

# Bedeutung der Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen in der Umweltmedizin

## Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“

### 1 Einleitung

Umwelterkrankungen werden immer wieder mit Alterationen immunologischer Prozesse in Verbindung gebracht [2]. In den letzten Jahren standen im Focus des Interesses mögliche Auswirkungen umweltmedizinischer Expositionen auf die relativen Anteile von Lymphozyten-Subpopulationen. Deren Analyse mittels Durchflusszytometrie anhand spezifischer Oberflächenmarker ist heute – noch vor dem Lymphozytentransformationstest (LTT) und der Bestimmung von Zytokinen – die Hauptmethode der immunologischen zellulären Diagnostik (■ **Abb. 1**) und hat daher auch in die Diagnostik von Umwelterkrankungen Eingang gefunden [3]. Schon lange ist bekannt, dass die Lymphozyten in Untergruppen eingeteilt werden müssen (T-, B- und natürliche Killerzellen), aber erst seitdem nachgewiesen wurde, dass sie durch definierte Oberflächenmoleküle charakterisiert sind, war es möglich geworden, sie mittels ausgefeilter Methoden wie der Durchflusszytometrie zu bestimmen. Veränderungen in der Anzahl einzelner Subpopulationen kann man vor allem bei Immundefekten, Leukämien, Autoimmun- und allergischen Erkrankungen sowie bei Mangel-/Stoffwechselerkrankungen beobachten [4, 5, 6]. Besonders bei der Klassifizierung von Leukämien kommt dieser Methode große Bedeutung zu.

Auf den Stellenwert der Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen bei umweltmedizinischen Fragestellungen soll in dieser Stellungnahme eingegan-

gen werden, unter besonderer Berücksichtigung der Einflüsse von chemischen Substanzen und physikalischen Faktoren. Auf biologische Agentien (z. B. Schimmelpilze) wird hier nicht eingegangen, da diese das Thema weiterer Abhandlungen der o. g. Kommission des RKI sein sollen.

### 2 CD-Nomenklatur

Zellen besitzen Oberflächenmoleküle, die über monoklonale Antikörper identifiziert und damit auch bestimmten Zellentwicklungen zugeordnet werden können. Monoklonale Antikörper, die gleiche Oberflächenstrukturen erkennen, werden in internationalen Workshops einem „Cluster of Differentiation“ (CD) zu-

geordnet. Dies vereinfacht die Klassifizierung von Molekülen, die in verschiedenen Fachdisziplinen mit unterschiedlichen Primärnamen benannt werden. Mit der 8. Revision wurden weitere Cluster aufgenommen, womit – bei Verbleib von freien Positionen für erwartete zusätzliche Moleküle einzelner Molekülgruppen – bereits CD339 erreicht wurde (8th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens [HLDA8], Adelaide 2004).

### 3 Lymphozyten-Subpopulationen

Die Entwicklung der monoklonalen Antikörper zusammen mit der Durchflusszytometrie hat es ermöglicht, in großem

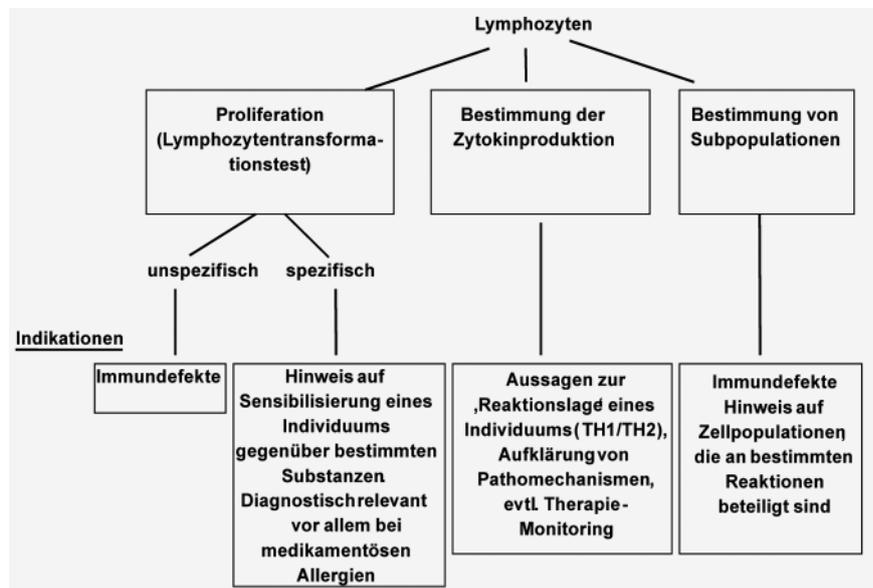


Abb. 1 ▲ Methoden der immunologischen zellulären Diagnostik mit Lymphozyten

Umfang die Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenantigene (CD) weiter in T-, B- und NK-Zellen zu unterteilen (Abb. 2) und von diesen Hauptuntergruppen weitere Subpopulationen zu definieren [7, 8]. Oberflächenmarker werden auch zur Charakterisierung der T-Zellentwicklung während der Hämatopoese eingesetzt.

### 3.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (T-Zellen) erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) Peptide, die ihnen in „Major-histocompatibility-complex“- (MHC-)Molekülen durch Antigen-präsentierende Zellen präsentiert werden, oder auch andere Antigene wie Glykolipide im Komplex mit CD1 auf NK-Zellen [9]. Der TCR bildet einen Komplex mit CD3, das allerdings teilweise auch auf NK-Zellen nachgewiesen werden kann. Die T-Zellen lassen sich in funktionelle Untergruppen mithilfe verschiedener Oberflächenmoleküle, intrazellulärer Marker oder auch der Sekretion definierter Moleküle, wie Zytokine, unterteilen. Die bedeutendsten Untergruppen werden durch die Oberflächenmarker *CD4* und *CD8* definiert. *CD4* ist der Ligand von MHC-II, *CD8* von MHC-I. *CD4+* Zellen (*CD4*-positive Zellen) werden auch noch als T-Helferzellen, *CD8+* Zellen als zytotoxische und Suppressorzellen bezeichnet. Dabei handelt es sich z. T. um geschichtliche Begriffe, die so nicht mehr ganz zutreffend sind. Auch unter den *CD4+* Zellen gibt es regulatorische Zellen (*CD25+*), die im Sinne der Immunantwort eine Suppressoraktivität besitzen [10, 11]. Der Begriff Suppressorzellen ist nicht klar definiert und sollte nicht mehr verwendet werden.

Als wichtige Untergruppen der *CD4+* Zellen kann man die T-Zellen definieren, die noch keinen Antigenkontakt gehabt haben (naive T-Zellen), und solche, die bereits Antigenkontakt hatten („memory“ T-Zellen). Hier hat sich besonders die Expression bestimmter Formen von *CD45*, nämlich *CD45RA* für die naiven und *CD45RO* sowie *CD29* für die Memory-Zellen etabliert. Analog gibt es diese Subtypen auch für *CD8*-Zellen [12, 13]. Funktionell wichtige Untergruppen, v. a. der *CD4+* Helferzellen, sind die T-Helfer (TH)<sub>1</sub>, 2 und 3-Zellen, die sich aus den nur Interleukin-2 (IL-2) sezernierenden THo-Zellen differenzie-

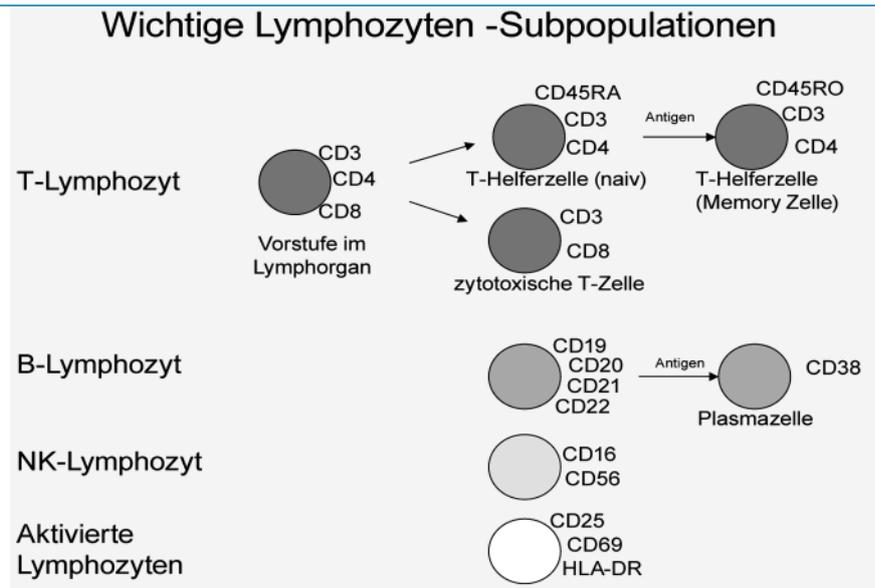


Abb. 2 ▲ Wichtige Lymphozyten-Subpopulationen

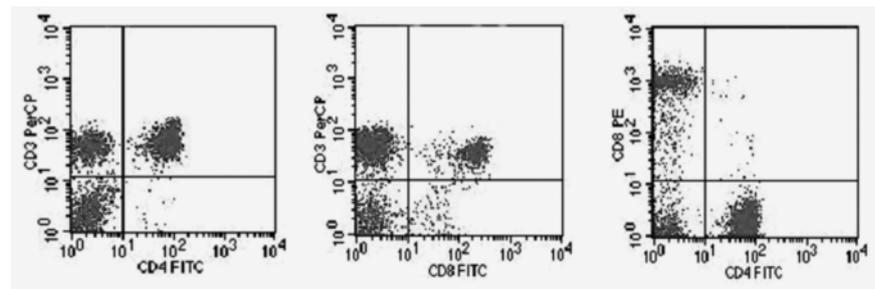


Abb. 3a-c ▲ Nachweis von *CD4*- und *CD8*-Subpopulationen mittels FACS. a Analyse der *CD3*<sup>+</sup>/*CD4*<sup>+</sup>-Lymphozyten: rechter oberer Quadrant: Zellen, die gleichzeitig *CD3*- und *CD4*-positiv sind (das sollten alle *CD4*<sup>+</sup> T-Zellen sein, da alle T-Lymphozyten *CD3*-positiv sind); rechter unterer Quadrant: Zellen die *CD4*<sup>+</sup>/*CD3*<sup>-</sup> sind (könnten z. B. einzelne Monozyten im Gate sein), linker oberer Quadrant: Zellen, die *CD3*<sup>+</sup>/*CD4*<sup>-</sup> sind (z. B. *CD8*<sup>+</sup> Lymphozyten); linker unterer Quadrant: *CD3*<sup>-</sup>/*CD4*<sup>-</sup> Lymphozyten (B- und NK-Zellen). b Analyse der *CD3*<sup>+</sup>/*CD8*<sup>+</sup> Lymphozyten: rechter oberer Quadrant: Zellen, die gleichzeitig *CD3* und *CD8* positiv sind (das sollten alle *CD8*<sup>+</sup> T-Zellen sein, da alle T-Lymphozyten *CD3* positiv sind); rechter unterer Quadrant: Zellen die *CD8*<sup>+</sup>/*CD3*<sup>-</sup> sind (z. B. NK-Subpopulation), linker oberer Quadrant: Zellen, die *CD3*<sup>+</sup>/*CD8*<sup>-</sup> sind (z. B. *CD4*<sup>+</sup> Lymphozyten); linker unterer Quadrant: *CD3*<sup>-</sup>/*CD4*<sup>-</sup> Lymphozyten (B- und NK-Zellen). c Gegenüberstellung von *CD4*<sup>+</sup> (rechte unterer Quadrant) und *CD8*<sup>+</sup> Lymphozyten (linke obere Quadrant); Zellen, die gleichzeitig *CD4* und *CD8* exprimieren (rechte obere Quadrant); linker unterer Quadrant: *CD4*<sup>-</sup>/*CD8*<sup>-</sup> Lymphozyten (B- und NK-Zellen)

ren. Zuerst beschrieben und am besten charakterisiert sind die TH<sub>1</sub> und 2-Zellen [14, 15, 16]. TH<sub>1</sub>-Zellen produzieren Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), IL-2 und Tumor-Nekrose-Faktor-beta (TNF $\beta$ ) und sind für die Etablierung zytotoxischer Reaktionen zur Abwehr intrazellulärer Pathogene zuständig. TH<sub>2</sub>-Zellen sezernieren IL-4, -5, -10 und -13 und aktivieren dadurch die B-Zellantwort (unter anderem die Produktion von IgE, aber auch von anderen Immunglobulinen) und Eosinophile, d. h., sie sind für die Abwehr löslicher Antigene und extrazellulärer Pathogene verantwortlich. Vergleichbare funktionelle Unterschiede bzw.

unterschiedliche Zytokinmuster sind auch bei den *CD8*<sup>+</sup> T-Zellen, wenn auch z. T. weniger klar ausgeprägt, zu finden. TH<sub>3</sub>-Zellen sind durch die Synthese von IL-10 und Tumor Growth Faktor beta (TGF $\beta$ ) charakterisiert. Die Definition dieser drei Subpopulationen über Oberflächenmarker ist schwierig, und die beste Differenzierung ist zurzeit die Färbung intrazellulärer Zytokine oder die Bestimmung definierter Chemokinrezeptoren (TH<sub>1</sub>: CXCR3, CXCR5; TH<sub>2</sub>: CCR4, CCR3).

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich auch Aktivierungsmarker bestimmen, d. h. die Expression von Molekü-

### **Bedeutung der Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen in der Umweltmedizin. Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“**

#### **Zusammenfassung**

Die früheren Erwartungen, dass sich eine Differenzierung der Lymphozyten-Subpopulationen in der Umweltmedizin als wichtige diagnostische Methode erweisen könnte, haben sich nicht erfüllt. Die Analyse der wissenschaftlichen Literatur zeigt vielmehr, dass übliche umweltmedizinische Expositionen nur in besonderen Ausnahmen reproduzierbare Veränderungen von Lymphozyten-Subpopulationen zur Folge haben. Auch sind nach heutigem Kenntnisstand „Umweltkrankheiten“ nicht mit regelmäßigen Veränderungen des Subpopulations-Musters assoziiert. Wenn bei speziellen Fragestellungen dennoch eine Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulation durchgeführt wird, sollten Indikation, Messung und Interpretation der Befunde unter strengen Qualitätskriterien erfolgen. Die Methode der Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen in der Umweltmedizin fällt unter Kategorie IV der Beurteilungskriterien der RKI-Kommission („Eine Maßnahme kann nicht empfohlen werden, weil keine ausreichenden, dies begründenden Untersuchungsergebnisse vorliegen [Anm.: keine konsistenten Veränderungen in epidemiologischen Untersuchungen] und theoretische Überlegungen [Anm.: physiologische Variabilität; mangelnde Expositions-/Stoff-Spezifität] gegen eine Anwendung sprechen“) [1].

len, die erst bei Aktivierung der Lymphozyten auf der Zelloberfläche erscheinen [17]. Hierzu zählen CD69, CD25, CD71 oder HLA-DR auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten. Die Expression von CD38, kostimulatorischen (CD27, CD28) und zytotoxischen Markern (CD57) demonstriert ebenfalls eine Immunaktivierung, v. a. der CD8+ T-Zellen.

#### **3.2 Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen (NK) sind in der Lage, ohne weitere Reifung oder vorhergehende Sensibilisierung Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen abzutöten [18]. Sie weisen auf ihrer Oberfläche als typische Rezeptoren CD16, CD56 und CD57 auf. Zudem finden sich „Natural Cytotoxicity Receptors“ (NCR), deren Expression jeweils positiv mit der Stärke der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen korreliert. Jede humane NK-Zelle exprimiert mindestens ein bis mehrere verschiedene inhibitorische Rezeptoren für MHC-I (KIR) [19, 20]. Aktivierende Isoformen dieser Rezeptoren werden bisweilen auch als „Killer Cell Activating Receptors“ (KAR) bezeichnet. Die Expression dieser Rezeptoren ist genetisch determiniert [20]. Die lektinähnlichen Rezeptoren (KLR) unterscheiden sich zwar hinsichtlich der Struktur und Spezifität von den KIRs, inhibieren NK-Zellen aber in gleicher Weise [21].

Die zytolytische Aktivität von NK-Zellen wird durch die Bilanz aller inhibitorischen und aktivierenden Signale in der Umgebung bestimmt. Überwiegt die inhibitorische Komponente, bleibt die Zelle inaktiv. Erreichen die Zellen hingegen mehr aktivierende Signale, so wird das zytolytische Programm gestartet [22].

#### **3.3 Subpopulationen mit Markern für NK- und T-Zellen**

Die Koexpression von CD3 und CD56 definiert eine im peripheren Blut selten vorkommende T-Zelle (1–5% der gesamten Lymphozytenpopulation), die nicht MHC-restringiert ist [23]. Eine weitere seltene Zellpopulation bilden die sog. NK-T-Zellen. Diese Zellen sind durch die Koexpression des NK-Rezeptors NK1.1 (CD161 oder NKR-P1) und eines TCR charakterisiert, wobei das TCR-Repertoire extrem

eingeschränkt ist [24]. Auch die „Large granular Lymphocytes“ (LGL) repräsentieren eine kleine Gruppe von Zellen, die sowohl Charakteristika von T- als auch NK-Zellen aufweisen können. Etwa 5–15% der peripheren Lymphozyten beim Gesunden sind LGLs. LGL-Zellen sind in erster Linie morphologisch definiert [25].

#### **3.4 B-Lymphozyten**

B-Lymphozyten (B-Zellen) sind vor allem durch die Expression von CD19, CD20, CD21 und CD22 auf ihrer Oberfläche charakterisiert. Sie sind die Träger der spezifischen humoralen Immunantwort und besitzen klonotypische, oberflächengebundene Immunglobuline als Antigenrezeptoren. Diese sind mit den signaltransduzierenden Molekülen Ig $\alpha$  (CD79a) und Ig $\beta$  (CD79b) assoziiert. B-Zellen können sowohl infolge Kontakts mit dem Antigen direkt (T-Zell-unabhängig) als auch durch Kontakt und Signale von antigenspezifischen Helfer-T-Zellen zu langlebigen Gedächtniszellen oder Plasmablasten werden. Die Gedächtniszellen rezirkulieren in Blut und lymphatischen Organen, während sich die Plasmablasten überwiegend ins Knochenmark orientieren und dort eine Enddifferenzierung zu langlebigen, Antikörper-produzierenden Plasmazellen erfahren. Die verschiedenen Differenzierungsstadien der B-Zellen im peripheren Blut und Knochenmark lassen sich inzwischen gut anhand der Expression von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen unterscheiden [26].

#### **4 Methodik zum Nachweis von Lymphozyten-Subpopulationen**

Der Nachweis lymphozytärer Subpopulationen ist nicht mit klassischen hämatologischen Methoden möglich. Er erfordert die Charakterisierung zellspezifischer Marker mittels direkt oder indirekt markierter monoklonaler Antikörper. Die Auswertung kann (fluoreszenz-)mikroskopisch oder durch zytometrische Methoden erfolgen. In der Medizin erfolgt die Analyse von Lymphozyten-Subpopulationen des peripheren Blutes heute im Allgemeinen durchflusszytometrisch, weitere Methoden, wie z. B. Chip- oder Partikelarrays, sind in Entwicklung. Die

## Übersicht 1

### Mittels Durchflusszytometrie messbare Zelleigenschaften und -funktionen (Beispiele)

- Oberflächenmoleküle
- Zellgröße
- Zellgranularität
- DNA-Gehalt
- RNA-Gehalt
- Proteingehalt
- Intrazellulärer pH-Wert
- Membranpotenzial
- Mitochondriengehalt
- Mitochondriale Aktivität
- Calcium-Einstrom
- Enzymaktivität
- Zellaktivierung
- Rezeptorbindung
- Zytokinsekretion
- Phagozytose
- Oxidativer Burst
- Zytotoxische Aktivität
- Nekrose
- Apoptose

Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, eine hohe Anzahl immunologischer, funktioneller und/oder molekularer zellulärer Parameter in heterogenen Zellgemischen Zelle für Zelle zu vermessen. Das Prinzip besteht darin, dass Zellen nach spezifischer Anfärbung mit fluoreszenten Molekülen – zurzeit sind routinemäßig parallel bis zu 4 Färbungen üblich, die Entwicklungen gehen aber weiter – in einer Durchflusskammer nach hydrodynamischer Fokussierung [27] in einem engen Flüssigkeitsstrom durch einen Messpunkt gelenkt werden. Die Fluoreszenzlichtpulse der Zellen werden dabei aufgefangen, verstärkt, miteinander verrechnet und klassifiziert (■ **Abb. 3**). Die eingesetzte Zellzahl liegt bei den meisten Messungen bei etwa  $10^5$  Zellen pro Einzelansatz, es können jedoch auch auswertbare Bestimmungen mit weniger Zellen durchgeführt werden. Neben Oberflächenantigenen (CD) zur Charakterisierung von Subpopulationen können mit der Durchflusszytometrie auch intrazelluläre Zytokine, Chemokine, DNA und andere Biomoleküle zur Funktionsanalyse von Lymphozyten gemessen werden (■ **Übersicht 1**). Nicht nur die einzelnen Subpopulationen, sondern auch ihr Differenzierungsgrad, ihr

Aktivierungszustand sowie ihre Fähigkeit, Zytokine und Chemokine zu produzieren, können mit dieser Methode erfasst werden [4, 5, 28]. Auf die Bedeutung und Methodik der durchflusszytometrischen Zytokinmessungen wurde bereits in einer früheren Stellungnahme eingegangen [29].

Während in ersten Protokollen die Färbung von Zellen des Blutes erst nach Separation der Leukozyten erfolgte, wird heute meist Vollblut inkubiert und vor der Messung eine Erythrozytenlyse durchgeführt.

Die meisten heute gebräuchlichen Geräte enthalten Dioden- oder Ionenlaser mit 488 nm (blau), ggf. auch 532 nm (grün) und/oder 633 nm (rot) zur Fluoreszenzanregung.

Die Normbereiche für die wesentlichen Lymphozyten-Subpopulationen sind in ■ **Tabelle 1** aufgeführt.

### 5 Bedeutung der Verschiebungen innerhalb der Lymphozyten-Subpopulationen und Indikationen für ihre Bestimmung

Die Lymphozyten im peripheren Blut stellen nur 2% des gesamten Lymphozytenpools des menschlichen Körpers dar ( $10 \times 10^9$  Zellen). Bei der Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut wird nur dieser Anteil erfasst. Lymphozyten werden pro Tag ca. 50-mal ausgetauscht, das bedeutet, dass täglich  $500 \times 10^9$  Lymphozyten den Blutkreislauf passieren. Hinzu kommt, dass eine Reihe physiologischer Faktoren einen Einfluss auf die Lymphozytenverteilung im Blut hat, wie z. B. Stress, körperliche Anstrengung, das Alter, ethnische Zugehörigkeit oder Medikamente. Ferner besteht ein circadianer Rhythmus für verschiedene Lymphozyten-Subpopulationen. Wie in ■ **Tabelle 2** dargestellt, findet sich eine Verschiebung innerhalb der Lymphozyten-Subpopulationen bei unterschiedlichen Erkrankungen.

#### Indikationen für die Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen

Veränderungen der T-Zell-Subpopulationen kommen physiologisch (circadianer Rhythmus, Stress etc.) vor, spielen v. a. aber im Zusammenhang mit der Bewertung pathologischer Veränderungen eine

Rolle. Es gibt eine Reihe gut etablierter Indikationen für die routinemäßige Bestimmung von T-Zell-Subpopulationen, wie angeborene oder erworbene Immundefekte, einschließlich der HIV-Infektion sowie Leukämien und Lymphome [5, 6, 7, 30, 31]. Die im Rahmen der prognostischen Einschätzung der HIV-Erkrankung etablierte Standard-Parameterkombination zur Charakterisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes umfasst Antikörper gegen T- (CD3), T-Helfer- (CD4), T-zytotoxische (CD8), B- (CD19) und NK-Zellen (CD16 und/oder CD56). Die Verlaufskontrolle der CD4+ und CD8+ T-Zellen ist wichtig, da ein Absinken der CD4+ T-Zellen als prognostisch ungünstig angesehen werden kann. Die Beurteilung von Immundefekten kann im Einzelfall die Einbeziehung zusätzlicher Parameter auch auf B-Zell-Ebene erfordern. Häufig werden je nach klinischer Fragestellung zusätzliche Aktivierungsmarker gemessen, z. B. HLA-DR, Interleukin-2-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette: CD25), CD38 und Transferrin-Rezeptor (CD71) [30, 32]. Beim „Common-variable-immunodeficiency“- (CVID-) Syndrom kann die Analyse der B-Zell-Reifung von Interesse sein.

Bei den Leukämien und Lymphomen hilft die Immunphänotypisierung mittels Oberflächenmarker bei der Unterscheidung zwischen akuter lymphatischer oder akuter myeloischer Leukämie oder bei der Klassifikation von Lymphomen.

Basierend auf der Analyse verschiedener Zelloberflächenmarker können – wie bereits oben erwähnt – T-Helferzellen als naive (CD45RA) und Memory-Zellen (CD45RO+) charakterisiert werden. Ihre Bestimmung kann bei Arthritiden, nach Transplantationen [33] oder bei HIV-Infektion [13, 34] Relevanz besitzen.

#### Indikationen zur Bestimmung der Lymphozytenfunktion

Neben der Bestimmung von Oberflächenmarkern bietet die Durchflusszytometrie aber auch die Möglichkeit, die Reaktion von Lymphozyten auf Mitogen- oder Antigen-spezifische Reize zu messen [35], d. h. einen Lymphozytentransformationstest durchzuführen, bei dem auf radioaktive Messmethoden verzichtet werden kann. Die DNA-Synthese kann über die S-Phase, via Bromdesoxyuridin-Inkorporation

Tabelle 1

**Typische Normbereiche der wesentlichen Lymphozyten-Subpopulationen im Blut von Erwachsenen (in Anlehnung an [140])**

| Zelltyp               | Oberflächenmolekül | Anteil in % bezogen auf die gesamte Lymphozyten-Population |
|-----------------------|--------------------|--|
| T-Zellen              | CD3+               | 69–93  |
| T-Helferzellen        | CD4+               | 35–72  |
| Zytotoxische T-Zellen | CD8+               | 7–33   |
| Naive T-Zellen        | CD4+CD45RA+        | 14–43  |
| Gedächtnis-T-Zellen   | CD4+CD29+ CD45RO+  | 11–38  |
| Aktivierte T-Zellen   | • CD3+CD25+        | 1–7  |
|                       | • CD3+HLA-DR+      | 1–11   |
| Reife B-Zellen        | CD19+              | 3–13   |
| Unreife B-Zellen      | • CD19+CD5+        | 0–2  |
|                       | • CD19+CD10+       | 0–2  |
| NK-Zellen             | CD16+CD56+CD3–     | 3–31   |

oder durch Markierung der Zellen mit spezifischen Farbstoffen gemessen werden [36, 37]. Die Indikationen dieses Testes wurden bereits in einer früheren Stellungnahme beschrieben [29]. Als Messparameter zur Bestimmung der Aktivierung von Lymphozyten kommen auch Zelloberflächenmoleküle wie CD69 (sehr schneller Anstieg in wenigen Stunden, Maximum nach 2–3 Tagen) und intrazelluläre Zytokine (s. u.) in Frage [38].

Allerdings korrelieren die Werte aus der CD69-Bestimmung nicht unbedingt mit den Ergebnissen aus Messungen der DNA-Synthese, da die verwendeten Aktivierungsmarker nicht zwangsläufig mit einer DNA-Synthese gekoppelt sein müssen.

**Indikationen zur Bestimmung des TH1/TH2-Verhältnisses**

Wie bereits früher beschrieben, können TH1- und TH2-relevante Zytokine nach Inkubation von Lymphozyten mit verschiedenen Antigenen in den Lymphozytenüberständen mittels ELISA nachgewiesen werden [29]. Als intrazelluläre Zytokine lassen sie sich aber auch durchflusszytometrisch nachweisen, was besonders gut für die Zytokine IL-2, IL-4 und IFN $\gamma$  aber nur eingeschränkt für andere Zytokine gelingt. Die Analyse der TH1/TH2-Verteilung hat Bedeutung für verschiedene klinische Bereiche, wie z. B. die Infektiologie, Allergologie, Onkologie und im Rahmen von Autoimmunerkrankungen [15].

**6 Einfluss von Umweltfaktoren auf Lymphozyten-Subpopulationen**

In den letzten 20 Jahren sind Umwelttoxinen, vor allem chemische Stoffe, aber auch Lärm und elektromagnetische Felder hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Immunsystem ebenso untersucht worden wie mögliche immunologische Veränderungen bei Umwelterkrankungen. Umwelttoxine können auf verschiedene Weise Lymphozyten-Subpopulationen beeinflussen, indem sie entweder als Antigene wirken (z. B. Nickel, p-Phenylendiamin etc.) oder die Differenzierung bzw. Aktivierung von Lymphozyten beeinflussen. Beide Mechanismen sind in unterschiedlicher Weise Stoff- und Dosisabhängig und können mit Verschiebungen von Subpopulationen oder der Veränderung der Expression von Aktivierungsmarkern einhergehen. Um Hinweise auf immuntoxische Gefährdungspotenziale, Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Wirkmechanismen einer potenziellen Noxe zu erhalten, werden zunächst immunologische Untersuchungen mit Versuchstieren und Zellsystemen vorgenommen. Jedoch sind wegen der Komplexität des menschlichen Immunsystems mit seiner Sensitivität gegenüber exogenen oder endogenen (endokrinen, neurologischen, psychischen) Einflüssen und der ausgeprägten Speziesunterschiede im Immunsystem die Ergebnisse aus solchen Modellen in der Regel nicht direkt auf

den Menschen übertragbar. Wirklich aussagekräftig sind nur bestätigte Befunde am Menschen.

Eine mögliche diagnostische Relevanz der Messung von Subpopulationen beim Menschen würde dann vorliegen, wenn Befunde an exponierten Personen und Umweltpatienten mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit reproduziert und in Zusammenhang mit der Dosis gebracht werden können. Im folgenden Abschnitt werden unter diesem Gesichtspunkt Ergebnisse von Untersuchungen analysiert und zusammengefasst, bei denen die Analyse von Verschiebungen von Lymphozyten-Subpopulationen beim Menschen im Mittelpunkt standen (■ Tabelle 3).

**6.1 Metalle**

**Nickel.** Nickel gehört zu den Metallen, die relativ häufig eine Kontaktallergie induzieren; seine Wirkung auf immunkompetente Zellen ist daher sehr gut untersucht (Übersicht bei [39, 40]). Nickel-sensitive Zellen im peripheren Blut sind in erster Linie CD4+ TH1-Zellen [41]. In vitro können Nickelsalze sowohl auf humane als auch auf Mauslymphozyten eine zerstörende Wirkung haben, die allerdings von der Dosis und Zellpopulation abhängt [42]. Die Relevanz dieser Beobachtung für die Nickelsensitivität beim Menschen in vivo ist aber unklar.

**Beryllium.** Bei der Beryllium-induzierten Berylliose, einer granulomatösen Lungenerkrankung, spielen ebenfalls CD4+ T-Zellen eine wesentliche Rolle (Literaturübersicht bei [43]); in den Granulomen können Beryllium-spezifische CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden, im peripheren Blut der Patienten finden sich CD4+ und CD8+ Be-spezifische T-Zellen [44]. Interessant sind neuere Untersuchungen, die zeigen, dass die Berylliose vor allem mit HLA-DP-Molekülen assoziiert zu sein scheint, die eine besondere Affinität zu Beryllium besitzen, sodass es CD4+ T-Zellen präsentiert werden kann [45, 46, 47, 48].

**Quecksilber.** Bezüglich des Quecksilbers liegen in der Literatur widersprüchliche Berichte vor, vor allem im Zusammenhang mit Amalgamfüllungen. Exposition gegenüber niedrigen Dosen, wie sie z. B.

bei der Entfernung von Amalgam frei werden, scheinen CD4+, CD8+ oder B-Zellen nicht zu beeinflussen [49]. Exposition gegenüber metallischem Quecksilberdampf, die dann auch zu erhöhten Urinkonzentrationen von Quecksilber führte, induzierte dagegen in einer Studie (Urinspiegel 0–240 µg/dl) eine Vermehrung der CD4+ und CD8+ Zellen [50], in einer anderen Studie (Urinspiegel 1,8–163,5 µg/dl) aber eine Erniedrigung der CD4+ sowie der NK-Zellen [51]. Eine inverse, bei Vergleich von exponierten mit nicht-exponierten Individuen statistisch aber nicht signifikante Korrelation zwischen Urin-Quecksilber-Konzentration und NK-Zell-Zahlen wurde auch von Vimercati et al. gefunden [52]. Aus diesen Diskrepanzen wird deutlich, dass es sich um sehr präliminäre Ergebnisse handelt, die durch wissenschaftliche Studien untermauert werden müssen, bevor so aufwändige Methoden bei klinischen Fragestellungen eingesetzt werden können.

**Blei.** Auch die zum Einfluss von Blei auf immunkompetente Zellen vorliegenden Studien sind nicht schlüssig. Eine ausführliche Übersicht zu dieser Thematik ist bei Singh et al. [53] zu finden. Basaran et al. [54], Fischbein et al. [55] und Kuo et al. [56] fanden bei Industriearbeitern, die lange Zeit Blei-exponiert waren, bei Blutkonzentrationen von 25–75 µg/dl eine Reduktion von CD3+ und CD4+ T-Zellen, Monozyten und Granulozyten; ähnliche Befunde wurden auch von Dyatlov et al. [57] im Tiermodell erhoben. Diese Befunde konnten von Pinkerton et al. [58] nicht bestätigt werden; sie beobachteten bei Blei-exponierten Arbeitern mit mittleren Blutspiegeln von 39 µg/dl keine Unterschiede hinsichtlich CD3+, CD4+, CD8+ T-Zellen, B-Zellen oder NK-Zellen im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen. Sata et al. [59] beschrieben sogar einen Anstieg der CD8+ Zellen bei Blut-Blei-spiegeln >20 µg/dl, während die NK- sowie die CD3+ CD45RO+ (Memory) T-Zellen abnahmen [60].

**Cadmium.** Eine dosisabhängige Wirkung auf immunologische Reaktionen wurde beim Cadmium beschrieben: sowohl im Tiermodell als auch in humanen Zellkulturen führten höhere Cadmiumdosen zu

Tabelle 2

| Klinische Bedeutung von Verschiebungen innerhalb von Lymphozyten-Subpopulationen |   |   |
|--|---|---|
| Lymphozyten-Subpopulation  | Vermehrung  | Verminderung  |
| T-Zellen   | Akute und chronische Infektionen, T-Zell-Leukämien, hormonelle Störungen, Drogenabusus, Leistungssport, Schwangerschaft, Rauchen  | Bestimmte Infektionen und Immundefekte, alkoholische Leberzirrhose, Leberkarzinom, immunsuppressive und Cortisontherapie, Autoimmunerkrankungen, verschiedene Tumoren, Bestrahlung, Mangelkrankungen (Protein, Eisen) |
| CD4+ T-Zellen  | Bestimmte Autoimmunerkrankungen, manche T-Zell-Leukämien, manche Infektionen, hormonelle Störungen, Rauchen   | Immundefekte, manche Virusinfektionen, alkoholische Lebererkrankung, manche Tumoren, Autoimmunerkrankungen, immunsuppressive und Steroidtherapie  |
| CD8+ T-Zellen  | Manche Virusinfektionen, manche T-Zell-Leukämien, Allgemeinanästhesie, vorzeitige Menopause, Stress, manche Autoimmunerkrankungen, Allergien (im akuten Stadium)  | Manche Autoimmunerkrankungen, Infekte, immunsuppressive Therapie  |
| Aktivierte T-Zellen  | Infektionen, Autoimmunerkrankungen, vorzeitige Menopause, Allergien, Schwangerschaft, alkoholische Leberzirrhose, Tumoren   |   |
| B-Zellen   | B-Zell-Lymphome, Autoimmunerkrankungen, Rauchen, Stress   | Common variable immunodeficiency, nach intravenöser Immunglobulin-G-Therapie, angeborene Immundefekte, nach der Menopause, alkoholische Leberzirrhose   |
| NK-Zellen  | Aktive Sarkoidose, intensives Training, Erholungsphase einer Hepatitis B und C, Infektionen, Depressionen, manche Autoimmunerkrankungen, Stress, Schwangerschaft, alkoholische Leberzirrhose, Tumorerkrankungen | Manche Infektionen, kalorienarme Diät, manche Autoimmunerkrankungen, immunsuppressive und Steroidtherapie, Rauchen  |

einer Immunstimulation mit Aktivierung von B- und T-Zellen sowie einer verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD69, während niedrige Dosen ( $10^{-10}$  M) immunsuppressiv wirkten [61]. NK-Zellen scheinen durch Cadmium dagegen nicht beeinflusst zu werden [62, 63].

**Chromat.** Die immunstimulierenden/inhibierenden Eigenschaften von Chromat

scheinen dagegen weniger von der Konzentration abhängig zu sein, als vielmehr davon, in welcher Form es vorliegt. Exposition gegenüber dem normalerweise vorkommenden trivalenten Chromat induzierte eine Vermehrung der NK-, B- und T-Zellen [64]; dagegen fanden Tanigawa et al. [65] bei Chromat-exponierten Arbeitern eine Abnahme der CD4+ und CD8+ T-Zellen.

Tabelle 3

Studien zum Einfluss von Umweltfaktoren auf Lymphozyten-Subpopulationen

| Einflussfaktor | Art der Untersuchung | Belastung  | Probanden/Untersuchungsmaterial  | Einfluss auf Lymphozyten-Subpopulationen   | Literaturstelle |
|----------------|----------------------|--|--|--|-----------------|
| <b>Metalle</b> |                      |  |  |  |                 |
| Cadmium        | In vivo              | Umgebungs-Exposition   | Exponierte Arbeiter  | Kein Einfluss auf NK-Zellen  | [63]            |
|                |                      |  | 1561 exponierte, 480 nicht-exponierte Individuen   | Bei Erwachsenen mit einem Cadmium-Spiegel im Urin >1,5 µg/dl Anstieg der B-Zellen  | [62]            |
|                | In vitro             | 0–100 ppm CdCl <sub>2</sub>  | PBMC aus Ratten  | Niedrige Dosen: (5–10 ppm): Abnahme der B- und T-Zellen (CD4 und CD8); Dosis >25: Zunahme von B- und T-Zellen  | [141]           |
|                |                      |  | PBMC von gesunden Blutspendern   | Kein Einfluss auf NK-Zellen  | [142]           |
|                |                      |  | 10 <sup>-3</sup> –10 <sup>-8</sup> M: verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD69; 10 <sup>-10</sup> M: starke Immunsuppression | [61]   |                 |
| Chrom/Chromat  | In vivo              | Exposition   | CR-Arbeiter  | Abnahme der CD4+ und CD8+ T-Zellen   | [65, 143]       |
|                |                      | Exposition   | Arbeiter, die hexavalentem Cr und Normalbevölkerung, die trivalentem Chromat ausgesetzt ist  | Exposition gegenüber trivalentem Chromat führt zu einem Anstieg der NK-, B-, T-Zellen in Korrelation zum Urin- und Blut-Chromatspiegel                   | [144]           |
|                | Exposition           | 46 Arbeiter einer Galvanisierungsanlage in Taiwan  | Abnahme von B-Zellen   | [145]  |                 |
|                | In vitro             |  | PBMC von gesunden Blutspendern   | Kein Einfluss auf NK-Zellen  | [142]           |
| Gold           | In vivo              | Exposition   | 80 Patienten mit rheumatoider Arthritis  | Kein Einfluss auf CD4/CD8-Verhältnis   | [146]           |
|                | In vitro             |  | PBMC von gesunden Spendern   | Inhibition von B-Zellen  | [147]           |
| Blei           | In vivo              | Exposition, Blutkonzentration 75±18 µg/dl  | Exponierte Industriearbeiter   | Verminderte T-Helferzellen, kein Einfluss auf CD8+, B- und NK-Zellen   | [54]            |
|                |                      | Exposition   | 1561 exponiert, 480 nicht-exponiert  | Kein Unterschied in Immunmarkern, aber bei Kindern <3 Jahre und Bleispiegeln >15 µg/dl Anstieg der B-Zellen  | [62]            |
|                |                      | Exposition, Blutspiegel 7–50 µg/ml   | 71 Blei-Arbeiter, 28 gesunde Blutspender   | Verminderung der CD3+CDRO+ Zellen, Abnahme der NK-Zellen, Anstieg der CD8+ T-Zellen bei Spiegeln >20 µg/dl   | [59, 60]        |
|                | Exposition           | Langzeitarbeiter in einer battery manufacturing plant und als Kontrollen Hochschullehrer | Abnahme von B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, CD8+ Zellen  | [65]   |                 |
|                | In vitro             |  | PBMC von gesunden Blutspendern   | Kein Einfluss auf NK-Zellen  | [142]           |
| Nickel         | In vivo/in vitro     |  | PBMC von Patienten mit Nickel-Allergie   | Ni-reaktive T-Zellen sind CD4+CLA+ Gedächtniszellen und exprimieren die Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR4, CCR10, aber nicht CCR6                           | [41]            |
|                |                      |  | PBMC der Maus  | Nickelsalze zerstören T-Lymphozyten der Maus in einer Kurzzeitkultur   | [148]           |
|                |                      | 24 h Kultur mit Nickel-salzen  | PBMC von gesunden Blutspendern   | Verminderung von CD4+ T- und NK-Zellen, kein Einfluss auf CD3, CD8, CD20, CD11a  | [42]            |
| Beryllium      | In vivo              | Exposition   | Patienten mit CBD  | Nachweis von Be-spezifischen CD4+ T-Zellen in der Bronchiallavage, Nachweis von zirkulierenden Be-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut | [44]            |

Tabelle 3 (Fortsetzung)

| Studien zum Einfluss von Umweltfaktoren auf Lymphozyten-Subpopulationen |                      |  |   |   |                   |
|---|----------------------|--|---|---|-------------------|
| Einflussfaktor  | Art der Untersuchung | Belastung  | Probanden/Untersuchungsmaterial   | Einfluss auf Lymphozyten-Subpopulationen  | Literaturstelle   |
| Quecksilber   | In vivo              | Niedrige Dosen, z. B. bei Amalgamentfernung        | Mensch  | Niedrige Dosen haben keinen Einfluss auf CD4+, CD8+ oder B-Zellen   | [49]              |
|   |                      | Exposition   | 81–101 Arbeiter, Quecksilberdampf-exponiert, 36 nicht-exponierte Arbeiter                     | Vermehrung der CD4+, CD8+ Zellen, kein Einfluss auf NK-Zellen   | [50, 149, 150]    |
|   |                      | Exposition   | 20 Arbeiter mit Quecksilberlampen, 20 nicht-exponierte Individuen                             | Erniedrigung von CD4+ und NK-Zellen   | [51]              |
|   |                      | Exposition   | 19 exponierte, 25 nicht-exponierte Personen   | Erniedrigung von NK-Zellen und Monozyten  | [52]              |
| <b>Inhalationsstoffe</b>  |                      |  |   |   |                   |
| Feinstaubpartikel   | In vivo              | Partikelkonzentration 23,1–311,1 µg/m <sup>3</sup> | 38 Probanden, die Feinstaubpartikeln oder gefilterter Luft exponiert wurden                   | In Bronchiallavage und Blut keine signifikante Veränderung von CD3, CD4, CD8, CD19 oder Aktivierungsmarkern<br>Anstieg der CD4+, CD8+, NK- und B-Zellen bei einer Partikelgröße <2,5 µm     | [84]              |
|   |                      | Messung in der Partikelgröße in 17 Zentren         | 366 Schulkinder   |   | [83]              |
| Dieselpartikel  | In vivo              | Exposition   | 10–15 gesunde Individuen  | In Bronchiallavage Anstieg der Neutrophilen, B-Zellen, CD4+, CD8+ Zellen, Mastzellen, im peripheren Blut der Neutrophilen<br>Hochregulation von HLA-DR, CD40, CD80, CD86 auf Blut-Monozyten | [85, 86]          |
|   | In vitro             | Partikel 0,1–10 µm                                 | PBMC von Gesunden   |   | [87]              |
| Silica  | In vivo              | Exposition   | PBMC von exponierten Arbeitern  | Verminderung von T- und B-Zellen, Anstieg der aktivierten T-Zellen  | [88, 89, 90, 91]  |
| Asbest  | In vivo              | Exposition   | Exponierte Arbeiter   | Verminderung von T- und B-Zellen, Anstieg der NK-Zellen, aber verminderte Funktion  |                   |
| Nikotin   | In vivo              | Exposition   | Raucher   | Erhöhung der Leukozyten, einschließlich CD4, CD8  | [93]              |
|   |                      | Exposition   | Raucher   | Kein Einfluss auf CD45RA+ oder CD45RO T-Zellen  | [93]              |
|   |                      | Exposition   | Raucher   | Anstieg der Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen, Abnahme der CD3+ und CD19+ Zellen  | [101]             |
|   |                      | Exposition<br>Exposition                           | Raucher<br>Raucher  | Anstieg der B-Zellen<br>Anstieg der B-Zellen, Abnahme der NK-Zellen   | [102]<br>[97, 98] |
| <b>Physikalische Faktoren</b>   |                      |  |   |   |                   |
| Elektromagnetisches Feld  | In vivo              | 0,1–0,25 mT  | Exponierte Arbeiter   | Erniedrigung von CD4+, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen  | [104]             |
|   |                      | 0,2–6 µT   | Exponierte Arbeiter   | Erniedrigung von CD4+, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen  | [105]             |
|   |                      | 100 V/cm, 5 ms                                     | Kurzzeitexposition  | Aktivierung von CD3, CD4, CD Oberflächenmarkern   | [106]             |
|   |                      | 60 Hz oder 50 Hz (10 µT)<br>4,3±1,4 V/m            | Kurz- (1 und 9 h) und Langzeitexposition (3 Tage)<br>9 exponierte, 47 nicht-exponierte Frauen | Kein Einfluss auf immunkompetente Zellen<br>Verminderung der CD16+CD+ NK-Zellen, der zytotoxischen CD3-CD8+, B- und NK-aktivierten CD3-HLA-DR+ Zellen                                       | [107]<br>[151]    |

Tabelle 3 (Fortsetzung)

| Studien zum Einfluss von Umweltfaktoren auf Lymphozyten-Subpopulationen |                      |  |  |  |                 |
|---|----------------------|--|--|--|-----------------|
| Einflussfaktor  | Art der Untersuchung | Belastung  | Probanden/Untersuchungsmaterial                | Einfluss auf Lymphozyten-Subpopulationen   | Literaturstelle |
| Elektromagnetisches Feld  | In vivo              | 0,2–3,6 µt,<br>40–120 V/m  | 15 Angestellte eines Museums,<br>86 Kontrollen | Verminderung von B- und NK-Zellen  | [152]           |
|   | In vitro             | 10 T   | PBMC   | Beeinflussung vorstimulierter Lymphozyten  | [110]           |
| Lärm  | In vivo              | >90 dB, <500 Hz  | Patienten mit vibroacoustic disease (VAD)      | Vermehrung der CD4+ und CD8+ T-Zellen, kein Einfluss auf NK-Zellen   | [111]           |
| Lärm und Bildschirmstrahlung  | In vivo              | 70 dB+Strahlenexposition gegenüber Bildschirm (20 und 90 cd/m <sup>2</sup> ) | Gesunde Studenten                              | Beeinflussung von Lymphozyten nur bei Probanden, die ausschließlich der Strahlung des Bildschirms ausgesetzt waren, aber keinem Lärm                                       | [112]           |
| UV  | In vivo              | Sonnenbad Sommer 2000, Parnu Beach   | 16 gesunde Frauen                              | Anstieg der CD4+CD25+ und CD3+ HLA-DR+ Zellen, Abfall der CD16CD56+ Zellen, aber Werte lagen alle im Normbereich   | [113]           |
|   |                      | 3 Wochen Sommerferien in Griechenland am Meer                                | 12 gesunde Probanden                           | Kein signifikanter Unterschied in CD4+, CD8+, B- oder HLA-DR+ Zellen vor und nach Sonnenbad, aber Anstieg der NK-Zellen und Zunahme des Aktivierungszustandes von T-Zellen | [114]           |
|   |                      | Low-dose UV-B  | Dunkel- und hellhäutige Individuen             | Anstieg der NK-Zellen bei Dunkelhäutigen, bei Hellhäutigen der CD29+ Zellen  | [115]           |
|   | In vitro             | Minimal UV-B Dosis, Solarium   | 31 gesunde Probanden                           | Abnahme und Hemmung der Langerhans-Zellen in der Haut, Abnahme der CD3- und CD4-Zellen im Blut   | [116]           |
|   | In vitro             | Low-dose UV-B  | PBMC von gesunden Probanden                    | Kein Einfluss auf TH1/TH2-Balance oder CD4+ und CD8+ Zellen; aber bei 0,5–1 mJ/cm <sup>2</sup> bereits 50% Mortalität der Lymphozyten                                      | [153]           |
| Organochlor-Verbindungen  |                      |  |  |  |                 |
| PCDD, TCDD  | In vivo              | Einzeldosis von 10 ng TCDD/kg Körpergewicht                                  | Krallaffen (Marmosets)                         | Nach 15 Wochen eine geringe Abnahme der CD4+ Zellen und ein Anstieg der CD8+ Zellen  | [68]            |
| PCBs (Arochlor 1254)  | In vivo              | 55 Wochen Behandlung, verschiedene Dosen                                     | Rhesusaffen                                    | Schon bei sehr niedrigen Dosierungen eine Veränderung von IgM und IgG-Globulinen, aber keine Veränderungen der Marker CD4, CD8 und CD20 auf peripheren Lymphozyten         | [70]            |
| PCDD, PCDF, PCB   | In vivo              | Nahrung vor 30 Jahren  | 16 Yusho-Patienten                             | TEQ-Spiegel im Blut 30 Jahre nach Exposition etwa 7-mal höher als bei gesunden Japanern. Lymphozyten-Subpopulationen wiesen keine Abweichungen auf                         | [71]            |
| PCDD, PCDF, PCB   | In vivo              | Nahrung  | Kinder von Yusho-Patientinnen                  | Bei den Kindern korrelierten die mit der Muttermilch aufgenommenen TEQ-Mengen negativ mit dem Anteil an CD8 positiven Zellen   | [72]            |
| PCDD, PCDF  | In vivo              | Arbeitsplatz, mäßige Belastung   | Arbeiter                                       | Bei Arbeitern, bei denen eine mäßige Belastung mit TCDD, PCDD oder PCDF festgestellt wurde, traten keine relevanten Veränderungen der Lymphozyten-Populationen auf         | [81]            |

Tabelle 3 (Fortsetzung)

| Studien zum Einfluss von Umweltfaktoren auf Lymphozyten-Subpopulationen |                      |  |   |   |                 |
|---|----------------------|--|---|---|-----------------|
| Einflussfaktor  | Art der Untersuchung | Belastung  | Probanden/Untersuchungsmaterial   | Einfluss auf Lymphozyten-Subpopulationen  | Literaturstelle |
| PCDD, TCDD  | In vivo              | Frühere Exposition am Arbeitsplatz. TCDD-Blutspiegel etwa 30fach über Bevölkerung      | Arbeiter  | Keine signifikanten Unterschiede bei CD3+, CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten, an CD16+ NK-Zellen und an CD19+ B-Lymphozyten. In Blutmonozyten CD8+ Memory-T-Zellen (CD45RO+) signifikant höher, CD45RA+signifikant niedriger | [82]            |
| PCDD, PCDF, PCB   | In vivo              | Nahrung, Ostsee-Fischverzehr   | Gesunde Personen  | Steigender Fischkonsum war mit abnehmenden Spiegeln an NK-Zellen korreliert   | [73]            |
| Organochlor-Verbindungen  | In vivo              | Nahrung, fetter Ostsee-Fisch   | 68 Personen aus Litauen   | Fischkonsum korrelierte positiv mit den Anteilen an B-Zellen und CD4+/CD8+ Verhältnis, aber negativ mit den Spiegeln an zytotoxischen (CD8+) T-Zellen   | [74]            |
| PCDD  | In vivo              | Perinatale Exposition  | 27 8-jährige Kinder aus den Niederlanden  | Erhöhte Anzahl von CD4+ T-Helferzellen und CD45RA+ Zellen   | [76]            |
| PCDD, PCDF, PCB   | In vivo              | Muttermilch  | 36 gestillte japanische Kinder  | Aufnahme an coplanaren PCB und PCDD/PCDF korrelierte positiv mit den CD4+ Zellen und negativ mit den CD8+ Zellen  | [77]            |
| PCDD, PCB   | In vivo              | Muttermilch  | Mutter-Kind-Paare   | Pränatale Expositionen waren mit erhöhten Zahlen von Lymphozyten, T-Zellen, CD3+CD8+ (zytotoxischen Zellen) und Memory-Zellen assoziiert.   | [78]            |
| Organochlor-Verbindungen  | In vivo              | Nahrung, belasteter Fisch  | Neugeborene aus Fischerfamilien, Kanada. Organochlor-Verbindungen 2- bis 3fach über Bevölkerung | Kein Unterschied bezüglich der Lymphozyten-Subpopulationen  | [79]            |
| PCBs/PCDFs  | In vivo              | Nahrung  | 105 Kinder von Yucheng-betroffenen Frauen   | Gleiche Anteile an CD3, CD4, CD8, B-Zellen und NK-Zellen wie in der Kontrollgruppe  | [80]            |
| Benzo[a]pyrene (B[a]P)  | In vivo              | Subchronisch   | Mäuse   | Wenn Mäuse in der Mitte der Schwangerschaft gegenüber Benzpyren exponiert wurden, so fanden sich bei den Neugeborenen signifikante Verminderungen der CD4+CD8+, CD4+CD8+V beta 8+ Thymozyten                            | [154, 155]      |
| Benzo[a]pyrene (B[a]P)  | In vivo              | inhalativ  | Bei 16 Straßenbelag-Arbeitern   | Signifikant höherer Anteil an CD4+ Zellen. CD8+ and CD19+ Zellen unverändert  | [92]            |
| Formaldehyd   | In vivo              | Inhalativ (Mittelwert 0,508±0,299 mg/m <sup>3</sup> ), 9 Stunden/Woche, mehrere Wochen | Studenten in Anatomiekurs   | Signifikante Zunahme der C19+ B-Zellen und eine Abnahme der CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen  | [103]           |

## 6.2 Organochlor-Verbindungen

Bei Tieren verschiedener Spezies werden schon in sehr niedrigen Dosierungen immunologische Effekte von polychlorierten Biphenylen (PCB), -Dioxinen (PCDD) und -Furanen (PCDF) beobachtet [66, 67]. Sie gehen bei verschiedenen Spezies mit ei-

ner Verschiebung des CD4/CD8-Verhältnisses einher. Zum Beispiel fand sich bei Krallaffen (Marmosets) bei einer Einzeldosis von 10 ng Tetrachlordibenzodioxin (TCDD)/kg Körpergewicht nach 15 Wochen eine geringe Abnahme der CD4+ Zellen und ein Anstieg der CD8+ Zellen [68]. Die Mechanismen dieser Verände-

rungen sind noch nicht aufgeklärt, angenommen werden unter anderem eine Aktivierung von B-Zellen, dendritischen Zellen und CD4+ Zellen durch TCDD sowie ein vorzeitiges Verschwinden der letzten beiden Zellpopulationen aus den peripheren lymphatischen Organen [69]. Auch bei Untersuchungen zur Immunotoxi-

tät von PCBs (Arochlor 1254) an Rhesusaffen über einen Zeitraum von 55 Wochen fanden sich zwar schon bei sehr niedrigen Dosierungen eine Veränderung von IgM und IgG, aber keine Verschiebungen der Marker CD4, CD8 und CD20 auf peripheren Lymphozyten [70]. Epidemiologische Untersuchungen wurden vor allem an exponierten Arbeitern und an Personen, die im Rahmen von Unfällen oder durch Ernährungsgewohnheiten besonderen Belastungen ausgesetzt waren, durchgeführt.

Bei 16 Japanern, die mit PCB kontaminierte Nahrung aufgenommen hatten (Yusho), fanden sich 30 Jahre nach der Exposition etwa 7-mal höhere Spiegel im Blut (27,8–1048,5 pg/g Blutfett) als bei nicht-exponierten Japanern. In dieser Studie wiesen verschiedene immunologische Parameter, einschließlich der Lymphozyten-Subpopulationen, keine Abweichungen auf [71], während in einer Studie zuvor die Autoren bei Yusho-Patienten mit hohen PCB-Konzentrationen im Blut eine höhere Konzentration an CD4-positiven Zellen gefunden hatten als bei Patienten mit niedrigeren PCB-Konzentrationen [72]. Bei Kindern von Yusho-Patientinnen korrelierten die mit der Muttermilch aufgenommenen Toxizitätsäquivalent- (TEQ-)Mengen negativ mit dem Anteil an CD8-positiven Zellen [72].

23 Personen mit sehr hohem Verzehr an Ostseefisch, der mit PCDD, PCDF und PCB belastet ist, wurden mit Personen verglichen, die praktisch keinen Fisch verzehren. Steigender Fischkonsum korrelierte mit einer Abnahme der NK-Zellen [73]. Bei einer Untersuchung an 68 Personen aus Litauen korrelierte der Fischkonsum positiv mit den Anteilen an B-Zellen und dem CD4+/CD8+ Verhältnis, aber negativ mit den Spiegeln an zytotoxischen (CD8+) T-Zellen [74].

Unter dem Aspekt einer möglichen entwicklungsimmuntoxischen Wirkung [75] wurden in den letzten Jahren verschiedene Untersuchungen an Kindern Dioxin-exponierter Mütter durchgeführt: Bei 27 niederländischen 8-jährigen Kindern mit dokumentierter perinataler Dioxinexposition fand sich eine erhöhte Anzahl von CD4+ T-Helferzellen und CD45RA+ Zellen [76]. Bei 36 gestillten japanischen Kindern korrelierte die Aufnahme an coplanaren polychlorierten Biphenylen und

polychlorierten Dioxinen/Furanen positiv mit den CD4+ Zellen und negativ mit den CD8+ Zellen [77].

Bei der Untersuchung von 207 niederländischen Mutter-Kind-Paaren wurden PCB und PCDD im Nabelschnurblut, im Blut der Mutter und in der Muttermilch gemessen. Pränatale PCB-Expositionen waren mit erhöhten Zahlen von Lymphozyten, T-Zellen, CD3+CD8+ (zytotoxischen Zellen) und Memoryzellen assoziiert. Dies wurde dahingehend gedeutet, dass die Auswirkungen dieser pränatalen Exposition bis in die Kindheit anhalten [78]. Bei Neugeborenen aus Fischerfamilien (Kanada) mit hoher interner Belastung an Organochlor-Verbindungen (2- bis 3fach über Kontrolle) und Methylquecksilber fand sich im Vergleich zu neugeborenen städtischen Kindern (Kontrolle) kein Unterschied bezüglich der Lymphozyten-Subpopulationen [79]. Bei 105 Kindern von Frauen, die hohen Konzentrationen von PCBs/PCDFs ausgesetzt waren (Yucheng), fanden sich gleiche Anteile an CD3+, CD4+, CD8+, B- und NK-Zellen wie in der Kontrollgruppe [80].

Bei Arbeitern, die einer mäßigen Belastung mit TCDD, PCDD oder PCDF ausgesetzt waren, traten Veränderungen der Lymphozyten-Populationen auf, die aber als klinisch nicht relevant eingestuft wurden [81]. Auch in einer anderen Studie an TCDD-exponierten Arbeitern mit erhöhten Spiegeln von 116 ng/kg im Vergleich zu 4 ng/kg in einer Kontrollgruppe, fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anteile an CD3+, CD4+, oder CD8+ T-Lymphozyten, an CD16+ NK-Zellen und an CD19+ B-Lymphozyten. Jedoch war im peripheren Blut der exponierten Arbeiter der Anteil an CD8+ Memory-T-Zellen (CD45RO+) signifikant höher und der Anteil der Lymphozyten mit naivem Phänotyp (CD45RA+) signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe [82]. Eine ausführliche Übersicht zu TCDD-induzierten immunologischen Veränderungen ist bei Holsapple et al. zu finden [67].

### 6.3 Feinstaub

Immunologische Parameter werden möglicherweise auch durch im Straßenverkehr produzierte toxische Stoffe verändert [64]. Leonardi et al. [83] berichteten über einen Anstieg der CD4+, CD8+, NK- und B-Zel-

len mit ansteigenden Konzentrationen von Feinstaubpartikeln. Dies konnte aber in einer umfangreichen Studie von Harder et al. [84], in der gesunde Personen Feinstaubpartikeln (0,1–2,5 µm im Durchmesser) in Konzentrationen von 23,1–311,1 µg/m<sup>3</sup> ausgesetzt waren, nicht bestätigt werden; die Autoren fanden keinen Einfluss auf die Verteilung der Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut, und auch die Analyse der Bronchiallavage dieser Probanden ergab lediglich eine milde Entzündung.

Dagegen führte in einer anderen Studie die Exposition gegenüber Dieselpartikeln in der Bronchiallavage zu einem Anstieg der Neutrophilen, B-Zellen und CD4+ und CD8+ Zellen sowie Mastzellen, und auch im peripheren Blut wurde eine Vermehrung der Neutrophilen beobachtet [85, 86]. Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen, die gezeigt haben, dass In-vitro-Exposition von peripheren Blutmonozyten gegenüber Partikeln in unterschiedlicher Größe (0,1–10 µm Durchmesser) zu einer Hochregulation von HLA-DR, CD40, CD80 und CD86, d. h. zu einer Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen führt. Dies würde Beobachtungen erklären, dass Exposition gegenüber Diesel die immunologische Reaktionsbereitschaft zu erhöhen scheint und damit auch die Entstehung von Allergien begünstigen könnte [87].

Untersuchungen zur Beeinflussung von immunkompetenten Zellen durch Asbest und Silica ergaben bei exponierten Arbeitern eine Verminderung der absoluten NK-, T- und B-Zellzahl im Blut. Gleichzeitig war bei Silikosepatienten der Prozentsatz an aktivierten T-Zellen signifikant erhöht. Die Autoren beobachteten auch gehäuft Autoimmunerkrankungen bei diesen Patienten. Bei Asbest-exponierten Patienten fand sich bei einem Anstieg der NK-Zellen eine verminderte Funktion dieser Zellpopulation, was die Autoren als möglichen Risikofaktor interpretieren, der zur Entstehung von Tumoren beitragen könnte [88, 89, 90, 91].

### 6.4 Tabakrauch

Nach Aussage einiger Studien führt Rauchen zu einer allgemeinen Erhöhung der Leukozyten, einschließlich der CD4+ und

CD8+ Lymphozyten, und zwar in Abhängigkeit vom Tabakkonsum [65, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99]. Ein Einfluss auf das Verhältnis der naiven (CD45RA+) und Memory-T-Zellen (CD45RO+) wurde nicht beobachtet. In einer anderen Studie fanden sich keine signifikanten Veränderungen der Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen oder CD3+ und CD19+ Zellen [100]. Milli et al. [101] und Tollerud et al. [96, 97] beschrieben dagegen, dass die absolute Zahl von B-Zellen bei starken Rauchern ansteigt, während die NK-Zellen deutlich absinken.

### 6.5 Benzo(a)pyren

Eine Wirkung von Benzpyren auf immunkompetente Zellen wurde von Karakaya et al. beobachtet [102]. Bei 16 Straßenbelagarbeitern, deren erhöhte Benzpyrenexposition aus Messergebnissen des Metaboliten 1-Hydroxy-Pyren im Urin abgeleitet wurde, fand sich ein signifikant höherer Anteil an CD4+ Zellen, während CD8+ and CD19+ Zellen unverändert waren. Ob diese Beobachtungen aber eine klinische Bedeutung haben – zumal es sich um gesunde Personen handelte – ist offen.

### 6.6 Formaldehyd

Bei Studenten, die während des Anatomiekurses mehrere Wochen lang wöchentlich 3-mal 3 Stunden gegenüber Formaldehyd in der Raumluft (Mittelwert  $0,508 \pm 0,299 \text{ mg/m}^3$ ) ausgesetzt waren, fanden sich eine signifikante Zunahme der C19+ B-Zellen und eine Abnahme der CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen [103].

### 6.7 Physikalische Faktoren

**Elektromagnetische Felder.** Der Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf das Immunsystem wird stark diskutiert, die Datenlage ist aber auch hier widersprüchlich. Dasdag et al. [104] und Bonhomme-Falvre et al. [105] beschrieben eine Erniedrigung der CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie der NK-Zellen bei Arbeitern, die entweder  $0,1\text{--}0,25 \text{ mTesla (mT)}$  beziehungsweise  $0,2\text{--}6 \mu\text{T}$  ausgesetzt waren. In einer anderen Studie von Filipic et al. [106] hatte Kurzzeitexposition gegenüber mittelstarken elektrischen Impulsen ( $100 \text{ v/}$

$\text{cm, } 5 \text{ ms}$ ) zu einer Aktivierung von CD3-, CD4- und CD8-Oberflächenmarkern geführt. Dagegen konnten Graham et al. [107], Ichinose et al. [108] und Selmaoui et al. [109] weder bei kurzzeitiger (1 und 9 h) noch längerer (3 Tage) Exposition einen Einfluss eines magnetischen Feldes von 60 oder 50 Hz ( $10 \mu\text{T}$ ) feststellen.

Eine In-vitro-Studie an Mitogen- (Phytohämagglutinin)stimulierten Lymphozyten ergab, dass Exposition gegenüber 10 Tesla in einem statischen Magnetfeld zu einer Verminderung der naiven CD4+ und CD8+ T-Zellen führte. Die Autoren schlossen daraus, dass die Suszeptibilität von Lymphozyten gegenüber elektromagnetischen Feldern von ihrem Aktivierungsstatus abhängt [110].

**Lärm.** Bestimmte Formen von Lärm ( $>90 \text{ dB, } <500 \text{ Hz}$ ) können zu der so genannten „vibroacoustic disease“ (VAD) führen, die verschiedene systemische Symptome hervorruft, aber auch zu rezidivierenden Infektionen der Haut und des Respirationstraktes prädisponiert. Analyse der peripheren Lymphozyten bei diesen Patienten ergab allerdings eine Vermehrung der CD4+ und CD8+ T-Zellen, die diese Infektanfälligkeit nicht unbedingt erklären würde. NK-Zellen wurden nicht beeinflusst [111]. In einer anderen Studie, in der Lärm ( $70 \text{ dB}$ ) mit der Lichtintensität eines Computer-Bildschirms ( $20$  und  $90 \text{ cd/m}^2$ ) kombiniert wurde, ergab sich ein Anstieg der weißen Blutzellen nur unter den Bedingungen, die ohne Lärm durchgeführt worden waren; allerdings lag bei diesen Probanden keine VAD vor [112].

**Sonnenbaden.** Studien zur Beeinflussung immunkompetenter Zellen durch Sonnenbaden ergaben bisher widersprüchliche Ergebnisse. Vaht et al. [113] beschrieben nach dem Sonnenbad einen Anstieg der CD4+CD25+ und CD3+HLA-DR+ Zellen und einen Abfall der CD16+CD56+ Zellen, die Schwankungen befanden sich jedoch noch im Rahmen des Normalbereiches. Kanariou et al. [114] beobachteten dagegen beim Vergleich vor vs. nach Sonnenbaden keinen signifikanten Unterschied in T-Zellzahl, CD4+, CD8+, B- oder HLA-DR+ Zellen bei Urlaubern in Griechenland, aber einen Anstieg der NK-Zellen. Matsuoka et al. [115] fanden, dass

sich die Subpopulationen bei hell- und dunkelhäutigen Menschen unterscheiden: bei Dunkelhäutigen stieg die NK-Zellaktivität signifikant an, bei den Hellhäutigen die CD19+ und VD4/29+ T-Zellen. Interessant ist der lokale Effekt von UVB-Strahlung auf immunkompetente Zellen in der Haut. So wurde eine Abnahme der Zahl an Langerhans-Zellen aber auch eine Hemmung ihrer Fähigkeit, TH1-Zellen zu stimulieren, in UVB-bestrahlter Haut beobachtet [116, 117, 118].

## 7 Idiopathische Umweltintoleranz/ Multiple Chemical Sensitivity

Als 1987 der Begriff „Multiple Chemical Sensitivity“ (MCS) von Cullen Eingang in die wissenschaftliche Literatur fand, gab es für die Beschreibung von chemischen Überempfindlichkeiten in der klinischen Ökologie schon verschiedene andere Bezeichnungen, unter anderem „chemical AIDS“ (siehe [119]). Diese Nomenklatur wollte zum Ausdruck bringen, dass chemische Stoffe in der Lage seien, die Lymphozyten-Populationen zu verschieben und eine Immunschwäche auszulösen. Aber schon früh gab es Zweifel an der richtigen Interpretation solcher Veränderungen und an ihrer Reproduzierbarkeit [120, 121, 122]. Auch neuere Untersuchungen [123, 124] liefern keine eindeutigen Befunde und insbesondere auch keine signifikanten Verschiebungen in den Lymphozyten-Subpopulationen, sodass man sagen muss, dass es bis heute keine Belege für die Hypothese gibt, die angegebene erhöhte Empfindlichkeit sei mit immunologischen Alterationen assoziiert.

## 8 Qualitätsaspekte

In den vergangenen Jahren hat sich die Durchflusszytometrie von einer reinen Forschungsmethode zu einem etablierten und zunehmend standardisierten Verfahren in der Routinediagnostik entwickelt. Es sind mittlerweile verschiedene Lösungen kommerziell verfügbar; Rezepturen und Fixierungseigenschaften der angebotenen Produkte unterscheiden sich aber erheblich, wodurch auch die Ergebnisse in unterschiedlichem Maße beeinflusst werden.

Wie für jede in der Routine eingesetzte Diagnostik muss auch bei der Durchflusszytometrie eine Qualitätssicherung

stattfinden [125]. Zu den gebräuchlichen Anwendungen sind heute Protokolle etabliert, die eine zuverlässige Abarbeitung der Untersuchungsproben zulassen. Dennoch muss betont werden, dass eine umfassende Standardisierung der Durchflusszytometrie noch nicht erreicht ist. Zudem stellen die Untersuchungen einen erheblichen Anspruch an Sorgfalt und Sachverstand der beteiligten Personen. Das Einhalten von Qualitätsstandards entsprechend RiLiBÄK (Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung im medizinischen Labor) und ISO 15189 ist unabdingbar, um reproduzierbare und nachprüfbar Ergebnisse zu erhalten.

Um die Expression von Zelloberflächenmolekülen quantifizieren zu können, gibt es verschiedene Ansätze zur Kalibration der gemessenen Fluoreszenzintensitäten [126, 127, 128, 129, 130, 131]. Dabei werden die einzelnen Methoden recht kontrovers diskutiert [132, 133]. Bei Vergleichsuntersuchungen zwischen 5 ausgewählten Laboren fand sich z. B. für einige Parameter eine sehr gute Reproduzierbarkeit (z. B. CD4+, Abweichung bis 4%), für andere Parameter größere Abweichungen (CD8+, 33%) und für Kombinationsparameter z. T. sehr hohe Abweichungen (CD25+ CD3+, 1100%) [123]. Zu betonen ist, dass man unterscheiden muss zwischen der quantitativen Bestimmung einzelner Zellpopulationen und der relativen Verteilung der Subpopulationen bezogen auf die Gesamtzellzahl. Für beide Methoden existieren unterschiedliche Standardisierungsmöglichkeiten.

Plausibilitätskontrollen tragen zur Qualitätssicherung bei. Dazu zählen der Vergleich der durchflusszytometrisch erstellten Ergebnisse mit den Ergebnissen am Hämatologieautomaten (z. B. Monozyten vs. CD14/45-positive Zellen; bei Absolutzählungen auch Lymphozytenprozent und absolute Lymphozytenzahl) sowie die Kontrolle der Lymphozytensumme, sofern mit einem Lymphozyten-“Gate“ gearbeitet wird ( $\%T+\%B+\%NK=100\pm 5\%$ ), und die Kontrolle der Übereinstimmung der pro Patient mehrfach bestimmten Marker (allgemein wird CD3 in mehreren Ansätzen bestimmt).

Zur internen Qualitätskontrolle wird empfohlen, mithilfe von kommerziell erhältlichen Kalibrierungspartikeln die

Fluoreszenzkanäle sowie die Kompensation einzustellen. Dies ist alternativ auch mit standardisierten und auch kommerziell erhältlichen Kontrollzellen möglich. Letztere können auch in der Durchflusszytometrie in einer Analysenserie als Präzisionskontrolle mitgemessen werden. Weiterhin gehören auch Richtigkeitskontrollen und externe Kontrollen in Form von Ringversuchen zur guten Laborpraxis, die für die gängigsten Anwendungen wie die Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen, CD34-Progenitorzellen, Retikulozyten, Leukämietypisierung und DNA-Analyse angeboten werden. Für viele der Methoden wurden von der Deutschen Arbeitsgruppe für Zytometrie und bildanalytische Verfahren, dem National Committee for Clinical Laboratory Standards, dem Center for Disease Control und dem College of American Pathologists Richtlinien herausgegeben [134, 135].

Die meisten Untersuchungen für die Routinediagnostik werden heute aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut durchgeführt. Es ist oft möglich, mit Zitrat- oder Heparin-antikoaguliertem Blut zu arbeiten. Von extrazellulärem Kalzium abhängige Vorgänge, wie Oxidativer Burst, Phagozytose oder die intrazelluläre Zytokinmessung, erfordern allerdings Heparinblut.

Die Proben müssen generell möglichst frisch ins Labor gelangen, insbesondere bei Messung von thrombozytären Antigenen, Aktivierungsmarkern und funktionellen Tests. Für Immunphänotypisierungen wird in aller Regel die taggleiche Bestimmung angestrebt. Blut sollte im Allgemeinen bei Raumtemperatur aufbewahrt und transportiert werden.

## 9 Interpretation und Fehlinterpretation

Die Analyse der Literatur bzgl. des Verhaltens von Lymphozyten-Subpopulationen unter Umwelteinflüssen ergibt überwiegend widersprüchliche Ergebnisse. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, zu denen Beryllium gehört, wo bei hohen Expositionen auch beim Menschen Veränderungen der Lymphozytenzahlen im Rahmen einer sich entwickelnden Berylliose auftreten, sind die unter normalen Umständen stattfindenden umweltmedizinischen Expositionen nicht mit eindeutigen

Verschiebungen der Subpopulationen verbunden. Es gibt kaum eine Exposition, für die publizierte Ergebnisse zu Veränderungen von Lymphozyten-Populationen konsistent durch mehrere Untersucher reproduziert wurden. Eine wesentliche Ursache hierfür ist, dass die Bandbreite der Normal- oder Referenzbereiche für einzelne Lymphozyten-Subpopulationen durch analytische Ungenauigkeiten und vor allem durch physiologische und daher nicht beeinflussbare Schwankungen sehr hoch ist und die beobachteten Veränderungen oft noch innerhalb dieser Referenzbereiche lagen. Ferner müssen selbst deutliche Veränderungen eines einzelnen immunologischen Endpunktes nicht zwangsläufig mit pathophysiologischen Mechanismen korrelieren [103] oder als pathologisch eingestuft werden [136], wie dies ja auch für zahlreiche andere immunologische Befunde (z. B. Autoantikörper, Zytokinproduktion, Lymphozytenproliferation) gilt [1, 29, 137].

Die heute meist durchgeführten Untersuchungen zu Veränderungen in der Immunantwort zeigen primär eine (stattgehabte) Auseinandersetzung des Immunsystems mit einem potenziell schädlichen Agens an, d. h. die Sensibilisierung, nicht dagegen Effektorreaktionen. Insofern haben Befunde, die außerhalb des Normbereiches liegen, nur selten Krankheitswert; sie sind eher Ausdruck einer erfolgreichen Auseinandersetzung des Immunsystems mit einem Agens. Es wurde vorgeschlagen, die Analyse von Lymphozyten-Subpopulationen als Ergänzung zu den klassischen Verfahren bei Untersuchungen auf Berylliose [138] und bei Studien zur Erfassung der Wirkungen inhalativer Stoffe am Arbeitsplatz [139] oder auch im Rahmen epidemiologischer Studien einzusetzen, um die Kenntnisse über mögliche Zusammenhänge zwischen immunologischen Veränderungen und möglichen Pathomechanismen zu verbessern. Der Einsatz in der Individualdiagnostik in der Umweltmedizin ist dagegen zurzeit nicht sinnvoll, da eventuelle Verschiebungen der Anteile einzelner Lymphozyten-Subpopulationen aus dem Normalbereich weder einen diagnostischen Hinweis auf Umweltexpositionen oder Umwelterkrankungen geben noch therapeutische Konsequenzen haben.

## 10 Bewertungen und Empfehlungen anhand der RKI-Kategorien

Untersuchungen der Lymphozyten-Subpopulationen sollten erst dann erfolgen, wenn sich bei den klassischen hämatologisch-immunologischen Untersuchungsverfahren Auffälligkeiten ergeben, die weiter abgeklärt werden müssen, insbesondere bei den Fragestellungen Leukämie/Lymphom, Immundefekt und Krebserkrankungen. In einigen Fällen ist der Verlauf der Änderungen von Subpopulationen prognostisch wichtig, so z. B. bei AIDS.

Die Hoffnungen, dass sich die Differenzierung der Subpopulationen in der Umweltmedizin als wichtige Methode zur Feststellung von „Umweltkrankheiten“ einsetzen ließe, haben sich in den letzten 20 Jahren nicht erfüllt. Die Analyse der wissenschaftlichen Literatur, die im Wesentlichen auf epidemiologischen Studien beruht, zeigt, dass weder die üblichen Expositionen zu reproduzierbaren Veränderungen der Subpopulationen führen, noch Umweltkrankheiten mit regelmäßigen Veränderungen assoziiert sind, die sinnvoll diagnostisch verwendet werden können. Nur in einigen Fällen kann die Untersuchung der Subpopulationen unter bestimmten Fragestellungen sinnvoll sein. Hierzu gehören die Berylliose oder eine Exposition gegenüber hohen Konzentrationen von PCB, PCDD/PCDF.

Bei diesen speziellen Indikationen kann nach Abklärung der Expositionshöhe die zusätzliche Messung der Subpopulationen in der individualmedizinischen Diagnostik gerechtfertigt sein. Nicht zu vernachlässigen ist weiterhin die durchflusszytometrische Bestimmung zellulärer Parameter in experimentellen und wissenschaftlichen Settings, um potenzielle Beeinflussungen des Immunsystems durch Schadstoffe weiter aufzuklären. Die Methode fällt damit in der Umweltmedizin unter Kategorie IV („Eine Maßnahme kann nicht empfohlen werden, weil keine ausreichenden, dies begründenden Untersuchungsergebnisse vorliegen [Anm.: keine konsistenten Veränderungen in epidemiologischen Untersuchungen] und theoretische Überlegungen [Anm.: physiologische Variabilität; mangelnde Expositions-/

Stoffspezifität] gegen eine Anwendung sprechen“) [1].

### Federführung

Prof. Dr. rer. nat. Michael Schwenk, Tübingen

### Von der Kommission hinzugezogene Sachverständige

Prof. Dr. med. Reinhild Klein, Universitätsklinikum Tübingen

PD Dr. Ulrich Sack, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Leipzig

Uni.-Prof. Dr. med. Helga Idel, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Prof. Dr. Charlotte Esser, IUF Düsseldorf

### RKI-Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“

#### Mitglieder

#### Kommissionsmitglieder

Dr. med. A. Beyer (Umweltmed. Ambulanz Berlin-Steglitz/Zehlendorf), Prof. Dr.

rer. nat. W. Dott (Universitätsklinikum Aachen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin), Prof. Dr. med. H. Drexler (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin), Prof. Dr. med. H. Dunkelberg (Universität Göttingen, Abt. Allg. Hygiene und Umweltmedizin), Prof. Dr. med. Th. Eikmann (Universität Gießen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin), Dr. med. B. Heinzow (Landesamt für Gesundheit und Arbeitssicherheit, Schleswig-Holstein, Dezernat Umweltbezogener Gesundheitsschutz, Kiel), Prof. Dr. C. Hornberg (Universität Bielefeld, Fakultät für Gesundheitswissenschaften), Prof. Dr. Dr. med. A. D. Kappos (Frankfurt/Main), Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann (Universität Gießen, Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie), Prof. Dr. med. K. E. von Mühlendahl (Kinderhospital Osnabrück, Gemeinnützige Kinderumwelt GmbH), Prof. Dr. med. D. Nowak (LMU München, Klinikum Innenstadt, Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin), PD Dr. med. F.-A. Pitten (Institut für Krankenhaushygiene und Infektionskontrolle GbR, Gießen), Dr. med. W. Stück (Ökologischer Ärztenbund/ISDE, Koblenz), Prof. Dr. M. Schwenk (Tübingen), Dr. med. R. Suchenwirth (Niedersächsisches Landesge-

sundheitsamt, Abt. Umweltmedizin/Epidemiologie, Hannover), Prof. Dr. med. M. Wilhelm (Ruhr-Universität Bochum, Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin).

### Ständige Gäste

S. Strecker (Bundesministerium für Gesundheit, Bonn), Dr. med. N. Englert (Umweltbundesamt, Berlin), Dr. med. A. Hahn (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin).

### Geschäftsstelle im RKI

Dr. med. D. Eis (Geschäftsführer), Dr. med. U. Wolf, Robert Koch-Institut, FG 22/Umweltmedizin, Seestr. 10, 13353 Berlin, Email: d.eis@rki.de; u.wolf@rki.de

### Literatur

1. Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ am Robert Koch-Institut (RKI) (2001) Grundsätze der Bewertung von umweltmedizinischen Methoden. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitschutz 44: 519–522
2. Holsapple MP (2003) Developmental immunotoxicity testing: a review. Toxicology 185: 193–203
3. Orfao A, Ruiz-Arguelles A (1996) General concepts about cell sorting techniques. Clin Biochem 29: 5–9
4. Orfao A, Schmitz G, Brando B et al. (1999) Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. Clin Chem 45: 1708–1717
5. Taylor JM, Fahey JL, Detels R, Giorgi JV (1989) CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. J Acquir Immune Defic Syndr 2: 114–124
6. Yssel H, Groux H (2000) Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. Int Arch Allergy Immunol 121: 10–18
7. Sack U, Rothe G, Barlage S et al. (2000) Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik. Positionspapier der Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie und Quantitative Mikroskopie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin. J Lab Med 24: 277–297
8. Pechhold K, Pohl T, Kabelitz D (1994) Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. Cytometry 16: 152–159
9. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005) Immunobiology, 6th edn. Garland Science, New York London
10. Paust S, Cantor H (2005) Regulatory T cells and autoimmune disease. Immunol Rev 204: 195–207
11. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM (2001) Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. Immunol Rev 182: 58–67
12. Bofill M, Mroczko A, Lipman M et al. (1996) Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. AIDS 10: 827–834

13. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE et al. (1993) Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6: 904–912
14. Romagnani S, Kapsenberg M, Radbruch A, Adorini L (1998) Th1 and Th2 cells. *Res Immunol* 149: 871–873
15. Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138–146
16. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C (1995) Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol* 154: 4294–4301
17. McCarthy DA, Macey MG (2001) Cytometric analysis of cell phenotype and function. Cambridge University Press, Cambridge
18. Trinchieri G (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47: 187–376
19. Uhrberg M, Valiante NM, Young NT et al. (2001) The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94: NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 166: 3923–3932
20. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG et al. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7: 739–751
21. Bauer S, Groh V, Wu J et al. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727–729
22. Long EO (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 17: 875–904
23. Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IG (1997) Activated T cells and cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells. *Ann Hematol* 74: 51–56
24. Elewaut D, Kronenberg M (2000) Molecular biology of NK T cell specificity and development. *Semin Immunol* 12: 561–568
25. Lamy T, Loughran TP (1999) Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev* 13: 230–240
26. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H (2004) Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197: 179–191
27. Crosland-Taylor PJ (1953) A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* 171: 37–38
28. Brando B, Barnett D, Janossy G et al. (2000) Cytometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 42: 327–346
29. Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ (2004) Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 47: 73–79
30. Burgisser P, Hammann C, Kaufmann D et al. (1999) Expression of CD28 and CD38 by CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. The Swiss HIV Cohort Study. *Clin Exp Immunol* 115: 458–463
31. Hultin LE, Matud JL, Giorgi JV (1998) Quantitation of CD38 activation antigen expression on CD8+ T cells in HIV-1 infection using CD4 expression on CD4+ T lymphocytes as a biological calibrator. *Cytometry* 33: 123–132
32. Malavasi F, Funaro A, Roggero JJ (1994) Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 15: 95–97
33. Winkler M, Schwitzer R, Wonigeit K et al. (1992) Analysis of CD45RA- CD45RO+ „memory“ T cells in patients after kidney, heart, and liver transplantation. *Transplant Proc* 24: 2532–2534
34. Benito JM, Zabay JM, Gil J et al. (1997) Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14: 128–135
35. Peacock JS, Colsky AS, Pinto VB (1990) Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J Immunol Methods* 126: 147–157
36. Bussa S, Rumi C, Leone G, Bizzi B (1993) Evaluation of a new whole blood cytometric lymphocyte transformation test for immunological screening. *J Clin Lab Immunol* 40: 39–46
37. Rabinovitch PS, Kubbies M, Chen YC et al. (1988) BrdU-Hoechst flow cytometry: a unique tool for quantitative cell cycle analysis. *Exp Cell Res* 174: 309–318
38. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ (1995) Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 20: 127–133
39. Cavani A (2005) Breaking tolerance to nickel. *Toxicology* 209: 119–121
40. van Kampen V, Merget R, Bruning T (2003) Immediate type allergies due to metal – nickel. *Pneumologie* 57: 667–670
41. Moed H, Boorsma DM, Stoof TJ et al. (2004) Nickel-responding T cells are CD4+ CLA+ CD45RO+ and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. *Br J Dermatol* 151: 32–41
42. Zeromski J, Jezewska E, Sikora J, Kasprzak KS (1995) The effect of nickel compounds on immunophenotype and natural killer cell function of normal human lymphocytes. *Toxicology* 97: 39–48
43. Rossman MD (2001) Chronic beryllium disease: a hypersensitivity disorder. *Appl Occup Environ Hyg* 16: 615–618
44. Farris GM, Newman LS, Frome EL et al. (2000) Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the ImmunoBe-LPT. *Toxicology* 143: 125–140
45. Fontenot AP, Kotzin BL (2003) Chronic beryllium disease: immune-mediated destruction with implications for organ-specific autoimmunity. *Tissue Antigens* 62: 449–458
46. Amicosante M, Sanarico N, Berretta F et al. (2001) Beryllium binding to HLA-DP molecule carrying the marker of susceptibility to berylliosis glutamate beta 69. *Hum Immunol* 62: 686–693
47. Sawyer RT, Parsons CE, Fontenot AP et al. (2004) Beryllium-induced tumor necrosis factor-alpha production by CD4+ T cells is mediated by HLA-DP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 122–130
48. Wang Z, Farris GM, Newman LS et al. (2001) Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype. *Toxicology* 165: 27–38
49. Loftenius A, Sandborgh-Englund G, Ekstrand J (1998) Acute exposure to mercury from amalgam: no short-time effect on the peripheral blood lymphocytes in healthy individuals. *J Toxicol Environ Health A* 54: 547–560
50. Moszczynski P, Slowinski S, Rutkowski J et al. (1995) Lymphocytes, T and NK cells, in men occupationally exposed to mercury vapours. *Int J Occup Med Environ Health* 8: 49–56
51. Park SH, Araki S, Nakata A et al. (2000) Effects of occupational metallic mercury vapour exposure on suppressor-inducer (CD4+CD45RA+) T lymphocytes and CD57+CD16+ natural killer cells. *Int Arch Occup Environ Health* 73: 537–542
52. Vimercati L, Santarelli L, Pesola G et al. (2001) Monocyte-macrophage system and polymorphonuclear leukocytes in workers exposed to low levels of metallic mercury. *Sci Total Environ* 270: 157–163
53. Singh VK, Mishra KP, Rani R et al. (2003) Immunomodulation by lead. *Immunol Res* 28: 151–166
54. Basaran N, Udeger U (2000) Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers. *Am J Ind Med* 38: 349–354
55. Fischbein A, Tsang P, Luo JC et al. (1993) Phenotypic aberrations of CD3+ and CD4+ cells and functional impairments of lymphocytes at low-level occupational exposure to lead. *Clin Immunol Immunopathol* 66: 163–168
56. Kuo HW, Hsiao TY, Lai YS (2001) Immunological effects of long-term lead exposure among Taiwanese workers. *Arch Toxicol* 75: 569–573
57. Dyatlov VA, Lawrence DA (2002) Neonatal lead exposure potentiates sickness behavior induced by Listeria monocytogenes infection of mice. *Brain Behav Immun* 16: 477–492
58. Pinkerton LE, Biagini RE, Ward EM et al. (1998) Immunologic findings among lead-exposed workers. *Am J Ind Med* 33: 400–408
59. Sata F, Araki S, Tanigawa T et al. (1997) Changes in natural killer cell subpopulations in lead workers. *Int Arch Occup Environ Health* 69: 306–310
60. Sata F, Araki S, Tanigawa T et al. (1998) Changes in T cell subpopulations in lead workers. *Environ Res* 76: 61–64
61. Petanova J, Fucikova T, Bencko V (2000) Influence of cadmium and zinc sulphates on the function of human T lymphocytes in vitro. *Cent Eur J Public Health* 8: 137–140
62. Sarasua SM, Vogt RF, Henderson LO et al. (2000) Serum immunoglobulins and lymphocyte subset distributions in children and adults living in communities assessed for lead and cadmium exposure. *J Toxicol Environ Health A* 60: 1–15
63. Yucseyo B, Turhan A, Ure M et al. (1997) Simultaneous effects of lead and cadmium on NK cell activity and some phenotypic parameters. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 19: 339–348
64. Boscolo P, Di Gioacchino M, Sabbioni E et al. (2000) Lymphocyte subpopulations, cytokines and trace elements in asymptomatic atopic women exposed to an urban environment. *Life Sci* 67: 1119–1126
65. Tanigawa T, Araki S, Sata F et al. (1998) Effects of smoking, aromatic amines, and chromates on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in male workers. *Environ Res* 78: 59–63
66. Morris DL, Jeong HG, Jordan SD et al. (1998) Characterization of the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in B6C3F1 and DBA/2 mice following single and repeated exposures. *Arch Toxicol* 72: 157–168
67. Holsapple MP, Snyder DS, Wood SC, Morris DL (1991) A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. *Toxicology* 69: 219–255
68. Neubert R, Jacob-Muller U, Stahlmann R et al. (1990) Polyhalogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 1. Effects on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (*Callithrix jacchus*) after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Arch Toxicol* 64: 345–359

69. Kerkvliet NI (2002) Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity. *Int Immunopharmacol* 2: 277–291
70. Tryphonas H, Luster MI, Schiffman G et al. (1991) Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and nonspecific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey. *Fundam Appl Toxicol* 16: 773–786
71. Nagayama J, Tsuji H, Iida T et al. (2001) Effects of contamination level of dioxins and related chemicals on thyroid hormone and immune response systems in patients with „Yusho“. *Chemosphere* 43: 1005–1010
72. Tsuji H (2000) Immune effects of endocrine disruptors. *Nippon Rinsho* 58: 2533–2538
73. Svensson BG, Hallberg T, Nilsson A et al. (1994) Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 65: 351–358
74. Hagmar L, Hallberg T, Leja M et al. (1995) High consumption of fatty fish from the Baltic Sea is associated with changes in human lymphocyte subset levels. *Toxicol Lett* 77: 335–342
75. Holsapple MP, Paustenbach DJ, Charnley G et al. (2004) Symposium summary: children's health risk – what's so special about the developing immune system? *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 61–70
76. ten Tusscher GW, Steerenberg PA, Van Loveren H et al. (2003) Persistent hematologic and immunologic disturbances in 8-year-old Dutch children associated with perinatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect* 111: 1519–1523
77. Nagayama J, Tsuji H, Iida T et al. (1998) Postnatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on lymphocyte subsets in Japanese breast-fed infants. *Chemosphere* 37: 1781–1787
78. Weisglas-Kuperus N, Patandin S, Berbers GA et al. (2000) Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ. Health Perspect* 108: 1203–1207
79. Bilrha H, Roy R, Moreau B et al. (2003) In vitro activation of cord blood mononuclear cells and cytokine production in a remote coastal population exposed to organochlorines and methyl mercury. *Environ Health Perspect* 111: 1952–1957
80. Yu ML, Hsin JW, Hsu CC et al. (1998) The immunologic evaluation of the Yucheng children. *Chemosphere* 37: 1855–1865
81. Neubert R, Maskow L, Webb J et al. (1993) Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. *Life Sci* 53: 1995–2006
82. Ernst M, Flesch-Janys D, Morgenstern I, Manz A (1998) Immune cell functions in industrial workers after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: dissociation of antigen-specific T-cell responses in cultures of diluted whole blood and of isolated peripheral blood mononuclear cells. *Environ Health Perspect* 106 [Suppl 2]: 701–705
83. Leonardi GS, Houthuijs D, Steerenberg PA et al. (2000) Immune biomarkers in relation to exposure to particulate matter: a cross-sectional survey in 17 cities of Central Europe. *Inhal Toxicol* 12 [Suppl 4]: 1–14
84. Harder SD, Soukup JM, Ghio AJ et al. (2001) Inhalation of PM<sub>2.5</sub> does not modulate host defense or immune parameters in blood or lung of normal human subjects. *Environ Health Perspect* 109 [Suppl 4]: 599–604
85. Rudell B, Blomberg A, Helleday R et al. (1999) Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trap filtered exhaust. *Occup Environ Med* 56: 527–534
86. Salvi S, Blomberg A, Rudell B et al. (1999) Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 702–709
87. Becker S, Soukup J (2003) Coarse (PM<sub>2.5–10</sub>), fine (PM<sub>2.5</sub>), and ultrafine air pollution particles induce/increase immune costimulatory receptors on human blood-derived monocytes but not on alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A* 6: 847–859
88. Basaran N, Shubair M, Undeger U et al. (2002) Alterations in immune parameters in foundry and pottery workers. *Toxicology* 178: 81–88
89. Subra JF, Renier G, Reboul P et al. (2001) Lymphopenia in occupational pulmonary silicosis with or without autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 126: 540–544
90. Froom P, Lahat N, Kristal-Boneh E et al. (2000) Circulating natural killer cells in retired asbestos cement workers. *J Occup Environ Med* 42: 19–24
91. Tulinska J, Jahnova E, Dusinska M et al. (2004) Immunomodulatory effects of mineral fibres in occupationally exposed workers. *Mutat Res* 553: 111–124
92. Chavance M, Perrot JY, Annesi I (1993) Smoking, CD45RO+ (memory), and CD45RA+ (naive) CD4+ T cells. *Am Rev Respir Dis* 148: 237–240
93. de Jong JW, Belt-Gritter B, Koeter GH, Postma DS (1997) Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir Med* 91: 67–76
94. Parry H, Cohen S, Schlarb JE et al. (1997) Smoking, alcohol consumption, and leukocyte counts. *Am J Clin Pathol* 107: 64–67
95. Schaberg T, Theilacker C, Nitschke OT, Lode H (1997) Lymphocyte subsets in peripheral blood and smoking habits. *Lung* 175: 387–394
96. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM et al. (1989) Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am Rev Respir Dis* 139: 194–198
97. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM et al. (1989). The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy caucasians. *Am Rev Respir Dis* 139: 1446–1451
98. van Larebeke N, Husson B, De Coen W, Pluggers E (2003) Immunologic and other biological parameters as a function of smoking status and of residence in areas differing in terms of air pollution. *Int J Environ Health Res* 13: 55–69
99. Freedman DS, Flanders WD, Barboriak JJ et al. (1996) Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men. *Ann Epidemiol* 6: 299–306
100. Hockertz S, Emmendorffer A, Scherer G et al. (1994) Acute effects of smoking and high experimental exposure to environmental tobacco smoke (ETS) on the immune system. *Cell Biol Toxicol* 10: 177–190
101. Mili F, Flanders WD, Boring JR et al. (1991) The associations of race, cigarette smoking, and smoking cessation to measures of the immune system in middle-aged men. *Clin Immunol Immunopathol* 59: 187–200
102. Karakaya A, Yucesoy B, Turhan A et al. (1999) Investigation of some immunological functions in a group of asphalt workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology* 135: 43–47
103. Ying CJ, Ye XL, Xie H et al. (1999) Lymphocyte subsets and sister-chromatid exchanges in the students exposed to formaldehyde vapor. *Biomed Environ Sci* 12: 88–94
104. Dasdag S, Sert C, Akdag Z, Batun S (2002) Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on hematologic and immunologic parameters in welders. *Arch Med Res* 33: 29–32
105. Bonhomme-Faivre L, Marion S, Forestier F et al. (2003) Effects of electromagnetic fields on the immune systems of occupationally exposed humans and mice. *Arch Environ Health* 58: 712–717
106. Filipic B, Kovacs K, Somogyvari F et al. (2000) The effects of medium-strength electric impulses on human blood. *Bioelectrochemistry* 52: 29–36
107. Graham C, Sastre A, Cook MR, Gerkovich MM (2001) All-night exposure to EMF does not alter urinary melatonin, 6-OHMS or immune measures in older men and women. *J Pineal Res* 31: 109–113
108. Ichinose TY, Burch JB, Noonan CW et al. (2004). Immune markers and ornithine decarboxylase activity among electric utility workers. *J Occup Environ Med* 46: 104–112
109. Selmaoui B, Bogdan A, Auzey A et al. (1996) Acute exposure to 50 Hz magnetic field does not affect hematologic or immunologic functions in healthy young men: a circadian study. *Bioelectromagnetics* 17: 364–372
110. Onodera H, Jin Z, Chida S et al. (2003) Effects of 10-T static magnetic field on human peripheral blood immune cells. *Radiat Res* 159: 775–779
111. Castro AP, Aguas AP, Grande NR et al. (1999) Increase in CD8+ and CD4+ T lymphocytes in patients with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70: A141–A144
112. Takahashi K, Sasaki H, Saito T et al. (2001) Combined effects of working environmental conditions in VDT work. *Ergonomics* 44: 562–570
113. Vaht M, Kikas U, Reinart A, Lehtmaa J (2003) Changes in the immune system of female sunbathers due to the effect of natural UV radiation. *Int J Hyg Environ Health* 206: 597–599
114. Kanariou M, Petridou E, Vrachnou E, Trichopoulos D (2001) Lymphocyte alterations after prolonged sunlight exposure. *J Epidemiol Biostat* 6: 463–465
115. Matsuoka LY, McConnachie P, Wortsman J, Holick MF (1999) Immunological responses to ultraviolet light B radiation in Black individuals. *Life Sci* 64: 1563–1569
116. Rivers JK, Norris PG, Murphy GM et al. (1989) UVA sunbeds: tanning, photoprotection, acute adverse effects and immunological changes. *Br J Dermatol* 120: 767–777
117. Simon JC, Krutmann J, Elmets CA et al. (1992) Ultraviolet B-irradiated antigen-presenting cells display altered accessory signaling for T-cell activation: relevance to immune responses initiated in skin. *J Invest Dermatol* 98: 665–695
118. Simon JC, Hara H, Denfeld RW, Martin S (2002) UVB-irradiated dendritic cells induce nonproliferating, regulatory type T cells. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 330–334
119. Ashford NA, Miller GE (1991) Chemical exposures: low levels and high stakes. Van Nostrand Reinhold, New York
120. Terr AI (1993) Multiple chemical sensitivities. *Ann Intern Med* 119: 163–164
121. Salvaggio JE (1996) Understanding clinical immunological testing in alleged chemically induced environmental illnesses. *Regul Toxicol Pharmacol* 24: S16–S27

122. Idiopathic environmental intolerances. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI) (1999) Board of Directors. *J Allergy Clin Immunol* 103: 36–40
123. Hoover DR, Donnay A, Mitchell CS et al. (2003) Reproducibility of immunological tests used to assess multiple chemical sensitivity syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 1029–1036
124. Baines CJ, McKeown-Eyssen GE, Riley N et al. (2004) Case-control study of multiple chemical sensitivity, comparing haematology, biochemistry, vitamins and serum volatile organic compound measures. *Occup Med (Lond)* 54: 408–418
125. Landay AL, Muirhead KA (1989) Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol* 52: 48–60
126. Caldwell CW, Maggi J, Henry LB, Taylor HM (1987) Fluorescence intensity as a quality control parameter in clinical flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 88: 447–456
127. Gratama JW, D'Hautcourt JL, Mandy F et al. (1998) Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 33: 166–178
128. Hoffkes HG, Schmidtke G (1996). Quality control of flow cytometry by means of fluorescent particles („beads“). *Infusionsther Transfusionsmed* 23: 115–116
129. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G et al. (1998) Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry. *Cytometry* 33: 188–196
130. Purvis N, Stelzer G (1998) Multi-platform, multi-site instrumentation and reagent standardization. *Cytometry* 33: 156–165
131. Schwartz A, Fernandez RE, Vogt R, Gratama JM (1996) Standardizing flow cytometry: construction of a standardized fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators. *Cytometry* 26: 22–31
132. Schwartz A, Marti GE, Poon R et al. (1998) Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry* 33: 106–114
133. Serke S, van Lessen A, Huhn D (1998) Quantitative fluorescence flow cytometry: a comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence. *Cytometry* 33: 179–187
134. Raffael A, Nebe CT, Valet G (1994) Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg) *Durchflusszytometrie in der klinischen Zell-diagnostik*. Schattauer, Stuttgart, pp 3–49
135. Robinson JP (1993) *Handbook of flow cytometry methods*. Wiley-Liss, New York
136. Kimber I (2002) Reduction, refinement and replacement: putting the immune system to work. *Altern Lab Anim* 30: 569–577
137. Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“ am Robert Koch-Institut (2002) Diagnostische Relevanz des Lymphozytentransformationstestes in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitschutz* 45: 745–749
138. Milovanova TN, Popma SH, Cherian JS et al. (2004). Flow cytometric test for beryllium sensitivity. *Cytometry* 60B: 23–30
139. Backe E, Lotz G, Tittelbach U et al. (2004) Immunological biomarkers in salt miners exposed to salt dust, diesel exhaust and nitrogen oxides. *Int Arch Occup Environ Health* 77: 319–327
140. Peter HH (2000) Erworbene Immundefekte. In: Thomas L (Hrsg) *Labor und Diagnose*. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, pp 751–759
141. Lafuente A, Gonzalez-Carracedo A, Esquifino AI (2004) Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. *Biometals* 17: 451–456
142. Yucesoy B, Mirshahidi S, Yucesoy C, Karakaya A (1999) In vitro effects of various metals on natural killer cell activity in cultured human lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 21: 599–607
143. Tanigawa T, Araki S, Nakata A et al. (1999) Effects of smoking and Japanese cedar pollinosis on lymphocyte subpopulations. *Arch Environ Health* 54: 119–123
144. Boscolo P, Di Gioacchino M, Bavazzano P et al. (1997) Effects of chromium on lymphocyte subsets and immunoglobulins from normal population and exposed workers. *Life Sci* 60: 1319–1325
145. Kuo HW, Wu ML (2002) Effects of chromic acid exposure on immunological parameters among electroplating workers. *Int Arch Occup Environ Health* 75: 186–190
146. Pedersen BK, Abom B (1988) The in vivo effect of triethylphosphine gold (auranofin), sodium aurothiomalate and azathioprine on lymphocyte subsets of patients with rheumatoid arthritis. *Allergy* 43: 396–398
147. Hashimoto K, Whitehurst CE, Matsubara T et al. (1992) Immunomodulatory effects of therapeutic gold compounds. Gold sodium thiomalate inhibits the activity of T cell protein kinase C. *J Clin Invest* 89: 1839–1848
148. Li D, Ong CN, Ng V, Tan C (1998) Effect of nickel chloride on mouse T-lymphocyte subsets. *Vet Hum Toxicol* 40: 129–131
149. Moszczynski P, Rutowski J, Slowinski S et al. (1996) Effects of occupational exposure to mercury vapors on T-cell and NK-cell populations. *Arch Med Res* 27: 503–507
150. Moszczynski P, Rutowski J, Slowinski S, Bem S (1998) Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of T-cells and NK-cells. *Analyst* 123: 99–103
151. Boscolo P, Di Sciascio M, D'Ostilio S et al. (2001) Effects of electromagnetic fields produced by radio-television broadcasting stations on the immune system of women. *Sci Total Environ* 273: 1–10
152. Boscolo P, Bergamaschi A, Di Sciascio M et al. (2001) Effects of low frequency electromagnetic fields on expression of lymphocyte subsets and production of cytokines of men and women employed in a museum. *Sci Total Environ* 270: 13–20
153. Teunissen MB, Sylva-Steenland RM, Bos JD (1993) Effect of low-dose ultraviolet-B radiation on the function of human T lymphocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 94: 208–213
154. Holladay SD, Smith BJ (1994) Fetal hematopoietic alterations after maternal exposure to benzo[a]pyrene: a cytometric evaluation. *J Toxicol Environ Health* 42: 259–273
155. Rodriguez JW, Kiriln WG, Wirsly YG et al. (1999) Maternal exposure to benzo[a]pyrene alters development of T lymphocytes in offspring. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 21: 379–396