

Dissertation 19/2006

**Modulation der T-Zellfunktion durch flüchtige aromatische
Verbindungen**

Christian Kulla

ISSN 1860-0387



Modulation der T-Zellfunktion durch flüchtige aromatische Verbindungen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

An der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von Christian Kulla,
geboren am 06.12.1974 in Karlsruhe

angefertigt am
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ
in Kooperation mit dem Institut für Umweltmedizin und Umwelthygiene der
Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von
Frau Dr. I. Lehmann und Herrn Dr. G. Wichmann
Herrn Prof. Dr. O. Herbarth

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AG	Antigen
ah	anti human
AK	Antikörper
appl.	appliziert
ATSDR	Agency For Toxic Substances and Disease Registry
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethylen Pyrokarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ECRHS	European Community Respiratory Health Service
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IARC	International Agency for Research on Cancer
ID ₅₀	inhibition dose (gibt die Dosis an, bei der 50% der jeweiligen Leistung gehemmt werden)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IUF	Institut für umweltmedizinische Forschung
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LARS	Leipzig Allergy High-Risk Children Study
LC ₅₀	Letale Konzentration, concentration of a material in air that will kill 50% of the test subjects
LISA	Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich
MONICA	Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
mRNA	Boten-RNA (messenger ribonucleic acid)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MVOC	microbial volatile organic compounds
NADH	Nicotinamid-AdeninDinucleotid-Hydrooen
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NTP	National Toxicology Program
OD	Optische Dichte
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Zellen im Blut)
PBS	Phosphate buffered saline
PBS/T	Phosphate buffered saline mit 0,1% Tween
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
POD	Peroxidase
RH	Relative Humidity
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SAWO	Schulanfängerstudie West/Ost
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Th	T-Helfer-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
VOC	Volatile Organic Compound
ZNS	Zentrales Nervensystem

Bibliographische Beschreibung

Kulla, Christian

Experimentelle Untersuchung zu immunmodulierenden Effekten flüchtiger organischer Verbindungen

Universität Leipzig, Dissertation

66S., 104 Lit., 16 Abb., 10 Tab., 2 Schemata

Referat:

Der Assoziation von Umweltfaktoren und Lebensbedingungen mit der Prävalenz von allergischen Erkrankungen wurde in den vergangenen Jahren zunehmend Bedeutung beigemessen. Im Rahmen der LISA-Studie („Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergie im Ost-West-Vergleich“) wurden verschiedene Einflussfaktoren als Ursache für die unterschiedliche Allergieprävalenz bei genetisch identischen Populationen in Ost- und Westdeutschland gefunden. Neben Bildungsindex, Besuch einer Kinderkrippe, Infektionen im 3. Lebenshalbjahr, etc. zeigte auch die Exposition gegenüber flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) eine deutliche Erhöhung des Allergierisikos bei Neugeborenen und Kleinkindern.

Um die Relevanz dieser epidemiologischen Daten im Bezug auf die VOC zu verifizieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine experimentelle Versuchsanordnung konzipiert, die es erlaubt, den direkten Effekt ausgewählter flüchtiger Organika auf die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen (PBMC) anonymen Spender zu beobachten.

Mit Ausnahme von Naphthalin lieferten die direkten Effekte der VOC auf PBMC keine Anhaltspunkte für eine Erhöhung des Risikos für allergische Erkrankungen. Im Fall von Naphthalin zeigte sich in einem Bereich zwischen 25 und 2500 ng/ml eine deutliche Erhöhung des Typ-2-Zytokins IL-4 bei gleichzeitiger Nichtbeeinflussung des Typ-1-Zytokins IFN- γ . Dies spricht für eine durch Naphthalin verursachte Dysbalance der Th1-/Th2-Regulation zugunsten Th2 und demzufolge für erhöhtes Allergierisiko (Typ-I-Allergie). Des Weiteren zeigten sich bei den übrigen getesteten VOC inflammatorische Effekte, wie sie auch in tierexperimentellen Studien, Kammerexposition und klinischen Fallberichten beobachtet wurden.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Pathophysiologische Mechanismen der Allergie	1
1.2.	Bedeutung der Innenraumluft	4
1.3.	Einfluss der Innenraumluft	5
1.3.1.	Physikalische Eigenschaften der Innenraumluft	5
1.3.2.	Biologische Bestandteile der Innenraumluft	6
1.3.3.	Chemische Bestandteile der Innenraumluft	7
1.4.	VOCs	9
1.4.1.	Naphthalin	9
1.4.2.	Chlorbenzol, Styrol, Toluol und Xylol	10
1.5.	Allergieregulation des Immunsystems	12
1.6.	Zielstellung	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Materialien und Geräte	14
2.1.1.	Chemikalien, Lösungen und Puffer	14
2.1.1.1.	Chemikalien allgemein	14
2.1.1.2.	Untersuchte Chemikalien	14
2.1.1.3.	Lösungen, Puffer und Zellkulturreagenzien	15
2.1.2.	Immunreagenzien und Proteine	15
2.1.2.1.	Immunreagenzien für die ELISA-Systeme	15
2.1.2.2.	Immunreagenzien für die Zellstimulation	16
2.1.3.1.	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3.2.	Geräte	16
2.1.3.3.	Software	17
2.2.	Methoden	17
2.2.1.	Präparation mononukleärer Zellen	17
2.2.2.	Durchführung der Zellkultur	17
2.2.3.	Durchführung der Immunmodulationsversuche	20
2.2.3.1.	Vorbereitung und Applikation der Proben	21
2.2.3.2.	Durchführung und Messung der ELISA- Systeme	22
2.2.3.2.1.	Prinzip der Methode	22
2.2.3.2.2.	Beschichtung der ELISA- Platten	23

2.2.3.2.3.	Erstellung und Auftragung der Standard-Verdünnungsreihe	24
2.2.3.2.4.	Auftragung der Kulturüberstände	24
2.2.3.2.5.	Herstellung und Auftragung der biotinylierten Detektions-Antikörper	24
2.2.3.2.6.	Anwendung der Substratpuffer im ELISA	25
2.2.3.2.7.	Messung und Auswertung der ELISA-Systeme	25
2.2.3.3.	MTT-Test	25
2.2.3.3.1.	Prinzip der Methode	25
2.2.3.3.2.	Durchführung des MTT-Tests	25
2.2.3.4.	Nachweis der m-RNA Expression von Zytokinen mittels real-Time PCR	26
2.2.3.4.1.	mRNA-Präparation	26
2.2.3.4.2.	cDNA-Synthese	27
2.2.3.4.3.	Real-Time PCR	28
2.2.3.4.3.1.	Prinzip der Methode	28
2.2.3.4.3.2.	Vorbereitung der PCR	28
2.2.3.4.3.3.	Durchführung der PCR	29
2.2.4.	Statistische Auswertung	30
3.	Ergebnisse	30
3.1.	In vitro Modell zur Bestimmung immunmodulatorischer Effekte	30
3.1.1.	Zellproliferation nach ahCD3/ ahCD28- Stimulation	31
3.1.2.	Zytokinproduktion nach ahCD3/ ahCD28- Stimulation	31
3.1.3.	Einfluss der verwendeten Lösungsmittel DMSO und Methanol auf die Proliferation/ Vitalität	33
3.1.4.	Einfluss der verwendeten Lösungsmittel DMSO und Methanol auf Zytokinproduktion	33
3.2.	Effekte von VOCs auf Vitalität und funktionelle Aktivität von PBMC	35
3.2.1.	Chlorbenzol	35
3.2.1.1.	Einfluss von Chlorbenzol auf Vitalität der Zellen	35
3.2.1.2.	Einfluss von Chlorbenzol auf die Zytokinproduktion	36
3.2.2.	Styrol	38
3.2.2.1.	Einfluss von Styrol auf die Vitalität der Zellen	38
3.2.2.2.	Einfluss von Styrol auf die Zytokinproduktion	40
3.2.3.	Toluol	40
3.2.3.1.	Einfluss von Toluol auf Vitalität der Zellen	40
3.2.3.2.	Einfluss von Toluol auf die Zytokinproduktion	41

3.2.4.	Xylol	43
3.2.4.1.	Einfluss von Xylol auf Vitalität der Zellen	43
3.2.4.2.	Einfluss von Xylol auf die Zytokinproduktion	45
3.2.5.	Naphthalin	45
3.2.5.1.	Einfluss von Naphthalin auf Vitalität der Zellen	45
3.2.5.2.	Einfluss von Naphthalin auf die Zytokinproduktion	46
3.2.5.3.	PCR- Messergebnisse der Naphthalinversuchsansätze	48
4.	Diskussion	52
4.1.1.	In vitro Modell zur Untersuchung immunmodulierender Effekte von VOC	52
4.1.2.	Einfluss der verwendeten Lösungsmittel	53
4.2.	Chlorbenzol	54
4.3.	Styrol	56
4.4.	Toluol	57
4.5.	m-Xylol	59
4.6.	Naphthalin	60
5.	Zusammenfassung der Arbeit	64
Anhang		i-xii

1. Einleitung

Allergien gehören mit zu den häufigsten Erkrankungen in Industrieländern, ihr Anteil in Deutschland beträgt ca. 30% (18% der Schulanfänger, (Krämer et al., 1999)). Zudem sind allergische Erkrankungen von enormer gesundheitspolitischer Relevanz, da sie zu erheblichen Einbußen der Aktivität der Betroffenen, wie z.B. Schulausfall oder Arbeitsunfähigkeit, führen. Das Erkennen von Ursachen allergischer Erkrankungen und die Entwicklung von Präventivstrategien ist demzufolge ein wichtiger Schritt, um teure Langzeittherapiekosten und eventuelle stationäre Behandlungen auf ein finanzierbares Minimum zu senken.

1.1. Pathophysiologische Mechanismen der Allergie

Der Begriff Allergie ist definiert als eine Hypersensitivitätsreaktion, die durch immunologische Mechanismen ausgelöst wurde. Die allergische Reaktion findet dabei nach wiederholtem Kontakt mit körperfremden und per se nicht schädlichen Substanzen statt und kann antikörper- oder zellvermittelt ablaufen. Dem Entstehungsmechanismus liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde, das auf komplexen Interaktionen zwischen genetischen Faktoren, und Faktoren aus Umwelt und Lebensweise basiert.

Der Anteil genetischer Prädisposition in diesem Entstehungsmechanismus wird auf 35%-70% geschätzt (Tariq et al., 1999; Nieminen et al., 1991). Dies lässt sich am Beispiel der Prävalenz von Asthma verdeutlichen. Die Häufigkeit, mit der Asthma bei Kindern auftritt, wenn der Vater oder die Mutter oder beide an Asthma leiden, wurde bereits in mehreren Publikationen (Janson et al., 2001) diskutiert. Das Risiko für ein Kind erhöht sich, wenn ein Elternteil Asthmatiker ist, um den Faktor 3,2 bzw. 2,9 bei mütterlicher bzw. väterlicher Vorbelastung und steigt weiter (Odds Ratio 7,0), wenn beide Elternteile betroffen sind. Die familiäre Prädisposition muss also als ein wichtiger Co-Faktor bei der Entstehung von Asthma angesehen werden.

Die Prävalenz von Asthma und anderen allergischen Erkrankungen wurde im Rahmen diverser Studien im Laufe der vergangenen Jahrzehnte aus verschiedenen Blickwinkeln beleuchtet. Mit Hilfe der ECRHS-Studie (European Community Respiratory Health Survey)

ist es deutlich geworden, dass die geographische Verteilung der Prävalenz von Asthma sehr stark mit den jeweiligen Lebensbedingungen assoziiert ist (von Mutius et al., 1994). Zu den Einflussfaktoren, die aus verschiedenen Lebensweisen resultieren, zählen unter anderem die Familiengröße, die Form der Betreuung im Säuglings- und Kleinkindalter, das Stillen, Tierkontakte, der sozioökonomischer Status und sowie Unterschiede im Lebensstil in Ost- und Westdeutschland.

Die Anzahl der Geschwister und die eigene Position in der Rangfolge der Geschwister haben einen starken Einfluss auf die Prävalenz von allergischer Rhinitis und atopischem Ekzem (Strachan, 1989). Das invers proportional zur Familiengröße auftretende Risiko für allergische Erkrankungen kann nach Ansicht des Autors auf reduzierte Infektionsraten zurückgehen, die ihrerseits einen protektiven Effekt gegen Heuschnupfen haben könnten. Diese „Hygiene-Hypothese“ wird untermauert durch den schützenden Effekt von Atemwegsinfektionen bei Säuglingen und Kleinkindern bis zum 25. Lebensmonat, die infolge häufiger Atemwegsinfektionen eine niedrigere Rate an atopischer Dermatitis aufzeigten. Die Infektionen, die vor dem 6. Lebensmonat auftraten, hatten anteilig einen viel stärkeren, schützenden Einfluss (Kilpi, 2002), als die später aufgetretenen. Nicht nur Kinder mit älteren Geschwistern, sondern auch Kinder aus Mehrlingsgeburten scheinen einem protektiven Einfluss gegenüber Asthma, atopischem Ekzem und Heuschnupfen zu unterliegen (McKeever et al., 2001), allerdings wird bei einem Alter unter 2 Jahren das Asthmarisiko durch ältere Geschwister erhöht.

Ein ähnlicher Einfluss wie in großen Familien wurde bei Kindern, die in Tagesstätten betreut wurden, beobachtet (Svanes et al., 2002). Die inverse Assoziation zwischen Allergierisiko und Besuch einer Kindertagesstätte wurde in dieser Studie allerdings nur bei Kindern mit familiärer Prädisposition nachgewiesen. Gleichzeitig trat bei diesen Kindern eine erhöhte Rate an Asthmasymptomen auf. Es wurde mittels Prick- Test gezeigt, dass der Besuch einer Kinderkrippe einen protektiven Effekt gegenüber Atopien ausübt. Kinder, die eine Kinderkrippe vor dem dritten Lebensjahr besuchten, hatten ein reduziertes Atopierisiko (Haby et al., 2000).

Das Stillen von Säuglingen wird im Zusammenhang mit der Prävalenz allergischer Erkrankungen kontrovers diskutiert. Einerseits wird der Einfluss von Stillen auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis als protektiv beschrieben, insbesondere, wenn schon positive Untersuchungsbefunde vorliegen (Kerkhof et al., 2003). Andererseits wird Stillen im

Rahmen der angeborenen Atopie als beitragender Risikofaktor zur Entwicklung eines positiven Hauttests und Asthma (Sears et al., 2002) genannt.

Der Einfluss ländlicher Umgebung wurde bei Kindern, die auf Bauernhöfen aufwuchsen, untersucht, und ein reduziertes Risiko für Asthma und Heuschnupfen (Von Ehrenstein et al., 2000) festgestellt. Dabei konnte eine enge Assoziation zwischen regelmäßigem Kontakt mit Tieren und dem erniedrigten Atopierisiko aufgezeigt werden (Riedler et al., 2001). Die zunehmende Verstädterung hat eine andere Studie (MONICA/KORA) zum Anlass genommen, die Prävalenz allergischer Erkrankungen auf Bauernhöfen, in Dörfern, Vorstädten und in Stadtwohnungen miteinander zu vergleichen. Es wurde festgestellt, dass in ländlichen Gegenden ein signifikant niedrigeres Risiko für allergische Rhinitis, atopische Sensibilisierung und Sensibilisierung gegen Pollen vorliegt (Filipiak et al., 2001). Der regelmäßige Aufenthalt von Kleinkindern bis zum 5. Lebensjahr in Tierställen ist dabei mit den niedrigsten Inzidenzen an Asthma, atopischer Sensibilisierung und Heuschnupfen assoziiert (Riedler, Braun-Fahrlander, Eder, Schreuer, Waser, Maisch, Carr, Schierl, Nowak, and von Mutius, 2001).

Auch im Umgang mit Haustieren wurde ein protektiver Effekt gegenüber der Ausbildung allergischer Erkrankungen beobachtet. Dies wird vor allem auf eine erhöhte Exposition gegenüber Endotoxin zurückgeführt. Die Endotoxinkonzentration im Hausstaub steigt signifikant an, wenn ein Hund, eine Katze oder Schaben im Haus leben. Für andere Tiere, welche sich im Wohnraum von Menschen aufhalten, ergab sich dagegen keine statistisch signifikante Assoziation (Heinrich et al., 2001). Die Exposition mit Endotoxinen wiederum korreliert stark mit dem invers auftretenden Risiko für Allergien (Braun-Fahrlander et al., 2002). Dabei wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt.

Als weiterer Einflussfaktor der unterschiedlichen Lebenseinflüsse muss der sozioökonomische Status genannt werden. Im Zusammenhang mit der Prävalenz von Asthma konnte aufgezeigt werden, dass die Schwere der Erkrankung im Kindesalter positiv mit der Zugehörigkeit der Familie zur sozioökonomischen Klasse korreliert (Mielck et al., 1996). Ein hoher sozioökonomischer Status bedeutet also eine mildere Ausprägungsform eines vorhandenen Asthma. Bei Untersuchung der vermuteten Einzelfaktoren wurden weitere Einflussgrößen wie Rauchen der Mutter während des ersten Lebensjahres des Kindes, Verkehrsbelastung sowie ein niedriger Bildungsstatus der Eltern bestimmt. Jeder Faktor für sich genommen ging mit einer Erhöhung der Asthmarisikos einher, allerdings erwiesen sich nur Rauchen der Mutter, Verkehrsbelastung im Umfeld des Kindes und eine familiäre Prädisposition als signifikant assoziiert mit der Schwere des Asthmas. Die Frage, ob

Unterschiede in der Behandlung die Ursache für die vorgefundene Diskrepanz sind, wurde vom Autor nur als Anregung für weitergehende Studien aufgegriffen.

Die deutliche Zunahme der Prävalenz von Allergie im Allgemeinen und Asthma im Speziellen über die vergangenen Jahrzehnte hat dazu geführt, dass die Aufmerksamkeit verstärkt auf Umweltfaktoren und ihren Einfluss bei der allergischen Sensibilisierung gerichtet wurde. Anfängen von Schadstoffexpositionen im fetalen Entwicklungsstadium über Kontakte zu Allergenen im Säuglingsalter bis zu Kontakt mit Schadstoffen am Arbeitsplatz/ zu Hause ergibt sich ein breites Spektrum an potentiellen Schädigungseinflüssen. In vielen Bereichen lässt sich eine Allergisierung oder der Kontakt mit dem entsprechenden Allergen vermeiden, solange es sich beispielsweise um Kontakt-, Nahrungsmittel- oder Medikamentenallergien handelt. Demgegenüber stehen andere Einflussfaktoren, denen man sich schwerer entziehen kann. Dazu gehören Luftkontaminationen.

1.2. Bedeutung der Innenraumluf

Ein großer Anteil der Schadstoffe, mit denen wir täglich konfrontiert werden, wird über die Atemluft aufgenommen. Der Mensch nimmt über den Tag hinweg ca. 10m^3 Atemluft zu sich, unter Belastung kann das Atemzugvolumen zeitweise bis auf das 6fache gesteigert werden, das Tagesvolumen auf etwa 20m^3 . Über ein Jahr gesehen können somit Schadstoffe aus mindestens 3.600m^3 Luft in der Lunge und je nach Löslichkeitsverhältnissen im menschlichen Organismus akkumulieren. Dies ist einer der Gründe, warum auch Schadstoffe, die in sehr geringer Konzentration in der Außen- bzw. Innenraumluf vorhanden sind, schädliche Einflüsse auf die Gesundheit haben können. Der Innenraumluf hat darüber hinaus eine stärkere Relevanz, da sich Kinder im Durchschnitt mehr als 85% des Tages in Innenräumen aufhalten (Herbarth et al., 2000a). Zudem tragen verbesserte Isoliermaßnahmen im Hausbau zu einer höheren Konzentration schädlicher Substanzen in Innenräumen bei (Herbarth et al., 2000b), wie am Beispiel der Konzentrationsunterschiede flüchtiger organischer Verbindungen (VOC) in der Innen- und Außenluft deutlich wird (siehe Abb. 1).

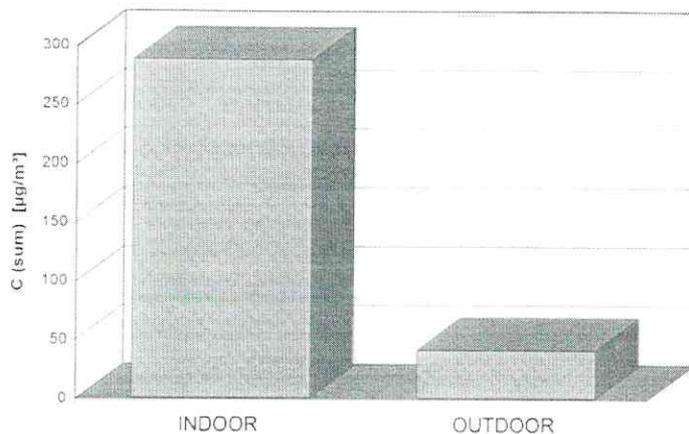


Abb. 1: Vergleich der Konzentrationsunterschiede der VOC-Konzentrationen Innen versus Außen (aus Herbarth et al., 2000)

1.3. Einfluss der Innenraumluft

Die Qualität der Innenraumluft wird durch die physikalischen, chemischen und biologischen Komponenten charakterisiert.

1.3.1. Physikalische Eigenschaften der Innenraumluft

Hier werden die Raumtemperatur und die Luftfeuchtigkeit eingeordnet. Dabei spielt besonders die Luftfeuchtigkeit eine Rolle, wie sich z.B. aus Studien mit Angestellten in Laboratorien zeigte, die aus arbeitstechnischen Gründen bei einer Luftfeuchtigkeit von 2,5% RH (relative humidity) arbeiten. Es traten hierbei vermehrt Hautsymptome auf, auch eine erhöhte Rate an atopischer Dermatitis wurde beobachtet (Sato et al., 2003). Eine erhöhte Luftfeuchtigkeit dagegen kann auch Ursache für ein vermehrtes Auftreten von Asthma sein (Norback et al., 2000). Als Ursache wird das vermehrte Auftreten von Hausstaubmilben und Pilzsporen diskutiert, da sowohl Hausstaubmilben als auch Schimmelpilze sich bei erhöhter Luftfeuchtigkeit verstärkt vermehren. Wie aus diesem Beispiel ersichtlich wird, besteht demnach ein enger Zusammenhang zwischen physikalischen Eigenschaften der Innenraumluft und ihren biologischen Bestandteilen.

1.3.2. Biologische Bestandteile der Innenraumluft

Unter biologischen Bestandteilen werden jene Komponenten zusammengefasst, die in höherer Konzentration in Haushalten vorkommen können und biologischen Ursprungs sind. Darunter fallen vor allem Katzen- und andere Tierhaare bzw. Hautschuppen, Hausstaubmilben bzw. -Exkreme, Pilzsporen, Bakterien, Viren und Pollen.

Die Exposition gegenüber Katzenallergenen im Hausstaub oder direktem Kontakt mit Katzen in den ersten Lebensjahren verursacht eine der Dosis- Wirkungsbeziehung folgenden Sensibilisierung gegenüber Katzenallergenen (Lindfors et al., 1999). Wird dabei die Familienanamnese berücksichtigt, ergibt sich jedoch nur für Kinder, deren Mütter an Asthma leiden, ein erhöhtes Risiko. Bei Kindern ohne Asthma in der Familienanamnese ergab sich dagegen eine Reduzierung des Sensibilisierungsrisikos.

Im Zusammenhang mit Katzenallergenen wurde bei ehemaligen Besitzern ein erhöhtes Sensibilisierungsrisiko festgestellt (Roost et al., 1999). Hohe Konzentrationen an Mikroorganismen und Hausstaubmilben wurden vermehrt in Haushalten von Personen mit asthmatischen Symptomen gefunden (Bjornsson et al., 1995). Bei der Sensibilisierung von Kleinkindern in den ersten drei Lebensjahren durch Hausstaubmilben wurde ebenfalls eine Dosis- Wirkungsbeziehung zwischen Allergenkonzentration und Allergiehäufigkeit gezeigt. Geordnet nach Familienanamnese für Atopie ergab sich dabei ein um bis zu 33faches Sensibilisierungsrisiko für Kindern mit genetischer Prädisposition (Wahn et al., 1997). Anders formuliert lag bei diesen Kindern die gemessene Sensibilisierungsdosis im Mittel bei 1:33 gegenüber Kindern ohne genetische Prädisposition. Epidemiologische Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass hohe Konzentrationen von Hausstaubmilben stark mit der Prävalenz von Asthma assoziiert sind (Platts-Mills et al., 1997; Brunekreef et al., 1989). Auch für Schimmelpilzbelastung im Innenraum konnte ein Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen gezeigt werden (Schafer et al., 1999; Muller et al., 2002). Bei Schimmelpilzen wird diskutiert, dass diese nicht nur selbst Allergene sind, sondern möglicherweise auch adjuvante Effekte verursachen. Dadurch besteht ein erhöhtes Risiko für allergene Sensibilisierung nicht nur gegen Schimmelpilze, sondern auch gegen beispielsweise Pollenallergene. Die Ursache dazu ist noch nicht geklärt. Es wird aber vermutet, dass von Schimmelpilzen produzierte Sekundärmetabolite wie Mykotoxine und MVOC dabei eine Rolle spielen können (Wichmann et al., 2002; Wichmann et al., 2003; Lehmann et al., 2003).

1.3.3. Chemische Bestandteile der Innenraumluft

Die Belastung der Innenraumluft mit Schadstoffen erfolgt aus vielen unterschiedlichen Quellen. Die Nebenprodukte aus Verbrennungen wie **CO**, **NO₂** und **SO₂** sind eher typische Vertreter der Außenluft- Schadstoffe. Sie gelangen zwar durch Penetration in Innenräume und können auch infolge der Benutzung von Gasherd, Holz- und Kohleofen und ähnlichem in Gebäuden entstehen, verursachen jedoch mehr eine Verschlechterung eines bestehenden Astmas als die Entstehung einer allergenen Erkrankung selbst (Nicolai, 2002). **Tabakrauch** ist als Mischung aus vielen bekannten und weit mehr unbekanntem Schadstoffen bezüglich des Wirkungsspektrums seit langem bekannt als Ursache für Bronchitis, Emphyseme und Lungentumoren (Hems, 1969; Lee, 1986), darüber hinaus ist er ein wesentlicher Risikofaktor bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (Makomaski Illing and Kaiserman, 2004). Die Belastung durch Passivrauchen und der schädigende Einfluss auf die Atemwege und Lungenfunktion Neugeborener bei prä- und postnataler Exposition sind ebenfalls weitgehend bekannt (Fauroux, 2003). In einer prospektiven Kohortenstudie an unter einjährigen Kindern konnte Rauchen als Risikofaktor für die Entwicklung von Wheezing bestimmt werden (Diez et al., 2003).

Eine sehr große Gruppe an Innenraumschadstoffen ist die der **flüchtigen organischen Verbindungen** (VOC). Zu ihnen zählen Verbindungen der Stoffgruppen Alkane/ Alkene, Aromaten, Terpene, Halogenkohlenwasserstoffe, Ester, Aldehyde und Ketone. Sie finden häufig Verwendung in bauchemischen Produkten wie Anstrichstoffen, Klebstoffen oder Dichtungsmassen. Auch Einrichtungsgegenstände, Reinigungs- und Pflegemittel sowie Tabakrauch können Emissionsquellen sein.

Aus der Exposition mit VOCs können, je nach Konzentration und Belastungsdauer, vielfältige Gesundheitsstörungen resultieren. Irritationen der Augen, Nase und Atemwege, wie sie beim „Sick-Building-Syndrom“ auftreten, stehen in engem Zusammenhang mit erhöhten Innenraumkonzentrationen an VOCs (Pappas et al., 2000), wie bei einer Expositionsstudie mit 25 und 50mg/m³ einer durchschnittlichen VOC-Mischung an 19 bis 44jährigen Probanden beobachtet wurde. Weitere Konsequenzen können Asthma (Wieslander et al., 1997), Kopfschmerzen und Müdigkeit (Pitten et al., 2000) und Hautirritationen (Wieslander et al., 1994) sein.

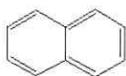
Im Rahmen einer Kohortenstudie an Allergierisikokindern (LARS -Leipzig Allergy Risk Children Study) wurde der Einfluss von VOC-Expositionen auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen im frühen Kindesalter untersucht. Dabei wurden bei 3jährigen Kindern

Korrelationen zwischen erhöhten VOC- Konzentrationen und aufgetretenen Nahrungsmittelsensibilisierungen festgestellt, insbesondere gegenüber Eiweiß- und Kuhmilchallergenen. Das Sensibilisierungsrisiko war nach VOC- Exposition 5 bis 11mal höher, als bei nichtexponierten Kindern. Dagegen konnte eine Sensibilisierung gegenüber Innenraum- bzw. Außenluftallergenen nicht mit der Exposition gegenüber VOCs assoziiert werden. Aus der Reihe der gemessenen VOCs wurde maßgeblich für die Gruppe der Alkane (Hexan, Nonan, Dekan) und die Gruppe der Aromaten (Toluol, m, p, o-Xylol, Chlorbenzol und 4-/ 3-/ 2-Ethyltoluol) eine signifikante Assoziation mit der Sensibilisierung gegenüber Eiweiß und Milch beobachtet. Neben dem Zusammenhang zwischen erhöhten VOC-Konzentrationen und allergischer Sensibilisierung wurden auch Veränderungen in der Immunreaktivität, insbesondere T-Zell-Funktion, in Abhängigkeit von der VOC-Exposition, beobachtet. Es wurde ein erniedrigter Anteil an CD3+/ CD8+ T-Zellen im peripheren Blut von Kindern gemessen, die erhöhten Konzentrationen an Alkanen, Naphthalin und Chlorbenzol ausgesetzt waren. Chlorbenzol zeigte darüber hinaus, ebenso wie Benzol und Ethylbenzol, eine starke Korrelation zu erhöhten Anteilen IL-4 produzierender CD3+ T- Zellen im Blut (Lehmann et al., 2001). Des Weiteren konnten Diez et al. 1999 einen signifikanten Zusammenhang zwischen Styrol-exposition und aufgetretenen Atemwegsinfektionen in der 7. Lebenswoche aufzeigen. Das Verlegen eines neuen Fußbodenbelages wurde in dieser Studie als Hauptursache für Konzentrationen von Styrol über $2\mu\text{g}/\text{m}^3$ ermittelt, der Median dieser Substanz lag bei $0,6\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Lehmann, Rehwagen, Diez, Seiffart, Rolle-Kampczyk, Richter M., Wetzig, Borte, and Herbarth, 2001).

In epidemiologischen Studien können Risikofaktoren für Erkrankungen aufgedeckt, jedoch keine ursächlichen Zusammenhänge beschrieben werden. Insbesondere für VOCs besteht das Problem, dass reale Expositionen immer auf ein Gemisch aus verschiedenen Verbindungen zurückgehen, deren potentielle Effekte nur schwer zu trennen sind. Weiterführende experimentelle Studien sollen deshalb klären helfen, welche der in Innenräumen vorkommenden flüchtigen Verbindungen tatsächlich kausal mit einem Anstieg des Allergierisikos in Zusammenhang zu bringen sind. Die Auswahl der aromatischen Verbindungen unter den VOCs als zu untersuchende Verbindungen erfolgte aufgrund verschiedener Faktoren. Einerseits deuteten sowohl hohe Innenraumkonzentrationsanteile in der Gesamtsumme der VOCs als auch signifikante Assoziationen mit aufgetretenen Nahrungsmittelallergien auf einen relevanten Einfluss auf das menschliche Immunsystem hin. Zum anderen musste die Auswahl der zu testenden Substanzen aufgrund des hohen experimentellen Aufwandes auf eine Gruppe der VOCs beschränkt werden.

1.4. VOCs

1.4.1. Naphthalin



Naphthalin ist eine weiße Substanz mit fest kristallinem Aggregatzustand bei RT. Der Geruch ist typisch („Mottenkugeln“) und wird ab einem Schwellenwert von 0,45mg/m³ bis 1,50mg/m³ (Rippen-Handbuch 10/97) wahrgenommen. Mit einem Schmelzpunkt bei 80,2°C und einem Siedepunkt bei 217,9°C gehört es zu den schwerer flüchtigen VOCs. Bekannte Emissionsquellen von Naphthalin sind Verbrennungsvorgänge unter Beteiligung von Öl oder Kohle und Tabakrauch. Als Mottenschutzmittel ist Naphthalin nicht mehr gebräuchlich. Die Exposition am Arbeitsplatz findet vor allem beim Umgang mit Teer und Holzschutzmitteln, beim Gerben oder in Färbereien statt (ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003).

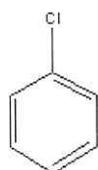
Die toxische Wirkung wird in Kurzzeit- und Langzeit- Effekte unterteilt. Bei hochdosierter Exposition infolge Ingestion und Hautkontakt wurden hämolytische Anämie, Nierenschädigung und bei Kleinkindern Gehirnschäden beschrieben. Als Begleitsymptome traten allgemeine Beschwerden wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen bis zu schweren Symptomen wie Anämie, Krämpfen und Koma auf (ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003). Bei chronischer Exposition wurden als Hauptsymptome Kataraktbildung und Retinadegeneration beschrieben.

Die Beurteilung der Kanzerogenität muss infolge mangelnder valider humanepidemiologischer Studien auf der Basis von Tierexperimenten erfolgen. Im Rahmen einer 2jährigen Inhalationstudie mit Ratten konnte ein eindeutiger Nachweis der Kanzerogenität erbracht werden. Dabei traten dosisabhängig erhöhte Inzidenzen Adenome des pulmonalen Epithels und Neuroblastome am Riechepithel auf (NTP: National Toxicology Program, 2000).

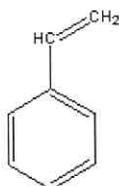
Von der allergenen Wirkung von Naphthalin wird in einigen Fallbeschreibungen berichtet. Dabei wurde ein Patient aus 598 im Rahmen von Dermatosen begutachteten Patienten mit einer positiven Reaktion im Epikutantest auf Naphthalin beschrieben (Klaschka, 1994). Aus der LARS- Studie konnte bei 3jährigen Kindern in Assoziation mit einer hohen Naphthalin-Konzentration eine Reduzierung der IFN- γ produzierenden CD8 T- Zellen im Blut gemessen werden (Lehmann et al., 2001), ebenso eine Erhöhung der IL-4 Konzentration im Nabelschnurblut im Rahmen der LISA Studie (Lehmann et al., 2002).

1.4.2. Chlorbenzol, Styrol, Toluol und Xylol

Die **toxische Wirkung** dieser vier Verbindungen ist aufgrund der chemischen Verwandtheit sehr ähnlich. Das akute toxische Wirkungsspektrum reicht bei Inhalation bzw. Ingestion von Dyspnoe, gastrointestinalen Beschwerden und Zyanose bis zu Bewusstlosigkeit, Myospasmus und Tremor (ATSDR, 1990). Bei chronischer Exposition am Menschen wurden ZNS-Veränderungen wie Hypästhesie, Hyperästhesie, Zyanose und Myospasmen beobachtet, außerdem eine beeinträchtigte Lungenfunktion, Brustschmerzen, Schleimhautreizungen und Kopfschmerzen. Tierexperimentell wurde weiter eine Schädigung der Niere, Leber und des ZNS bei Inhalationsstudien festgestellt.

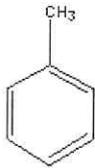


Chlorbenzol (Syn.: Monochlorbenzol, Chlorobenzene) ist unter Standardumweltbedingungen (P=1013,25mbar; T=25°C) eine farblose, leichtflüchtige Flüssigkeit. Der Geruch wird als mandelartig beschrieben, die Geruchsschwelle liegt bei 0,9mg/m³. Der Schmelzpunkt liegt bei -45,2°C, der Siedepunkt bei 132°C (Rippen G., 2004a). Es wird überwiegend als Lösungsmittel bei der Herstellung von Kunstharzen, Farbstoffen, Pestiziden und Parfums verwendet, weitere Verwendung findet es als Entfetter und als chemisches Zwischenprodukt bei der Herstellung von Nitrobenzol-Verbindungen (ATSDR, 1990). Im Versuch mit Ratten wurde kein eindeutiger Nachweis für die Kanzerogenität von Chlorbenzol bei Ingestion erbracht (NTP, 1985). Aus der LARS- Studie wurde ein Zusammenhang zwischen hohen Chlorbenzolkonzentrationen in der Innenraumlufte und der Sensibilisierung gegenüber Kuhmilchallergenen sowie verringerter INF-γ bzw. erhöhter IL-4 Produktion peripherer T-Zellen festgestellt (Lehmann et al., 2001).



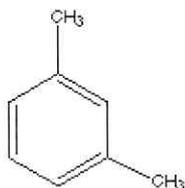
Styrol (Syn: Ethenylbenzol, Vinylbenzol, Phenylethen, Phenylethylen) ist unter Standardumweltbedingungen (P=1013,25mbar; T=25°C) eine farblose, flüssige Substanz mit einem süßlichen gummiartigen Geruch. Die Wahrnehmungsgrenze liegt bei 0,43mg/m³, der Schmelzpunkt liegt bei -31°C und der Siedepunkt bei 145,1°C (Rippen G., 2004c). Es wird hauptsächlich zur Herstellung von Polystyrol, Harzen und weiter als Zwischenprodukt bei der Copolymerproduktion verwendet. Die Hauptemissionsquellen für Styrol sind Baumaterialien (v.a. Klebstoffe), Verbrauchsgüter (Verpackungsmaterial, Spielzeug, Haushaltswaren) und Tabakrauch. Die Konzentration in der Innenraumlufte beträgt zwischen 1 und 9µg/m³ (ATSDR, 1992). Aus

mehreren epidemiologischen Studien lassen sich Hinweise darauf finden, dass es eine Assoziation zwischen Styrol- Exposition und erhöhtem Leukämie- bzw. Lymphomrisiko gibt (ATSDR, 1992; Wong, 1990; Huggett et al., 1996), allerdings ist der Nachweis nicht eindeutig aufgrund multipler Chemikalienexposition und lückenhaften Informationen zu Konzentration und Dauer der Exposition. Die Einstufung der Kanzerogenität ist daher unterschiedlich (NTP: No; IARC Yes (2B); OSHA: No). In Hinblick auf immunmodulatorische Effekte wurden bei Arbeitern, die unterschiedlichen Styrolkonzentrationen ausgesetzt waren, die α -, β - und γ -Globulin- Konzentration bestimmt, ohne jedoch eine Dosis- Wirkungsbeziehung festzustellen (Chmielewski et al., 1977). Eine Fallbeschreibung nennt Styrol als mögliche Hauptursache für berufsbedingtes Asthma und Rhinitis mit noch ungeklärtem Entstehungsmechanismus ((Moscato et al., 1988). Weiter wurde in der LARS- Studie ein Zusammenhang zwischen Atemwegserkrankungen bei Kindern und hohen Styrolkonzentrationen gefunden (Diez et al., 1998).



Toluol (Syn: Methylbenzol) ist eine farblose, flüssige Substanz mit einem süßen, scharfen Geruch (EPA, 1999), welcher ab einer Konzentration von $7,6\text{-}8\text{mg/m}^3$ wahrnehmbar ist (Rippen G., 2004d). Der Schmelzpunkt liegt bei -95°C , der Siedepunkt bei $110,6^\circ\text{C}$. Es wird Benzin zur Oktanerhöhung beigelegt und zur Benzol- bzw. zur Lösungsmittelproduktion verwendet. Die Konzentrationsunterschiede zwischen Innenraumluft, städtischer und ländlicher Außenluft ($31,5\mu\text{g}$; $10,8\mu\text{g}$ und $1,3\mu\text{g pro m}^3$) zeigen, dass die höchsten Konzentrationen in der Innenraumluft auftreten, insbesondere nach der Verwendung von Produkten wie Wandfarbe, Farb-Verdünnungen, Klebstoffen, Reinigungsmitteln, Lacken und infolge Tabakrauch. Die absichtliche Inhalation von Farben und Klebern durch Süchtige kann zu hohen Expositionsdosen an Toluol und damit verbunden zum Tod führen (Anderson et al., 1986). Eine Kanzerogenität konnte bisher nicht in Studien nachgewiesen werden (ATSDR, 2000). Eine Abhängigkeit zwischen IgG, IgA und IgM- Serumspiegeln konnte bei einer Studie an Arbeitern einer Druckerei mit Expositionsdosen zwischen $104\text{-}1.170\text{ ppm}$ ($392\text{-}4411\text{mg/m}^3$) über einen Zeitraum von 13 Jahren im Vergleich zu den Büroangestellten des gleichen Unternehmens nicht festgestellt werden (Pelclova et al., 1990). Jedoch war der IgE- Spiegel im Blut Druckereiangestellter bei Expositionsdosen zwischen $97\text{-}232\text{ mg/m}^3$ im Vergleich zur Kontrollgruppe Nichtexponierter signifikant erhöht. Es ließ sich dabei eine Dosis- Wirkungsbeziehung zwischen der kumulativen Toluol- Exposition und dem IgE- Spiegel beobachten (Stengel et al., 1998). Die Lymphozytenfraktion

im Blut Angestellter in Schuhfabriken, Druckereien und in der Produktion von Audiogeräten wurde nach einer Durchschnittsexposition von $155\text{mg}/\text{m}^3$ für Frauen und $173\text{mg}/\text{m}^3$ für Männer und 82 Monaten signifikant erniedrigt gemessen. Dieser Befund verweist auf ein möglicherweise von Toluol ausgehendes erhöhtes Sensibilisierungsrisiko. Er wird gestützt durch die Daten aus der LARS- Studie, in der bei 3jährigen Kindern ein Zusammenhang zwischen erhöhter Toluolkonzentration im Innenraum und allergischer Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmitteln beobachtet worden war (Lehmann et al., 2001).



m-Xylol (Syn: 1,3-Dimethylbenzol, 1,3-Xylol) zeichnet sich ebenfalls durch seine Eigenschaften als farblose, flüssige Substanz mit süßlichem Geruch aus Gummi (Rippen G., 2004b) aus. Der Schmelzpunkt liegt bei $-47,8^\circ\text{C}$ und der Siedepunkt bei $139,1^\circ\text{C}$. Emissionsquellen sind Industrieverbrennungsanlagen, Verbrennungsmotoren und Farben bzw. Lacke, die Xylole (o-, m- und p-Xylol) als Lösungsmittel beinhalten. Die Innenraumkonzentrationen für m- und p-Xylol liegen im Bereich zwischen $0,010$ und $0,047\text{mg}/\text{m}^3$ (ATSDR, 1995). Alle drei Verbindungen (m-, o-, p-) Xylol wurden laut EPA im Hinblick auf ihre Kanzerogenität als nicht klassifizierbar eingestuft. Im Bezug auf immunologische Effekte sind nur eingeschränkt Daten aus Studien verfügbar. Aus humanepidemiologischen Studien wird von einer erniedrigte Lymphozytenkonzentration bei Arbeitern, die mit Xylol exponiert waren, berichtet (Moszczynsky and Lisiewicz, 1984), allerdings konnten infolge gleichzeitiger Exposition gegenüber anderen Chemikalien keine validen Schlüsse bezüglich der vermuteten Korrelation getroffen werden. Aus tierexperimentellen Studien konnten ebenfalls keine weiteren Erkenntnisse bezüglich möglicher immunmodulierender Effekte gewonnen werden (Selgrade et al., 1993). Im Rahmen der LARS- Studie konnte eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten von Allergien gegen Milchprodukte und dem Auftreten von m- und p-Xylol beobachtet werden.

1.5. Allergieregulation des Immunsystems

Die spezifischen Reaktionen des Immunsystems auf körperfremde Antigene basieren auf einem komplex ineinandergreifenden Regulierungsmechanismus. Dabei greifen Funktionen unterschiedlicher Zellpopulationen wie B- und T-Zellen, Antigen-präsentierender und adhärenter Zellen ineinander und führen zu einer dem Immunreiz angepassten Immunantwort.

In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass die Differenzierung von T-Lymphozyten des Helfertyps mit den Oberflächenmolekülen CD4+ und CD8+ aufgrund unterschiedlicher Zytokinsekretion die Einteilung in zwei funktionell unterschiedliche Subgruppen, Th1- und Th2-Zellen, erlaubt (Sad and Mosmann, 1995; Croft et al., 1999). Th2-Zellen produzieren überwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, während Th1-Zellen insbesondere Interferon-Gamma (IFN- γ), TNF- α und IL-2 produzieren (Mosmann et al., 1986). Die Sekretion von IL-4 durch Th2-Zellen spielt dabei eine besondere Rolle bei der Induktion der IgE-Synthese durch aktivierte B-Zellen, welche in engem Zusammenhang mit allergischen Reaktionen steht (Abbas et al., 1996). Ihre Kontrahenten, die Th1-Zellen, inhibieren mittels IFN γ -Sekretion die IL-4- induzierte IgE-Synthese und wirken dadurch entscheidend am Regulationsmechanismus der IgE-Synthese mit (Haas and Schlaak, 1994). Um zu entscheiden, ob infolge einer Schadstoffexposition eine Dysbalance zwischen den Th1- und Th2- Zellen entstand, wurden im vorliegenden Versuchsaufbau die Konzentrationen von IL-4, IFN- γ , IL-2 und TNF- α nach 24stündiger Inkubation einer festgelegten Zellzahl mit einer der besprochenen flüchtigen organischen Verbindungen gemessen.

1.6. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genannten flüchtige aromatische Verbindungen Naphthalin, Toluol, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol, für die aufgrund von Daten aus epidemiologischen Studien der Verdacht bestand, dass sie zur Entstehung von allergischen Manifestationen beitragen, in einem experimentellen Modell näher zu charakterisieren. Dabei sollte geprüft werden, ob von den zu untersuchenden VOC adjuvante Effekte auf das Immunsystem, insbesondere die T- Zell- Funktion ausgehen. Konkret sollte geprüft werden, ob Naphthalin, Toluol, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol die T- Zellreaktivität in Richtung einer gesteigerten Th2- Reaktivität verschieben, so dass von diesen Verbindungen ein erhöhtes Allergierisiko ausgeht.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien, Lösungen und Puffer

2.1.1.1. Chemikalien allgemein

β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid (30%) (37.5:1)	Life Technologies, Karlsruhe
Azetonitril	Merck, Darmstadt
Depc-Wasser	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DMSO (Dimethylsulfoxid) p.a. >99%	Merck, Darmstadt
DMF (N,N'-Dimethylformamid)	Serva, Heidelberg
dNTP-Mix	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ficoll-Paque TM PLUS;	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
FKS (Fötale Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
MTT (=3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-	
2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)	Serva, Heidelberg
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Türks Lösung	Merck, Darmstadt
Tween [®] 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

2.1.1.2. Untersuchte Chemikalien

Alle verwendeten flüchtigen organischen Verbindungen (VOCs), die auf immunmodulatorische Effekte hin untersucht wurden, sind nachfolgend aufgeführt:

Chlorbenzol	>99% GC, Merck
Naphthalen	>99% GC, Merck
Styrol	>99% GC, Aldrich
Toluol	>99% GC, Merck
m-Xylol	>99% GC, Fluka

2.1.1.3. Lösungen, Puffer und Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenzien

RPMI 1640	Biochrom AG
N-Acetyl- L-Alanyl- L- Glutamin	Biochrom AG
BME- Amino Acids ohne Glutamin	Biochrom AG
CO ₂ - Independent Medium ohne L- Glutamin	Gibco

Puffer für ELISA

PBS / T

PBS Dulbecco (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei,pH 7,4)	Biochrom AG, Berlin
0,1% Tween [®] *20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Assaypuffer

PBS Dulbecco (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei,pH 7,4)	Biochrom AG, Berlin
5% FKS	Biochrom AG, Berlin

2.1.2. Immunreagenzien und Proteine

2.1.2.1. Immunreagenzien für die ELISA-Systeme

ELISA-Sets	OptEIA™, Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
human IL-2 OptEIA-Set	(Cat.No.26271 E)
human INF-γ OptEIA-Set	(Cat.No.26131 E)
human IL-4 OptEIA-Set	(Ca.No.26291 E)
human TNF-α OptEIA-Set	(Ca.No.26371 E)
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.2.2. Immunreagenzien für die Zellstimulation

ahCD3 anti-human CD3; Klon OKT3 (Natu Tec GmbH, Frankfurt)

ahCD28 anti-human CD28, Klon: CD28.2, Isotyp IgG1k (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld)

2.1.3.1. Verbrauchsmaterial

384 weil Immuno- Platten, MaxiSorp; 464718, Nunc GmbH, Wiesbaden

96 Zellkulturplatten, Flachboden PS, TPP

Glasflaschen, 500 ml mit 600 ml Innenvolumen; 107-462, Dr. Ilona Schubert

Laborfachhandel, Espenhain

PP-Masterblock, 1 ml - 96well; 780201, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

Sterile PS Test Tubes 14ml; TPP, Schweiz

2.1.3.2. Geräte

Sterilbank HERASAFE HSPC 18; Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Inverses Mikroskop Axiovert 25; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Unitherm 190, Wassermantel-C02 -Brutschrank; Uni Equip Leipzig

Unitherm Schüttelwasserbad WA-25; UniEquip Laborgerätebau, Martinsried

Mikrotiterplattenschüttler TITRAMAX 101; Heidolph Instruments, Schwabach

Pipettierautomat Biomek 2000; Beckman Coulter, Unterschleissheim

Taumel-Rollenmischer; Rettberg Laborgeräte Glasapparatebau, Göttingen

ELISA-Washer Columbus; Tecan, Crailsheim

Photometer Spectra Image; Tecan, Crailsheim

Zentrifuge ROTIXA 50RS; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tischzentrifuge MIKRO 22R; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Zentrifuge ROTINA 46R; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Mikrozentrifuge; Labnet, USA

Lightcycler PCR System; Roche Diagnostik, Mannheim

2.1.3.3. Software

Die ELISA- Systeme wurden unter Verwendung des Programms EasyWin Kinetics 32 (EasyWin-Software, Tecan, Crailsheim) gemessen. Realtime PCR Messungen sowie Datenauswertung erfolgte mit der Software LightCycler 3.5.3 (LightCycler-Software, Roche, Mannheim). Die Statistische Datenerhebung erfolgte mit dem Programm STATISTICA 5.5 (StatSoft, Inc., USA). Zur graphischen Darstellung der erhobenen Werte wurde Excel 97 (für Windows NT, Microsoft Corporation) verwendet. Die Anfertigung der Dissertationsarbeit erfolgte mit Word 97 (für Windows NT, Microsoft Corporation, USA).

2.2. Methoden

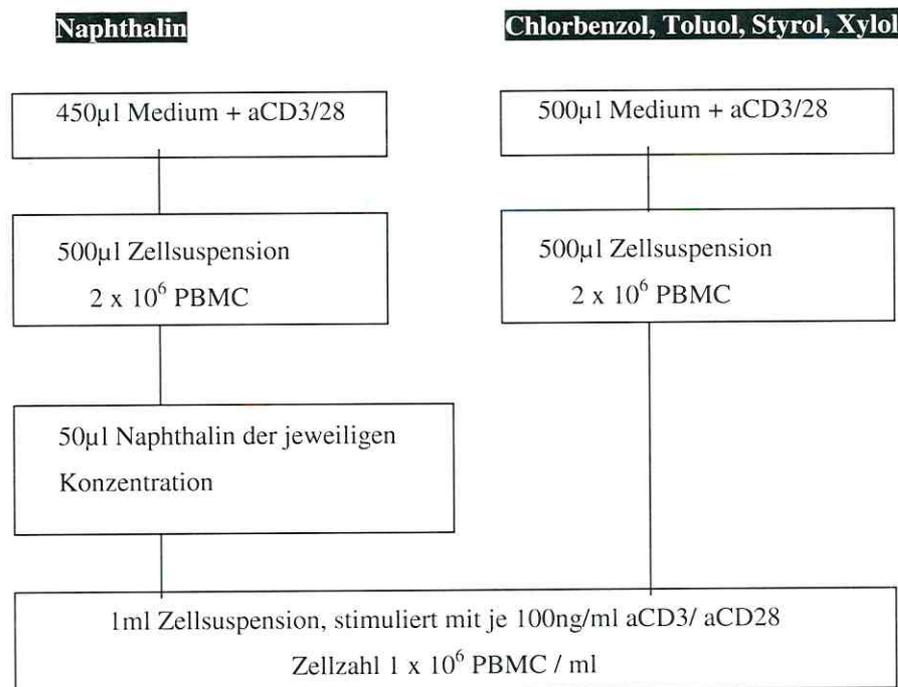
2.2.1. Präparation mononukleärer Zellen (PBMC)

Die Präparation der peripheren Spenderblutzellen erfolgte in der Sterilbank. Der Buffy-Coat (50ml) wurde mit 50ml steriler PBS verdünnt. In vier sterile 50ml Zentrifugenröhrchen wurde jeweils 12,5ml Ficoll Paque vorgelegt und mit jeweils 25ml verdünntem Buffy-Coat vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1750 U/min und Raumtemperatur (RT) für 20 Minuten. Der resultierende Leukozytenring wurde in ein weiteres 50ml Zentrifugenröhrchen steril abpipettiert und zweimal mit 50ml PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1250 U/min, 10 min und RT), der Überstand wurde dabei verworfen. Nachfolgend wurde eine Zellkernzählung mit Türks Lösung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, worauf ein letzter Waschschrift folgte. Die Zelldichte wurde auf 1×10^7 PBMC/ml eingestellt.

2.2.2. Durchführung der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als Medium wurde CO₂-unabhängiges Medium ohne L-Glutamin verwendet, welchem 1% BME-Aminosäuren ohne Glutamin, 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und 10% Fetales Kälberserum (FKS)

zugesetzt wurde. Die aus dem Buffy-Coat präparierten PBMC wurden mit dem Kulturmedium zu einer homogenen Suspension vermischt und auf eine Dichte von $2 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Die Aufteilung auf die Zellkulturrohre erfolgte nach folgendem Schema:



Schema 1: Herstellung der Zellkulturansätze für die verschiedenen VOC-Experimente

Zuerst erfolgte die Vorlage der stimulierenden Antikörper in 450 µl bzw. 500 µl Zellkulturmedium mit 222,22 ng/ml bzw. 200 ng/ml aCD3/ aCD28. Nach einer kurzen Erwärmungsphase im Brutschrank wurden 500 µl PBMC Zellsuspension ($2 \times 10^6/\text{ml}$) zugegeben. Beim Versuchsansatz von Naphthalin wurden im Anschluss daran noch je 50 µl der unter Abschnitt 2.2.3.1. aufgeführten Verdünnungen zugegeben. In allen Zellkulturansätzen wurde die Konzentration somit auf 1×10^6 PBMC/ml und je 100 ng/ml stimulierende Antikörper aCD3 und aCD28 eingestellt.

Die *in vitro* Kultur wurde in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre über einen Zeitraum von 24h durchgeführt.

2.2.3. Durchführung der Immunmodulationsversuche

Die Messungen erfolgten in Triplikatreihen. Alle getesteten Verbindungen sind flüchtige Verbindungen, die unter Zellkulturbedingungen (37°C) sehr schnell in die Gasphase übertreten. Um eine Kontamination des CO₂-Brutschrankes mit Chemikalien zu vermeiden und gleichzeitig zu garantieren, dass die applizierte Chemikalienkonzentration tatsächlich in der Zellkultur verbleibt, erfolgte die Zellkultur in geschlossenen Systemen. Dafür wurden die Zellkulturröhrchen in 500ml Glasflaschen eingestellt und nach Applikation der Chemikalien fest verschlossen (siehe Abbildung 2). Die Verwendung von 14ml Zellkulturröhrchen mit speziellen Kappen ermöglichte dabei einen Gasaustausch aus der Flasche in die Zellkulturröhrchen, so dass sich in diesen eine gleichmäßige Atmosphäre der zu untersuchenden Verbindung bilden konnte. Zwischen Gasphase und Zellkulturmedium stellte sich ein Diffusionsgleichgewicht ein. Durch die Verwendung von CO₂-unabhängigem Zellkulturmedium wurde gewährleistet, dass auch in der verschlossenen Flasche optimale Zellkulturbedingungen vorhanden waren.

Die Versuchsreihe für Naphthalin erfolgte mittels der Applikation der in Dimethylsulfoxid (DMSO) seriell verdünnten Verbindung direkt in die Zellkulturröhrchen. Bei allen anderen VOCs wurden serielle Verdünnungsreihen mit Methanol hergestellt und die Chemikalien über die Gasphase appliziert.

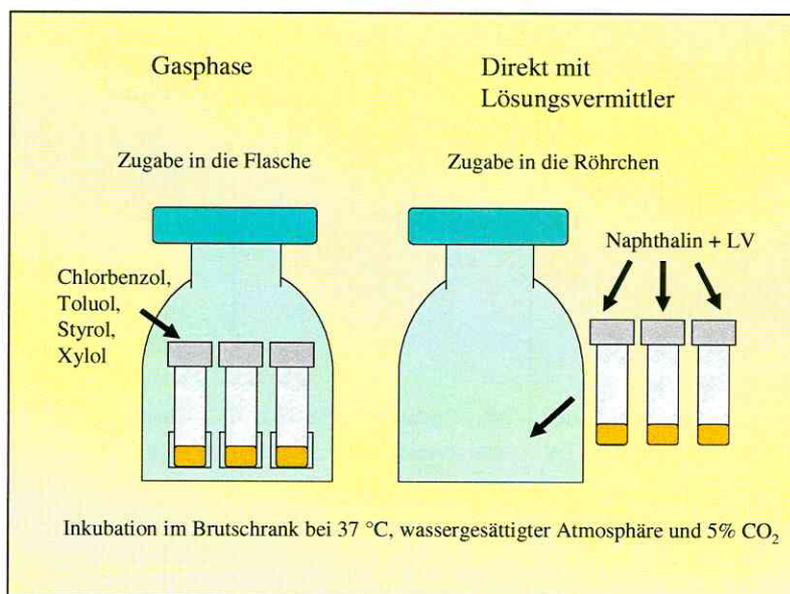


Abb. 2: Darstellung der unterschiedlichen Applikationsweisen je nach VOC

2.2.3.1. Vorbereitung und Applikation der Proben

Die chemische Struktur der flüchtigen organischen Verbindungen erlaubte aufgrund ihres hydrophoben Charakters keine direkte Applikation der einzelnen Substanzen in eine Zellsuspension. Es wurde daher nach einer Möglichkeit gesucht, die Zellen in der wässrigen Lösung in Kontakt mit den schwer löslichen und leicht flüchtigen Verbindungen zu bringen.

Naphthalin

Bei Naphthalin gelang die Applikation mittels Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO), da sich die Substanz langsamer verflüchtigt als die restlichen. Die Verdünnungsreihe wurde erst unmittelbar vor der Applikation erstellt. Zur Herstellung der höchsten Konzentration wurde eine Lösung von 5mg Naphthalin pro 1ml DMSO angefertigt. Von dieser Lösung wurden dann 100µl in 900µl Zellkulturmedium überführt, gründlich resuspendiert mittels Schüttler (Vortex Genie 2, Scientific Industries) und aus dieser Lösung wiederum 100µl in 900µl Zellkulturmedium überführt. Zur Herstellung der nächst-niedrigeren Konzentration erfolgte zunächst eine parallele Verdünnungsreihe in DMSO. Dabei wurde aus der ursprünglichen Konzentration eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe mit DMSO hergestellt. Anschließend wurden in einem weiteren Schritt jeweils 10µl aus den einzelnen Verdünnungsstufen in DMSO in 990µl Zellkulturmedium überführt und sorgfältig suspendiert.

Tabelle 3.1: Herstellung der Naphthalin- Verdünnungsreihe

Ansatz	1. Verdünnung	2. Verdünnung	appl. Menge	Endkonzentration in der Zellkultur	
				Naphthalin	DMSO
P4	1ml DMSO		50µl		5%
P3	100µl aus P4 +900µl ZKM		50µl		0,5%
P2	100µl aus P2 +900µl ZKM		50µl		0,05%
1	Ausgangslösung 5mgNaphthalen/ ml DMSO		50µl	250µg	5%
2	100µl aus 1 +900µl ZKM		50µl	25µg	0,5%
3	100µl aus 2 +900µl ZKM		50µl	2,5µg	0,05%
4	100µl aus 1 +900µl DMSO (=4a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	250ng	0,05%
5	100µl aus 4a +900µl DMSO (=5a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	25ng	0,05%
6	100µl aus 5a +900µl DMSO (=6a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	2,5ng	0,05%
7	100µl aus 6a +900µl DMSO (=7a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	250pg	0,05%
8	100µl aus 7a +900µl DMSO (=8a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	25pg	0,05%
9	100µl aus 8a +900µl DMSO (=9a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	2,5pg	0,05%
10	100µl aus 9a +900µl DMSO (=10a)	10µl + 990µl ZKM	50µl	250fg	0,05%

Jeweils 50µl dieser Naphthalin- Verdünnung wurde in die Zellkulturröhrchen appliziert, so dass eine DMSO Konzentration von 5% in der höchsten, 0,5% in der folgenden und 0,05% in den Konzentrationen 3 bis 10 vorlag. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, wurde die DMSO- Konzentration der Kontrollen angepasst. P4 wurde somit als Kontrolle für 1, P3 als Kontrolle für 2 verwendet, und P2 für die Konzentrationen 3-10.

Chlorbenzol, Styrol, Toluol und Xylol

Die Applikation der übrigen VOCs ließ keine direkte Applikation in die Zellsuspension zu, da sich selbst unter Zuhilfenahme von DMSO keine homogene Lösung erzielen ließ und sich die zugegebenen Verbindungen nach Applikation sofort wieder aus der Zellsuspension verflüchtigten.

Hohe Konzentrationen der Verbindungen wurden direkt appliziert, ab einem Volumen kleiner 5µl erfolgte eine Verdünnung in Methanol zur besseren Applizierbarkeit und zur Verringerung der Schwankungen infolge Abdampfung. Die Konzentrationsreihe wurde erstellt, indem 500µl bzw. 150µl der Testsubstanz in Methanol seriell verdünnt wurden. Nach Applikation der jeweiligen Dosis wurden die Flaschen, welche die entsprechenden Zellkultur-Triplikate der Spender enthielten, dicht verschlossen und für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Dabei wurden für die jeweiligen VOCs folgende Konzentrationen appliziert:

Tabelle 3.2: Exposition der Zellkulturen mit Chlorbenzol, Styrol, Toluol und m-Xylol. Angegeben sind die applizierten Volumina und die jeweilige Konzentration in der Gasphase. Die Konzentrationsberechnungen basieren auf der Annahme, dass sich die applizierten Chemikalien in 600cm³ Flaschenvolumen verflüchtigen.

	Chlorbenzol	Styrol	Toluol	m-Xylol	Methanol
	[mg/m ³ Luft]				
P2					13115,00
500,00 µl	918330,00	754916,67	725000,00	716666,67	
150,00 µl	275499,00	226475,00	217500,00	215000,00	
50,00 µl	91833,00	75491,67	72500,00	71666,67	
15,00 µl	27549,90	22647,50	21750,00	21500,00	
5,00 µl	9183,30	7549,17	7250,00	7166,67	
1,50 µl	2754,99	2264,75	2175,00	2150,00	11147,75
0,50 µl	918,33	754,92	725,00	716,67	12459,25
0,15 µl	275,50	226,48	217,50	215,00	12918,28
0,05 µl	91,83	75,49	72,50	71,67	13049,43

Die Entnahme der Kulturüberstände nach 24 Stunden im Brutschrank erfolgte bei allen VOCs gleich. Die 14ml Kulturröhrchen wurden aus der Flasche entnommen und bei 1250 U/min und RT 10min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Entnahme der zellfreien Kulturüberstände. Es wurden pro Röhrchen 750µl entnommen und in 96er Masterblock Platten überführt, die bis zur ELISA- Analyse bei -20°C gelagert wurden. Die verbleibenden Zellen wurden entweder im MTT (3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) –Assay einem Vitalitätstest unterzogen oder zur Präparation von mRNA weiterverarbeitet.

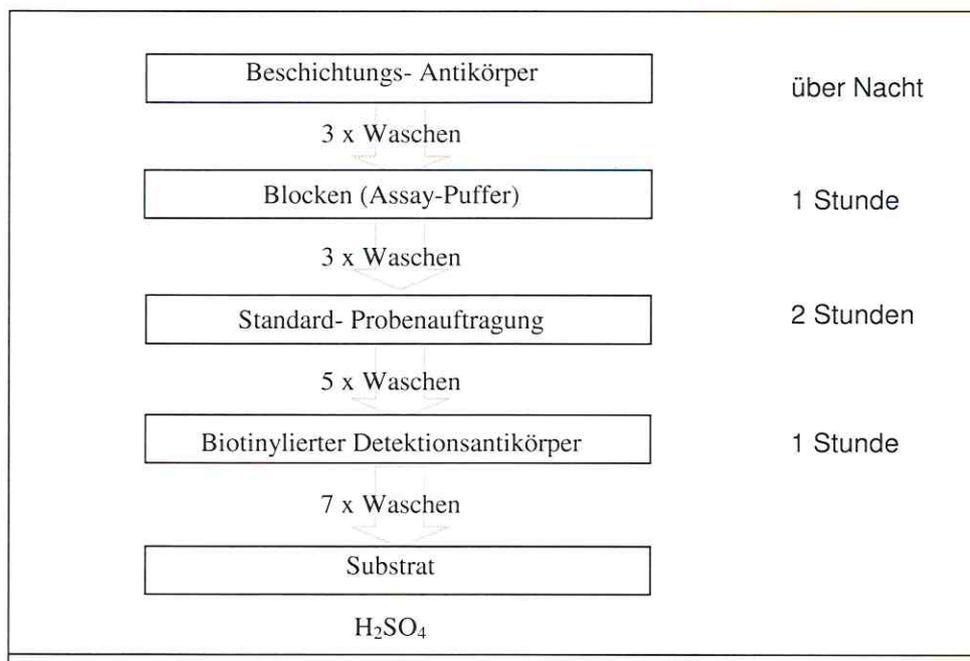
2.2.3.2. Durchführung und Messung der ELISA- Systeme

2.2.3.2.1. Prinzip der Methode

Das Grundprinzip der zur Messung der Zytokinkonzentration in den Kulturüberständen verwendeten ELISAs (enzyme linked immunosorbent assay) ist ein indirekter Sandwich-ELISA. Die Durchführung der ELISA erfolgte unter Verwendung von OptEIATM-ELISA-Kits (Becton Dickinson Biosciences) für IFN- γ , IL-4, IL-2 und TNF- α . Es wurden 384er Nunc MaxiSorp[®]-Immunoplaten verwendet.

Die Beschichtung der Kavitäten beginnt mit den als Fangantikörper fungierenden monoklonalen Antikörpern, die an die Kavitätenwand binden. Es folgen ein Waschschriff und die Blockung noch verbleibender freier Bindungsstellen mit Protein aus FKS. Nach dem nächsten Waschschriff werden die Proben aus den Kulturüberständen aufgetragen. Zur genauen Bestimmung der Konzentration in diesen Proben wird parallel eine Reihe standardisierter Zytokinlösungen mit bekannten Konzentrationen aufgetragen, aus welcher später die Eichkurve erstellt wird. Nach zweistündiger Inkubationszeit, in der die Bindung der gesuchten Zytokine an die vorgelegten Antikörper erfolgte, wird die Platte einem weiteren Waschschriff unterzogen. Es folgt die Zugabe und Bindung eines zweiten, als Detektionsantikörper fungierenden biotinylierten Antikörpers, der gleichzeitig die Bindung eines Avidin-markierten POD-Kunjugates ermöglicht. In einem letzten Waschschriff wird nicht an den Antikörper-Zytokin-Antikörperkomplex gebundenes Enzym entfernt und die Enzym-Substrat-Reaktion mit Zugabe von TMB gestartet. Diese Reaktion ist durch eine Farbveränderung proportional zur Menge gebundener Zytokin-Komplexe gekennzeichnet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt nach 30 bis 60 Minuten, je nach Zytokin, mit der Zugabe von 1M Schwefelsäure. Unverzüglich danach findet die photometrische Messung im ELISA-

Reader statt. Aus den mitgeführten Standardkonzentrationen wird eine Kalibrationskurve interpoliert, die die Umrechnung der gemessenen Extinktionen der Proben in Menge Zytokingehalt gestattet.



Schema 2: Durchführung der ELISAs unter Verwendung von OptEIA™-Kits

2.2.3.2.2. Beschichtung der ELISA- Platten

Die Beschichtungsantikörper wurden in steriler PBS auf die entsprechende optimale Beschichtungskonzentration mit steriler PBS verdünnt (IFN- γ 1:1000, TNF- α 1:500, IL-2 1:500 und IL-4 1:250). Die Platten wurden mit 50 μ l der verdünnten Beschichtungs-Antikörper pro Kavität befüllt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Um nicht an die Kavitätenwand gebundene Beschichtungsantikörper zu entfernen, wurden die Platten mit dem ELISA-Platten-Washer Columbus (Tecan, Crailsheim) drei aufeinanderfolgenden Waschschritten unterzogen (150 μ l PBS/Tween / Kavität). Anschließend wurden die Platten auf Zellstoff ausgeschlagen, um mögliche Waschpufferreste zu entfernen. Eventuell freie Proteinbindungsstellen wurden im Anschluss daran mit 100 μ l PBS/ 10% FKS (Assay Puffer) / Kavität für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur geblockt.

2.2.3.2.3. Erstellung und Auftragung der Standard-Verdünnungsreihe

Während der Inkubationszeit erfolgt die Erstellung einer Standardverdünnungsreihe. Dabei wurden die im OptEIA-Kit enthaltenen Zytokinstandards bekannter Konzentration in Assay-Puffer seriell 1:2 verdünnt. Es wurde eine zwölfstufige geometrische Verdünnungsreihe erstellt, die den zu erwartenden Konzentrationsbereich der zu messenden Zytokine in den Kulturüberständen einschloss. Die Auftragung der Standardkonzentrationen erfolgte in Duplikaten.

2.2.3.2.4. Auftragung der Kulturüberstände

Nach Ablauf der vorgegebenen Zeit zum Blocken der freien Proteinbindungsstellen folgten weitere Waschschrte (3 x 150 μ l PBS/T /Kavität). Zur Vermeidung von Trocknungsartefakten wurde nach dem letzten Waschschrte Assay-Puffer in unterschiedlicher Menge je nach Zytokin vorgelegt. Bei der Standardauftragung wurden 60 μ l Assay-Puffer vorgelegt, bei IL-4-Probe 10 μ l, bei IL-2-Probe, IFN- γ -Probe und TNF- α -Probe 25 μ l.

Bei der Auftragung der Standards wurden 50 μ l der erstellten Verdünnungsreihe auf die vorgelegte Menge Assay-Puffer gegeben, beim Pipettieren der Kulturüberstände wurden 100 μ l für den IL-4-ELISA und 50 μ l für den Nachweis von IL-2, IFN- γ und TNF- α aufgetragen. Nach einer Inkubation von 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei RT folgten erneut Waschschrte (5 x 150 μ l PBS/T /Kavität).

2.2.3.2.5. Herstellung und Auftragung der biotinylierten Detektions-Antikörper

Die biotinylierten Antikörper und das Avidin-POD-Konjugat wurden in Assay-Puffer verdünnt (IFN- γ 1:1000, TNF- α 1:500, IL-2 1:500 und IL-4 1:250), zusammengegeben, 15 min inkubiert und mit je 50 μ l in die Kavitäten verteilt. Nach einer einstündigen Inkubation in der feuchten Kammer bei RT folgten wiederum Waschschrte (7 x 150 μ l PBS/T /Kavität).

2.2.3.2.6. Anwendung der Substratpuffer im ELISA

Das Substrat (TMB Reagent A und B) wurde auf Raumtemperatur erwärmt, kurz vor Applikation wurden die Lösungen A und B zusammengeführt. Im direkten Anschluß an den letzten Waschschrift wurden je 50µl Substrat/ Kavität aufgetragen und im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach erfolgtem Substratumsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄ / Kavität abgestoppt.

2.2.3.2.7. Messung und Auswertung der ELISA-Systeme

Die Messung der optischen Dichte erfolgte am ELISA-Reader (Photometer Spectra Image, Tecan) bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm. Die Konzentration der jeweiligen Zytokine konnte aus den interpolierten Eichkurven der aufgetragenen Standardkonzentrationen ermittelt werden. Die Auswertung der Meßergebnisse wurde mittels *EasyWin Kinetics 32* (EasyWin-Software, Tecan, Crailsheim) durchgeführt, die resultierende Konzentration in Excel 97 (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) berechnet.

2.2.3.3. MTT-Test

2.2.3.3.1. Prinzip der Methode

Der MTT-Test (Mosmann, 1983) ist ein kolorimetrischer Test und beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes 3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid mit NADH zu blauen Formazankristallen durch eine katalytische Reaktion über zelluläre Dehydrogenasen. Succinatdehydrogenasen sind nur in lebenden Zellen aktiv. Dies bedeutet, die Umwandlung von MTT kann als Maß für die Vitalität der Zellen dienen.

2.2.3.3.2. Durchführung des MTT-Tests

Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Entnahme der zellfreien Kulturüberstände. Zu den verbleibenden 250µl Zellkultur wurden jeweils 25µl der MTT- Stammlösung (5mg MTT /ml

PBS) hinzugegeben. Im Anschluss daran erfolgte eine vierstündige Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank.

Nach dieser Zeit wurden 100 µl Stop-Lösung (10% Sodiumdodecylsulfat (SDS) in 50% Dimethylformamid) hinzugegeben, die Ansätze geschüttelt und zur weiteren Auflösung der Farbkristalle bei 37°C und wassergesättigter Atmosphäre über Nacht stengelassen. 300 µl wurden je 14ml Röhren entnommen und in eine 96er Mikrotiterplatte überführt. Die optische Dichte wurde am ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm (Spectra Image) gemessen. Es wurden Mittelwerte aus den Triplikatanalysen berechnet und auf die jeweils mitgeführte Kontrolle bezogen. Die Ergebnisse wurden in Prozent dargestellt (% Vitalität/Proliferation = Mittelwert OD Schadstoff / Mittelwert OD Kontrolle x 100).

2.2.3.4. Nachweis der m-RNA Expression von Zytokinen mittels *real-Time* PCR

Im Anschluß an die 24stündige Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen (wie unter Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben) und nach Abnahme der Kulturüberstände erfolgte die Präparation von mRNA aus den verbleibenden Zellen. Dafür wurden die Triplikate gepoolt.

2.2.3.4.1. mRNA-Präparation

Zur Präparation wurde der E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Der Kit enthält alle dafür benötigten Puffer und Materialien mit Ausnahme von DEPC-Wasser, Ethanol und β-Mercaptoethanol. Zur Isolation der RNA wurde nach dem E.Z.N.A.[®] Total RNA Isolierungsprotokoll für eukaryotische Zellen und Gewebe verfahren.

Zu den gepoolten Zellen wurden jeweils 200µl TRK-Lysepuffer gegeben und das so gewonnene Lysat in ein RNase-freies 1,5ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses Zelllysate wurde mit einem identischen Volumen 70% Ethanol versetzt und durch Vortexen sorgfältig gemischt. Anschließend wurde die Probe auf eine HiBind[®]-Zentrifugensäule geladen und für 15 sec bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Im Anschluß daran folgte der erste Waschschriff, indem auf die Säule 750 µl RNA-Waschpuffer I pipettiert und nochmals für 15 sec bei 10000 x g zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Daraufhin erfolgte ein zweimaliges Waschen der Säule mit 500 µl RNA-Waschpuffer II bei einer Zentrifugation für 15 sec und 10000 x g. Das Trocknen der Säule

erfolgte durch einminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit. Danach wurde die Zentrifugensäule auf ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben und mit 50 μ l sterilem DEPC-Wasser durch eine einminütige Zentrifugation bei 10000 x g eluiert.

Das RNA- Eluat wurde für einen Tag bei -32°C gelagert und unmittelbar nach dem Auftauen in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) umgeschrieben.

2.2.3.4.2. cDNA-Synthese

Die Transkription in cDNA wurde mittels AMV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) entsprechend der Herstellerbeschreibung bei 42°C und 60 min mit einem dNTP Set und oligo-dT (5'-pd(T)₁₂₋₁₈-3') als Primer (beide von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Alle Schritte der Transkription wurden auf Eis durchgeführt. Die Zusammensetzung des cDNA-Mixes zur Umschreibung der RNA in cDNA zeigt folgende Tabelle (Angaben pro RNA-Probe):

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des cDNA- Mixes

	Stammlösung	Endkonzentration
5 x Puffer	4 μ l	
dNTP's	2 μ l (2mM)	(0,2mM)
oligo-dT	0,2 μ l (19,6 U/ μ l)	(0,2 U/ μ l)
DEPC-Wasser	3,3 μ l	
AMV-RT	0,5 μ l (10 U/ μ l)	(0,25U/ μ l)

Es wurden jeweils 10 μ l des cDNA-Mixes in ein RNase-freies Eppendorf-Tube vorgelegt und mit 10 μ l RNA gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 42°C wurde die erhaltene cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -32°C gelagert und der noch verbleibende Rest RNA bei -78°C kryokonserviert.

2.2.3.4.3. Real-Time PCR

2.2.3.4.3.1. Prinzip der Methode

Es handelt sich um ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte Abschnitte einer vorgelegten DNA amplifiziert werden. Das Grundprinzip besteht in der Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Schritten: Denaturierung der DNA mittels hoher Temperaturen (95°C), Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden (Primer) und Neusynthese der von zwei Primern eingerahmten DNA-Sequenz. Die spezifische Auswahl der Primer gestattet die individuelle Auswahl der gesuchten DNA-Sequenz. Jede Wiederholung verdoppelt die Menge neusynthetisierter DNA-Abschnitte, so dass nach den angewendeten 40 Zyklen 2^{40} Einzelsequenzen der nachzuweisenden DNA-Sequenz vorliegen. Zur Quantifizierung wird ein externer Standard (GenExpress, Berlin) verwendet, der parallel in logarithmischer Verdünnung angewendet den zu erwartenden Bereich an Proben-DNA abdeckt.

2.2.3.4.2. Vorbereitung der PCR

Die Real-Time PCR wurde entsprechend den Herstellerangaben zum LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reagenz Kit (Roche Diagnostik, Mannheim) für GAPDH, IFN- γ und IL-4 durchgeführt. Die unterschiedlichen Volumina der einzelnen Reagenzien für die jeweiligen PCR-Ansätze sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Tab. 3.4: Angabe der Reagenzien für die verschiedenen PCR-Ansätze.

	GAPDH	IL-4	IFN- γ
DEPC-Wasser	11,6 μ l	10,8 μ l	12,4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ l	3,2 μ l	1,6 μ l
Primer (10 μ M) sense	1 μ l	1 μ l	1 μ l
antisense	1 μ l	1 μ l	1 μ l
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	2 μ l	2 μ l	2 μ
cDNA-Probe	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Endvolumen	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Die Molaritäten von Magnesiumchlorid betragen für GAPDH 4 mM, für IL-4 5 mM und für IFN- γ 3 mM. 18 μ l des PCR-Ansatzes wurden in die *LightCycler*-Kapillaren pipettiert.

Es wurden folgende Primer verwendet:

GAPDH	sense:	5'-GTCAGTGGTGGACCT-3'
	antisense:	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'
IL-4	sense:	5'-AGAAGACTCTGTGCACCGATTGA-3'
	antisense:	5'-CTCTCATGATCGTCTTTAGCCTTT-3'
IFN- γ	sense:	5'-TTCAGCTCTGCATCGTTTTG-3'
	antisense:	5'-TCAGCCATCACTTGGATGAG-3'

2.2.3.4.3. Durchführung der PCR

Alle PCR-Ansätze wurden mit 40 Zyklen durchgeführt und mit einem zehnminütigem Denaturierungsschritt bei 95°C gestartet. Der Nachweis der einzelnen Zytokin-mRNA (bzw. cDNA) wurde mit individuellen Amplifikationsprotokollen geführt, die nachfolgend aufgeführt sind.

Tab. 3.5: Amplifikationsprotokolle

	GAPDH	IL-4	IFN- γ
Denaturierungsphase	95°C, 0 s	95°C, 1 s	95°C, 0 s
Hybridisierungsphase	64°C, 5 s	64°C, 10 s mit einer um 0,5°C pro Zyklus erniedrigte Annealingtemperatur bis zum Erreichen der Endannealingtemperatur von 58°C bei Zyklus 17	64°C, 5 s
Synthesephase	72°C, 17 s	72°C, 16 s	72°C, 16 s

Die Spezifität der PCR wurde im Anschluß an die Amplifikation durch die schrittweise Denaturierung der DNA in einem Bereich von 58°C bis 95°C und die damit erhaltene typische Schmelzkurve kontrolliert. Die Ergebnisse wurden mit einem aus der Analyse des *Housekeeping*-Gens GAPDH stammenden Faktor korrigiert und als Prozent der Zytokinexpression bezogen auf die Kontrolle dargestellt (% Zytokinexpression = Anzahl der Kopien der Toxin belastete Probe/Anzahl der Kopien der Kontrolle x 100).

2.2.4. Statistische Auswertung

Mit statistischen Methoden wurde geprüft, ob vorhandene Unterschiede in den Messwerten zufällig oder als nicht zufällig anzusehen sind. Dabei wurde der Grenzwert für die Entscheidung, wo die zufallsbedingten Unterschiede aufhören, bei 5% ($p < 0,05$) festgelegt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des nicht parametrischen Mann-Whitney U-Tests für nicht normal verteilte Proben ermittelt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm STATISTICA 5.5 (StatSoft, Inc., USA).

3. Ergebnisse

3.1. In vitro Modell zur Bestimmung immunmodulatorischer Effekte

Die Anwendung des unter 2.2.3. erläuterten Verfahrens gestattete es, immunmodulierende Effekte der zu untersuchenden Verbindungen auf die PBMC zu untersuchen. Effekte auf die Zellvitalität wurden mittels MTT- Test untersucht, die konzentrationsabhängige Auswirkung auf die funktionelle Aktivität von peripheren Lymphozyten wurde über die Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA erfasst.

Um immunstimulatorische bzw. immuninhibitorische Effekte der zu testenden flüchtigen Organika nachweisen zu können, erfolgte eine suboptimale Stimulation der PBMC mit jeweils 100ng/ml anti-human (ah)CD3- bzw. ahCD28- Antikörper. Diese Methode der Zellstimulation erlaubt die Erfassung sowohl inhibitorischer als auch stimulatorischer Effekte der zu testenden Substanzen. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der eingesetzten ahCD3/ ahCD28- Stimulation auf die Zellvitalität/ Zellproliferation und die Zytokinproduktion der Lymphozyten dargestellt.

3.1.1. Zellproliferation nach ahCD3/ ahCD28- Stimulation

Die Stimulation der humanen PBMC erfolgte mit jeweils 100ng/ml ahCD3 (Klon UCTH-1) und ahCD28 (Klon CD28.2) über 24 Stunden. Bei jedem experimentellen Ansatz wurden zur Kontrolle ein Triplikat unstimulierter Zellen (N) und ein Triplikat stimulierter Zellen (P1) mitgeführt. Tabelle 3.1 zeigt den Effekt der Stimulation mit ahCD3/ ahCD28- Antikörper auf die Vitalität von PBMC.

Tabelle 3.1: Median und 1. bzw. 3. Quantil der relativierten MTT- Ergebnisse nach 24h in vitro- Kultur, bezogen auf unstimulierte PBMC als Ausgangswert (=100%). Zusammengefasste Ergebnisse von 10 Spendern.

Stimulation	Median	25%-Quantil	75%-Quantil
ohne Stimulation (N)	100,00%	100,00%	100,00%
mit CD3/CD28 (P1)	109,53%	83,99%	123,18%

Die eingesetzte immunologische Stimulation bewirkt keine signifikante Stimulation der Zellproliferation während der 24-stündigen Kultivierung.

3.1.2. Zytokinproduktion nach ahCD3/ ahCD28- Stimulation

Die getesteten Spender zeigten in der Reaktion auf die eingesetzte Immunstimulation markante Unterschiede, wodurch sich Variationen in der Zytokin- Konzentration in den Kulturüberständen der verschiedenen Spender ergaben. Tabelle 3.2 zeigt die gemessenen Zytokinkonzentrationen jeweils bezogen auf die unstimulierten Kontrollen (N), welche auf 100% gesetzt wurden.

Tab. 3.2: Mediane und Quantilsabstände der Konzentrationen an IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α in den zellfreien Kulturüberständen nach 24h Kultivierung mit und ohne Stimulation durch ahCD3/ ahCD28. Zusammengefasste Ergebnisse von 10 Spendern.

Stimulation	absolute Zytokinproduktion		relative Zytokinproduktion	
	Median in [pg/ml] (25%/ 75% Quantil)		Median in [%] (25%/ 75% Quantil)	
IL- 4				
Unstimuliert (N)	3,9	(1,1/ 6,4)	100,0	
Stimuliert mit ahCD3/ahCD28 (P1)	30,7	(15,0/ 41,3)	796,2	(388,5/ 1070,7)
IL- 2				
Unstimuliert (N)	148,4	(32,7/ 999,9)	100,0	
Stimuliert mit ahCD3/ahCD28 (P1)	530,4	(227,7/ 1099,0)	357,3	(153,4/ 740,5)
IFN-γ				
Unstimuliert (N)	25,1	(6,8/ 103,6)	100,0	
Stimuliert mit ahCD3/ahCD28 (P1)	210,8	(124,6/ 469,2)	838,7	(495,7/ 1866,6)
TNF-α				
Unstimuliert (N)	38,1	(23,9/ 239,8)	100,0	
Stimuliert mit ahCD3/ahCD28 (P1)	1302,6	(831,7/ 1683,5)	3414,7	(2180,2/ 4413,1)

Erkennbar ist, dass die Stimulation der PBMC zu unterschiedlich starker Sekretion der Zytokine führt.

Um die zu testenden flüchtigen Organika in die Zellkultur zu bringen, musste eine Lösungsvermittlung über DMSO bzw. eine Verdünnung in Methanol erfolgen. Im Folgenden wird der Einfluss dieser Lösungsmittel auf Zellvitalität und Zytokinproduktion dargestellt, um gegebenenfalls durch Lösungsvermittlung entstehende Modulationen ausschließen zu können.

3.1.3. Einfluss der verwendeten Lösungsmittel DMSO und Methanol auf die Proliferation/ Vitalität

Die Effekte der verwendeten Lösungsmittel auf die Zellvitalität werden in der nachfolgenden Tabelle 3.3 gezeigt:

Tab. 3.3: Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf die Zellproliferation/ Vitalität, gemessen im MTT- Test. Zusammengefasste Ergebnisse von 7 Spendern.

PBMC mit	Median	25%-Quantil	75% Quantil
ahCD3/ahCD28	100,0%	100,0%	100,0%
166,7g/m ³ Methanol	97,9%	94,8%	98,7%
0,05% DMSO	98,1%	85,2%	111,6%
0,5% DMSO	96,6%	84,1%	109,3%
5% DMSO	76,1%	69,5%	86,3%

Anhand dieser Tabelle wird erkennbar, dass sich die Effekte der DMSO- Konzentrationen im Bereich von 0,05% und 0,5% ebenso wie die Anwesenheit von 166,7g/m³ Methanol nicht signifikant ($p=0,749$) auf die Vitalität der Zellen auswirken. Eine Konzentration von 5% DMSO in der Zellkultur führt bereits zu tendenziell toxischen Effekten (ca. 24% Hemmung der Vitalität, $p=0,083274$).

3.1.4. Einfluss der verwendeten Lösungsmittel DMSO und Methanol auf Zytokinproduktion

Der Einfluss der angewandten Lösungsmittelkonzentrationen auf die Zytokinproduktion variiert je nach Zytokin. Die IL-4- Produktion wird durch 5% DMSO in der Kultur auf 9,43% ($p=0,004$) des Ausgangswertes supprimiert, die IL-2 Produktion auf 2,00% ($p=0,012$) und die TNF- α - Produktion auf 1,98% ($p=0,005$). Die TNF- α - Produktion zeigt zusätzlich schon bei einer 0,5% DMSO Konzentration eine signifikante Hemmung der Sekretion auf 20,57% ($p=0,018$). Die IFN- γ -Produktion zeigt ebenfalls eine Senkung bei 5% DMSO in der Kultur auf 27,16% mit einem Signifikanzniveau von $p=0,001$. Im Vergleich dazu trägt die Hemmung der Proliferation/ Vitalität, wie aus der oben aufgeführten Tabelle erkennbar wird, zwar

teilweise zur Senkung der Zytokin-Produktion bei, erklärt jedoch nicht die signifikanten Abweichungen vom Ausgangswert.

Tab. 3.4: Konzentrationen an IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α in den zellfreien Kulturüberständen von 7 Spendern nach 24h Kultivierung. Dargestellt sind die relativen Ergebnisse nach Bezug auf die lösungsmittelfreien Stimulationskontrollen. Signifikant erniedrigte Werte wurden mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet.

Zytokin	Median	25%-Quantil	75% Quantil
IL-4			
ahCD3/ ahCD28	100,00%	24,16%	125,30%
166,7g/m ³ Methanol	97,03%	86,54%	113,94%
0,05% DMSO	95,13%	73,64%	98,34%
0,5% DMSO	74,81%	53,80%	87,69%
5% DMSO	9,43% [#]	3,93%	31,16%
IL-2			
ahCD3/ ahCD28	100,00%	68,97%	230,48%
166,7g/m ³ Methanol	103,88%	70,72%	132,80%
0,05% DMSO	120,02%	83,70%	151,02%
0,5% DMSO	94,45%	78,25%	116,78%
5% DMSO	2,00% [#]	0,76%	20,47%
IFN-γ			
ahCD3/ ahCD28	100,00%	57,25%	205,30%
166,7g/m ³ Methanol	107,30%	102,11%	124,85%
0,05% DMSO	97,70%	81,60%	106,37%
0,5% DMSO	108,47%	98,72%	128,04%
5% DMSO	27,16% [#]	5,92%	37,65%
TNF-α			
ahCD3/ ahCD28	100,00%	50,65%	117,72%
166,7g/m ³ Methanol	108,29%	80,62%	111,86%
0,05% DMSO	92,85%	77,83%	95,49%
0,5% DMSO	20,57% [#]	18,99%	39,07%
5% DMSO	1,98% [#]	0,84%	3,67%

3.2. Effekte von VOCs auf Vitalität und funktionelle Aktivität von PBMC

Die gemessenen Effekte der getesteten flüchtigen aromatischen Verbindungen auf die PBMC werden in den nachstehenden Abschnitten aufgelistet. Es wird dabei für jede Verbindung zunächst ihre Auswirkung auf die Zellproliferation dargestellt, im Anschluss daran folgt die Darstellung von VOC-Effekten auf die Zytokinproduktion.

3.2.1. Chlorbenzol

3.2.1.1. Einfluss von Chlorbenzol auf Vitalität der Zellen

Die Auswirkung der über die Gasphase in die Zellkultur eingebrachten Konzentrationen von Chlorbenzol auf die Vitalität der PBMC ist in der folgenden Grafik dargestellt.

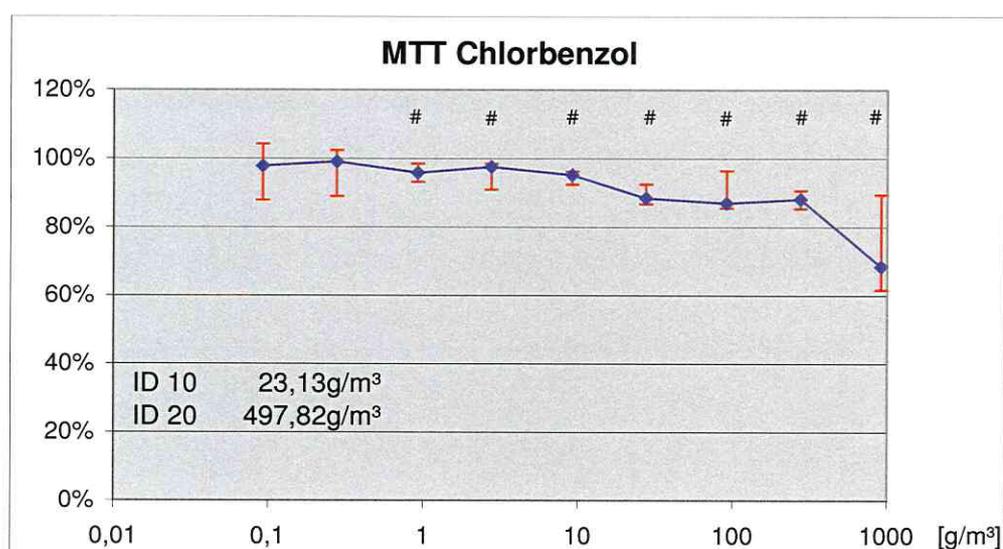


Abb. 3.1: Beeinflussung der Zellproliferation durch steigende Konzentration an Chlorbenzol. Gezeigt werden Median und 1. bzw. 3. Quantil für acht Probanden, jeweils bezogen auf die individuellen Kontrollen. Signifikant erniedrigte Zellvitalität wurde durch ein Rautezeichen (#) gekennzeichnet.

Anhand des Kurvenverlaufes wird erkennbar, dass die Zellvitalität mit steigender Chlorbenzol-Konzentration langsam abnimmt und bei der höchsten Konzentration von 918g/m^3 auf einen mittleren Wert von 70% gesenkt wird. Signifikante toxische Effekte wurden ab einer Konzentration von $0,920\text{g/m}^3$ beobachtet.

3.2.1.2. Einfluss von Chlorbenzol auf die Zytokinproduktion

Die Inkubation mit Chlorbenzol führte zu einer Hemmung der Sekretion von IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α . In den höchsten drei Konzentrationen ($91,8\text{-}918,3\text{g/m}^3$) wurde eine signifikante Hemmung der Zytokinsekretion bei allen vier gemessenen Zytokinen beobachtet. Für IL-4 und IL-2 wurden nach Exposition gegenüber niedrigen Konzentrationen an Chlorbenzol keine Abweichungen von den Kontrollwerten gesehen. Die IFN- γ -Sekretion dagegen zeigte in den drei niedrigsten Konzentrationen leicht erhöhte Messwerte. Fünf von acht Spendern zeigten in Bezug auf die TNF- α -Sekretion im Konzentrationsbereich zwischen $0,92$ und $2,75\text{g/m}^3$ stimulatorische Effekte. Bezogen auf alle getesteten Probanden war dieser Stimulationseffekt jedoch nicht signifikant.

Im Vergleich zur im MTT- Assay gemessenen Zellvitalität zeigte sich bei allen vier Zytokinen eine stärkere Hemmung der Zytokinsekretion in den höchsten getesteten Konzentrationen.

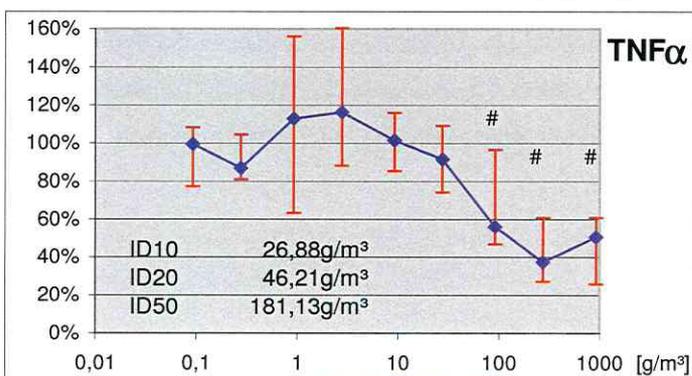
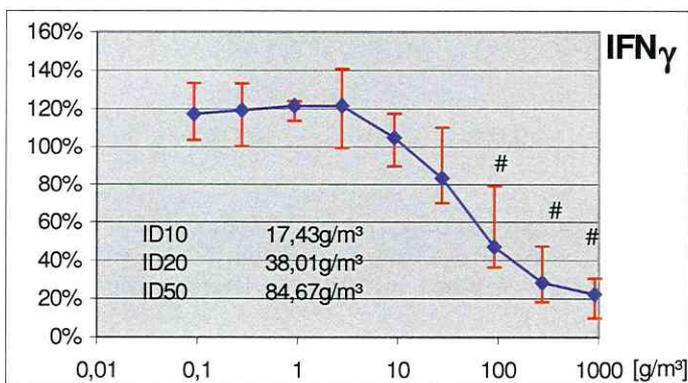
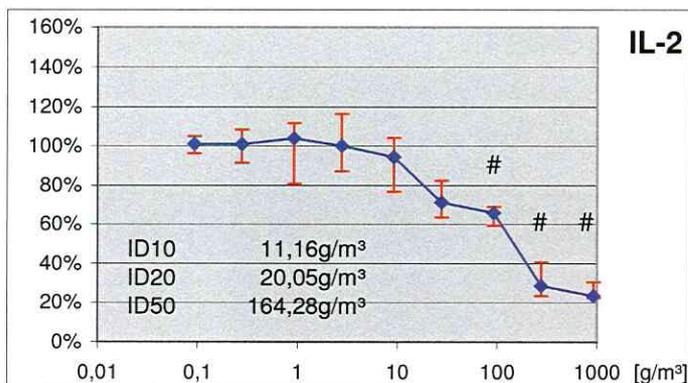
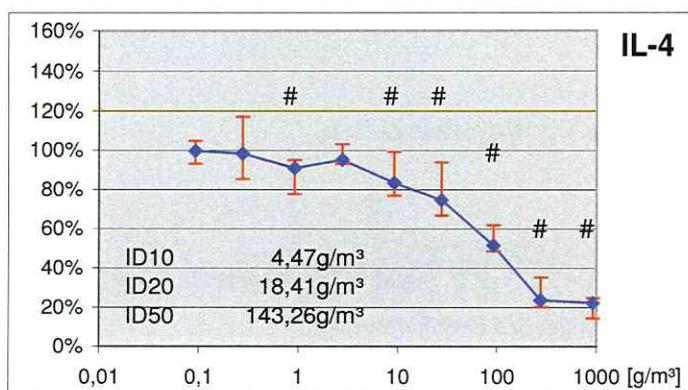


Abb. 3.2:

Einfluss einer 24stündigen Chlorbenzolexposition auf die Produktion von IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α .

Signifikant (=Abweichung von 100%) erhöhte Werte wurden mit einem Stern (*), signifikant erniedrigte mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet. Dargestellt sind Mediane sowie 25%-75% Quantil der zusammengefassten Ergebnisse von acht Spendern.

3.2.2. Styrol

3.2.2.1. Einfluss von Styrol auf die Vitalität der Zellen

Die Auswirkung der über die Gasphase in die Zellkultur eingebrachten Konzentrationen von Styrol auf die Vitalität der PBMC ist in der folgenden Grafik dargestellt.

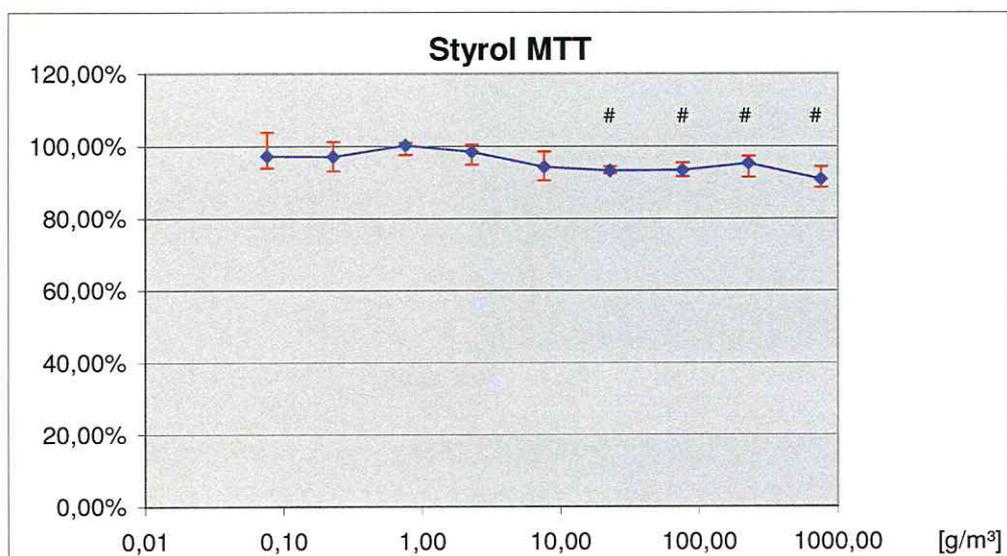


Abb. 3.3: Beeinflussung der Zellvitalität durch Styrol. Gezeigt werden Median und 25% bzw. 75% Quantil für vier Probanden, jeweils bezogen auf die individuellen Kontrollen. Signifikant erniedrigte Zellvitalität wurden mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet.

Die Messwerte zeigen eine leichte, jedoch signifikante Hemmung der Zellvitalität ab einer Konzentration von 22,64g Styrol/m³. Auffällig ist ein Ausbleiben der Zunahme der Toxizität ab der genannten Styrol- Konzentration. Die stärkste Hemmung der Zellvitalität liegt bei 9,1% und wurde bei der Probe mit der höchsten Styrol- Konzentration (754,92g/m³) gemessen.

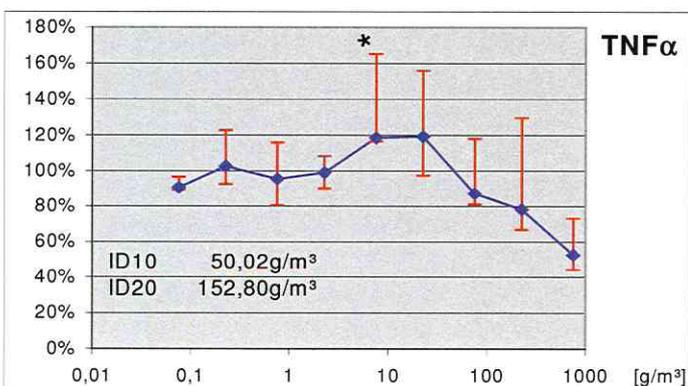
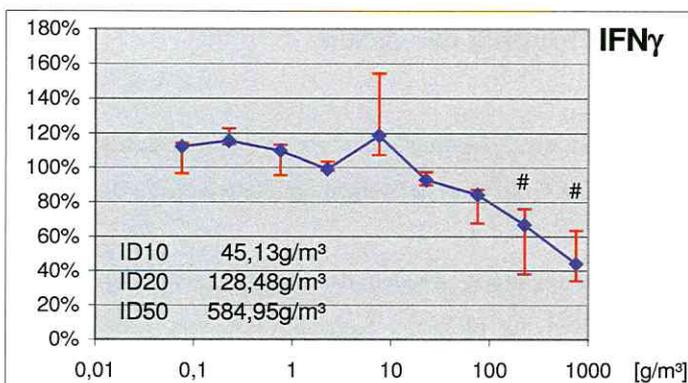
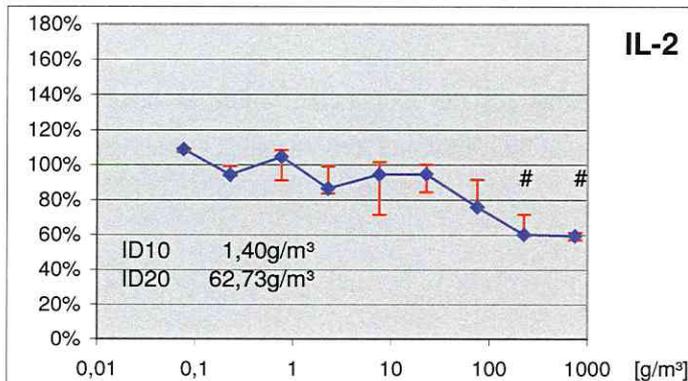
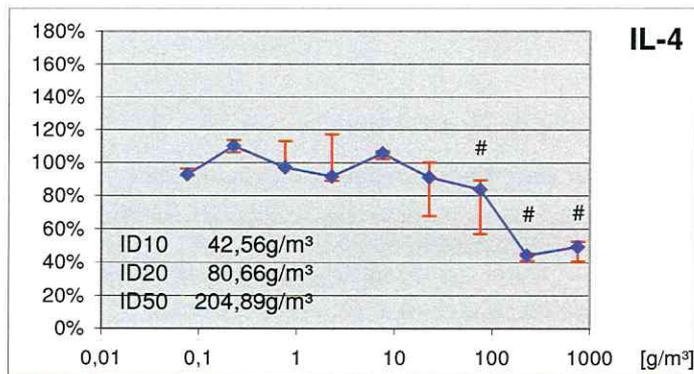


Abb. 3.4: Einfluss einer 24stündigen Styrolexposition auf die Produktion von IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α . Signifikant (=Abweichung von 100%) erhöhte Werte wurden mit einem Stern (*), signifikant erniedrigte mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet. Dargestellt sind Mediane sowie 25%-75% Quantil der zusammengefassten Ergebnisse von fünf Spendern.

3.2.2.2. Einfluss von Styrol auf die Zytokinproduktion

Die Inkubation mit Styrol führte zu einer Hemmung der Sekretionen von IL-2, IL-4 und IFN- γ . Für IL-2 und IFN- γ wurden erst in den Konzentrationen 226,5g/m³ bzw. 755g/m³ signifikante Abweichungen von den Kontrollen beobachtet. Die Sekretion von IL-4 wurde schon ab einer Konzentration von 75,5g/m³ Styrol signifikant inhibiert. Die TNF α - Sekretion war tendenziell ebenfalls nach Exposition gegenüber 226,5 bzw.755g/m³ Styrol vermindert. Wegen starker individueller Schwankungen konnten für TNF- α wiederum keine signifikanten inhibitorischen Effekte dargestellt werden. Dagegen ließ sich im Bereich von 7,55g/m³ eine Stimulation der Sekretion beobachten (p=0,009).

Im Gegensatz zu den gemessenen Effekten auf die Zellvitalität wurde in den höchsten getesteten Konzentrationen die Sekretion von IL-2, IL-4 und IFN- γ deutlich stärker gehemmt.

3.2.3. Toluol

3.2.3.1. Einfluss von Toluol auf Vitalität der Zellen

Die Auswirkung der über die Gasphase in die Zellkultur eingebrachten Konzentrationen von Toluol auf die Vitalität der PBMC ist in der Grafik auf der folgenden Seite dargestellt.

Ausgehend von nicht-signifikanten Schwankungen um den Kontrollwert zeigt sich bei der Inkubation der PBMC mit Toluol erst bei der höchsten Konzentration von 725g/m³ eine signifikante Hemmung der Zellvitalität auf 68% (p=0,008).

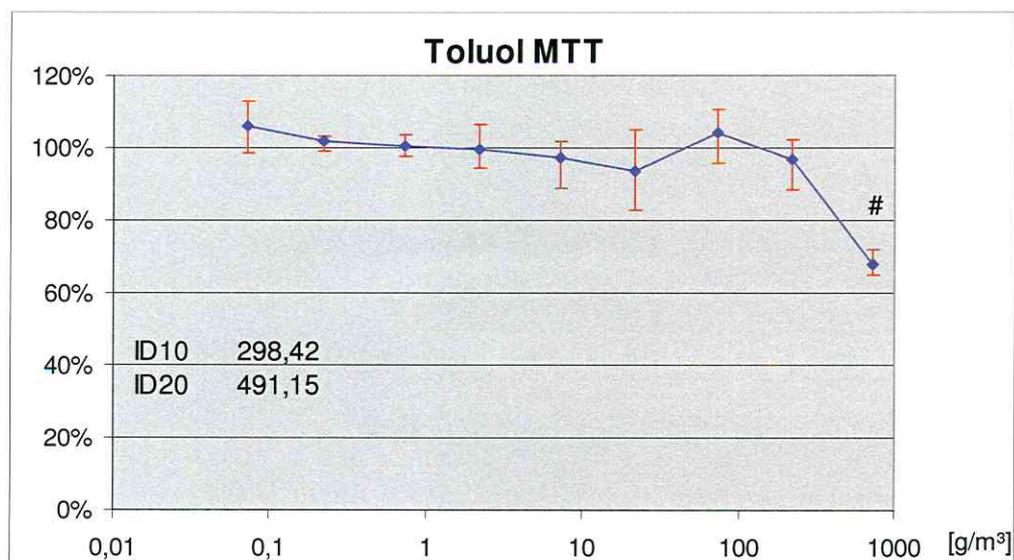


Abb. 3.5: Beeinflussung der Zellvitalität durch Toluol. Gezeigt werden Median und 1. bzw. 3. Quantil für fünf Probanden, jeweils bezogen auf die individuellen Kontrollen. Signifikant erniedrigte Zellvitalität wurde durch ein Rautezeichen (#) gekennzeichnet.

3.2.3.2. Einfluss von Toluol auf die Zytokinproduktion

Die Inkubation mit Toluol führte in den hohen Konzentrationsbereichen zu einer Hemmung der Sekretionen von IL-2, IL-4 und IFN- γ . Im Fall von IL-4 und IFN- γ wurde bereits ab einer Konzentration von 72,5g/m³ eine signifikante Hemmung beobachtet. In den niedrigeren Konzentrationsbereichen wurden keine Effekte auf die IL-4-, IL-2- und IFN- γ - Sekretion beobachtet. Die TNF- α - Sekretion zeigte eine deutliche Erhöhung ab einer Konzentration von 7,25g/m³, im Gegensatz zu den anderen gemessenen Zytokinen ließ selbst die höchste Konzentration keine toxischen Effekte auf die Sekretion von TNF- α erkennen. Im Vergleich zur Zellvitalität zeigte sich, dass selbst die im MTT- Assay gemessene erniedrigte Zellzahl bei 725g/m³ Toluol nicht zu einem Rückgang der Sekretion an TNF- α führte. Bei den übrigen Zytokinen setzte eine Supprimierung der Sekretion schon unterhalb der Konzentration von 100g/m³ ein.

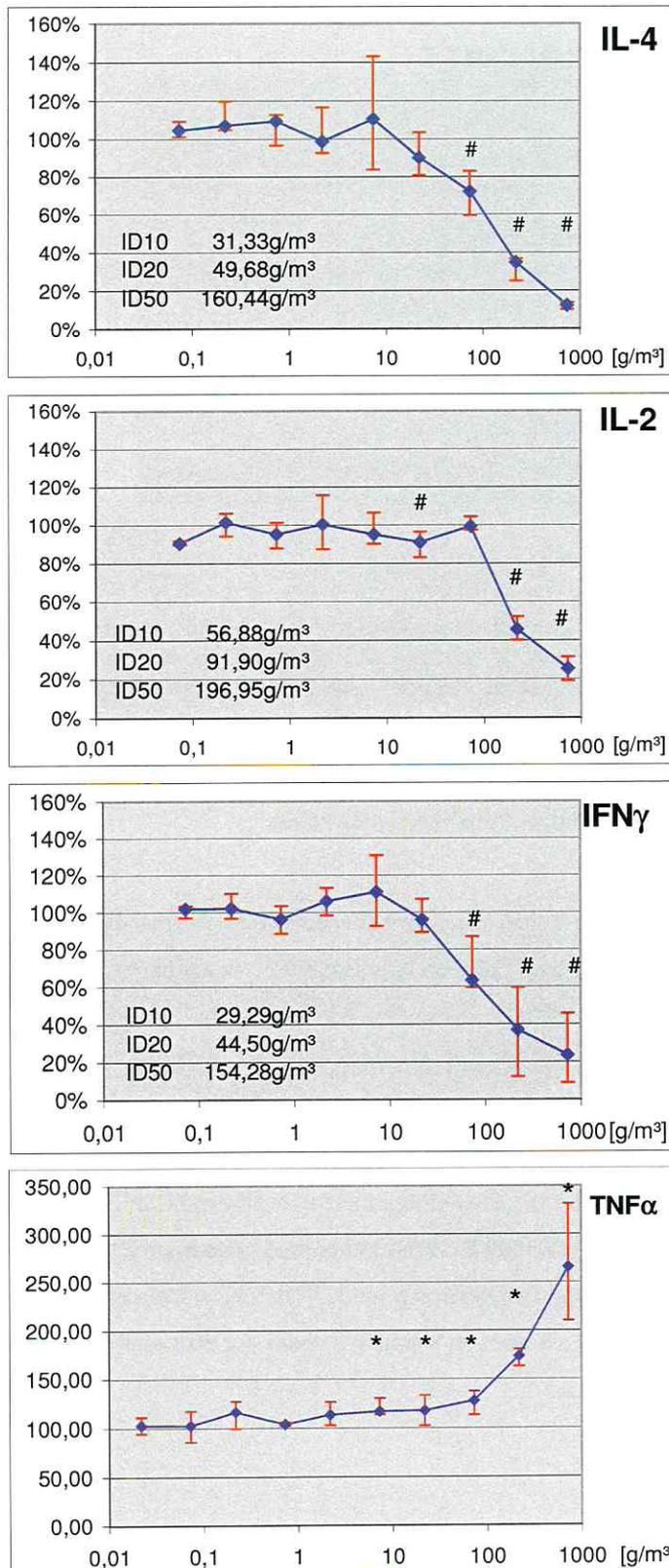


Abb. 3.6:

Einfluss einer 24stündigen Toluol-exposition auf die Produktion von IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α .

Signifikant (=Abweichung von 100%) erhöhte Werte wurden mit einem Stern (*), signifikant erniedrigte mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet. Dargestellt sind Mediane sowie 25%-75% Quantil der zusammengefassten Ergebnisse von fünf Spendern.

3.2.4. Xylol

3.2.4.1. Einfluss von Xylol auf Vitalität der Zellen

Die Auswirkung der über Gasphase in die Zellkultur gebrachten Konzentrationen von Xylol auf die in- vitro- Proliferation/ Vitalität der PBMC ist in der folgenden Grafik dargestellt.

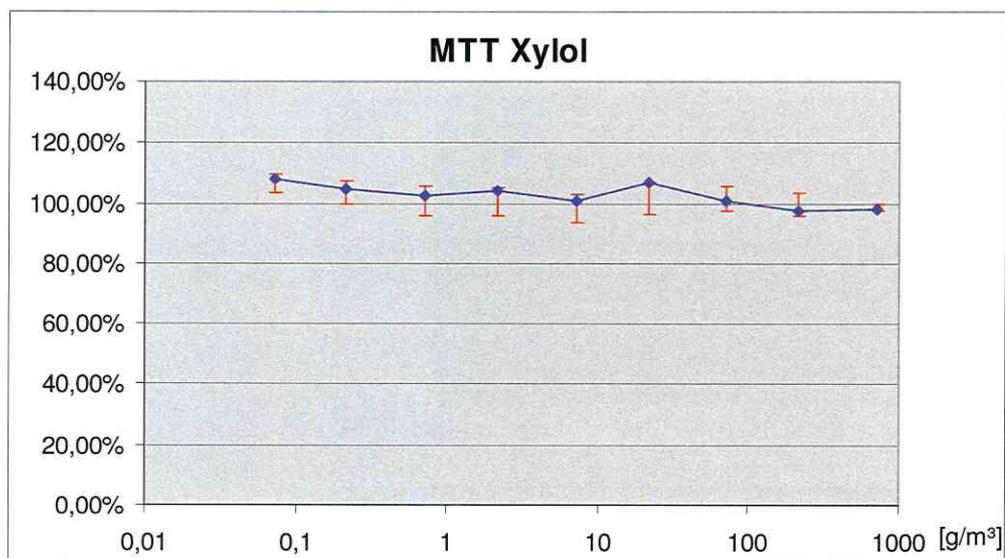


Abb. 3.7: Beeinflussung der Zellproliferation durch steigende Konzentration an Xylol. Gezeigt werden Median und 25% bzw. 75% Quantil für fünf Probanden, jeweils bezogen auf die individuellen Kontrollen.

Die Xylol- Exposition hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität.

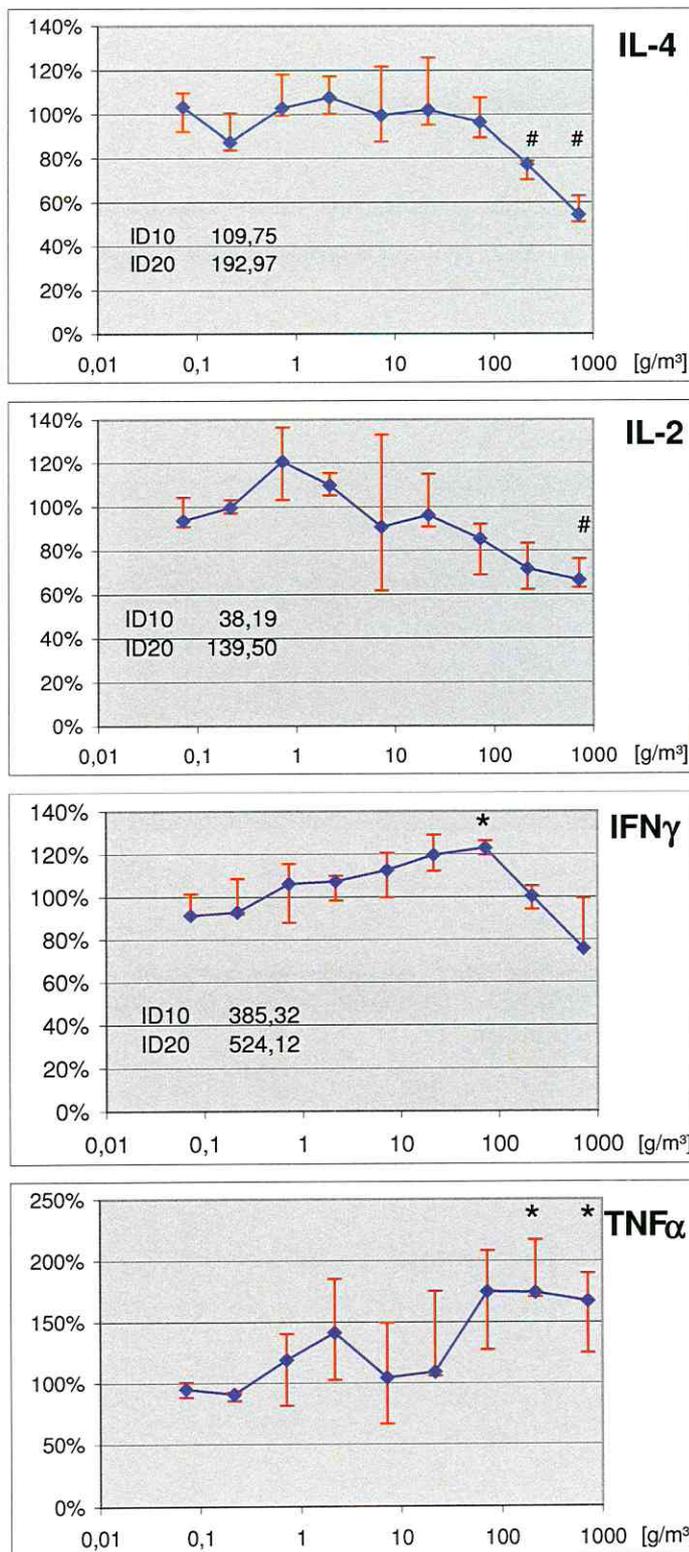


Abb. 3.8: Einfluss einer 24stündigen Xyloexposition auf die Produktion von IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α . Signifikant (=Abweichung von 100% erhöhte Werte wurden mit einem Stern (*), signifikant erniedrigte mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet. Dargestellt sind Mediane sowie 25%-75% Quantil der zusammengefassten Ergebnisse von fünf Spendern.

3.2.4.2. Einfluss von Xylol auf die Zytokinproduktion

Die Effekte von Xylol auf die verschiedenen Zytokine waren unterschiedlich.

Die IL-4- Sekretion wurde erst ab einer Konzentration von 215g/m³ Xylol gehemmt (p=0,0045). Die höchste eingesetzte Xylol- Konzentration (716,7g/m³) führte zu einer Hemmung der IL-4- Produktion auf 54%. Auch bei IL-2 ließ sich eine signifikante Hemmung der Sekretion (p=0,0045) erst im hohen Konzentrationsbereich (716,7g/m³) messen.

Im Gegensatz dazu war die IFN- γ - Sekretion bei 21,5g/m³ signifikant erhöht (p=0,0045). Bei der höchsten Xylol- Konzentrationsstufe ließ sich eine tendenzielle Erniedrigung der IFN- γ - Produktion (p=0,088) erkennen.

Auch die TNF- α - Produktion war nach Exposition gegenüber Xylol stimuliert. Bedingt durch starke Schwankungen unter den einzelnen Spendern ließ sich im Bereich zwischen 0,717g/m³ und 71,7g/m³ eine tendenzielle Erhöhung (p=0,088) der Sekretion erkennen, eine signifikante Erhöhung (p=0,0045) der Sekretion wurde allerdings erst ab einer Konzentration von 215g/m³ gefunden.

3.2.5. Naphthalin

3.2.5.1. Einfluss von Naphthalin auf Vitalität der Zellen

Die Auswirkung der in die Zellkultur eingebrachten verschiedenen Konzentrationen von Naphthalin auf die Zellproliferation wurde im MTT- Test nach 24h Inkubation untersucht. In der folgenden Abbildung wurde die Zellvitalität der PBMC bezogen auf die jeweiligen Kontrollen graphisch dargestellt.

Der Einfluss der Naphthalin- Exposition bleibt bis auf die höchste Konzentration ohne Auswirkung auf die Zellvitalität. 250 μ g/ml Naphthalin in der Kultur führte zu einer deutlichen Hemmung (ca.70%) der Vitalität der Zellen (p=0,0017).

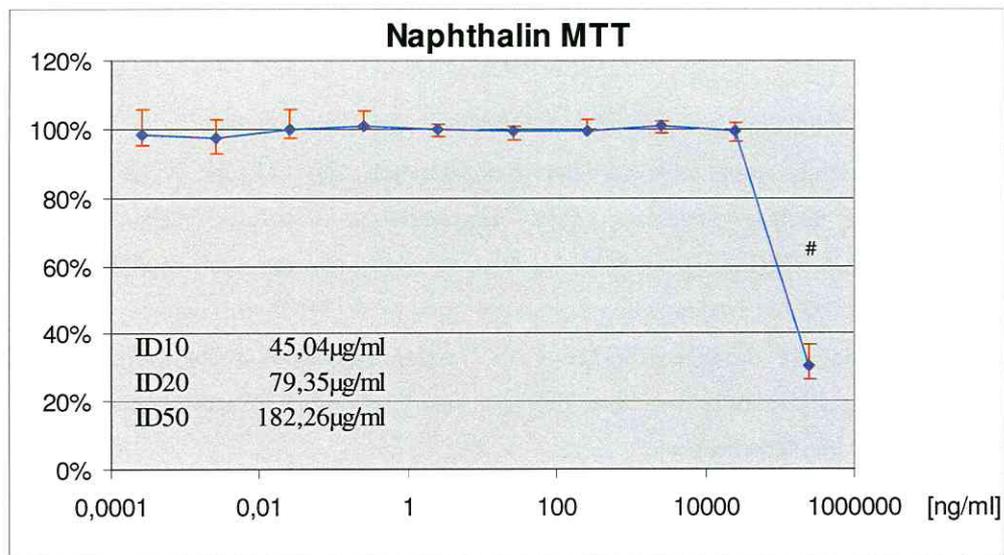


Abb. 3.9: Beeinflussung der Zellproliferation durch Naphthalin. Gezeigt werden die Mediane und 25% bzw. 75% Quantil für sechs Probanden, jeweils bezogen auf die individuellen Kontrollen. Signifikante Abweichungen vom jeweiligen Kontrollwert wurden mit einem Rautezeichen (#) für Hemmung gekennzeichnet.

3.2.5.2. Einfluss von Naphthalin auf die Zytokinproduktion

Die Inkubation mit Naphthalin führte zu einer Hemmung der Sekretionen von IL-4, IL-2 und TNF- α in der höchsten getesteten Konzentration (250000ng/ml). Die Produktion von IL-4 und IL-2 war auch bei einer Konzentration von 25000ng/ml noch gehemmt. Die IL-4-Sekretion wurde wie die TNF- α - Sekretion durch die Naphthalin- Konzentrationen zwischen 25ng/ml und 2500ng/ml signifikant stimuliert.

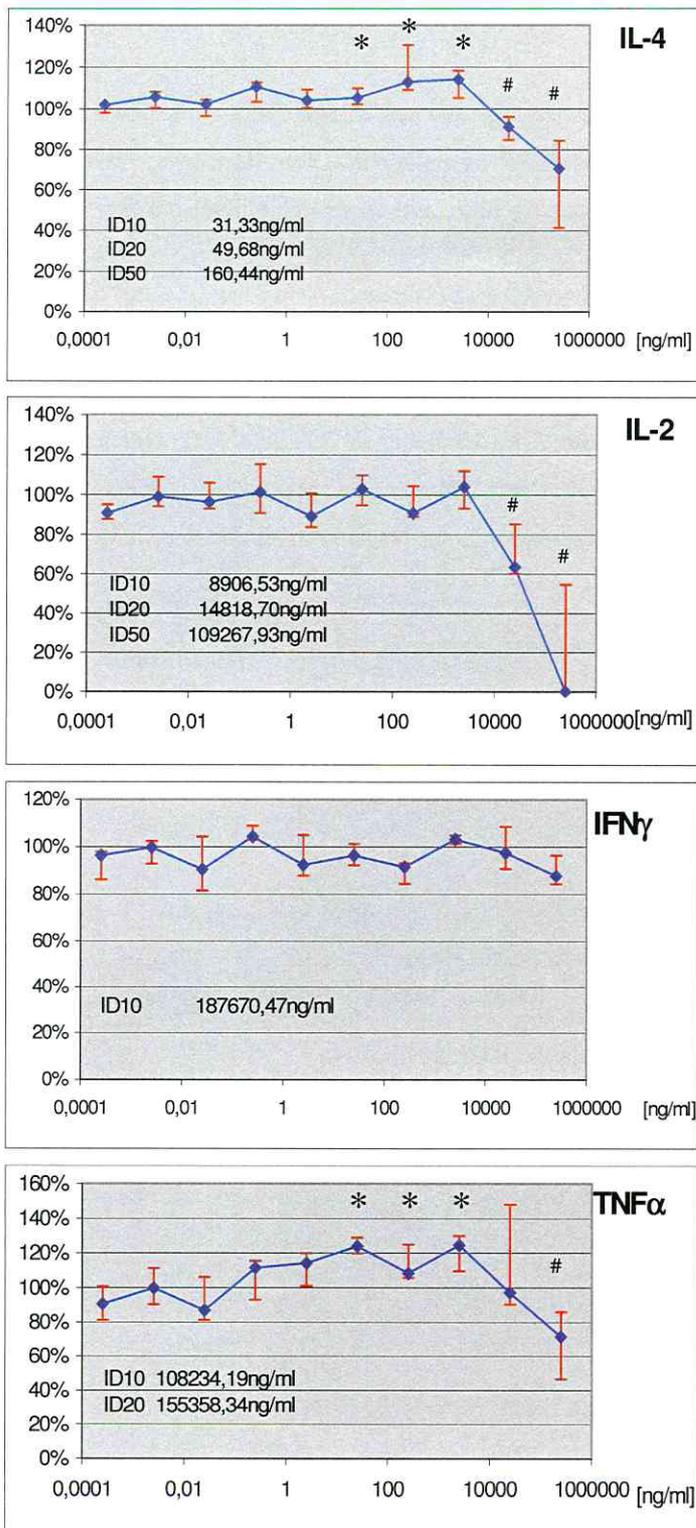


Abb. 3.10:
Einfluss einer 24stündigen Naphthalenexposition auf die Produktion von IL-4, IL-2, IFN- γ und TNF- α . Signifikant (=Abweichung von 100%) erhöhte Werte wurden mit einem Stern (*), signifikant erniedrigte mit einem Rautezeichen (#) gekennzeichnet. Dargestellt sind Mediane sowie 25%-75% Quantil der zusammengefassten Ergebnisse von acht Spendern.

3.2.5.3. PCR- Messergebnisse der Naphthalinversuchsansätze

Da im Fall von Naphthalin im Konzentrationsbereich zwischen 25 und 2500ng/ml schwache, aber dennoch bei allen Spenden reproduzierbare Stimulationen von IL-4 bzw. TNF- α auftraten, wurden weitere Versuchsansätze durchgeführt, um diese Ergebnisse in Form der Zytokinexpression auf mRNA- Ebene zu verifizieren.

Für diese Experimente erfolgte nach der 24stündigen Inkubation mit Naphthalin eine Abnahme der Kulturüberstände zur ELISA- Messung, aus den verbleibenden Zellen wurde mRNA präpariert. Mittels real time PCR (Lightcycler) wurde unter Verwendung externer Standards eine quantitative PCR durchgeführt. Die Abbildungen 3.11 und 3.12 zeigen die ELISA- Messungen im Kulturüberstand für IL-4 und IFN- γ am Beispiel eines Spenders. Für IL-4 wurde eine deutliche Stimulation der Expression unter Naphthalin- Einfluss beobachtet, während IFN- γ kaum beeinflusst wurde.

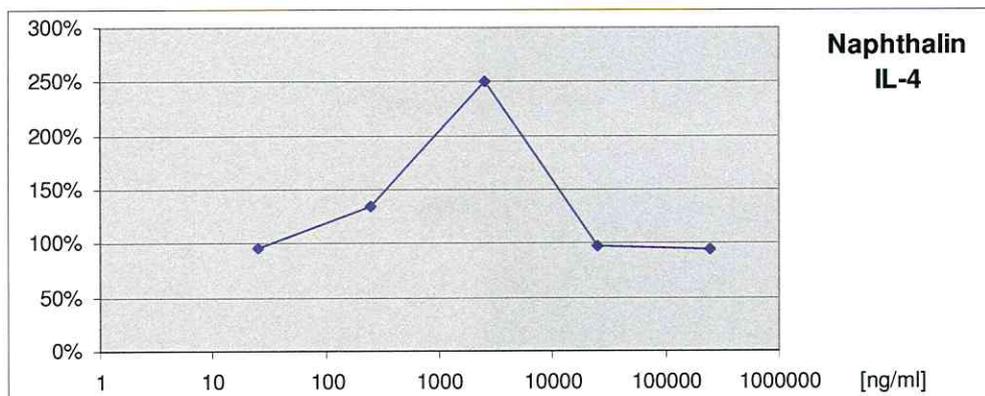


Abb.3.11: Einfluss von Naphthalin- auf die Produktion von IL-4.

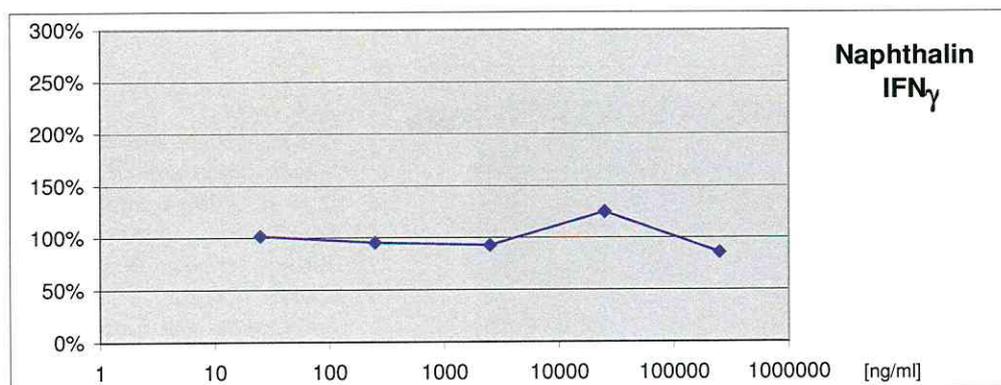


Abb.3.12: Einfluss von Naphthalin- auf die Produktion von IFN- γ

Im folgenden Abschnitt sind die Originaldaten der durchgeführten PCR dargestellt. Das Prinzip der real time PCR am Light-Cyclers besteht darin, dass sich im Gegensatz zur konventionellen PCR bereits während der Anbindungsphase der Primer und der Amplifikationsphase durch die Polymerase der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green an die DNA bindet. Durch Messen der Fluoreszenz nach jedem PCR- Zyklus läßt sich die zunehmende Menge amplifizierter DNA bestimmen. Verlagert sich die Kurve nach links, bedeutet dies eine größere Zahl an DNA- Kopien, eine Verschiebung nach rechts eine niedrigere Zahl. Eine Quantifizierung der cDNA-Menge in der Probe ist durch Mitführung von Standards mit bekannter cDNA-Menge möglich. Die quantitative Analyse der Regulation der mRNA- Expression erfordert eine über die Untersuchung eines Housekeeping Gens (GAPDH) durchgeführte Adjustierung der Probe auf die Gesamt-DNA-Menge.

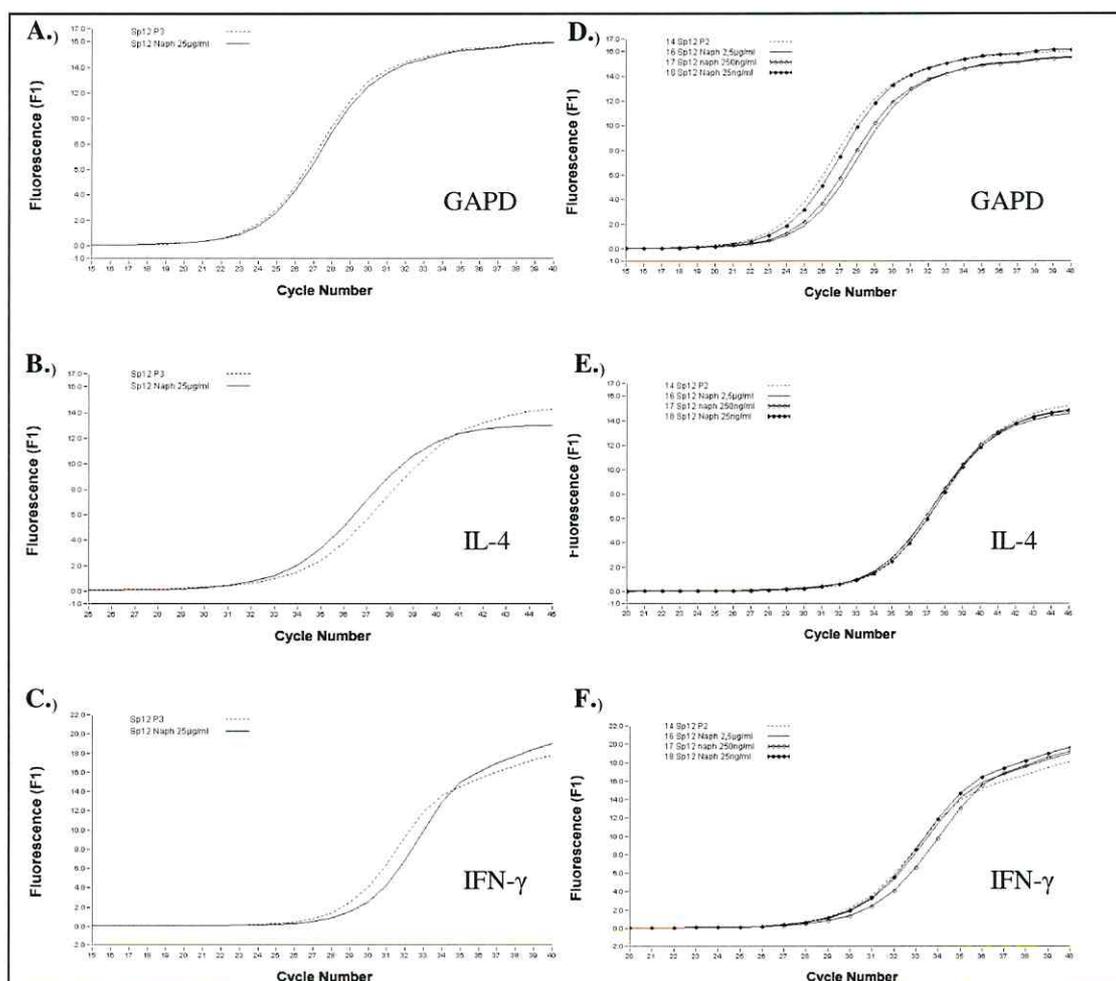


Abb. 3.13: PCR- Messergebnisse für vier Verdünnungsstufen und die jeweiligen Kontrollen, dargestellt für GAPDH, IL-4 und IFN- γ .

Da für die Konzentrationsstufe 25µg/ml eine andere Kontrolle (P3) benötigt wurde als für die Konzentrationen 2,5µg - 25ng/ml (P2), wurden die Messergebnisse für P3 bzw. 25µg/ml in Abbildung 3.13 A - C dargestellt, für P2 und die restlichen Konzentrationsstufen in Abbildung 3.13 D- F.

Wie die Abb. 3.13 A, B und C zeigen, war bei einer Naphthalin- Konzentration von 25µg/ml bei identischer GAPDH-Menge die Expression von IL-4 erhöht und von IFN-γ verringert. In den Naphthalin- Konzentrationen 25ng/ml bis 2,5µg/ml waren mit steigender Naphthalin- Konzentration geringere GAPDH-Expressionen zu beobachten (Abb.3.13 D). Bei leicht erhöhter Expression von IL-4 (Abb. 3.13 E) im Vergleich zur Kontrolle bedeutet dies, dass in den Naphthalin- exponierten Proben eine erhöhte IL-4- mRNA/cDNA-Menge vorlag. Für IFN-γ (Abb. 3.13 F) wurde eine im Vergleich zur Kontrolle leicht verringerte Expression in Abhängigkeit von der Naphthalin-Exposition gesehen.

Abb. 3.14 zeigt die für GAPDH adjustierten Ergebnisse der IL-4- und IFN-γ- Expression. Für die Adjustierung wurde in der GAPDH ein Faktor ermittelt, der die Expression (=cDNA-Menge in der Probe) im Vergleich zum Kontrollansatz (P2/P3) darstellt.

Zur Adjustierung wurden die resultierenden Konzentrationen für IL-4- bzw. IFN-γ- mRNA/cDNA mit dem jeweiligen GAPDH- Faktor multipliziert. Es ist deutlich erkennbar, dass mit steigender Naphthalin-Konzentration die IL-4-mRNA/cDNA- Expression ansteigt, während die Expression von IFN-γ weniger beeinflusst wird. Für IFN-G wurde eine leichte Stimulation bei 2,5µg/ml Naphthalin und eine Hemmung bei 25µg/ml beobachtet.

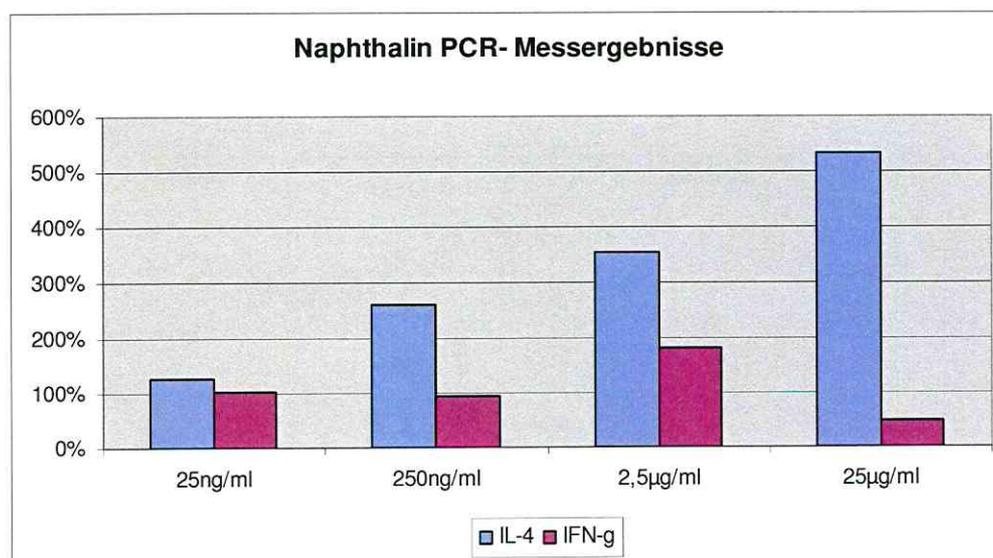


Abb. 3.14: Einfluss von Naphthalin auf die Zytokin-mRNA-Expression peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) nach Inkubation über 24 Stunden.

Der Quotient aus der Expression von IL-4-mRNA/ Expression von IFN- γ -mRNA steigt mit Erhöhung der Naphthalin-Konzentration in der Probe kontinuierlich an. Dies bedeutet eine Verschiebung der IL-4/ IFN- γ - Expression zugunsten von IL-4 (Tab. 3.5)

Tabelle 3.5.: Quotient der ermittelten Prozentangaben der mRNA- Expression von IL-4/ IFN- γ .

Konzentration	25ng/ml	250ng/ml	2,5 μ g/ml	25 μ g/ml
Verhältnis IL-4/ IFN- γ	1,53	2,42	2,99	5,79

4. Diskussion

Aufbauend auf Ergebnissen epidemiologischer Studien wie der LARS- Studie (Leipziger Allergie- Risikokinder Studie) wurden in dieser Arbeit einige aromatische Verbindungen aus der Gruppe der flüchtigen organischen Verbindungen auf ihre potentielle Allergie- fördernde Wirkung untersucht. Da toxische Effekte dieser Organika schon in vielen Tierversuchen und Fallberichten dokumentiert worden waren (ATSDR, 1990), wurden für das in dieser Arbeit verwendete In vitro- Modell Konzentrationsbereiche ausgewählt, in denen sowohl toxische Effekte als auch sub- und nichttoxische Effekte zu erwarten waren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob flüchtige Organika, wie innerhalb der LARS- Studie beobachtet, tatsächlich T- Zell- Reaktivität in Richtung Th2 verschieben bzw. inflammatorische Reaktionen auslösen können. Im Einzelnen wurden die Verbindungen Chlorbenzol, Styrol, Toluol, Xylol und Naphthalin untersucht.

4.1.1. In vitro Modell zur Untersuchung immunmodulierender Effekte von VOC

Beim Aufbau einer Versuchsanordnung, in der PBMC gegenüber flüchtigen organischen Verbindungen exponiert werden, mussten einige experimentelle Besonderheiten berücksichtigt werden. Zunächst musste eine Möglichkeit der Lösungsvermittlung gefunden werden, die es erlaubte, die Spenderlymphozyten mit den VOCs in Kontakt zu bringen. Aufgrund der Unterschiede in Löslichkeit und Flüchtigkeit wurde Naphthalin DMSO- vermittelt appliziert, während die übrigen VOCs in der ersten Versuchsreihe in Methanol verdünnt zu den Zellen gegeben wurden (Daten hier nicht dargestellt). Eine im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführten Messung der Löslichkeit verschiedener VOCs in Zellkulturmedium mittels Headspace-Kapillargaschromatographie ergab jedoch, dass bei direkter Applikation der VOC in das Kulturmedium nur sehr geringe Konzentrationen in der Zellkultur verbleiben, da die VOC sofort aus der Zellkultur verdampfen. Abbildung 4.1 A zeigt am Beispiel von Toluol die im Zellkulturmedium eingestellte Konzentration nach lösungsvermittelter Applikation. Von der direkt zugegebenen Menge an Toluol ($0,5\mu\text{l}$ Toluol/ml DMSO = $0,025\mu\text{l}$ Toluol/ml Zellkulturmedium) verbleibt nur ein geringer Anteil im Medium (ca. 10% nach 24h). Nach Applikation über die Gasphase (Abb.4.1 B) sinkt die

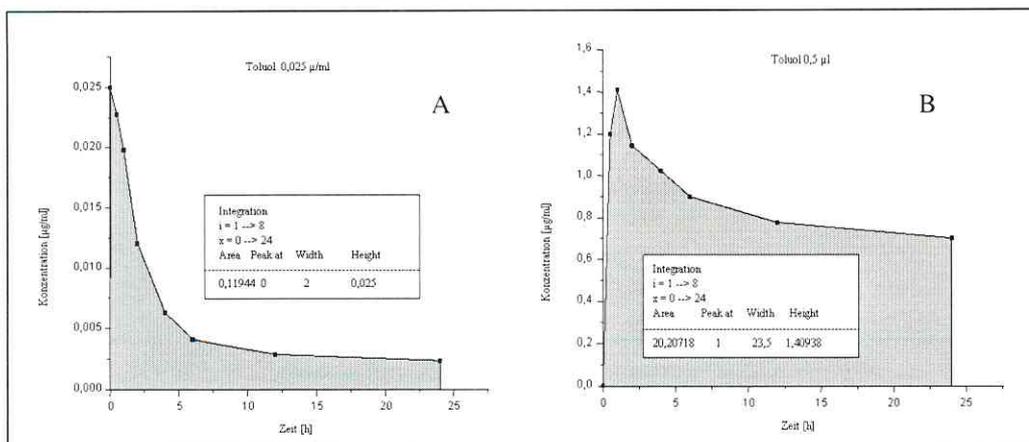


Abb. 4.1: Vergleich der Konzentrationen von Toluol bei direkter Applikation (A) und bei Applikation über die Gasphase (B), aus Diplomarbeit von Jana Mühlenberg 2002

Konzentration auch, jedoch ist der Konzentrationsabfall weniger steil und endet nach 24h bei 60% der maximal erreichten Konzentration. Vorteile der Applikation über die Gasphase waren somit eine konstantere Konzentration über den Messzeitraum, weniger Kontrollen zu den einzelnen Messreihen und die Applikation ohne Lösungsmittel in hohen Konzentrationen und somit lösungsmittelfreie Effekte in diesen Bereichen. In Konsequenz wurden die weiteren Versuchsreihen mit den Verbindungen Chlorbenzol, Styrol, Toluol und Xylol mit dem in Abschnitt 2.2.3. beschriebenen experimentellen System durchgeführt.

Ein weiteres Problem betraf alle untersuchten Organika. Die 24stündige Inkubation im Brutschrank und die hohe Flüchtigkeit der Testsubstanzen machte es erforderlich, in einem in sich geschlossenen System zu arbeiten. Nur so konnte ein Absinken der gewählten Konzentration und eine Kontamination anderer Zellkulturen verhindert werden. Gleichzeitig wurde damit jedoch auch eine CO₂- Versorgung unterbunden, welche für eine physiologische Zellreaktion erforderlich ist. Daher wurde anstelle des sonst üblichen Zellkulturmediums RPMI 1640 ein CO₂- unabhängiges Zellkulturmedium verwendet.

4.1.2. Einfluss der verwendeten Lösungsmittel

Die Zellvitalität hat sich unter den eingesetzten Konzentrationen der Lösungsmittel Methanol und DMSO nicht signifikant verändert. Allein in der höchsten Konzentration von DMSO (5%) konnte eine geringe Toxizität beobachtet werden. Im Gegensatz zur Zellvitalität wurde die Zytokinproduktion durch 5% DMSO im Zellkulturmedium deutlich stärker beeinflusst.

Aufgrund dieser Beobachtung sind die Chemikalieneffekte bei 5% DMSO nicht sicher darstellbar, Ergebnisse müssen daher in dieser Konzentrationsstufe vorsichtig interpretiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen Messungen bei niedrigeren Lösungsmittelkonzentrationen, dass signifikant gemessene Abweichungen vom Kontrollwert nach Applikation der jeweiligen VOCs auch tatsächlich auf diese Verbindungen zurückzuführen sind.

4.2. Chlorbenzol

Als eines der am meisten eingesetzten chlorierten Benzole kommt Chlorbenzol hauptsächlich bei der Herstellung von Herbiziden, Gerbstoffen und Kautschuk- Chemikalien zur Anwendung (HSDB, 2003). In privaten Haushalten kommt es unter anderem als Entfetter, Bindemittel, in Farben, Wachsen und Polituren zum Einsatz (NIOSH, 1993). Obwohl Chlorbenzol seit vielen Jahren industriell verwendet wird, haben sich bisher nur wenige epidemiologische Studien mit den Langzeit- Effekten der Exposition gegenüber Chlorbenzol befasst. Eine russische Studie (Rozenbaum, 1947) verweist auf multiple ZNS- Störungen im Zusammenhang mit einer intermittierenden 2jährigen Exposition (Konzentrationsbereich nicht erfasst). ZNS-Störungen wurden auch in weiteren Studien von TARKHOVA, 1965 und Ogata et al., 1991 beschrieben. Ein Zusammenhang zwischen Chlorbenzol- Exposition und der Entstehung allergischer Erkrankungen wurde bisher allein im Rahmen der LARS- Studie (Lehmann et al., 2001) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde Chlorbenzol in einem Konzentrationsbereich von 92mg/m³ bis 918g/m³ getestet. Die Chlorbenzolkonzentration, die von Ogata et al 1991 eingesetzt wurde, um fünf freiwillige Probanden einmalig sieben Stunden lang zu exponieren, wurde somit durch die vorliegende Arbeit abgedeckt. Dieser Konzentrationsbereich (276-918mg/m³) scheint einen Schwellenbereich darzustellen, da auch in der vorliegenden Arbeit im MTT- Assay bei Konzentrationen, welche dieses Intervall überstiegen, zytotoxische Effekte beobachtet worden sind.

Chlorbenzol führte in Konzentrationen größer 918mg/m³ zu einer Stimulation von TNF- α bei fünf von acht Spendern. Dies spricht für direkte Chlorbenzol- Effekte an PBMC. TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von Lymphozyten und Monozyten produziert wird. Seine Induktion durch Chlorbenzol spricht dafür, dass Chlorbenzol in hohen Konzentrationen proinflammatorische Reaktionen auszulösen vermag. Dieser Befund könnte

sowohl die von Ogata et al. beschriebenen Symptome wie Augenreizungen und Halsschmerzen erklären, als auch ein Hinweis für die Induktion inflammatorischer Reaktionen in den Atemwegen nach Einatmen von Chlorbenzol sein. Im Vergleich der Zellvitalität mit der Sekretion der vier gemessenen Zytokine wurde zudem deutlich, dass aus der Beobachtung der Zellvitalität allein keine Schlussfolgerungen auf Beeinflussung spezieller Immunfunktionen gezogen werden können. Wie in der vorliegenden Arbeit zu sehen ist, wurde die Zytokinsekretion je nach Zytokin zwischen 1,32 und 3,73mal stärker in den Konzentrationen von 91,83 und 918,33 g/m³ Chlorbenzol gehemmt, als die im MTT-Assay gemessene Vitalität.

Aus den vorliegenden Messergebnissen lassen sich für Chlorbenzol keine Hinweise finden, dass von dieser Verbindung ein Allergierisiko ausgeht. Möglich wäre, dass niedrigere Konzentrationen zwischen 0,1-10µg/m³, wie in der LARS- Studie gemessen, zur allergischen Sensibilisierung beitragen. Dieser Konzentrationsbereich wurde in der vorliegenden Arbeit nicht abgedeckt. Allerdings wurden bei weiterführenden Untersuchungen im Umweltforschungszentrum im Rahmen eines durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt geförderten Projektes auch für sehr niedrige Chlorbenzolkonzentrationen keine direkten Effekte auf die funktionelle Aktivität von T-Zellen beobachtet (persönliche Mitteilung, Gundula Fischäder). Dies steht im Gegensatz zu dem in der LARS- Studie beobachteten Chlorbenzol- Effekt. In der LARS-Studie wurde eine Hemmung von IFN-γ bzw. eine Stimulation von IL-4 produzierenden T-Zellen sowie ein erhöhtes Risiko für allergische Sensibilisierung durch Chlorbenzol gesehen. Möglicherweise übt Chlorbenzol jedoch keine direkten Effekte (außer den beschriebenen Stimulationen proinflammatorischer Zytokine nach Exposition gegenüber hohen Konzentrationen) auf T-Lymphozyten aus. Es ist denkbar, dass Zellen im Respirationstrakt (Lungenepithel, Alveolarmakrophagen), welche nach Inhalation von Chlorbenzol primär mit Chlorbenzol in Kontakt kommen, funktionell beeinflusst werden und Sekundäreffekte auf T-Zellen auslösen. Ähnliche Sekundäreffekte wurden von (Shreedhar et al., 1998) beschrieben. Die Autoren beschreiben eine UV- induzierte systemische Immunsuppression als Folge einer Regulationskaskade mehrerer Mediatoren im Tierexperiment (Maus). Möglicherweise kommen als initiale Zellen einer Regulationskaskade bei inhalativer Exposition gegenüber Chlorbenzol vor allem Epithelzellen der Atemwege in Frage.

4.3. Styrol

Der Hauptaufnahmeweg, über den Styrol in den menschlichen Organismus gelangt, ist, wie bei den anderen flüchtigen Verbindungen auch, die Inhalation. Die Styrolemissionsquellen sind Baumaterialien (v.a. Klebstoffe), Plastikzeugnisse und Tabakrauch. Das höchste Expositionsrisiko tragen Arbeiter in der Plastikindustrie, insbesondere bei der Herstellung von Polystyrol (ATSDR, 1992). In diesem Bereich wurden auch die meisten Expositionsstudien am Menschen durchgeführt. Die nachfolgend genannten Studien haben hauptsächlich die respiratorischen Auswirkungen nach Styrol- Exposition untersucht und dokumentiert. Allen gemein ist eine von den Betroffenen beschriebene Reizung der Schleimhäute (Carpenter et al., 1944; Stewart et al., 1968), insbesondere im Bereich der oberen Luftwege (Nase, Hals). Laut Carpenter et al. traten bei 800ppm (= 3,4g/m³) Styrol bei zwei Männern Reizungen im Halsbereich, eine verstärkte nasale Sekretion und Reizungen der Augen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hemmung der Zellvitalität erst ab einer Konzentration von 22,65g/m³ beobachtet. Dagegen zeigt die TNF- α - Sekretion bereits ab 7,55g/m³ eine signifikante Stimulation. Dies belegt einen direkten Effekt von Styrol auf PBMC. TNF- α ist, wie bereits bei Chlorbenzol angesprochen, ein proinflammatorisches Zytokin, welches von Lymphozyten und Monozyten produziert wird. TNF- α bewirkt im menschlichen Organismus eine Reihe von unterschiedlichen Reaktionen, u.a. die Induktion von Akutphaseproteinen und die Stimulation von Fibroblasten und Endothelzellen. Auch tierexperimentell wurden inflammatorische Reaktionen nach Styrolexposition beschrieben. Dabei trat bei Ratten nach 21 Tagen Exposition (4h/d, 5d/Woche) gegenüber 1000ppm (=4,26g/m³) Styrol nicht nur eine erhöhte Vaskularisierung, sondern auch eine verminderte ziliare Aktivität der respiratorischen Epithelzellen auf (Ohashi et al., 1986).

Bei höheren Styrol- Konzentrationen (>72,5g/m³) findet eine relativ gleichförmige Hemmung der IL-4-, IL-2- und IFN- γ - Sekretion statt, TNF- α wurde nur bei vier von fünf Spendern gehemmt (nicht signifikant). In diesem Konzentrationsbereich ist zu erwarten, dass die toxischen Effekte das klinische Bild prägen. In humanepidemiologischen Studien wurden keine so hohen Konzentrationsbereiche dokumentiert. In Tierexperimenten wurde eine LC₅₀ bei Ratten nach zweistündiger Exposition gegenüber 11,8g/m³ und bei Mäusen nach vierstündiger Exposition gegenüber 21,8g/m³ beschrieben (Shugaev, 1969). Eine 16- bzw. 30stündige Exposition gegenüber 5,5g/m³ wurde von allen Ratten und Meerschweinchen überlebt (Spencer et al., 1942). Wie aus den in der vorliegenden Arbeit gezeigten

Messergebnissen des MTT- Assay zur Styrol- Exposition deutlich wird, liegt der in vitro beobachtete Schwellenwert von nicht- toxisch zu toxisch im gleichen Konzentrationsbereich, wie auch tierexperimentell bestätigt, zwischen 7,55 und 22,65g/m³. Das bedeutet, dass das in vitro verwendete experimentelle Modell gut geeignet ist, toxische Effekte von flüchtigen Chemikalien nachzuweisen und eventuell sogar Tierversuche ersetzen könnte.

Ähnlich wie bei Chlorbenzol wurden auch in den experimentellen Ansätzen bei Styrol in der vorliegenden Arbeit keine Anhaltspunkte für ein von dieser Verbindung ausgehendes Allergierisiko gefunden. Niedrigere Konzentrationsbereiche zwischen 0,1 und 10µg/m³, wie sie in der LARS- Studie gemessen wurden, wurden in dieser Arbeit nicht abgedeckt. Wie im Fall von Chlorbenzol bereits erwähnt liegen jedoch auch für Styrol bereits weiterführende Untersuchungen bis zur niedrigsten Konzentration von 0,001µg/m³ vor, wobei keine direkten Effekte auf die Th1/ Th2- Regulation beobachtet wurden (persönliche Mitteilung, Gundula Fischhäder). Auch in der LARS- Studie wurden keine signifikanten Assoziationen mit Allergien im Kindesalter bzw. erhöhten/ erniedrigten IFN-γ/ IL-4- Blutwerten gefunden (Lehmann et al., 2001), jedoch fand sich ein Zusammenhang zwischen Styrol und Atemwegserkrankungen bei Kindern (Diez et al., 1999).

4.4. Toluol

Toluol wird vom menschlichen Organismus, wie die anderen getesteten Organika, hauptsächlich über Inhalation aufgenommen. Als Emissionsquellen kommen dabei Tabakrauch, Benzin (Toluol als Zusatz zur Verbesserung der Oktanzahl) und Lösungsmittel in Farben, Klebstoffen, Reinigungsmitteln und Lacken in Frage (ATSDR, 2000). Bei der Exposition gegenüber niedrigen Toluolkonzentrationen zwischen 7 und 20µg/m³ wurde in der LARS- Studie eine signifikante Assoziation mit nachfolgend aufgetretener Milchallergie gefunden. Augenreizungen bei Personen, welche 0,38g/m³ über sechs bis acht Stunden ausgesetzt waren, wurden von Baelum et al. 1985 beschrieben. Die respiratorischen Effekte sind nicht eindeutig in der Literatur dokumentiert. Einerseits wurden nach Exposition gegenüber 7g/m³ über zwei Stunden (Meulenbelt et al., 1990) bzw. gegenüber 0,75g/m³ und höher über einen Zeitraum von mehr als 18 Monate (Guzelian et al., 1988) keine subjektiven Atembeschwerden angegeben. Andererseits berichten Baelum et al. 1985 bei Angestellten in Druckereien nach sechseinhalb Stunden Exposition gegenüber 0,38g/m³ über Irritationen in Nase und Hals. Ähnliche Beschwerden wurden bei Freiwilligen, die sich sieben Stunden lang

einer Konzentration von $0,75\text{g/m}^3$ aussetzten, beobachtet (Carpenter, Shaffer, Weil, and Smyth, 1944). Die vorliegende Arbeit zeigt allein für $\text{TNF-}\alpha$ eine deutliche Stimulation durch Toluol, welche jedoch erst ab einer Konzentration von $7,25\text{g/m}^3$ signifikant ist. Dies spricht für einen direkten Effekt von Toluol auf PBMC. Wie auch für die Verbindungen Chlorbenzol und Styrol beobachtet, scheint Toluol daher in hohen Konzentrationen proinflammatorische Reaktionen auszulösen. Dieser Effekt mag individuell bereits in niedrigeren Konzentrationen einsetzen, was die Unterschiede in den subjektiven Symptomen der Betroffenen nach Exposition gegenüber $0,38\text{g/m}^3$ bzw. $0,75\text{g/m}^3$ Toluol in den oben genannten Arbeiten erklären würde. Stimulatorische Effekte auf die Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$ bzw. IL-4 konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Weitere Messungen in niedrigeren Konzentrationsbereichen bis zu Verdünnungen von $0,001\mu\text{g/m}^3$ Toluol fanden in der bereits erwähnten Untersuchung des durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt geförderten Projektes ebenfalls keine Hinweise auf eine Verschiebung des Th1/Th2 Gleichgewichts in Richtung Th2- Zytokine resp. IL-4 bei direkter Toluol- Exposition der PBMC über die Gasphase. Allerdings fand sich auch in der LARS- Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen Toluol- Exposition und $\text{IFN-}\gamma$ - bzw. IL-4- Produktion.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur für die höchste verwendete Konzentration (725g/m^3) zytotoxische Effekte im MTT- Assay beobachtet. In Fallberichten sind vereinzelte Todesfälle genannt, welche die Exposition mit hohen Toluolkonzentrationen dokumentieren. Besonders beim „Lösungsmittelschnüffeln“ kam es wiederholt zu Todesfällen. (Paterson and Sarvesvaran, 1983) beschrieben 1983 einen Teenager, der infolge Klebstoff- Schnüffeln starb. In Großbritannien wurde aus 42 in 52 Fällen bei Tod nach Lösungsmittelmissbrauch im toxikologischen Bericht Toluol erwähnt (Anderson et al., 1986; Paterson and Sarvesvaran, 1983). In Japan starb ein Mann an Herzstillstand, nachdem er ein Badezimmer mit einem Anstrich versiegelt hatte, welcher 67% Toluol enthielt (Shibata et al., 1994). Es liegen keine Konzentrationsangaben aus diesen Fallberichten vor. In Tierexperimenten wurde eine LC_{50} bei Ratten von 20g/m^3 Toluol beobachtet (Svirbely et al., 1943). Aufgrund der neurologischen Toxizität und der damit verbundenen Letalität von Toluol auf den Organismus ist daher davon auszugehen, dass in hohen Konzentrationen ($>21,75\text{g/m}^3$) immunologische Dysregulationen eine eher untergeordnete Rolle spielen.

4.5. m-Xylol

Xylol kommt meist in Form eines Gemisches aus m-, p- und o-Xylol vor, davon sind anteilig bis 65% m-Xylol und je 20% o- und p-Xylol. Xylol wird bei der Produktion von Ethylbenzol, als Lösungsmittel bei Farben und als Zusatz bei Benzin verwendet. Hauptemissionsquellen sind daher industrielle Produktionsstätten, Verbrennungsmotoren und Lösungsmittel (ATSDR, 1995). Hohe Konzentrationen in der Innenraumluft treten u.a. infolge der Verwendung von Lacken, Farben, Rostschutz und nach Rauchen auf. Die kurzfristige Xylol-Exposition wird in vielen Studien mit Irritationen im Nasen- und Halsbereich assoziiert (Carpenter et al., 1975; Hake, 1981; Klaucke et al., 1982). Bei einer Konzentration von $0,868\text{g/m}^3$ gemischter Xylole über drei bis fünf Minuten wurde von Nelson et al. 1943 Schleimhautirritationen im Hals- und Nasenbereich beschrieben. Hastings et al. beschrieben dagegen 1986 keine vermehrt auftretenden Symptome wie Schleimhautirritationen oder Änderung der Atemfrequenz nach Exposition gegenüber einer Xylol- Konzentration von $1,718\text{g/m}^3$. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Effekte auf die Zytokinproduktion von PBMC lassen für den betrachteten Konzentrationsbereich bis 215g/m^3 keine Anhaltspunkte für eine inflammatorische Reaktion erkennen. Die hohen Schwankungen bei $\text{TNF-}\alpha$ sind möglicherweise durch individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern bedingt. Dabei ist es möglich, dass wie in den erwähnten Arbeiten gezeigt, sehr hohe Konzentrationen nötig sind, um ähnliche Immunreaktionen zu provozieren. Eine deutliche Stimulation der $\text{TNF-}\alpha$ - Sekretion tritt in der vorliegenden Arbeit erst ab einer Konzentration von 215g/m^3 auf, eine Stimulation der $\text{IFN-}\gamma$ - Sekretion bei $71,67\text{g/m}^3$. Da sich in der vorliegenden Arbeit selbst in hohen Konzentrationen keine Effekte auf die Zellvitalität beobachten ließen, spricht dies für einen direkten immunmodulatorischen Effekt von Xylol auf PBMC. Die $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation belegt die beobachteten proinflammatorischen Effekte von Xylol, da $\text{TNF-}\alpha$, wie bereits bei den oben diskutierten Organika angesprochen, fördernd auf Entzündungsreaktionen wirkt. Auch $\text{IFN-}\gamma$ ist an der Entzündungsreaktion beteiligt, da seine Anwesenheit u.a. chemotaktische Reize für Monozyten, die Differenzierung von Th-1-Zellen und eine erhöhte Diapedese der an der Entzündung beteiligten Zellen bewirkt. Morley et al. beschrieben 1970 die anhand einer Autopsie gefundenen Effekte einer Xylol- Exposition von $43,4\text{g/m}^3$, die bei einem Mann auftraten, welcher während einem Anstrich dieser Konzentration mehrere Stunden lang ausgesetzt war. Dabei wurde eine hochgradige Lungenstauung mit fokal- intraalveolären Einblutungen und pulmonalen Ödemen vorgefunden. Dies sind ebenfalls Anzeichen einer abgelaufenen Entzündungsreaktion. Auch

tierexperimentell (Ratte, Maus, Meerschweinchen) wurden nach Exposition gegenüber Xylol-Konzentrationen von 6,36 bzw. 10,59g/m³ nach fünf bzw. sechs Minuten Entzündungsreaktionen wie Irritationen der Atemwege, Lungenödeme und pulmonale Einblutungen beobachtet (de Ceaurriz et al., 1981;Korsak et al., 1990).

In niedrigen Konzentrationsbereichen wurde keine Änderung der Zytokinsekretion oder der Zellvitalität beobachtet. Daher konnten in dieser Arbeit keine Anhaltspunkte für ein von Xylol ausgehendes Allergierisiko gefunden werden. Der bei Lehmann et al. 2001 im Rahmen der LARS- Studie gemessene Konzentrationsbereich zwischen 4,21 und 11,4µg/m³, welcher mit einer Nahrungsmittelallergie assoziiert war, wurde nicht in dieser Arbeit abgedeckt. Jedoch liegen wie bereits im Fall von Chlorbenzol beschrieben, weiterführende Untersuchungen bis zu einem Konzentrationsbereich von 0,001µg/m³ vor, in welchen ebenfalls keine direkten Effekte auf die Th1-/ Th2 Regulation gefunden wurden (persönliche Mitteilung, Gundula Fischäder).

4.6. Naphthalin

Der Aufnahmeweg von Naphthalin ist neben der Ingestion und dem Hautkontakt vor allem die Inhalation. Emissionsquellen, welche zu hohen Innenraum-Konzentrationen führen, sind vor allem Tabakrauch, Feuerstellen, wo Holz verbrannt wird, und Mottenkugeln (ATSDR, 2003). In Deutschland ist es in Mottenkugeln allerdings in den vergangenen Jahren wegen seines Geruchs weitgehend durch andere Wirkstoffe ersetzt worden.

Die gemessenen Konzentrationen variierten je nach Lokalisation beträchtlich. Die Innenraumkonzentration wurde von Chuang et al. 1991, Hung et al. 1992 und Wilson et al. 1989 in einem Bereich zwischen 0,860 bis 1600µg/m³ angegeben. Die in der LARS- Studie gemessene Naphthalin- Konzentration in Wohnungen betrug im Median 0,73µg/m³. Der Konzentrationsbereich der vorliegenden Arbeit rangierte von 250fg/ml bis 250µg/ml, was einem Konzentrationsbereich von 0,0025µg/m³ bis 2,5g/m³ entspricht. Damit wurden alle in der Literatur genannten Konzentrationsbereiche abgedeckt.

Aus Fallberichten, welche die Folgen einer inhalativen Naphthalin-Exposition beschreiben, sind keine genauen Konzentrationsangaben bekannt. Bei den angegebenen Beschwerden handelte es sich um Irritationen der Atemwege, Kopfschmerzen, Übelkeit, Verwirrung und Nierenerkrankungen (Linick M., 1983). In Tierexperimenten (Maus) wurden bei mehr als 95% aller Mäuse nach zweijähriger Naphthalin- Exposition gegenüber 52,4 bzw. 157,2mg/m³

Anzeichen chronischer Entzündung und Metaplasie des Nasenepithels beobachtet (ATSDR, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Stimulation der TNF- α - Sekretion zwischen 25 und 2500 ng/ml (entspricht 0,25 bis 25mg/m³) könnte diese entzündlichen Effekte von Naphthalin erklären. TNF- α wurde bereits bei den vorher genannten VOC in seiner Wirkung als proinflammatorisches Zytokin beschrieben. Die gemessene Konzentrationserhöhung in dem genannten Bereich ist möglicherweise eher auf eine Stimulation der Monozyten als auf eine Stimulation der Th1 Zellen zurückzuführen, da sowohl die IFN- γ - als auch die IL-2- Sekretion unbeeinflusst bleibt.

Die IL-4- Sekretion zeigte ebenfalls im Bereich zwischen 25 und 2500 ng/ml eine Stimulation. Bei IL-4 handelt es sich um das Leitzytokin der Th2- Zellen; unter seinem Einfluss differenzieren sich T-Zellen zu Th2- Zellen. Seine Anwesenheit übt verschiedene Effekte auf seine Umgebung aus, wie z.B. Aktivierung ruhender B-Zellen, was bei diesen zu Proliferation, gesteigerter mRNA-/ Proteinsynthese und vermehrter MHC II- Expression führt. Weiter führt sein Einfluss bei bereits proliferierenden B-Zellen zu einem Ig- Klassen-Switch, worauf IgE produziert wird. Zusammen mit IL-3 kann es eine Mastzellproliferation bewirken. Die IL-4- Effekte können alle, bis auf die vermehrte MHC II- Expression, durch IFN- γ , welches von Th1- Zellen synthetisiert wird, neutralisiert werden. Umgekehrt bewirkt IL-4 eine Supprimierung der IFN- γ - Produktion. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Stimulation der IL-4- Sekretion deutet also nicht nur auf einen direkten Effekt von Naphthalin auf die PBMC an sich hin, sondern spricht im Zusammenhang mit der unbeeinflussten IFN- γ - Sekretion für eine durch Naphthalin verursachte Dysbalance der Th1/Th2-Regulation zugunsten Th2. Damit ist die Ausgangslage für ein erhöhtes Allergierisiko (Typ-I- Allergie) gegeben. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte im Rahmen der LISA-Studie (Lifestyle-Immune System-Allergy) eine Erhöhung der IL-4- Produktion beobachtet werden. Neugeborene, deren Mütter während der Schwangerschaft Naphthalin- Konzentrationen mehr als 1,7 μ g/m³ ausgesetzt waren, hatten erhöhte Anteile IL-4-produzierender T-Zellen im Nabelschnurblut (Lehmann et al., 2002). Nachfolgend konnte bei LISA-Studien-Probanden ein signifikanter Zusammenhang zwischen Naphthalin- Exposition während der Schwangerschaft und Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene (OR 16,0) beobachtet werden (Henker, 2004). Bei 3jährigen Kindern führte zudem eine Naphthalin-Exposition höher als 5,8 μ g/m³ zu einem erhöhten Risiko für die Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene. Auch im Rahmen der LARS- Studie konnte ein Effekt von Naphthalin auf die Zytokin-Produktion peripherer T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Oberhalb eines gemessenen Innenraum- Konzentrationsbereiches von 1,65 μ g/m³ wurde eine Hemmung der IFN- γ -

produzierenden CD8+ T-Zellen beobachtet (Lehmann et al., 2001). Dies ist wahrscheinlich auf eine Hemmung der Th1- Zellen durch Gegenregulation der Th2- Zellen zurückzuführen. Eine Verringerung der IL-4- Sekretion wurde hier nicht nachgewiesen. Allerdings sind IL-4- produzierende T-Zellen im peripheren Blut nur in außerordentlich geringer Zahl vorhanden, so dass sich Expositionseffekte in dieser Zellpopulation schwerer nachweisen lassen, als im Fall von IFN- γ -produzierender Th1-Zellen.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Stimulation der IL-4- Sekretion nach Naphthalin- Exposition ist mit einem Maximum bei 114% als eher gering einzustufen. Jedoch können auch derartig schwache Veränderungen der IL-4- bzw. IFN- γ -Produktion langfristig Auswirkungen auf die IgE-Produktion haben, wie am Beispiel von Mykotoxin von (Wichmann et al., 2003) gezeigt werden konnte. Dabei wurde nach Inkubation mit Mykotoxinen zwischen 10 und 10⁴pg/ml eine leichte IL-4- Stimulation und eine leichte IFN- γ - Inhibition nach 24h Expositionszeit beobachtet. Bei einer weiteren Messung nach sieben Tagen hatte sich die Differenz zwischen IL-4- und IFN- γ - Sekretion vergrößert. Die Messung der IgE- Konzentration im Überstand nach 48h ergab eine deutliche Erhöhung in jenem Konzentrationsbereich, welcher nach 24h nur leichte Differenzen zwischen der IL-4- und der IFN- γ - Sekretion gezeigt hatte.

Die im Gegensatz zu den anderen VOC gemessene direkte Stimulation der IL-4- Sekretion durch Naphthalin lässt sich möglicherweise auf Strukturunterschiede zurückführen. Naphthalin ist mit zwei miteinander verknüpften Benzolringen der kleinste Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Auch für Pyren, einen weiteren Vertreter der PAK, konnte ein direkter stimulierender Effekt auf die IL-4-mRNA- Transkription beobachtet werden (Bommel et al., 2000). Beobachtet wurde eine Stimulierung der basalen Transkription des IL-4- Promotors in Abhängigkeit von der Pyren- Konzentration. Es ist denkbar, dass auch im Fall von Naphthalin ein direkter Effekt auf DNA- Ebene (Promotor- Induktion) zur beobachteten Stimulation der IL-4- Produktion führte.

Mit Ausnahme von Naphthalin lieferten die direkten Effekte der VOC auf PBMC keine Anhaltspunkte für eine Erhöhung des Risikos für allergische Erkrankungen. Wie bereits angesprochen kann die Ursache dafür in der Tatsache begründet sein, dass die PBMC in der Expositionskette nicht an erster Stelle stehen und somit möglicherweise nicht der auslösende Faktor jener Regulationskaskade sind, welche die in den genannten epidemiologischen Studien wie LARS und LISA beobachteten allergischen Sensibilisierungen gegenüber Nahrungsmittel oder anderen Allergenen verursachen.

Die in der Literatur (tierexperimentelle Studien, Kammerexposition, klinische Fallberichte) beschriebenen inflammatorischen Effekte konnten in vitro in soweit nachvollzogen werden, als die getesteten VOC-Konzentrationen an PBMC proinflammatorische Effekte auslösen konnten. Es kann also eingeschätzt werden, dass das verwendete Modell geeignet ist zur Untersuchung immuntoxikologischer bzw. immunmodulierender Effekte flüchtiger Chemikalien.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Modulation der T-Zellfunktion durch flüchtige aromatische Verbindungen

eingereicht von Christian Kulla,
geboren am 06.12.1974 in Karlsruhe

angefertigt am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ in Kooperation mit dem Institut für Umweltmedizin und Umwelthygiene der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von
Frau Dr. I. Lehmann und Herrn Dr. G. Wichmann
Herrn Prof. Dr. O. Herbarth

eingereicht im November 2004

Die Rate an Allergien hat in Deutschland wie auch in den meisten westlichen Ländern über die vergangenen Jahrzehnte stetig zugenommen. Epidemiologische Studien haben im Rahmen der Ursachensuche drei große Gruppen an begünstigenden Faktoren als Ursache ausgemacht: Genetische Veranlagung, Umweltfaktoren und Lebensweise. Um den Entstehungsmechanismus im Kontext mit Umweltfaktoren, insbesondere Schadstoffen der Innenraumluft, näher zu durchleuchten, wurde im Rahmen der Leipziger-Allergie-Risikokinder-Studie (LARS) die Innenraumkonzentration diverser chemischer Verbindungen im Zusammenhang mit dem Auftreten allergischer Erkrankungen im frühen Kindesalter korreliert. Dabei konnte für einige Schadstoffe eine signifikante Assoziation zu dem Auftreten allergischer Sensibilisierungen nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die isolierte Wirkung einzelner ausgesuchter chemischer Verbindungen auf Zellen des Immunsystems zu untersuchen und die epidemiologischen Daten aus oben genannter Studie zu verifizieren. Dabei ging es vor allem um die Frage, ob

infolge der Exposition mit flüchtigen organischen Verbindungen die Sekretion bestimmter Zytokine, welche für die Balance zwischen Entzündungsreaktion- und allergischer Reaktion maßgeblich sind, gehemmt oder stimuliert wird. Untersucht wurden immunmodulierende Effekte der flüchtigen Organika Toluol, Chlorbenzol, Styrol, Xylol und Naphthalin.

Um die Zielzellen, mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut, den gewünschten Konzentrationen an flüchtigen Verbindungen auszusetzen, wurde ein System entwickelt, welches erlaubt, die flüchtigen und schwer löslichen Chemikalien auf kontrollierte und reproduzierbare Art in das Zellkulturmedium überzuführen. Sechs einzelne Zellkulturröhrchen wurden mit jeweils einer Millionen peripherer Blutzellen in einem Milliliter Zellkulturmedium in eine Glasflasche mit einem Innenvolumen von 600ml gestellt. Ein Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Organika wurde hergestellt. Eine der Anzahl der einzelnen Konzentrationen entsprechende Menge an den oben genannten Flaschen wurden anschließend mit einer der Konzentrationen beimpft, wobei darauf geachtet wurde, dass die Chemikalien nicht direkt in das Zellkulturmedium appliziert wurden. Anschließend wurden diese Flaschen verschlossen und für 24h in einem Brutschrank gestellt. Ausnahme stellt hier die Exposition gegenüber Naphthalin dar, da es sich mittels Lösungsmittel direkt in das Medium applizieren ließ. Die weitere Hantierung erfolgte wie bei den übrigen Chemikalien auch in der Glasflasche. Die nach 24h abzentrifugierten Kulturüberstände wurden mittels ELISA- Assay auf die Menge an sezernierten Zytokinen getestet.

Mit Ausnahme von Naphthalin konnte bei keiner der untersuchten Verbindungen ein Effekt auf das Zytokinsekretionsprofil von T-Lymphozyten (Th1/Th2-Regulation) gefunden werden, so dass bisher kein Hinweis für eine durch Toluol, Chlorbenzol, Styrol und Xylol verursachte Erhöhung des Risikos allergischer Erkrankungen vorliegt. Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Konzentrationsbereich der vier zuletzt genannten Chemikalien ($71,67 - 91,8 \cdot 10^4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft) deckte zwar nicht jene Konzentrationen ab, welche in der LARS-Studie mit der Entstehung von Sensibilisierungen gegen Nahrungsmittelallergene assoziiert waren, jedoch liegen bereits weiterführende Untersuchungen aus dem Umweltforschungszentrum in Leipzig (Department Umweltimmunologie) vor, welche auch in den epidemiologisch für positiv assoziiert gefundenen sehr geringen Konzentrationsbereichen ($0,1 - 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft) keine direkten Effekte auf die T-Zell-Regulation fanden (persönliche Mitteilung, Gundula Fischäder).

Im Gegensatz zu den fehlenden Effekten auf die Th1/Th2-Regulation fanden sich bei Toluol, Chlorbenzol, Styrol und Xylol eindeutige Hinweise auf zytotoxische und vor allem proinflammatorische Effekte. In einem Konzentrationsbereich von $91,8 \cdot 10^1$ bis

$71,7 \cdot 10^4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ wurde die Produktion des Zytokins $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert, während die Produktion der Zytokine IL-4, IL-2 und $\text{IFN-}\gamma$ inhibiert wurde oder unbeeinflusst blieb, mit Ausnahme der Stimulation der $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion durch m-Xylol bei $21,5 \cdot 10^3 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Im Gegensatz zu den teilweise großen individuellen Unterschieden mit Abweichungen vom Ausgangswert von über 200% in der Zytokinproduktion der einzelnen Spender fand sich bei der Messung der Zellvitalität eine maximale Hemmung auf 68% des Ausgangswertes. Hinweise auf zytotoxische und proinflammatorische Effekte der genannten Chemikalien wurden bereits in epidemiologischen Studien und Tierexperimenten gefunden.

Bei den experimentellen Ansätzen mit Naphthalin zeigte sich demgegenüber unter den untersuchten Zytokinen eine deutliche Dysbalance zugunsten des allergiefördernden Zytokins Interleukin 4. In einem Konzentrationsbereich von 25ng/ml bis 2500ng/ml wurde unter dem Einfluss von Naphthalin eine Stimulation der IL-4-Produktion bei gleichzeitig fehlendem Einfluss auf die $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion beobachtet. Eine Exposition gegenüber Naphthalin könnte demnach über eine Modulation der T-Zell-Reaktivität in Richtung einer verstärkten Th2-Reaktivität zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit allergischer Überreaktionen führen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich nach Exposition gegenüber flüchtigen organischen Verbindungen direkte Effekte auf die Zytokinsekretion peripherer Blutzellen messen lassen. Proinflammatorische Effekte, wie in Publikationen beschrieben, konnten nachgewiesen werden. Möglicherweise lassen sich deshalb mit der in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Methode tierexperimentelle Studien zur Untersuchung immunmodulierender Wirkung chemischer Verbindungen teilweise oder vollständig ersetzen. Dass im Falle von Chlorbenzol, Styrol, Toluol und Xylol die epidemiologischen Hinweise auf ein durch diese Verbindungen verursachtes erhöhtes Allergierisikos nicht bestätigt werden konnten, ist möglicherweise in der Tatsache begründet, dass die peripheren Blutzellen (Lymphozyten/Monozyten) in der Expositionskette nicht an erster Stelle stehen und somit möglicherweise nicht der auslösende Faktor jener Regulationskaskade sind, welche die beobachtete allergische Sensibilisierung verursachen.

Naphthalin als einzige aromatische Verbindung mit zwei Benzolringen zeigt wahrscheinlich aufgrund der strukturellen Differenz zu allen anderen getesteten Verbindungen differente Effekte auf die Immunregulation. Nur für diese Verbindung wurde ein direkter stimulierender Effekt auf die Sekretion des allergiefördernden IL-4 beobachtet. Damit liegt die Vermutung nahe, dass eine Exposition gegenüber Naphthalin zu einer Erhöhung des Allergierisikos beitragen kann.

Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, and Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787-793.
- Anderson HR, Bloor K, Macnair RS, and Ramsey J (1986) Recent trends in mortality associated with abuse of volatile substances in the UK. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* **293**:1472-1473.
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Chlorobenzene. 1990.
Ref Type: Report
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Styrene. 1992.
Ref Type: Report
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Xylene. 1995.
Ref Type: Report
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Toluene. 2000.
Ref Type: Report
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2-Methylnaphthalene. 2003.
Ref Type: Report
- Bjornsson E, Janson C, Plaschke P, Norrman E, and Sjoberg O (1995) Venom allergy in adult Swedes: a population study. *Allergy* **50**:800-805.
- Baelum J, Andersen IB, Lundqvist GR, Molhave L, Pedersen OF, Vaeth M, and Wyon DP (1985) Response of solvent-exposed printers and unexposed controls to six-hour toluene exposure. *Scand.J Work Environ.Health* **11**:271-280.

-
- Bommel H, Li-Weber M, Serfling E, and Duschl A (2000) The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J Allergy Clin.Immunol.* **105**:796-802.
- Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, and von Mutius E (2002) Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N.Engl.J.Med.* **347**:869-877.
- Brunekreef B, Dockery D, Speizer FE, Ware JH, Spengler JD, and Ferris BG (1989) Home dampness and respiratory morbidity in children. *Am Rev.Respir.Dis.* **140**:1363-1367.
- Carpenter CP, Kinkead ER, Geary DL, Jr., Sullivan LJ, and King JM (1975) Petroleum hydrocarbon toxicity studies. VIII. Animal and human response to vapors of "140 degrees Flash Aliphatic Solvent". *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **34**:413-429.
- Carpenter CP, Shaffer CB, Weil CS, and Smyth HFJr (1944) Studies on the inhalation of 1,3-butadiene; with a comparison of its narcotic effect with benzol, toluol, and styrene, and a note on the elimination of styrene by the human. *Journal of Industrial Hygiene* 69-78.
- Chmielewski J, Dolmierski R, Renke W, and Kwiatkowski SR (1977) [Long-term effects of styrene on workers at the working place]. *Z.Gesamte Hyg.* **23**:639-643.
- Chuang JC, Mack G, and Kuhlmann MRea (1991) Polycyclic aromatic hadrocarbons and their derivates in indoor and outdoor air in an eight-home study. *Atmospheric Environment* **25B(3)**:369-380.
- Croft M, Carter L, Swain SL, and Dutton RW Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles.
- de Ceaurriz JC, Micellino JC, Bonnet P, and Guenier JP (1981) Sensory irritation caused by various industrial airborne chemicals. *Toxicol.Lett.* **9**:137-143.
- Diez, U, Rehwagen, M., Rolle-Kampczyk, U., Wetzig, H., Schulz, R., Richter, M., Lehmann, I., and Borte, M. Redecoration of apartments promotes obstructive bronchitis in atopy risk infants - Results of the LARS study. *Int J Hyg Environ Health* 206, 173-179. 2003.
- Ref Type: Abstract

-
- Diez U, Kroessner T, Rehwagen M, Richter M, Schlink U, Krumbiegel P, Fritz G, Schulz R, Wetzig H, Metzner G, Herbarth O, and Borte M (1999) Einfluss von Innenraumchemikalien auf die Häufigkeit von Infektionen der oberen Luftwege und die Atopie-Entwicklung in den ersten Lebenswochen. *Pädiatr.Grenzgeb.* **37**:469-485.
- Diez, U., Kroessner, T., Rehwagen, M., Richter, M., Schulz, R., Wetzig, H., Borte, M., and Herbarth, O. Einfluß chemischer Innenraumbelastung auf die Atopie-Entwicklung und Infektionen der oberen Luftwege bei Säuglingen in den ersten Lebenswochen. 14. 27-11-1998. Jena, Arbeitsgruppe Thüringer Hygieniker e.V.
Ref Type: Conference Proceeding
- EPA: Environmental Protection Agency (US). Integrated Risk Information System (IRIS) on Toluene. 1999.
Ref Type: Internet Communication
- Fauroux B (2003) [Smoking, fetal pulmonary development and lung disease in children]. *J.Gynecol.Obstet.Biol.Reprod.(Paris)* **32**:1S17-1S22.
- Filipiak B, Heinrich J, Schafer T, Ring J, and Wichmann HE (2001) Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany-- results from the MONICA/KORA study Augsburg. *Clin.Exp.Allergy* **31**:1829-1838.
- Guzelian P, Mills S, and Fallon HJ (1988) Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *J Occup.Med.* **30**:791-796.
- Haas H and Schlaak M (1994) [The Th1/Th2 concept--its importance for regulation of IgE]. *Immun.Infekt.* **22**:88-93.
- Haby MM, Marks GB, Peat JK, and Leeder SR (2000) Daycare attendance before the age of two protects against atopy in preschool age children. *Pediatr Pulmonol* **30**:377-384.
- Hake DH (1981) Interstitial nephritis and cimetidine. *Ann.Intern.Med.* **94**:416.
- Hastings L, Cooper G, and Burg W (1986) Human sensory response to selected petroleum hydrocarbons. *Advances in modern environmental toxicology* **6**:255-270.
- Heinrich J, Gehring U, Douwes J, Koch A, Fahlbusch B, Bischof W, and Wichmann HE (2001) Pets and vermin are associated with high endotoxin levels in house dust. *Clin.Exp.Allergy* **31**:1839-1845.

-
- Hems G (1969) Lung cancer: smoking and other associated factors. *Br.J.Cancer* **23**:661-669.
- Herbarth O, Diez U, Fritz G, Kroessner T, Krumbiegel P, Lehmann I, Metzner G, Müller A, Rehwagen M, Richter M, Rolle-Kampezyk U, Schlink U, Schulz R, Wetzig H, and Borte M (2000a) Allergieentwicklung im frühen Kindesalter, pp 31-39, Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen.
- Herbarth O, Diez U, Fritz G, Kroessner T, Krumbiegel P, Lehmann I, Metzner G, Müller A, Rehwagen M, Richter M, Schulz R., Wetzig H, and Borte M (2000b) Air-pollution-dependent changes in the morbidity of children. *Air Pollution* **8**:775-781.
- HSDB: Hazardous Substances Data Bank. Chlorobenzene. 14-2-2003.
Ref Type: Report
- Huggett AC, Schilter B, Roberfroid M, Antignac E, and Koeman JH (1996) Comparative methods of toxicity testing. Consensus document following an International Life Sciences Institute-ILSI Europe Workshop held in May 1995. *Food Chem.Toxicol.* **34**:183-192.
- Hung IF, Fang HF, and Lee TS (1992) Aliphatic and aromatic hydrocarbons in indoor air. *Bull.EnvIRON.Contam Toxicol.* **48**:579-584.
- Janson C, Anto J, Burney P, Chinn S, de Marco R, Heinrich J, Jarvis D, Kuenzli N, Leynaert B, Luczynska C, Neukirch F, Svanes C, Sunyer J, and Wjst M (2001) The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? European Community Respiratory Health Survey II. *Eur.Respir.J.* **18**:598-611.
- Kerkhof M, Koopman LP, van Strien RT, Wijga A, Smit HA, Aalberse RC, Neijens HJ, Brunekreef B, Postma DS, and Gerritsen J (2003) Risk factors for atopic dermatitis in infants at high risk of allergy: the PIAMA study. *Clin.Exp.Allergy* **33**:1336-1341.
- Kilpi T (2002) [Vaccinations have their benefits--but what are their adverse effects?]. *Duodecim* **118**:63-69.
- Klaschka FVD (1994) Kontaktallergene, chemische, klinische und experimentelle Daten (Allergenliste), in *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-Arbeitsmedizinische Begründungen für MAK- Werte* (Greim H ed) pp 142-143, Erich Schmidt Verlag, Berlin.

-
- Krämer U, Behrendt H, Dolgner R, Oppermann H, Ranft U, Ring J, and Schlipkröter H-W (1999) Prävalenzen von Atemwegserkrankungen, Allergien und Sensibilisierungen. *Allergologie* **22**:27-37.
- Lee PN (1986) Passive smoking. *Br.J.Cancer* **54**:1019-1021.
- Lehmann I, Müller A, Diez U, Richter M, Wallach S, Sierig G, Seiffart A, Wetzig H, Borte M, and Herbarth O (2003) Indoor Mould Exposure Reduces Th1 Reactivity in early childhood. *Indoor and Built Environment*(accepted).
- Lehmann I, Rehwagen M, Diez U, Seiffart A, Rolle-Kampczyk U, Richter M., Wetzig H, Borte M, and Herbarth O (2001) Enhanced in vivo IgE production and T cell polarization to the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. *Int J Hyg Environ Health* **204**:211-221.
- Lehmann I, Thielke A, Rehwagen M, Rolle-Kampczyk U, Schlink U, Schulz R, Borte M, Diez U, and Herbarth O (2002) The influence of maternal exposure to volatile organic compounds on the cytokine secretion profile of neonatal T cells. *Environ.Toxicol.* **17**:203-210.
- Lindfors A, Hage-Hamsten M, Rietz H, Wickman M, and Nordvall SL (1999) Influence of interaction of environmental risk factors and sensitization in young asthmatic children. *J Allergy Clin.Immunol.* **104**:755-762.
- Linick M. (1983) Illness associated with exposure to naphthalene in mothballs - Indiana. *MMWR* **32**: 34-35
- Klaucke DN, Johansen M, and Vogt RL (1982) An outbreak of xylene intoxication in a hospital. *Am.J.Ind.Med.* **3**:173-178.
- Korsak Z, Sokal JA, Wasiela T, and Swiercz R (1990) Toxic effects of acute exposure to particular xylene isomers in animals. *Pol.J Occup.Med.* **3**:221-226.
- Makomaski Illing EM and Kaiserman MJ (2004) Mortality attributable to tobacco use in Canada and its regions, 1998. *Can.J.Public Health* **95**:38-44.
- McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M, and Hubbard R (2001) Siblings, multiple births, and the incidence of allergic disease: a birth cohort study using the West Midlands general practice research database. *Thorax* **56**:758-762.

-
- Meulenbelt J, de Groot G, and Savelkoul TJ (1990) Two cases of acute toluene intoxication. *Br.J Ind.Med.* **47**:417-420.
- Mielck A, Reitmeir P, and Wjst M (1996) Severity of childhood asthma by socioeconomic status. *Int J Epidemiol.* **25**:388-393.
- Morley R, Eccleston DW, Douglas CP, Greville WE, Scott DJ, and Anderson J (1970) Xylene poisoning: a report on one fatal case and two cases of recovery after prolonged unconsciousness. *Br.Med.J* **3**:442-443.
- Moscato G, Marraccini P, Dellabianca A, Vinci G, and Candura SM (1988) [Styrene-induced occupational asthma and rhinitis]. *G.Ital.Med.Lav.* **10**:253-259.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, and Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* **136**:2348-2357.
- Moszczyński P and Lisiewicz J (1984) Occupational exposure to benzene, toluene and xylene and the T lymphocyte functions. *Haematologia (Budap.)* **17**:449-453.
- Muller A, Lehmann I, Seiffart A, Diez U, Wetzig H, Borte M, and Herbarth O (2002) Increased incidence of allergic sensitisation and respiratory diseases due to mould exposure: results of the Leipzig Allergy Risk children Study (LARS). *Int.J.Hyg.EnvIRON.Health* **204**:363-365.
- Nicolai T (2002) Pollution, environmental factors and childhood respiratory allergic disease. *Toxicology* **181-182**:317-321.
- Nieminen MM, Kaprio J, and Koskenvuo M (1991) A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest* **100**:70-75.
- NIOSH: National Institute For Occupational Safety And Health. NIOH and NIOSH Basis for an Occupational Health Standard: Chlorobenzene. 1-1-1993.
Ref Type: Report
- Norback D, Wieslander G, Nordstrom K, and Walinder R (2000) Asthma symptoms in relation to measured building dampness in upper concrete floor construction, and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **4**:1016-1025.

-
- NTP: National Toxicology Program, U. S. Department of Health and Human Services. Toxicology And Carcinogenesis Studies of Chlorobenzene. 1985.
Ref Type: Report
- NTP: National Toxicology Program, U. S. Department of Health and Human Services. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (CAS No. 91-20-3) in F344/N Rats (Inhalation Studies). 2000.
Ref Type: Report
- Ogata M, Taguchi T, Hirota N, Shimada Y, and Nakae S (1991) Quantitation of urinary chlorobenzene metabolites by HPLC: concentrations of 4-chlorocatechol and chlorophenols in urine and of chlorobenzene in biological specimens of subjects exposed to chlorobenzene. *Int.Arch.Occup.Environ.Health* **63**:121-128.
- Ohashi Y, Nakai Y, Ikeoka H, Koshimo H, Nakata J, Esaki Y, Horiguchi S, and Teramoto K (1986) Degeneration and regeneration of respiratory mucosa of rats after exposure to styrene. *J Appl.Toxicol.* **6**:405-412.
- Pappas GP, Herbert RJ, Henderson W, Koenig J, Stover B, and Barnhart S (2000) The respiratory effects of volatile organic compounds. *Int J Occup.Environ Health* **6**:1-8.
- Paterson SC and Sarvesvaran R (1983) Plastic bag death--a toluene fatality. *Med.Sci.Law* **23**:64-66.
- Pelcova D, Rossner P, and Pickova J (1990) Chromosome aberrations in rotogravure printing plant workers. *Mutat.Res.* **245**:299-303.
- Pitten FA, Bremer J, and Kramer A (2000) [Air pollution by volatile organic compounds (VOC) and health complaints]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **125**:545-550.
- Platts-Mills TA, Sporik RB, Chapman MD, and Heymann PW (1997) The role of domestic allergens. *Ciba Found.Symp.* **206**:173-185.
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, and von Mutius E (2001) Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* **358**:1129-1133.
- Rippen G. (2004a) Chlorbenzol, in *Handbuch Umweltchemikalien: Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften* (Rippen G. ed) ecomed Sicherheit, Landsberg/ Lech.

-
- Rippen G. (2004b) m-Xylol, in *Handbuch Umweltchemikalien: Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften* (Rippen G. ed) ecomed Sicherheit, Landsberg/ Lech.
- Rippen G. (2004c) Styrol, in *Handbuch Umweltchemikalien: Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften* (Rippen G. ed) ecomed Sicherheit, Landsberg/ Lech.
- Rippen G. (2004d) Toluol, in *Handbuch Umweltchemikalien: Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften* (Rippen G. ed) ecomed Sicherheit, Landsberg/ Lech.
- Roost HP, Kunzli N, Schindler C, Jarvis D, Chinn S, Perruchoud AP, Ackermann-Liebrich U, Burney P, and Wuthrich B (1999) Role of current and childhood exposure to cat and atopic sensitization. European Community Respiratory Health Survey. *J.Allergy Clin.Immunol.* **104**:941-947.
- Rozenbaum NDBRSKSN (1947) Use of chlorobenzene as a solvent from the standpoint of industrial hygiene. *Gig.I Sanit.* 21-24.
- Sad S and Mosmann TR (1995) Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8+ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *J.Exp.Med.* **182**:1505-1515.
- Sato M, Fukayo S, and Yano E (2003) Adverse environmental health effects of ultra-low relative humidity indoor air. *J.Occup.Health* **45**:133-136.
- Schafer T, Kramer U, Dockery D, Vieluf D, Behrendt H, and Ring J (1999) What makes a child allergic? Analysis of risk factors for allergic sensitization in preschool children from East and West Germany. *Allergy Asthma Proc.* **20**:23-27.
- Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Herbison GP, and Poulton R (2002) Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* **360**:901-907.
- Selgrade MK, Daniels MJ, Jaskot RH, Robinson BL, and Allis JW (1993) Enhanced mortality and liver damage in virus-infected mice exposed to p-xylene. *J.Toxicol.EnvIRON.Health* **40**:129-144.
- Shibata K, Yoshita Y, and Matsumoto H (1994) Extensive chemical burns from toluene. *Am.J Emerg.Med.* **12**:353-355.

-
- Shreedhar V, Giese T, Sung VW, and Ullrich SE (1998) A cytokine cascade including prostaglandin E₂, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J.Immunol.* **160**:3783-3789.
- Shugaev BB (1969) Concentrations of hydrocarbons in tissues as a measure of toxicity. *Arch.Environ.Health* **18**:878-882.
- Spencer HC, Irish DD, Adams EM, and Rowe VK (1942) The response of laboratory animals to monomeric styrene. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology* **295-296**.
- Stengel B, Cenee S, Limasset JC, Diebold F, Michard D, Druet P, and Hemon D (1998) Immunologic and renal markers among photogravure printers exposed to toluene. *Scand.J.Work Environ.Health* **24**:276-284.
- Stewart RD, Dodd HC, Baretta ED, and Schaffer AW (1968) Human exposure to styrene vapor. *Arch.Environ.Health* **16**:656-662.
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**:1259-1260.
- Svanes C, Jarvis D, Chinn S, Omenaas E, Gulsvik A, Burney P, and European Community Respiratory Health Survey (2002) Early exposure to children in family and day care as related to adult asthma and hay fever: results from the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax* **57**:945-950.
- Svirbely JL, Dunn RC, and von Oettingen WF (1943) The acute toxicity of vapors of certain solvents containing appreciable amounts of benzene and toluene. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology* **25**:366-373.
- Tariq SM, Arshad SH, Matthews SM, and Hakim EA (1999) Elevated cord serum IgE increases the risk of aeroallergen sensitization without increasing respiratory allergic symptoms in early childhood. *Clin.Exp.Allergy* **29**:1042-1048.
- Tarkhova LP (1965) [Data on the determination of the maximum permissible concentration of chlorobenzene in the atmosphere]. *Gig.Sanit.* **30**:8-17.
- Von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, and von Kries R (2000) Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin.Exp.Allergy* **30**:187-193.

-
- von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, and Thiemann HH (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir.Crit Care Med.* **149**:358-364.
- Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, and Guggenmoos-Holzmann I (1997) Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J.Allergy Clin.Immunol.* **99**:763-769.
- Wichmann G, Herbarth O, and Lehmann I (2002) The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ.Toxicol.* **17**:211-218.
- Wichmann G, Krumm B, Dröbber K, Herbarth O, and Lehmann I (2003) The effect of gliotoxin and patulin on human T cell function. *Indoor and Built Environment in print.*
- Wieslander G, Norback D, Bjornsson E, Janson C, and Boman G (1997) Asthma and the indoor environment: the significance of emission of formaldehyde and volatile organic compounds from newly painted indoor surfaces. *Int Arch.Occup.Environ Health* **69**:115-124.
- Wieslander G, Norback D, and Edling C (1994) Occupational exposure to water based paint and symptoms from the skin and eyes. *Occup.Environ.Med.* **51**:181-186.
- Wilson NK, Kuhlmann MR, and Chuang JC (1989) A quiet sampler for the collection of semivolatile organic pollutants in indoor air. *Environmental Science Technology* **23**:1112-1116.
- Wong O (1990) A cohort mortality study and a case-control study of workers potentially exposed to styrene in the reinforced plastics and composites industry. *Br.J.Ind.Med.* **47**:753-762.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder enutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Joensuu, 15.02.2005

Christian Kulla

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Kulla
Geburtsdatum/-ort: 06.12.1974, Karlsruhe
Familienstand: Ledig

Schulbildung

1981-1985 Grundschole Rheinstetten Mörsch
1985-1992 Gymnasium Rheinstetten
1992-1993 Austauschjahr Joensuu, Finnland
1993-1995 Gymnasium Rheinstetten
1995 Abitur, Note 1,7

Zivildienst

1995-1996 Hagsfelder Werkstätten GmbH

Studium

1996-1998 Universität Leipzig, Studium der Humanmedizin
1998 Ärztliche Vorprüfung, Note „ausreichend“
1998-2003 Universität Leipzig, Studium der Humanmedizin
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung „befriedigend“

Promotion

Seit 2001 Department Umweltimmunologie am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle in Kooperation mit dem Institut für Umweltmedizin und Umwelthygiene der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Zusatzqualifikation

1997-2000 Fachübersetzer für Englisch/Medizin
Fachsprachenzentrum der Universität Leipzig

Berufliche Tätigkeit

VI-X/2004 Arzt im Praktikum, Städtisches Klinikum Karlsruhe
Ab XI/2004 Assistenzarzt im Regionalkrankenhaus Joensuu, Finnland

Helmholtz-Zentrum
für Umweltforschung GmbH – UFZ
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Internet: www.ufz.de

