als Maß für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gilt. Aufgrund des Einsatzes von Targetzellen muss bei der eingesetzten Methode mit einer gewissen Störanfälligkeit gerechnet werden. Die POP-Konzentrationen (sechs POPs bzw. POP-Verbindungsgruppen: PCDDs, PCDFs, PCBs, ß-HCH, HCB und pp-DDE) im Blutfett der Probanden wurden kommerziell bestimmt. Erwartungsgemäß wiesen dabei gestillte Kinder deutlich höhere POP-Werte als nicht gestillte Kinder auf; bei den Probanden aus der Region mit erhöhter Belastung wurden die höchsten PCDD/PCDF-Konzentrationen gemessen.

Die 66 Probanden besaßen im Mittel relative NK-Zellzahlen ($CD3^{-}CD56/16^{+}$) von $6{,}4 \pm 2{,}8$ % der Lymphozyten und absolut $0{,}35 \pm 0{,}19$ NK-Zellen/nl. Die NK-Aktivität betrug bei den drei eingesetzten Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnissen im Mittel $12{,}5 \pm 9{,}5$ % (50:1), $7{,}5 \pm 5{,}5$ % (25:1) sowie $4{,}2 \pm 3{,}4$ % (12,5:1). Zwischen den gestillten und nicht-gestillten Kindern konnten weder bei den zellulären Werten, noch bei den NK-Aktivitäts-Parametern signifikante Unterschiede im t-Test nachgewiesen werden. Mögliche Einflüsse der POPs auf NK-Zellzahl und NK-Aktivität wurden durch bivariate Korrelationsanalysen geprüft. Bei zwei Subpopulationen der NK-Zellzahlen fanden sich teilweise signifikante Assoziationen ($p < 0{,}05$ bis $< 0{,}01$) mit den untersuchten POPs, die bei der Gesamtpopulation nicht nachweisbar waren. Es fanden sich keine signifikanten Assoziationen der NK-Aktivität mit den POPs. Die multivariate Analyse zeigte signifikante Assoziationen zwischen einzelnen NK-Subpopulationen und den POP-Konzentrationen, welche zum Teil inkonsistent zu den Ergebnissen der Korrelationsanalyse waren. Zusammenfassend ließen sich keine Effekte von POP-Konzentrationen im Hintergrundbereich auf NK-Zellzahlen und NK-Aktivität bei gestillten Kindern nachweisen.

Die bestehende Stillempfehlung kann aufgrund dieser Ergebnisse und der nachgewiesenen positiven Effekte des Stillens unterstützt werden. Trotzdem sind weitere Bemühungen zur Reduktion der Umweltbelastung mit POPs wünschenswert.

Zusätzlich konnten zwei Erwachsene untersucht werden, welche akzidentell sehr hoch mit TCDD belastet waren. Dabei wurden verminderte NK-Aktivitäten und bei der am höchsten belasteten Person grenzwertig niedrige relative NK-Zellzahlen beobachtet. Ein primärer TCDD-Effekt auf die NK-Zellen war hier nicht auszuschließen, wobei bei der am höchsten belasteten Person möglicherweise sekundäre Effekte durch eine schwere Erkrankung an Chlorakne und Steroidtherapie bedingt waren.

Abkürzungen

Ah	Arylhydrocarbon
β-HCH	β-Hexachlorcyclohexan
ß	standardisierter Koeffizient der linearen Regression
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
E:T-Ratio	Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnis
FACS	Fluorescence Activated Cell Scan
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenzdetektor-Kanal
FSC	Forward angle light Scatter, Vorwärtsstreulicht
HCB	Hexachlorbenzol
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I-TEq	Internationale Toxizitäts-Äquivalente
KG	Körpergewicht
Leuko.	Leukozyten
LD_{50}	Letaldosis einer Chemikalie, die 50 % der damit behandelten Tiere tötet
Lym.	Lymphozyten
mAb	monoklonaler Antikörper
Max	maximaler Wert
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	minimaler Wert
MW	Mittelwert
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
ng	Nanogramm, 10^{-9} Gramm

nl	Nanoliter, 10^{-9} Liter
NK	natürliche Killer (-Zellen)
ns	nicht signifikant
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBs	polychlorierte Biphenyle
PCDDs	polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine
PCDFs	polychlorierte Dibenzofurane
PE	Phycoerythin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm, 10^{-12} Gramm
PHAHs	polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
PI	Propidiumjodid
POP	Persistenter Organischer Schadstoff, Persistent Organic Pollutant
pp-DDE	pp'-Dichlordiphenyldichlorethylen
ppt	parts per trillion
PSL	Prozent der Spezifischen Lyse
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
r_s	Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SSC	Side angle light Scatter, Seitwärtsstreulicht
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin
TEF	Toxizitäts-Äquivalenz-Faktor
TEq	Toxizitäts-Äquivalent
T-PCP	technical grade Pentachlorophenol
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Literaturverzeichnis

Abraham K, Knoll A, Ende M, Päpke O, Helge H (1996). Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res*, 40 (5), 671-679.

Abraham K, Palavinskas R, Wahn U, Helge H, Mathar W (1998a). Still relatively high PCDD/PCDF concentrations in human milk of mothers living in a contaminated area in Germany. *Organohalogen Compounds*, 38, 33-36.

Abraham K, Päpke O, Gross A, Kordonouri O, Wiegand S, Wahn U, Helge H (1998b). Time course of PCDD/PCDF/PCB concentrations in breast-feeding mothers and their infants. *Chemosphere*, 37 (9-12), 1731-1741.

Abraham K (2000). Belastung von Säuglingen mit polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (PCDDs), Dibenzofuranen (PCDFs) und Biphenylen (PCBs) und deren Auswirkung auf sensible biologische Parameter. *Projektbericht*, Kinderklinik der Charité, Berlin.

Abraham K (2001). Veränderungen biologischer Parameter (Immunsystem, Cytochrom P450-System) bei 3 hoch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)-exponierten Personen aus Wien. *Projektbericht*, Kinderklinik der Charité, Berlin.

Abraham K (2002). Exposition gegenüber Dioxinen und verwandten Substanzen – ein Risiko für Säuglinge? *Habilitationsschrift*, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.

Alamartine E, Sabido O, Berthoux F (1994). In-vitro effects of cyclosporin A, FK506, 6-mercaptopurine, and prednisolone on lymphokine-activated killer cells. *Nephrol Dial Transplant*, 9 (10), 1456-1461.

Baccarelli A, Mocarelli P, Patterson DG Jr, Bonzini M, Pesatori AC, Caporaso N, Landi MT (2002). Immunologic effects of dioxin: New results from Seveso and comparison with other studies. *Environ Health Perspect*, 110 (12), 1169-1173.

Beck H, Dross A, Mathar W (1994). PCDD and PCDF exposure and levels in humans in Germany. *Environ Health Perspect*, 102 (Suppl 1), 173-185.

Berke G (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol*, 12, 735-773.

Bernard A, Broeckaert F, De Poorter G, De Cock A, Hermans C, Saegerman C, Houins G (2002). The Belgian PCB/dioxin incident: analysis of the food chain contamination and health risk evaluation. *Environ Res*, 88 (1), 1-18.

Bertazzi PA, Bernucci I, Brambilla G, Consonni D, Pesatori AC (1998). The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect*, 106 (Suppl 2), 625-633.

Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, Rubagotti M, Baccarelli A, Zocchetti C, Pesatori AC (2001). Health effects of dioxin exposure: A 20-year mortality study. *Am J Epidemiol*, 153 (11), 1031-1044.

Biron CA, Byron KS, Sullivan JL (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*, 320 (26), 1731-1735.

Biron CA (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17, 189-220.

Böyum A (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 97 (Suppl), 77-89.

Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B (1968). Quantitative assay of the cytolytic action of immune lymphoid cells on 51Cr-labelled allogenic target cells: inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, 14, 181-196.

Bryant J, Day R, Whiteside TL, Herberman RB (1992). Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 146 (1), 91-103.

Carver JD, Pimentel B, Cox WI, Barness LA (1991a). Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics*, 88 (2), 359-363.

Carver JD, Pimentel B, Wiener DA, Lowell NE, Barness LA (1991b). Infant feeding effects on flow cytometric analysis of blood. *J Clin Lab Anal*, 5 (1), 54-56.

Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL (1993). Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, 166 (1), 45-54.

Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K, Hooijkaas H, van Dongen JJM (1997). Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr*, 130 (3), 388-393.

Cornacoff JB, Lauer LD, House RV, Tucker AN, Thurmond LM, Vos JG, Working PK, Dean JH (1988). Evaluation of the immunotoxicity of ß-hexachlorocyclohexane (ß-HCH). *Fundam Appl Toxicol*, 11 (2), 293-299.

Curran JS, Barness LA (2000a). Breast-feeding. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg.): *Nelson textbook of pediatrics* (S. 150-154), 16. Auflage; Philadelphia, London, Toronto; W. B. Saunders.

Curran JS, Barness LA (2000b). Nutritional requirements. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (Hrsg.): *Nelson textbook of pediatrics* (S. 138-147), 16. Auflage; Philadelphia, London, Toronto; W. B. Saunders.

DeVito MJ, Birnbaum LS (1994). Toxicology of dioxins and related chemicals. In Schecter A (Hrsg.): *Dioxins and health* (S. 139-162), New York; Plenum Press.

De Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, de Groot R, Hop WCJ, Boerma GJM, Lotgering FK, van Dongen JJM (2000). Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res*, 47 (4 Pt 1), 528-537.

De Vries E, de Groot R, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, van Dongen JJM (1999). Analysing the developing lymphocyte system of neonates and infants. *Eur J Pediatr*, 158, 611-617.

Donnerstag B, Oltrogge JB, Henzel K, Rüenauver A, Baum RP (1993). Functional analysis of peripheral blood lymphocytes from healthy volunteers. *J Clin Lab Immunol*, 40 (2), 91-95.

Ernst M, Flesch-Janys D, Morgenstern I, Manz A (1998). Immune cell functions in industrial workers after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Dissociation of antigen-specific T-cell responses in cultures of diluted whole blood and of isolated peripheral blood mononuclear cells. *Environ Health Perspect*, 106 (Suppl 2), 701-705.

Fleisher G, Starr S, Koven N, Kamiya H, Douglas SD, Henle W (1982). A non-X-linked syndrome with susceptibility to severe Epstein-Barr virus infections. *J Pediatr*, 100 (5), 727-730.

Flesch-Janys D, Becher H, Gurn P, Jung D, Konietzko J, Manz A, Päpke O (1996). Elimination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health*, 47 (4), 363-378.

Flieger D, Gruber R, Schlimok G, Reiter C, Pantel K, Riethmüller G (1995). A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods*, 180, 1-13.

Friberg DD, Bryant JL, Whiteside TL (1996). Measurements of natural killer (NK) activity and NK-cell quantification. *Methods*, 9, 316-326.

Funseth E, Ilbäck N (1992). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on blood and spleen natural killer (NK) cell activity in the mouse. *Toxicol Lett*, 60 (3), 247-256.

Geusau A, Abraham K, Geissler K, Sator MO, Stingl G, Tschachler E (2001). Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect*, 109 (8), 865-869.

Gatti G, Cavallo R, Sartori M, del Ponte D, Masera R, Salvadori A, Carignola R, Angeli A (1987). Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity. *J Steroid Biochem*, 26 (1), 49-58.

Godoy-Ramirez K, Franck K, Gaines H (2000). A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry. *J Immunol Methods*, 239 (1-2), 35-44.

Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C (1999). A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *J Immunol Methods*, 224 (1-2), 1-9.

Hatam L, Schuval S, Bonagura VR (1994). Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry*, 16, 59-68.

Hawkes JS, Neumann MA, Gibson RA (1999). The effect of breast feeding on lymphocyte subpopulations in healthy term infants at 6 months of age. *Pediatr Res*, 45 (5), 648-651.

Herberman RB, Holden HT (1978). Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res*, 27, 305-377.

Herberman RB, Ortaldo JR (1981). Natural killer cells: Their role in defense against disease. *Science*, 214, 24-30.

Holsapple MP, Snyder NK, Wood SC, Morris DL (1991). A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. *Toxicology*, 69, 219-255.

Hong R, Taylor K, Abounor R (1989). Immune abnormalities associated with chronic TCDD exposure in rhesus monkeys. *Chemosphere*, 18 (1-6), 313-320.

Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE (1990). Fluorescent cell labeling for in-vivo and in-vitro cell tracking. In Darzynkiewicz Z, Crissman HA (Hrsg.): *Flow Cytometry* (Bd. 33, S. 469-490), San Diego; Academic Press.

Horikoshi T (1985). Significant differences in natural killer cell activity in children according to age and sex. *Kurume Med J*, 32 (1), 63-69.

Hoshino T, Hara A, Inoue M, Honda J, Imai Y, Oizumi K, Yokoyama MM (1991). Flow cytometric measurement of NK cell cytotoxicity. *J Clin Lab Immunol*, 36 (1), 39-43.

House RV, Lauer LD, Murray MJ, Thomas PT, Ehrlich JP, Burleson GR, Dean JH (1990). Examination of immune parameters and host resistance mechanisms in B6C3F1 mice following adult exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Toxicol Environ Health*, 31 (3), 203-215.

Hulstaert F, Hannet I, Deneyes V, Munhyeshuli V, Reichert T, DeBruyère M, Strauss K (1994). Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements. *Clin Immunol Immunopathol*, 70 (2), 152-158.

Jennings AM, Wild G, Ward JD, Ward AM (1988). Immunological abnormalities 17 years after accidental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Br J Ind Med*, 45 (10), 701-704.

Johann S, Blümel G, Lipp M, Förster R (1995). A versatile flow cytometry-based assay for the determination of short- and long-term natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, 185, 209-216.

Jung D, Berg PA, Edler L, Ehrenthal W, Fenner D, Flesch-Janys D, Huber C, Klein R, Koitka C, Lucier G, Manz A, Muttray A, Needham L, Päpke O, Pietsch M, Portier C, Patterson D, Prellwitz W, Rose DM, Thews A, Konietzko J (1998). Immunologic findings in workers formerly exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and its congeners. *Environ Health Perspect*, 106 (Suppl 2), 689-695.

Kane KL, Ashton FA, Schmitz JL, Folds JD (1996). Determination of natural killer cell function by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3 (3), 295-300.

Kerkvliet NI, Brauner JA, Baecher-Steppan L (1985). Effects of dietary technical pentachlorophenol exposure on T cell, macrophage and natural killer cell activity in C57Bl/6 mice. *Int J Immunopharmacol*, 7 (2), 239-247.

Kerkvliet NI (1994). Immuntoxicology of dioxins and related chemicals. In Schecter A (Hrsg.): *Dioxins and health* (S. 199-225), New York; Plenum Press.

Kerkvliet NI (1995). Immunological effects of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ Health Perspect*, 103 (Suppl 9), 47-53.

Kitamura K, Kikuchi Y, Watanabe S, Waechter G, Sakurai H, Takada T (2000). Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers. *J Epidemiol*, 10 (4), 262-270.

Koletzko B, Schroten H (1999). Ernährung und Immunfunktion. In Wahn U, Seger R, Wahn V (Hrsg.): *Pädiatrische Allergologie und Immunologie in Klinik und Praxis* (S. 148-156), 3. Auflage; München, Jena; Urban & Fischer.

Komiyama A, Kawai H, Yabuhara A, Yanagisawa M, Miyagawa Y, Ota M, Hasekura H, Akabane T (1990). Natural killer cell immunodeficiency in siblings: defective killing in the absence of natural killer cytotoxic factor activity in natural killer and lymphokine-activated killer cytotoxicities. *Pediatrics*, 85 (3), 323-330.

Kroesen B, Mesander G, ter Haar JG, The TH, de Leij L (1992). Direct visualisation and quantification of cellular cytotoxicity using two colour fluorescence. *J Immunol Methods*, 156, 47-54.

Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF (1983). Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*, 131 (4), 1789-1796.

Lanier LL, My Le A, Civin CI, Loken MR, Phillips JH (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136 (12), 4480-4486.

Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*, 169, 2233-2238.

Lanier LL (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16, 359-393.

Lanier LL (2000). The origin and function of natural killer cells. *Clin Immunol*, 95 (1), S14-S18.

Lanier LL (2001). On guard - activating NK cell receptors. *Nat Immunol*, 2 (1), 23-27.

Lee B (1996). Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy asian subjetcs: from birth to adulthood. *Cytometry*, 26 (1), 8-15.

Ljunggren HG, Kärre K (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11 (7), 237-244.

Lötzerich H, Hirt W (1997). Durchflußzytometrische nichtradioaktive Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von natürlichen Killerzellen: Vergleich mit dem klassischen 51Cr-Release-Assay. *J Lab Med*, 21 (1), 13-20.

Lovik M, Johansen HR, Gaarder PI, Becher G, Aaberge IS, Gdynia W, Alexander J (1996). Halogenated organic compounds and the human immune system: preliminary report on a study in hobby fishermen. *Arch Toxicol*, 18 (Suppl), 15-20.

Lowin B, Peitsch MC, Tschopp J (1995). Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 198, 1-24.

Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS (1981). A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 166 (4), 546-550.

Lozzio CB, Lozzio BB (1973). Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst*, 50, 535-538.

Lü YC, Wu YC (1985). Clinical findings and immunological abnormalities in Yu-Cheng patients. *Environ Health Perspect*, 59, 17-29.

Mantovani A, Vecchi A, Luini W, Sironi M, Candiani GP, Spreafico F, Garattini S (1980). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on macrophage and natural killer cell-mediated cytotoxicity in mice. *Biomedicine*, 32 (4), 200-204.

Masuda Y (1985). Health status of Japanese and Taiwanese after exposure to contaminated rice oil. *Environ Health Perspect*, 60, 321-325.

McGinnes K, Chapman G, Marks R, Penny R (1986). A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 86 (1), 7-15.

Michalek JE, Ketchum NS, Check IJ (1999). Serum dioxin and immunologic response in veterans of Operation Ranch Hand. *Am J Epidemiol*, 149 (11), 1038-1046.

Miller JS (2001). The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp Hematol*, 29, 1157-1168.

Mocarelli P, Needham LL, Marocchi A, Patterson D, Brambilla P, Gerthoux PM, Meazza L, Carreri V (1991). Serum concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and test results from selected residents of Seveso, Italy. *J Toxicol Environ Health*, 32 (4), 357-366.

Möller MJ, Kammerer R, von Kleist S (1998). A distinct distribution of natural killer cell subgroups in human tissues and blood. *Int J Cancer*, 78, 533-538.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annu Rev Immunol*, 19, 197-223.

Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A (2000). Human NK-cell receptors. *Immunol Today*, 21 (9), 420-422.

Murphy W, Longo D (1996). NK cells in the regulation of hematopoiesis. *Methods*, 9 (2), 344-351.

NATO/CCMS (1988). Scientific Basis for the development of international Toxicity Equivalency Factor Method of Risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. *NATO Pilot Study on International Infomation Exchange on Dioxins and related Compounds,* Report Nr. 178; NATO/CCMS.

Nair MP, Schwartz SA (1984). Immunomodulatory effects of corticosteroids on natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxic activities of human lymphocytes. *J Immunol*, *132* (6), 2876-2882.

Nationale Stillkommission (1996). Rückstände in Frauenmilch, Beschluß der Nationalen Stillkommission vom 20.11.1995. *Bundesgesundhbl*, *2*, 87.

Nationale Stillkommission (2002). Stillempfehlungen für die Säuglingszeit. Nationale Stillkommission. *Online im Internet*: URL: http://www.bfr.bund.de/cms/media.php-/113/still_empfehl2_umarb_aug_02.pdf (Stand 2003-06-18).

Neubert R, Jacob-Müller U, Stahlmann R, Helge H, Neubert D (1990). Polyhalogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 1. Effects on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (*Callithrix jacchus*) after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Arch Toxicol*, 64, 345-359.

Neubert R, Maskow L, Webb J, Jacob-Müller U, Nogueira AC, Delgado I, Helge H, Neubert D (1993). Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. *Life Sci*, 53 (26), 1995-2006.

Noble RL, Warren RP (1985). Age-related development of human natural killer cell activity. *N Engl J Med*, 313 (10), 641-642.

O'Shea J, Ortaldo JR (1992). The biology of natural killer cells: Insights into the molecular basis of function. In Lewis CE, McGee JO (Hrsg.): *The natural immune system: The natural killer cell* (S. 2-40), Oxford; Oxford University Press.

Oldham RK (1982). Natural killer cells: history and significance. *J Biol Resp Mod*, 1, 217-231.

Omara FO, Flipo D, Brochu C, Denizeau F, Brousseau P, Potworowski EF, Fournier M (1998). Lack of suppressive effects of mixtures containing low levels of methylmercury (MeHg), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDS), polychlorinated dibenzofurans (PCDFS), and aroclor biphenyls (PCBS) on mixed lymphocyte reaction, phagocytic, and natural killer cell activities of rat leukocytes in vitro. *J Toxicol Environ Health*, 54 (7), 561-577.

Ott MG, Zober A, Germann C (1994). Laboratory results for selected target organs in 138 individuals occupationally exposed to TCDD. *Chemosphere*, 29 (9-11), 2423-2437.

Päpke O (1997). Determination of PCDD/Fs in human blood - a fast and sensitive method. *Organohalogen Compounds*, 31, 212-214.

Päpke O (1998). PCDD/PCDF: Human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ Health Perspect*, 106 (Suppl 2), 723-731.

Papa S, Vitale M, Mariani AR, Roda P, Facchini A, Manzoli FA (1988). Natural killer function in flow cytometry. I. Evaluation of NK lytic activity on K562 cell line. *J Immunol Methods*, 107 (1), 73-78.

Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M (1994). An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 177 (1-2), 101-111.

Patandin S, Dagnelie PC, Mulder PG, Op de Coul E, van der Veen JE, Weisglas-Kuperus N, Sauer PJ (1999). Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and long-term exposure. *Environ Health Perspect*, 107 (1), 45-51.

Pedersen BK, Beyer JM (1986). Characterization of the in vitro effects of glucocorticosteroids on NK cell activity. *Allergy*, 41 (3), 220-224.

Phillips DL, Pirkle JL, Burse VW, Bernert JT, Henderson LO, Needham LL (1989). Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch Environ Contam Toxicol*, 18 (4), 495-500.

Piriou L, Chilmonczyk S, Genetet N, Albina E (2000). Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry*, 41 (4), 289-297.

Poellinger L (2000). Mechanistic aspects - the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Food Add Contam*, 17 (4), 261-266.

Poland A, Glover E, Kende A (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is the receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*, 251, 4936-4946.

Pollock RE, Zimmerman SO, Fuchshuber P, Lotzova E (1990). Lytic units reconsidered: Pitfalls in calculation and usage. *J Clin Lab Anal*, 4 (4), 274-282.

Pountain GD, Keogan MT, Hazleman BL, Brown DL (1993). Effects of single dose compared with three days' prednisolone treatment of healthy volunteers: Contrasting effects on circulating lymphocyte subsets. *J Clin Pathol*, 46 (12), 1089-1092.

Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS (1981). Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol*, 1 (1), 51-63.

Pross HF, Baines MG (1982). Studies of human natural killer cells. I. In vivo parameters affecting normal cytotoxic function. *Int J Cancer*, 29, 383-390.

Racz T, Sacks P, Van NT, Taylor DL, Young G, Bugis S, Savage HE, Schantz SP (1990). The analysis of natural killer cell activity by flow cytometry. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 116 (4), 440-446.

Radosevic K, Garritsen HSP, Van Graft M, De Grooth BG, Greve J (1990). A simple and sensitive flow cytometric assay for the determination of the cytotoxic activity of human natural killer cells. *J Immunol Methods*, 135, 81-89.

Raffael A, Nebe CT, Valet G (1994). Grundlagen der Durchflußzytometrie. In Schmitz G, Rothe G (Hrsg.): *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik* (S. 3-49), Stuttgart; Schattauer.

Reichert T, DeBruyère M, Deneys V, Tötterman T, Lydyard P, Yuksel F, Chapel H, Jewell D, Van Hove L, Linden J, Buchner L (1991). Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. *Clin Immunol Immunopathol*, 60, 190-208.

Robertson MJ, Ritz J (1990). Biological and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76 (12), 2421-2438.

Rogan WJ, Gladen BC, Hung KL, Koong SL, Shih LY, Taylor JS, Wu YC, Yang D, Ragan NB, Hsu CC (1988). Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*, 241 (4863), 334-336.

Rosenberg E, Herberman R, Levine P, Halterman R, McCoy J, Wunderlich J (1972). Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int J Cancer*, 9 (3), 648-658.

Ross PS, de Swart RL, van der Vliet H, Willemsen L, de Klerk A, van Amerongen G, Groen J, Brouwer A, Schipholt I, Morse DC, van Loveren H, Osterhaus AD, Vos JG (1997). Impaired cellular immune response in rats exposed perinatally to Baltic Sea herring oil or 2,3,7,8-TCDD. *Arch Toxicol*, 71 (9), 563-574.

Santoli D, Trinchieri G, Zmijewski CM, Koprowski H (1976). HLA-related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans. *J Immunol*, 117 (3), 765-770.

Shi T, Tong MJ, Bohman R (1987). The application of flow cytometry in the study of natural killer cell cytotoxicity. *Clin Immunol Immunopathol*, 45, 356-365.

Slezak SE, Horan PK (1989). Cell-mediated cytotoxicity: A highly sensitive and informative flow cytometric assay. *J Immunol Methods*, 117 (2), 205-214.

Smialowicz RJ, Andrews JE, Riddle MM, Rogers RR, Leubke RW, Copeland CB (1989). Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat. *Toxicology*, 56 (2), 197-211.

Svensson BG, Hallberg T, Nilsson A, Schutz A, Hagmar L (1994). Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health*, 65 (6), 351-358.

Sweeney M, Mocarelli P (2000). Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Addit Contam*, 17 (4), 303-316.

Talcott PA, Koller LD, Exon JH (1985). The effect of lead and polychlorinated biphenyl exposure on rat natural killer cell cytotoxicity. *Int J Immunopharmacol*, 7 (2), 255-261.

Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, Hoover RN (1989). The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *J Clin Immunol*, 9 (3), 214-222.

Trinchieri G (1989). Biology of natural killer cells. In Dixon FJ (Hrsg.): *Advances in Immunology* (Bd. 47, S. 187-376), San Diego; Academic Press.

Tryphonas H, Luster MI, White KL, Naylor PH, Erdos MR, Burleson GR, Germolec D, Hodgen M, Hayward S, Arnold DL (1991). Effects of PCB (Aroclor 1254) on non-specific immune parameters in rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. *Int J Immunopharmacol*, 13 (6), 639-648.

UNECE (1998). Protocol to the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants. United Nations Economic Commission for Europe. *Online im Internet*: URL: http://www.unece.org/env/lrtap/protocol/98pop.htm (Stand 2003-06-18).

UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. United Nations Environment Programme. *Online im Internet*: URL: http://www.pops.int/documents-/convtext/convtext_en.pdf (Stand 2003-06-18).

Umweltbundesamt (2000). Dioxine in der Umwelt. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. *Online im Internet*: URL: http:-//www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten/daten/dioxine.htm (Stand 2003-06-18).

Umweltbundesamt (2002). Dioxin-Referenzmessprogramm. In Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Hrsg.): *4. Bericht der Bund/Länder-Arbeitsgruppe DIOXINE* (S. 98-99).

Van den Berg M, De Jongh J, Poiger H, Olson JR (1994). The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 24 (1), 1-74.

Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FX, Liem AK, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L. Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F, Zacharewski T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect*, 106 (12), 775-792.

Van Den Heuvel RL, Koppen G, Staessen JA, Hond ED, Verheyen G, Nawrot TS, Roels HA, Vlietinck R, Schoeters GE (2002). Immunologic biomarkers in relation to exposure markers of PCBs and dioxins in Flemish adolescents (Belgium). *Environ Health Perspect*, 110 (6), 595-600.

Van Loveren H, Krajnc EI, Rombout PJA, Blommaert FA, Vos JG (1990). Effects of ozone, hexachlorobenzene, and bis(tri-n-butyltin)oxide on natural killer activity in the rat lung. *Tox Appl Pharm*, 102 (1), 21-33.

Vitale M, Neri LM, Comani S, Falcieri E, Rizzoli R, Rana R, Papa S (1989). Natural killer function in flow cytometry. II. Evaluation of NK lytic activity by means of target cell morphological changes detected by right angle light scatter. *J Immunol Methods*, 121 (1), 115-120.

Vorderstrasse BA, Steppan LB, Silverstone AE, Kerkvliet NI (2001). Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice generate normal immune responses to model antigens and are resistant to TCDD-induced immune suppression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 171 (3), 157-164.

Vujanovic NL, Nagashima S, Herberman RB, Whiteside TL (1996). Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol*, 157 (3), 1117-1126.

WHO (2000). Consultation on Assessment of the Health Risk of Dioxins; Re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI): Executive Summary. *Food Addit Contam*, 17 (4), 223-240.

Wade MG, Foster WG, Younglai EV, McMahon A, Leingartner K, Yagminas A, Blakey D, Fournier M, Desaulniers D, Hughes CL (2002). Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci*, 67 (1), 131-143.

Wahn U (1999). Natürliche Killerzellen. In Wahn U, Seger R, Wahn V (Hrsg.): *Pädiatrische Allergologie und Immunologie in Klinik und Praxis* (S. 56-58), 3. Auflage; München, Jena; Urban & Fischer.

Watanabe S, Kitamura K, Nagahashi M (1999). Effects of dioxins on human health: A review. *J Epidemiol*, 9 (1), 1-13.

Weisglas-Kuperus N, Sas TCJ, Koopman-Esseboom C, van der Zwan CW, De Ridder MAJ, Beishuizen A, Hooijkaas H, Sauer PJJ (1995). Immunologic effects of background prenatal and postnatal exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls in dutch infants. *Pediatr Res*, 38 (3), 404-410.

West HW, Cannon GB, Kay DH (1977). Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of the effector cells. *J Immunol*, 118 (1), 355-361.

Whiteside TL, Bryant J, Day R, Herbermann RB (1990). Natural killer cytotoxicity in the diagnosis of immune dysfunction: Criteria for a reproducible assay. *J Clin Lab Anal*, 4, 102-114.

Whiteside TL, Herberman RB (1989). The role of natural killer cells in human disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 53, 1-23.

Wolff MS, Fischbein A, Selikoff IJ (1992). Changes in PCB serum concentrations among capacitor manufacturing workers. *Environ Res*, 59 (1), 202-216.

Yabuhara A, Kawai H, Komiyama A (1990). Development of natural killer cytotoxicity during childhood: Marked increases in number of natural killer cells with adequate cytotoxic abilities during infancy to early childhood. *Pediatr Res*, 28 (4), 316-322.

Yamashita F, Hayashi M (1985). Fetal PCB syndrome: Clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism. *Environ Health Perspect*, 59, 41-45.

Yang YG, Lebrec H, Burleson GR (1994). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 23 (1), 125-131.

Yeh CJ, Hsi BL, Faulk WP (1981). Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J Immunol Methods*, 43 (3), 269-275.

Yovel G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S (2001). The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecol Oncol*, 81 (2), 254-262.

Zamai L, Mariani AR, Zauli G, Rodella L, Rezzani R, Manzoli FA, Vitale M (1998). Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry. *Cytometry*, 32 (4), 280-285.

Zarcone D, Tilden AB, Cloud G, Friedman HM, Landay A, Grossi CE (1986). Flow cytometry evaluation of cell mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 94, 247-255.

Zober A, Ott MG, Messerer P (1994). Morbidity follow up study of BASF employees exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) after a 1953 chemical reactor incident. *Occup Environ Med*, 51 (7), 479-486.

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1-1:	Strukturformel der PCDDs	3
Abbildung 1-2:	Strukturformel der PCDFs	4
Abbildung 1-3:	Strukturformel der PCBs	5
Abbildung 1-4:	Strukturformel von HCB	6
Abbildung 1-5:	Strukturformel von pp-DDE	6
Abbildung 1-6:	Strukturformel von ß-HCH	7
Abbildung 3-1:	Boxplots des Lymphozytenanteils in Vollblut und PBMCs	50
Abbildung 3-2:	Häufigkeitsverteilung der NK-Zellen in Vollblut	52
Abbildung 3-3:	Häufigkeitsverteilung der NK-Zellen in Vollblut	52
Abbildung 3-4:	Häufigkeitsverteilung der NK-Zellen in PBMCs	53
Abbildung 3-5:	Kreisdiagramm Median Vollblut-Subpopulationen	54
Abbildung 3-6:	Kreisdiagramm Median PBMC-Subpopulationen	54
Abbildung 3-7:	Boxplots der spezifischen Lyseraten	56
Abbildung 3-8:	Zeitlicher Verlauf der spezifischen Lyserate 50/1	57
Abbildung 3-9:	Streudiagramm NK-Zellen vs. pp-DDE	61
Abbildung 3-10:	NK-Aktivität und I-TEq PCDD/PCDF	63
Abbildung 3-11:	NK-Aktivität und Gesamt-WHO-TEq	63
Abbildung 3-12:	NK-Aktivität und Σ PCB 138, 153, 180	64
Abbildung 3-13:	NK-Aktivität und ß-HCH	64
Abbildung 3-14:	NK-Aktivität und HCB	65
Abbildung 3-15:	NK-Aktivität und pp-DDE	65
Abbildung 3-16:	Wiederholungsmessungen der PSL 50/1	66
Abbildung 3-17:	Streudiagramm NK-Zellen absolut vs. TCDD-Belastung (Erw.)	70
Abbildung 3-18:	Streudiagramm NK-Zellen relativ vs. TCDD-Belastung (Erw.)	70
Abbildung 3-19:	Streudiagramm NK-Aktivität vs. TCDD-Belastung (Erw.)	71

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1-1:	WHO-Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren der PCDD/PCDF/PCB-Kongenere	8
Tabelle 1-2:	Studien über POP-Wirkungen auf NK-Zellzahl	29
Tabelle 1-3:	Studien über POP-Wirkungen auf NK-Aktivität	30
Tabelle 2-1:	Pipettierschema Zytotoxizitäts-Assay	43
Tabelle 3-1:	Leukozyten- und Lymphozytenzahlen	49
Tabelle 3-2:	NK-Zell-Zahlen in Vollblut	51
Tabelle 3-3:	NK-Zell-Zahlen in PBMC	51
Tabelle 3-4:	Spezifische Lyseraten	56
Tabelle 3-5:	Korrelationskoeffizienten der NK-Zellpopulationen vs. PSLs	58
Tabelle 3-6:	POP-Werte der gestillten und nicht gestillten Kinder	59
Tabelle 3-7:	Korrelationskoeffizienten NK-Zellpopulationen vs. POPs	60
Tabelle 3-8:	Korrelationskoeffizienten NK-Zellpopulationen vs. POPs	61
Tabelle 3-9:	Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Messwerte	67
Tabelle 3-10:	Ergebnisse der TCDD-exponierten Personen und der Erwachsenengruppe	69

Danksagung

Hiermit danke ich Herrn PD Dr. med. *Klaus Abraham* für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Mitarbeit in seinem Projekt und die praktische und wissenschaftliche Betreuung sowie für seine große Geduld und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. *Ulrich Wahn* danke ich für die großzügige Bereitstellung des Studienlabors und anderer Ressourcen seiner Klinik.

Die Experimente wurden im Labor für Immunologie, Campus Virchow-Klinikum, Charité der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. In diesem Zusammenhang möchte ich mich insbesondere bei Frau MTA *Margret Oberreit* und Frau MTA *Valerie Johnston*, sowie bei Frau MTA *Petra Ellensohn* und Frau MTA *Lucia Badiali* für unersetzliche theoretische und praktische Hilfestellung bedanken, ohne welche die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Stat. *Tania Schink* (Institut für medizinische Biometrie der Charité) für die Beratung in statistischen Fragen.

Herrn Prof. em. Dr. med. *Hans Helge* danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Bei der Kommission für wissenschaftlichen Nachwuchs der Charité bedanke ich mich für die studienbegleitende Forschungsförderung.

Nicht zuletzt gebührt allen Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern und deren Eltern mein allerherzlichster Dank für die Teilnahme an der Studie.

Forschungsförderung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.04.1997 bis zum 31.12.1997 durch eine studienbegleitende Forschungsförderung der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin gefördert.

Das Projekt „Belastung von Säuglingen mit polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (PCDDs), Dibenzofuranen (PCDFs) und Biphenylen (PCBs) und deren Auswirkung auf sensible biologische Parameter“ wurde vom Forschungszentrum Karlsruhe – Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung, Projekt Umwelt und Gesundheit – gefördert.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde, dass sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und nur unter Verwendung der dargestellten methodischen Mittel und der angegebenen Literatur angefertigt wurde.