

Beispiel eines neuen Einsatzbereichs des humanen Vollbluttests: Entwicklung eines Messverfahrens zur Abschätzung der gesundheitlichen Gefährdung durch luftgetragene mikrobielle Verunreinigungen

Stefan Fennrich¹, Bert Zucker² und Thomas Hartung¹

¹Universität D-Konstanz, ²Freie Universität D-Berlin

Zusammenfassung

Die für den Menschen krankmachenden Eigenschaften von Umweltkeimen, wie auch von Pyrogenen als Fragmente dieser Keime (speziell Endotoxine), werden zunehmend erkannt. Verschiedene Krankheitsbilder sind bei Kontakt mit luftgetragenen mikrobiellen Kontaminationen über die Atemwege beschrieben: Sick-Building-Syndrom, Befeuchterlunge, „Montagskrankheit“ u.a.. Raumlufttechnische Anlagen verschärfen dieses Problem, aber auch Lagerung von Biomüll stellt in Wohnungen eine erhebliche Quelle an luftgetragenen Verunreinigungen dar.

Von Thomas Hartung und Albrecht Wendel wurde 1995 eine neue Methode zur Detektion von pyrogenen (fieber-induzierenden), gesundheitsgefährdenden Kontaminationen beschrieben. Dieser Vollbluttest nutzt die natürliche Reaktion des Immunsystems, um sehr sensitiv ein weites Pyrogenspektrum in der relevanten Spezies zu testen. Injizierbare Arzneimittel sind der Kernanwendungsbereich, in dem sich der innovative Test bereits bewährt hat und vor der Aufnahme in das Europäische Arzneibuch steht.

Wir konnten in einer Kooperation mit der FU Berlin exemplarisch an klimatechnischen Anlagen von Tierställen zeigen, dass der Vollblut-Pyrogentest luftgetragene Umweltkeime sehr sensitiv und speziesrelevant detektieren kann. Die Filtrationstechnik zur Sammlung dieser Keime ist eine etablierte Methode für Klima- und Belüftungseinrichtungen. In einer Kooperation mit der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin der FU Berlin (Institut für Tier- und Umwelthygiene) und dem Filterhersteller Sartorius wird diese Methode derzeit für den Einsatz im Wohnumfeld des Menschen für luftgetragene Verunreinigungen weiterentwickelt.

Summary: A new application for the human whole blood test: development of an assay to assess the health risk of air-borne microbial contaminations

The pathogenic properties of environmental microorganisms as well as pyrogens as fragments of those bacteria (especially endotoxins) for humans is increasingly recognised. Various clinical syndromes are described after contact with airborne microbial contaminants via the respiratory tract: Sick-building-syndrome, humidifier lung (a form of hypersensitive pneumonitis), "Monday sickness" etc..

Air-conditioning and ventilation systems intensify this problem as well as storage of compost within the household which represents a considerable source of airborne pollutants.

In 1995 a new method for the detection of pyrogenic (fever-inducing) hazardous substances was described by Hartung and Wendel. This whole blood assay utilises the natural reaction of the immune system in order to detect a broad spectrum of pyrogens very sensitively in the relevant species. Injectable drugs are the main area of application in which this innovative test has already proven effective and is currently validated for inclusion into European Pharmacopoeia.

In co-operation with the FU Berlin we could demonstrate in ventilation systems in animal stables that the whole blood pyrogen test can also detect airborne environmental microorganisms very sensitively. The filtration technique for collection of these germs is an established method for air-conditioning and ventilation systems. In co-operation with the FU Berlin (Institut für Tier- und Umwelthygiene) and the filter producer Sartorius this method is currently developed for the detection of airborne contaminations.

Keywords: 3R, pyrogens, air quality control, safety, microbial contaminations

1 Problemstellung

Nicht nur unser Wohlbefinden in geschlossenen Räumen, sondern auch unsere Gesundheit hängt wesentlich von der Luftqualität unseres unmittelbaren Lebensum-

feldes ab. Die Qualität des Raumklimas, besonders in klimatisierten Gebäuden, wird dabei hauptsächlich durch die Komponenten Lufttemperatur, Luftfeuchtigkeit und den Gehalt an Schadstoffen in der Luft bestimmt, wobei die Kontamination mit

Umweltkeimen oder deren Zerfallsprodukten eine zentrale Rolle spielt.

Bei den Mikroorganismen haben insbesondere Schimmelpilze und Bakterien, sowie die von ihnen gebildeten Toxine, eine besondere Bedeutung. So soll die

Verunreinigung der Innenraumluft mit Bakterien und Schimmelpilzen einen ursächlichen Faktor beim „Sick-Building-Syndrom“ darstellen (Exner, 1993). Dieses Syndrom ist u.a. durch mangelndes Wohlbefinden, Mattigkeit, Konzentrationschwäche, Kopfschmerzen, Schleimhautreizungen, Lufttrockenheitsgefühl und erhöhte Allergie- und Infektanfälligkeit gekennzeichnet. Nach einer Studie der WHO leiden 30% der insgesamt 3 Millionen in klimatisierten Räumen Beschäftigten unter diesen Symptomen (Drexler und Fechner, 1997).

Untersuchungen der Universität Kiel konnten ebenfalls Zusammenhänge zwischen Atemwegserkrankungen, Infektanfälligkeit und Allergien, sowie dem Vorkommen von Umweltkeimen (Bakterien und Schimmelpilzen) in Wohnungen aufzeigen (Böge, 1998).

Hauptursache für eine mikrobielle Kontamination mit Bakterien und Schimmelpilzen des Wohnraumbereichs stellt eine andauernde Feuchte in oder auf Baumaterialien dar. Dieses Problem wird durch den anhaltenden Trend zur stärkeren Abdichtung der Gebäude zum Zweck der Energieeinsparung noch verstärkt. Durch Abdichtungsmaßnahmen wird ein kontinuierlicher Luftaustausch im Wohnraum behindert. Eine steigende Feuchtigkeitsbelastung der Baumaterialien, sowie steigende Schadstoffkonzentrationen in der Wohnraumluft sind die Folge. Auf Grund dieser Zusammenhänge ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren der Stellenwert mikrobieller Belastungen in Wohn- und Arbeitsbereichen als Ursache für gesundheitliche Probleme deutlich zunehmen wird. Deshalb müssen besonders aus hygienischer Sicht Untersuchungsmethoden und Bewertungskriterien zur Charakterisierung von Belastungen mit Umweltkeimen in Wohn- und Arbeitsräumen verbessert werden.

Bisher werden mikrobielle Kontaminationen in Wohnräumen i.d.R. nur durch die Konzentration an Schimmelpilzsporen in der Raumluft bewertet, was zu einer umfassenden Bewertung von Keimbelastungen unzureichend ist:

► Schimmelpilze stellen nur eine Form der mikrobiellen Belastungen dar, insbesondere wird den Gram-negativen Bakterien und ihren Endotoxinen eine ursächliche Bedeutung beim „Sick-Building-Syndrom“ beigemessen.

► Die Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen beruht auf klassischen mikrobiologischen Methoden, d.h. es werden nur vermehrungsfähige Formen dieser Mikroorganismen erfasst. Eine gesundheitliche Gefährdung für den Menschen geht aber auch von toten Pilzen und Bakterien aus, die mittels kultureller Nachweismethoden nicht erfasst werden.

► Die Bestimmung der Konzentration an Mikroorganismen, d.h. das einfache Feststellen der Anzahl pro Volumeneinheit, gibt keinen Hinweis auf die Pathogenität der jeweils vorkommenden Schimmelpilze, bzw. Bakterien für den Menschen.

Eine umfassende Einschätzung von Belastungen durch Umweltkeime sollte daher eine Vielzahl von relevanten Mikroorganismen und ihrer toxischen Stoffwechselprodukte erfassen und eine Bewertung ihrer Pathogenität für den Menschen vornehmen.

Ein wesentlicher Problembereich ist der Innenraum von Wohnungen und Arbeitsräumen. Erst kürzlich wurde im *Spiegel* (14/2000, Seite 222) unter der Überschrift „Giftregen aus dem Bottich“ die mikrobiologische Keimbelastung aufgrund der getrennten Sammlung und Lagerung von Biomüll im Wohnbereich problematisiert. Neben den Mikroorganismen selber stellen deren Zellwandbestandteile, also das, was auch nach Absterben des Keimes noch übrig bleibt, einen wesentlichen Risikofaktor für das Wohlbefinden und die Gesundheit des Menschen dar. Denn diese Strukturen (Endotoxine) und Glucane werden von weißen Blutzellen des Organismus erkannt und lösen z.B. nach Einatmen eine Entzündungsreaktion aus, die die o.g. Gesundheitsstörungen hervorruft. Eine Belastung mit derartigen Umweltkeimen ist in Haushalten, die Biomüll sammeln und in der Wohnung einige Tage deponieren, ca. dreimal höher. Die Belastung mit Schimmelpilzen steigt sogar um das Achtfache. Bei Vorhandensein von Teppichen als Fußbodenbelag steigen diese Werte drastisch auf das 800fache!

Einen weiteren wichtigen Bereich stellt der Arbeitsplatz dar. Hier nimmt die Zahl raumlufttechnischer Anlagen (RLT-Anlagen), denen inzwischen einige Millionen Menschen in der Bundesrepublik Deutschland ausgesetzt sind (1993: 3 Millionen, Exner, 1993), stark zu. Heute werden folgende Gesundheitsstörungen im Zusam-

menhang mit RLT-Anlagen beschrieben: *Sick Building Syndrom*, *Building Related Illness*, Infektionen und Allergien.

Die Detektion von Endotoxin gilt als Marker für die Kontaminationen mit Krankheitskeimen als wichtigster Ursache (als Belastung gelten sechsfach erhöhte Endotoxinmengen, d.h. 36-800 ng/m³ Luft) (Teeuw, 1994). Gram-positive Keime sind ebenfalls in erheblichem Umfang vertreten, scheinen aber eine nicht so große krankmachende Bedeutung zu haben, wie mikrobiologische Untersuchungen, also der Nachweis von lebenden Erregern, vermuten lassen. Es ist allerdings anzumerken, dass es kein *in vitro* Testsystem gibt, totes Material Gram-positiver Erreger nachzuweisen, wie es für Endotoxin von Gram-negativen Bakterien möglich ist. Eine detailliertere Beurteilung steht deshalb noch aus. Ähnliches gilt für Pilzbestandteile.

Die Weltgesundheitsorganisation WHO schätzte bereits vor über 10 Jahren, dass etwa 1/3 aller neuen oder renovierten Gebäude sogenannte potentielle „kranke“ Bauwerke sind (Teeuw, 1994). Da die Gesundheitsprobleme weniger für natürlich belüftete Gebäude, als vielmehr für vollklimatisierte Räume zutreffen, ist entsprechend der zunehmenden Verbreitung mit stark steigenden Zahlen zu rechnen. Die mit Luftbefeuchtern betriebenen Anlagen stellen dabei einen besonderen Risikofaktor dar, da zu hohe Luftfeuchte Kontaminationen und Keimwachstum begünstigt. Aufgrund von Energiesparmaßnahmen wird oft auf eine sinnvolle Regelung der Luftfeuchte verzichtet (Luftfeuchte steigt). Die sogenannte „Befeuchterlunge“ (besonders in Druckereibetrieben) ist ursächlich sowohl auf Gram-negative, als auch Gram-positive Bakterien wie auch Pilze und Amöben zurückzuführen (Exner, 1993). Das sogenannte „Befeuchterfieber“ wird direkt mit Endotoxinen (Zellwandbestandteilen von Gram-negativen Bakterien) in Zusammenhang gebracht. Es handelt sich dabei um sogenannte Pyrogene, also Substanzen, die potentiell Fieber beim Menschen auslösen können, die Endotoxine sind potentester Vertreter. Andere Pyrogene können derzeit durch *in vitro* Systeme nicht nachgewiesen werden, wie pyrogene Fragmente von Gram-positiven Bakterien, die etwa die andere Hälfte der Keimbesiedlung in den kritischen klimatechnischen Anlagen

ausmachen. Ähnliches gilt für Pilzbestandteile, aber auch chemische Partikel können im Menschen eine pyrogene, krankmachende Wirkung entfalten.

Es ist für eine Vielzahl von Arbeitsplätzen bekannt, dass gehäuft montags Krankheitssymptome auftreten, denn nach einer Karenzzeit über das belastungsfreie Wochenende wird der Körper mit einer Vielzahl von luftgetragenen Kontaminationen abrupt wieder konfrontiert. Diese „Montagssymptomatik“, gekennzeichnet durch deutliches Krankheitsgefühl kombiniert mit Luftnot, Husten und thorakalem Engegefühl, bessert sich im Laufe der Arbeitswoche. Als Ursache für diese in der Baumwollindustrie unter dem Namen „Byssinose“ bekannte Erkrankung nach Inhalation von organischen Stäuben werden u.a. inhalierte Endotoxine der Atemluft diskutiert (Baenker, 1999).

Beschäftigte in Tierhandlungen, Tierställen, Zoos, Geflügelfarmen oder Müllsortieranlagen sind hier ebenfalls zu nennen. Aber auch Arbeiter in der Stahlindustrie gehören zu besonders exponierten Gruppen, denn die rezirkulierenden Kühlflüssigkeiten (Öl-Wassergemische) verbreiten in besonderem Maße als Aerosole pyrogene Verunreinigungen durch Verkeimung der rezirkulierenden Flüssigkeit insbesondere mit Pseudomonaden. Dies wird begünstigt durch die hohen Temperaturen und die feuchte Umgebung. Endotoxine sind hitzestabil und werden unter diesen Umgebungsbedingungen nicht inaktiviert.

2 Bisherige Detektionsmöglichkeiten

Im Wesentlichen sind folgende Verfahren zu nennen:

1) Mikrobiologische Prüfverfahren, bei denen Probenmaterial mit einem Nährstoffsubstrat zusammen bebrütet wird. Entsprechend dem Substrat vermehren sich spezielle Erreger, die dann identifiziert werden können. Zeitaufwand: bis zu 14 Tage.

2) Schnelltest für mikrobiologische Kontaminationen sind die Biolumineszenz und das Impedanz-Monitoring, die auch eine vorherige Keimvermehrung benötigen. Das optische Nachweissystem der direkten Epifluoreszenz ist sehr zeitraubend und personalintensiv und für die Routineanalytik großer Probenzahlen ungeeignet. Mit

Verfahren der direkten Fluoreszenzmarkierung (z.B. ChemScan-System, Messung mit ultrasensitivem Laser-Scanner) weist sehr schnell lebende Mikroorganismen nach. Es ist für Rohmaterialien oder Fertigprodukte z.B. in Pharmafirmen vorgesehen und für die Luftkontrolle ungeeignet, denn das natürlich vorkommende Keimspektrum würde diesen Test erheblich stören.

3) Prüfung auf Endotoxingehalt. Nach Abscheidung luftgetragener Endotoxine auf Filtern können diese Strukturen von Gram-negativen Bakterien nach Auswaschen im sogenannten Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) sehr empfindlich nachgewiesen werden (Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration am Arbeitsplatz, BIA-Arbeitsmappe „Messung von Gefahrenstoffen“, Kennzahl 9450).

Die mikrobiologischen Differenzierungsverfahren sind eine sehr gute Möglichkeit, das Keimspektrum zu analysieren, während tote und mit Standardverfahren schlecht vermehrbare Keime nicht erkannt werden. Diese Methoden sind aber sehr arbeits- und zeitaufwendig als auch materialintensiv. Für die Routine ist dies kaum brauchbar, und der direkte Einfluss auf den Menschen bleibt unberücksichtigt. Zudem wird in der Regel infektiöses Material vermehrt und muss unter entsprechenden Sicherheitsbedingungen bearbeitet und entsorgt werden.

Endotoxine können als Marker für Kontaminationen mit Gram-negativen Bakterien herangezogen werden. Mit dem LAL-Test steht eine gut etablierte und sensitive Methode zur Verfügung. Untersuchungen können aber nur eine Spüllösung

des verwendeten Filters. Eventuell an diesen gebundene und nicht mehr abwaschbare Endotoxine entziehen sich der Detektion.

3 Neue Methode

Pyrogene sind entzündungsinduzierende Substanzen, die je nach Aufnahmeweg über eine Beeinträchtigung des Allgemeinempfindens, Atemprobleme, Fieber, Kreislauf- und Organversagen bis hin zum tödlichen Schock des Menschen führen können. Die dramatischsten Krankheitssymptome treten allerdings nur auf, wenn injizierbare Arzneimittel kontaminiert sind. Nach Aufnahme von Endotoxin über die Lunge wurden die oben genannten Krankheitsbilder beschrieben und sind heutzutage als eindeutige körperliche Symptome umweltmedizinisch anerkannt.

Das Immunsystem des Menschen reagiert sehr sensibel auf Umweltkeime bzw. deren Abbauprodukte und löst entsprechende Abwehrmechanismen aus. Dabei ist es für die Körperabwehr grundsätzlich unerheblich, ob Erregermaterial (lebende Keime, Pyrogene wie Endotoxin) direkt über das Blut, die Haut oder die Atemwege den Menschen bedroht. Nach Kontakt mit entsprechenden Kontaminationen werden von weißen Blutzellen (Monozyten/Makrophagen) Signalstoffe ausgeschüttet, die die Reaktion des Körpers steuern. Diese Reaktion haben wir ausgenutzt, um einen Nachweis von Pyrogenen in Medikamenten auf Basis einer Vollblut-Inkubation zu entwickeln (Hartung und Wendel, Fennrich, 1995, 1996, 1998, 1999).

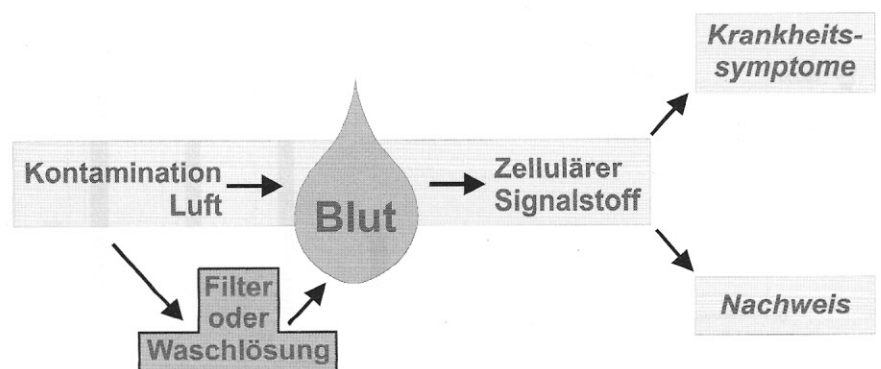


Abb.1: Grundprinzip des auf Sammlung von luftgetragenen Pyrogenen adaptierten Vollbluttests. Es ist möglich, eingesetzte Filter ohne den Umweg über ein Eluat oder Abstrichproben direkt mit dem Blut zu inkubieren.

Der innovative Ansatz für luftgetragene Pyrogene besteht darin, diese Substanzen ebenso mit einer winzigen Menge Blut nach Inkubation mit der aus der Umgebungsluft gefilterten Probe zu detektieren. Die ELISA-Technik ist dafür eine einfache und sichere Messmethode. Darüber hinaus kann sogar das Blut von Betroffenen direkt mit Material, das aus der individuellen Umgebung gewonnen wurde, inkubiert werden, um somit die individuelle Reagibilität zu beurteilen. Besonders überempfindliche Patienten könnten so identifiziert werden.

Es ist sogar möglich, eingesetzte Filter ohne den Umweg über ein Eluat oder Abstrichproben direkt mit dem Blut zu inkubieren. Abbildung 1 zeigt das Grundprinzip. Ein Versuch mit ca. 40 Proben kann kostengünstig innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden.

4 Ergebnisse der neuen Vollblutmethode

Abbildung 2 zeigt beispielhaft am Bakterium *Escherichia coli*, dass sowohl lebende, als auch durch Antibiotika inaktivierte oder durch Hitze abgetötete Bakterien mit der neuen Vollblutmethode erfasst werden können. Je nach Behandlung können bereits 10-100 Erreger erfasst werden. Die Detektion von Endotoxin ist eine besondere Stärke des Vollbluttests und hier nicht näher gezeigt. Dasselbe gilt für Gram-positive Bakterien und Pilze sowie deren Frag-

mente (Hartung und Wendel, Fennrich, 1995, 1996, 1998, 1999).

FAZIT: Lebende Erreger und totes Keimmaterial verschiedener Spezies können in einem einzigen Test gemessen werden.

In Zusammenarbeit mit der FU Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, wurden aus Tierställen mit dieser Methode Luftproben untersucht. Die Belastung

Sammlung über Filtration (Schafstall und *Impingement* (Schweine-stall und Außenluft) gewonnenen Proben waren zuvor im Institut für Tier- und Umwelthygiene (FU Berlin) mit üblichen Kulturverfahren bzw. im LAL-Test untersucht worden.

Die zur Sammlung von luftgetragenen Kontaminationen verwendeten Filter können zur Messung von Pyrogenen

Tab. 1: Überblick über die mikrobielle Kontamination der Luft der untersuchten Tierställe. Im Schafstall wurden die zu untersuchenden Luftproben mittels Filtration (Nitrozellulosefilter) gewonnen.

Lufthygienische Parameter	Schafstall	Schweine-stall K	Schweine-stall V	Außenluft
Einatembarer Staub* [mg/m ³]	0,5	3,1	2,8	0,1
Einatembares Endotoxin* [EU/m ³]	512	3.994	3.841	15
Bakterien gesamt* [KbE/m ³]	40.000	175.000	132.000	2.055
Gram-negative Bakterien* [KbE/m ³]	10	115	100	3
Schimmelpilze* [KbE/m ³]	94.007	247	230	n.u.

* Die Angaben stellen die arithmetischen Mittel von jeweils mindestens 5 Messungen dar. n.u. = nicht untersucht KbE = koloniebildende Einheiten EU = Endotoxin Units

von Luft im Bereich der Tierhaltung und Verwertung ist besonders problematisch für die dort arbeitenden Menschen (Nowak, 1998) und soll hier als Anwendungsbeispiel dienen.

Die mikrobielle Kontamination in den untersuchten Tierställen war bekannt (Tabelle 1). Die mit den Verfahren der

im neuen Test direkt in das Blut eingelegt werden. So ist eine Detektion ohne den Umweg über ein Extraktionsverfahren möglich. Als Kontrolle aufgebraachte Endotoxine in aufsteigender Konzentration auf sauberes Filtermaterial konnten als Antwort zunehmende Interleukinausschüttungen induzieren, d.h. es besteht eine Konzentrationswirkungsbeziehung, wie sie für flüssige Proben gilt und notwendig ist, wenn das Messergebnis quantifiziert werden sollte. Kontaminierte Proben aus einem Schafstall zeigten in Abhängigkeit ihrer Belastung deutliche Signalantworten (Abbildung 3).

Die Luftproben aus den Schweineställen (Proben K und V) und die Außenluftproben wurden mittels *Impingement* gewonnen (Zucker, Draz und Müller, 2000). Bei diesem Verfahren wird die zu analysierende Luft durch eine pyrogenfreie Sammelflüssigkeit geleitet, so dass die Verunreinigungen dort ausgewaschen werden. Diese mit luftgetragenen Stoffen kontaminierte Waschflüssigkeit kann im neuen Vollbluttest problemlos als Probe eingesetzt werden (Abbildung 4).

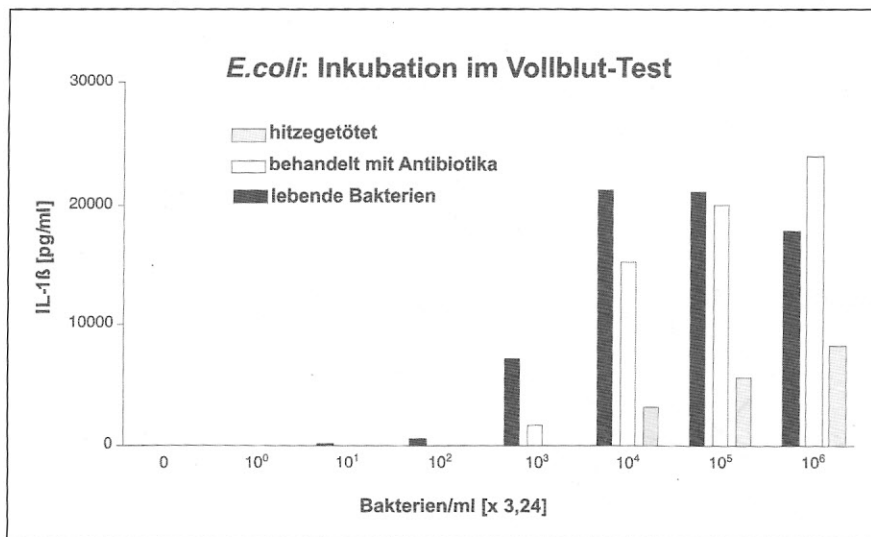


Abb. 2: Lebende Erreger und totes Keimmaterial verschiedener Spezies können in einem einzigen Test gemessen werden.

5 Schlussfolgerung

Wir haben gezeigt, dass im Problembereich von Tierställen die Luft auf Kontaminationen mit lebenden Umweltkeimen und totem Material mit dem neuen Vollbluttest geprüft werden kann. Das neue Prüfverfahren wurde dafür auf die besonderen Verhältnisse (Filtration und *Impingement* zur Sammlung luftgetragener Kontaminationen) adaptiert.

Mit der neuen Vollblutmethode können luftgetragene Pyrogene detektiert werden, die nicht nur in den beispielhaft demonstrierten Proben aus Tierställen von Bedeutung sind, sondern darüber hinaus für den Menschen in seinem gesamten Umfeld des Wohn- und Arbeitsbereiches eine krankmachende Bedeutung haben. Der besondere Vorteil liegt in der Speziesrelevanz, der medizinischen Relevanz, dem breiten Detektionsspektrum und der Möglichkeit, das Blut des Betroffenen selbst direkt zu prüfen. Es existiert kein vergleichbares Testsystem, das sowohl totes wie lebendes Material in einem Ansatz integral erfassen kann.

Wir beabsichtigen, diese innovative Methode mit Partnern aus der Umweltmedizin und Industrie weiter zu evaluieren, die ersten methodisch erfolgreichen Ansätze zu optimieren und an die verschiedenen Umweltbedingungen des Menschen zu adaptieren. Eine entsprechende Kooperations- und Förderungsvereinbarung wurde mit der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Herrn Dr. Linsel) getroffen. An diesem Projekt ist auch der Filterhersteller Sartorius beteiligt. Der entscheidende Vorteil der neuen Messmethode besteht darin, dass genau die Reaktion gemessen wird, die die Luftkontamination auch im menschlichen Organismus hervorrufen würde, und sie spiegelt dadurch potentielle Gefahren für den Menschen wider. Es besteht die berechtigte Hoffnung, dass damit demnächst eine einfache, standardisierte Methode zur Messung von luftgetragenen Pyrogenen zur Verfügung steht. Dies ist letztlich eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Präventionsmaßnahmen.

Danksagung

Die exzellente technische Unterstützung gewährleisteten Frau Ilona Kindinger,

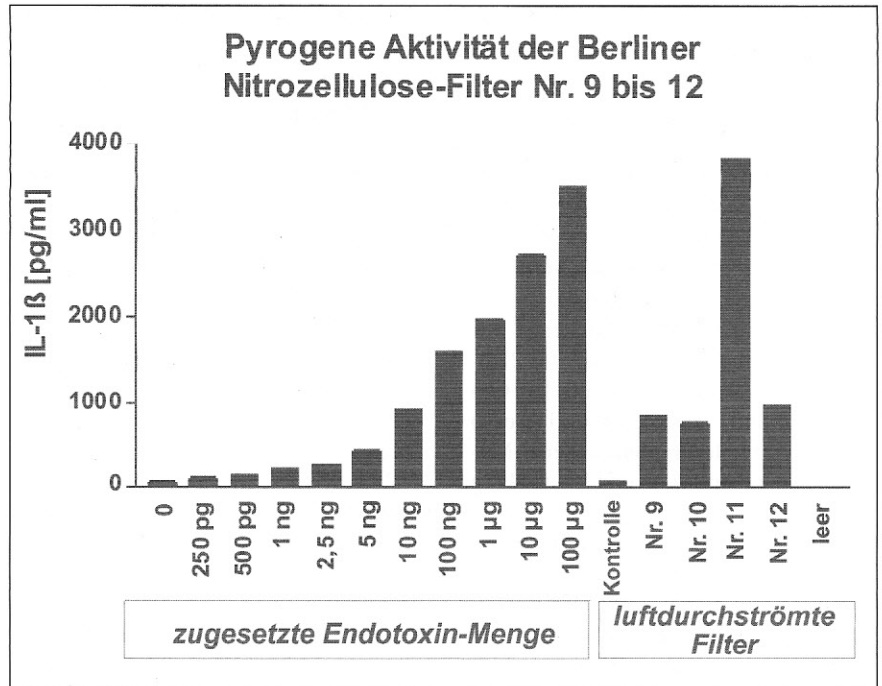


Abb. 3: Es sind die direkt im Vollbluttest gemessenen Filterproben dargestellt. Die linke Grafikhälfte zeigt, dass ansteigende Endotoxinmengen, auf „leere“ Filter aufgebracht, eine klare Konzentrations-Wirkungsbeziehung aufweisen, eine Voraussetzung für eine quantitative Testdurchführung. Bei den mit den Ziffern 9 bis 12 gekennzeichneten Balken handelt es sich um die Filterproben aus dem Schafstall.

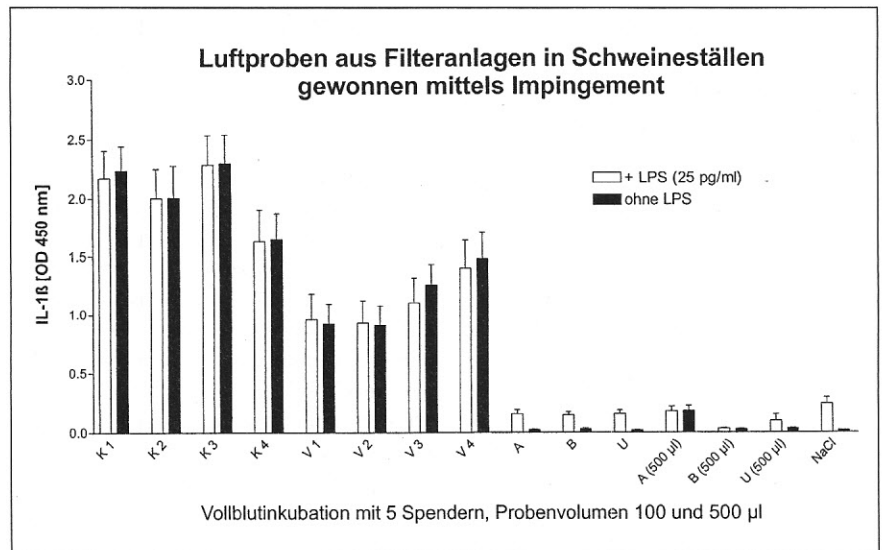


Abb. 4: Messung mittels Waschlösung (Impingement): In den Luftproben der Schweineställe (K1–K4 und V1–V4) konnten pyrogene Aktivitäten sicher nachgewiesen werden (hohe schwarze Balken). Selbst geringste Belastungen ($< 0,1$ internationale Einheiten Endotoxin pro Milliliter), wie in Probe A, konnten durch Modifikation des Versuchsprotokolls (Erhöhung des Probenvolumens auf 500 μ l) identifiziert werden, wie der schwarze Balken über „A (500 μ l)“ zeigt. Damit wird deutlich, dass das Meßsystem empfindlich genug ist auch geringe Belastungen, wie sie in Wohnräumen auftreten dürften, sicher zu erfassen.



Frau Ina Seuffert und Stefanie Schindler. Ihnen sei hier ausdrücklich gedankt!

Literatur

- Baenkler, H. W., Fritze, D., Fießl, H. S. et al. (Hrsg.) (1999). Erkrankungen der Atmungsorgane. In *Innere Medizin* (562). Stuttgart: Hippokrates-Verlag im Thieme-Verlag (Duale Reihe).
- Bethge, P. (2000). Müll: Giftregen aus dem Bottich. *DER SPIEGEL* 14, 222.
- Böge, Klaus Peter (Ambulanz für Gesundheit und Umwelt, 23568 Lübeck) (1998). Aktuelle Ergebnisse neuer Methoden zur Ermittlung und Beurteilung mikrobieller Belastungen in Innenräumen. *Zeitschrift für Umweltmedizin, Umweltmedizin.de*.
- Drexler, D. und Fechner, B (1997). Schadstoffemissionen in Innenräumen. *GIT-Spezial "Sicherheit und Management"* 2, 91-100.
- Exner, M. (1993). Raumluftechnische Anlagen und ihre medizinische Relevanz: Sick Building Syndrom ist keine Massenpsychose. *Krankenhaus Arzt* 66, 12, 586-592.
- Fennrich, S., Fischer, M., Hartung, T. et al. (1999). Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood. In F. Brown, C. Hendriksen and D. Sesardic (eds.), *Alternatives to Animals in the Development and Control of Biological Products for Human and Veterinary Use*. Dev Biol Stand, vol 101 (131-139). Basel: Karger.
- Fennrich, S., Fischer, M., Hartung, T. et al. (1998). Entwicklung und Evaluierung eines Pyrogentests mit menschlichem Blut. *ALTEX* 15, 123-128.
- Fennrich, S., Wendel, A. and Hartung, T. (1999). New applications of the human whole blood pyrogen assay (PyroCheck). *ALTEX* 16, 146-149.
- Hartung, T. and Wendel, A. (1996). Detection of Pyrogens Using Human Whole Blood. *In Vitro Toxicology* 9, 353-359.
- Hartung, T. und Wendel, A., (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX* 12, 70-75.
- Nowak, D. (1998). Die Wirkung von Stallluftbestandteilen, insbesondere Schweineställen, aus arbeitsmedizinischer Sicht. *DTW-Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 105, 225-234.
- Teeuw, K. B., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. and Verhoef, J. (1994). Airborne Gram-negative bacteria and endotoxin in Sick-Building Syndrome: A study in Dutch Governmental Office Buildings. *Arch Intern Med*, vol 154, Oct 24, 2339-2345.
- Zucker, B. A., Draz, A. M. and Müller, W. (2000). Comparison of filtration and impingement for sampling airborne endotoxin. *J. Aerosol Sci*, 751-755.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Dr. Thomas Hartung
 Universität Konstanz
 Fachbereich Biologie, Fach M655
 D-78457 Konstanz
 Tel. +49-75 31-88 41 16
 E-mail: Thomas.Hartung@uni-konstanz.de



Poster

In vitro Modell zur Angiogenese und Antiangiogenese

Johanna Plendl und Stefanie Schuster

Freie Universität Berlin, Institut für Veterinär Anatomie, D-Berlin,
 E-mail: plendl@zedat.fu-berlin.de

Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, kommt physiologischerweise nur im Embryo und Fetus sowie in der Plazenta, im Zuge der zyklischen Tätigkeit im Ovar und bei der Entwicklung der Milchdrüse vor. Alle anderen Formen der Angiogenese sind mit krankhaften Prozessen verbunden, wie beispielsweise die Angiogenese beim Wachstum von Tumoren. Angiogenese zu stimulieren, würde bedeuten, die Ausbildung von Kapillaren in einem ischämischen Gebiet anzuregen, umgekehrt würde die Inhibierung der Angiogenese abnormes Wachstum durch Ausschalten der Blutzufuhr beenden.

In jüngster Zeit wurden zahlreiche Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese identifiziert und isoliert. Die Wirkungsmechanismen dieser Substanzen sind sehr vielschichtig, und ihre Untersuchung befindet sich meist noch in frühen experimentellen Stadien.

Im Bereich der Angiogeneseforschung werden zahlreiche Tierversuche durchgeführt, von denen die meisten, da sie am Auge vorgenommen werden, sehr umstritten sind. Für die Untersuchung der Wirkung potentieller Angiogenese-Stimulatoren oder -Inhibitoren werden daher neue *in vitro* Systeme benötigt. Von zahlreichen Forschungsgruppen werden zwar angiogene Endothelzellkulturen vorgestellt, jedoch findet in diesen lediglich eine zweidimensionale Umgruppierung statt, nicht aber Angiogenese, also die Bildung gefäßähnlicher Strukturen, die ein Lumen aufweisen.

Unser Ziel ist die Etablierung eines realitätsnahen Modells der Angiogenese *in vitro*, das die Untersuchung und Quantifizierung der angiogenen bzw. antiangiogenen Wirkung von Angiogenese- und Antiangiogenesefaktoren erlaubt und durch das Tierversuche ersetzt werden können.

In ersten Versuchen gelang es, mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem *Corpus luteum* von Schlachtrindern zu isolieren, welche Angiogenese in einem bisher noch nicht beschriebenen Ausmaß zeigen. Die Zellen migrieren und proliferieren, sie richten sich dreidimensional aus und bilden echte Zellverbindungen im Sinne von *gap* und *tight junctions*. Dadurch entsteht ein komplexes, weitverzweigtes, kapillarähnliches Netz mit kontinuierlichem Lumen, und es wird ein Pendant der Basalmembran gebildet. Mittels immunhistochemischer sowie molekularbiologischer Methoden werden die Zellen weiter charakterisiert. Sie produzieren selbst den wahrscheinlich wichtigsten Angiogenesefaktor, den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und sie exprimieren auch seinen Rezeptor.

Eine Quantifizierung der Angiogenese (Gefäßlänge, -areal, -verzweigung) sowie der Veränderung des Gefäßnetzes (z. B. bzw. abnehmende Ausbildung bzw. Verschwinden) mittels *Image analysis* nach Inkubation in Angiogenesefaktoren bzw. Antiangiogenesefaktoren ist angestrebt.