

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Nowak

**Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut nach beruflicher
Exposition gegenüber organischen Stäuben bei Landwirten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Junichiro Ruzicka
aus Neumarkt in der Oberpfalz

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. rer. biol. hum. K. Radon
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. M. Dellian Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann Prof. Dr. K. Häußinger
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. E. Scharrer
Dekan	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	18. Januar 2007

gewidmet

meinen lieben Eltern Takie & Ales Ruzicka

in tiefer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	5
B. Grundlagen	6
1. Berufskrankheiten (=BK) in der Landwirtschaft.....	6
1.1 Atemwegserkrankungen in der Landwirtschaft.....	6
1.1.1 Rhinitis.....	6
1.1.2 Asthma.....	7
1.2.3 Asthma-like Syndrome.....	7
1.2.4 Exogen-allergische Alveolitis (Farmerlunge).....	7
1.2.5 Organic Dust Toxic Syndrom (Drescherfieber).....	8
1.2.6 Chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung (COPD).....	9
2. Risikofaktoren in der Landwirtschaft.....	9
2.1 Stallgase.....	9
2.2 Pestizide.....	11
2.3 Endotoxine.....	11
2.3.1 Partikel-induzierte adverse Reaktionen.....	12
3. Zytokine.....	14
3.1 Interleukin-6.....	14
3.2 Tumornekrosefaktor α (TNF- α).....	15
3.3 Epitheliales Neutrophilen-aktivierendes Protein 78 (ENA-78).....	15
3.4 Zeitlicher Ablauf der Zytokinausschüttung.....	16
3.5 Pathomechanismus der Endotoxin-induzierten Entzündungsreaktion.....	16
3.6 Zytokine in der Nasallavage.....	18
3.7 Zytokine im Serum.....	19
C. Zielsetzung.....	20
D. Material und Methoden.....	21
1. Kollektiv.....	21
1.1 Landwirte.....	21
1.2 Nichtexponierte Kontrollen.....	21
2. Untersuchungsablauf.....	22
2.1 Landwirte.....	22
2.2 Büroangestellte.....	23
3. Studienprotokoll.....	24
4. Fragebogen.....	24
5. Umweltfaktoren:.....	25
5.1 Endotoxine.....	25
5.2 Kohlendioxid.....	26
5.3 Ammoniak.....	26
5.4 Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit.....	27
6. Spirometrie.....	27
7. Laboruntersuchung.....	28
7.1 Hämatologische Untersuchungen:.....	28
7.2 RAST-Test.....	29
7.3 ELISA.....	29
7.4 Nasallavage.....	31
7.5 Zellzählung.....	32
7.6 Zelldifferenzierung.....	32
8. Statistische Methoden.....	34
E. Ergebnisse.....	35
1. Kollektiv.....	35
1.1 Atemwegsbeschwerden.....	35
1.2 Aktuelles Befinden.....	35
1.3 Arbeitsprofil.....	35
1.4 Stallprofil.....	36
2. Umweltparameter.....	36
2.1 Endotoxinbelastung am Arbeitsplatz.....	36
2.2 Ammoniak.....	36
2.3 Kohlendioxid.....	36
2.4 Temperatur.....	36
2.5 Luftfeuchtigkeit.....	36
2.6 Luftgeschwindigkeit.....	36

3. Laboruntersuchungen.....	37
3.1 Lungenfunktionswerte.....	37
3.2 Allergiestatus	38
3.3 Blutbild.....	38
3.4 Nasallavage	42
3.5 Zytokine	43
3.6 Korrelationsanalysen.....	43
3.6.1 Zusammenhang zwischen Endotoxinexposition und Lungenfunktionsparameter	43
3.6.2 Zusammenhang zwischen Endotoxinexposition und Blutparameter.....	43
3.6.3 Zusammenhang zwischen Endotoxinbelastung und Zellen in der Nasallavage	43
3.6.4 Zusammenhang zwischen Endotoxin und Zytokinen.....	44
3.6.5 Zusammenhang zwischen Nasallavage und Lungenfunktionsparameter	45
3.6.6 Zusammenhang zwischen Nasallavage und Zytokinen in der Nasallavage	46
F. Diskussion	48
1. Studiendesign.....	48
1.1 Untersuchungskollektiv.....	49
1.2 Untersuchungsparameter.....	49
1.2.1 Lungenfunktion	49
1.2.2 Differentialblutbild.....	49
1.2.3 Nasallavage	50
1.2.4 Zytokine und Zellen der Nasallavage.....	51
1.3 Studiendesign – Zusammenfassung	51
2. Umweltparameter.....	52
2.1 Endotoxinbelastung im Stall	52
2.1.1 Endotoxinquantifizierung.....	52
2.1.2 Endotoxinexposition im Stall	52
2.2 Diskussion der Ammoniakbelastung in den Ställen.....	53
2.3 Diskussion der Kohlendioxidkonzentrationen in den untersuchten Ställen	54
3. Diskussion der Ergebnisse	54
3.1 Lungenfunktion	54
3.2 Peripheres Blutbild.....	55
3.3 Nasallavage	57
3.4 Zytokinbefunde im Plasma und in der Nasallavage.....	59
G. Methodische Schwächen.....	62
1. Fallzahl und Gruppenhomogenität	62
2. Untersuchungszeitraum.....	62
3. Ausreißer.....	62
H. Ausblick.....	64
I. Zusammenfassung	65
J. Literaturverzeichnis.....	67
K. Anhang	72
1.1 Fragebögen.....	72
1.2 Stallparameter	82
1.3 Zellen der Nasallavage	82
L. Danksagung	84
M. Lebenslauf	86

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Asp.	Aspergillus
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BK	Berufskrankheit
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony stimulating factor
Δ	Prozentuale Veränderung
EKG	Elektrokardiogramm
ENA-78	epitheliales Neutrophilen-aktivierendes Protein 78
EU	Endotoxin-Units
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen
FVC	forcierte Vitalkapazität
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen colony-stimulating factor
Gr.	Granulozyten
h	Stunde
IFN-γ	Interferon gamma
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-inducible protein-10
IU	international unit
kg	Kilogramm
KO	Kollektiv der Büroangestellten (Kontrollgruppe)
kPa	Kilopascal
l	Liter
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LPS	Lipopolysaccharid-Protein-Komplex
LW	Kollektiv der Landwirte
m	Meter
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
Max.	Maximum
MEF _{50%}	mittlerer expiratorischer Fluss bei 50 Prozent
mg	Milligramm
min	Minute
Min.	Minimum
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Nach Expo	Nach Exposition am Untersuchungstag 2
NaCl	Natriumchlorid
NAL	Nasallavage
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa-B
NH ₃	Ammoniak
NK-Zellen	Natürliche Killer - Zellen
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PDGF	platelet derived growth factor
PEF	peak expiratory flow, expiratorischer Spitzenfluß
pg	Picogramm
p_m	p - Mann-Whitney-U
ppm	parts per million
p_{sp}	p - Spearman
p_w	p - Wilcoxon
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
Rocc	Atemwiderstand, mit der Unterbrechermethode bestimmt
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR4	toll-like-receptor-4
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehungen
U-tag	Untersuchungstag
V_{insp}	inspiratorische Vitalkapazität
Vol%	Volumen Prozent
Vor Expo	Vor Exposition am Untersuchungstag 2

A. Einleitung

Die Landwirtschaft ist heute weltweit noch immer der größte Beschäftigungszeitung. Auch wenn in der Europäischen Union ein deutlicher Rückgang der erwerbstätigen Landwirte zu vermerken ist, arbeiten dennoch ca. 6,8 Mio. (4% von 1.708 Mio. Erwerbstätige in der EU) in diesem Berufszweig (<http://europa.eu.int/comm/eurostat/>). In manchen Ländern der Welt arbeiten sogar bis zu 70% der Erwerbstätigen in der Landwirtschaft.

In der Landwirtschaft tritt eine Fülle von Gefahrenquellen für den Landwirt auf, wie zum Beispiel Staub, Lärm, Vibrationen, UV-Exposition, chemisch irritative und biologisch aktive Substanzen [51, 63].

Modernisierungen und Umstrukturierungen führten in den letzten Jahren zu einer höheren Produktivität und Effizienz, allerdings auch zu neuen Gefahrenquellen für die Gesundheit des Landwirtes. So tragen Stallungen, vor allem Intensivtierhaltung in der Schweine- und Geflügelhaltung mit einer hohen Zahl von Nutztieren, zu einer häufigeren und längeren Exposition der Landwirte gegenüber mit Endotoxinen bei [36]. Dies kann unter anderem zu Erkrankungen der Atemwege führen. Atemwegserkrankungen sind gegenwärtig im Wirtschaftszweig Land- und Forstwirtschaft die dritthäufigste gemeldete Berufskrankheit gemäß den Daten von Eurostat [24].

Eine Prävention dieser Erkrankungen stellt, vor allem wegen der hohen Prävalenz und der hohen Zahl von Landwirten, eine große Herausforderung für die Arbeitsmedizin mit großer Relevanz für die öffentliche Gesundheit dar.

Nur durch ein besseres Verständnis der Ursachen und Mechanismen der Erkrankungswege können wirkungsvolle, präventive Maßnahmen gewählt und ergriffen werden.

B. Grundlagen

1. Berufskrankheiten (=BK) in der Landwirtschaft

Zu den klassischen Berufskrankheiten in der Landwirtschaft, die durch organische Stäube hervorgerufen werden, zählen die exogen-allergische Alveolitis, vorrangig als Farmerlunge bezeichnet (BK 4201), sowie obstruktive Atemwegserkrankungen, die durch allergisierende Stoffe hervorgerufen werden (BK 4301), und solche, die durch chemisch-irritativ oder toxisch wirkende Stoffe ausgelöst werden (BK 4302).

1.1 Atemwegserkrankungen in der Landwirtschaft

Atemwegserkrankungen sind ein sehr häufiges Problem in der Landwirtschaft. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Morbidität und Mortalität aufgrund von Atemwegserkrankungen, trotz einer geringeren Prävalenz an Rauchern, in der Landwirtschaft höher ist als in anderen Bevölkerungsgruppen [32, 63, 89].

Auch die Prävalenz von arbeitsbedingten Atemwegssymptomen wie pfeifendes Atemgeräusch, Husten und Atemnot ist unter den Landwirten ungewöhnlich hoch (23-50%) [71, 78, 86].

Im Folgenden soll kurz auf die verschiedenen Atemwegserkrankungen, die in der Landwirtschaft vorkommen, eingegangen werden.

1.1.1 Rhinitis

Rhinitis gehört zu den häufigsten Atemwegserkrankungen, die in der Landwirtschaft vorkommen. Unter Rhinitis versteht man einen Symptomenkomplex, der durch eine nasale Reizung oder Entzündung zustande kommt. Symptome können Fließschnupfen oder behinderte Nasenatmung, Juckreiz oder Niesen sein. Man unterscheidet zwei Formen der Rhinitis: Die allergische und die nicht-allergische Rhinitis.

Getreideverarbeitung, Milchfarmen, Tierzucht, sowie Flachs- und Hanfverarbeitung konnten in vergangenen Studien mit dem Auftreten von Rhinitiden in Verbindung gebracht werden [80], da gerade in diesen Arbeitsbereichen Typ I Allergene stark verbreitet sind. Neben Allergenen wirken viele Komponenten von organischem Staub sowie einige Desinfektionsmittel und Pestizide als Reizmittel und können Rhinitiden auslösen.

1.1.2 Asthma

Es gibt zwei verschiedene Typen des arbeitsbedingten Asthmas. Zum einen das immunologische Asthma, welches nach einer variablen Zeitspanne, in der es zu einer Sensibilisierung gegen bestimmte Agenzien im Arbeitsumfeld kommt, auftritt; zum anderen das irritativ induzierte Asthma, welches im Anschluss an eine kurze Latenzperiode nach einer intensiven Exposition mit einem irritativen Staub, Nebel, Dampf oder Rauch, entsteht [45].

Arbeitsbedingtes Asthma ist definiert als ein anfallsweises Auftreten von Atemnot infolge variabler und reversibler Bronchialverengung durch Entzündung und Hyperreaktivität der Atemwege, ausgelöst durch spezifische Agenzien oder Bedingungen am Arbeitsplatz, welche abseits des Arbeitsplatzes normalerweise nicht vorkommen [45]. Die häufigsten Allergene, die für das Asthma beim Landwirt verantwortlich gemacht werden, sind Tierepithelien [43].

Innerhalb des European Community Respiratory Health Survey von 1999 wurden mehr als 16000 nach dem Zufallsprinzip ausgewählte junge Erwachsene aus der Allgemeinbevölkerung untersucht. Das höchste Risiko, an Asthma zu erkranken, wurde in der Berufsgruppe der Landwirte festgestellt. Hier lag die Odds Ratio bei 2,62 (95% Konfidenz-Intervall 1,29-5,35) [37].

1.2.3 Asthma-like Syndrome

Die Inhalation von organischem Staub kann eine nicht-allergische Atemwegsantwort auslösen, die auch als „Asthma-like Syndrome“ bezeichnet wird. Die Hauptsymptome sind pfeifende Atemgeräusche und Kurzatmigkeit, welche sich über die Arbeitswoche hin zu bessern scheinen. Bei Landwirten in der Tieraufzucht reduzierte sich die Einsekundenkapazität (FEV_1) in einigen Fällen über die Exposition um 10% [19, 72].

Die unspezifische Atemwegsüberempfindlichkeit, wie man sie bei Asthma beobachtet, kommt vielfach auch in Abwesenheit eines Asthmas vor. Getreidestaub und Baumwollstaub sind die häufigsten Auslöser, allerdings führen auch Ammoniak und Endotoxin zu diesem Krankheitsbild.

1.2.4 Exogen-allergische Alveolitis (Farmerlunge)

Diese Erkrankung ist durch eine interstitielle chronisch-lymphozytäre Pneumonitis gekennzeichnet und kann durch eine Reihe von Antigenen ausgelöst werden, die in verschimmeltem Heu, Getreide oder Strohstaub vorkommen. Hierzu gehören die thermophilen *Actinomyces* spp. und bestimmte *Aspergillus* Arten, wie *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus umbrosus*. Die häufigste Form dieser

Erkrankung ist die Farmerlunge, welche gehäuft nach Exposition zu Saccharopolyspora rectivirgula auftritt. Die Prävalenz wird kontrovers diskutiert:

In einer Untersuchung von Rinderhaltern in Wisconsin konnte eine Prävalenz von 42 je 100000 Rinderzüchter festgestellt werden, während eine Untersuchung zum akuten gehäuften Auftreten von Exogen-allergischer Alveolitis unter einer Gruppe von Büroangestellten, welche dem gleichen bakteriellen Antigen über eine Klimaanlage ausgesetzt waren, bei fast 70% eine Erkrankung feststellte [105].

Symptome treten vor allem während der Wintermonate bzw. in kalt-feuchtem Klima auf. Bei der akuten Form kommt es nach einer Latenzzeit von einigen Stunden nach Exposition (meist am Spätnachmittag) zu Episoden von Kurzatmigkeit, Husten, Fieber und Schüttelfrost. Der Zustand bessert sich ohne Therapie nach einigen Tagen. Andere Formen sind die subakute, rezidivierende und die chronische Form [43]. Allergische Mechanismen vom Typ III und Typ IV spielen eine Rolle [43, 53, 105]. Ein chronischer Verlauf kann sehr fulminant ablaufen, jedoch ist die Letalität gering [43, 105]. Die akute exogen-allergische Alveolitis spricht sehr gut auf eine orale Therapie mit niedrig dosierten Kortikosteroiden an. Präventiv sollte man den Umgang mit feuchtem Material vermeiden, Heu, Getreide und Stroh gut trocknen, die Lager- und Arbeitsräume gut belüften, eine Staubschutzmaske tragen und kommerzielle Antischimmelpräparate verwenden [43, 105].

1.2.5 Organic Dust Toxic Syndrom (Drescherfieber)

Hierbei handelt es sich um eine bei Landwirten sehr häufig vorkommende, akut entzündliche Reaktion der Bronchien und Alveolen. Unter schwedischen Landwirten beträgt die Prävalenz, einmal im Leben an einem Organic Dust Toxic Syndrome zu erkranken, 6% [73], und die Inzidenz liegt bei 1% [46, 68]. Nach Exposition mit Endotoxin treten mit einer Latenzzeit von vier bis sechs Stunden die ersten Symptome, wie Kurzatmigkeit, Fieber, Husten und Übelkeit auf. Im Allgemeinen bessern sich die Symptome ohne Therapie innerhalb von 36 Stunden.

Die Pathogenese und Ätiologie sind im Detail noch unbekannt, jedoch wird von einem toxischen Geschehen ausgegangen, da eine allergisch vermittelte Hypersensitivität nicht vorhanden ist.

Eine typische Auslösesituation ist das Ausmisten von Tierställen im engeren Sinne und die Arbeit mit schimmeligem Getreide.

Die Präventionsmaßnahmen ähneln denen, die zur Vermeidung der Farmerlunge (siehe Kapitel 1.2.4) angewandt werden und beinhalten hauptsächlich die Vermeidung von Auslösesituationen und Substanzen.

1.2.6 Chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung (COPD)

Durch die in der landwirtschaftlichen Arbeit vorkommende Exposition gegenüber organischen Stäuben, Gasen und Rauch, können Irritationen und Inflammationen der Atemwege entstehen. Dies kann, gerade nach langer Exposition zu einer chronischen Atemwegsobstruktion führen.

Mastrangelo und Tartari (2003) untersuchten 131 Fälle einer COPD auf das Auftreten in bestimmten Berufen. Hierbei kamen Landwirten gehäuft vor [47]. Dieses Risiko erhöht sich mit der Tätigkeitsdauer [68, 72]. In einer groß angelegten europäischen Studie von Radon (2003) wurden 7496 Landwirte nach Atemwegserkrankungen befragt, 229 Landwirte wurden später besucht und auf Atemwegserkrankungen hin untersucht. Bei Landwirten in der Tierzucht zeigte sich ein erhöhtes Risiko an chronischen Atemwegserkrankungen zu erkranken [69, 70].

2. Risikofaktoren in der Landwirtschaft

Risikofaktoren für eine Atemwegserkrankung in der Landwirtschaft sind mannigfaltig. So sind Landwirte während ihrer Tätigkeit gegenüber Endotoxinen, organischen Stäuben, Gasen und Pestiziden exponiert.

2.1 Stallgase

Neben dem mit Endotoxinen verbundenen Gesundheitsrisiko treten in Stallungen hohe Konzentrationen gesundheitsrelevanter Gase auf, welche meist aus den Fäkalien der Tiere entstehen. Hier handelt es sich um Schwefelwasserstoff (H_2S), Ammoniak (NH_3), Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Methan (CH_4). Hauptgefahrenquellen für die Gesundheit sind hierbei Ammoniak und Schwefelwasserstoff [36].

Schwefelwasserstoff ist in geringen Dosen irritativ, in hohen Dosen führt er zu Asphyxie. Da Schwefelwasserstoff leicht an dem typischen „verfaulte-Eier-Geruch“ erkannt werden kann, sind tödliche Unfälle mit diesem Gas selten. Bei Konzentrationen über 150 ppm kommt es zu einer olfaktorischen Paralyse, und der Geruch kann nicht mehr wahrgenommen werden. Ein Lungenödem

entsteht ab 250 ppm und Bewusstlosigkeit und Tod ab 500 ppm. Während des Umgrabens von Güllegruben kann es zu Konzentrationen von bis zu 1000 ppm kommen [36].

Ammoniak ist ein häufig in Tierstallungen vorkommendes Reizgas. Dieses Gas ist sehr gut wasserlöslich und häufig mit Irritation und Entzündung der Schleimhäute, Sinusitis und chronisch-obstruktiven Atemwegssymptomen verbunden. Nach längerer Exposition kann eine Toleranz entstehen, welche zu geringeren Symptomen führt, aber auch wiederum eine Verlängerung der Exposition verursachen kann. Die Deutsche Forschungsgesellschaft DFG hat einen Grenzwert für Ammoniak von 20 ppm (14 mg/m^3) festgelegt (MAK+BAT Werte Liste 2004, DFG), dieser wird jedoch nur selten in Schweineställen erreicht. Trotzdem wird vermutet, dass bereits Ammoniak-Konzentrationen über 7,5 ppm mit einer Verschlechterung des forcierten expiratorischen Volumens (FEV_1) einhergehen können [20, 96]. Zusammen mit organischem Staub kommt es zu synergistischen Effekten, die eine weitere Verschlechterung der Lungenfunktion verursachen können [18].

Gesundheitsschädlich ist Ammoniak durch seine ätzende Wirkung in Verbindung mit Feuchtigkeit. Aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit bildet NH_3 bei Kontakt mit den Schleimhäuten Ammoniumhydroxid, das infolge seiner alkalischen Wirkung verflüssigend auf Zellproteine wirkt und zu Verätzungen führen kann. Betroffen sind vor allem Augen, Schleimhäute und feuchte Stellen an der Haut. In geringer Konzentration eingeatmet, wirkt es als Reizgas und erzeugt Unruhe, Schwindel, Erbrechen und Krämpfe [36].

Kohlendioxid ist ein farbloses, geruchloses, nicht brennbares und giftiges Gas. Es entsteht bei der Verbrennung von kohlenstoffhaltigen Substanzen, wenn ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Im Stall ist CO_2 ein guter Indikator für den Belüftungszustand des Stalls.

Die Maximale Arbeitsplatz-Konzentration (MAK) von Kohlenstoffdioxid beträgt 5000 ppm. Werte unter 5000 ppm deuten auf eine noch gute Belüftung des Stalls hin [36].

Auf den menschlichen Körper führt Kohlenstoffdioxid bei geringer Konzentration zunächst zu einer Steigerung von Atmungsfrequenz, sowie Unbehagen, Unruhe und Blutdruckanstieg und verursacht ein Wärmegefühl im Hals. Schleimhautreizungen treten bei einer Konzentration von 4-5 Vol% (50000 ppm) auf. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu Ohrensausen, Atemnot, Angstzustände, Kopfschmerzen, Schweißausbruch, Herzklopfen und Ohnmachtsanfall. Ab einer Volumenkonzentration von 8-10 Vol% treten Krämpfe, Taumeln, Erbrechen, Apathie und Atemstillstand auf.

Die verschiedenen Stallgase und Endotoxinquellen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



Abbildung 1: Quellen für potentiell gesundheitsschädliche Stallgase, Stäube und Staubinhaltsstoffe in Tierställen

2.2 Pestizide

Pestizide wirken hauptsächlich auf das Zentrale Nervensystem und sind kaum verantwortlich für Atemwegserkrankungen. Allerdings gibt es hier Ausnahmen wie z.B. Paraquat (Lungenfibrose), Roundup, ein Herbizid (chemische Pneumonitis) sowie Organophosphate und Carbamate (Bronchokonstriktion) [36].

2.3 Endotoxine

Endotoxine sind Teil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und bestehen aus einem Lipopolysaccharid-Protein-Komplex (Abbildung 2). Verantwortlich für die meisten biologischen

Eigenschaften, die bakterielle Endotoxine charakterisieren, sind vor allem die Lipopolysaccharide, welche bei den gram-negativen Bakterien aus reinen Lipid-Kohlenhydrat-Molekülen, also frei von Proteinen und anderen Zellwandbestandteilen, bestehen [30, 84]. Gram-negative Bakterien, und somit auch Endotoxine, kommen ubiquitär auf Oberflächen von Pflanzen und Tieren vor und vor allem dort, wo ideale Bedingungen, d.h. genügend Wärme und Feuchtigkeit, sowie organisches Material für ihr Wachstum gegeben sind. In verschiedenen Arbeitsumfeldern kommen Endotoxine in hohen Konzentrationen vor. Die höchsten Konzentrationen konnten in der Landwirtschaft und in der industriellen Verwertung von organischem Material gemessen werden [14].

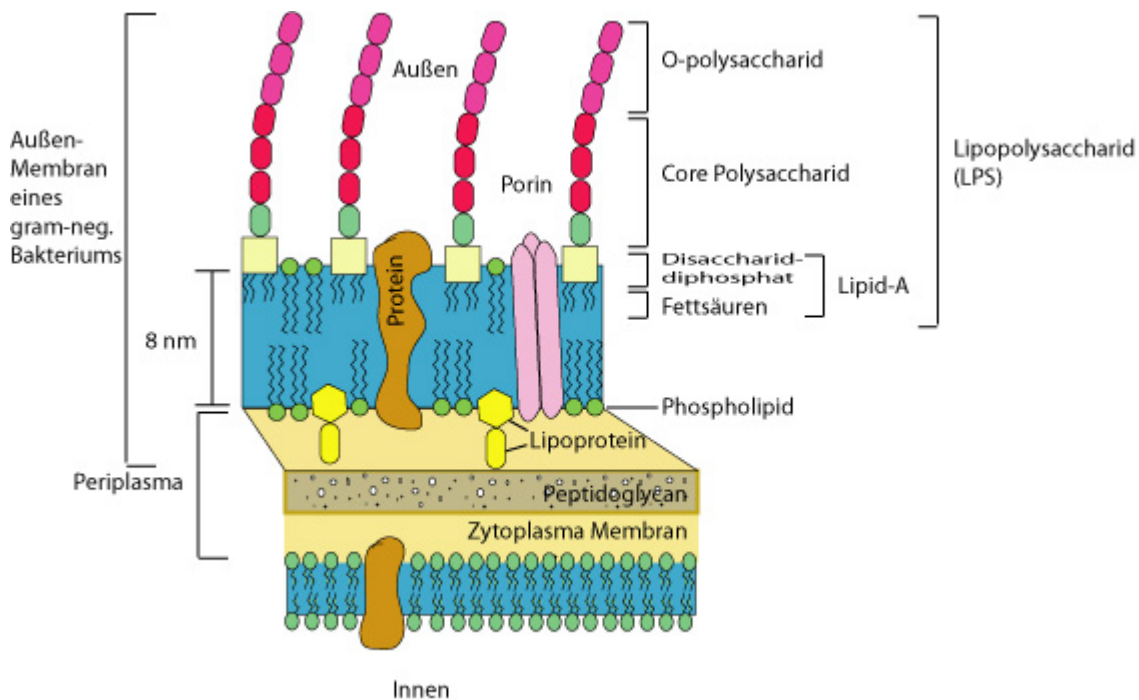


Abbildung 2: Zellwand eines gram-negativen Bakteriums und struktureller Aufbau des Lipopolysaccharids [13]

2.3.1 Partikel-induzierte adverse Reaktionen

Bislang findet sich in der Literatur sehr wenig über die Aufnahme und die Verteilung von Endotoxinen im Organismus nach Inhalation. Mit Partikeln verbundene Endotoxine, die in die oberen Atemwege gelangen, werden über den mukoziliären Transport entfernt. Endotoxine, die tiefer in das Atemwegssystem eindringen, werden vermutlich über Phagozytose von Makrophagen und mononuklearen Leukozyten eliminiert [77]

Akute Auswirkungen nach Exposition sind trockener Husten und Atemnot. Wenige Stunden nach Exposition können Fieber, Unwohlsein und manchmal Dyspnoe, Kopf- und Gelenkschmerzen auftreten [50].

Simpson und Niven (1998) konnte einen engen Zusammenhang zwischen individueller Endotoxinbelastung und dem Auftreten von Atemwegssymptomen zeigen [83].

Epidemiologische und tierexperimentelle Untersuchungen lassen darauf schließen, dass eine ständige Endotoxinexposition zu chronischer Bronchitis und eingeschränkter Lungenfunktion führen kann [35].

Sowohl akute wie auch chronische Effekte werden wahrscheinlich durch inflammatorische Reaktionen in den Lungen induziert, bei denen die alveolaren Makrophagen eine Schlüsselrolle spielen.

Eine chronische inhalative Aufnahme von Endotoxin kann eine unspezifische Immunreaktion auf Antigene im Menschen verstärken (Adjuvans-Effekt). Außerdem sind die durch Endotoxin ausgelösten Entzündungsreaktionen dosisabhängig [14, 50].

Die möglichen Wirkungen von Endotoxin auf den menschlichen Körper sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Wirkungsart	Beschreibung	Beginn (nach Exposition)	Dauer
Allgemeinsymptome	Kopfweg, Müdigkeit, Muskel und Gelenkschmerzen, Schleimhautreizungen, trockener Husten, Engegefühl in der Brust, Fieber, Tachykardie	ca. 6 Stunden	etwa 4-8 Stunden
Lungenfunktion	Moderate FEV ₁ -Abnahme Bronchiale Reaktivität nimmt zu	ca. 30 Minuten	etwa 5 Stunden
Entzündungsmarker	Makrophagen in BAL Zytokine in BAL und NAL	ca. 6 Stunden	etwa 24 Stunden

Tabelle 1: Wirkungen von Endotoxinen auf den menschlichen Körper [14]

Grenzwerte

Für viele potentielle Schadstoffe, wie Endotoxine und Mykotoxine, aber auch für zahlreiche Allergene existieren keine wissenschaftlich fundierten Grenzwerte [30, 101]. Das Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS) empfiehlt einen gesundheitlich-basierten Expositionsgrenzwert für Endotoxin in der Luft von 50 EU/m³, der auf einer personenbezogenen Exposition gegenüber eingeatmetem Staub basiert, gemessen als zeitgewichteter Durchschnittswert über acht Stunden.

Durch die Kombination verschiedener Schadstoffe im Stall können synergistische Effekte entstehen und daher adverse Reaktionen schon bei geringeren Konzentrationen ausgelöst werden. Darüber hinaus fehlen Präventionskonzepte, die vom Landwirt im Stall einfach durchzuführen und kostengünstig sind. So scheitern neu entwickelte Präventionen häufig daran, dass diese für den Landwirt einen zu hohen Arbeitsaufwand bedeuten oder diese bei der Verrichtung der täglichen Arbeit hinderlich sind und zu Zeitverlust führen.

3. Zytokine

Der Begriff Zytokine bezeichnet eine Gruppe von löslichen Proteinen und Peptiden, welche als humorale Regulatoren im nano- und picomolaren Konzentrationsbereich fungieren und zudem, unter pathologischen wie normalen Bedingungen, Funktionen und Aktivitäten einzelner Zellen und Gewebe modulieren. Außerdem sind sie Mediatoren zwischen Zellen und regulieren Prozesse im extrazellulären Raum.

Interleukine gehören zu der Gruppe der Zytokine und werden von bestimmten Leukozyten, welche die Kommunikation zwischen den Zellen regeln, ausgeschüttet. Sie sind beteiligt an der Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und der Zell-Zell-Kommunikation [7, 17].

3.1 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, welches maßgeblich an der Regulation der Immunantwort, der Akut-Phase-Reaktion und an der Haematopoese beteiligt ist (Abbildung 3).

Dieses Interleukin wird hauptsächlich von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert, aber auch viele andere Zellen produzieren IL-6. Der physiologische Stimulus für die Synthese von IL-6 sind IL-1, bakterielles Endotoxin, TNF, PDGF und Oncostatin M, jedoch haben die verschiedenen produzierenden Zellen auch unterschiedliche Stimuli [2, 7, 17].

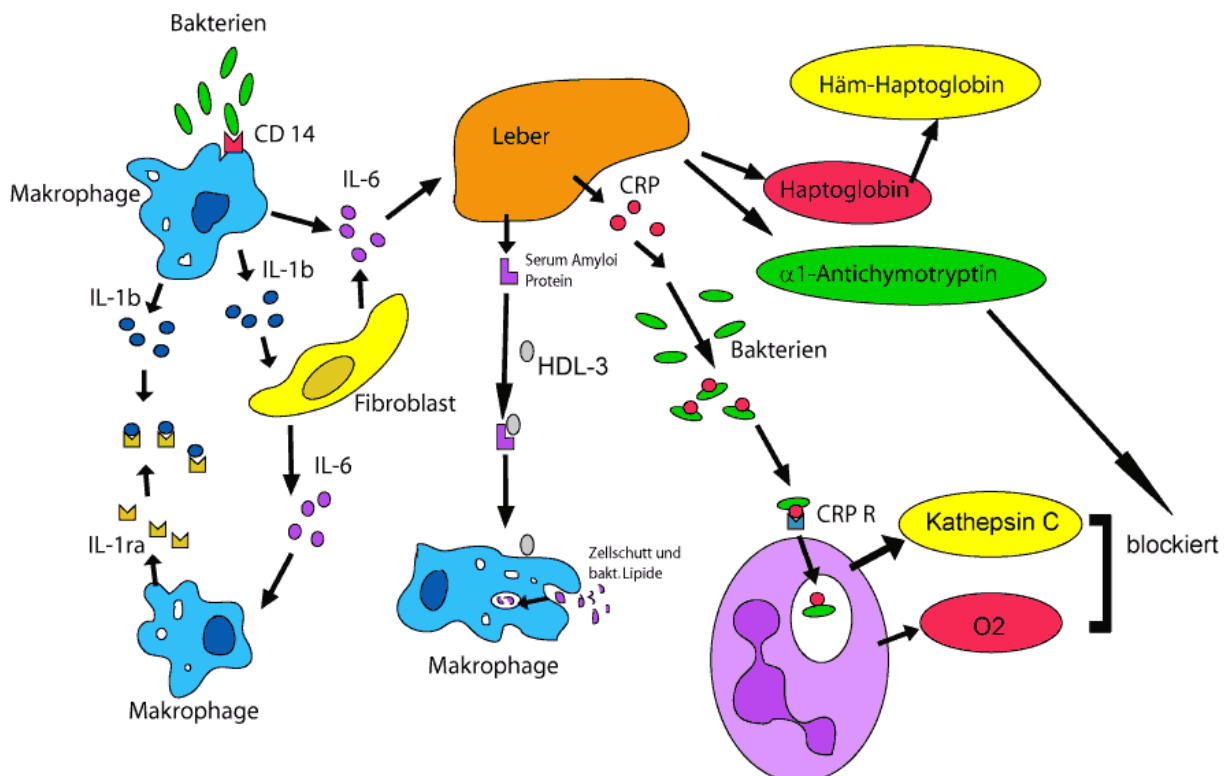


Abbildung 3: IL-6 und IL-1b Interaktion [7]

3.2 Tumornekrosefaktor α (TNF- α)

TNF- α wird von Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen gebildet, nachdem diese durch bakterielle Lipopolysaccharide stimuliert werden. CD4-Zellen sezernieren TNF- α , während CD8-Zellen kaum oder kein TNF- α sezernieren. Außerdem wird TNF- α noch von weiteren Zellen, wie Astrozyten, Mikroglia und Fibroblasten gebildet [7].

Die Synthese wird durch viele verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel Interferone, IL-2, GM-CSF, Substanz P, Bradykinin, Immunkomplexe, Cyclooxygenase-Inhibitor, sowie Plättchenfaktor initiiert und wird inhibiert durch IL-6, TGF- β , Vitamin D3, Prostaglandin E2, Dexamethason, Cyclosporin A, und Antagonisten von plättchenaktivierenden Faktor.

Bei in vitro Versuchen mit Tumorgewebe führt TNF- α zu Zytolyse und Zytostase des Tumorgewebes (daher der Name: Tumor-Nekrose-Faktor).

In vivo hat TNF- α ein weites Spektrum an biologischer Aktivität. So vermittelt es zusammen mit IL-1 Endothelalterationen. Es hemmt antikoagulative Mechanismen, und fördert thrombotische Prozesse. Es ist ein potenter chemotaktischer Reiz für neutrophile Granulozyten und induziert die Synthese von anderen chemoattraktiven Zytokinen, wie Interferon-inducible-protein-10 (IP-10) oder small inducible cytokine A2 (JE). Es fördert die Angiogenese und ist ein Wachstumsfaktor für Fibroblasten, in welchen es die Synthese von Kollagenasen und Prostaglandin E2 fördert. In ruhenden Makrophagen induziert TNF- α die Synthese von IL-1 und Prostaglandin E2, außerdem wirkt es stimulierend auf die Phagozytose und die Synthese von Superoxid-Dismutase.

In Leukozyten und Lymphozyten Vorläufer Zellen stimuliert TNF- α die Klasse I und Klasse II HLA Expression, die Produktion von IL-1, CSF, IFN- γ , und den Arachidonsäure-Metabolismus.

Zudem wird TNF- α für die normale Immunität des Organismus benötigt und nimmt Teil an der zellulären Abwehr gegen obligat und fakultativ pathologische Bakterien und Parasiten. Eine zu hohe Konzentration an TNF- α ist verantwortlich für eine Reihe von Symptomen. So ist es der Hauptmediator der bei Tumorpatienten beobachteten Kachexie (daher auch der alternative Name: Kachektin) [6, 17, 27].

3.3 Epitheliales Neutrophilen-aktivierendes Protein 78 (ENA-78)

Das ENA-78 wird von verschiedenen Epithelzelllinien produziert und gehört zur Klasse der CXC-Chemokine (Einteilung der Chemokine in CXC, CC, C und CX3C, wobei „C“ für ein Cystein in der

codierenden Gensequenz und „X“ für eine andere nicht-konservierte Aminosäure steht). Im Tierversuch konnte an bovinen Monozyten und Alveolarmakrophagen die Produktion von bovines ENA-78 nach Endotoxin-Stimulation nachgewiesen werden. Es aktiviert neutrophile Granulozyten und wirkt stark chemotaktisch [3, 97].

3.4 Zeitlicher Ablauf der Zytokinausschüttung

Neben einer zirkadianen Rhythmik der Zytokinausschüttung, bei der es zu einer spontanen Peak-Ausschüttung von Interleukin-6 und TNF- α um 12.00 Uhr kommt [106], muss auch der zeitliche Ablauf der Ausschüttung nach Exposition beachtet werden. So untersuchte Wohlford-Lenane (1999) an Mäusen den zeitlichen Verlauf der Zytokinausschüttung nach Exposition mit Getreidestaub und mit Endotoxin in der broncho-alveolären Lavage. TNF- α erreichte das Maximum 4 Stunden nach Exposition mit Endotoxin und blieb 48 Stunden signifikant erhöht [102].

Wang (1996) untersuchte den zeitlichen Verlauf von IL-6 und TNF- α nach Inhalation von Stäuben aus Schweinställen. Für TNF- α konnte ein maximaler Anstieg 3-5 Stunden nach Exposition gemessen werden; IL-6 erreichte das Maximum zwischen 1-5 Stunden, nachdem TNF- α sein Maximum erreicht hatte [100].

Leukozyten waren 6 Stunden nach Exposition auf ihrem Maximalwert und erreichten ihren Ausgangswert nach 24 Stunden [49]. CRP stieg langsamer an und erreichte das Maximum 24 bis 48 Stunden nach Exposition.

Die T-Zellaktivierung wurde in einem in-vitro-Versuch anhand von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche untersucht, wobei für CD69 und CD25 nach 24 Stunden die maximale Expression gemessen werden konnte [55].

Ein weiterer Versuch zeigte einen Anstieg von IL-6 und IL-8 drei Stunden nach Exposition und für TNF- α , IL-1 β und neutrophile Granulozyten nach 6 Stunden in der Nasallavage von Müllverarbeitern. Nach 6-11 Stunden begannen alle Zytokine außer IL-1 β wieder zu sinken. Auch im Blutserum konnte ein Anstieg von TNF- α und IL-1 β festgestellt werden [82].

3.5 Pathomechanismus der Endotoxin-induzierten Entzündungsreaktion

Nach Inhalation von Endotoxin und der Deposition von Endotoxin in den Atemwegen wird der Lipid A Teil des Endotoxins von dem Lipopolysaccharid bindenden Protein (LBP), welches möglicherweise von Typ II Epithelzellen der Atemwege und über Exsudation aus dem Gefäßsystem gebildet wird,

opsoniert. LBP ist ein Teil der körpereigenen Abwehr gegenüber Antigenen von außen und soll das Antigen zu Makrophagen oder Epithelzellen weitertransportieren. LBP bindet sich an das Makrophagenoberflächenmolekül CD14 und wird dann mit Hilfe eines weiteren Rezeptors (toll-like-receptor TLR4) internalisiert. Daraufhin initiiert dann NF- κ B die Produktion einer Reihe von Zytokinen, vor allem IL-1 β , TNF- α und IL-6.

Nach einigen Stunden steigt die Zahl der polymorphkernigen Zellen an, als Folge der vorausgegangenen Sekretion der chemotaktischen Zytokine und der Mobilisation der neutrophilen Granulozyten. E-Selektin nimmt als Zeichen der Endothelzellaktivierung zu, und das C-reaktive Protein erhöht sich 24 h nach Inhalation, was auf die Aktivierung von Leberzellen durch IL-6, IL-1 und TNF- α zurückzuführen ist.

Die entzündlichen Zytokine und neutrophile Granulozyten sind im Allgemeinen 2-6 Stunden nach Exposition erhöht, während andere Entzündungszellen wie Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten nach 24 Stunden ansteigen, zu einer Zeit, wenn die Zytokine wieder ihre normale Konzentration erreicht haben.

Die Symptome, die durch Zytokinausschüttung und Immunzellaktivierung ausgelöst werden können, sind Müdigkeit, Gelenkschmerzen, Fieber und Schüttelfrost. Eine schematische Darstellung des Pathomechanismus ist in Abbildung 4 dargestellt [77].

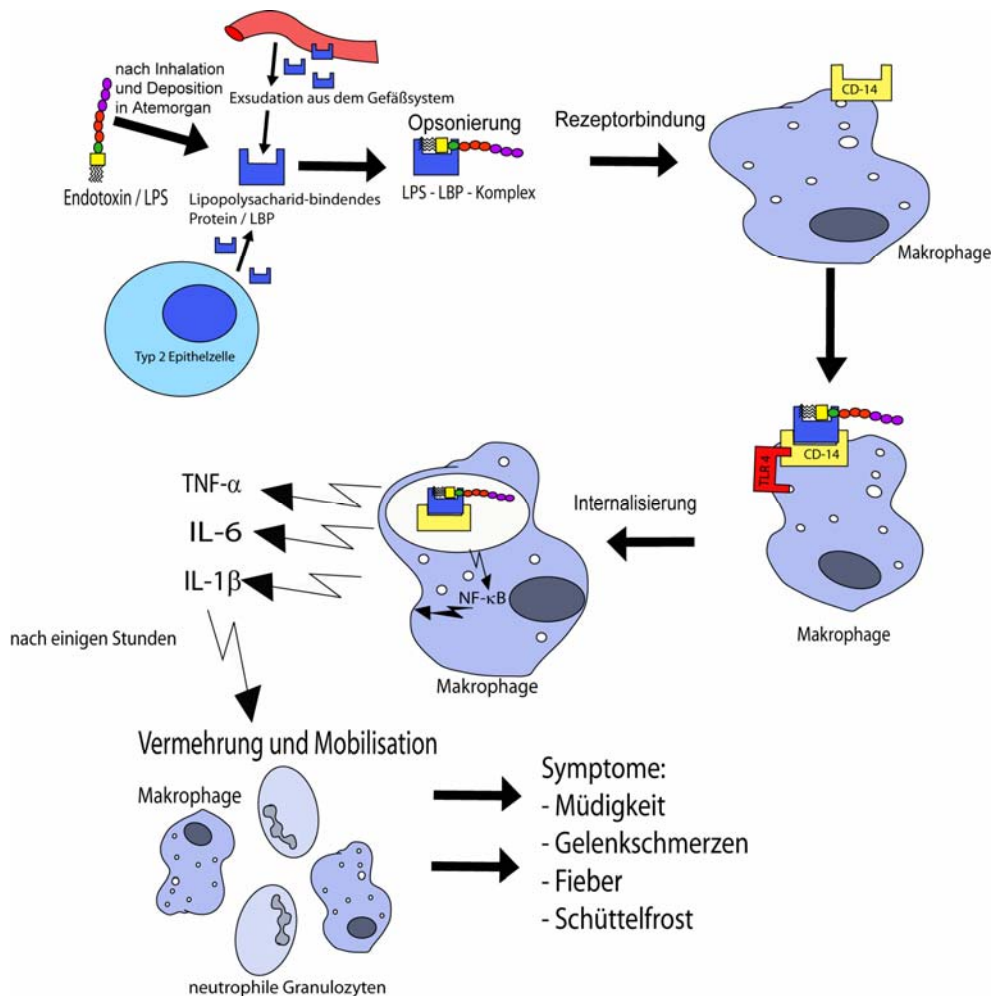


Abbildung 4: Pathomechanismus der Entzündungsreaktion nach Endotoxin-Inhalation [77]

3.6 Zytokine in der Nasallavage

Viele Studien zeigen, dass nach einer Exposition gegenüber Endotoxin die Konzentrationen von Zytokinen in den oberen Atemwegen ansteigen. So stellten Danuser et al. einen Dosis-abhängigen Anstieg von IL-6 in der Nasenschleimhaut nach Instillieren von reinem LPS in die Nase dar [15].

Eine weitere Studie verglich eine Kontrollgruppe mit Kompostarbeitern und konnte eine signifikant erhöhte IL-8 Konzentration in der Nasenschleimhaut gegenüber der Kontrollgruppe messen [22]. In einer anderen Studie an Müllverarbeitern, die über eine Arbeitswoche untersucht wurden, war die IL-8 Konzentration in der Nasallavage ebenfalls am Ende der Arbeitswoche deutlich erhöht [31]. Cormier stellte einen Anstieg der IL-8 Konzentration bei gesunden Probanden, die in einem Schweinestall exponiert wurden, fest [11].

Bei 5 symptomatischen Müllarbeitern, denen LPS in die Nase geträufelt wurde, zeigte sich in der Nasallavage ein Anstieg von IL-6, IL-8, IL-1β und TNF-α [82]. IL-6 und IL-8 Konzentrationen stiegen

auch bei gesunden Probanden, die während des Wiegens von Schweinen im Schweinestall exponiert wurden, an [41].

Man kann daher annehmen, dass nach Exposition gegenüber organischem Stäuben und Endotoxin ein Anstieg der Zytokine in den oberen Atemwegen folgt.

3.7 Zytokine im Serum

Auch im Serum kann nach Exposition mit Endotoxin ein Anstieg der Entzündungsmediatoren gemessen werden.

So wurde in einer Studie der Effekt von Flachsstaub auf Landwirte untersucht und zeigte einen Anstieg der Interleukine IL-1 α und IL-6 im Serum [85]. Eine weitere Studie an 8 gesunden Probanden, welche für 4 Stunden einmal pro Woche in verschiedenen Schweineställen exponiert wurden, zeigte einen Anstieg von IL-6 im Serum [11]. IL-6 war im Serum von Probanden, die ohne Schutzmaske im Schweinestall während des Wiegens von Schweinen anwesend waren, im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe mit Maske deutlich erhöht [41].

In einer Untersuchung von fünf symptomatischen Müllarbeitern konnte ein Anstieg von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 nach Instillieren von LPS gezeigt werden [82].

Zusammenfassend zeigt sich somit, dass eine Exposition gegenüber Endotoxin zu einem Anstieg von Zytokinen im Blutserum führt.

C. Zielsetzung

Das Ziel unserer Studie bestand darin, bei Landwirten und einem Kontrollkollektiv lokale und systemisch ausgelöste Entzündungsreaktionen der oberen Atemwege nach Exposition gegenüber organischen Stäuben im Arbeitsumfeld des Landwirtes nachzuweisen und diese mit dem Kontrollkollektiv zu vergleichen.

Wir untersuchten zu diesem Zweck die Landwirte an einem Kontrolltag ohne berufliche Exposition und an einem Expositionstag während der Arbeit im Stall, um relevante intraindividuelle Unterschiede ausarbeiten zu können.

Zur Charakterisierung und Erfassung der Immunantwort wurden im Einzelnen erfasst:

- Lungenfunktion
- Differentialblutbild
- Interleukin-6, TNF- α , ENA-78 in Nasallavage und im Blut mittels ELISA Verfahren
- Zellzahl und Zelldifferenzierung in der Nasenschleimhaut über Nasallavage
- Umweltfaktoren (Temperatur, CO₂, NH₃, Luftfeuchtigkeit und Windgeschwindigkeit)
- Endotoxinkonzentration im Stall über Personalsampler

Ziele und Fragestellungen der Studie:

- Welche Auswirkung hat eine berufliche Belastung des Landwirts gegenüber organischen Stäuben, insbesondere Endotoxin, auf den menschlichen Organismus?
- Prüfung der Frage, ob eine Änderung der systemischen (Serum) sowie lokalen (Nasallavage) Entzündungszeichen ein sensitiverer Beanspruchungsparameter ist als die Lungenfunktionsprüfung
- Etablierung der Nasallavage als nicht-invasive Untersuchungsmethode zur Darstellung von Entzündungsreaktionen der oberen Atemwege im Feldversuch

D. Material und Methoden

1. Kollektiv

1.1 Landwirte

Das Untersuchungskollektiv wurde unter Mithilfe der Landwirtschaftlichen Berufsgenossenschaft Schwaben rekrutiert. Die Landwirte waren zum Zeitpunkt der Erhebung im Raum Mering, Schwabmünchen und Bobingen bei Augsburg wohnhaft.

Tägliche Verrichtung der Stallarbeit und ein Mindestalter von 18 Jahren zählten zu den Einschlusskriterien. Außerdem sollten die Probanden möglichst an keiner chronischen Atemwegserkrankung leiden sowie Nicht-Raucher sein.

Insgesamt wurden 25 Personen untersucht, wovon 4 Personen aus persönlichen Gründen nach der Voruntersuchung die Studie abbrachen.

Somit ergab sich ein Kollektiv von 21 Landwirten (14 Männer, 7 Frauen) im Alter von 19 – 61 Jahren (arithmetisches Mittel 42 Jahre), darunter 4 Raucher.

Die Landwirte waren durchschnittlich seit 26 Jahren (Spannweite 5 - 40 Jahre) in der Landwirtschaft tätig und arbeiteten im Mittel 21 Stunden pro Woche (Spannweite 3 h – 40 h) in der Landwirtschaft.

1.2 Nichtexponierte Kontrollen

Das Kollektiv der Kontrollgruppe setzte sich aus freiwillig teilnehmenden Personen mit Bürotätigkeit zusammen, die durch Aushänge an der Ludwig-Maximilians-Universität gewonnen wurden und die auch in ihrer Freizeit keiner landwirtschaftlichen Tätigkeit nachgingen.

Bei der Auswahl der Probanden wurde darauf geachtet, dass Geschlecht, Alter und Rauchgewohnheiten vergleichbar mit der Gruppe der Landwirte waren.

Insgesamt nahmen 24 nicht-exponierte Kontrollen (18 Männer, 6 Frauen) im Alter von 21 bis 60 Jahren (arithmetisches Mittel 41,3 Jahre) teil, davon 9 Raucher und 10 Nichtraucher. Fünf Probanden machten keine Angaben zu ihrem Rauchverhalten. Tabelle 2 stellt beide Kollektive gegenüber.

	Landwirte n=21	Büroangestellte n=24
Alter	41,6 ± 12,8	41,3 ± 10,9
Geschlecht (männlich:weiblich)	14 : 7	18 : 6
Raucher (ja : nein)	4 : 17	9 : 10
FEV ₁ %Soll	112,2 ± 16,3	107,8 ± 15,3

Tabelle 2: Überblick über das Probandenkollektiv (Mittelwerte ± Standardabweichungen)

2. Untersuchungsablauf

2.1 Landwirte

Übersicht:

Die Untersuchung der Landwirte wurde jeweils an zwei Tagen durchgeführt. Der Abstand zwischen den beiden Untersuchungstagen (U-Tag) betrug mindestens 48 h.

Untersuchungstag 1 (Voruntersuchung auf dem Hof):

Am Kontrolltag wurden vor Arbeitsbeginn des Landwirts ein Kurzfragebogen zum aktuellen Befinden ausgefüllt und eine Blutabnahme, eine Lungenfunktion sowie eine Nasallavage auf dem Hof durchgeführt.

Untersuchungstag 2 (Exposition im Stall):

Am Expositionstag fanden vor Arbeitsaufnahme eine Blutabnahme und eine Lungenfunktionsuntersuchung statt. Mittels Kurzfragebogen wurde das aktuelle Befinden erfasst. Danach wurde dem Landwirt ein Personal Sampler (Modell: ALPHA-1, Firma AMETEK Mansfield & Green Division) zur Endotoxinprobenahme angelegt und gemeinsam mit dem Untersucher der Stall betreten. Der Ansaugkopf wurde oberhalb der linken Brust fixiert und das Gerät nach Eichung des Luftdurchflusses auf 2 l/min eingeschaltet. Während der Landwirt seiner normalen Tätigkeit nachging, wurden Raumluftmessungen zu Umweltfaktoren im Stall vollzogen. Es wurden Messungen zur Kohlendioxid- und Ammoniakbelastung, sowie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Windgeschwindigkeit im Stall vollzogen.

Unmittelbar im Anschluss an die Stallarbeit erfolgte nochmals eine Lungenfunktionsuntersuchung, und der Kurzfragebogen zum aktuellen Befinden wurde auf eventuelle Veränderungen während der Stallarbeit mit dem Probanden durchgegangen. Nach 3 Stunden folgten eine weitere Blutabnahme und eine Nasallavage. Eine Übersicht über den Untersuchungsablauf gibt Tabelle 3 wieder.

U-Tag 1 Kontrolltag	U-Tag 2 Expositionstag VOR Stallarbeit	U-Tag 2 Expositionstag WÄHREND Stallarbeit	U-Tag 2 Expositionstag NACH Stallarbeit	U-Tag 2 Expositionstag 3h NACH Stallarbeit
Zwischen 5.00 Uhr – 8.00 Uhr	Zwischen 5.00 Uhr – 8.00 Uhr	Direkt nach Voruntersuchung	Direkt nach der Stallarbeit	3h nach Beendigung der Stallarbeit
- Kurzfragebogen - Blutabnahme - Lungenfunktion - Rhinomanometrie - Nasallavage	- Kurzfragebogen - Blutabnahme - Lungenfunktion - Rhinomanometrie	- Endotoxinmessung - Kohlendioxidmessung - Ammoniakmessung - Temperatur - Luftfeuchtigkeit - Luftgeschwindigkeit	- Kurzfragebogen - Lungenfunktion - Rhinomanometrie	- Blutabnahme - Nasallavage

Tabelle 2: Untersuchungsablauf in der Gruppe der Landwirte

2.2 Büroangestellte

Die Untersuchung der Büroangestellten wurde ebenfalls an zwei Tagen durchgeführt. Der Abstand zwischen den beiden Untersuchungstagen (U-Tag) betrug gleichfalls mindestens 48h.

Untersuchungstag 1 (Kontrolltag):

Am Kontrolltag wurden vormittags ein Kurzfragebogen zum aktuellen Befinden ausgefüllt und eine Blutabnahme, eine Lungenfunktionsuntersuchung sowie eine Nasallavage im Labor des Instituts und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin durchgeführt.

Untersuchungstag 2 (Exposition bzw. Fahrradergometrie):

Am Expositionstag wurden vor Durchführung einer Fahrradergometrie eine Blutabnahme und eine Lungenfunktion mit Rhinomanometrie durchgeführt und mittels Kurzfragebogen das aktuelle Befinden erfasst. Danach wurde die Untersuchung am Fahrradergometer kurz erläutert, ein EKG und eine Blutdruckmanschette angelegt und der Proband für 20 min mit 1 Watt Belastung pro kg Körpergewicht belastet.

Unmittelbar im Anschluss daran erfolgte nochmals eine Lungenfunktion nach Protokoll, und der Kurzfragebogen zum aktuellen Befinden wurde auf eventuelle Veränderungen mit dem Probanden überprüft.

Nach 3 Stunden – in Anlehnung an das Untersuchungsprotokoll bei den Landwirten und zur Wahrung der zirkadianen Rhythmik - wurden eine Blutabnahme und eine Nasallavage durchgeführt.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über den Untersuchungsablauf im Kollektiv der Büroangestellten wieder.

U-Tag 1 Kontrolltag	U-Tag 2 Expositionstag VOR Fahrradergometrie	U-Tag 2 Expositionstag WÄHREND Fahrradergometrie	U-Tag 2 Expositionstag NACH Fahrradergometrie	U-Tag 2 Expositionstag 3h NACH Fahrradergometrie
8.00 Uhr	8.00 Uhr		8.30 Uhr	11.30 Uhr
- Kurzfragebogen - Blutabnahme - Lungenfunktion - Rhinomanometrie - Nasallavage	- Kurzfragebogen - Blutabnahme - Lungenfunktion - Rhinomanometrie	- EKG - Blutdruck - Fahrradergometrie	- Kurzfragebogen - Lungenfunktion - Rhinomanometrie	- Blutabnahme - Nasallavage

Tabelle 3: Ablauf der Untersuchungen für die Gruppe der Büroangestellten

Die gesamte Feldarbeit wurde vom Autor dieser Arbeit mit Unterstützung durch Mitarbeiter des Instituts und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin durchgeführt.

3. Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt.

4. Fragebogen

Es wurden zwei standardisierte Fragebögen (siehe Anhang 1.1) eingesetzt: ein Kurzfragebogen, der das aktuelle Befinden der Probanden erfasste und ein ausführlicher Fragebogen, der die Prävalenz von Atemwegserkrankungen, Allergien, Rauchverhalten und Arbeitsumfeld ermittelte. Die Kurzfragebögen wurden jeweils am Tag der Untersuchungen im Interview erhoben. Der umfassende Fragebogen wurde den Probanden bei der Voruntersuchung überreicht und am Tag der Expositionsuntersuchung ausgefüllt wieder entgegengenommen. Eventuelle Unklarheiten konnten dann besprochen werden. Die Fragebögen wurden bereits im Vorfeld erfolgreich für landwirtschaftliche Feldstudien verwendet [72].

Asthma wurde bei den Probanden angenommen, die mindestens einen Asthmaanfall in den letzten zwölf Monaten berichteten und zusätzlich durch Kurzatmigkeit in den letzten zwölf Monaten aufgewacht waren oder gegenwärtig Asthmamedikamente einnahmen.

Asthmasymptome wurden bei Probanden angenommen, die ein pfeifendes oder brummendes Geräusch im Brustkorb in den letzten zwölf Monaten angaben und zusätzlich ein Pfeifen oder Brummen im Brustkorb ohne Erkältung wahrgenommen hatten, mit einem Engegefühl in der Brust in den letzten zwölf Monaten aufgewacht waren oder über einen Anfall von Kurzatmigkeit tagsüber in Ruhe in den letzten zwölf Monaten berichteten.

Chronische Bronchitis wurde über die Symptome Husten mit Auswurf im Winter während des Tages oder in der Nacht für mindestens drei Monate im Jahr definiert.

Allergien wurden angenommen, wenn mindestens eine der Fragen zu Heuschnupfen, Lebensmittelallergie bzw. anderen Allergien bejaht wurde.

5. Umweltfaktoren:

5.1 Endotoxine

Um eine möglichst personenspezifische Belastung der Landwirte gegenüber Endotoxin zu erhalten, wurde den Landwirten am Expositionstag ein personenbezogenes Probennahmegerät (Personalsampler) für Feinstaub (FFP) mit einem Ansaugkopf umgehängt und dessen Funktion kurz erläutert. Der Ansaugkopf wurde oberhalb der linken Brust fixiert und das Gerät nach Einstellung des Luftdurchflusses auf 2 l/min eingeschaltet. Für die Dauer der Stallarbeit strömte so kontinuierlich Luft auf den Glasfaserfilter. Nach Beendigung wurde das Gerät abgenommen, ausgeschaltet und die Dauer der Messung notiert.

Die Analyse der Filter wurde im Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin durchgeführt. Die Glasfaserfilter wurden in ein Quarzglas gegeben und die Endotoxine mit endotoxin-freiem Wasser (7 ml) unter Schütteln (1,5 h) extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte für 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach entsprechender Verdünnung (je nach erwarteter Konzentration 1:1, 1:10, 1:100) und Auftrag auf eine Mikrotiterplatte erfolgte die Bestimmung mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test. Dieser wurde von Levin und Bang 1964 entwickelt und verwendet die biochemische Eigenschaft der Blutkörperchen von Limulus-Amoebocyten (Abbildung 5), einer Flusskrebssart, dessen Blutkörperchen nach Kontakt mit Endotoxin koagulieren [42].

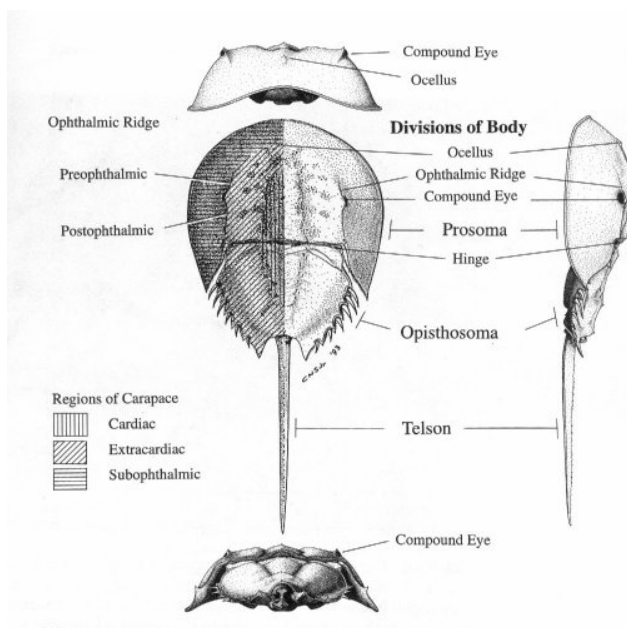


Abbildung 5: Limulus-Amoebocyt, dessen Blutkörperchen nach Kontakt mit Endotoxin koagulieren, wird zur Analyse von Endotoxin verwendet
(Quelle: <http://www.acs.appstate.edu/~kms/classes/psy3203/Brightness/limulus2.jpg>)

Es wurde ein kinetischer Farbstest (Endochrome, Charles River) verwendet. Quantifiziert wurde mit einer jeweils frisch erstellten Eichkurve (50 / 5 / 0,5 / 0,05 / 0,005 EU/ml). Das Ergebnis wurde auf den gesamten Filter bezogen (EU/Filter). Aus diesen Daten wurde bei bekanntem Luftdurchsatz (m^3) die Endotoxinkonzentration in der Stallluft (EU/m^3) berechnet. Zur Qualitätssicherung wurde jeder Probe ein Standard zugesetzt, der zwischen 50% und 200% betragen musste. Lagen Proben außerhalb dieses Bereiches, wurde weiter verdünnt. Zusätzlich wurde bei jeder Serie ein laborinterner Kontrollstandard mitgeführt.

5.2 Kohlendioxid

Die Kohlendioxidkonzentrationen im Stall wurden mit einem portablen Kohlendioxid-Messgerät (Hersteller: Fischer-Rosemount; Typ: Binos 100 2 M; Messbereich: CO₂: 0-5000 ppm, Hanau) ortsfest gemessen, wobei das Gerät für einige Minuten auf einer Höhe von 1,60 m in der Mitte des Stalls gehalten wurde, um einen exemplarischen Wert für die Belastung des Landwirts zu erhalten.

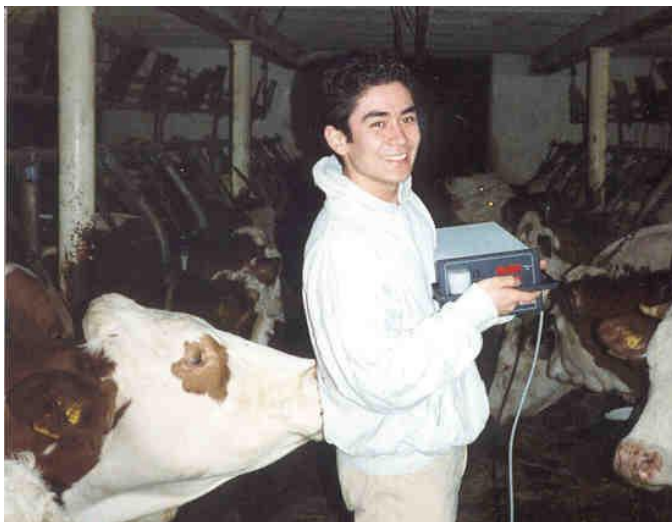


Abbildung 6 : Messung der CO₂-Konzentration im Stall

5.3 Ammoniak

Um die Belastung des Arbeitsplatzes mit Ammoniak zu ermitteln, wurden pro Stall jeweils 2 Batteriebetriebene Luftsammler (Eigenbau Dipl.-Chem. Römmelt, Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der LMU, siehe Abbildung 7) für einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten mit einem Durchfluss von 2 l/min an zwei unterschiedlichen Orten auf verschiedenen Höhen aufgestellt. Das Gerät führte gleichmäßig einen Luftstrom auf einen mit 10-20 % Citratlösung belegten Glasfaserfilter

(Gelman Science, Ann Arbor, MI, USA, Type A/E Glass Fibre Filter, 50 mm, PN 61632), welcher dann im Labor Röttgelt im Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin ausgewertet wurde. Ammoniak wurde hierbei während der Exposition quantitativ als Ammoniumcitrat abgeschieden. Im Labor wurde das Ammoniak mit destilliertem Wasser aus dem Ammoniumcitrat ausgelöst. Mit Hilfe der Berhelot-Reaktion (Merckotest – Harnstoff), einer Farbreaktion des Ammoniums mit Phenolreagens und Hypochloritreagens, wurde eine quantitative Bestimmung photometrisch bei 620 nm durchgeführt.

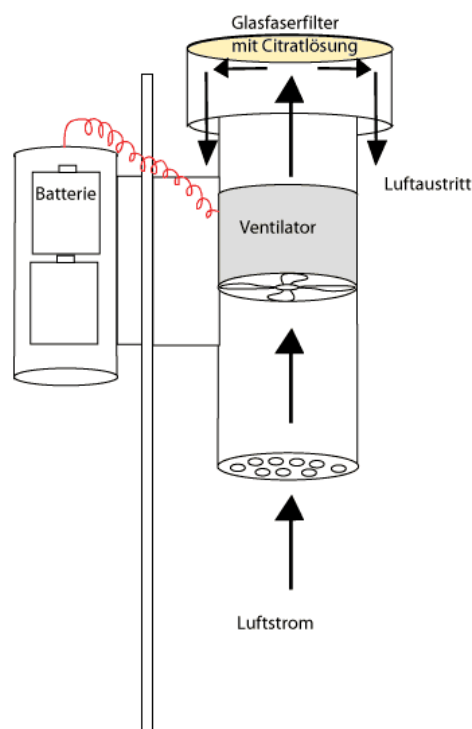


Abbildung 7: Schematische Zeichnung des benutzten Ammoniakmessgeräts

5.4 Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit

Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit wurden mit einem portablen Messgerät der Firma Thies Klima, Göttingen, Deutschland (Best.Nr. 1.0465.00.000) im Stall ortsfest gemessen.

6. Spirometrie

Die Lungenfunktionsprüfung fand mit einem portablen Spirometer (Masterscope PC, Fa. Jaeger, Würzburg) in Aufenthaltsräumen (Kollektiv Landwirt), z.B. der Küche der Landwirte, nach Kalibrierung des Spirometers und Eingabe der Umgebungsparameter in aufrechter, sitzender Position nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Arbeits- und Umweltmedizin (DGAUM e. V.) statt. Das

Kontrollkollektiv wurde im Labor des Instituts und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der LMU untersucht.

Zuerst wurde der zentrale Atemwegswiderstand (Verschlussdruckmethode, Rocc) bestimmt. Es wurden mindestens vier Werte aufgezeichnet. Danach wurden pro Proband entsprechend den Richtlinien der American Thoracic Society mindestens drei Fluss-Volumen-Kurven bestimmt.

Es wurden jeweils die besten Werte für die inspiratorische Vitalkapazität (VC_{in}), die Einsekundenkapazität (FEV_1), sowie den maximalen expiratorischen Fluss ausgewählt und in der weiteren Auswertung verwendet.

Zuletzt wurde der Nasenfluss mittels der Rhinomanometrie-Einheit zum Lungenfunktionsgerät (Masterscope PC, Fa. Jaeger, Würzburg) für jedes Nasenloch bestimmt. Der Nasenfluss wurde bei einem Druck von 150 kPa für jede Seite notiert.

Der mittlere expiratorische Fluss bei 50% der Ausatmung (MEF 50%) wurde aus der Kurve mit der höchsten Summe aus FVC und FEV_1 verwendet. Zusätzlich wurde der Mittelwert aus allen Atemwegswiderständen (Rocc) herangezogen.

Die Sollwertberechnung der spirometrischen Parameter richtete sich nach dem von Quanjer et al. (1993) veröffentlichten Formeln. Die Körpergröße sowie das Körpergewicht der Probanden wurden zur Berechnung der Sollwerte am Tag der Voruntersuchung erfasst.

7. Laboruntersuchung

Ein allgemeines Routinelabor sowie die Untersuchung spezifischer Zytokine wurden für alle Probanden am Kontrolltag sowie am Expositionstag unmittelbar vor und 3h nach Exposition veranlasst. Darüber hinaus wurden spezifische IgE-Antikörper als Marker einer Atopie am Kontrolltag untersucht.

7.1 Hämatologische Untersuchungen:

Die Bestimmung der Routineparameter erfolgte im Zentrallabor des Klinikums der Universität München-Innenstadt. Untersucht wurde ein Differentialblutbild, Natrium, Kalium, Kreatinin, Eiweiß, Albumin, Blutzucker, CRP und Blutkörperchengeschwindigkeit. Die übrigen Serumproben wurden bis zur Analyse im Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München bei -20°C gelagert.

7.2 RAST-Test

Um eine spezifische Sensibilisierung gegen häufige berufsspezifische Allergene zu überprüfen, wurde bei allen Probanden der Sensibilisierungsstatus über Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen Rinderschuppen, Schweineepithelien, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, Dreschstaub, Strohstaub sowie Heustaub erhoben. Hierbei wurde das Chemilumineszenzverfahren RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test, MagicLite SQ, BAYER) im Labor des Instituts und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der Universität München verwendet. Bei diesem Verfahren reagieren Allergene, welche kovalent an paramagnetische Partikel im MagicLite System gebunden wurden, mit dem allergenspezifischen IgE-Antikörper in der Patientenprobe, wobei über eine Lichtreaktion eine quantitative Messung durchgeführt werden kann. Eine Klassifikation erfolgt anhand einer Eichkurve semiquantitativ in 6 Klassen von Klasse 0 bis Klasse 5. In dieser Arbeit wurden die Klassen 0 bis 1 als „nicht sensibilisiert“ und 2-5 als „sensibilisiert“ zusammengefasst.

Eine atopische Veranlagung wurde mittels spezifischem IgE gegenüber ubiquitären Aeroallergenen überprüft. Hierzu wurden im Serum spezifische IgE-Antikörper über den Phadiatop Assay für ubiquitär vorkommende Aeroallergene (SX 1) bestimmt. Dieses in-vitro Testsystem basiert auf der ImmunoCAP Technologie (CAP Phadiatop FEIA, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Schweden) und ist eine Screeningmethode für folgende Allergene: Gras, Roggen, Birke, Beifuss, *Cladosporium herbarum*, Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), Katze und Hund. Auch hier wird die Sensibilisierung in 6 Klassen von 0 bis 5 eingeteilt. Als Atopiker wurden solche Personen eingeteilt, die Klassen >2 aufwiesen.

7.3 ELISA

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Stallexposition und dem Anstieg der Interleukine IL-6, TNF- α und ENA-78 darzustellen, erfolgte bei jedem Probanden eine Bestimmung der Interleukine im Serum mittels ELISA am Kontrolltag sowie am Expositionstag vor und nach Exposition.

IL-6 Bestimmung

Zur Bestimmung der IL-6 Konzentrationen im Serum wurde ein Quantikine HS Set der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet.

Nachdem alle benötigten Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht wurden, wurde der IL-6 Standard angesetzt und eine Verdünnungsreihe von 5 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,25 pg/ml, 0,625 pg/ml, 0,313 pg/ml, 0,156 pg/ml erstellt. Es wurde nun 50 μ l Assay Diluent 1D in alle Vertiefungen der

Probenplatte vorgelegt und jeweils 200 µl Standard bzw. Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 14 - 20 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Probenmaterial aus den Vertiefungen durch Abklopfen entfernt und mit einer Pufferlösung mehrfach gewaschen.

Nach Zugabe von 200 µl IL-6 Konjugat, einem polyklonalen Antikörper gegen IL-6, in jede Vertiefung, wurde die Mikrotiterplatte wiederum mit einer Klebefolie verschlossen und dann für 6 Stunden inkubiert.

Es folgte ein weiterer Waschvorgang und ein Auffüllen der Vertiefungen mit 50 µl Substrat. Nach 1 Stunde Inkubationszeit wurden 50 µl Amplifier-Lösung in jede Vertiefung gegeben und wiederum 30 Minuten inkubiert. Nun wurden 50 µl einer Stop-Lösung hinzugefügt und die Mikrotiterplatte wurde mit einem Plattenphotometer (Lambda Spectral 340; Firma MWG-BIOTECH, Ebersberg) innerhalb von 30 Minuten bei 490 nm ausgemessen.

Die Konzentration wurde über die mitgelaufenen Standards der Verdünnungsreihe ermittelt.

TNF- α Bestimmung

Für die TNF- α Untersuchung wurde eine Standard-Verdünnungsreihe entsprechend dem Verfahren für IL-6 hergestellt, und nach Zugabe von 50 µl Assay Diluent HD1-11 in alle Plattenvertiefungen wurden 200 µl Standard bzw. Probenlösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei Raumtemperatur wurde mit einem frisch angesetzten Waschpuffer die Mikrotiterplatte gewaschen und kräftig ausgeklopft. Es wurden 200 µl TNF- α HS Konjugat in jede Vertiefung gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschdurchgang wurden 50 µl Substratlösung in jede Probenvertiefung gegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit wurde 50 µl Amplifier-Lösung hinzugegeben, 30 Minuten inkubiert und 50 µl einer Stop-Lösung hinzugefügt. Abgelesen wurde die enzymatische Lichtreaktion innerhalb von 30 Minuten bei 490 nm auf dem Plattenphotometer.

ENA-78 Bestimmung

Nachdem alle Reagenzien auf Zimmertemperatur erwärmt wurden, wurden die Serumproben mit 1:2 Calibrator Diluent RD6-1 verdünnt.

Ein Waschpuffer und eine Standardverdünnungsreihe wurden angesetzt.

In jede Mikrotiterplattenvertiefung wurden 200 µl Assay Diluent RD1W pipettiert, anschließend 50 µl des Standards bzw. der Serumprobe in die entsprechende Vertiefung gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Pufferlösung gewaschen und kräftig

ausgeklopft. Dieser Waschvorgang wurde 2-mal wiederholt, schließlich wurde 200 µl Konjugat hinzugefügt. Nach 2 Stunden Inkubationszeit wurde die Platte erneut gewaschen und 200 µl Substrate Solution zugesetzt. Es wurden 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert und 50 µl einer Stop-Lösung hinzugegeben. Die optische Reaktion wurde innerhalb von 30 Minuten mit dem Plattenphotometer bei 540 nm gelesen.

7.4 Nasallavage

Wir wählten für unsere Studie das Verfahren nach Naclerio et al. (1983) [56, 57]. Nach Aufklärung über den Ablauf der Nasallavage wurde der sitzende Proband gebeten, den Kopf nach hinten zu legen und die Zunge gegen den Gaumen zu drücken, um ein Schlucken der Kochsalzlösung zu verhindern. Dann wurden mit einer Einmalspritze vorsichtig bis zu 2 ml 0,9% Natriumchloridlösung in das Nasenloch gegeben. Durch ein Handzeichen konnte der Proband die Natriumchlorid - Injektion unterbrechen, falls er die Lösung nicht mehr in der Nase halten konnte und ein Verschlucken der Kochsalzlösung drohte.

Durch kräftiges Schnäuzen wurde dann die betreffende Nasenseite in ein 600 ml Becherglas entleert. Entsprechend wurde die andere Seite gespült.

In das Becherglas wurden 5 ml einer vorbereiteten Sputolysin Verdünnung (1:10) gegeben und die Wände des Becherglases mit einer Einmalpipette abgespült, um möglichst alle im Glas befindlichen Zellen zu erhalten. Die Sputolysin Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen umgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4 Grad in einer Kühlbox und unter gelegentlicher Homogenisierung mit einer Pasteurpipette wurde die Sputolysin-Zelllösung mit 1xPBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und dann bei 2400 U/min 10 Minuten lang in einer mobilen Kühlzentrifuge (Hettich Mikro 22R) bei 4 Grad Celsius zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein 50 ml Gefäß abgekippt und in einer Kühlbox bei 4 Grad Celsius gelagert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl 1xPBS Puffer resuspendiert, das Volumen wurde notiert, und das Pellet in ein Cryoröhrchen umpipettiert. Aus der Zellsuspension im Cryoröhrchen wurden 50 µl in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß für die spätere Zellzählung entnommen, während das im Cryoröhrchen verbleibende Volumen bei 2400 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgekippt und verworfen, das Cryoröhrchen mit dem Zellpellet wurde zum Transport in Trockeneis schockgefroren.

7.5 Zellzählung

Die Aufbereitung der Zellsuspension erfolgte am gleichen Tag durch den Autor dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit einer erfahrenen Chemisch-Technischen Assistentin.

Nach Entnahme von 1 µl aus der Zellsuspension und Anfärben mit 9 µl Trypanblau und 10 µl 1xPBS-Lösung entstand eine angefärbte Zelllösung (Verdünnungsfaktor 1:20), welche auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen wurde. Unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung wurde anschließend die Zellzahl von lebenden und toten Zellen ermittelt.

Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl der ausgewerteten Großquadrate}} = \text{Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension}$$

Formel 1

$$\text{Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension} \times \text{Volumen (ml) der Zellsuspension im Cryoröhrchen} = \text{Zellzahl im weggefrorenen Cryoröhrchen}$$

Formel 2

7.6 Zelldifferenzierung

Um eine Zelldifferenzierung vorzunehmen, wurde mit Hilfe des Cytospin 3 der Firma Shandon die Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen.

Hierbei wurde eine Zelllösung mit ca. 20.000-40.000 Zellen benötigt, welche über folgende Formel aus der Zellsuspension entnommen wurden:

$$\frac{30.000 \times 1000}{\text{Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension}} = \mu\text{l Zellsuspension für den Zytospin}$$

Formel 3

Die entnommene Zellsuspension wurde mit 200 µl 1xPBS resuspendiert und in die Plexiglas-Trichteröffnung, die bereits mit einem Objektträger und einem Filterkarton fixiert wurde, pipettiert. Der Zentrifugenbehälter (bestehend aus Objektträger, Filterkarton, Plexiglastrichter und Zentrifugenhalterung) wurden in den Cytospin eingehängt und bei 800 RPM 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Objektträger trocknete mindestens 10 Minuten, bevor er mit einer Methanol/Aceton (1:1) Lösung für 5 min fixiert wurde.

Anschließend trocknete der Objektträger mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde für ca. 30-40 Minuten in eine Giemsa-Färbelösung (190 ml Weise-Puffer + 10 ml Giemsa) getaucht. Nach kurzem Abspülen in Weise-Puffer wurde der Objektträger für 12 Minuten in einer May-Grünwald Lösung gebadet. Es wurde noch 2-mal mit Weise-Puffer gespült und dann getrocknet.

Für die Zelldifferenzierung wurde ein Lichtmikroskop (100x) verwendet, und jeweils 300 Zellen pro Objektträger wurden ausgezählt. Differenziert wurde zwischen Epithelzellen, Makrophagen (Abbildung 8), neutrophilen Granulozyten (Abbildung 9), eosinophilen Granulozyten, basophile Granulozyten und Lymphozyten. Es wurde die absolute und prozentuale Zellzahl notiert.



Abbildung 8: Makrophagen in der Nasallavage

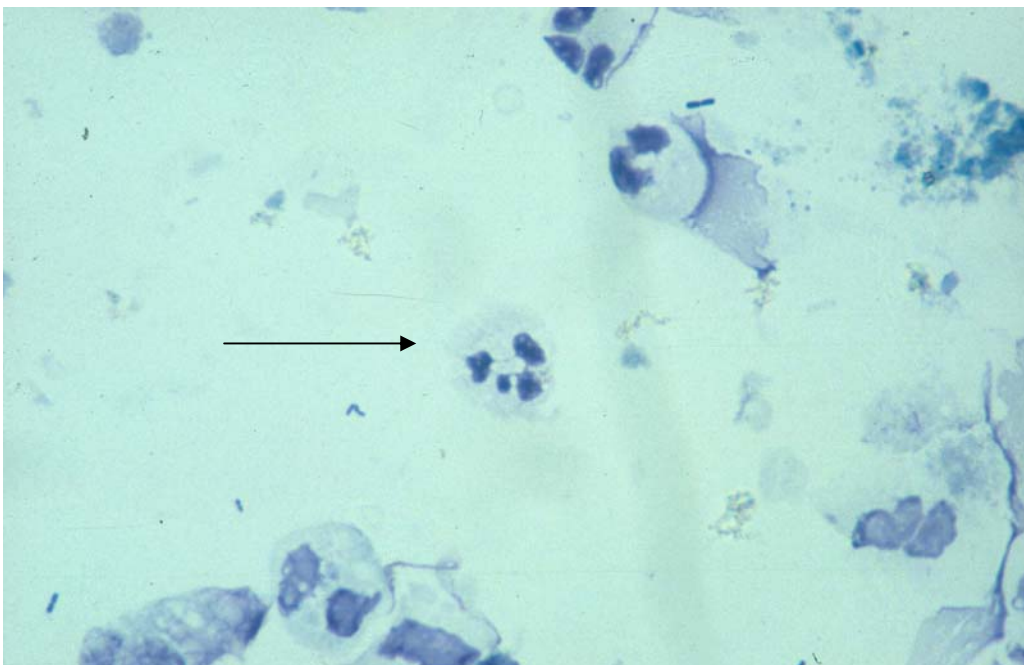


Abbildung 9: Neutrophile Granulozyten in der Nasallavage

8. Statistische Methoden

Die Dateneingabe erfolgte über eine vom Autor dieser Arbeit mit Microsoft Access (Version 2002, Microsoft Deutschland, Unterschleissheim, Deutschland) erstellte Eingabemaske. Alle Daten wurden von 2 Personen doppelt eingegeben und miteinander abgeglichen, um Eingabefehler möglichst klein zu halten. Für alle statistischen Berechnungen wurden die Daten in das Statistikprogramm SPSS Ver. 11 (SPSS inc., Chicago, USA) importiert.

Mit SPSS wurden Median, Minimum und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile aller erhobenen kontinuierlichen Daten dargestellt. Außerdem wurden die Korrelationen zwischen Umweltbelastung der Blutparameter, Interleukinen, Lungenfunktionsbefunden und Ergebnissen der Nasallavage mittels Spearman Rangkorrelation bestimmt. Über den Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben wurde der Unterschied zwischen den Prä- und Postexpositionswerten ermittelt. Weiterhin wurde mittels Mann-Whitney-U-Test die Gruppe der Landwirte mit der Gruppe der Büroangestellten verglichen. Hierzu wurde für jeden Teilnehmer die prozentuale Veränderung über die Exposition mittels folgender Formel berechnet:

$$\frac{X_{U\text{-tag 2 (nach Exposition)}} - X_{U\text{-tag 2 (vor Exposition)}}}{X_{U\text{-tag 2 (vor Exposition)}}} \times 100 = \text{Prozentuale Veränderung}$$

Formel 4

E. Ergebnisse

1. Kollektiv

1.1 Atemwegsbeschwerden

Ein Landwirt von insgesamt 21 Landwirten berichtete über Asthmasymptome, ein manifestes Asthma bronchiale gab jedoch kein Landwirt an. Chronische Bronchitis wurde von einem Landwirt berichtet, Allergien wurden insgesamt von 6 Landwirten angegeben.

In der Kontrollgruppe (n=24) gaben 2 Probanden Asthmasymptome an, darunter ein Proband mit ärztlich diagnostiziertem Asthma. Symptome einer chronischen Bronchitis bestanden im Bürokollektiv nicht. 8 der 24 Probanden berichteten von allergischen Beschwerden.

1.2 Aktuelles Befinden

Im Kollektiv der Landwirte traten insbesondere „Nasenbeschwerden“ auf. Die Büroangestellten berichteten nur vereinzelt über akute Symptome (Tabelle 5).

Parameter	Landwirte n=21		Büroangestellte n=24	
	Vor Expo	Nach Expo	Vor Expo	Nach Expo
Verstopfte Nase	6	1	0	1
Fließschnupfen	2	2	0	0
Trockener Husten	4	0	1	0
Husten mit Auswurf	4	0	0	0
Kratzen im Hals	0	4	1	0
Pfeifendes Atemgeräusch in der Brust	0	0	1	0
Kopfschmerzen	1	0	0	0
Juckreiz	2	0	0	0

Tabelle 5: Aktuelles Befinden der Probanden

Abkürzung:

Vor Expo = Vor Exposition am Untersuchungstag 2
Nach Expo = Nach Exposition am Untersuchungstag 2

1.3 Arbeitsprofil

Bei den 21 teilnehmenden Landwirten handelte es sich um Rinderhalter, ausgenommen 1 Landwirt, der in der Schweinemast tätig war.

Die Büroangestellten waren vorwiegend an der LMU beschäftigt.

1.4 Stallprofil

Das Stallprofil wurde durch einen separaten Fragebogen erfasst (Anhang 1.2). Das durchschnittliche Stallvolumen betrug 4386,9 m³, mit durchschnittlich 107,6 (Min: 50, Max: 400) Nutztieren. Die Ställe wurden von 10 Landwirten täglich, von 2 wöchentlich, von 4 monatlich, und von 5 Landwirten weniger als einmal im Monat gereinigt.

2. Umweltparameter

2.1 Endotoxinbelastung am Arbeitsplatz

Die personenbezogenen Endotoxinkonzentrationen im Stall lagen im Bereich von 0,9 EU/m³ bis 20816,3 EU/m³ Luftdurchfluss, der Median bei 360,2 EU/m³. Für einen Landwirt konnte die Exposition auf Grund eines technischen Messfehlers nicht ermittelt werden.

2.2 Ammoniak

Die im Stall gemessenen Ammoniakkonzentrationen lagen bei 0,52 mg/m³ bis 12,75 mg/m³ (Median 3,61 mg/m³) und somit in allen Fällen unter dem MAK-Wert von 14 mg/m³ (MAK+BAT Werte Liste 2004, DFG).

2.3 Kohlendioxid

Im Stall konnten CO₂ Konzentrationen von 600 ppm bis 3100 ppm festgestellt werden (Median 1870 ppm); diese lagen ebenfalls unter dem MAK Wert von 5000 ppm (MAK+BAT Werte Liste 2004, DFG)

2.4 Temperatur

Die durchschnittliche Temperatur in den Ställen betrug im Median 14,7° C und schwankte zwischen 6° und 19°.

2.5 Luftfeuchtigkeit

Die Luftfeuchtigkeit im Stall betrug im Median 62% (Range 50% und 87%).

2.6. Luftgeschwindigkeit

Die gemessene Luftgeschwindigkeit im Stall lag zwischen 0,04 und 1,7 m/s.

3. Laboruntersuchungen

3.1 Lungenfunktionswerte

Ausgangswerte und Änderung der Lungenfunktion

Tabelle 6 gibt Mediane und Spannweiten der gemessenen Lungenfunktionswerte am Expositionstag jeweils vor und nach Stallarbeit bzw. Fahrradergometrie wieder.

Die VC_{insp} , sowie FEV_1 und MEF_{50} stiegen in der Gruppe der Landwirte nach Exposition geringfügig, jedoch statistisch signifikant ($p < 0,05$), während es in der Kontrollgruppe zu keinerlei signifikanten Veränderungen kam. Der Vergleich der beiden Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied.

	Landwirte vor Exposition U-Tag 2	Landwirte nach Exposition U-Tag 2	Kontrolle vor Exposition U-Tag 2	Kontrolle nach Exposition U-Tag 2	Δ Landwirte proz. Veränderung	Δ Kontrolle proz. Veränderung
VC_{insp} %Soll						
Median	107,72	112,37	104,23	105,3	2,49	0,66
Min / Max	63,66 / 135,41	61,8 / 134,03	76 / 126,81	77,64 / 133,4	-5,3 / 12,11	-7,6 / 12,86
25.P / 75.P	99,74 / 120,04	102,7 / 122,52	94,6 / 117,85	93,3 / 117,24	-2,13 / 5,02	-3,56 / 2,51
	$P_w = 0,039$		$P_w = 1,0$		$P_M = 0,144$	
FEV_1 %Soll						
Median	111,22	114,62	103,87	105,15	1,82	2,58
Min / Max	64,44 / 148,63	65,49 / 140,78	79,3 / 128,8	82,2 / 177,5	-5,69 / 17,26	-5,11 / 67,06
25.P / 75.P	98,07 / 120,06	98,06 / 122,95	99,1 / 112,4	98,0 / 124,4	0,43 / 4,58	0,14 / 3,40
	$P_w = 0,042$		$P_w = 0,101$		$P_M = 0,595$	
PEF %Soll						
Median	110,96	110,46	117,11	117,55	3,95	0,723
Min / Max	49,53 / 138,21	47,99 / 148,56	77,24 / 144,9	79,05/184,56	-12,84 / 27,02	-5,67 / 43,96
25.P / 75.P	92,76 / 119,78	101,68 / 119,50	112,7/126,83	112,67/135,4	-7,73 / 8,48	-1,8 / 5,28
	$P_w = 0,339$		$P_w = 0,463$		$P_M = 0,710$	
MEF_{50}%Soll						
Median	81,95	88,05	87,24	92,83	7,41	4,73
Min / Max	28,37 / 165,73	47,62 / 177,44	50,5 / 134,0	49,7 / 149,2	-30,09 / 190	-22,71 / 75,09
25.P / 75.P	72,27 / 92,21	70,58 / 106,50	68,0 / 110,34	77,02/ 124	-2,5 / 13,92	-1,5 / 12,20
	$P_w = 0,044$		$P_w = 0,116$		$P_M = 0,685$	

Tabelle 6: Lungenfunktionsparameter der Landwirte im Vergleich zur Kontrollgruppe

Abkürzungen:

P_M	=	$P_{\text{Mann-Whitney-U}}$
P_W	=	P_{Wilcoxon}
Δ	=	Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer}) \cdot 100$ Positiver Wert = Anstieg über Exposition Negativer Wert = Abfall über Exposition
Min	=	Minimum
Max	=	Maximum
25.P / 75.P	=	25. / 75. Perzentil
$V_{C_{\text{insp.}}}$	=	Inspiratorische Vitalkapazität
FEV	=	Forciertes Expiratorisches Volumen
PEF	=	Peak Expiratory Flow
MEF 50	=	Maximal Expiratorischer Flow bei 50 % der forcierten Vitalkapazität

3.2 Allergiestatus

Drei Landwirte gaben an, dass sie unter Allergien litten. Davon klagten zwei über Heuschnupfen, und ein Landwirt litt an einer „Amalgam-Unverträglichkeit“. Bei vier Landwirten waren in der Familie Allergien bekannt.

Gesamt-IgE-Werte von über 100 IU/ml wurden bei 6 Landwirten festgestellt. Bei zwei Landwirten lag eine Sensibilisierung im SX1-Test vor, bei 2 weiteren Probanden wurden polyvalente Typ I - Sensibilisierungen festgestellt.

Bei fünf Büroangestellten wurden Gesamt-IgE-Werte von über 100 IU/ml gemessen. 9 Büroangestellte wiesen eine Sensibilisierung im SX1-Test auf. Spezifische IgE-Werte wurden in der Kontrollgruppe nicht gemessen.

Einen Überblick gibt Tabelle 7.

		Landwirte (n)	Kontrolle (n)
Anamnestische Angabe einer Allergie	Ja	3	6
Anamnestische Angabe einer Allergie bei Familienangehörigen	Ja	4	9
Gesamt IgE > 100 IU / ml	Ja	6	5
Mehr als ein spezifisches IgE positiv (RAST - Klassen >1)	Ja	5	-
Anamnestisch Allergie und Atopiker*	Ja	1	-
*Atopiker definiert als Gesamt IgE > 100 IU/ml und mehr als ein spezifisches IgE positiv			

Tabelle 7: Allergie-Status der Landwirte

3.3 Blutbild

Allgemeines Gesundheitsprofil

Eine Übersicht über Median, Spannweite und Perzentile der wichtigsten Blutparameter im Kollektiv der Landwirte im Vergleich zum Bürokollektiv gibt Tabelle 8.

In der Gruppe der Landwirte kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten drei Stunden nach Stallarbeit (Abbildung 9). Die Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Monozyten hingegen fielen hochsignifikant. Das CRP fiel ebenfalls signifikant.

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten drei Stunden nach der Fahrradergometrie (Abbildung 10), dieser war tendenziell jedoch nicht so ausgeprägt, wie in der Gruppe der Landwirte ($P_m=0,098$). Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten sanken signifikant. Die Veränderungen fielen insgesamt weniger stark aus als in der Gruppe der Landwirte und erreichen im Vergleich der Kollektive nur für die Lymphozyten statistische Signifikanz ($P_m=0,047$).

Die Veränderung der neutrophilen Granulozyten über die Exposition ist in Abbildung 10 für die Landwirte und in Abbildung 11 für die Kontrollen dargestellt.

Parameter	Landwirte vor Exposition U-Tag 1	Landwirte nach Exposition U-Tag 2	Kontrollgruppe vor Exposition U-Tag 1	Kontrollgruppe nach Exposition U-Tag 2	Δ Landwirte	Δ Büroangest.
Neutrophile Gr.	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Median	52,7	62,9	56,5	61,6	19,83	7,73
Min / Max	43,9 / 67,6	50,3 / 74,0	42,6 / 73,2	49,7 / 73,7	-13,57 / 47,90	-10,78 / 46,37
25.P / 75.P	47,6 / 58,2	55,6 / 67,9	48 / 61,5	54,8 / 68,5	4,39 / 40,30	-4,75 / 18,93
	$P_w = 0,003$		$P_w = 0,006$		$P_M = 0,098$	
Lymphozyten	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Median	35	27,5	32,95	28,6	-26,5	-5,863
Min / Max	21,8 / 45	18,6 / 37,5	17,2 / 48,5	17,7 / 41,3	-43,53 / 37,23	-46,93 / 36,82
25.P / 75.P	30,6 / 40,7	23,8 / 31,6	26,1 / 41,1	24,2 / 33,8	-37,05 / -6,28	-23,37 / 10
	$P_w = 0,003$		$P_w = 0,019$		$P_M = 0,047$	
Eosinophile Gr.	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Median	3,5	2,0	2,8	2,1	-37,84	-32,26
Min / Max	1,1 / 6,3	0,4 / 6,5	1 / 6,1	0,4 / 6,6	-80 / 84,62	-78,69 / 57,14
25.P / 75.P	1,9 / 5	0,8 / 3	1,9 / 4,2	1,2 / 2,8	-62,08 / -7,14	-45 / -8,89
	$P_w = 0,013$		$P_w = 0,015$		$P_M = 0,444$	
Monozyten	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Median	8,4	7,3	7,4	6,5	-18,3	-15,1
Min / Max	5 / 13,9	5,0 / 9,4	3,9 / 12,7	3,4 / 9,2	-40,23 / 64	-53,01 / 22,67
25.P / 75.P	6,8 / 9,9	5,7 / 8,2	6,7 / 8,5	5,3 / 7,5	-33,59 / -4,17	-30,38 / -2,74
	$P_w = 0,012$		$P_w = 0,071$		$P_M = 0,652$	
CRP	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[%]	[%]
Median	0,17	0,15	0,2	0,2	-7,41	-4,55
Min / Max	0,04 / 0,82	0 / 0,7	0 / 5,7	0 / 0,8	-50 / 13,33	-92 / 850
25.P / 75.P	0,09 / 0,27	0,1 / 0,24	0,05 / 0,5	0,04 / 0,42	-11,76 / 0	-35 / 8,33
	$P_w = 0,011$		$P_w = 0,734$		$P_M = 0,720$	

Tabelle 8: Übersicht über das Blutbild bei Landwirten und Kontrollgruppe im Vergleich

Abkürzungen:

P_M	=	$P_{\text{Mann-Whitney-U}}$
P_w	=	P_{Wilcoxon}
Δ	=	Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer}) \cdot 100$ - Positiver Wert = Anstieg über Exposition - Negativer Wert = Abfall über Exposition
Min	=	Minimum
Max	=	Maximum
25.P / 75.P	=	25. / 75. Perzentil
Neutrophile Gr..	=	Neutrophile Granulozyten
Eosinophile Gr.	=	Eosinophile Granulozyten
U-Tag 1	=	Untersuchungstag 1
U-Tag 2	=	Untersuchungstag 2

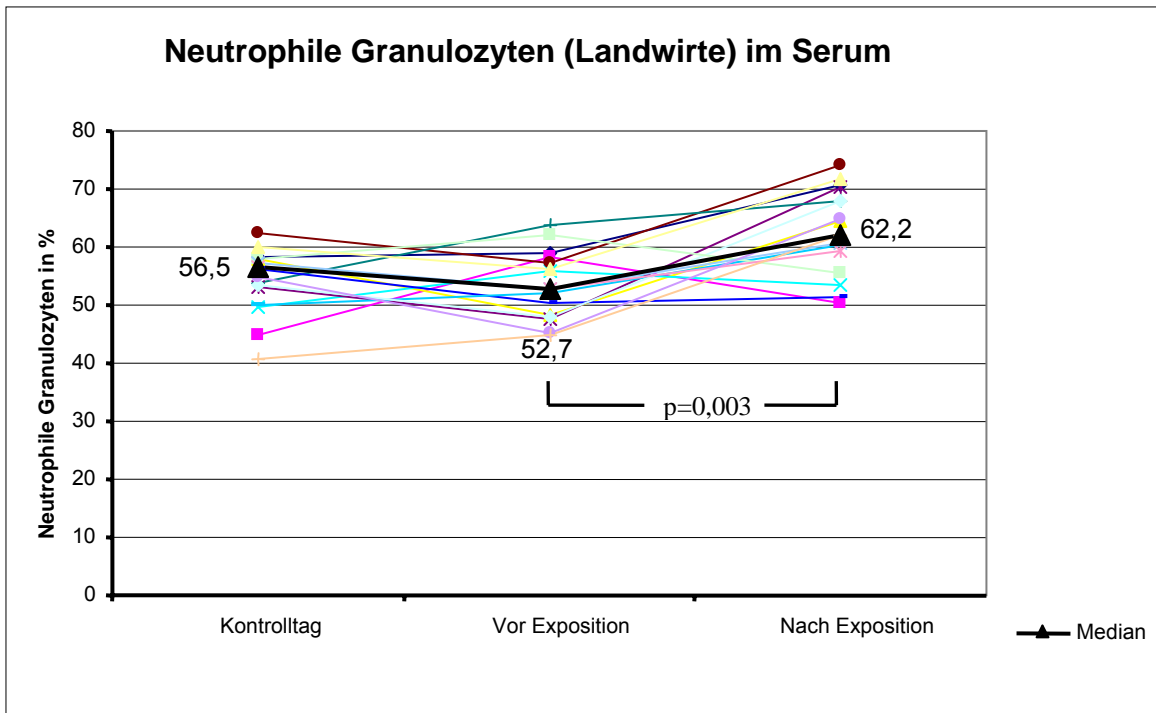


Abbildung 10: Neutrophile Granulozyten (Landwirte) am Kontrolltag vor und nach Exposition

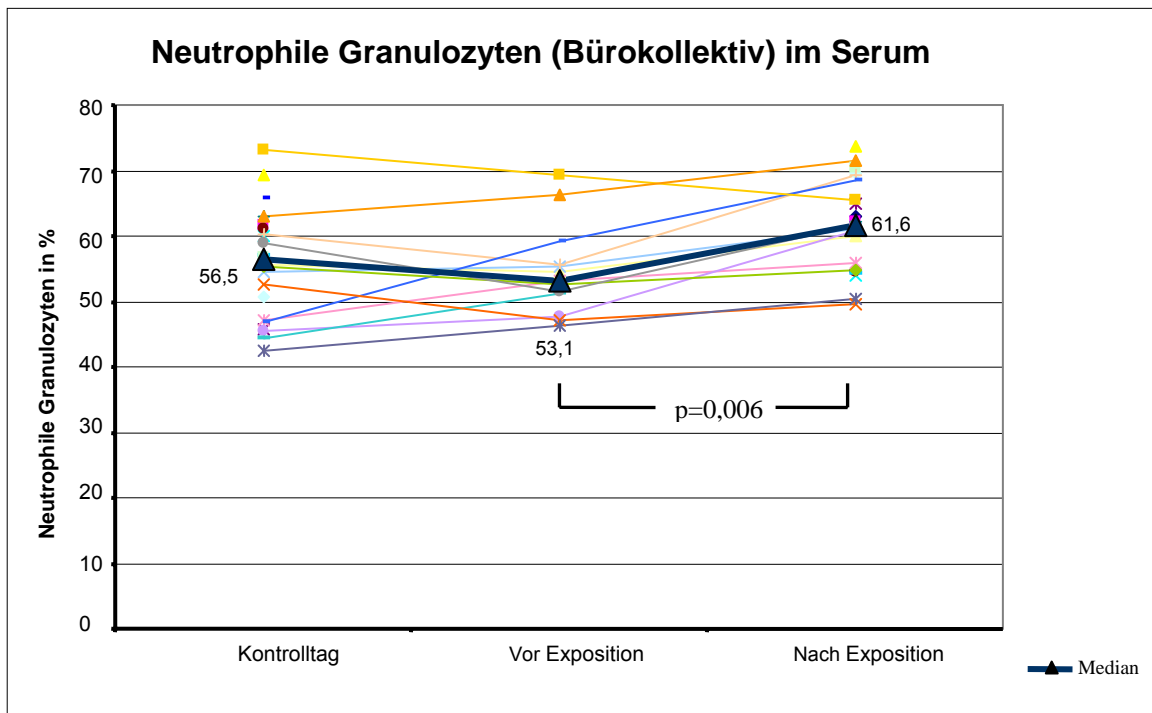


Abbildung 11: Neutrophile Granulozyten (Bürokollektiv) am Kontrolltag vor und nach Exposition

3.4 Nasallavage

Die in der Nasallavage gewonnenen Zellen wurden auf Objektträgern fixiert, gefärbt, gezählt und differenziert. Es fanden sich vorwiegend Epithelzellen sowie neutrophile Granulozyten und Makrophagen.

In der quantitativen Analyse der Zellen aus der nasalen Lavage konnte außer einem signifikanten Abfall des Anteils der neutrophilen Granulozyten nach Exposition ($p_w = 0,04$) keine statistisch signifikante Veränderung festgestellt werden (Tabelle 9).

Eine vollständige Darstellung aller ausgezählten Zellen ist im Anhang (Anhang 1.3) beigefügt.

	Landwirte vor Exposition U-Tag 1	Landwirte nach Exposition U-Tag 2	Kontrolle vor Exposition U-Tag 1	Kontrolle nach Exposition U-Tag 2	Δ Landwirte	Δ Kontrollgruppe
NAL Neutro	[absolut]	[absolut]	[absolut]	[absolut]	[%]	[%]
Median	263	231	102	78	-6,14	-22,22
Min / Max	2 / 283	0 / 608	0 / 259	0 / 275	-100 / 131,18	-100 / 19600
25.P / 75.P	201 / 273	45,5 / 261	18 / 190	19,25 / 164,5	-59,98 / 7,93	-69,29 / 125,4
	$P_w = 0,246$		$P_w = 0,581$		$P_M = 0,930$	
NAL Neutro%	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Median	88	77	34	28	-5,56	-22,92
Min / Max	4 / 94	0 / 96	0 / 86	0 / 92	-100 / 50	-100 / 6500
25.P / 75.P	68 / 91	15 / 86,5	6 / 63	7,25 / 63	-44,18 / 5,09	-65,0 / 122,08
	$P_w = 0,047$		$P_w = 0,559$		$P_M = 0,941$	

Tabelle 9: Neutrophile Granulozyten in der Nasallavage der Landwirte im Vergleich zur Kontrollgruppe

Abkürzungen

P_M =	$P_{\text{Mann-Whitney-U}}$
P_w =	P_{Wilcoxon}
Δ =	Prozentuale Veränderung $((\text{Exp} - \text{Leer})/\text{Leer}) \cdot 100$ Positiver Wert = Anstieg über Exposition Negativer Wert = Abfall über Exposition
Min =	Minimum
Max =	Maximum
25.P / 75.P =	25. / 75. Perzentil
NAL Neutro. =	Nasallavage Neutrophile Granulozyten
NAL Neutro % =	Nasallavage Neutrophile Granulozyten in % von der Gesamtzellzahl

3.5 Zytokine

Die Zytokine wurden analog zum Differentialblutbild aus dem Serum gewonnen und untersucht. Hier konnte jedoch keine statistisch signifikante Veränderung im Vergleich zum Kontrolltag bzw. den Werten vor der Exposition festgestellt werden. Ebenso wenig gab es signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Landwirte und der Gruppe der Büroangestellten.

3.6 Korrelationsanalysen

3.6.1 Zusammenhang zwischen Endotoxinexposition und Lungenfunktionsparameter

Eine Spearman-Rangkorrelationsanalyse erbrachte keine Korrelation zwischen zentralen Atemwegswiderstand (R_{oc}), inspiratorischer Vitalkapazität (VC_{in}), Einsekundenkapazität (FEV₁), maximalem expiratorischem Fluss und Rhinoflow und der gemessenen Endotoxinkonzentration im Stall.

3.6.2 Zusammenhang zwischen Endotoxinexposition und Blutparameter

Vergleicht man die gemessenen Blutwerte mit der Endotoxinkonzentration im Stall, so kann man feststellen, dass Landwirte, die höheren Endotoxinkonzentrationen ausgesetzt waren, eine signifikant höhere Zahl der Leukozyten im peripheren Blut aufwiesen (n=19; r=0,498; p=0,03) (Tabelle 10).

Parameter Endotoxin (EU/m ²)	Leukozyten Vor Expo U-Tag 2	Leukozyten Nach Expo U-Tag 2
Korrelations- Koeffizient	0,292	0,498
P _{Sp}	0,239	0,030
N	18	19

Tabelle 10: Statistischer Zusammenhang zwischen Endotoxinkonzentration und Leukozytenzahl

3.6.3 Zusammenhang zwischen Endotoxinbelastung und Zellen in der Nasallavage

Endotoxine gelten als Auslöser entzündlicher Reaktionen nach Exposition mit Stallstäuben. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den expositionsrelevanten Endotoxinen und den in dieser Untersuchung gemessenen Zellen in der nasalen Lavage wurde mit Hilfe einer Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Es wurde ausschließlich das Kollektiv der Landwirte untersucht, da nur diese erhöhten Endotoxinkonzentrationen ausgesetzt waren.

In der Nasenschleimhaut konnte mit zunehmender Endotoxinkonzentration auch eine signifikante Zunahme der Makrophagen festgestellt werden (n=16; r=0,933; p<0,001). Ebenso stieg die Zahl der Epithelzellen bei hohen Endotoxinkonzentrationen (n=16; r=0,568; p=0,022) (Abbildung 12 + 13).

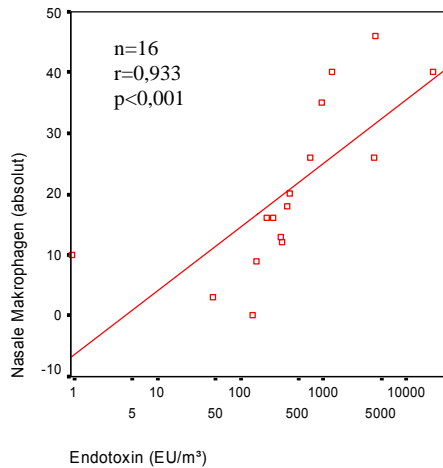


Abbildung 12: Korrelationsgrafik (Scatterplot) zwischen Endotoxin und Makrophagen nach Exposition in der nasalen Lavage

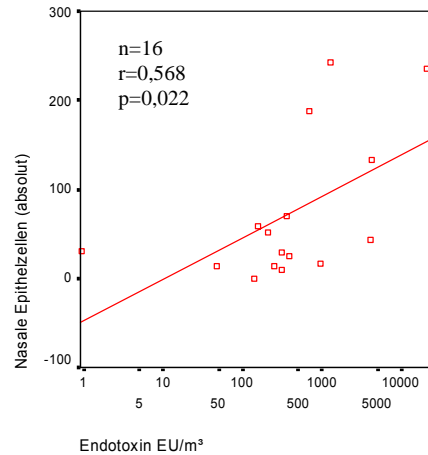


Abbildung 13: Korrelationsgrafik (Scatterplot) zwischen Endotoxinen und Epithelzellen nach Exposition in der nasalen Lavage

3.6.4 Zusammenhang zwischen Endotoxin und Zytokinen

Mit steigender Endotoxinkonzentration stieg auch die IL-6 Konzentration im Serum (Abbildung 14). Der Zusammenhang war allerdings nur grenzwertig signifikant (n=20; r=0,435; p=0,056). Darüber hinaus ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Endotoxinkonzentration und den Zytokinkonzentrationen im Serum.

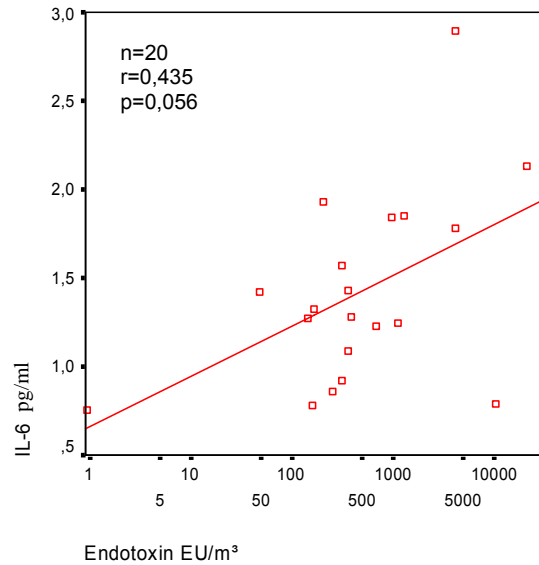


Abbildung 14: Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen IL-6 Konzentration (pg/ml) nach Endotoxinexposition und der Endotoxinkonzentration

3.6.5 Zusammenhang zwischen Nasallavage und Lungenfunktionsparameter

Forciertes expiratorisches Volumen

Die Spearman-Rangkorrelation zeigte eine signifikant negative Korrelation ($n=17$; $r=0,514$; $p=0,035$) zwischen dem forcierten expiratorischen Volumen und der absoluten Zahl der Epithelzellen (Abbildung 15).

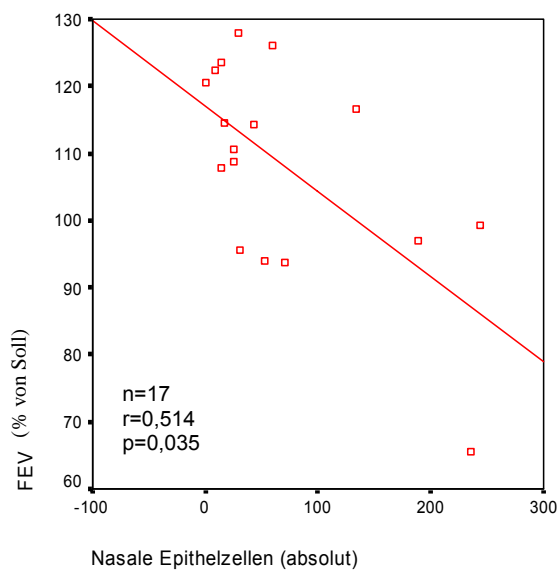


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Epithelzellen der Nasallavage und dem forcierten expiratorischen Volumen in 1 Sekunde nach Stallarbeit

Maximaler Expiratorischer Fluss

Es zeigte sich ebenfalls eine statistisch signifikante Korrelation ($n=17$; $r=0,585$; $p=0,014$) zwischen dem maximalen expiratorischen Fluss bei 50% und der Zahl der Epithelzellen in der Nasallavage (Abbildung 16)

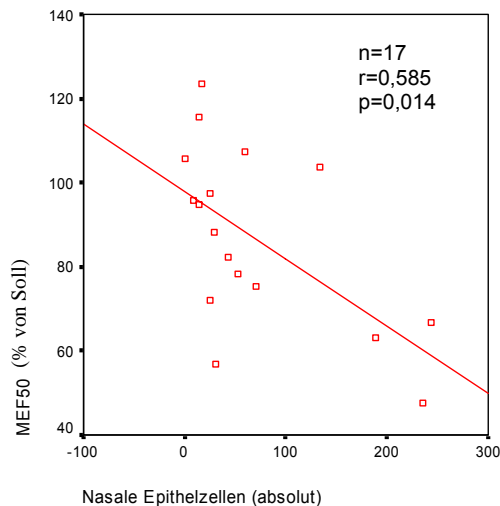


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Epithelzellen der Nasallavage und dem maximalen expiratorischen Fluss nach Stallexposition

3.6.6 Zusammenhang zwischen Nasallavage und Zytokinen in der Nasallavage

Es konnte eine Assoziation der nasalen Makrophagen (Abbildung 17) nach Exposition mit der IL-6 Konzentration nach Exposition ($n=17$, $r=0,545$; $p=0,016$) erfasst werden. Außerdem hing die TNF- α Konzentration hochsignifikant mit der Anzahl der nasalen Epithelzellen nach Exposition ($n=17$, $r=-0,665$; $p=0,004$) zusammen (Abbildung 18).

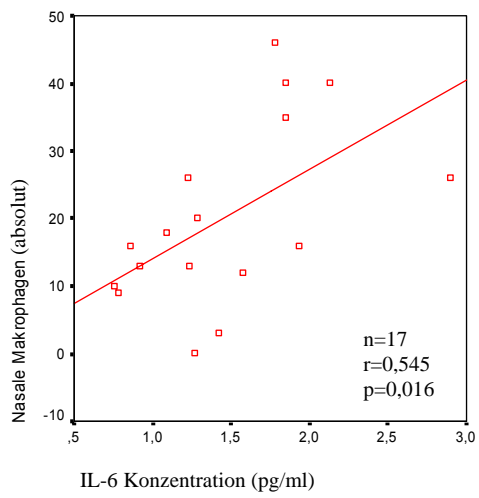


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen nasalen Makrophagen und IL-6 Konzentration im Serum

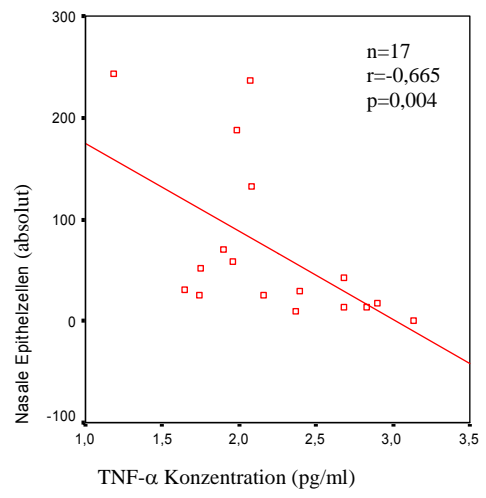


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen nasalen Epithelzellen und TNF-α Konzentration im Serum

F. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, Entzündungsreaktionen der oberen Atemwege bei Landwirten nach beruflicher Exposition mit Endotoxinen im Stall nachzuweisen. Hierzu sollte das Verfahren der Nasallavage als nicht-invasive Methode zum Nachweis solcher Entzündungen etabliert werden, zudem Zusammenhänge zwischen Nasallavage und peripheren Blutbild sowie Lungenfunktionsparametern untersucht werden.

Es wurde ein Kollektiv von 21 Landwirten mit einem Kontrollkollektiv von 24 Büroangestellten verglichen.

In der Lungenfunktionsuntersuchung konnte ein signifikanter Anstieg von VC_{insp} , FEV_1 und MEF_{50} im Kollektiv der Landwirte gemessen werden, während es in der Gruppe der Büroangestellten zu keinerlei Veränderungen kam.

Im Blutbild der Landwirte kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg des prozentualen Werts der neutrophilen Granulozyten; die Lymphozyten (%), eosinophile Granulozyten (%) und Monozyten (%) fielen hoch signifikant ab. Mit zunehmender Endotoxinkonzentration fiel auch die Zahl der Leukozyten im Blut ab, während die IL-6 Konzentration stieg. Auch im Bürokollektiv kam es zu einem ähnlichen Bild, jedoch waren die Unterschiede vor und nach Exposition tendenziell nicht so ausgeprägt wie in der Gruppe der Landwirte.

Der Anteil der neutrophilen Granulozyten in der Nasallavage fiel signifikant ab, sonst gab es keine Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Nasallavage. Die Büroangestellten zeigten keine Veränderung durch die Exposition (Fahrradergometrie). Ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Makrophagen in der Nasallavage und der Endotoxinkonzentration konnte für die Gruppe der Landwirte ermittelt werden.

1. Studiendesign

Das Studiendesign lehnt sich an bereits etablierten Untersuchungen an Schweißern und Kompostarbeitern (H. Hessel 2003; T. Müller 2004) [33, 54]. Diese wurde teilweise modifiziert, um der hier zugrunde liegenden Fragestellung gerecht zu werden.

1.1 Untersuchungskollektiv

Die Landwirtschaft ist ein Arbeitsbereich mit potentiellen gesundheitlichen Risiken. Organische Stäube und toxische Gase gehören zu den häufigsten Auslösern von Erkrankungen im Zusammenhang mit der Landwirtschaft [36, 69, 72, 76, 80].

Vor diesem Hintergrund wurden an 21 gesunden Landwirten Endotoxin-induzierte Entzündungsreaktionen untersucht. In verschiedenen Arbeiten konnten bereits Entzündungsreaktionen der oberen und unteren Atemwege bei Beschäftigten in der Abfallwirtschaft und Landwirtschaft nachgewiesen werden [22, 31]. Die Schweinemast und die Geflügelzucht erreichen die höchste Arbeitsplatzbelastung mit Endotoxin und organischem Staub innerhalb der Landwirtschaft [67, 80, 83].

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Landwirte mit Rinderhaltung untersucht, nur ein Landwirt bewirtschaftete eine Schweineaufzucht.

Ein Vergleich mit beruflich nicht-exponierten Personen wurde anhand der Büroangestellten durchgeführt.

1.2 Untersuchungsparameter

1.2.1 Lungenfunktion

Inhalative Partikel in Kombination mit Endotoxin können sich auf die Lungenfunktion auswirken und eine Verminderung von FEV₁ und FVC nach sich ziehen [11, 64]. Um Veränderungen der Lungenfunktionsparameter zu erfassen, wurde in unserer Untersuchung vor und nach Exposition eine Lungenfunktionsuntersuchung durchgeführt.

1.2.2 Differentialblutbild

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass inhaliertes Endotoxin zu systemischen Veränderungen im Blut führt [48, 107]. Um systemische Entzündungsreaktionen nach Endotoxinexposition darzustellen, wurden in der vorliegenden Untersuchung auch entzündungsspezifische Parameter des peripheren Blutes bestimmt, um einerseits einen möglichen Zusammenhang zwischen Endotoxinbelastung und Veränderung des Differentialblutbildes darzustellen, und zum anderen die lokale Entzündungsreaktion der Nase mit einer systemischen Auswirkung im peripheren Blutbild zu vergleichen.

1.2.3 Nasallavage

Die Methode der Nasallavage wurde gewählt, da sie ein nicht-invasives, gut tolerables und schnelles Verfahren darstellt, um objektive Messungen bei nasalen Entzündungsreaktionen zu erhalten und für intraindividuelle Vergleiche sehr gute Ergebnisse ergibt [34, 74]. Die Nasallavage ist daher für Feldstudien, wie wir sie vornahmen, besonders geeignet. Peden et al. (1996) beschreiben die nasale Lavage als ein wertvolles Instrument bei der Untersuchung von Entzündungsantworten der Nasenschleimhaut [65]. Bezüglich der Reproduzierbarkeit der Nasallavage innerhalb kurzer Abstände finden sich in der Literatur nur wenige Arbeiten mit kontroversen Ergebnissen. Während Diaz-Sanchez et al. (2000) keine unmittelbare Beanspruchung der nasalen Schleimhäute durch eine Spülung mit einer isotonen NaCl-Lösung beschreibt [16], konnte bei Provokation der nasalen Mukosa mit einer hypertonen NaCl-Lösung jedoch Nachweise erbracht werden, dass hier proinflammatorische Effekte entstehen [4, 94]. Eine weitere Versuchsreihe, die Probanden gegenüber zunehmender LPS-Konzentration exponierten, zeigte auch bei 0 µg LPS (reine 0,9% Natrium-Chlorid-Lösung) eine Zunahme von Symptomen, was ebenfalls auf eine Irritation der Nasenschleimhaut durch die Nasallavage hinweist [15].

Als Ursache für diese unterschiedlichen Effekte können neben der Osmolarität die verschiedenen Untersuchungsmethoden der nasalen Lavage, die bei den angeführten Studien zum Einsatz kamen, angenommen werden.

In unserer Studie wurde mit Modifikationen das Verfahren einer Nasallavage nach Naclerio et al. (1983) verwendet [56, 57], da in Arbeiten von Frischer und Baraldi (2000) eine gute Reproduzierbarkeit bei einem Abstand von mindestens 48 Stunden gezeigt werden konnte [26]. Hierbei wurde nach einer kurzen Inkubationszeit mit isotoner Kochsalzlösung kräftig in ein Glas geschnäuzt und dieses dann vor Ort weiterverarbeitet, um es dann unter Schockgefrierung in das Labor nach München zur weiteren Zellaufbereitung und Isolierung von Material für die in Hamburg durchgeführte PCR zu transportieren. Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung und ein gutes Ergebnis bei der Gewinnung von Zellen, Nachteil ist die unterschiedliche und schlecht standardisierbare Art des „Schnäuzens“, die zu unterschiedlichen Mengen an mobilisierten Sekreten und daher unterschiedlichen Zellzahlen führte. So konnten bei einem Landwirt keine Zellen gewonnen werden, da er nicht kräftig genug ausschnäuzen konnte oder wollte.

In einer Studie von Purokivi (2002) wurde die Sputuminduktionstechnik mit der Nasallavage verglichen, um darzustellen, in wieweit eine Nasallavage und damit die lokale Entzündungsreaktion der oberen

Atemwege mit der Entzündungsreaktion der unteren Atemwege zusammenhängt. Dabei wurde die arbeitsplatzbezogene Exposition gegenüber Hausschimmel untersucht. Es wurde festgestellt, dass eine Nasallavage alleine nicht ausreicht, um Aussagen über eine Entzündung der unteren Atemwege zu treffen. Die Arbeitsgruppe räumte allerdings ein, dass dies mit anderen Irritantien möglich wäre [66].

1.2.4 Zytokine und Zellen der Nasallavage

In frühen Phasen entzündlicher Reaktionen sind nach in vitro- und in vivo-Untersuchungen der letzten Jahre proinflammatorische Zytokine maßgeblich beteiligt [5, 25, 52, 90]. Um Entzündungsreaktionen nach organischer Staubbelastung darzustellen, wurden daher die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , ENA-78 und IL-6 aus Blut und Nasallavage quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte in dieser Studie unter Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmen [23, 44, 106] für alle Probanden einheitlich nach Endotoxinbelastung und am Kontrolltag.

Verschiedene Autoren beschrieben eine Latenzzeit zwischen 2 bis 6 Stunden nach Exposition gegenüber alveolengängigen Partikeln, bis es zur Bildung der spezifischen zu quantifizierenden Zytokin-mRNA kommt [1, 5]. Daher wurde darauf geachtet, die nasalen Sekrete und das Serum mindestens 3 Stunden nach Exposition zu gewinnen.

Die chemotaktischen Eigenschaften der proinflammatorischen Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der spezifischen Vermehrung immunkompetenter Zellen. Verschiedene Untersuchungen zeigten dies und konnten eine Verschiebung des Zelldifferentialbildes von broncho-alveolären Lavage, Sputum und Nasallavage nach inhalativer Partikel-induzierter Exposition nachweisen [58, 61, 62, 75]. Um zudem einen Zusammenhang von proinflammatorischen Zytokinen und den entzündungsspezifischen Zellen zu untersuchen, erfolgte in dieser Untersuchung eine Differenzierung der Zellen der Nasallavage.

1.3 Studiendesign – Zusammenfassung

Das hier gewählte Studiendesign sollte Aufschluss geben über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der Endotoxinbelastung im Stall und auftretenden entzündlichen Veränderungen der Atemwege, ferner Auftreten von spezifischen Entzündungsmediatoren und Entzündungszellen in der nasalen Lavage, sowie Veränderungen des Differentialblutbildes. Außerdem sollte die nasale Lavage als nicht-invasive Methode zur Darstellung von im Feld zu ermittelnden Parametern etabliert werden, um Entzündungsreaktionen in Nasallavage und Blut vergleichen zu können.

2. Umweltparameter

2.1 Endotoxinbelastung im Stall

2.1.1 Endotoxinquantifizierung

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Tests ist eine kostengünstige und effektive Methode zur Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen [79]. Die Ergebnisse sind sehr gut reproduzierbar und wurden schon in vielen verschiedenen Arbeitsumfeldern mit erfolgreichem Ergebnis eingesetzt [40]. Jedoch existieren keine allgemein akzeptierten Standardprobennahmen und Extraktionsverfahren, was die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors problematisch macht [30, 101].

2.1.2 Endotoxinexposition im Stall

Die Messung der Endotoxinkonzentration erfolgte während der normalen Tätigkeit am frühen Morgen zwischen 5.00 und 8.00 Uhr im Stall. Aufgrund unterschiedlicher Ställe, Anzahl der Tiere, Art der Belüftungssysteme und Dauer der Arbeitszeit war jeder Landwirt individuell anderen Konzentrationen ausgesetzt. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass jeder Landwirt mindestens 30 Minuten lang eine Tätigkeit im Stall ausübte. Die Endotoxinkonzentrationen variierten von 0,9 bis 20.816,3 EU/m³. Unsere Werte befanden sich im Bereich der Konzentrationen von anderen Untersuchungen, wobei die meisten Untersuchungen an Schweineställen durchgeführt werden [9, 11, 29, 31, 39, 68, 69, 72, 77, 84], in denen höhere Konzentrationen als in der Rinderhaltung gemessen wurden (Abbildung 19)[87]. Eine Untersuchung in Rinderstallungen führte Kullman et al. (1998) an 85 Milchkuhställen durch, wobei Endotoxinkonzentrationen von 25,4 EU/m³ und 34.800 EU/m³ gemessen wurden [38].

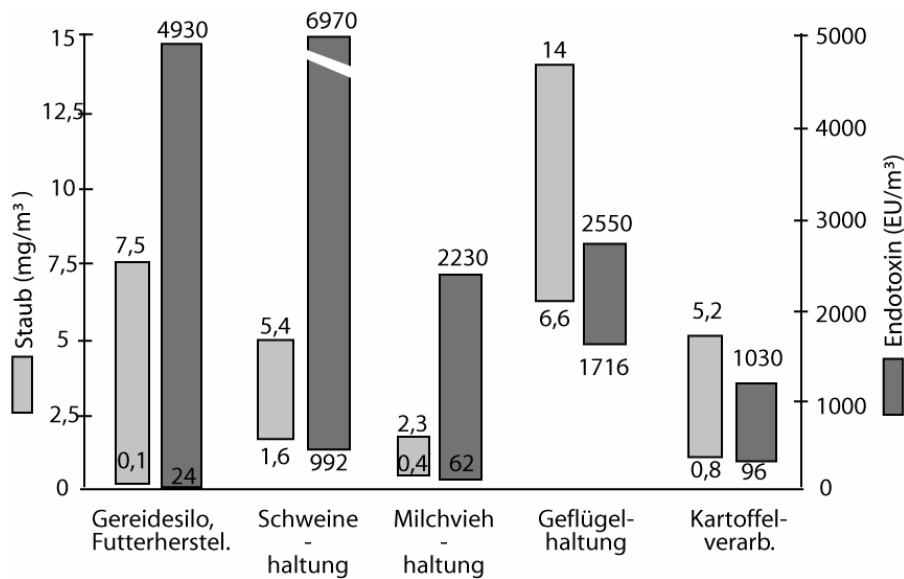


Abbildung 19: Staub (einatembare Anteil) und Endotoxinbelastung in der Landwirtschaft [87]

Ein Vorteil unserer Messung ist das Verwenden von Personalsamplern. So konnten die sehr individuellen Belastungen mit Endotoxin protokolliert werden, da die Belastung je nach Arbeitstätigkeit variieren kann. Thorn verglich stationäre Endotoxinmessgeräte mit personenbezogenen Messgeräten und riet zum Verwenden von Personalsamplern, um die individuelle arbeitsspezifische Belastung eines Probanden zu analysieren. [92]. Nachteilig wirkte sich die Größe der Messgeräte aus, die in manchen Fällen den natürlichen Arbeitsablauf geringfügig behinderten.

2.2 Diskussion der Ammoniakbelastung in den Ställen

In den von uns untersuchten Ställen wurden jeweils 2 Messgeräte an verschiedenen Plätzen für mindestens 30 Minuten aufgestellt. Es wurden hierbei unterschiedliche Luftkonzentrationen im selben Stall erfasst, was eine Standardisierung nicht ermöglichte. Der Grund für die unterschiedlichen Luftkonzentrationen von Ammoniak im Stall lag möglicherweise an der unterschiedlichen Luftzirkulation an bestimmten Stellen des Stalls. So liefern Messgeräte in der Nähe einer Tür oder eines Fensters geringere Ammoniakkonzentrationen als in der Nähe eines Nutztiers oder Nahe der Güllegrube. Um dennoch verwertbare Ergebnisse zu erhalten, wurde aus den beiden im (selben) Stall erhobenen Werten ein Mittelwert berechnet und mit den zu untersuchenden Parametern in Relation gestellt.

Auch zwischen den verschiedenen Ställen wurden unterschiedliche Konzentrationen gemessen. So variierten die Werte zwischen 0,4 ppm (0,52 mg/m³) bis 18,2 ppm (12,75 mg/m³). Diese

Konzentrationen lagen jedoch alle unter dem aktuellen MAK-Wert für Ammoniak von 20 ppm (=14 mg/m³).

In zukünftigen Studien sollte eine Methodik entwickelt werden, um die Ammoniakmessung auch in unterschiedlichen Ställen vergleichen zu können. So sollten mehr Messungen an verschiedenen Punkten im Stall durchgeführt werden und die Lokalisation der Messgeräte, sowie Fenster, Türen und Nutztiere in einer Karte protokolliert werden. Auch der Einsatz von Personalsamplern für Ammoniak wäre zu überlegen, da hiermit die individuelle Belastung im Arbeitsbereich während der normalen Arbeitszeit gemessen werden könnte.

2.3 Diskussion der Kohlendioxidkonzentrationen in den untersuchten Ställen

Um Zusammenhänge zwischen hohen Kohlendioxidkonzentrationen im Stall und den von uns untersuchten Parametern darzustellen, wurde eine Messung der Kohlenstoffdioxidkonzentration an einer Stelle im Stall in Kopfhöhe durchgeführt.

Die Kohlendioxidkonzentrationen variierten stark zwischen den einzelnen Ställen. So wurden Konzentrationen von 600 ppm bis 3100 ppm notiert. Diese lagen unter dem MAK Wert von 5000 ppm. Es wurde keine Korrelation zwischen einem von uns untersuchten Parameter und Kohlendioxid gefunden.

Allerdings ist Kohlendioxid selten die Ursache für adverse gesundheitliche Reaktionen am Menschen und erreicht im Stall selten Konzentrationen über 5000 ppm [36].

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1 Lungenfunktion

Die von uns untersuchten Lungenfunktionsparameter waren nicht pathologisch verändert.

Bei den Landwirten kam es nach Exposition zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg der $V_{C_{insp}}$, der FEV_1 und des MEF_{50} . Die Kontrollgruppe zeigte keinerlei signifikante Veränderung nach körperlicher Belastung auf dem Fahrradergometer. Dennoch stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der prozentualen Veränderung der Lungenfunktionsparameter zwischen den beiden Gruppen dar.

Generell wurde in anderen Untersuchungen ein Abfall der FEV_1 und der FVC nach Exposition in Ställen festgestellt [10, 11, 35, 48, 98]. Der von uns beobachtet Anstieg könnte auf der tageszeitlichen Rhythmik beruhen, da die Lungenfunktionsparameter wie FEV_1 , FVC und PEF physiologisch zwischen

5.00 und 12.00 Uhr langsam ansteigen, um mittags ein Maximum zu erreichen [8, 88]. In unserer Untersuchung wurde die erste Spirometrie um ca. 6.00 Uhr durchgeführt. Die zweite Spirometrie folgte nach Exposition zwischen 8.00 und 9.00 Uhr, also in einem Zeitbereich, in dem sich die Lungenfunktionswerte physiologischerweise langsam erhöhen. Da unsere Expositionen im Vergleich zu anderen Studien relativ kurz waren (ca. 60 Minuten), wäre zudem nur ein geringer Abfall der Lungenfunktion zu erwarten gewesen.

Die nasalen Epithelzellen korrelierten signifikant negativ mit $FEV_1(\%)$ ($p_{sp}=0,035$) und $MEF_{50}(\%)$ ($p_{sp}=0,014$). So könnte die Zahl der Epithelzellen in der Nasallavage als ein Indikator für die Lungenfunktion benutzt werden. Bei hohen Zahlen von Epithelzellen in der Nasallavage wäre auch das FEV_1 und die MEF_{50} vermindert und somit die Lungenfunktion beeinträchtigt. Dies müsste jedoch in weiteren Studien mit höheren Fallzahlen überprüft werden.

3.2 Peripheres Blutbild

Im Differentialblutbild konnte ein hochsignifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten nach Exposition gemessen werden ($p_w= 0,003$). In vielen anderen Studien wurde ebenfalls ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. So untersuchten Cormier et al. 1997 sieben Freiwillige auf Auswirkungen von wiederholter Exposition in Schweineställen und konnte im Blutbild einen Anstieg der Leukozyten ausmachen, der zum größten Teil durch neutrophile Granulozyten hervorgerufen wurde [10]. 2000 untersuchten Cormier et al. acht gesunde Probanden, die einmal pro Woche für vier Stunden in jeweils acht verschiedenen Schweineställen exponiert wurden. Auch hier stiegen die Leukozyten stark nach Exposition an [11].

Larson et al. (2002) exponierten 16 gesunde Freiwillige für drei Stunden während des Wägens von Schweinen; einer Tätigkeit, die zu sehr starkem Staubaufkommen führt. Sowohl in der Gruppe mit, als auch in der Gruppe ohne Atemschutz kam es zu erhöhten Konzentrationen von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blutbild, allerdings war die Erhöhung in der Gruppe ohne Atemschutz signifikant höher als in der Gruppe ohne Atemschutz [41].

Michel et al. (2003) verglich die systemische Antwort auf Lipopolysaccharide mit genetischen Polymorphismen und exponierte 118 Freiwillige mit LPS. Auch hier konnte nach bereits drei Stunden ein Anstieg der Leukozyten gemessene werden, das Maximum war sechs Stunden nach Exposition erreicht [49].

Die Lymphozyten fielen in unserer Arbeit ab, was wohl am ehesten mit einer Verschiebung zugunsten der neutrophilen Granulozyten zu erklären ist.

In anderen Studien lässt sich nur wenig über Lymphozyten finden, meist werden Leukozyten und neutrophile Granulozyten untersucht. Thorn et al. (1998) beschrieben in einer Studie mit Arbeitern in der Müllverwertung im Gegensatz zu uns einen Anstieg der Lymphozyten mit zunehmender Konzentration an (1→3)-β-glucan, einem Zellwandbestandteil von Pilzen, sowie bestimmten Bakterien und Pflanzen. Da die Exposition in dieser Studie aus einem hohen Anteil (1→3)-β-glucan und nur zu einem geringen Teil aus LPS bestand, ist dieses Ergebnis allerdings nur bedingt mit unserem zu vergleichen [93].

Ein geringerer Abfall zeigte sich bei den eosinophilen Granulozyten und Monozyten. In einer Studie von Gladding et al. (2003) wird ein Abfall von Monozyten und eosinophilen Granulozyten beschrieben. Die Autoren vermuten, dass möglicherweise diese beiden Zellreihen von der Lunge rekrutiert worden sind und dorthin abgewandert sind [28]. Auch Thorn et al. (2001) beschrieben ein ähnliches Bild [91].

CRP fiel in unserer Studie leicht ab, obwohl eigentlich einen Anstieg zu erwarten gewesen wäre. Jedoch steigt CRP wesentlich langsamer an als z.B. die Leukozyten [49]. Eine frühere Studie von Michel et al. zeigte einen CRP Anstieg erst nach 6 Stunden [48], unser Versuchsaufbau unterschritt dieses Zeitfenster um 3 Stunden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten eine Veränderung des Differentialblutbildes sowohl der Landwirte nach Stallarbeit als auch im Bürokollektiv nach Ergospirometrie. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Veränderungen zum Teil im direkten Zusammenhang mit der körperlichen Belastung zusammenhängen. Im einzelnen konnte ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten und ein Abfall von Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Monozyten und CRP festgestellt werden, wobei die deutlichsten Veränderungen bei den neutrophilen Granulozyten und bei den Lymphozyten gemessen wurden. Die Veränderung über die Exposition fiel in der Gruppe der Landwirte stärker aus als im Bürokollektiv, sodass nicht von einer rein durch körperliche Belastung verursachten Veränderung ausgegangen werden kann. So stand einer prozentualen Veränderung der neutrophilen Granulozyten von 19,83% ein Anstieg von 7,73% bei den Kontrollen gegenüber. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant verschieden, was mit der geringen Fallzahl zusammenhängen könnte.

Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Endotoxinkonzentration im Stall und der Leukozytenzahl im Serum nach Exposition ($p_{sp} = 0,03$) gemessen werden. Dies deutet

darauf hin, dass die Blutbildveränderungen nicht ausschließlich auf eine körperliche Belastung zurückzuführen waren.

Um den Zusammenhang zwischen Endotoxinkonzentration und Blutbildparameter verifizieren zu können, wäre ein größeres Untersuchungskollektiv hilfreich, da so auch bei geringeren Unterschieden eine statistische Signifikanz geprüft werden könnte.

3.3 Nasallavage

Es ergab sich ein signifikant geringerer Anteil der neutrophilen Granulozyten nach Exposition ($p_w=0,04$) in der Gruppe der Landwirte, sonst stellten wir keinerlei signifikante Veränderungen durch die Exposition fest. Im Gegensatz zu unserem Ergebnis fanden verschiedene Autoren einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten nach Exposition als Zeichen einer Entzündungsreaktion. Zudem stand unser Ergebnis im Widerspruch zum Blutbild, da hier die neutrophilen Granulozyten anstiegen.

In Arbeiten von Cormier et al. an kleinen Gruppen von Freiwilligen ($n=7-9$) zeigten sich Erhöhungen der neutrophilen Granulozyten nach Exposition im Schweinestall [10-12].

Douwes et.al. untersuchten Kompostarbeiter auf Entzündungsreaktionen der oberen Atemwege und fanden in deren Nasallavage nach Exposition einen signifikant erhöhten Anteil der neutrophilen Granulozyten und einen entsprechend erniedrigten Anteil der Epithelzellen [22].

Ebenso konnte Heldal et al. 2003 bei 31 Müllarbeitern, die sie über einer Woche untersuchten, einen signifikanten Anstieg von neutrophilen Granulozyten zum Ende der Woche zeigen [31].

Wouters et al. (2002) verglichen 47 Müllverarbeiter mit 15 Kontrollen über eine Arbeitswoche und konnten ebenfalls am Ende der Woche eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Zellzahl, bestehend hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten, in der Nasallavage finden [103].

Weitere Studien zeigen ein ähnliches Bild [41, 82, 98].

Diese Diskrepanz unseres Ergebnisses zu den Ergebnissen anderer Autoren könnte damit zusammenhängen, dass wir bei drei Probanden einen massiven Abfall der neutrophilen Granulozyten feststellten, der mit einem Messfehler zusammenhängen könnte, jedoch konnte dies im Nachhinein nicht mehr rekonstruiert werden. Schloss man diese drei Fälle aus der Berechnung aus, so ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Anteil der neutrophilen Granulozyten vor und nach Exposition.

Dem entspricht ein Tierversuch an 29 Schweinen. Hier konnte in der Zellzusammensetzung der Nasallavage nach Exposition mit LPS keine Veränderung festgestellt werden, während in der Bronchiallavage Makrophagen und Lymphozyten anstiegen [95].

Der Trend unserer Untersuchung zur Abnahme der neutrophilen Granulozyten in der Nasallavage über die Exposition könnte möglicherweise auch an einer ständigen chronischen Entzündung der Nasenschleimhaut liegen, welche durch organische Stäube verursacht wurde, so dass keine akuten inflammatorischen Reaktionen auszulesen waren. Tim Müller untersuchte 2004 die akuten Auswirkungen einer Kompoststaubexposition bei Studenten und konnte einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Blutbild messen. Beim Umgraben von Kies kam es zu keinem Anstieg. Da die Studenten im Gegensatz zu Landwirten nicht chronisch mit organischem Staub exponiert waren, legt dies die Vermutung nahe, dass es bei den Landwirten zu einer Toleranz gegenüber der Exposition mit organischem Staub kam [54].

Auch der Abstand zwischen beiden Untersuchungen könnte zu intraindividuellen Veränderungen geführt haben, die zu solch starken Verschiebungen der neutrophilen Granulozyten geführt haben könnte. Der Kontrolltag lag meist zwei Tage zurück. Falls der Proband am Vorabend oder in der Nacht anderen Expositionsreizen ausgesetzt war, die zu einer nasalen Neutrophilie oder Neutropenie geführt hätten, so hätte dies unser Ergebnis verfälscht.

Hier wirkte sich nachteilig aus, dass es in dieser Versuchsanordnung nicht möglich war, mehrere Nasallavagen an einem Tag durchzuführen, ohne dass mögliche Irritationen der Nasenschleimhaut durch die häufigen Lavagen Einfluss auf unsere Messgrößen genommen hätten. Mit einem System, das eine Untersuchung der Zellpopulationen der Nasenschleimhaut kurz aufeinander folgend ermöglichen würde, könnten derartige Schwankungen weitgehend ausgeschlossen werden. Dennoch konnte in einer Arbeit von Howarth et al. (2005) gezeigt werden, dass die Nasallavage auch im Vergleich mit anderen Messmethoden, wie zum Beispiel der nasalen Biopsie oder der nasalen NO Messung eine einfache, schnelle, kostengünstige und gut tolerable Methode ist, um nasale Entzündungsreaktionen darzustellen. Er räumt jedoch ein, dass noch weitere Studien folgen sollten, um die Variabilität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse weiter zu validieren [34].

In unserer Untersuchung konnte zwischen den Makrophagen in der Nasallavage und der Endotoxinkonzentration gemessen über den Personalsampler ein enger Zusammenhang gezeigt werden. Es scheint also, dass hier, ausgelöst durch höhere Konzentrationen an Endotoxin während der Exposition, eine chronische Entzündungsreaktion in der Nase hervorgerufen wurde und vermehrt

Makrophagen zum Abtransport der Staubpartikel in die Nase eingewandert sind. Man kann daher annehmen, dass, je höher die Endotoxinbelastung ausfällt, desto mehr Makrophagen in der Nasallavage auffindbar sind.

In der Literatur findet sich bisher keine Arbeit, in der ein ähnlicher Zusammenhang dargestellt wurde, jedoch wurden im Laborversuchen nach LPS-Exposition nasale Fibroblasten zu Produktion und Sezernierung von Granulozyten/Makrophagen colony-stimulating factor (GM-CSF) stimuliert [59, 60, 104].

Es korrelierten die nasalen Makrophagen mit der Höhe der IL-6 Konzentration im Serum (n=17; r=0,588; p=0,013). Dies war pathophysiologisch zu erwarten, da Makrophagen IL-6 im Rahmen von Entzündungsreaktion, wie etwa der Akut-Phase-Reaktion, produzieren.

Ebenso konnte eine enge positive Korrelation der Epithelzellenzahl in der Nasallavage und der Endotoxinkonzentration sowie eine negative Korrelation mit TNF- α gezeigt werden. Mit zunehmender Endotoxinkonzentration fanden wir auch eine zunehmende Zahl von Epithelzellen in der Nasallavage, aber eine niedrigere Konzentration von TNF- α im Serum. Die Erniedrigung des TNF- α könnte mit der Sekretion von IL-6 aus den Makrophagen zusammenhängen, da IL-6 die Produktion von TNF- α inhibiert.

3.4 Zytokinbefunde im Plasma und in der Nasallavage

Im Blutplasma der Probanden wurden die Zytokine ENA-78, IL-6 und TNF- α mittels ELISA bestimmt. Da bei verschiedenen Untersuchungen mit Landwirten nach Endotoxinexposition eine Erhöhung der Zytokine festgestellt werden konnte, sollte dies in unserem Modell überprüft werden. Wir konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen messen. Ursächlich könnte hier die Größe unseres Kollektivs angenommen werden, wobei viele andere Autoren ebenfalls Kollektive kleiner als 25 Personen untersuchten und Veränderungen der Zytokine feststellen konnten.

So untersuchten Wang et al. (1997) 22 gesunde Freiwilligen, die akut Schweinestaub ausgesetzt worden sind, wobei neben allgemeinen Symptomen wie Fieber und anderen Symptomen die Interleukine IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , und IL-6 in der broncho-alveolären Lavage und in der Nasallavage signifikant anstiegen [98]. In einer Studie, die Wang et al. (1996) zuvor an 14 Freiwilligen durchführten, konnten sie einen Anstieg für TNF- α und IL-6 im Blutplasma darstellen [100]. In vitro-Versuche von Wang (1999) an humanen Alveolarmakrophagen zeigten ebenfalls einen Dosis-abhängigen Anstieg der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-a, produziert von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen [82, 99].

Sigsgaard et al. (2000) konnten in ihrer Arbeit über in-vitro Zytokinfreisetzung aus der nasalen Mukosa und dem Blut einen deutlich signifikanten Anstieg von TNF- α , IL-1b, IL-6 und IL-8 im Blutplasma zeigen. In der nasalen Schleimhaut erhöhten sich zunächst IL-6 und IL-8 nach drei Stunden, und nach sechs Stunden folgten auch TNF- α und IL-1 β [82]. Da in unserer Arbeit die Nasallavage drei Stunden nach Exposition durchgeführt worden ist, erklärt sich der geringe Anstieg von TNF- α in unserer Studie. Allerdings wäre dennoch ein Anstieg von IL-6 zu erwarten gewesen.

Dosman et al. (2000) untersuchten Freiwillige auf Effekte von Atemschutzmasken während Aufenthalt in Schweineställen und konnte höhere Konzentrationen von IL-8 und IL-6 bei Probanden ohne Atemschutz in der nasalen Schleimhaut messen. Im Serum stiegen die IL-6 Konzentrationen bei Probanden ohne Atemschutz an [21].

Auch bei Flachsverarbeitern in Polen wurde nach Exposition mit organischem Staub ein Anstieg von IL-1 α und IL-6 gemessen, TNF- α blieb jedoch unverändert [85].

In einer Studie von Senthilselvan et al. (1997) wurde Rapsöl in Schweineställen versprüht, um somit geringere Staubbelastungen zu erhalten. In der Nasallavage der Probanden, die in Schweineställen ohne Rapsöl exponiert wurden, waren IL-1b, IL-6 und IL-8 hoch signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Serum konnte nur eine signifikante Erhöhung von IL-6 gemessen werden [81].

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem unserer Studie. Wir konnten einen grenzwertig signifikanten ($p=0,056$) Zusammenhang zwischen der Konzentration von IL-6 im Serum und der Höhe der Endotoxinbelastung im Stall belegen.

Die Überprüfung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS auf nasale Zytokine konnte für IL-6 zeigen, dass bei höheren LPS-Konzentrationen auch eine höhere Konzentration an IL-6 gemessen werden kann [15]. Cormier et al.(2000) untersuchten verschiedene Schweineställe und konnten bei den acht untersuchten Probanden nach vierstündiger Exposition einen Anstieg von IL-6 feststellen [11].

Somit ist anzunehmen, dass Veränderungen der Zytokine durch die Exposition mit organischem Staub hervorgerufen werden können.

Um in Zukunft klarere Aussagen zu erhalten, sollten an einer größeren Probandengruppe ähnliche Versuche durchgeführt werden und möglicherweise der Zeitraum zwischen Exposition und Blutabnahme vergrößert werden, da hier bereits 3 Stunden nach Exposition das Blutbild untersucht wurde. Möglicherweise handelte es sich dabei um ein zu kleines Zeitfenster. Eventuell führt auch eine hochsensible PCR anstelle der ELISA zur Zytokinbestimmung zu deutlicheren Ergebnissen, obwohl

sich in anderen Untersuchungen gezeigt hat, dass die ELISA über ausreichende Sensitivität verfügt, um hier Aussagen zu treffen [11, 15, 66].

G. Methodische Schwächen

1. Fallzahl und Gruppenhomogenität

Die kleine Fallzahl der hier untersuchten Landwirte macht eine Interpretation der Ergebnisse schwierig. Zudem ist es uns nicht gelungen einen vergleichbaren Anteil von Nicht-Rauchern in der Kontrollgruppe zu akquirieren. Dies erschwert einen Vergleich der beiden Gruppen in Hinblick auf Lungenfunktionsdiagnostik, sowie Nasallavage und systemischen Entzündungszeichen, da diese auf Grund des Faktors „Rauchen“ verändert sein könnte. Dennoch lässt es eine Interpretation der Veränderung innerhalb der Gruppe der Landwirte zu. So kann, zum Beispiel, der von uns gemessene Anstieg der VC_{insp} , der FEV_1 , und des MEF_{50} in der Lungenfunktion nicht durch den Faktor „Raucher“ ausreichend erklärt werden. Vielmehr nehmen wir an, dass es sich hier wohl um eine Verzerrung aufgrund einer zirkadianen Rhythmik handeln könnte [8, 88], wie im nächsten Abschnitt noch erläutert wird.

2. Untersuchungszeitraum

Aufgrund von organisatorischen Problemen war es nicht möglich die Untersuchungen der Landwirte zu einer bestimmten Uhrzeit durchzuführen. Die Landwirte gingen zu unterschiedlichen Zeiten in ihre Ställe, so dass letztlich zu verschiedensten Uhrzeit untersucht wurde.

Die Untersuchung der Gruppe der Büroangestellten konnte zwar immer zur gleichen Uhrzeit vollzogen werden, jedoch war es nicht möglich das Bürokollektiv ähnlich früh wie das Kollektiv der Landwirte zu untersuchen.

Wie oben bereits erläutert, könnte es auch hier zu einer Verzerrung der Daten aufgrund von zirkadianen Unterschieden in der Ausschüttung der Zytokine [106] oder der Lungenfunktion [8, 88] kommen. Daher sollte in zukünftigen Studien auf einen standardisierten Untersuchungszeitpunkt geachtet werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

3. Ausreißer

In der Untersuchung der Nasallavage stellten wir einen signifikanten Abfall des prozentualen Anteils der Neutrophilen Granulozyten fest, was im Gegensatz zu anderen Untersuchungen stand. Obwohl bei der Zellenaufbereitung und Zellzählung sehr sorgsam gearbeitet wurde, und auf ein hohes Maß an

Reproduzierbarkeit geachtet wurde, schließen wir dennoch nicht aus, dass es sich bei diesem Ergebnis auch um einen Messfehler handeln könnte, da nur zwei unsere Proben erhöhte Werte hatten. Dabei waren die Ausreißer ca. 3 mal so hoch, wie die üblichen Werte bei den anderen Probanden, was dennoch noch im Bereich des plausiblen läge, hätten die betreffenden Probanden z.B. eine akute Entzündungsreaktion der Nase zum Untersuchungszeitraum gehabt.

H. Ausblick

Die chronische Exposition mit organischem Staub kann, wie in vielen Studien gezeigt, zu nachhaltigen Atemwegserkrankungen führen. Unsere Studie konnte diesen Einfluss durch den Nachweis von entzündlichen Veränderungen in Nasenschleimhaut und Blut nach Exposition bestätigen, während nach akuter Exposition (Studie Tim Müller), keine Veränderung in der Nasenschleimhaut nachweisbar war [54].

Die Nasallavage erwies sich als ein flexibles nicht-invasives Verfahren zur Untersuchung von beruflich exponierten Personen am Arbeitsplatz.

Es empfiehlt sich, die in unserem Versuch gewonnenen Ergebnisse an einer größeren Gruppe zu verifizieren und das Versuchsprotokoll im Hinblick auf den Zeitpunkt der Nachuntersuchung zu überarbeiten. So würde eine Nachuntersuchung 5 Stunden nach Exposition möglicherweise zu einem erweiterten Erkenntnisgewinn bezogen auf die Untersuchung der Zytokine führen.

I. Zusammenfassung

Landwirte sind durch ihr Arbeitsumfeld einer erhöhten Konzentration von organischem Staub, insbesondere Endotoxinen im Stall, bei erhöhtem Lungenminutenvolumen durch körperliche Arbeit ausgesetzt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, unter Berücksichtigung der Endotoxinkonzentrationen das broncho-pulmonale System auf Entzündungsreaktionen zu untersuchen. Insbesondere war hier die nasale Lavage von Interesse, da hierbei durch eine nicht-invasive Untersuchungstechnik Rückschlüsse auf den Zustand des Respirationstraktes gezogen werden können.

Zum Vergleich und um Aussagen über systemische Entzündungsreaktionen zu erhalten, wurden ausgewählte Entzündungsparameter im peripheren, venösen Blut quantitativ bestimmt.

Die Untersuchung erfolgte an zwei Kollektiven gesunder Probanden. Es wurden 21 Landwirte mit 24 nicht beruflich exponierten Personen verglichen und das Auftreten von respiratorischen und allergischen Symptomen nach Exposition erfasst. Des Weiteren wurden eine Lungenfunktionsuntersuchung, eine Blutabnahme und eine Nasallavage zur Evaluierung der häufigsten Blut- und Entzündungsparameter durchgeführt. Im Plasma wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und ENA-78 bestimmt. Zusätzlich wurde Endotoxin personenbezogen gemessen sowie die Kohlendioxid- und Ammoniakkonzentrationen im Stall ortsfest bestimmt. Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Windgeschwindigkeit im Stall wurden vor Ort am Expositionstag ermittelt.

Die gemessenen Endotoxin Konzentrationen lagen im Bereich von 0,9 EU/m³ bis 20816,3 EU/m³.

Die Lungenfunktionswerte zeigten eine signifikante Erhöhung über die Stallarbeit. VC_{insp} (vor Expo: 107,7 \pm 3,7 %; nach Expo: 112,4 \pm 3,7 %; p_w=0,039), FEV₁ (vor Expo: 111,2 \pm 4,0 %; nach Expo: 114,6 \pm 3,8 %; p_w=0,042), und MEF₅₀ (vor Expo: 82,0 \pm 7,5 %; nach Expo: 88,1 \pm 6,2 %; p_w=0,044) stiegen signifikant an.

Die Analyse des Differentialblutbildes zeigte das Bild einer Entzündungsreaktion nach Exposition. Es erhöhte sich signifikant der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten (vor Expo: 52,7 \pm 1,6 %; nach Expo: 62,9 \pm 1,6 %; p_w=0,003). Lymphozyten fielen von 35 \pm 1,56 % auf 27,5 \pm 1,3 % ab (p_w=0,003), eosinophile Granulozyten fielen von 3,5 \pm 0,4 % auf 7,3 \pm 0,3 % (p_w=0,013), Monozyten von 8,4 \pm 0,5 % auf 7,3 \pm 0,3 % (p_w=0,012), CRP von 0,2 \pm 0,04 mg/dl auf 0,15 \pm 0,04 mg/dl

($p_w=0,011$). Auch in der Kontrollgruppe kam es zu einer ähnlichen, ebenfalls signifikanten Veränderung, diese war jedoch geringer ausgeprägt.

Für die Zytokine im Serum zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung über die Exposition. Jedoch ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen der IL-6 Konzentration im Serum und der Höhe der Endotoxinbelastung im Stall. Dieser Zusammenhang war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,056$).

Bei Betrachtung der Zelldifferenzierung der Nasallavage konnte ein geringer, aber signifikanter Abfall der Anteile der neutrophilen Granulozyten (vor Expo: $88 \pm 5,7$ %; nach Expo: $77 \pm 8,7$ %; $p_w=0,047$) festgestellt werden. Außerdem ergab sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Endotoxinkonzentration und der nasalen Makrophagen ($p_{sp}=0,0001$), sowie der nasalen Epithelzellen ($p_{sp}=0,022$).

Im Hinblick auf unsere Anfangs gewählte Fragestellung deutet unser Ergebnis an, dass eine Exposition gegenüber organischem Staub, insbesondere Endotoxin, zu einer Neutrophilie im Serum führen kann und bei hohen inhalierten Endotoxinkonzentrationen auch vermehrt Makrophagen in der Nasenschleimhaut rekrutiert werden.

Da sowohl die Lungenfunktionsparameter, als auch die systemischen (Serum) und lokalen (Nasallavage) Entzündungszeichen das Bild einer Entzündungsreaktion zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass die Lungenfunktion, sowie die systemischen und lokalen Messmethoden über ausreichende Sensitivität verfügen, um in diesem Studiendesign Entzündungsreaktionen nachzuweisen.

Die Nasallavage konnte im Feldversuch als eine objektive, kostengünstige, schnelle und gut tolerable Messmethode zur Darstellung von nasalen Entzündungsreaktionen etabliert werden.

J. Literaturverzeichnis

1. Abel, G. and J.K. Czop, *Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta*. Int J Immunopharmacol, 1992. **14**(8): p. 1363-73.
2. Akira, S., T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, *Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)*. Faseb J, 1990. **4**(11): p. 2860-7.
3. Allmann-Iselin, I., B.D. Car, R.D. Zwahlen, R. Mueller-Schupbach, M. Wyder-Walther, U. Steckholzer, and A. Walz, *Bovine ENA, a new monocyte-macrophage derived cytokine of the interleukin-8 family. Structure, function, and expression in acute pulmonary inflammation*. Am J Pathol, 1994. **145**(6): p. 1382-9.
4. Baraniuk, J.N., M. Ali, and K. Naranch, *Hypertonic saline nasal provocation and acoustic rhinometry*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(4): p. 543-50.
5. Becker, S., J. Quay, and J. Soukup, *Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(12): p. 4307-12.
6. Beutler, B. and A. Cerami, *Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 505-18.
7. Blackwell, T.S. and J.W. Christman, *Sepsis and cytokines: current status*. Br J Anaesth, 1996. **77**(1): p. 110-7.
8. Borsboom, G.J., W. van Pelt, H.C. van Houwelingen, B.G. van Vianen, J.P. Schouten, and P.H. Quanjer, *Diurnal variation in lung function in subgroups from two Dutch populations: consequences for longitudinal analysis*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(4 Pt 1): p. 1163-71.
9. Chang, C.W., H. Chung, C.F. Huang, and H.J. Su, *Exposure assessment to airborne endotoxin, dust, ammonia, hydrogen sulfide and carbon dioxide in open style swine houses*. Ann Occup Hyg, 2001. **45**(6): p. 457-65.
10. Cormier, Y., C. Duchaine, E. Israel-Assayag, G. Bedard, M. Laviolette, and J. Dosman, *Effects of repeated swine building exposures on normal naive subjects*. Eur.Respir.J., 1997. **10**(7): p. 1516-1522.
11. Cormier, Y., E. Israel-Assayag, G. Racine, and C. Duchaine, *Farming practices and the respiratory health risks of swine confinement buildings*. Eur Respir J, 2000. **15**(3): p. 560-5.
12. Cormier, Y., M. Laviolette, G. Bedard, J. Dosman, and E. Israel-Assayag, *Effect of route of breathing on response to exposure in a swine confinement building*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(5 Pt 1): p. 1512-21.
13. Costerton, J.W., J.M. Ingram, and K.J. Cheng, *Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria*. Bacteriol Rev, 1974. **38**(1): p. 87-110.
14. Danuser, *Endotoxine in Arbeitsumfeld und Umwelt*. Kongressbeitrag, 1999.
15. Danuser, B., H. Rebsamen, C. Weber, and H. Krueger, *Lipopolysaccharide-induced nasal cytokine response: a dose-response evaluation*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2000. **257**(10): p. 527-32.
16. Diaz-Sanchez, D., M. Jyrala, D. Ng, A. Nel, and A. Saxon, *In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans*. Clin Immunol, 2000. **97**(2): p. 140-5.
17. Dinarello, C.A., *Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed*. J Endotoxin Res, 2004. **10**(4): p. 201-22.
18. Donham, K.J., D. Cumro, and S. Reynolds, *Synergistic effects of dust and ammonia on the occupational health effects of poultry production workers*. J Agromedicine, 2002. **8**(2): p. 57-76.
19. Donham, K.J., D. Cumro, S.J. Reynolds, and J.A. Merchant, *Dose-response relationships between occupational aerosol exposures and cross-shift declines of lung function in poultry workers: recommendations for exposure limits*. J Occup Environ Med, 2000. **42**(3): p. 260-9.
20. Donham, K.J., S.J. Reynolds, P. Whitten, J.A. Merchant, L. Burmeister, and W.J. Pendorf, *Respiratory dysfunction in swine production facility workers: dose-response relationships of environmental exposures and pulmonary function*. Am J Ind Med, 1995. **27**(3): p. 405-18.
21. Dosman, J.A., A. Senthilselvan, S.P. Kirychuk, S. Lemay, E.M. Barber, P. Willson, Y. Cormier, and T.S. Hurst, *Positive human health effects of wearing a respirator in a swine barn*. Chest, 2000. **118**(3): p. 852-60.

22. Douwes, J., I. Wouters, H. Dubbeld, L. van Zwieten, P. Steerenberg, G. Doekes, and D. Heederik, *Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: A relation with bio-aerosol exposure*. Am J Ind Med, 2000. **37**(5): p. 459-68.
23. Entzian, P., K. Linnemann, M. Schlaak, and P. Zabel, *Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(3): p. 1080-6.
24. EUROSTAT, *Zahl und Inzidenzrate (je 100 000 Beschäftigte) der Berufskrankheiten nach Wirtschaftszweig, Krankheit (ICD-10) und Geschlecht. Der verbindlichen EODS Liste*. 2002, EUROSTAT.
25. Finkelstein, J.N., C. Johnston, T. Barrett, and G. Oberdorster, *Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine expression*. Environ Health Perspect, 1997. **105 Suppl 5**: p. 1179-82.
26. Frischer, T. and E. Baraldi, *Upper airway sampling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(2 Pt 2): p. S28-30.
27. Gifford, G.E. and D.H. Duckworth, *Introduction to TNF and related lymphokines*. Biotherapy, 1991. **3**(2): p. 103-11.
28. Gladding, T., J. Thorn, and D. Stott, *Organic dust exposure and work-related effects among recycling workers*. Am J Ind Med, 2003. **43**(6): p. 584-91.
29. Hartung, J., J. Seedorf, T. Trickl, and H. Gronauer, *[Emission of particulates from a pig farm with central air exhaust in the pig stall]*. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1998. **105**(6): p. 244-5.
30. Heederik, D., *Toward an occupational exposure limit for endotoxins?* Ann Agric Environ Med, 1997. **4**, **17-19**: p. 17-19.
31. Haldal, K.K., A.S. Halstensen, J. Thorn, P. Djupesland, I. Wouters, W. Eduard, and T.S. Halstensen, *Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols*. Occup Environ Med, 2003. **60**(6): p. 444-50.
32. Heller, R.F. and M.C. Kelson, *Respiratory disease Mortality in Agricultural workers in eight member countries of the European community*. Int J Epidemiol, 1982. **11**(2): p. 170-4.
33. Hessel, H., *Effekte von Alveolarstaubpartikel auf Entzündungsmarker in oberen und unteren Atemwegen*. Dissertation, 2004.
34. Howarth, P.H., C.G. Persson, E.O. Meltzer, M.R. Jacobson, S.R. Durham, and P.E. Silkoff, *Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3 Pt 2): p. S414-41.
35. Jagielo, P.J., P.S. Thorne, J.L. Watt, K.L. Frees, T.J. Quinn, and D.A. Schwartz, *Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects*. Chest, 1996. **110**(1): p. 263-70.
36. Kirkhorn, S.R. and V.F. Garry, *Agricultural lung diseases*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 4**: p. 705-12.
37. Kogevinas, M., J.M. Anto, J. Sunyer, A. Tobias, H. Kromhout, and P. Burney, *Occupational asthma in Europe and other industrialised areas: a population-based study*. European Community Respiratory Health Survey Study Group. Lancet, 1999. **353**(9166): p. 1750-4.
38. Kullman, G.J., P.S. Thorne, P.F. Waldron, J.J. Marx, B. Ault, D.M. Lewis, P.D. Siegel, S.A. Olenchock, and J.A. Merchant, *Organic dust exposures from work in dairy barns*. Am Ind Hyg Assoc J, 1998. **59**(6): p. 403-13.
39. Laitinen, S., J. Kangas, K. Husman, and P. Susitaival, *Evaluation of exposure to airborne bacterial endotoxins and peptidoglycans in selected work environments*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(2): p. 213-9.
40. Lane, S.R., P.J. Nicholls, and R.D. Sewell, *The Measurement and Health Impact of Endotoxin Contamination in Organic Dusts from Multiple Sources: Focus on the Cotton Industry*. Inhal Toxicol, 2004. **16**(4): p. 217-229.
41. Larsson, B.M., K. Larsson, P. Malmberg, and L. Palmberg, *Airways inflammation after exposure in a swine confinement building during cleaning procedure*. Am J Ind Med, 2002. **41**(4): p. 250-8.
42. Levin, J. and F.B. Bang, *A Description Of Cellular Coagulation In The Limulus*. Bull Johns Hopkins Hosp, 1964. **115**: p. 337-45.
43. Linaker, C. and J. Smedley, *Respiratory illness in agricultural workers*. Occup Med (Lond), 2002. **52**(8): p. 451-9.
44. Lissoni, P., F. Rovelli, F. Brivio, O. Brivio, and L. Fumagalli, *Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans*. Nat Immun, 1998. **16**(1): p. 1-5.
45. Lombardo, L.J. and J.R. Balmes, *Occupational asthma: a review*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 4**: p. 697-704.

46. Malmberg, P., A. Rask-Andersen, S. Hoglund, B. Kolmodin-Hedman, and J. Read Guernsey, *Incidence of organic dust toxic syndrome and allergic alveolitis in Swedish farmers*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1988. **87**(1): p. 47-54.
47. Mastrangelo, G., M. Tartari, U. Fedeli, E. Fadda, and B. Saia, *Ascertaining the risk of chronic obstructive pulmonary disease in relation to occupation using a case-control design*. *Occup Med (Lond)*, 2003. **53**(3): p. 165-72.
48. Michel, O., M. Dentener, F. Corazza, W. Buurman, and R. Rylander, *Healthy subjects express differences in clinical responses to inhaled lipopolysaccharide that are related with inflammation and with atopy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**(5): p. 797-804.
49. Michel, O., T.D. LeVan, D. Stern, M. Dentener, J. Thorn, D. Gnat, M.L. Beijer, P. Cochaux, P.G. Holt, F.D. Martinez, and R. Rylander, *Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(5): p. 923-9.
50. Michel, O., A.M. Nagy, M. Schroeven, J. Duchateau, J. Neve, P. Fondu, and R. Sergysels, *Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(4 Pt 1): p. 1157-64.
51. Moloczniak, A., *Time of farmers' exposure to biological factors in agricultural working environment*. *Ann Agric Environ Med*, 2004. **11**(1): p. 85-9.
52. Monn, C. and S. Becker, *Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM2.5) and coarse particles (PM10-2.5) in outdoor and indoor air*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. **155**(3): p. 245-52.
53. Moran, J.V., P.A. Greenberger, and R. Patterson, *Long-term evaluation of hypersensitivity pneumonitis: a case study follow-up and literature review*. *Allergy Asthma Proc*, 2002. **23**(4): p. 265-70.
54. Mueller, T., *Untersuchung systemischer Entzündungsreaktionen nach standardisierter Kompostexposition*. Dissertation, 2004.
55. Muller-Suur, C., P.H. Larsson, and K. Larsson, *T-cell activation by organic dust in vitro*. *Respir Med*, 2000. **94**(8): p. 821-7.
56. Naclerio, R.M., P.S. Creticos, P.S. Norman, and L.M. Lichtenstein, *Mediator release after nasal airway challenge with allergen*. *Am Rev Respir Dis*, 1986. **134**(5): p. 1102.
57. Naclerio, R.M., H.L. Meier, N.F. Adkinson, Jr., A. Kagey-Sobotka, D.A. Meyers, P.S. Norman, and L.M. Lichtenstein, *In vivo demonstration of inflammatory mediator release following nasal challenge with antigen*. *Eur J Respir Dis Suppl*, 1983. **128 (Pt 1)**: p. 26-32.
58. Nightingale, J.A., R. Maggs, P. Cullinan, L.E. Donnelly, D.F. Rogers, R. Kinnersley, K. Fan Chung, P.J. Barnes, M. Ashmore, and A. Newman-Taylor, *Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(1): p. 161-6.
59. Nonaka, M., R. Pawankar, F. Saji, and T. Yagi, *Distinct expression of RANTES and GM-CSF by lipopolysaccharide in human nasal fibroblasts but not in other airway fibroblasts*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999. **119**(4): p. 314-21.
60. Nonaka, M., R. Pawankar, F. Saji, and T. Yagi, *Eotaxin synthesis by nasal polyp fibroblasts*. *Acta Otolaryngol*, 1999. **119**(7): p. 816-20.
61. Nordenhall, C., J. Pourazar, A. Blomberg, J.O. Levin, T. Sandstrom, and E. Adelroth, *Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum*. *Eur Respir J*, 2000. **15**(6): p. 1046-51.
62. Nordenhall, C., J. Pourazar, M.C. Ledin, J.O. Levin, T. Sandstrom, and E. Adelroth, *Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects*. *Eur Respir J*, 2001. **17**(5): p. 909-15.
63. Nowak, D., *[Health effects of airborne pollutants, particularly in swine confinement stalls, from the viewpoint of occupational medicine]*. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1998. **105**(6): p. 225-34.
64. Omland, O., *Exposure and respiratory health in farming in temperate zones--a review of the literature*. *Ann Agric Environ Med*, 2002. **9**(2): p. 119-36.
65. Peden, D.B., *The use of nasal lavage for objective measurement of irritant-induced nasal inflammation*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1996. **24**(1 Pt 2): p. S76-8.
66. Purokivi, M., M.R. Hirvonen, M. Roponen, J. Randell, M. Vahteristo, and H. Tukiainen, *Comparison of inflammatory elements in nasal lavage and induced sputum following occupational exposure to moldy-building microbes*. *Inhal Toxicol*, 2002. **14**(6): p. 653-62.
67. Radon, K., B. Danuser, M. Iversen, E. Monso, C. Weber, J. Hartung, K. Donham, U. Palmgren, and D. Nowak, *Air contaminants in different European farming environments*. *Ann Agric Environ Med*, 2002. **9**(1): p. 41-8.
68. Radon, K., S. Garz, A. Riess, F. Koops, E. Monso, C. Weber, B. Danuser, M. Iversen, U. Opravil, K. Donham, J. Hartung, S. Pedersen, and D. Nowak, *[Respiratory diseases in*

- European farmers-II. Part of the European farmers' project]. Pneumologie, 2003. 57(9): p. 510-7.*
69. Radon, K., E. Monso, C. Weber, B. Danuser, M. Iversen, U. Opravil, K. Donham, J. Hartung, S. Pedersen, S. Garz, D. Blainey, U. Rabe, and D. Nowak, *Prevalence and risk factors for airway diseases in farmers--summary of results of the European Farmers' Project. Ann Agric Environ Med, 2002. 9(2): p. 207-13.*
 70. Radon, K. and D. Nowak, *[Respiratory diseases in European farmers. Part 1: Literature review]. Pneumologie, 2003. 57(8): p. 444-8.*
 71. Radon, K., U. Opravil, J. Hartung, D. Szadkowski, and D. Nowak, *Work-related respiratory disorders and farming characteristics among cattle farmers in Northern Germany. Am J Ind Med, 1999. 36(4): p. 444-9.*
 72. Radon, K., C. Weber, M. Iversen, B. Danuser, S. Pedersen, and D. Nowak, *Exposure assessment and lung function in pig and poultry farmers. Occup Environ Med, 2001. 58(6): p. 405-10.*
 73. Rask-Andersen, A., *Organic dust toxic syndrome among farmers. Br J Ind Med, 1989. 46(4): p. 233-8.*
 74. Roponen, M., M. Seuri, A. Nevalainen, J. Randell, and M.R. Hirvonen, *Nasal lavage method in the monitoring of upper airway inflammation: seasonal and individual variation. Inhal Toxicol, 2003. 15(7): p. 649-61.*
 75. Rudell, B., A. Blomberg, R. Helleday, M.C. Ledin, B. Lundback, N. Stjernberg, P. Horstedt, and T. Sandstrom, *Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trap filtered exhaust. Occup Environ Med, 1999. 56(8): p. 527-34.*
 76. Rylander, R., *Lung diseases caused by organic dusts in the farm environment. Am J Ind Med, 1986. 10(3): p. 221-7.*
 77. Rylander, R., *Endotoxin in the environment--exposure and effects. J Endotoxin Res, 2002. 8(4): p. 241-52.*
 78. Rylander, R., N. Essle, and K.J. Donham, *Bronchial hyperreactivity among pig and dairy farmers. Am J Ind Med, 1990. 17(1): p. 66-9.*
 79. Saubolle, M.A. and J.H. Jorgensen, *Use of the Limulus amebocyte lysate test as a cost-effective screen for gram-negative agents of meningitis. Diagn Microbiol Infect Dis, 1987. 7(3): p. 177-83.*
 80. Schenker, M., *Respiratory health hazards in agriculture. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(5 Pt 2): p. S1-S76.*
 81. Senthilselvan, A., Y. Zhang, J.A. Dosman, E.M. Barber, L.E. Holfeld, S.P. Kirychuk, Y. Cormier, T.S. Hurst, and C.S. Rhodes, *Positive human health effects of dust suppression with canola oil in swine barns. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 156(2 Pt 1): p. 410-7.*
 82. Sigsgaard, T., E.C. Bonefeld-Jorgensen, S.K. Kjaergaard, S. Mamas, and O.F. Pedersen, *Cytokine release from the nasal mucosa and whole blood after experimental exposures to organic dusts. Eur Respir J, 2000. 16(1): p. 140-5.*
 83. Simpson, J.C., R.M. Niven, C.A. Pickering, A.M. Fletcher, L.A. Oldham, and H.M. Francis, *Prevalence and predictors of work related respiratory symptoms in workers exposed to organic dusts. Occup Environ Med, 1998. 55(10): p. 668-72.*
 84. Simpson, J.C., R.M. Niven, C.A. Pickering, L.A. Oldham, A.M. Fletcher, and H.C. Francis, *Comparative personal exposures to organic dusts and endotoxin. Ann Occup Hyg, 1999. 43(2): p. 107-15.*
 85. Skorska, C., B. Mackiewicz, and J. Dutkiewicz, *Effects of exposure to flax dust in Polish farmers: work-related symptoms and immunologic response to microbial antigens associated with dust. Ann Agric Environ Med, 2000. 7(2): p. 111-8.*
 86. Skorska, C., B. Mackiewicz, J. Dutkiewicz, E. Krysinska-Traczyk, J. Milanowski, H. Feltovich, J. Lange, and P. Thorne, *Effects of exposure to grain dust in Polish farmers: work-related symptoms and immunologic response to microbial antigens associated with dust. Ann Agric Environ Med, 1998. 5(2): p. 147-53.*
 87. Spaan, S., I.M. Wouters, I. Oosting, G. Doekes, and D. Heederik, *Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. J Environ Monit, 2006. 8(1): p. 63-72.*
 88. Spengler, C.M. and S.A. Shea, *Endogenous circadian rhythm of pulmonary function in healthy humans. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(3 Pt 1): p. 1038-46.*
 89. Stellman, S.D., P. Boffetta, and L. Garfinkel, *Smoking habits of 800,000 American men and women in relation to their occupations. Am J Ind Med, 1988. 13(1): p. 43-58.*
 90. Takano, H., R. Yanagisawa, T. Ichinose, K. Sadakane, S. Yoshino, T. Yoshikawa, and M. Morita, *Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through*

- expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(9): p. 1329-35.
91. Thorn, J., *The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review*. *Inflamm Res*, 2001. **50**(5): p. 254-61.
 92. Thorn, J., L. Beijer, T. Jonsson, and R. Rylander, *Measurement strategies for the determination of airborne bacterial endotoxin in sewage treatment plants*. *Ann Occup Hyg*, 2002. **46**(6): p. 549-54.
 93. Thorn, J., L. Beijer, and R. Rylander, *Airways inflammation and glucan exposure among household waste collectors*. *Am J Ind Med*, 1998. **33**(5): p. 463-70.
 94. Togias, A., K. Lykens, A. Kagey-Sobotka, P.A. Eggleston, D. Proud, L.M. Lichtenstein, and R.M. Naclerio, *Studies on the relationships between sensitivity to cold, dry air, hyperosmolar solutions, and histamine in the adult nose*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **141**(6): p. 1428-33.
 95. Urbain, B., J. Mast, D. Beerens, T.Q. N'Guyen, B. Goddeeris, M. Ansay, and P. Gustin, *Effects of inhalation of dust and endotoxin on respiratory tracts of pigs*. *Am J Vet Res*, 1999. **60**(9): p. 1055-60.
 96. Vogelzang, P.F., J.W. van der Gulden, H. Folgering, D. Heederik, M.J. Tielen, and C.P. van Schayck, *Longitudinal changes in bronchial responsiveness associated with swine confinement dust exposure*. *Chest*, 2000. **117**(5): p. 1488-95.
 97. Walz, A., P. Schmutz, C. Mueller, and S. Schnyder-Candrian, *Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease*. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(5): p. 604-11.
 98. Wang, Z., K. Larsson, L. Palmberg, P. Malmberg, P. Larsson, and L. Larsson, *Inhalation of swine dust induces cytokine release in the upper and lower airways*. *Eur Respir J*, 1997. **10**(2): p. 381-7.
 99. Wang, Z., P. Malmberg, A. Ek, K. Larsson, and L. Palmberg, *Swine dust induces cytokine secretion from human epithelial cells and alveolar macrophages*. *Clin Exp Immunol*, 1999. **115**(1): p. 6-12.
 100. Wang, Z., P. Malmberg, P. Larsson, B.M. Larsson, and K. Larsson, *Time course of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha increase in serum following inhalation of swine dust*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **153**(1): p. 147-52.
 101. White, E.M., *Environmental endotoxin measurement methods: standardization issues*. *Appl Occup Environ Hyg*, 2002. **17**(9): p. 606-9.
 102. Wohlford-Lenane, C.L., D.C. Deetz, and D.A. Schwartz, *Cytokine gene expression after inhalation of corn dust*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 1): p. L736-43.
 103. Wouters, I.M., S.K. Hilhorst, P. Kleppe, G. Doekes, J. Douwes, C. Peretz, and D. Heederik, *Upper airway inflammation and respiratory symptoms in domestic waste collectors*. *Occup Environ Med*, 2002. **59**(2): p. 106-12.
 104. Xing, Z., M. Jordana, T. Braciak, T. Ohtoshi, and J. Gauldie, *Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung, fibroblasts: evidence for heterogeneity within the respiratory tract*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993. **9**(3): p. 255-63.
 105. Yi, E.S., *Hypersensitivity pneumonitis*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2002. **39**(6): p. 581-629.
 106. Zabel, P., K. Linnemann, and M. Schlaak, *[Circadian rhythm in cytokines]*. *Immun Infekt*, 1993. **21 Suppl 1**: p. 38-40.
 107. Zhiping, W., P. Malmberg, B.M. Larsson, K. Larsson, L. Larsson, and A. Saraf, *Exposure to bacteria in swine-house dust and acute inflammatory reactions in humans*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **154**(5): p. 1261-6.

K. Anhang

1.1 Fragebögen

Klinikum der Universität München

Institut und Poliklinik für Arbeits- und
Umweltmedizin – Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

Klinikum der Universität München • Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin
Ziemssenstraße 1 • D-80336 München

Geschlecht: Weiblich Männlich

Geburtsdatum ____ . ____ . ____ Probanden- ID: «Code»

Datum: des Interviews

Teil 1 – Atembeschwerden und allergische Symptome

1. Haben Sie jemals in den letzten 12 Monaten ein pfeifendes oder brummendes Geräusch in Ihrem Brustkorb gehört? Nein Ja

--	--

1.1 Fühlten Sie sich außer Atem, als dieses Geräusch auftrat? Nein Ja

--	--

1.2 Hatten Sie dieses Pfeifen oder Brummen, wenn Sie nicht erkältet waren? Nein Ja

--	--

2. Sind Sie irgendwann in den letzten 12 Monaten durch einen Anfall von Luftnot geweckt worden? Nein Ja

--	--

3. Sind Sie irgendwann in den letzten 12 Monaten mit einem Engegefühl in der Brust aufgewacht? Nein Ja

--	--



4. Sind Sie irgendwann in den letzten 12 Monaten wegen eines Hustenanfalls aufgewacht?

--	--

Nein Ja

5. Haben Sie in den letzten 12 Monaten einen Asthmaanfall gehabt?

--	--

Nein Ja

6. Nehmen Sie derzeit Medikamente (zum Beispiel Inhalationen, Dosieraerosole (Sprays) oder Tabletten) gegen Asthma ein?

--	--

Nein Ja

7. Haben Sie allergischen Schnupfen, z.B. „Heuschnupfen“?

--	--

Nein Ja

7.1 Leiden Sie häufig an Schnupfen oder „verstopfter Nase“?

--	--

Nein Ja

8. Leiden Sie unter Lebensmittelallergien?

--	--

8.1 Wenn „JA“ welche? _____

Nein Ja

9. Sind bei Ihnen Hauterkrankungen bekannt?

--	--

9.1 Wenn „JA“ welche? _____

Nein Ja

10. Sind bei Ihnen andere Allergien bekannt (z.B. gegen Metalle, Tierhaare, Hausstaub)?

--	--

10.1 Wenn „JA“ welche? _____

Nein Ja

11. Sind in Ihrer Familie Allergien bekannt?

--	--

Nein Ja

12. Husten Sie gewöhnlich im Winter als erstes nach dem Aufstehen?
(Wenn „JA“ oder unsicher, beantworten Sie Bitte Frage 13.1 zur Ergänzung)

--	--

Nein Ja

13. Husten Sie gewöhnlich im Winter während des Tages oder in der Nacht?
(Wenn „NEIN“, gehen Sie bitte zu Frage 14, wenn „Ja“)

--	--

Nein Ja

13.1 Husten Sie derart meistens für mindestens 3 Monate jährlich?

--	--

--	--

14. Haben Sie im Winter gewöhnlich als erstes am Morgen Auswurf?
(Wenn „JA“ oder unsicher, beantworten Sie bitte Frage 15.1 zur Ergänzung)

Nein	Ja

15. Haben Sie im Winter gewöhnlich Auswurf tagsüber oder nachts?
(Wenn „NEIN“, gehen Sie bitte zu Frage 16, wenn „JA“)

Nein	Ja

15.1 Haben Sie diesen Auswurf an den meisten Tagen für mindestens 3 Monate pro Jahr?

Nein	Ja

16. Hatten Sie jemals in den letzten 12 Monaten zwei bis sechs Stunden nachdem Sie Staub ausgesetzt waren, eine plötzlich auftretende grippeähnliche Krankheit mit 2
Wenn „JA“ beantworten Sie bitte folgende Fragen:

Nein	Ja

16.1 Wie häufig? _____ mal

16.2 Bei welcher Gelegenheit traten diese Symptome auf? _____

16.3 Wie lange dauerten diese Symptome an? _____ Stunden bzw. _____ Tage

Teil 2 – Fragen über Ihre Arbeit

17. Ist die Landwirtschaft Ihr Hauptberuf?

Nein	Ja

Wenn „NEIN“: Was ist Ihr Hauptberuf? _____

18. Sind Sie zuvor an einem anderen Arbeitsplatz mit Stäuben in Kontakt gekommen?

Nein	Ja

Wenn „NEIN“ gehen Sie zu Frage 19, wenn „JA“:

An welchem Arbeitsplatz:

Anzahl der Jahre:

_____	_____ Jahre
_____	_____ Jahre
_____	_____ Jahre

19. Seit wie vielen Jahren arbeiten Sie schon an diesem Arbeitsplatz? _____ Jahre

20. Wie viele Tage pro Woche arbeiten Sie in der Regel? _____ Tage

21. Wie viele Stunden pro Tag arbeiten Sie in der Regel? _____ Stunden

22. Wie viele Jahre arbeiten Sie schon in der Landwirtschaft? _____ (Jahre)

23. Führen Sie folgende Arbeiten selbst aus?	Nein	Ja
23.1 Schroten		
23.2 Schrot von Hand vorgeben		
23.3 Ausmisten von Hand		
23.4 Gülle ausbringen		
23.5 Pflanzenschutzmittel spritzen		
23.6 Mineraldünger streuen		
23.7 Mähen		
23.8 Arbeit mit Heu		
23.9 Ernten von Getreide		

24. In welchen Jahren haben Sie folgende Produktion/Tierhaltung betrieben bzw. betreiben Sie noch:			
24.1 Schweinehaltung	Anzahl der Tiere:	Von (Jahr)	bis (Jahr)
24.2 Rinderhaltung	Anzahl der Tiere:	Von (Jahr)	bis (Jahr)
24.3 Legehennenhaltung	Anzahl der Tiere:	Von (Jahr)	bis (Jahr)
24.4 Geflügelmast	Anzahl der Tiere:	Von (Jahr)	bis (Jahr)
24.5 Schafhaltung	Anzahl der Tiere:	Von (Jahr)	bis (Jahr)
24.6 Pferdehaltung	Anzahl der Tiere:	Von (Jahr)	bis (Jahr)

Nein Ja

25. Arbeiten Sie in geschlossenen Räumen mit Tieren?

--	--

Wenn „NEIN“ gehen Sie bitte zu Frage 26, wenn „JA“ :

25.1 Wie viele Stunden pro Tag arbeiten Sie:

- a) mit Schweinen
- b) mit Rindern
- c) Geflügel
- d) Sonstiges

_____ Stunden pro Tag
 _____ Stunden pro Tag
 _____ Stunden pro Tag
 _____ Stunden pro Tag

26. Arbeiten Sie regelmäßig im Anbau von	Nein	Ja
26.1 Getreide		
26.2 Mais		
26.3 Gemüse		
26.4 Sonstiges:		

Teil 3 – Atembeschwerden bei der Arbeit

27. Haben Sie bei der Arbeit im Stall eine oder mehrere der folgenden Beschwerden?	Nein	Ja
27.1 Kurzatmig, außer Atem		
27.2 Reizhusten (Husten ohne Auswurf)		
27.3 Husten mit Auswurf		
27.4 Pfeifende oder brummende Atemgeräusche		
27.5 Reizung der Nasenschleimhaut		
27.6 Reizung/Rötung der Augen		
27.7 Hautveränderungen		

28. Wie war der Verlauf dieser Beschwerden während der letzten 10 Jahre?

Bitte setzen Sie folgende Häufigkeitsangaben in jedes Kästchen ein:

HÄUFIGKEIT DER ATEMBESCHWERDEN BEI DER ARBEIT 1= ohne Beschwerden
 2= seltener als einmal im Monat
 3= einmal im Monat
 4= einmal im Monat bis einmal in der Woche

5= einmal in der Woche
6= täglich

Bis vor 10 Jahren	Bis vor 8 Jahren	Bis vor 6 Jahren	Bis vor 4 Jahren	Bis vor 2 Jahren	Jetzt

29. Haben Sie während der Arbeit mit Getreide, Heu oder Stroh folgende Beschwerden (bitte ankreuzen)			
	Getreide	Heu	Stroh
29.1 Kurzatmig, außer Atem			
29.2 Reizhusten			
29.3 Pfeifende oder brummende Atemgeräusche			

30. Haben Sie bei den nachfolgend genannten Tätigkeiten folgende Beschwerden (bitte ankreuzen)			
	Schroten	Schrot von Hand geben	Ausmisten von Hand
30.1 Kurzatmig, außer Atem			
30.2 Reizhusten			
30.3 Pfeifende oder brummende Atemgeräusche			

31. Haben Sie bei den nachfolgend genannten Tätigkeiten folgende Beschwerden (bitte ankreuzen)			
	Gülle ausbringen	Pflanzenschutz spritzen	Mineraldünger streuen
31.1 Kurzatmig, außer Atem			
31.2 Reizhusten			
31.3 Pfeifende oder brummende Atemgeräusche			

32. Wenn Sie die Frage 27 oder 29 mit „JA“ beantwortet haben, kreuzen Sie bitte an, wann die Atembeschwerden bei der Arbeit beginnen oder verschwinden

Beginn von Atembeschwerden bei der Arbeit	Im Stall	Mit Getreide	Mit Heu	Mit Stroh
32.1 In den ersten Minuten				

32.2 In der ersten Stunde				
32.3 Nach mehr als einer Stunde				
32.4 Nach Arbeitsende				

Verswinden der Atembeschwerden nach der Arbeit	Im Stall	Mit Getreide	Mit Heu	Mit Stroh
32.5 In den ersten Minuten				
32.6 In der ersten Stunde				
32.7 Nach mehr als einer Stunde				
32.8 Nach Arbeitsende				

33. Verwenden Sie ein Atemschutzgerät bei der Arbeit im Stall? Nein Ja

--	--

Wenn „JA“: 33.1 Wieviele Stunden pro Woche in _____ Stunden etwa?

Teil 4 – Rauchen

34. Haben Sie schon einmal ein Jahr lang geraucht? Nein Ja

--	--

(„JA“ bedeutet mindestens 20 Päckchen Zigaretten im Leben oder ein Jahr lang mindestens eine Zigarette pro Tag oder eine Zigarre pro Woche)

Wenn „NEIN“, ist der Fragebogen beendet, wenn „JA“:

34.1 Wie alt waren Sie, als Sie anfangen zu rauchen? _____ Jahre alt

34.2 Rauchen Sie jetzt (bzw. bis vor einen Monat?)

Nein Ja

--	--

Wenn „NEIN“, gehen Sie zu Frage 34.4, wenn ja :

34.3 Wieviel rauchen Sie derzeit durchschnittlich

Zigaretten _____ Stück pro Tag
 Zigarren/Zigarillos _____ Stück pro Tag
 Pfeifentabak _____ Gramm pro Woche
 Schnupftabak/Kautabak _____ Gramm pro Woche

34.4 Gab es eine Zeit in Ihrem Leben, in der Sie mehr geraucht haben?

33.5 Haben Sie das Rauchen aufgegeben oder reduziert?
 Wenn „Nein“, ist der Fragebogen beendet, wenn „Ja“:

Nein Ja

34.5.1 Wie alt waren Sie, als Sie das Rauchen reduziert bzw. aufgegeben haben? _____

34.5.2 Wieviel rauchten Sie früher durchschnittlich, bezogen auf die ganze Zeit, die Sie rauchten, bevor Sie reduziert bzw. aufgaben?

Zigaretten pro Tag _____

Zigarillos pro Tag _____

Zigarren pro Tag _____

Pfeifentabak in Gramm pro Woche _____

Kurzfragebogen zum aktuellen Befinden

Klinikum der Universität München

Institut und Poliklinik für Arbeits- und
Umweltmedizin – Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

Klinikum der Universität München • Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin
Ziemssenstraße 1 • D-80336 München

Geschlecht Weiblich Männlich

Geburtsdatum ____ . ____ . ____ Probanden-ID:

Datum des Interviews

Interviewer:

Welche der nachstehend genannten Symptome verspüren Sie aktuell?

1. Trockener Husten

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Husten mit Auswurf

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. Pfeifendes oder brummendes Atemgeräusch

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

4. Engegefühl in der Brust

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. Atemnot

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6. Fließschnupfen

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7. Stockschnupfen (verstopfte Nase)

Nein	Ja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nein Ja



8. „Kratzen“ im Hals

--	--

9. Kopfschmerzen

Nein Ja

--	--

10. Schwindelgefühl

Nein Ja

--	--

11. Reizung der Augen

Nein Ja

--	--

12. Juckreiz der Haut

Nein Ja

--	--

13. Hautveränderungen:

Nein Ja

--	--

14. Übelkeit

Nein Ja

--	--

15. Fieber

Nein Ja

--	--

1.2 Stallparameter

Häufigkeit der Fütterung				
Einmal täglich	Zweimal täglich		Häufiger	
3	11		6	
Fütterung durch die selbe Person bei 9 Landwirten				
Lagerdauer Gülle				
Weniger als eine Woche	Eine Woche	Zwei Wochen	Drei bis vier Wochen	Mehr als vier Wochen
8	7	1	0	1
Lagerdauer Festmist				
Weniger als eine Woche	Eine Woche	Zwei Wochen	Drei bis vier Wochen	Mehr als vier Wochen
12	0	0	0	4
Reinigung				
Täglich	Pro Woche	Monatlich	Seltener als monatlich	Jährlich
10	2	4	4	1
Zuluftöffnung in				
Wand	Decke		Sonst.	
12	14		2	
Abluftöffnung in				
Wand	Decke		Spaltenboden	Sonst.
14	16		3	6
Lüftungssystem				
Freie Lüftung	Zwangs-lüftung	Überdruck	Unterdruck	Gleichdruck
11	8	0	5	0
Management				
Ganzjährige Belegung	Saisonale Belegung			
19	0			
Stallabmessungen				
Stalllänge	41,68 m		+/- 47,88	
Breite	21,22 m		+/- 21,45	
Höhe	4,96 m		+/- 3,864	
Fläche	460,4 m ²		+/- 360,172	

1.3 Zellen der Nasallavage

	LW – vor Exposition	LW – nach Exposition	KO – vor Exposition	KO – nach Exposition	LW - Proz. Anstieg	KO – Proz. Anstieg
Neutro						
Median	263	231	102	78	-6,14	-22,22
Min / Max	2 / 283	0 / 608	0 / 259	0 / 275	-100 / 131,18	-100 / 19600
25.P / 75.P	201 / 273	45,5 / 261	18 / 190	19,25 / 164,5	-59,98 / 7,93	-69,29 / 125,4
	P _w = 0,246		P _w = 0,581		P _M = 0,930	
Neutro%						
Median	88	77	34	28	-5,56	-22,92
Min / Max	4 / 94	0 / 96	0 / 86	0 / 92	-100 / 50	-100 / 6500
25.P / 75.P	68 / 91	15 / 86,5	6 / 63	7,25 / 63	-44,18 / 5,09	-65,0 / 122,08
	P _w = 0,047*		P _w = 0,559		P _M = 0,941	

Eos						
Median	0	0	0	0	-90,8	-100
Min / Max	0 / 17	0 / 20	0 / 88	0 / 140	-100 / 260	-100 / 66,67
25.P / 75.P	0 / 4,5	0 / 1	0 / 0	0 / 3	-100 / 12,5	-100 / -0,76
	$P_w = 0,325$		$P_w = 0,283$		$P_M = 0,590$	
Eos %						
Median	0	0	0	0	-90	-68,97
Min / Max	0 / 6	0 / 7	0 / 29	0 / 47	-100 / 200	-100 / 67,86
25.P / 75.P	0 / 1,5	0 / 0	0 / 0	0 / 1	-100 / 80	-100 / 67,86
	$P_w = 0,527$		$P_w = 0,666$		$P_M = 0,686$	
Makro						
Median	20	16	8	7	-10	20,67
Min / Max	5 / 46	0 / 46	0 / 76	1 / 48	-100 / 122,22	-96,05 / 1500
25.P / 75.P	10 / 31	11 / 30,5	3 / 18	5 / 17,5	-39,05 / 49,39	-47,20 / 151,39
	$P_w = 0,722$		$P_w = 0,673$		$P_M = 0,436$	
Makro%						
Median	7	5	3	4	12,5	33,33
Min / Max	3 / 13	0 / 17	0 / 25	1 / 16	-100 / 120	-96 / 433,33
25.P / 75.P	4,5 / 10	3 / 12	1 / 6	2 / 5,75	-41,43 / 47,22	-16,67 / 100
	$P_w = 0,938$		$P_w = 0,239$		$P_M = 0,277$	
Epi						
Median	15	31	128	165	240	-9,92
Min / Max	2 / 146	0 / 243	21 / 304	1 / 381	-100 / 1200	-95,24 / 266,35
25.P / 75.P	5,5 / 56	15,5 / 101,5	65 / 258	61,75 / 232,5	-27,73 / 615,18	-45,6 / 53,85
	$P_w = 0,102$		$P_w = 0,903$		$P_M = 0,039$	
Epi%						
Median	5	14	52,5	69,5	150	10,27
Min / Max	1 / 86	0 / 81	7 / 97	0 / 97	-100 / 1600	-100 / 242,86
25.P / 75.P	2 / 20,5	5 / 53,5	21,75 / 88,5	28,5 / 85	-30,1 / 436,36	-25,05 / 91,6
	$P_w = 0,147$		$P_w = 0,229$		$P_M = 0,153$	
Lympho						
Median	0	0	2	1,5	-100	-75
Min / Max	0 / 1	0 / 4	0 / 6	0 / 6	-100 / 0	-100 / 300
25.P / 75.P	0 / 0	0 / 0	0 / 4	0 / 3,75	-100 / 0	-100 / 75
	$P_w = 0,161$		$P_w = 0,661$		$P_M = 0,461$	
Lympho%						
Median	0	0	1	1		-100
Min / Max	0 / 0	0 / 1	0 / 2	0 / 4		-100 / 300
25.P / 75.P	0 / 0	0 / 0	0 / 1	0 / 1		-100 / 0
	$P_w = 0,317$		$P_w = 0,717$		$P_M =$	

L. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak durchgeführt.

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak für die herzliche Aufnahme in sein Institut, für die Bereitstellung des Themas und der gesamten Infrastruktur des Instituts, sowie der Korrektur und den vielen wertvollen Verbesserungsvorschlägen dieser Arbeit.

Frau PD Dr. rer. biol. hum. K. Radon und Frau Dr. med. E. Scharrer für ihre überaus freundschaftliche Betreuung während der gesamten Zeit, für die vielen Korrekturvorschläge, für die kompetenten Hilfestellungen und Anregungen und der mir vermittelten Freude am wissenschaftlichen Arbeiten, aber auch für viele andere Tipps, Hilfen und Vorschlägen in allen Lebenslagen, ob im neuem Beruf oder im Alltag. Ohne ihre großartige Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. R. Jörres für die vielen Verbesserungsvorschläge, für die überaus schnelle Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Frau A. Kronseder, MTA, für die fachliche Anleitung und ihre Mitarbeit während des labortechnischen Teils der Arbeit und die immer freundschaftliche Atmosphäre während der Laboranalysen.

Frau Selzer, Krankenschwester, für die Mitarbeit bei der Felduntersuchung und dafür dass sie ihre Wohnung als Aufenthaltsmöglichkeit während den langen Wartezeiten zwischen den Untersuchungen zur Verfügung gestellt hat.

Herr Dr. rer. nat. Dipl-Chem. R. Schierl und sein Team für die Analyse der Staubproben und der Hilfestellungen zu diesem Thema.

Herr Dipl. Chem. Römmelt für die Analyse der Ammoniak- und CO₂-Proben, sowie Klärung diverser Fragen über email.

Frau de la Motte für die Durchführung der Lungenfunktionsuntersuchungen im Labor.

Herrn Dipl. Ing. (FH) U. Egger von der landwirtschaftlichen Berufsgenossenschaft Schwaben, der viele der Landwirte von unserer Arbeit überzeugen konnte und als Probanden gewann.

Den studentischen Hilfskräften, die bei der Eingabe der Daten in die Datenmaske geholfen haben.

Den Landwirtinnen und Landwirten aus der Region Bobingen, Schwabmünchen und Mering sowie den Büroangestellten, die sich für diese Studie als Probanden zur Verfügung gestellt haben.

Außerdem natürlich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mich so freundlich in ihr Team aufgenommen haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung dieser Studie.

Besonders möchte ich meiner Ehefrau Barbara-Miyuki für Ihre aufopferungsvolle Hilfe und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen während dieser Arbeit danken, sowie für die kompetente Durchsicht und den vielen Korrekturvorschlägen von ihr, die ich dankbar aufgenommen habe.

Und zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern Takie & Ales, sowie meinen japanischen und tschechischen Großeltern von ganzen Herzen danken, die mich mit viel Liebe aufgezogen haben und mir das Studium und diese Promotion ermöglichten.

M. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Junichiro Ruzicka
Adresse: Maillingerstrasse 6
80636 München
email: daniel@ruzickas.de
Staatsbürgerschaft: Deutsch
Geburtstag: 27.11.1974
Geburtsort: Neumarkt in der Oberpfalz
Familienstand: Verheiratet

Ausbildung

1980-1984 Grundschole, Neumarkt
1985 - 1990 Willibald-Gluck-Gymnasium, Neumarkt
1991-1994 Deutsche Schule Tokio Yokohama / Japan
1994 Allgemeine Hochschulreife, Note: 1.8
1995 - 1996 Zivildienst im Akademisches Lehrkrankenhaus München
Harlaching / Abteilung Onkologie

Höhere Ausbildung

4/1996 – 11/2003 Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-Universität
München
3/1999 Physikum
3/2000 1. Staatsexamen
9/2002 2. Staatsexamen
10/02 - 2/03 1. Terial Praktisches Jahr / Innere Medizin / Akademisches
Lehrkrankenhaus München Harlaching
2/03 - 6/03 2. Terial Praktisches Jahr / Chirurgie / Hospital Universitario
Prof. Edgard Santos in Salvador de Bahia, Brasilien
6/03 - 10/03 3. Terial Praktisches Jahr / Pädiatrie / University Childrens
hospital, Centro Pediatrico Prof. Hosannah Oliveira, Salvador
de Bahia, Brasilien
11/03 3. Staatsexamen
10/06 – heute Master of Science Studiengang „Medical Engineering“ an der
Technischen Universität München

Sonstige Ausbildung

8/97 - 4/98	Europäisches Austauschprogramm „Sokrates“ an der Universität Miguel Hernandez, Alicante, Spanien im Rahmen des makroskopischen Anatomiekurses
8/99	Famulatur in der Pädiatrie am Haunerschen Kinderkrankenhaus, München
9/99	Famulatur Anästhesie am Omiya Jichi Medical Center / Tokio / Japan
9/00	Famulatur Chirurgie am Hospital Baron, Valparaiso / Chile und Hospital Van Burren, Valparaiso / Chile
8/01 - 9/01	2 monatige Famulatur in Hangzhou and Xian / Volksrepublik China, mit Ausbildung im Bereich Traditionell chinesischer Medizin und Akupunktur
12/01 – 12/04	Doktorarbeit am Institut für Arbeits- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München über Effekte von organischen Stäuben auf die oberen Atemwegen am Kollektiv Landwirt

Beruf

Seit 02/2005	Assistenzarzt in der Klinik für Herzchirurgie des Deutschen Herzzentrums München (Forschungsbereich Klappenchirurgie)
--------------	---

Sprachen

Deutsch, Englisch, Japanisch, Portugiesisch, Spanisch, Latinum