

Wirkung Hormon-verseuchter Lebensmittel bei Allergien

Untersuchungen mit dem illegalen Tiermast-Futterzusatz Medroxy-Progesteron-Acetat (MPA)

von *Irina Maul, John Ionescu, Hannelore Borck* und *Friedhelm Diel*

Zusammenfassung

Die immuno-allergotoxische Wirkung des synthetisch hergestellten Hormons MPA wird anhand der Lymphozytenproliferation und Zytokin-Produktion von Nicht-Atopikern und Atopikern *ex vivo* ermittelt. Zu diesem Zweck werden verschiedene MPA-Konzentrationen den PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen zugegeben und bis 72 Stunden inkubiert. Proliferationsverlauf (MTT-Test) und Zytokin-Sekretion wurden mittels ELISA-Technik untersucht. Zwei Nicht-Atopiker und zwei Atopiker mit typischer Allergiesymptomatik aus der Spezialklinik Neukirchen (Dr. J. Ionescu) werden ausgewählt. Das Differentialblutbild und Gesamt-IgE bestätigen die Zuordnung.

Die Atopiker weisen hierbei eine deutlich höhere Sensibilität verglichen mit den Nicht-Atopikern auf:

- Durch MPA wird die Lymphozytenproliferation konzentrationsabhängig reduziert. Bei den Atopikern (IC_{50} : $0,15 \times 10^{-6}$ M) zeigt sich eine mehr als zehnfach stärkere Hemmung als bei den Nicht-Atopikern (IC_{50} : $0,5 \times 10^{-5}$ M).
 - Auch bei der IFN- γ -Sekretion wird bei den Atopikern (IC_{50} : $0,35 \times 10^{-5}$ M) eine zirka zehnfach stärkere MPA-abhängige Hemmung verglichen mit den Nicht-Atopikern (IC_{50} : $0,2 \times 10^{-4}$ M) festgestellt.
 - Wegen zu geringem Datenmaterial ist für IL-4 lediglich eine IC_{50} -Abschätzung von $< 0,2 \times 10^{-6}$ M möglich, die ebenfalls auf die hohe Empfindlichkeit bezüglich der MPA-Wirkung hinweist.
 - Auch der allergotoxikologische Index, definiert als IL-4/IFN- γ -Verhältnis (Th2/Th1), weist auf die besondere Sensibilität der Atopiker, verglichen mit den Nicht-Atopikern, gegenüber dem synthetischen Progesteron (MPA) hin.
- Um die hier aufgezeigten Ergebnisse einer immunsuppressiven Wirkung des MPA zu bestätigen und statistisch relevante Aussagen machen zu können, sollten weitere Untersuchungen mit einem größeren Personenkreis durchgeführt werden.

Abstract

Medroxy-progesterone-acetate (MPA) responses in lymphocytes of non-atopic and atopic patients *ex vivo*

Irina Maul, Hannelore Borck, John Ionescu, Friedhelm Diel

*Immuno-allergotoxic responses of the synthetically produced hormone MPA are investigated using lymphocyte proliferation and cytokine production *ex vivo*. For this purpose different concentrations of MPA are added to the cell cultures of PHA stimulated lymphocytes and incubated for 72 h. Proliferation (MTT-test) and cytokine secretion (ELISA technique) are determined. 2 non-atopic and 2 atopic donors – patients at the Spezialklinik Neukirchen (Dr. John Ionescu) – are selected and examined using the differential blood count and total IgE measurement respectively. The atopic shows an increased sensitivity compared to the non-atopic group:*

- *MPA responds concentration related suppression of the lymphocyte proliferation. Atopic donors ($IC_{50} = 0.5 \times 10^{-6}$ M) show a more than tenfold increased suppression compared to the non-atopic donors ($IC_{50} = 0.5 \times 10^{-5}$ M).*
- *This is corresponding to a ca. tenfold increased IFN- γ secretion of the atopic ($IC_{50} = 0.3 \times 10^{-5}$ M) compared to the non-atopic volunteers ($IC_{50} = 0.2 \times 10^{-4}$ M).*
- *Due to the low number of data IL-4 shows only an approximate $IC_{50} < 0.2 \times 10^{-6}$ M indicating again the increased MPA sensitivity in the atopic samples.*
- *Furthermore, the allergotoxikological index which is defined as the IL-4/IFN- γ balance (Th2/Th1), underlines the particular responses of synthetic MPA in atopic patients compared with non-atopic controls.*

It can be concluded that more data are necessary to confirm the here presented results that MPA is a very effective immune suppressor, particularly in lymphocytes of patients suffering from atopic diseases.

Key words: Medroxy-progesterone-acetate (MPA), atopy, IL-4, IFN- γ , allergotoxikological index

UMWELT & GESUNDHEIT 1 (2006) 7-12

Einleitung

Schon seit den 50er Jahren werden gezielt hormonal wirksame Wachstumsförderer in der Tiermast eingesetzt, um die Futterumsetzung zu verbessern, die Proteinsynthese zu erhöhen und die Fettdepotbildung zu reduzieren. (Van der Wal und Berende 1983) In der EU sind hormonal wirksame Wachstumsförderer seit 1988 generell verboten. (Europäische Kommission 1999) Medroxy-Progesteron-Acetat (MPA)-Belastung von Futtermitteln wird bekannt, nachdem in einem niederländischen Betrieb Fruchtbarkeitsstörungen bei Schweinen auftreten. In untersuchten Futtermitteln werden Spuren von MPA als Ursache entdeckt. Weitere Sachklärungen in diesem Zusammenhang ergeben, dass zwischen Mitte 2000 und Mai 2002 MPA-haltige Pharmaabfälle aus Irland an die belgische Firma Bioland Liquid Sugars geliefert werden. Diese beliefern in Folge Hersteller von Süßgetränken und Futtermitteln mit MPA-haltigem Glucosesirup.

Das Handlungsmotiv der belgischen Firma, die den hormonbelasteten Glucosesirup liefert, ist offenbar gezielte Kostenreduzierung. Sie kann Kosten für die Entsorgung alter Hormonpräparate senken, aber auch Spekulationen über die wachstumsfördernde Wirkung des unreinigten Sirups kommen in Frage. Mitte Juli 2002 werden Analyseresultate aus betroffenen EU-Staaten (Belgien, Holland, Deutschland) bekannt. Nach Angaben des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) werden in den betroffenen Chargen von Glucosesirup MPA-Konzentrationen von 0,35 bis 0,52 mg/kg, in den daraus hergestellten Futtermitteln bis zu 0,7 mg/kg nachgewiesen. Im Schweinefleisch der betroffenen Betriebe liegen die Konzentrationen bei 0,5 bis 1 μ g/kg. (BgVV 2002)

Schwerpunkt

Die in den Lebensmitteln gefundenen Mengen gelten laut BgVV als unbedenklich. Der Körper scheidet MPA relativ schnell wieder aus, daher rechnet das BgVV nicht mit einer akuten Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher.

MPA ist ein synthetisch hergestelltes Sexualhormon und gehört zur Klasse der Gestagene. Es ist ein Abkömmling des natürlichen „Gelbkörperhormons“ Progesteron.

Der Rationalname für das synthetische Gestagen lautet 17 α -Acetoxy-6 α -methyl-4-pregnen-3,20-dion. Die Summenformel ist C₂₄H₃₄O₄. Sein Molekulargewicht beträgt 386,53 g/mol. Hierbei handelt es sich um ein weißes, kristallisiertes, geruchloses Pulver, das in Wasser praktisch nicht, jedoch in Chloroform, Aceton, Dioxan und Alkohol löslich ist. (Falbe und Regitz 1998)

Es ist schon lange bekannt, dass Steroidhormone – so wie das Hormon Cortisol – starke immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkungen aufweisen. *Ex vivo* und *in vivo* ist eine deutliche Hemmung der Lymphozytenproliferation zu beobachten. Dadurch wird die Freisetzung von Zytokinen verhindert, die Entzündungsprozesse aufrechterhalten. (Horr 2001)

Weitere bekannte Wirkungen des Steroidhormons Cortisol auf das Immunsystem sind die Hemmung der Antikörperbildung und Antigen-Antikörper stimulierte Immunantwort.

Progesteron wird aus Cholesterin in den Sexualdrüsen und der Nebennierenrinde (NNR) gebildet und stellt eine Zwischenstufe in der Biosynthese der Androgene, Östrogene und Kortikosteroide dar. (Grunert 1995)

Steroidhormone sind fettlöslich und deshalb fähig, in alle Zellen des Körpers einzudringen. Das Eindringen in die Zellen erfolgt durch passive Diffusion. Die Steroide binden intrazellulär an spezifische Rezeptoren (Heat-Shock-Protein – HSP) und wirken so auf die Transkription an den Regulatorgenen. (Edquist 1997)

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob MPA eine immunsuppressive Wirkung aufweist und deshalb für Atopiker beziehungsweise für aufgrund familiärer Vorbelastung an allergischen Erkrankungen leidende Menschen ein besonderes Gesundheitsrisiko darstellt.

In der folgenden Studie wird die Frage untersucht, ob Atopiker sensibler auf

MPA reagieren als Nicht-Atopiker und inwieweit MPA die immunkompetenten Zellen und somit das Immunsystem beeinflusst.

Methoden

Probanden

Es werden vier freiwillige Probanden ausgewählt. Das Alter der vier weiblichen Probanden liegt zwischen 27 und 36 Jahren. Die zwei Patientinnen sind aufgrund ärztlicher Diagnose als Atopiker einzustufen.

Bei der **28jährigen Patientin** sind seit ihrem zweiten Lebensjahr zahlreiche Allergien bekannt. Seit 25 Jahren leidet sie an einer sehr schweren Form der atopischen Dermatitis, die durch massive, bakterielle Superinfektion kompliziert wird. Dieses macht sich durch rötliche Papeln, sowie rauen, ekzematisierten und schuppigen Stellen am Körper bemerkbar. Neben Dermatitis ist die Patientin von einer polyvalenten, spezifischen, IgE-vermittelten Sensibilisierung gegen Latex, Inhalations- und Nahrungsmittelallergene bei einem erhöhten Gesamt-IgE-Wert betroffen. Zu den vorbekannten Diagnosen gehören auch *Rhinoconjunktivitis allergica saisonalis* und Darmdysbiose bei *Candida*-Hyperkolonisation. Die vorliegenden Laborbefunde weisen neben den erhöhten Gesamt-IgE-Werten eine stark erhöhte Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut auf. Der bereits vorliegende Befund zeigt folgende RAST-Ergebnisse der **spezifischen IgE-Antikörper**:

- Rastklasse 3: Gräser (früh), Nussmischung, Dorsch
- Rastklasse 4: Latex, Kartoffel
- Rastklasse 6: beta-Lactoglobulin, Kasein, Eiklar

Bei der **36jährigen Patientin** ist seit der Kindheit atopische Dermatitis bekannt. Diese begann mit Beugeekzemen und breitete sich später auf das Gesicht und den Stamm aus.

Aus der Familienanamnese ist erkennbar, dass sie väterlicher- und mütterlicherseits vorbelastet ist. Nach der stationären Aufnahme der Patientin im März 2004 in die Spezialklinik in Neukirchen, wird bei ihr eine schwere, generalisierte, atopische Dermatitis diagnostiziert. Diese verkompliziert sich zudem durch eine massive, bakterielle Superinfektion (*Staphylococcus aureus*). Bekannt sind weiterhin eine saisonale und leicht pe-

renniale Rhinokonjunktivitis mit einem Maximum im Frühjahr.

Im Ernährungsbereich besteht eine polyvalente, IgE-vermittelte Typ-I-Sensibilisierung gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene bei einem erhöhten Gesamt-IgE-Wert, sowie eine IgG4-vermittelte Nahrungsmittelunverträglichkeit. Weitere Diagnosen sind Laktosetoleranz, Darmdysbiose, exokrine Pankreasinsuffizienz, *Epstein-Barr*- und *Herpes-Simplex*-Virus-Infektionen.

Bei der Aufnahme findet sich eine generalisierte Ekzematisierung, gekennzeichnet durch ödematös-infiltrierte Erytheme, Krusten und Borkenbildungen sowie entzündliche Schwellungen und Rötungen am ganzen Körper.

Bei den anderen zwei Probanden gibt es keine Hinweise auf allergische Reaktionen.

Die vorliegenden Laborbefunde zeigen ebenfalls stark erhöhte Gesamt-IgE-Werte, sowie einen hohen Anteil von eosinophilen Granulozyten im Blut. Die bereits durchgeführten Messungen der spezifischen IgE-Antikörper und IgG4-Nahrungsmittelallergien zeigen folgende Resultate:

Spezifische IgE-Antikörper:

- Rastklasse 3: Bäckerhefe, Gräser (Frühblüher), Gräser (Spätblüher)
- Rastklasse 4: Apfel (grün), Bäume (Frühblüher)
- Rastklasse 5: Tierepithelien
- Rastklasse 6: Hausstaubmischung, Bäume (Spätblüher)

IgG4-Nahrungsmittelallergien:

- Klasse 3: Kiwi, Weizenmehl, Roggenmehl, Milch-Pool
- Klasse 4: Senfkörner, Ei-Pool (Eiklar, Eigelb)
- Klasse 6: Nüsse-Samen-Pool, Getreide-Pool (glutenhaltig)

Versuchsdesign

Für die Untersuchungen des immunotoxischen Potenzials von MPA werden PBMC sofort nach der Blutabnahme separiert, zum Wachstum stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen von MPA belastet. Zellvermehrung wird mit Hilfe des MTT-Tests photometrisch bestimmt und Konzentrationen der von den T-Lymphozyten (Th) produzierten Zytokine, Interleukin 4 (IL-4) und Interferon-gamma (IFN- γ), werden mittels ELISA-Technik in Gegenwart unterschiedlicher MPA-Konzentrationen ermittelt. (Diel et al. 1998)

Schwerpunkt

Gesamt-IgE

Die IgE-Bestimmung wird im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Magic Lite Analyzer II durchgeführt (Chemielumineszenz-Detektion nach magnetischer Trennung der Antikörper-Ligand-Komplexe). Dieses automatisierte System kann zur Messung des Gesamt-IgE und zur Ermittlung des spezifischen IgE eingesetzt werden. (Umrechnungsfaktor für IgE: 1 IU/ml = 2,42 ng/ml - Ciba Corning Diagnostics GmbH 1998, jetzt Chiron)

Routine-Untersuchungen

Differentialblutbild (Panoptische Färbung nach Pappenheimer), Vitalitätstest der angereicherten PBMC und statistische Auswertung mittels Student's t-Test werden routinemäßig durchgeführt. $P < 0,05$ wird als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die Proliferationskurven nach MPA-Belastung.

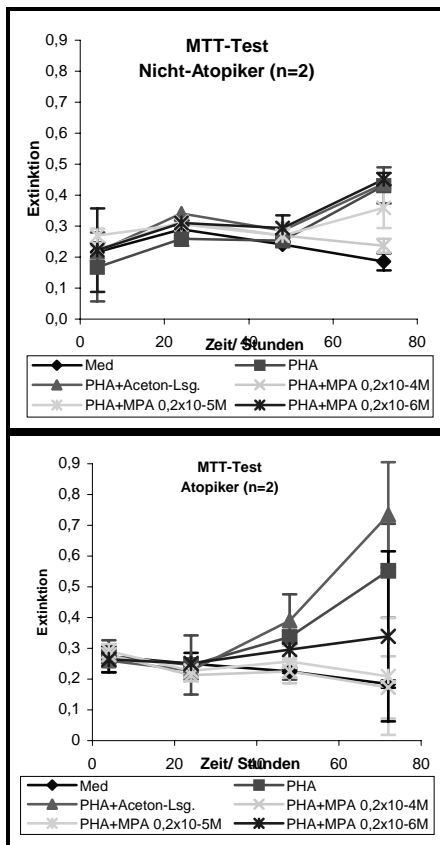


Abbildung 1: MPA-Wirkung auf die Lymphozytenproliferation der Nicht-Atopiker und Atopiker in der 72 Stunden Kultur Mittelwertbildung bei I.M. (28 Jahre) und C.W. (27 Jahre), lineare Abweichung. Agentienzugabe vier Stunden post-plating.

Proliferationskurven

Die unbelasteten, mit PHA stimulierten Lymphozyten erfahren über den gesamten Zeitraum eine Proliferation, die nach 48 Stunden in ein exponentielles Wachstum übergeht. Insgesamt nimmt die Anzahl der Zellen um etwa das 2,5fache zu. Im Vergleich dazu erfahren die unstimulierten Zellen eine Wachstumshemmung am Ende der Kultivierungszeit. Die MPA-belasteten Proben zeigen zu Beginn der Kultivierung einen ganz schwach erhöhten, aber nicht signifikanten Wert. Zum Ende der Kultur zeigen die MPA-belasteten Proben eine eindeutige Hemmung der Zellproliferation und das deutlich stärker bei den Atopikern; besonders deutlich fällt diese Suppression der Proliferation bei der höchsten MPA-Konzentration (PHA + MPA $0,2 \times 10^{-4}$ M, $p < 0,001$) auf. Zu beachten ist die Wirkung der Aceton-Lösung, die einen stimulierenden Effekt auf die Zellkultur hat.

Wirkung auf Zytokin-Produktion

Bei den im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Zytokinen handelt es sich um das entzündungsfördernde Zytokin IFN- γ und dessen Gegenspieler das Zytokin IL-4. Die Ergebnisse aus der Bestimmung dieser Zytokine können Hinweise darauf geben, welche Zellpopulation sich bei der jeweiligen Personengruppe durchgesetzt hat und inwieweit sich diese durch das MPA beeinflussen lässt.

IFN- γ -Produktion in MPA-belasteten Lymphozytenkulturen

Die Abbildung 3 zeigt die Konzentration an IFN- γ in den Überständen der kultivierten Lymphozyten.

Die IFN- γ -Sekretion der PHA-stimulierten Lymphozyten ist deutlich erhöht bei den nicht-atopischen Kontrollpersonen. Hier ist eine konzentrationsabhängige, stimulierende Wirkung durch MPA ($0,2 \times 10^{-5}$ M und $0,2 \times 10^{-6}$ M) auf die

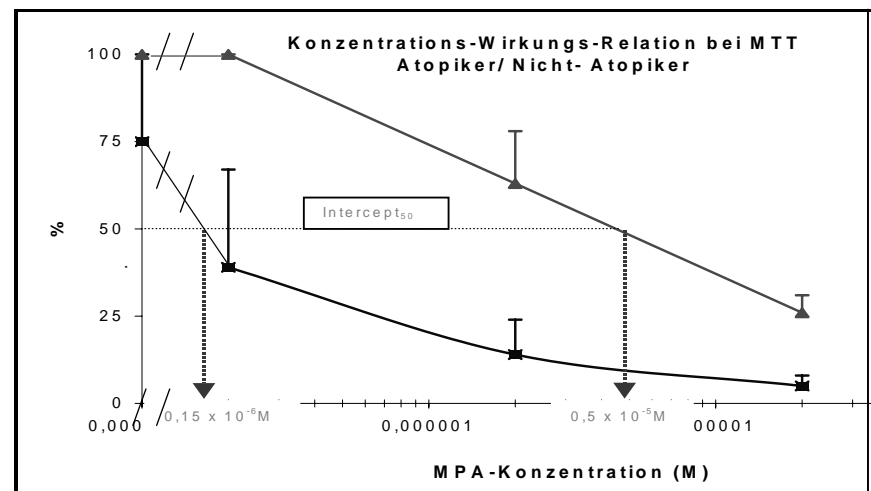


Abbildung 2: Konzentrations-Wirkungs-Relation von MPA auf die Lymphozytenproliferation. MPA ($0,2 \times 10^{-6}$ M, $0,2 \times 10^{-5}$ M und $0,2 \times 10^{-4}$ M) in der Lymphozytenkultur (Enkonzentration im Well), 4h post-plating. Es wird jeweils über 2 Probanden gemittelt (lineare Abweichung). I.M., C.W. = Nicht-Atopiker (- \blacktriangle); D.K., B.D = Atopiker (- \blacksquare) Anfangswerte: Nicht-Atopiker 100%; Atopiker 75%. MTT-Werte nach 72 Stunden.

Konzentrations-Wirkungs-Relation beim MTT-Test

Die 50%-Interzept-Werte sind bei den Nicht-Atopikern $0,5 \times 10^{-5}$ M und bei den Atopikern $0,15 \times 10^{-6}$ M. (Abbildung 2)

IFN- γ -Sekretion beobachten. Die IFN- γ -Sekretion der Lymphozyten, die mit der höchsten MPA-Konzentration von $0,2 \times 10^{-4}$ M kontaminiert sind, zeigt nach 72 Stunden eine deutliche Hemmung der Produktion in beiden Probanden-Gruppen. Die Aceton-Lösung wirkt dagegen stark stimulierend auf die IFN- γ -Sekretion.

IL-4-Produktion in MPA-belasteten Lymphozytenkulturen

Auch hier werden die isolierten Lymphozyten mit PHA zum Wachstum stimuliert, mit unterschiedlichen MPA-Konzentrationen kontaminiert und über einen Zeitraum von 72 h kultiviert. Das in dieser Zeit von den T-Lymphozyten der Klasse 2 (Th2) gebildete Zytokin IL-4 wird aus den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA-Technik gemessen.

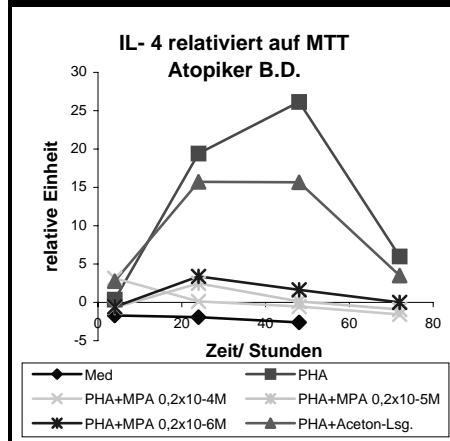
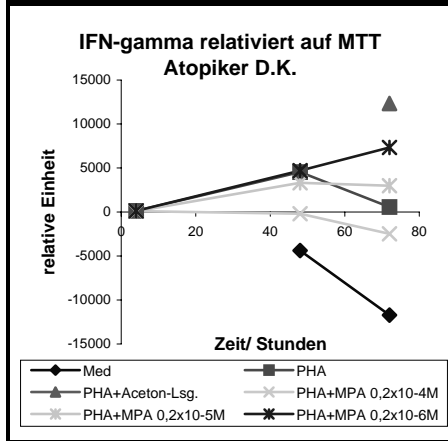
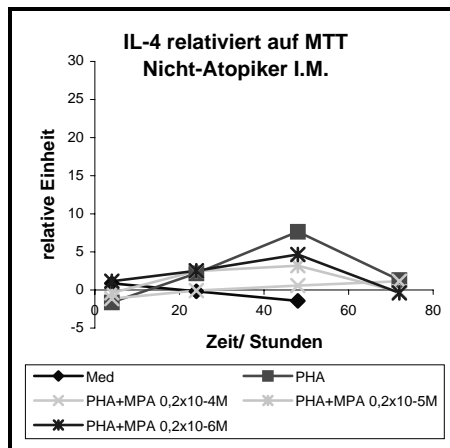
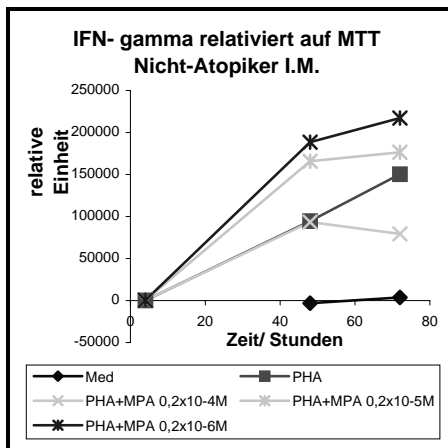


Abbildung 3: IFN- γ -Produktion in Lymphozytenkulturen einer Nicht-Atopikerin und Atopikerin nach MPA-Zugabe. Die IFN- γ -Produktion in Lymphozytenkulturüberständen ist relativiert auf MTT-Werte. Messungen bei 4, 48 und 72 Stunden. Agentienzugabe vier Stunden post-plating.

Abbildung 4: IL-4-Produktion in Lymphozytenkulturen einer Nicht-Atopikerin und einer Atopikerin nach MPA-Zugabe. Die IL-4-Produktion in Lymphozytenkulturüberständen ist relativiert auf MTT-Werte. Messungen bei 4, 24, 48 und 72 Stunden. Nachweisgrenze 35 pg/ml, ansonsten vergleiche Abbildung 3.

In der Abbildung 4 sind die Werte der IL-4-Produktion nach der MPA-Zugabe in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit dargestellt. Die IL-4-Produktion der stimulierten unbelasteten Lymphozyten der Nicht-Atopikerin erreicht den maximalen Wert von 1,9 pg/ml. Der Maximalwert bei der Atopikerin nach 48 h liegt weit höher bei 11,4 pg/ml. Im weiteren Verlauf nimmt die Konzentration an IL-4 wieder kontinuierlich ab. Die Zellen, die mit unterschiedlichen MPA-Konzentrationen versetzt werden, verhalten sich ähnlich, produzieren aber konzentrationsabhängig geringere Mengen an IL-4.

Am deutlichsten ist die IL-4-Sekretion über den gesamten Zeitraum bei der höchsten MPA-Konzentration von $0,2 \times 10^{-4}$ M gehemmt. Auch die unstimulierten Zellen sind in ihrer Produktionsfähigkeit so gehemmt, dass sie nur geringe IL-4-Mengen sezernieren.

Konzentrations-Wirkungs-Relation bei IFN- γ und IL-4

Der ermittelte Intercept₅₀-Wert (IFN- γ) liegt bei den Atopikern bei $0,2 \times 10^{-4}$ M, bei den Nicht-Atopikern bei $0,35 \times 10^{-5}$ M. Dies zeigt, dass bei den Atopikern bezüglich des IFN- γ eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem MPA besteht.

Aufgrund nicht ausreichender Daten ist kein genauer Intercept₅₀-Wert für IL-4 ermittelbar. In jedem Fall liegen die Intercept₅₀-Werte für IL-4 $< 10^{-7}$ M.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Faktoren zur Beurteilung einer immunotoxischen Wirkung des synthetisierten Hormons MPA untersucht. Hierzu findet ein Vergleich zwischen Nicht-Atopikern und Atopikern statt.

Grundsätzlich kann eine immunsuppressive Wirkung nachgewiesen werden. Atopische Patienten weisen eine höhere Sensibilität gegenüber diesem Schadstoff auf. Sowohl auf das Wachstum der Lymphozyten (MTT-Test) als auch auf die Sekretion von IL-4 und IFN- γ (ELISA) wird mittels der hier verwendeten Methoden eine konzentrationsabhängige Suppression durch MPA festgestellt.

Die Untersuchungen mit MPA werden in einem Konzentrationsbereich zwischen $0,2 \times 10^{-6}$ M und $0,2 \times 10^{-4}$ M durchgeführt. Diese Konzentrationen können bei einer erhöhten Belastung durch Nahrungsmittel oder Medikamente, zumindest kurzfristig, im Organismus auftreten. (BgVV 2002) Aufgrund der Fettlöslichkeit des MPA ist darüber hinaus eine Akkumulation im Körper in Betracht zu ziehen, die zu dauerhaften MPA-Konzentrationen im Fett- und Nervengewebe führen kann. (Europäische Kommission 1999)

Ein ganz wichtiger Aspekt dabei ist, dass MPA eine Substanz ist, die physiologisch im Organismus nicht vorkommt. Daher kann man die synthetisch hergestellten Progesterone nicht dem natürlichen (physiologischen) Progesteron, gleichstellen. So wie das natürliche Progesteron interagieren die künstliche Progesterone wie MPA mehr oder weniger gut mit den Progesteronrezeptoren, jedoch nicht in allen Organen. In manchen Organen binden sie zwar an die Rezeptoren, vermitteln dabei aber nicht das identische Progesteronpotenzial an die Zelle. (Look 2003)

Tabelle 1: Vergleich zwischen MPA und genuinem Progesteron

Progesteron, genuin	MPA, synthetisch
Körperidentisches Hormonmolekül	Synthetische Verbindung
Die chemische Struktur entspricht der menschlichen Hormonkonstruktion	Die chemische Struktur unterscheidet sich von der körpereigenen
Folgt den normalen Stoffwechselabbauebenen, wobei essentiell aktive Metabolite, wie Allopregnenolon entstehen	Folgt nicht den normalen Stoffwechselabbauebenen, da im Organismus keine Enzyme vorkommen, die MPA verstoffwechseln
Neutral zu Koronararterien	Verengt Koronararterien
Cholesterinspiegel bleibt unverändert	Senkt HDL-Spiegel

