

# Der Granulozytenfunktionstest

## Immunmodulatorische Effekte auf die Granulozyten des menschlichen Blutes unter $O_2/O_3$ Einfluss



Granulierender Leukozyt (eosinophiler Granulozyt unter  $O_2/O_3$ -Einfluss)  
Elektronenmikroskopische Aufnahme aus einer Arbeit von H. Kief und J. Greenberg (1993)

## Zusammenfassung

Der Leukozytenfunktionstest (Synonym Leukozytendegranulationstest) ist ein etabliertes Diagnoseverfahren, um die zelluläre Immunlage gegenüber ausgewählten Antigenen zu erfassen und daher in der deutschen Gebührenordnung für Ärzte unter Nummer 3693 verankert. Neben der eher semiquantitativen Ausführung dieses Tests unter dem Mikroskop gibt es eine Weiterentwicklung, die eine quantitative Aussage unter Zuhilfenahme eines Durchflusszytometers erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren beschrieben, in dem ein Zellcounter modernster Bauart (Sysmex XE100.) als Messinstrument dient. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Erfassung der Differenz zwischen kontaminierten und unkontaminierten Blutproben über die drei Messkanäle derartiger Geräte. Ein eigens entwickeltes Computerprogramm vergleicht nicht nur die Reaktionen unterschiedlicher Antigene auf das zelluläre Blutbild, sondern errechnet daraus die Leukozytendegranulation, die RNA Induktion und die Reaktion der Thrombozyten bei Antigenkontakt.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wird das zu untersuchende Blut unter exakt eingehaltenen biochemischen und kulturellen Bedingungen in mehreren Versuchsreihen getestet. Zur Erzielung eines möglichst einheitlichen  $pO_2$  wird das Blut mit verschiedenen Konzentrationen eines  $O_2/O_3$  Gemisches behandelt, im Brutschrank bei  $37^\circ C$  zum Vergleich bei Raumtemperatur kultiviert, als auch mit und ohne einer auf den Stoffwechsel der Leukozyten abgestimmten Kulturlösung untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwar die Reihenfolge der Antigene, geordnet nach der Intensität ihrer Reaktion wechselt, das Gesamtbild pathologischer Reaktionen des untersuchten Antigenpools jedoch weitestgehend identisch bleibt. Die Ergebnisse dienen als Basis für eine Validierung dieses neuartigen Testverfahrens.

## Summary

The leukocyte function test (synonym: leukocyte degranulation test) is an established diagnostic to detect the cellular immunology of selected antigens. Therefore the German fee schedule for physicians makes allowance for this. This paper wants to present an enhancement to this rather semiquantitative method with a microscope, which allows quantitative conclusions with the aid of a flow cytometer.

The method presented here uses the latest series of cell counter (Sysmex XE100) as measure. The procedure is based on the detection of the difference between contaminated and uncontaminated blood samples via the three measuring channels of the device. An especially developed software program compares not only the reaction of different antigens on the cellular CBC, but calculates the leukocyte degranulation out of it as well as the RNA induction and reaction of thrombocytes when in antigen contact.

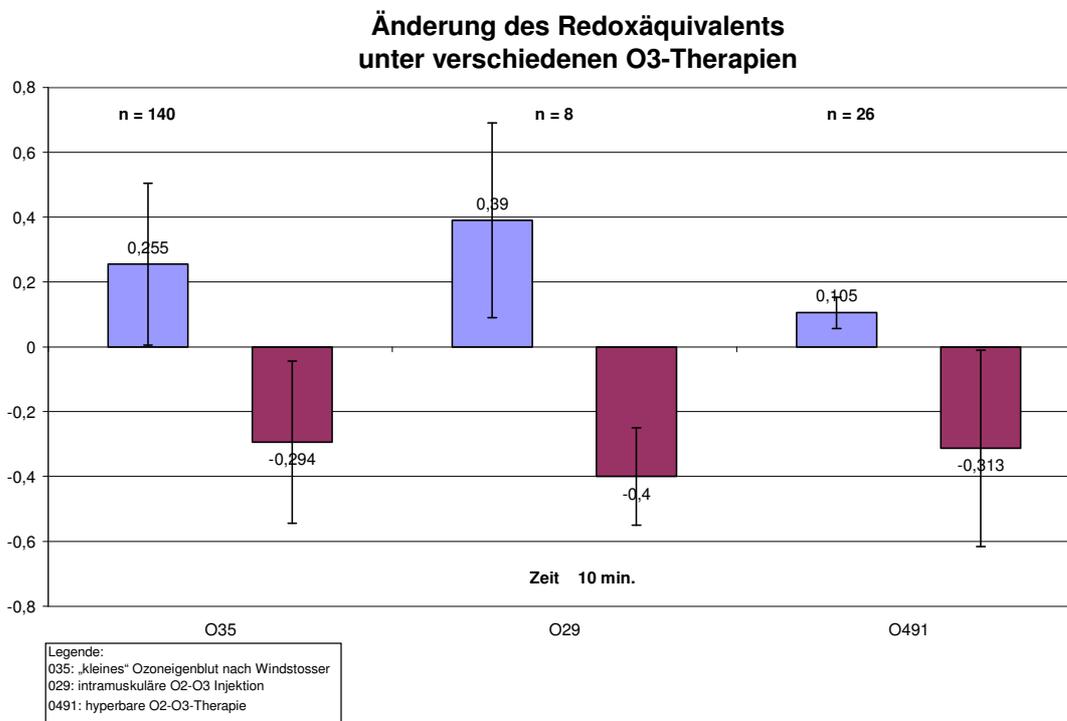
In order to accomplish reproducible results the examined blood samples are kept in exactly equal biochemical and cultural conditions in a series of tests. To achieve consistent  $pO_2$  results the samples were treated with different concentrations of an  $O_2/O_3$  composition, in an incubator at  $37^\circ C$  in comparison to room temperature, as well as with and without a culture solution adjusted to the metabolism of leukocytes.

The findings show that the sequence of antigens, which are ranked according to their intensity in reaction, changes. However, the overall picture of pathologic reactions of the antigen pool stays identical. The results may serve as a step in the validation of this new testing method.

Die Spaltung der medizinischen Welt in die klassische, konventionelle Medizin gemeinhin „Schulmedizin“ genannt und die Naturheilkunde darf als ein unglückliches Faktum gesehen werden, da einerseits der Schatz der Erfahrungsheilkunde und andererseits die streng wissenschaftlichen Kriterien unterliegende orthodoxe Medizin zwei medizinische Weltbilder darstellen, die sich durchaus ergänzen und gegenseitig befruchten könnten.

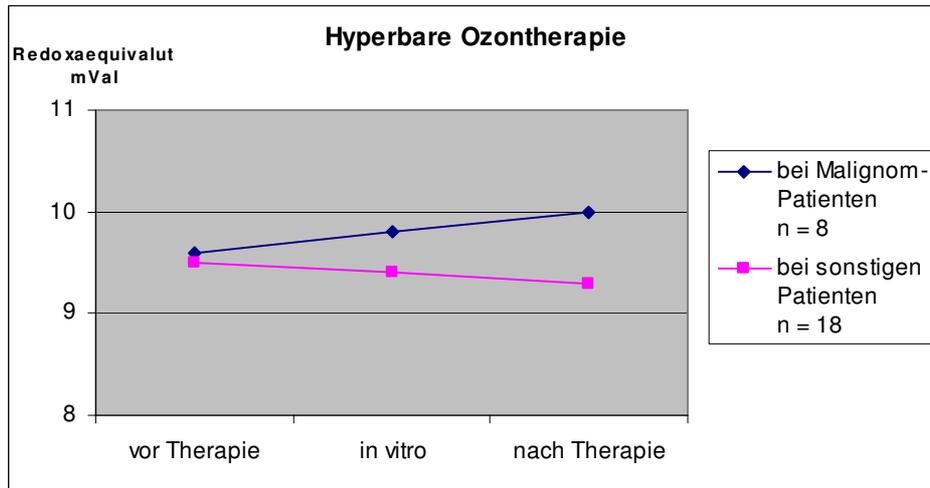
Die Ozontherapie ist ein derart klassisches Reizwort, das der Aufspaltung der medizinischen Welt in die beiden zitierten weltanschaulichen Lager dient. Einerseits ist Ozon unzweideutig ein potentes Gift, insbesondere für das Lungengewebe, andererseits wird es im naturheilkundlichen Lager lediglich in Mikrogrammmengen verwendet und erfüllt somit die alte Forderung der „Dosis, die das Gift macht“. **Kontaminiert Ozon in diesen Dosen das menschliche Blut, dann setzt es interessanter Weise reduzierende Valenzen trotz seines oxydativen Potentials frei, eine Reaktion, die für den „Gesunden“ typisch ist** (Grafik 1),

Grafik 1



während der Krebs- oder Praekanzerosen- Patient zu dieser regulativen Antwort nicht fähig ist, woraus sich die Möglichkeit einer Krebsfrüherkennung ergibt. (1, Grafik 2)

Grafik 2



Legende:  
 „in vitro“, hyperbar ozonisiertes Eigenblut in der Plasmaflasche. „Nach Therapie“: Kontrolle des Redoxaequivalents im Venenblut, 150 ml ozonisiertes Venenblut setzen einen „Impuls“ im peripheren Blut, der sich kettenreaktionsartig verstärkt.

Von besonderem Interesse dürfte auch die Frage sein, welcher Teil des Hämatokrits in besonderem Maße an der Änderung des Redoxaequivalents beteiligt ist, worüber die nachfolgende Grafik Nr. 3 Auskunft gibt. Die subkutane Verabreichung eines Präparates unter einer O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Atmosphäre kultivierter autologer Leukozyten zieht eine kräftige Änderung des Redoxaequivalents zur elektronegativen Seite nach sich. Im Gegensatz zu einem Präparat, das aus Krebsgewebe durch Ozonolyse gewonnen wurde.

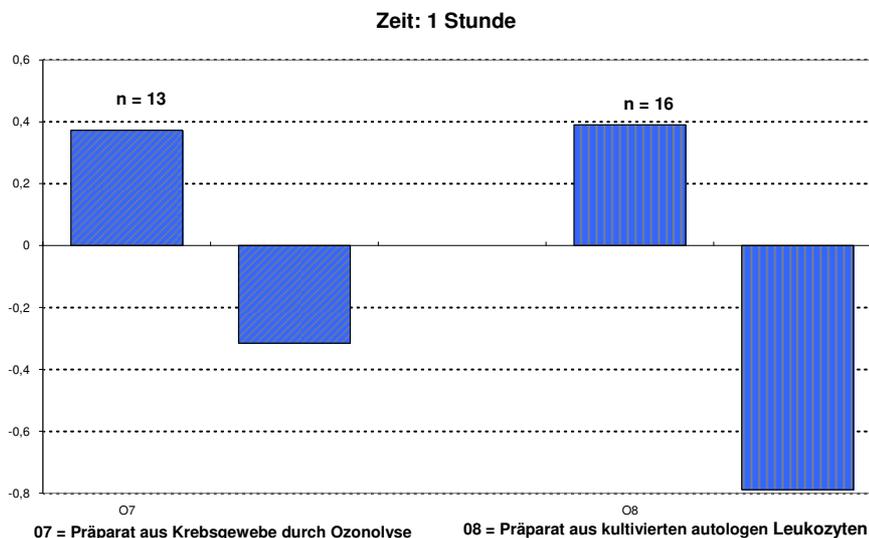
Die Anwendung des medizinischen Ozons in Form von Eigenbluttherapien und die intravenöse Gabe von Vitamin C scheint auf den ersten Blick eine seltsam konträre Therapiekombination zu sein, die immer wieder zu kontroversen, zum Teil heftigen Diskussionen führte. Andererseits waren aber speziell mit dieser Therapiekombination immer wieder klinische Erfolge zu erzielen, wie die Erfahrung lehrt. (2)

**Vitamin C führt zu einer Regeneration des Glucose-Phosphat-Shunts** in Erythrozyten (und auch in Granulozyten, wie weiter unten ausgeführt). Bei gleichzeitigem Einsatz von Vitamin C und Ozon wird die Energiebilanz drastisch verbessert, was u. a. bei „alten“ Blutkonserven durch Kontrolle des Sauerstoffpartialdrucks eindrucksvoll nachweisen lässt (siehe Grafik 4)

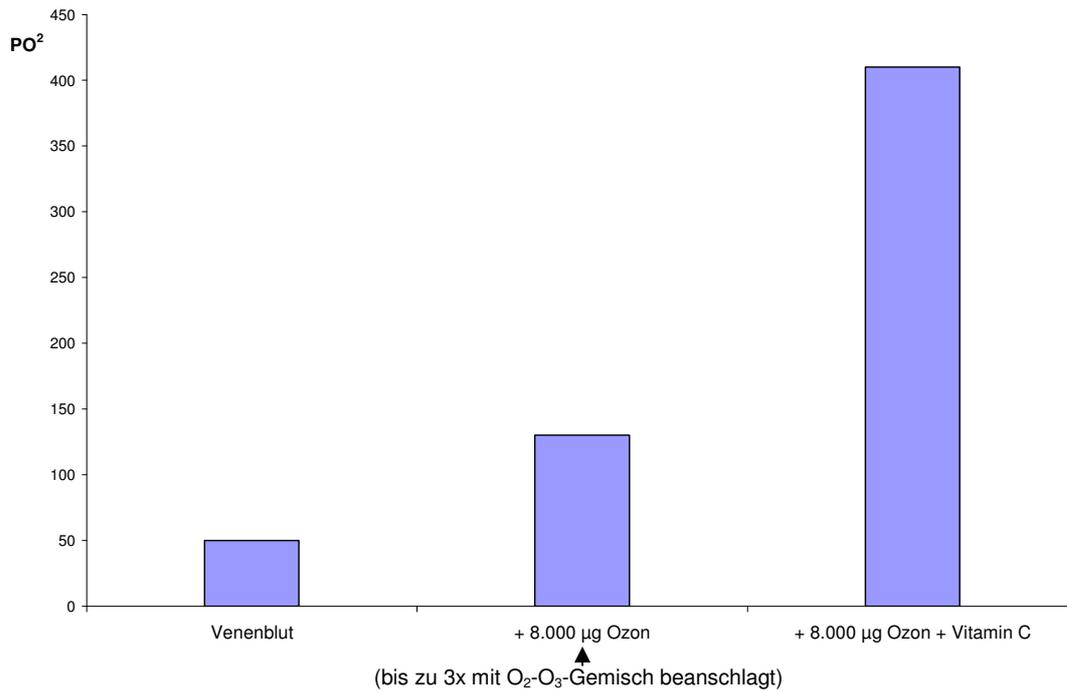
Ein durchaus nachahmenswertes Verfahren für Transfusionszentren.

Änderung des Redoxäquivalents unter verschiedenen O<sub>3</sub>-Therapien

Grafik 3

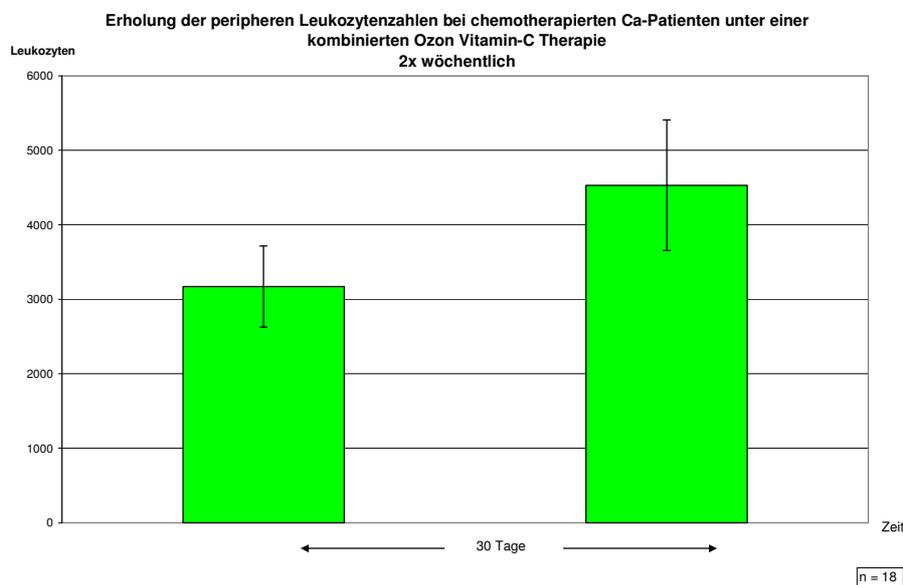


Grafik 4



**Werden Ozon-Eigenblut-Therapien mit intravenösen Vitamin C-Applikationen kombiniert, kommt es zu einem Anstieg der peripheren Leukozytenzahlen (siehe Grafik 5).**

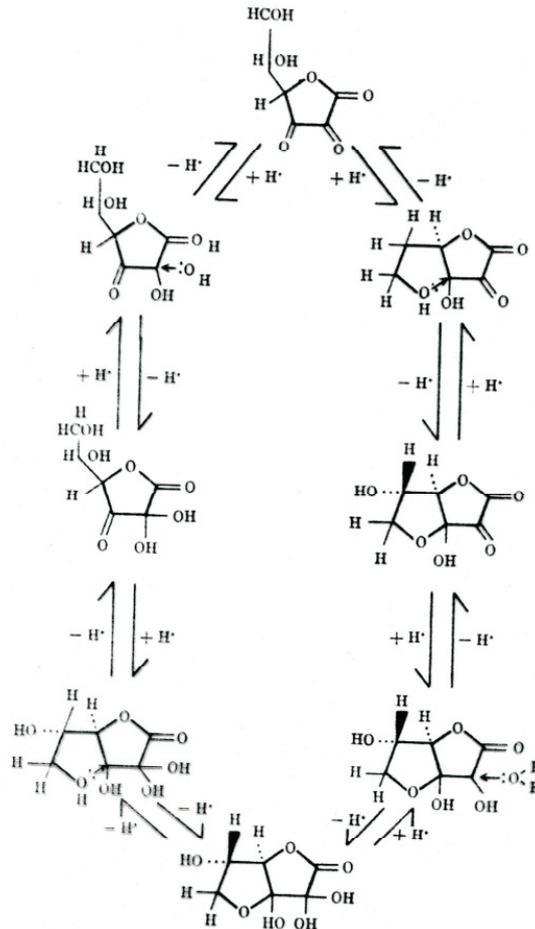
Grafik 5



In der Tat besteht Vitamin C nicht nur aus der klassischen Ascorbinsäure, sondern kann in vielfältigen teiloxidierten Varianten – auch in dimeren Formen - nachgewiesen werden, bis hin zur Dehydroascorbinsäure, die ein eindeutig oxydatives Potential aufweist und im Gegensatz zur wasserlöslichen Ascorbinsäure fettlöslich ist. (siehe Grafik 6)

Grafik 6

Vitamin C: Ascorbinsäure ↔ Dehydroascorbinsäure



nach Tolbert und Ward

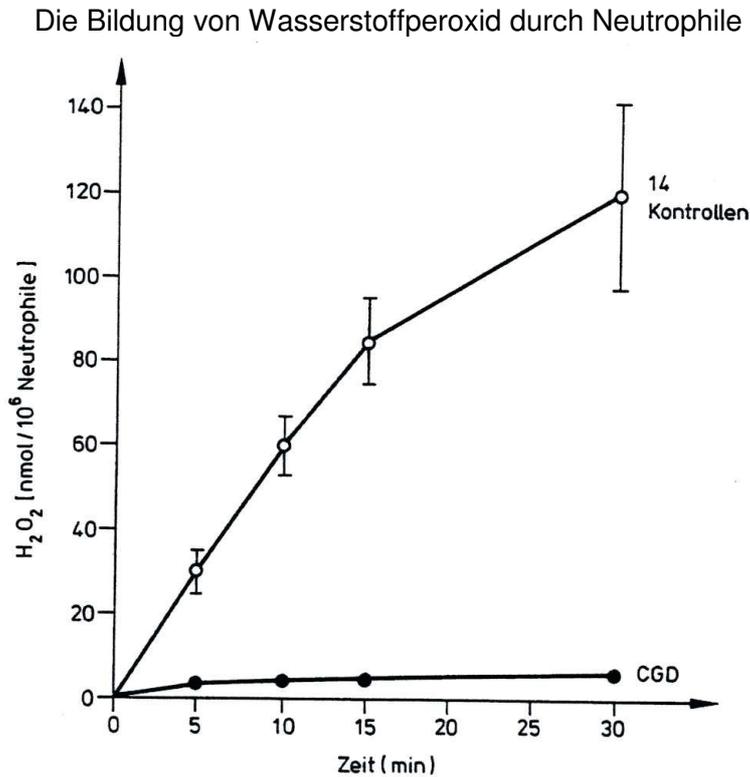
Der Neutrophile gewinnt seine Energie in erster Linie über die Glykolyse, das heißt über die Umwandlung von Glucose in Lactat. Wenn intakte oder homogenisierte Leukozyten inkubiert werden mit C 14 markierter Glucose wird 80 % der Radioaktivität wieder entdeckt in Milchsäure. Dieser Prozess kann durch Cortisol behindert werden.

Der oxydative Metabolismus der Neutrophilen ist gekennzeichnet durch 0,15  $\mu\text{mol}$  Oxygen pro  $10^7$  Zellen bei Fehlen von Glucose und 0,015  $\mu\text{mol}$  Sauerstoff pro  $10^7$  Zellen in Anwesenheit von Glucose. Der Sauerstoffverbrauch der Neutrophilen wird durch eine Vielzahl von physiologischen Stimuli beeinflusst, unter anderem durch Schilddrüsenhormone (5), Kohlendioxidpartialdruck (6), Glucosekonzentration (7), Serum (8) Pyrogene (9), Komplementkomponenten, chemotaktische Peptide und Immunkomplexe (10). Eine Reihe chemischer Substanzen unterdrückt die Atmung der Granulozyten, unter anderem Saponin, Thiourazil, Chloramphenicol, Cyanid, Fluoroacetat, Malonat und Beta-p-Hydroxymercuribenzoat. Im Gegensatz zu einigen anderen Verbindungen wie Dinitrophenol und Ascorbinsäure, die die Sauerstoffverwertung verbessern (11), woraus sich wiederum der immunstimulative Effekt der Kombination Ozon und Vitamin C ableiten lässt.

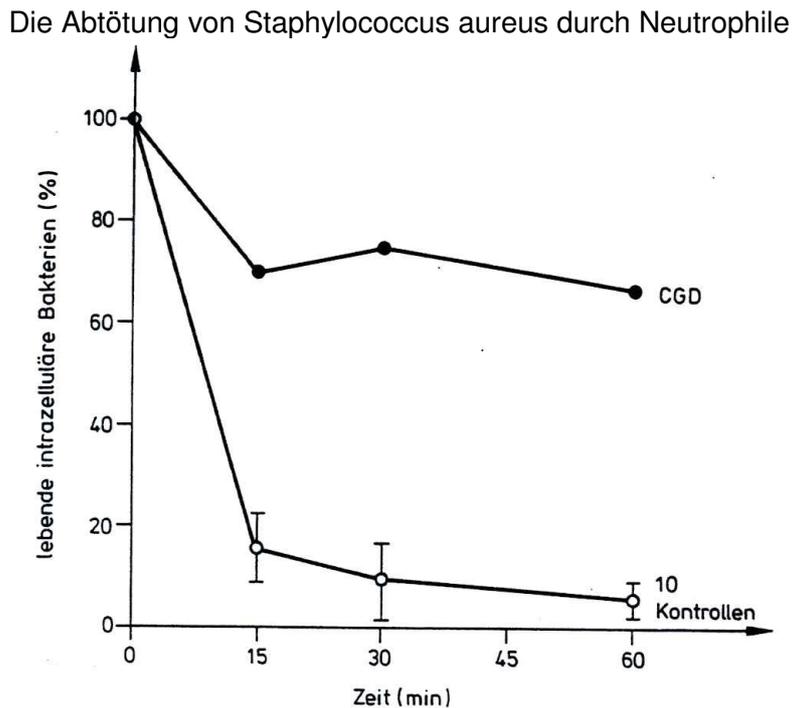
Aktivierte Neutrophile produzieren verschiedene antimikrobielle Sauerstoffmetaboliten, unter anderem Superoxidanion ( $\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ), hypochlorige Säure ( $\text{HOCl}$ ) und Singulett-Sauerstoff. Diese reaktiven Metabolite werden generiert durch eine NADPH-abhängige Oxidase, die in der Plasmamembran lokalisiert ist und molekularen Sauerstoff reduziert zum Superoxidanion. Die Oxydase ist inaktiv in

ruhenden Neutrophilen und wird stimuliert durch eine Aktivierung des Neutrophilen (12). Die Bedeutung der NADPH-abhängigen Oxydase für die bakterizide Fähigkeit der Zellen ist nachgewiesen in Personen mit CGD- Erkrankung (**Chronic Granulomatous Disease**), bei denen die Neutrophilen Superoxidanionen und davon abhängige Metabolite nicht generieren können. **Diese Neutrophilen und Monozyten phagozytieren zwar katalasepositive Mikroorganismen, aber töten sie nicht.** (13) (Grafik 7 und 8)

Grafik 7



Grafik 8



**Die morphologische Lokalisation der Abwehr der Granulozyten ist in den Granula beheimatet**, von denen verschiedene Typen unterschieden werden:

**Acurophile Granula besitzen mikrobizide Aktivität** und spielen eine wesentliche Rolle in der Vernichtung von Geweben, die durch entzündliche Prozesse gekennzeichnet sind. In diesen Granula findet man Defensine (mikrobizide Peptide). (14, 15). Ein wesentliches Agens bei der Abtötung von Mikroorganismen ist die oben erwähnte hypochlorige Säure, die durch Myeloperoxidase (MPO) aus Wasserstoffperoxyd und Chlorid produziert wird (16). Von dieser Erstfraktion der Granula unterscheidet man eine zweite Generation, die synthetisiert wird während der Granulozythopoese. Diese **Granula wirken über Lysozyme, Kollagenasen, Vitamin B 12 abhängige Proteine, Heparinase und Lactoferrin** (17-22).

Die Funktion dieser Proteine sei an zwei Beispielen erläutert. Lysozym hydrolysiert das Zellwandproteoglykan von einigen Bakterien und wird ebenso in der Erstfraktion der azurophilen Granula gefunden. Lactoferrin ist ein eisenhaltiges Protein, das notwendig ist für die Hydroxylradikalbildung (23) und die Zelladhäsion (24) und beeinflusst zusätzlich die Funktion der Lysozyme bei der Vernichtung gramnegativer Bakterien (25).

Neutrophile besitzen auch eine dritte Reihe von **Granula, die Gelatinase enthalten** (26), ein Enzym, das viele Gemeinsamkeiten mit der neutrophilen Kollagenase hat (27). Diese dritte Population der Granula scheint über einen ganzen Pool von Membranglycoproteinen zu verfügen, der **in die Zelladhäsion integriert** ist (28-30). Dafür spricht der C3 b-Rezeptor, der für die Zelladhäsivität essentiell ist (31) und der speziell in den tertiären Granula lokalisiert ist. Tertiäre Granula enthalten außerdem Oxydase und Zytochrom B (32).

Dieser kurze Überblick über die Funktion der Granula erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, zumal die Forschung darüber derzeit noch sehr im Fluss ist. Andererseits genügt dieser kurze Einblick in die Funktion der Granula, um ihrer besonderen Bedeutung in der körpereigenen Abwehr gerecht zu werden. **Die Kontrolle der Granulabildung und der Degranulation aus Leukozyten ist daher von essentieller Bedeutung bei allen akuten und chronischen Infekten, Immundefekten, malignen Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen.** Die Kenntnis dieses Geschehens fand ihren Niederschlag im Leukozytenfunktionstest (GOÄ 3693), der zum diagnostischen Standardrepertoire des immunologisch arbeitenden Arztes gehört.

Die grundlegende Fragestellung zur nachfolgenden Versuchsanordnung basierte auf dem Kernproblem der Ozondosierung, das heißt inwieweit beeinflusste die Ozonkonzentration und die Gesamtmenge des O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemischs die Funktion der Granulozyten. Dazu wurden 10 ml Venenblut in Vacutainer mit Na-Heparinbeschichtung abgenommen und anschließend nach folgendem Modus ozonisiert: Jeweils 10 ml ungerinnbares Blut wurden in eine 20 ml Polyäthylenspritze überführt und anschließend jeweils mit einer Gesamtmasse von 10 ml O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemisch à 4 µg, 12 µg, 21 µg, 24 µg, 31 µg und 40 µg ozonisiert. Nach Aufnahme des Gases wurde das Blut durch kreisende Bewegungen der verschlossenen Spritze mit dem O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemisch kontaminiert. Vorgesehen waren Konzentrationen von 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 40 µg. Der Ozongenerator 13 T der Firma Clinico Bad Hersfeld ließ jedoch keine Steigerung der Ozonkonzentration in 1-µg-Schritten, sondern nur in 2-µg-Schritten zu. Außerdem stimmten die abgegebenen Ozonkonzentrationen bei Kontrollen nicht mit den Vorgaben auf dem Display des Generators überein. Das O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemisch wurde daher am Ausgang der Apparatur durch einen Ozonanalyzer der Firma Humares, Weingarten kontrolliert. Um Fehlkonzentrationen aufgrund des Totraums in der zuführenden Leitung zu vermeiden, wurde zunächst das ausströmende O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemisch über den Analyzer in seiner Konzentration bestimmt, danach die Gaszufuhr kurz abgeschaltet, um hernach erneut die Spritze mit neuerlicher Gaszufuhr zu füllen.

Die Ozonisierung des Blutes führte von einem Sauerstoffgehalt von 23,5 mmHg und einem Vol% von 8,7% (Leerwert, Messgerät: ABL 520 von Radiometer, Copenhagen)

		zu einem pO <sub>2</sub> von	bei einem Vol% von
bei 4 µg	Konzentration O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub>	151,4 mmHg	19,0 %
bei 12 µg	Konzentration O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub>	79,6 mmHg	16,1 %
bei 21 µg	Konzentration O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub>	394,7 mmHg	19,8 %
bei 24 µg	Konzentration O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub>	77,3 mmHg	17,9 %
bei 31 µg	Konzentration O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub>	300,7 mmHg	18,8 %
bei 40 µg	Konzentration O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub>	437,9 mmHg	20,0 %

Die abweichenden –„nicht linearen“– pO<sub>2</sub>-Werte bei einer Ozonisierung mit einem O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemisch von 12µg Konzentration bzw. 24µg Konzentration wurden mehrfach kontrolliert. Eine hinreichende Erklärung konnte bislang nicht gefunden werden.

Ozon ist für die Aktivierung des oxidativen Stoffwechsels das derzeit beste Agens. Es ist exakt dosierbar, leicht handhabbar und ohne metabolische Rückstände (außer O<sub>2</sub>). Alternativen wären bspw. Phorbolmyristat oder Wasserstoffperoxyd. Der Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist jedoch schwer händelbar, da er das Blut zum Schäumen bringt, und wird daher beim eigenen Verfahren nicht verwendet. Ohne die Anregung durch Ozon zeigen die Granulozyten auf die zugesetzten Antigene eine veränderte Sensibilität (siehe nachfolgende Grafiken).

Nach der Ozonisierung wurde das Blut gemäß nachfolgenden Vorgaben mit exakt gleicher Dosis des jeweiligen Erregers kontaminiert: das heißt, das mit 4µg, 12 µg, 21µg, 21µg,31 µg oder 40 µg O<sub>3</sub>-Konzentration kontaminierte Blut wurde mit jeweils 100 µl pro 1 ml Blut einer exakt vorgegebenen Dosis an Antigenen (Bakterien, Viren, Pilze, Toxine) gemäß nachfolgender Liste (Tabelle 2) versetzt. Die Gesamtmasse der jeweiligen Erregerspezies wurde in Vorversuchen als dosisäquivalent zur Reaktion anderer Spezies ermittelt. Die Auswahl der Antigene wurde in einem Vorversuch mit insgesamt 54 Proben gemäß nachfolgender Liste ermittelt.

Tabelle 1

Name des Patienten: N. N.		Geburtsdag: 20.1.1940	
Diagnose:			
<u>Geprüfte Antigene</u>			
ID	Antigene	ID	Antigene
1	Cholera	36	Serra D7
2	Hepatitis A u. B	52	Mucor mucedo
3	Tetanus	70	Pilze II (Asp. fum., Mucor muc., Pen. not., Pull. pull., Rhizo. nigric., Se
5	Grippe	74	Papillomavirus 1:100
7	Staphylokokken	81	EBV
9	Herpes	82	Röteln
10	Typhus	83	Papillomavirus 1:10
13	Pneumokokken	89	Hepatitis C
15	Tuberculinum	96	Masern
16	Luesinum	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., Curv. lun., Fusar. monil
17	Tollwut	98	Alternaria tenuis
18	Meningokokken	99	Botrytis cinerea
20	FSME	100	Cladosporium herbarum
22	Candida	101	Curvularia lunata
23	Propionibakterien	102	Fusarium moniliforme
24	Corynebakterien	103	Helminthosporium halodes
25	Proteus vulgaris	104	Neurospora sitophila
26	Rotaviren	105	Penicillium notatum
27	Esch.coli, Morgan., Prot., Klebs., Entero.faeca.	106	Pullularia pullulans
28	Borrelien	107	Rhizopus nigricans
29	Chlamydien	108	Serpula lacrymans
30	Mycoplasmen	109	Phoma betae
31	Mucor racemosus / Aspergillus niger	110	Enterococcus faecalis (Symbioflor 1)
32	Adenoviren D6	111	Escherichia coli (Symbioflor 2)
33	Cytomegalie	112	Enteroc. faec., Esch. coli (ProSymbioflor)
34	Mycobakterium	113	PEU patienteneigener Urin
35	Pseudomonas	114	PEU2 patienteneigener Urin 1:10

Die nachfolgende Tabelle erfasst demnach nur die „reaktionsfreudigen“ Erreger.

Tabelle 2

<b>Antigen</b>	<b>Kontrollnummer</b>
Grippeviren (Agglutinine)	2
Meningokokken	18
Propionibakterien	23
Proteus vulgaris	25
Rotaviren	26
Röteln	82
Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., Curv. lun., Fusar. monil.)	87
Botrytis cinerea	98
Cladosporium herbarum	100
Rhizopus nigricans	107
Wespen Gift 1:100	960

Das kontaminierte Blut wurde hernach 12 Stunden bei 37 Grad inkubiert und 6 Stunden danach (nach einer Zwischenlagerung bei Raumtemperatur) einer Messung durch den Granulozytenfunktionstest, respektive einschließlich seiner weitergehenden Varianten im Rahmen des Kulturtransformationstestes unterzogen. (34, 35) Ausgenommen von dieser Versuchsanordnung waren Ergebnisse gemäß der Tabellen 5 und 6.

Die weiter unten veröffentlichten Daten wurden ermittelt aus dem Blut eines 69-jährigen Patienten, mit den Diagnosen primär chronische Polyarthrit, Hypertonus und Herzinsuffizienz. Die anamnestischen Daten waren: Schwere eitrige Angina und Sepsis mit acht Jahren, mit 16 Jahren Tonsillektomie, mit 20 Jahren schwere eitrige Sinusitis, mit 28 und 33 Jahren Abgänge von Nierensteinen, in den fünfziger Jahren Entwicklung eines Hypertonus, der einen stationären Aufenthalt im Alter von 57 Jahren auf Grund einer hypertensiven Krise notwendig machte. Allergische Reaktionen auf Hausstaub, über viele Jahre pathologische Werte von ASL, CRP und in geringerem Maße auch RF. Der technische Ablauf des Tests beruht auf der automatischen Erfassung des Differentialblutbildes über einen so genannten Zellcounter. Das Funktionsprinzip dieser Geräte beruht auf dem Durchlicht und dem seitlichen Streulicht einer Lasereinheit unter verschiedenen Färbebedingungen.

Zum besseren Verständnis des Verfahrens sei kurz auf die bislang etablierten Methoden eingegangen: Die dabei durchgeführten Schritte sind:

1. Isolation der basophilen Granulozyten
2. Stimulation mit Allergenextrakten
3. Messung der freigesetzten histaminassoziierten Allergiemediatoren

Eine Verbesserung dieses standardgemäßen Verfahrens auf mikroskopischer Basis ist die zelluläre Diagnostik, wie sie von Biocienza, Boehringer Ingelheim durchgeführt wird. Wobei diese Diagnostik aufgrund des Einsatzes eines Durchflusszytometers deutlich verbessert wurde aufgrund der Kontrolle großer Zellzahlen, das heißt aus dem früher eher semiquantitativen Verfahren wurde nun ein quantitatives Verfahren.

Aus den Unterlagen ist darüber hinaus zu ersehen, dass neben den klassischen IgE vermittelten Reaktionen auch Pseudoallergene nachgewiesen werden können. Das eigene Verfahren stürzt sich ebenfalls auf die quantitative Erfassung dieser Reaktion, jedoch unter Verwendung der Laserphotozelleinheit eines Zellcounters, der als Basiswerte zur Errechnung des Differentialblutbildes ebenfalls nach entsprechender Färbung die zytoplasmatischen Granula ermittelt, Größe des Zellkerns und Größe der Gesamtzelle in drei getrennten Kanälen.

Wird eine Population immunkompetenter Zellen daher mit einem Antigen kontaminiert, kommt es zwangsläufig zum physiologischen Prozess der Granulaproduktion bzw. der Verminderung durch Exkretion. Da gleichzeitig die Zellgröße gemessen wird, lässt sich daraus sehr exakt die tatsächliche Degranulationen errechnen. Der errechnete Wert ergibt sich demnach aus der Differenz „Stimulationskontrolle minus Basalwert,“ bezogen auf „Granuladichte und Zellgröße“.

Da darüber hinaus noch die RNA/DNA Masse über die Zellkerngröße ermittelt wird, lassen sich außerdem noch Steuerungsprozesse der Zelle erfassen.

Da der Test sich spezifisch für Granulozyten, Basophile, Lymphozyten usw. errechnen lässt, lassen sich neben den üblichen Einsätzen bei Allergenen und Pseudoallergenen auch infektsbedingte Prozesse messen. Das eigene Verfahren hat gegenüber dem ursprünglichen mikroskopisch basierten Test den Vorteil der bereits von Biocienza gelobten quantitativen Erfassung der Prozesse. Wie exakt der eigene Leukozytendegranulationstest den tatsächlichen physiologischen Ablauf der Degranulation erfasst, lässt sich anhand der Tatsache ableiten, dass die nachmalige Kontamination einer autologen Blutkultur mit den ermittelten relevanten Antigenen die Basophilen auf 15 – 20 % der Gesamtzellzahlen ansteigen lässt: ein Beweis „im Umkehrschluss“.

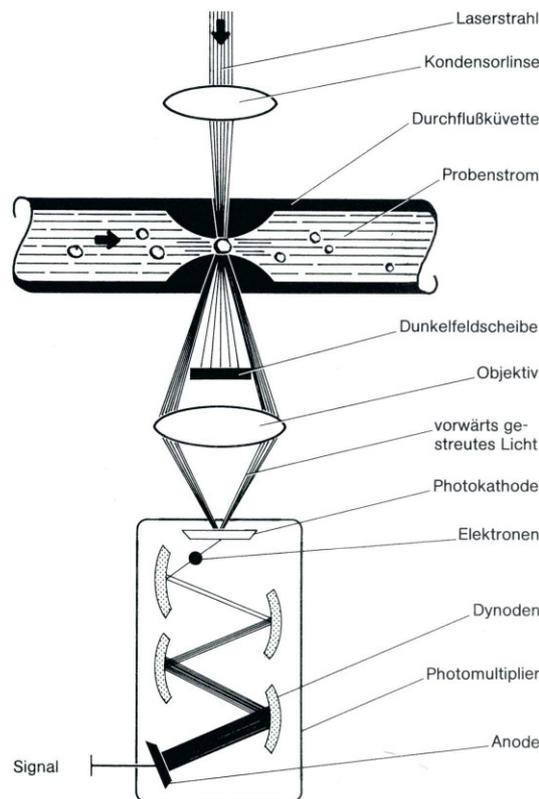
Die Biocienza hat für ihre eigenen Leukozytendegranulationstests Basiswerte ermittelt. Die ergeben sich im eigenen Test zwangsläufig durch Berechnung der Standardabweichung, da bei Testung von 40 – 50 Antigenen sich ein robustes Sigma errechnen lässt. Meist liegen relevante Antigene sogar über der doppelten und dreifachen Standardabweichung.

Sämtliche oben genannten Schritte des Leukozytendegranulationstest werden demnach im eigenen Verfahren ebenfalls durchgeführt und erfüllen damit die Anforderungen nach GOÄ 3693.

Der gerätetechnische Ablauf des Diagnoseverfahrens sei kurz erläutert:

Bei der Streulicht-Zähltechnik durchfließt die mit partikelfreier Flüssigkeit verdünnte Blutprobe eine Durchflußküvette mit einem festgelegten Kapillardurchmesser. Hierbei wird der Probenstrom senkrecht zur Strömungsrichtung von einem eng gebündelten Lichtstrahl durchleuchtet (Grafik 9).

Grafik 9



Falls sich keine Blutkörperchen im Probenstrom befinden, wird der Lichtstrahl, nachdem er die Küvette ungestört durchquert hat, von einer Dunkelfeldscheibe ausgeblendet und erzeugt kein Meßsignal. Sobald allerdings Blutkörperchen im Probenstrom sind und den Abtastbereich des Lichtstrahls passieren, wird ein Teil des Lichtes gestreut und mit einer Sammellinse einem Photomultiplier zugeführt. Dieser wandelt das unter einem bestimmten Winkel gestreute Licht in ein elektrisches Signal um und verstärkt es. Die Häufigkeit der registrierten Streulichtimpulse (Impulsfrequenz) wird von der Partikelkonzentration bestimmt. Als Lichtquelle kommen Wolframlampen und vor allem Laser in Frage, weil sie den Vorteil besitzen, kohärentes Licht von hoher Intensität zu erzeugen, so dass der in Vorwärtsrichtung gestreute Lichtanteil besonders hoch ist. Bei Wolframlampen dagegen sind die Lichtintensität und somit auch die Empfindlichkeit des Aufnehmers durch die erforderliche Bündelung des Lichtes mit Linsen und Spalten verringert.

Um die Möglichkeit einer Überlagerung von Blutkörperchen im Messbereich zu verringern, muss der Lichtstrahl möglichst eng gebündelt sein. Auch der Probenstrom kann verengt werden – hydrodynamisch fokussiert – werden. Bei optisch messenden Geräten ist die Länge der Kapillare wesentlich größer als ihr Durchmesser, der sich in der Durchflußküvette oft bis zur Meßstelle hin verjüngt. Da die Signalhöhe im Gegensatz zum konduktometrischen Messverfahren nicht von der Weite der Kapillare abhängt, kann der Messöffnungsdurchmesser wesentlich größer sein, so dass die Öffnung nicht so schnell verstopft. Die für die Koinzidenz entscheidende Einengung des Probenstroms wird durch die stetige Verengung der Kapillaröffnung und einen den Probenstrom umgebenden Hüllstrom erreicht.

Infolgedessen ist das Messvolumen klein, und die Blutkörperchen können trotz geringer Verdünnung einzeln abgetastet werden. Hierdurch kann im Vergleich zum konduktometrischen Verfahren eine höhere Zellzahl pro Analyse gezählt werden, was sich statistisch günstig auf die Messgenauigkeit auswirkt.

Erythrozyten und Thrombozyten werden zugleich gemessen. Ihre Abgrenzung erfolgt durch den Grad der Streuung und die Intensität des gestreuten Lichtes, da sie von der Oberfläche

der Blutkörperchen sowie der Oberflächenbeschaffenheit und dem Berechnungsindex des Zellmaterials bestimmt werden. Da hiervon die Höhe und von der Verweildauer der Teilchen im Lichtstrahl die Breite der Impulse abhängen, können mit Hilfe elektrischer Diskriminatorschwellen Zelltypen verschiedener Art und Größe voneinander unterschieden werden.

Der ermittelten Impulsfrequenz wird mit Hilfe bekannter Referenzproben eine Spannungshöhe zugeordnet, die der angegebenen Konzentration entspricht.

**Auf der Basis dieses Prozesses werden Zellkerne, Zytoplasma, Größe und Form der Zellen differenziert und der jeweiligen Zellart des Differentialblutbildes zugeordnet. Der nachfolgende Leukozytenfunktionstest nutzt die Technik derartiger Geräte, um im Vergleich gegenüber einer Leerkultur die Veränderungen an Zellen zu ermitteln, die mit verschiedenen Antigenen bakterieller, viraler oder allergener Natur kontaminiert wurden. Die Reaktionen verschiedener Zellarten in den kontaminierten Kulturen werden in Ihrem Ausmaß untereinander und mit der unbehandelten Kultur verglichen. Das Ausmaß dieser Veränderungen wird über ein eigenes Computerprogramm als so genannter „Sensibilitätsfaktor“ bzw. „Prüfprogramm“ ermittelt.**

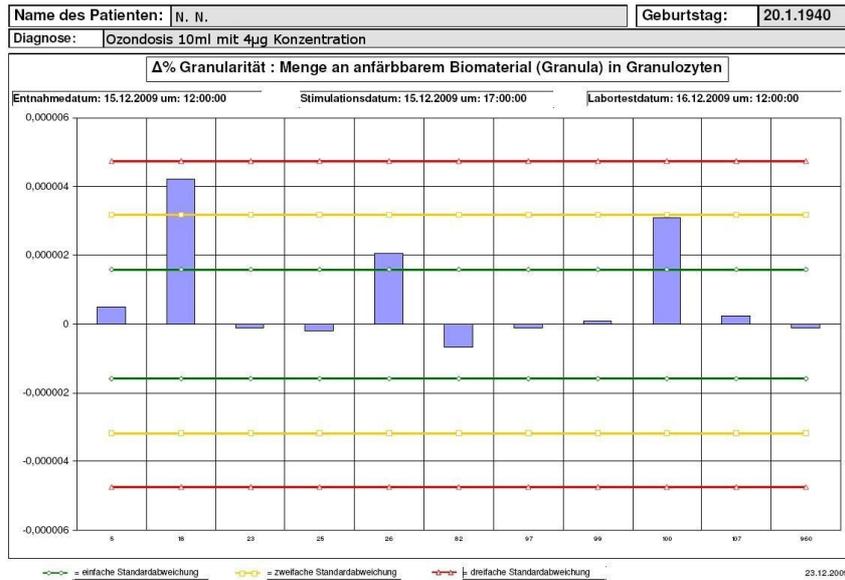
Unter dem Einfluss der Antigene ändern Neutrophile und Lymphozyten ihre Größe, ihre Zahl und auch die Menge an anfärbbarem Biomaterial im Zellinnern. Mit der Beladung der Neutrophilen an anfärbbarem Biomaterial nimmt die zelluläre Dichte der Neutrophilen ab, ebenso wie das Volumen der „geschrumpften“ Leukozyten.

Die Zahl der antigenerkennenden Zellen, z.B. die Monozyten, können je nach Einfluss der Toxine von Bakterien, Viren oder sonstigen Antigenen zu- oder abnehmen. In der Regel reduziert sich ebenfalls die Zahl der Thrombozyten, während das Volumen der Erythrozyten entsprechend dem Toxizitätsgrad des Antigens zunimmt.

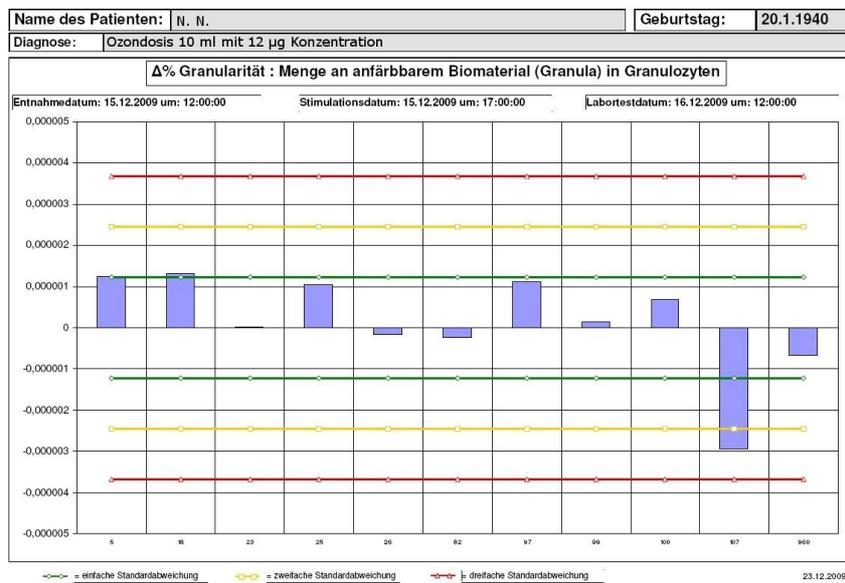
In den Messkanälen des Zellcounters wird außer dem Gehalt an anfärbbarem Biomaterial im Zytoplasma, die Kerngröße und die Größe der Zelle gemessen. Neben diesen Daten werden die Zellzahlen von Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten erfasst und mit der unbehandelten Eigenblutkultur verglichen

Die Differenzen der Parameter, die gegenüber der unbehandelten Kultur in den antigenbeschickten Kulturen entstehen, werden ermittelt und danach über ein Computerprogramm in Form eines „Sensibilitätsfaktors“ errechnet. Die so ermittelten Sensibilitätsfaktoren werden in einem grafischen Profil abgetragen, wodurch ein Balkendiagramm entsteht, das je nach der Intensität des Einflusses der unterschiedlichen Toxine auf die Zellen einen differenzierten Ausschlag zeigt. (Grafik 9-44)

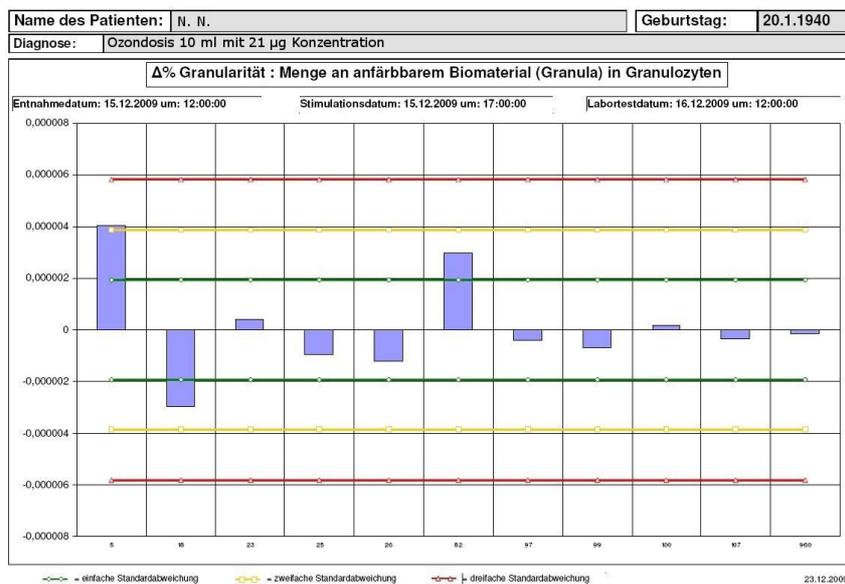
Grafik 10



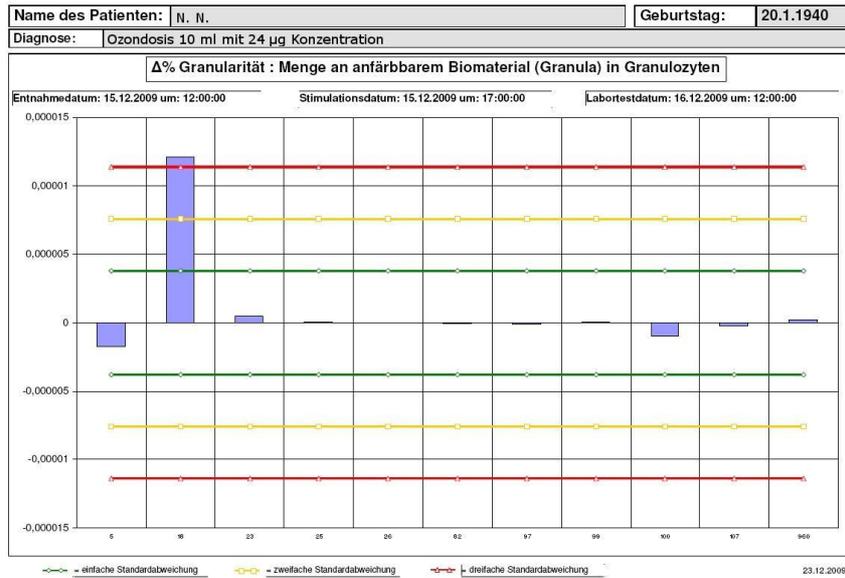
Grafik 11



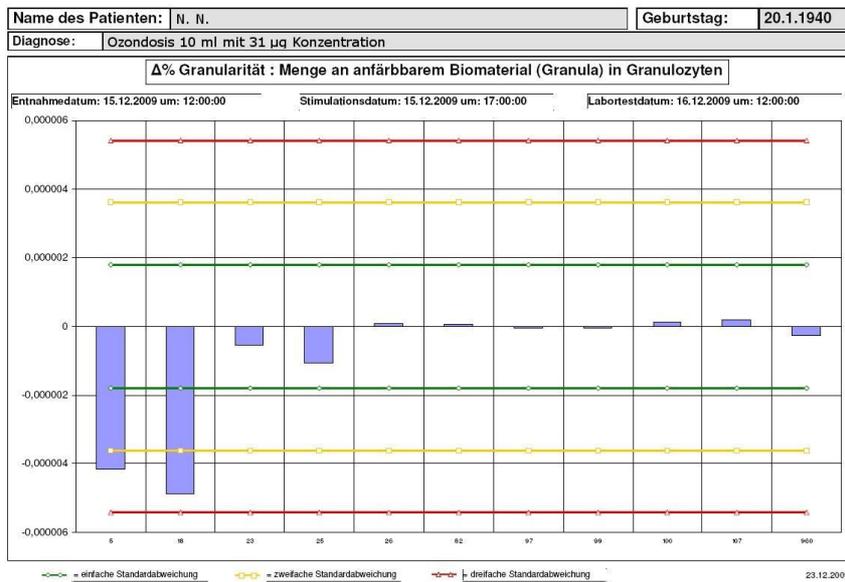
Grafik 12



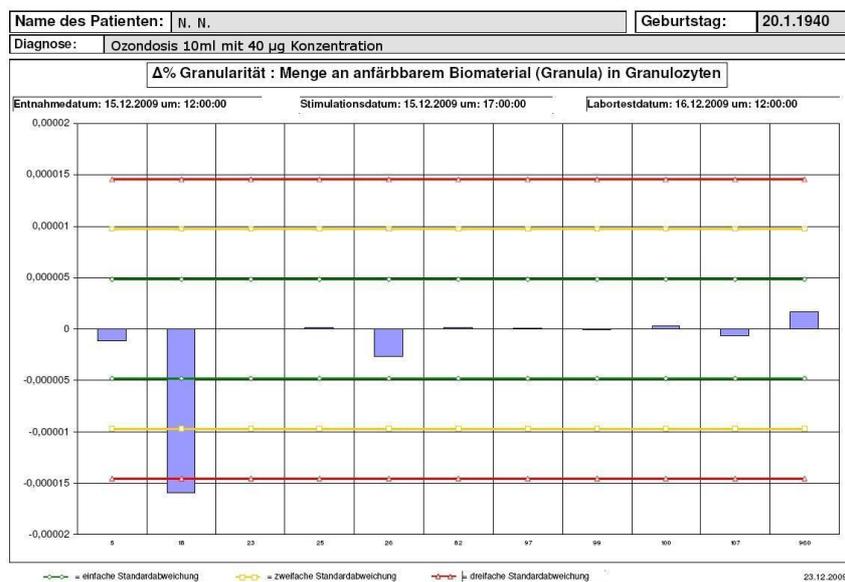
Grafik 13



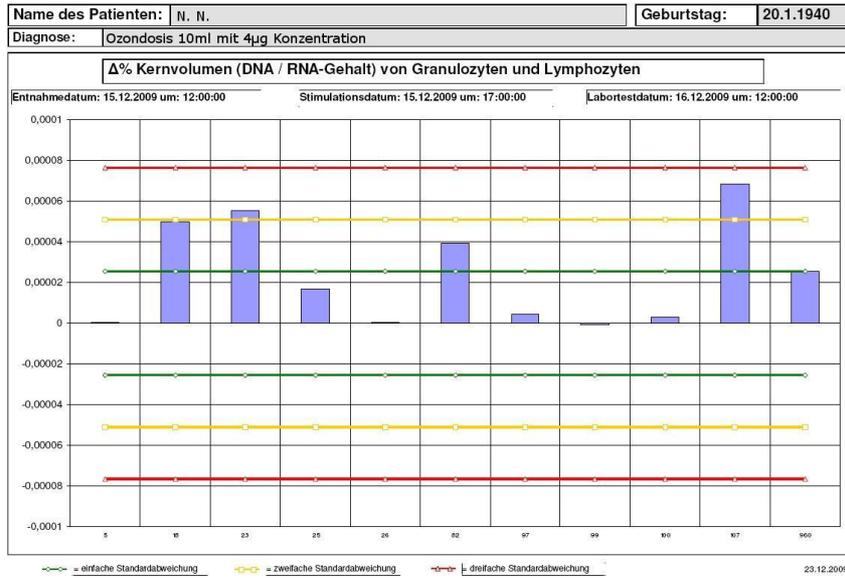
Grafik 14



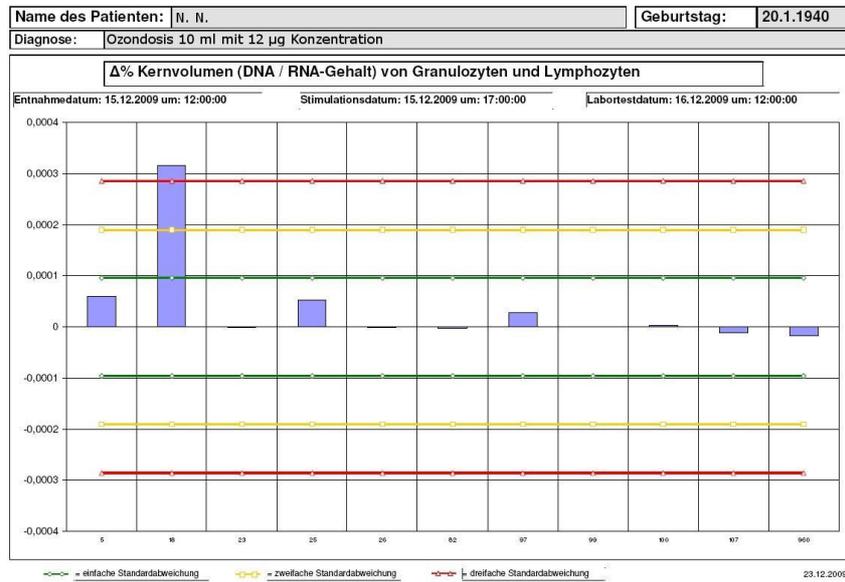
Grafik 15



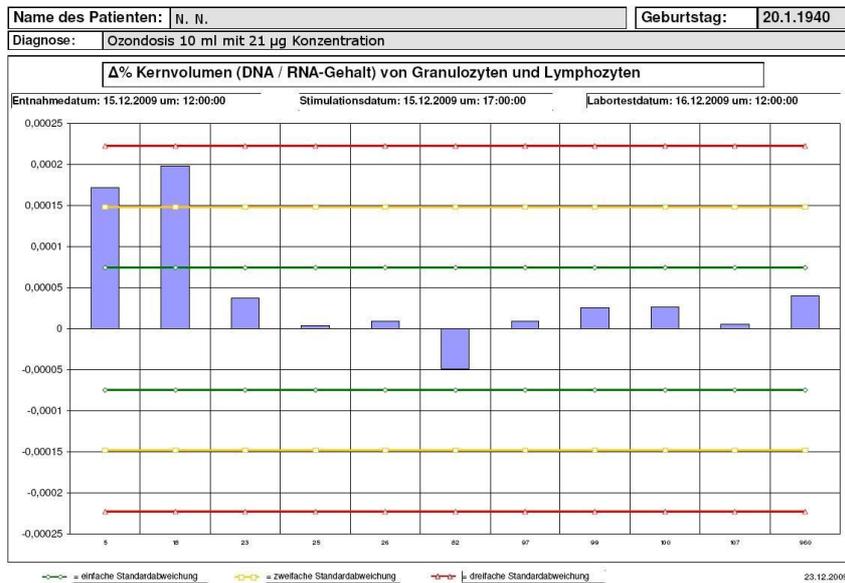
Grafik 16



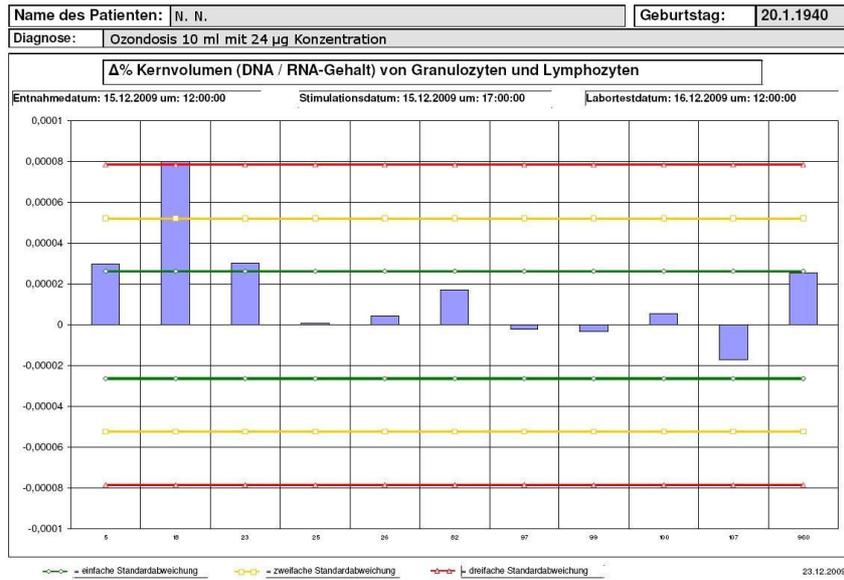
Grafik 17



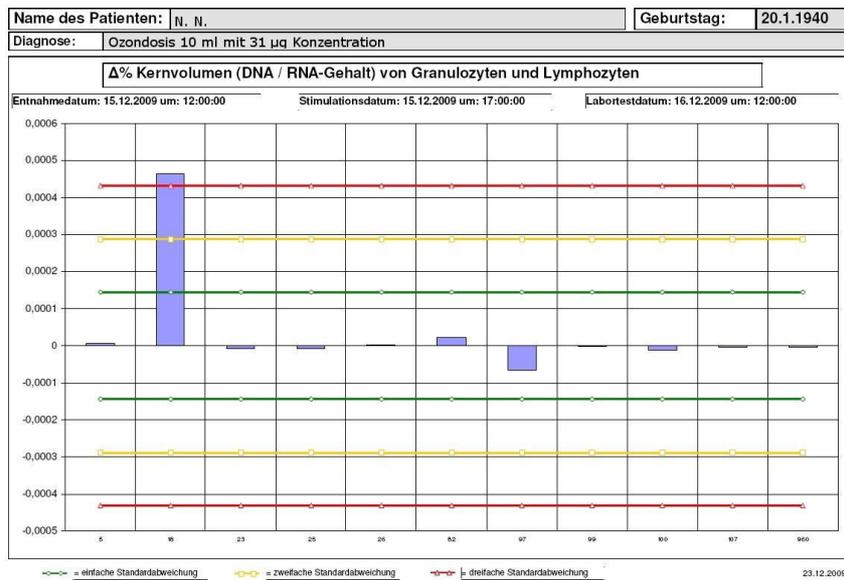
Grafik 18



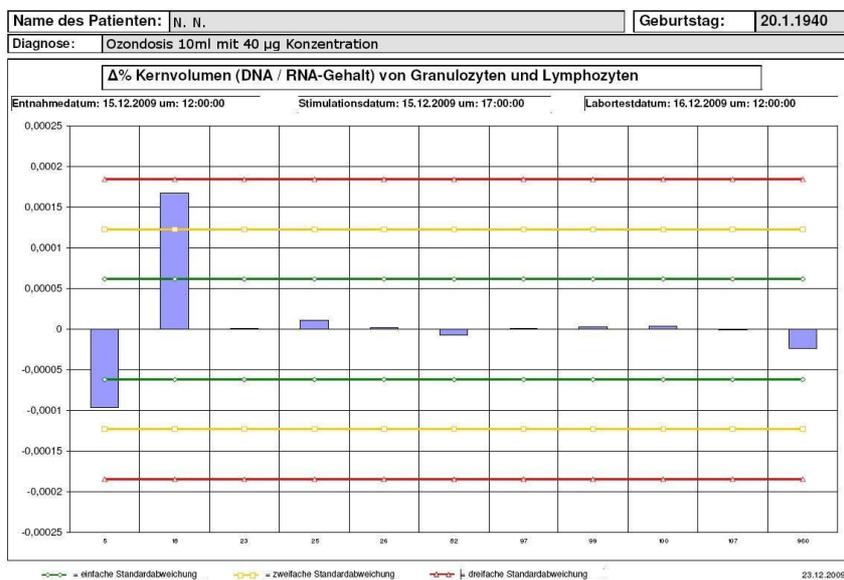
Grafik 19



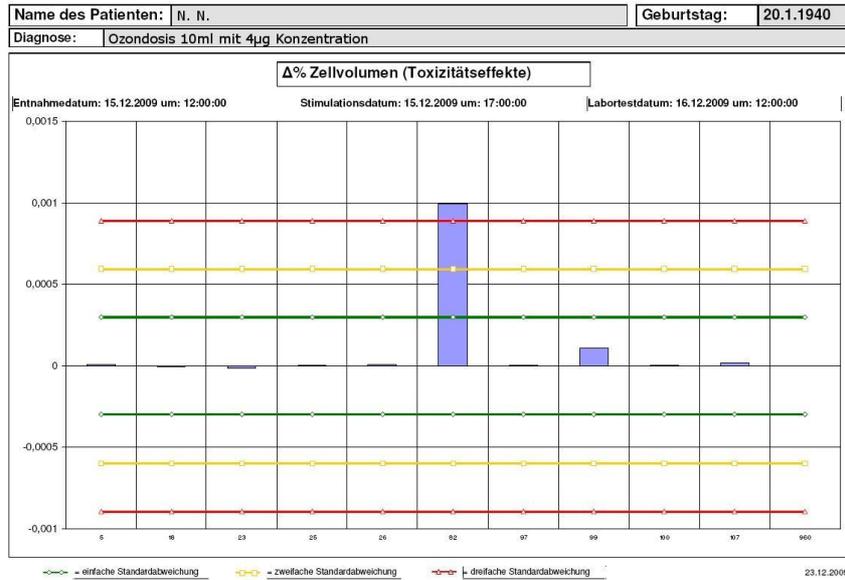
Grafik 20



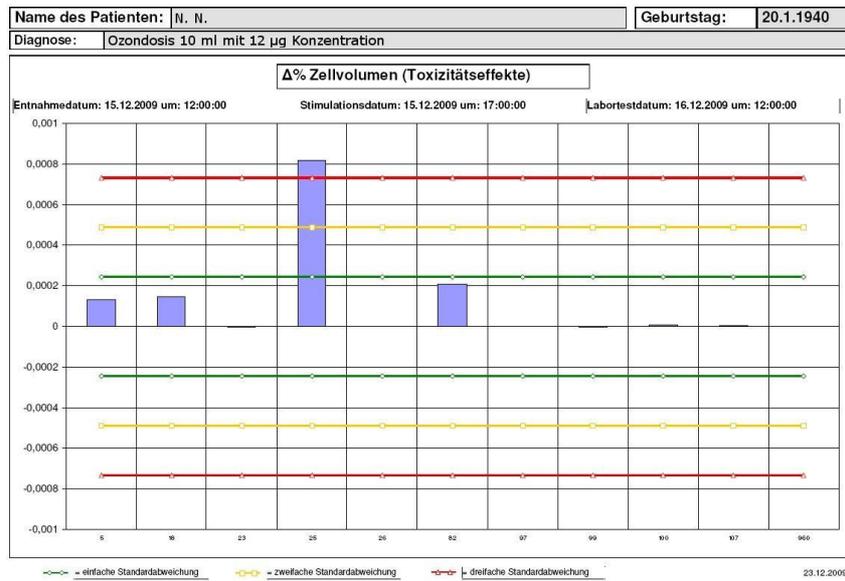
Grafik 21



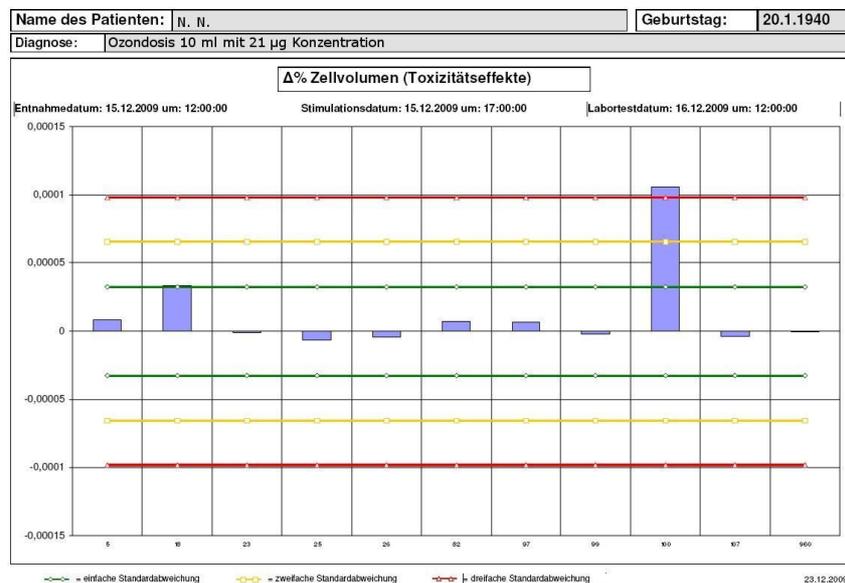
Grafik 22



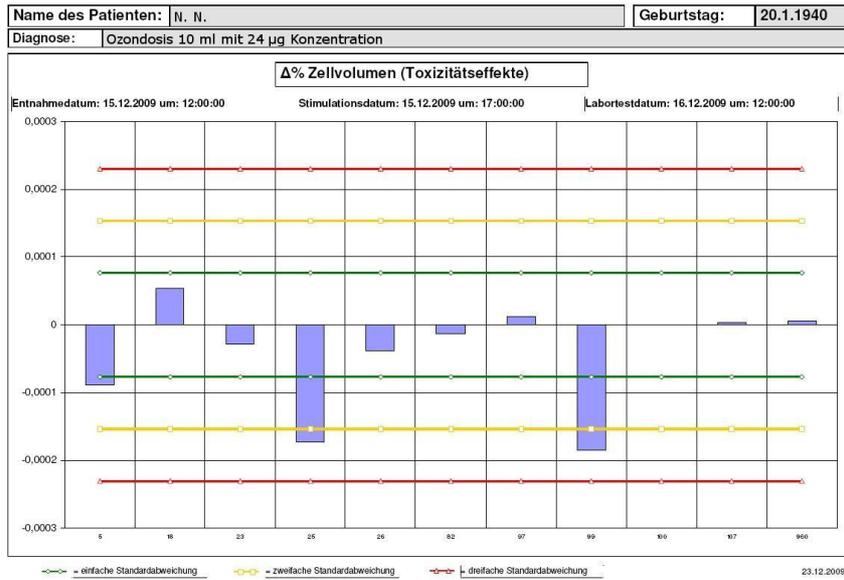
Grafik 23



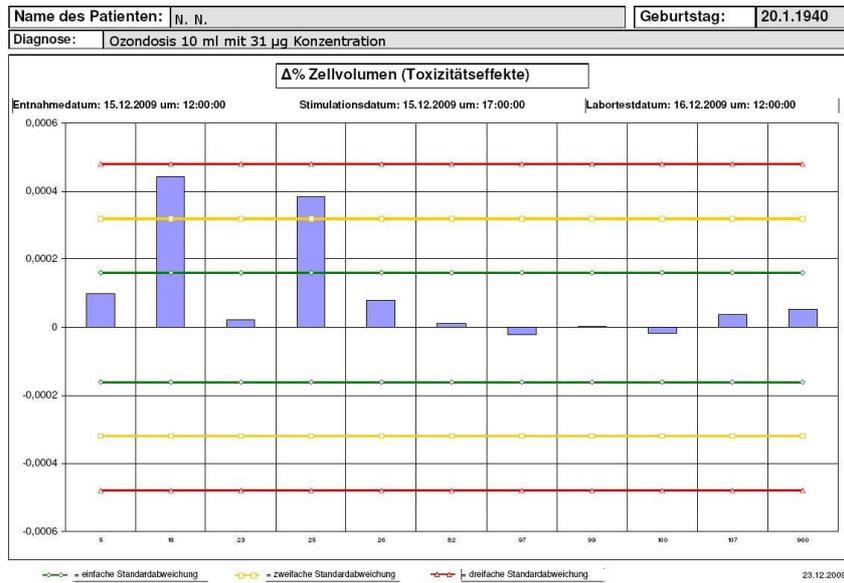
Grafik 24



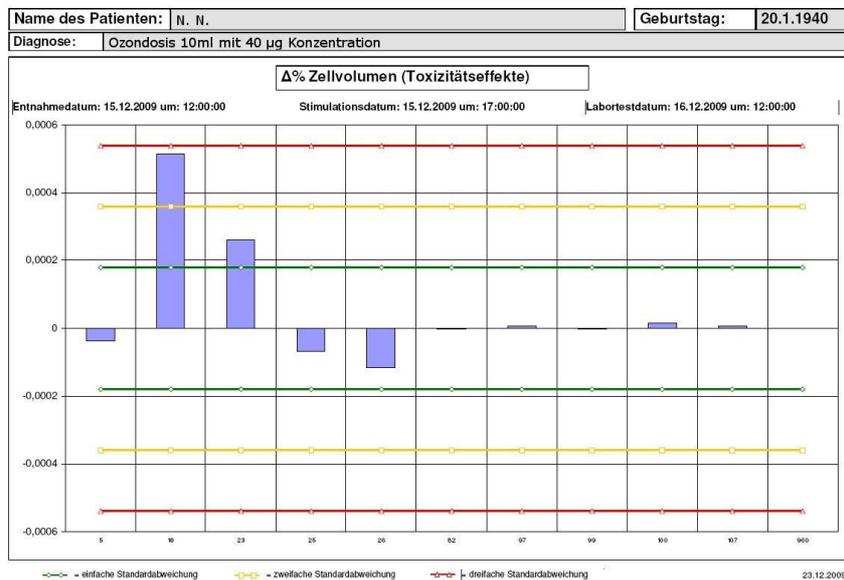
Grafik 25



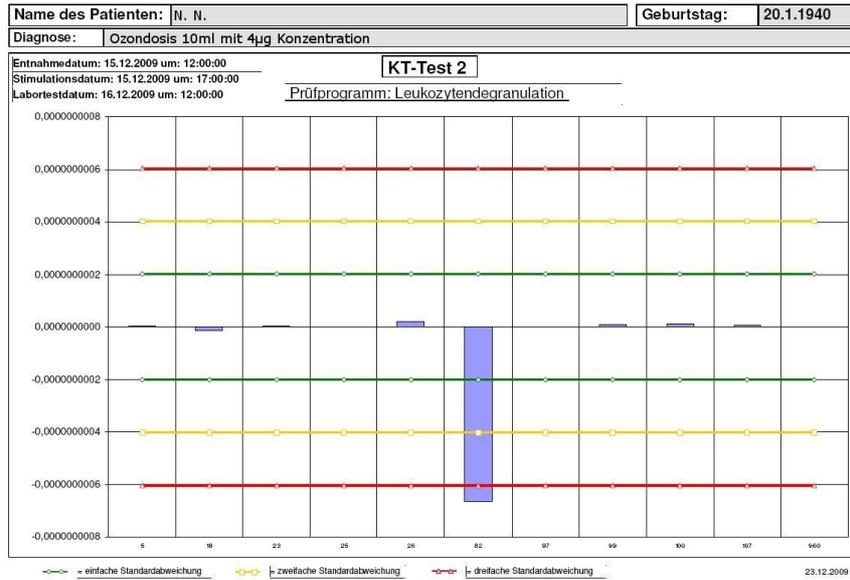
Grafik 26



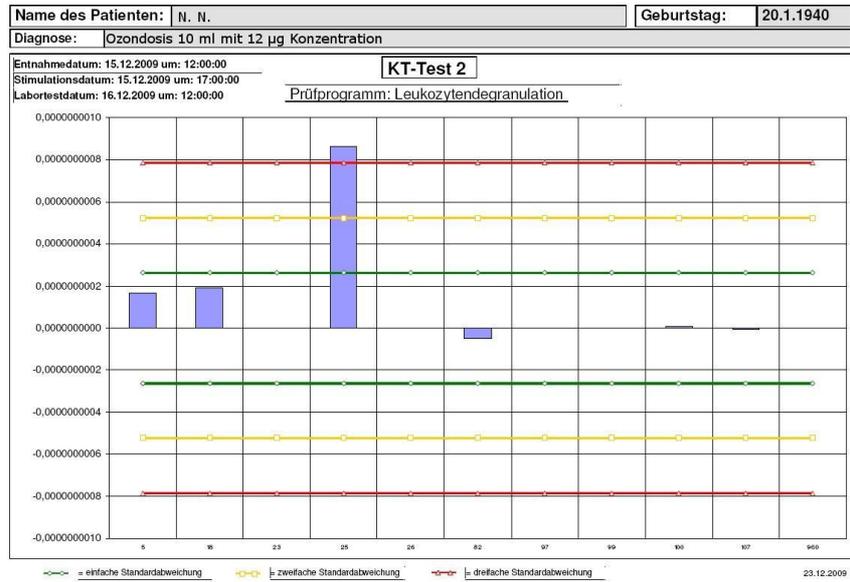
Grafik 27



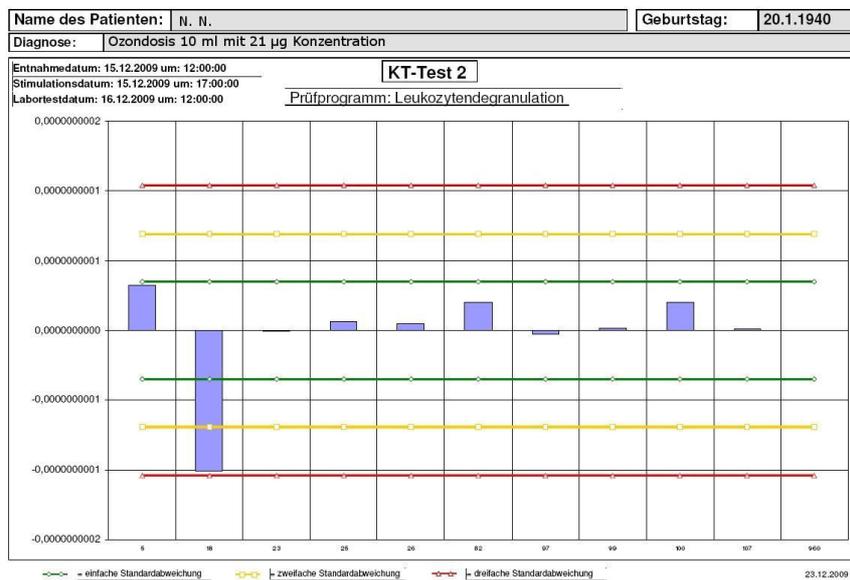
Grafik 28



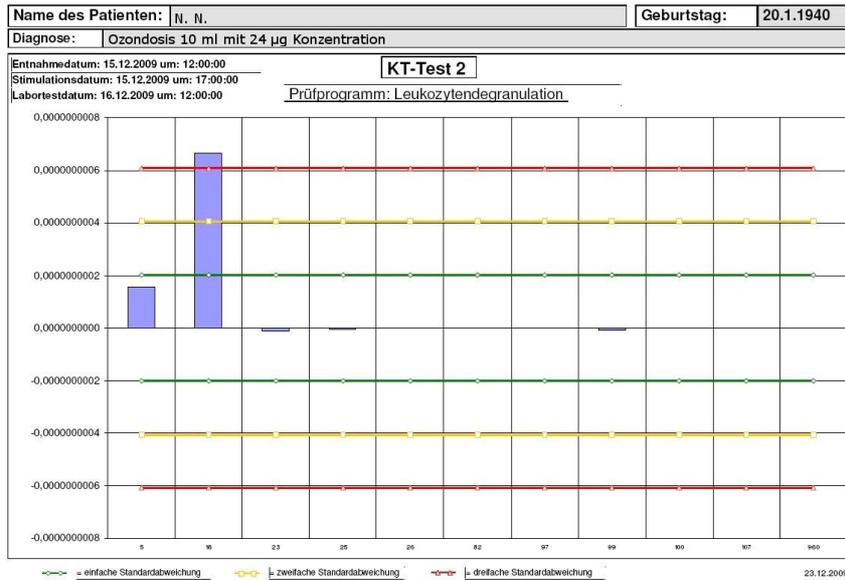
Grafik 29



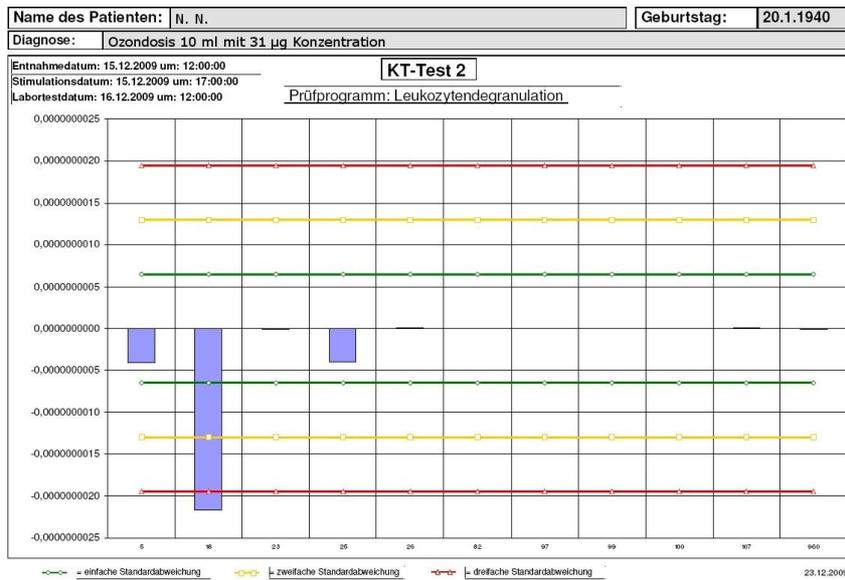
Grafik 30



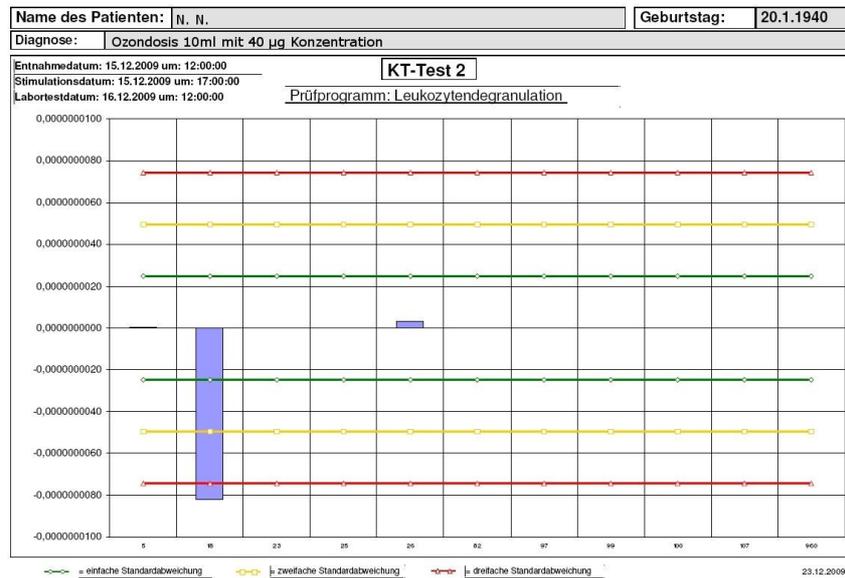
Grafik 31



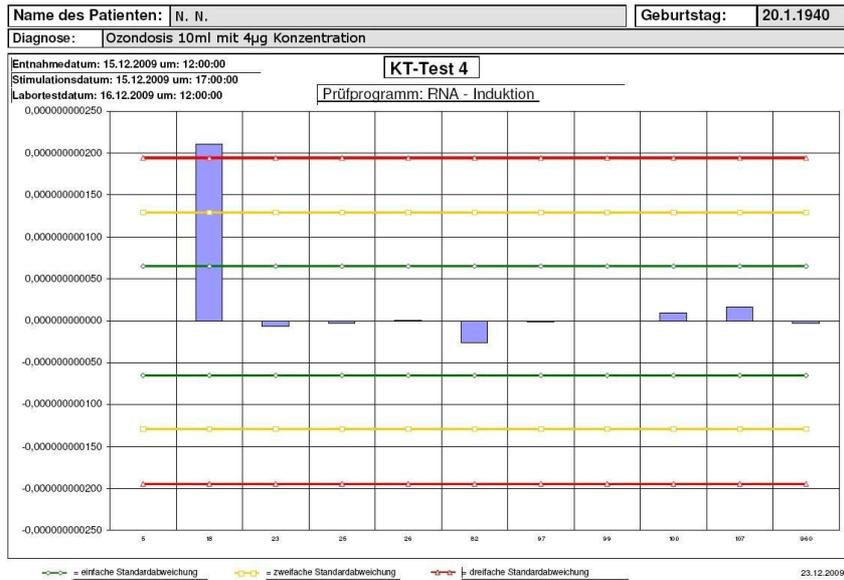
Grafik 32



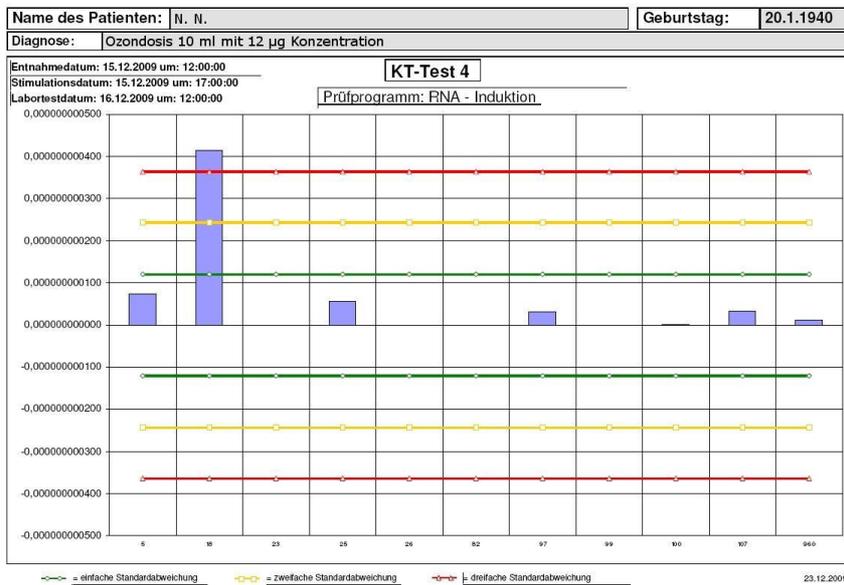
Grafik 33



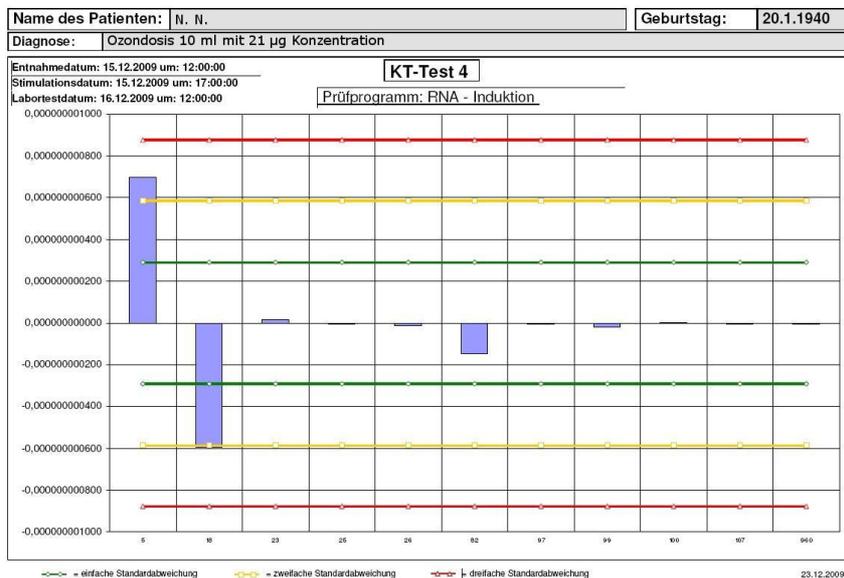
Grafik 34



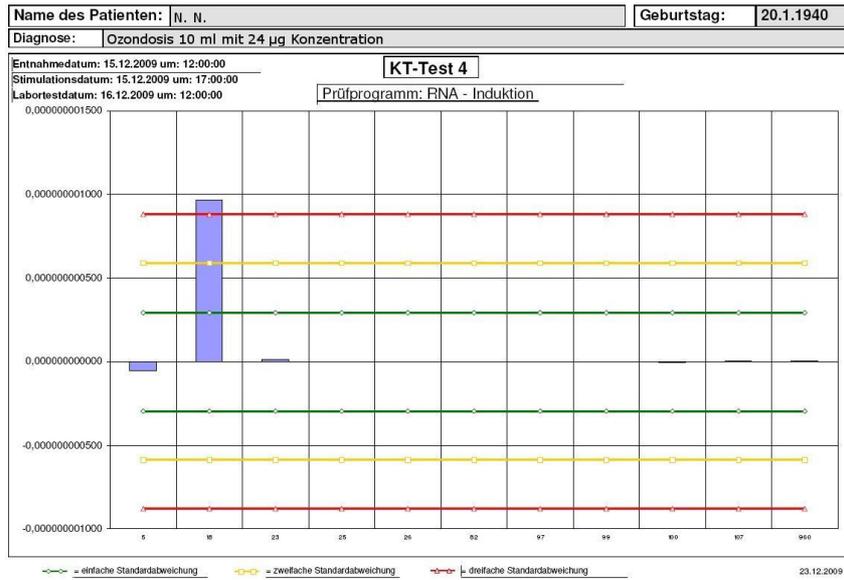
Grafik 35



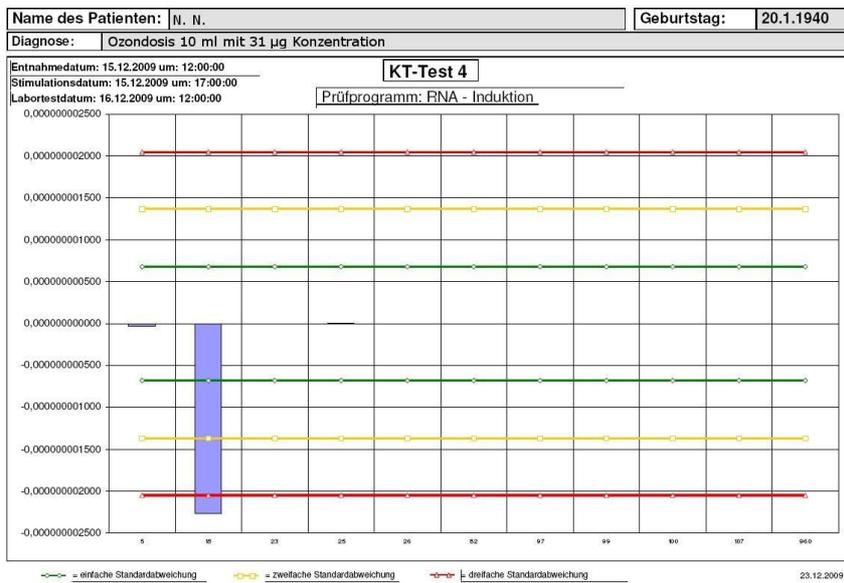
Grafik 36



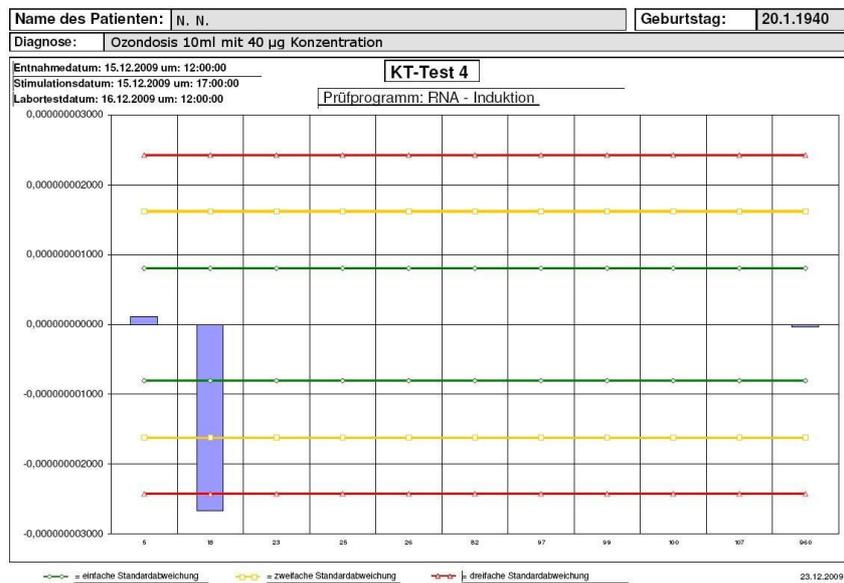
Grafik 37



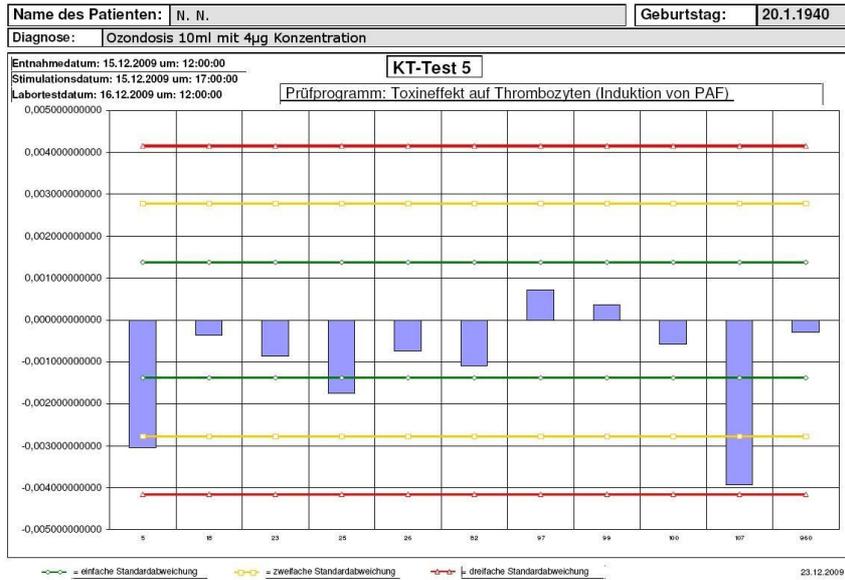
Grafik 38



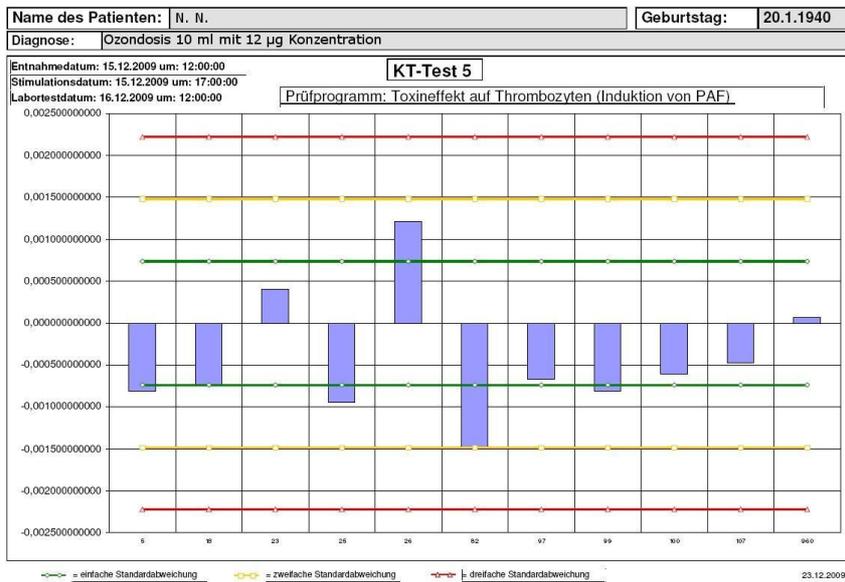
Grafik 39



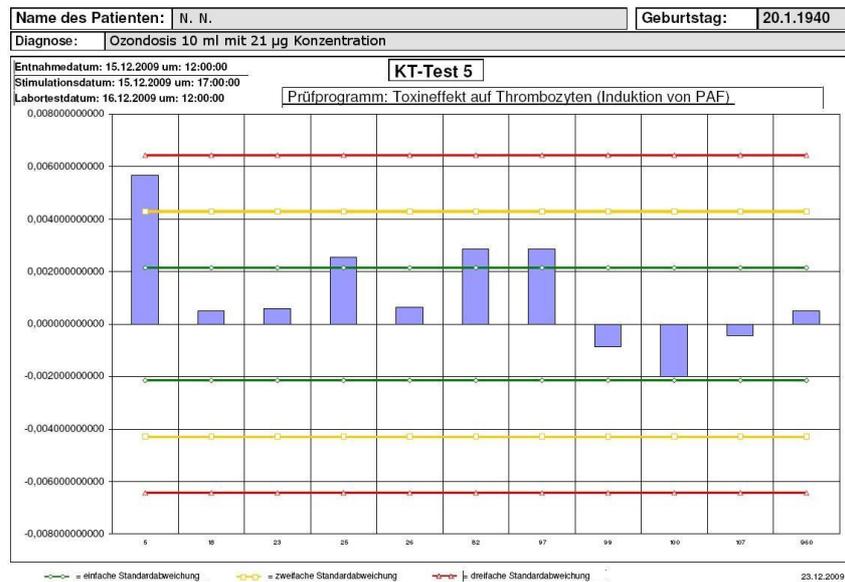
Grafik 40



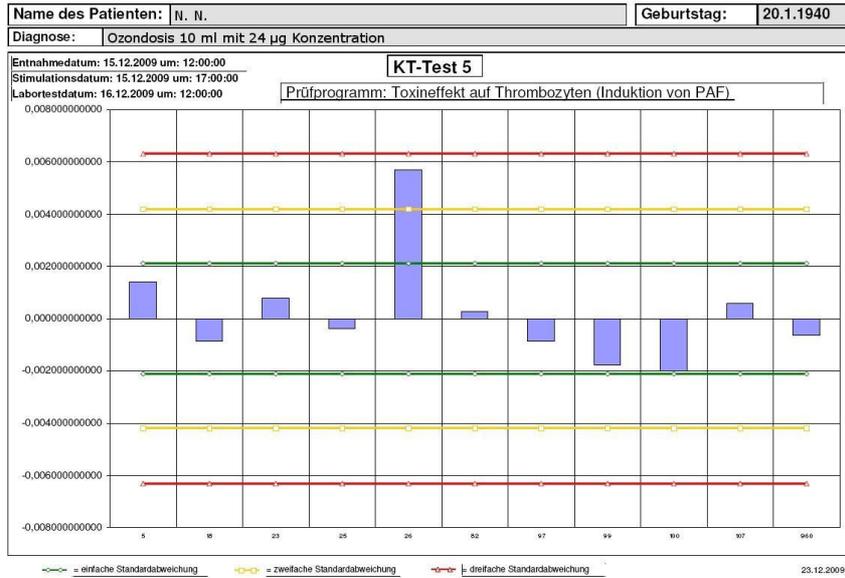
Grafik 41



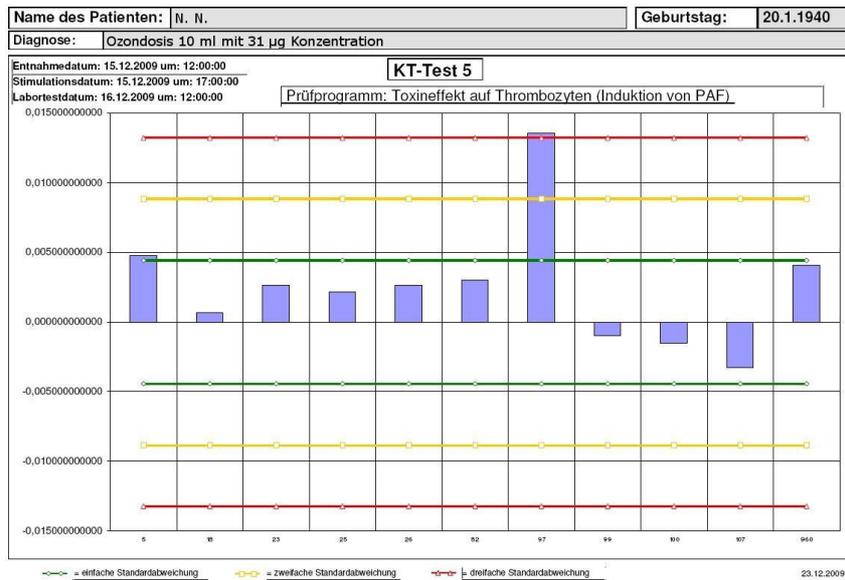
Grafik 42



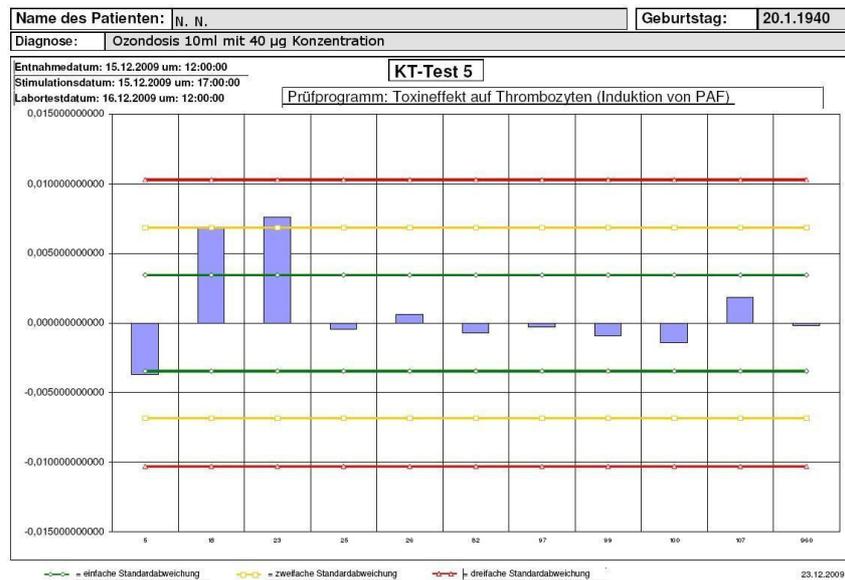
Grafik 43



Grafik 44



Grafik 45



Betrachtet man die Ozoneffekte in unterschiedlicher Konzentration auf die Menge der anfärbbarem Granula, dann **erkennt man mit steigender Konzentration eine verstärkte Immunantwort auf Meningokokken** (Grafik 10-15).

Das gleiche Prinzip lässt sich beobachten beim Einfluss der Antigene auf das Kernvolumen der untersuchten Zellen, d. h. mit steigender Konzentration tritt eine verstärkte Selektion der Immunantwort auf Meningokokken auf. Beim Vergleich der Ozonkonzentration von 4µg mit der zu 40µg wird dies besonders deutlich (Grafik 16-21).

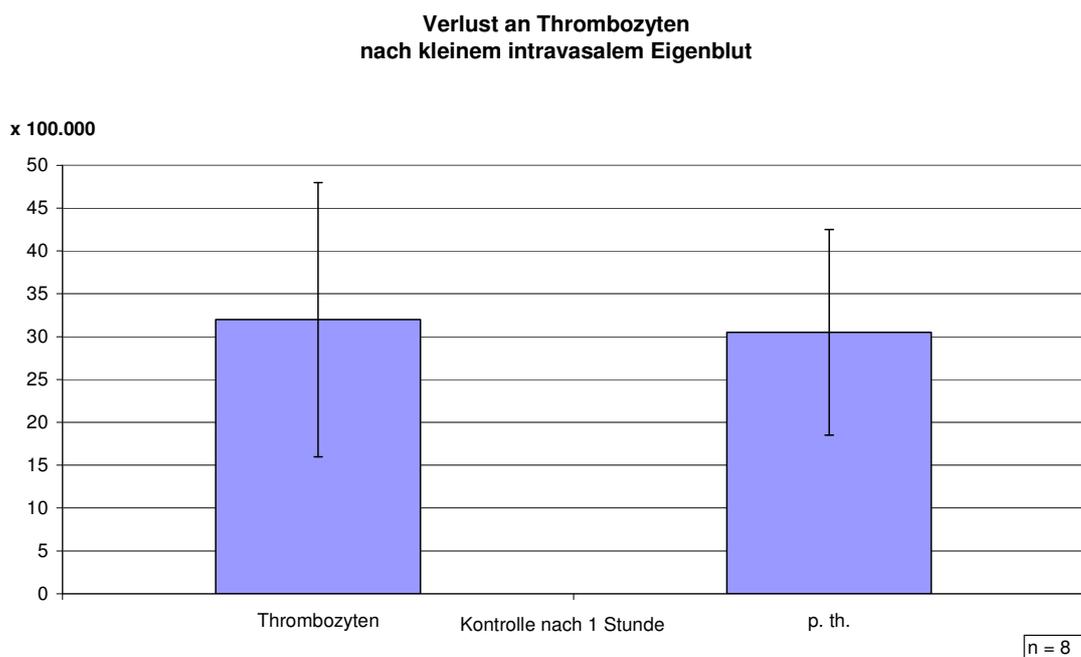
Der Effekt verschiedener Ozonkonzentrationen auf das **Zellvolumen** (Toxizitätseffekte) löst insgesamt betrachtet unterschiedliche Reaktionen aus. Wobei **bei höheren Konzentrationen** (31µg und 40µg) auch wieder die Meningokokken **die stärkste Antwort** hervorrufen. (Grafik 22-27)

Die Leukozytendegranulation unter verschiedenen Ozonkonzentrationen lässt sich aus den Grafiken 28 – 30 ablesen. Die Leukozytendegranulation errechnet der Computer aus der Änderung des Zellvolumens (Grafik 22–27) und der Vermehrung bzw. Verminderung der Granuladichte (Grafik 10 – 15). Mit steigender Ozonkonzentration erfolgt offensichtlich eine zunehmende Standardisierung der Testbedingungen und damit ein konstantes Messergebnis.

Das Prüfprogramm **RNA-Induktion** (Grafik 30-37) ergibt sich aus der Variation der Kerngröße der Zellen bzw. der Verminderung des Kernvolumens und der Variation der Granuladichte. Das Computerprogramm ermittelt aus der Variation dieser Werte die RNA-Induktion. Zytologischer Hintergrund: Die RNA als Messenger-Substanz für das „Produktionsprogramm“ des endoplasmatischen Retikulums im Zytoplasma ist Teil der Kernsubstanz, so dass diese funktionellen Zusammenhänge mathematisch leicht nachvollziehbar sind.

Die Grafiken 34–39 zeigen eine **überraschend einheitliche Übereinstimmung**. Hier hat die **Ozonkonzentration also offenbar einen geringeren Einfluss auf Metabolismus und Morphologie der Zelle**.

Grafik 46



Der Einfluss unterschiedlicher Ozonkonzentrationen auf die Thrombozyten zeigt ein sehr differenziertes uneinheitliches Bild. Erst bei hoher Ozonkonzentration von 40µg ergibt sich eine teilweise Übereinstimmung mit den übrigen Werten (Grafik 40 – 45).

Ozon führt in höherer Konzentration zu einer mäßigen Hämolyse und einer Reduktion der Thrombozyten (Grafik 46).

Die nachfolgenden Tabellen über die Thrombozytenzahlen unter Ozoneinfluss und Antigenkontakt lassen keine allgemeine Schadtendenz des Ozons auf die Thrombozyten erkennen (siehe Leerwerte aus Tabelle 3). Im Gegenteil: eine Untersuchung zu anderen Zeitpunkten zeigte eine Tendenz zur Erhöhung der Thrombozytenzahlen (siehe Tabelle 4) unter steigender Konzentration. Dieser Effekt ist bislang noch ungeklärt. Die Änderung der Thrombozytenzahlen unter dem Einfluss von Allergenen, d. h. deren Verminderung ist bekannt. Ein einheitliches Bild unter dem Einfluss von Antigenen lässt sich aus der Kontrolle der Thrombozytenzahlen allein nicht ableiten. Erst die gleichzeitige Berücksichtigung der Größenänderungen der Thrombozyten unter Antigeneinfluss ergibt ein den sonstigen Ergebnissen vergleichbares Bild bei höherer Ozonkonzentration. Allergene bei bereits bestehender Sensibilisierung bedürfen hier sicherlich einer eigenen Kontrolle.

Tabelle 3

Thrombozytenzahlen gemäß Testbedingungen. Werte absolut x 1000

Ozonkonzentration	Ozon 4µg	Ozon 12µg	Ozon 21µg	Ozon 24µg	Ozon 31µg	Ozon 40µg
<b>Leerwert</b>	130	136	128	130	134	124
<b>Wespengift 1:100</b>	130	135	121	121	128	123
<b>Rhizopus</b>	124	135	125	131	126	127
<b>Cladosporium</b>	130	133	121	126	123	122
<b>Botrytis cinerea</b>	131	133	124	125	127	122
<b>Pilze I</b>	131	131	124	128	114	123
<b>Röteln</b>	125	125	120	126	123	121
<b>Rotaviren</b>	125	127	125	122	121	116
<b>Proteus Vulgaris</b>	124	122	119	125	118	121
<b>Arthro. "A" Propioni</b>	124	130	124	119	121	114
<b>Meningokokken</b>	125	125	121	118	124	115
<b>Grippe</b>	116	130	120	120	127	116

Tabelle 4

Ozonkonzentration	ohne 10µg	mit 10µg	ohne 20µg	mit 20µg	ohne 30µg	mit 30µg	ohne 40µg	mit 40µg
<b>Leerwert</b>	141	158	169	157	154	168	153	165
<b>Wespengift 1:100</b>	136	159	175	150	157	160	157	149
<b>Rhizopus</b>	149	147	169	154	159	157	151	162
<b>Cladosporium</b>	146	153	169	153	160	156	158	156
<b>Botrytis cinerea</b>	148	159	171	155	153	153	146	158
<b>Pilze I</b>	152	164	173	148	148	161	155	157
<b>Röteln</b>	144	152	170	146	156	157	151	161
<b>Rotaviren</b>	143	152	152	147	154	158	149	151
<b>Proteus Vulgaris</b>	146	155	165	153	146	139	148	156
<b>Arthro. "A" Propioni</b>	142	151	156	151	145	148	149	147
<b>Meningokokken</b>	140	154	151	143	148	140	153	155
<b>Grippe</b>	140	137	142	141	146	143	152	153

Die nachfolgenden Tabellen beinhalten die Ergebnisse unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

In den nachfolgenden Tabellen beinhaltet der KTT 1 die Zellmorphologie der Granulozyten, KTT 2 den Leukozytendegranulationstest, KTT 3 Zellmorphologie und Zellanzahl der Leukozyten. KTT 4 die RNA – Induktion und KTT 5 die Variation der Thrombozyten in Anzahl und Größe.

Die Tabellen 5 und 6 demonstrieren den Einfluss der Zeit auf die Versuchsansätze: Beide Testsätze wurden unmittelbar nach Blutentnahme stimuliert und 2 Stunden danach –ohne Zwischenlagerung und Inkubation- untersucht. Ozon erweist sich hier als hemmend auf die Reagibilität der Leukozyten.

Tabelle 5

Name des Patienten: N. N.						Geburtstag: 20.1.1940					
Diagnose: Mit 40 µg Ozon, ohne BS, Zeitfaktor!											
<b>KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse</b>											
Entnahmedatum: 19.1.2010 um: 09:26:00			Stimulationsdatum: 19.1.2010 um: 09:59:00			Labortestdatum: 19.1.2010 um: 12:00:00					
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	960	Wespen 1:100	3,0933	0,0845	1,0192	3,2448	0,7341	2,43858	3,10381	0,05322	13,77
2	5	Grippe	0,9770	3,2643	0,0066	0,4396	2,8698	1,9425	0,52789	2,57958	12,61
3	107	Rhizopus nigricans	0,0211	3E-06	3,2768	0,0062	6,0066	0,03985	0,36221	0,00011	3,77
4	82	Röteln	0,1187	0,2858	0,0009	0,0102	0,2269	0,17931	0,13230	2,44677	3,4
5	23	Propionibakterien	0,2449	0,1443	0,0116	0,0367	0,3603	0,59769	0,14333	0,37054	1,91
6	25	Proteus vulgaris	0,0435	0,0006	0,0637	0,0438	7,3414	0,07514	1,35830	0,01197	1,67
7	26	Rotaviren	0,0377	0,0006	0,0303	0,0018	1,2680	0,04554	0,09188	0,02183	1,5
8	100	Cladosporium herbarum	0,0482	0,0001	0,4161	0,0062	0,4004	0,09108	0,15994	0,00203	1,12
9	18	Meningokokken	0,0407	0,0154	0,0037	0,0020	0,2402	0,12295	0,03881	0,19245	0,66
10	99	Botrytis cinerea	0,0051	0,0001	0,0512	0,0003	0,3203	0,0999	0,00794	0,00174	0,49
11	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,0096	7E-05	0,0928	0,0018	0,1401	0,05806	0,07247	0,00181	0,38

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

Tabelle 6

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	20.1.1940
Diagnose:	Ohne Ozon, ohne BS, Zeitfaktor!		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 19.1.2010 um: 09:26:00		Stimulationsdatum: 19.1.2010 um: 09:57:00					Labortestdatum: 19.1.2010 um: 12:00:00				
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	25	Proteus vulgaris	1,0993	3,3326	0,0227	2,7984	1,9461	1,59977	1,28438	3,19943	15,28
2	108	Serpula lacrymans	3,1980	0,1492	1,6066	1,2687	1,2974	1,74520	0,53377	0,13126	9,93
3	82	Röteln	0,3748	0,0848	0,0434	0,7025	1,2974	0,22906	2,25184	0,56879	5,55
4	5	Grippe	0,5122	0,0128	0,638	0,8678	1,1893	0,37267	1,70973	0,05294	5,36
5	960	Wespen 1:100	0,7329	0,0039	2,6143	0,063	0,7027	0,31995	0,14456	0,01849	4,6
6	100	Cladosporium herbarum	0,3560	0,1594	0,0894	0,1174	2,1624	0,93259	0,09244	0,26252	4,17
7	18	Meningokokken	0,2498	0,1624	0,0317	0,2044	1,9461	0,47993	0,31276	0,51978	3,91
8	26	Rotaviren	0,3789	0,0403	0,5344	0,2606	0,9730	1,32345	0,14456	0,04676	3,7
9	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,1166	0,0123	0,4135	0,1889	0,8649	1,01804	0,13622	0,01859	2,77
10	99	Botrytis cinerea	0,2832	0,1585	0,019	0,0438	0,8649	0,24724	0,12997	0,98444	2,73
11	23	Propionibakterien	0,2998	0,0287	0,1762	0,0089	0,4865	0,39267	0,01668	0,11223	1,52

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

20.1.2010

Die Tabellen 7 und 8 demonstrieren die Ergebnisse mit und ohne Ozon (40 µg) im Brutschrank. Auch hier gilt die gleiche Aussage: Die Reihenfolge wechselt, doch die Gesamtpopulation der pathologisch wirksamen Antigene bleibt weitestgehend identisch.

Tabelle 7

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	
Diagnose:	Mit 40 µg Ozon im BS		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 12.1.2010 um: 10:15:00		Stimulationsdatum: 12.1.2010 um: 16:23:00					Labortestdatum: 13.1.2010 um: 12:00:00				
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	5	Grippe	2,2079	3,1865	0,0074	2,1588	0,5716	1,48489	2,32510	3,3855	15,33
2	25	Proteus vulgaris	2,5892	0,5835	0,0611	2,9591	0,7621	1,90915	2,47883	0,46213	11,83
3	18	Meningokokken	0,9233	0,6339	0,0130	0,3188	1,4291	1,24246	0,41033	0,80493	5,78
4	23	Propionibakterien	0,7878	0,0759	0,0415	0,5497	1,2861	0,55504	1,58378	0,21571	5,1
5	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	1,1590	0,0033	1,6493	0,409	0,1429	0,65620	0,99679	0,00799	5,02
6	26	Rotaviren	0,8004	0,0524	0,0589	0,2211	2,3818	0,53453	0,66159	0,15459	4,87
7	99	Botrytis cinerea	0,3328	0,0002	2,7058	0,0114	0,2858	0,22728	0,08028	0,0014	3,64
8	960	Wespen 1:100	0,0688	0,1051	0,0071	0,0103	0,4287	1,50654	0,01095	0,11001	2,25
9	107	Rhizopus nigricans	0,0069	2E-05	0,0148	4E-05	2,1436	0,00615	0,01117	0,00533	2,19
10	100	Cladosporium herbarum	0,6507	0,0222	0,0926	0,0419	0,1429	0,43861	0,15263	0,07989	1,62
11	82	Röteln	0,1711	0,0096	0,0284	0,006	0,1905	0,22147	0,04333	0,06855	0,74

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

14.1.2010

Tabelle 8

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	20.1.1940
Diagnose:	Ohne Ozon im BS		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 12.1.2010 um: 10:15:00			Stimulationsdatum: 12.1.2010 um: 16:22:00					Labortestdatum: 13.1.2010 um: 12:00:00			
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	18	Meningokokken	0,3671	3,1825	0,0120	1,4359	0,2026	2,09159	0,3167	3,10152	10,71
2	82	Röteln	2,6684	0,0918	2,3587	1,8065	0,2431	1,62902	0,51159	0,11485	9,42
3	23	Propionibakterien	1,0918	0,0735	0,1927	1,496	1,9455	0,26049	2,64930	0,57525	8,28
4	960	Wespen 1:100	0,4933	0,6664	0,0888	2,0514	0,3242	2,40906	0,39283	0,56384	6,99
5	25	Proteus vulgaris	0,8339	0,0385	0,2616	0,6301	1,2159	0,24241	1,19904	0,32358	4,75
6	5	Grippe	0,3294	0,0553	0,0298	0,0287	2,8372	0,10056	0,13145	1,12055	4,63
7	26	Rotaviren	0,7036	0,002	1,9867	0,1106	0,8106	0,11205	0,45525	0,03595	4,22
8	100	Cladosporium herbarum	0,233	0,0368	0,0311	0,1578	0,4863	0,09876	0,73693	0,75959	2,54
9	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,3388	0,0052	0,6159	0,1227	0,1215	0,18962	0,29843	0,05586	1,75
10	99	Botrytis cinerea	0,0474	0,0037	0,0166	0,0253	0,2026	0,02598	0,44942	0,28891	1,06
11	107	Rhizopus nigricans	0,0188	0,0009	0,0114	0,0015	0,3242	0,01101	0,06192	0,16693	0,6

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

14.1.2010

Zum Vergleich werden noch die Ergebnisse mit und ohne 40µg Ozon bei Raumtemperatur herangezogen. Erwartungsgemäß sinkt die Reagibilität der Kultur bei Raumtemperatur, lediglich die Reaktion auf Meningokokken ist bei beiden Versuchen vergleichbar (Tab. 9 u. 10)

Tabelle 9

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	
Diagnose:	Mit 40µg Ozon bei RT		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 12.1.2010 um: 10:15:00			Stimulationsdatum: 12.1.2010 um: 16:24:00					Labortestdatum: 13.1.2010 um: 12:00:00			
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	82	Röteln	3,2694	0,3928	3,1716	3,0111	0,6570	3,18246	1,99065	0,07935	15,75
2	18	Meningokokken	0,8055	3,1748	0,0345	1,1338	0,8134	1,13498	2,10179	1,79825	11
3	5	Grippe	0,002	0,1496	6E-05	0,0002	1,8145	0,03611	0,01083	2,66278	4,68
4	25	Proteus vulgaris	0,1878	0,0096	0,5532	0,1460	1,5642	0,23506	1,30693	0,02613	2,48
5	23	Propionibakterien	0,0084	0,4206	0,0005	0,0024	0,2659	0,20023	0,02564	1,35050	2,27
6	107	Rhizopus nigricans	0,0009	0,0009	0,0004	3E-05	2,0648	0,00339	0,01911	0,16759	2,26
7	99	Botrytis cinerea	0,0002	0,0054	6E-05	7E-05	1,5486	0,01161	0,01274	0,29995	1,88
8	26	Rotaviren	0,0351	0,0316	0,0108	0,0047	0,4692	0,08125	0,12229	0,24995	1,01
9	100	Cladosporium herbarum	0,0410	0,0045	0,3263	0,0076	0,2502	0,29793	0,05350	0,00967	0,99
10	960	Wespen 1:100	0,0049	0,0153	0,0066	0,0003	0,6570	0,16976	0,0043	0,05804	0,92
11	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,0064	0,0004	0,0303	0,0006	0,1564	0,01693	0,07022	0,01629	0,3

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

14.1.2010

Tabelle 10

Name des Patienten:							Geburtsdag:				
Diagnose:		ohne Ozon bei RT									
KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse											
Entnahmedatum: 14.1.2010 um: 11:45:00			Stimulationsdatum: 14.1.2010 um: 15:30:00					Labortestdatum: 15.1.2010 um: 12:00:00			
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	107	Rhizopus nigricans	2,8218	0,0063	3,3052	2,9671	6,7840	2,67158	1,65143	0,0006	13,49
2	5	Grippe	0,1661	3,3366	3E-05	0,0716	0,9158	0,25024	0,42519	3,35461	8,52
3	18	Meningokokken	1,2704	0,1539	0,0089	0,6172	2,5440	0,38979	2,35438	0,09931	7,44
4	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,5357	0,0244	0,0822	1,2012	0,2035	1,34943	1,32363	0,00455	4,72
5	26	Rotaviren	0,2175	0,0173	0,0299	0,4457	0,4409	0,85795	0,77253	0,00507	2,79
6	82	Röteln	0,2578	0,0032	0,0724	0,1092	0,3052	0,32623	0,49760	0,00249	1,57
7	960	Wespen 1:100	0,0604	0,0003	0,0185	0,004	1,1872	0,03707	0,15994	0,00228	1,47
8	100	Cladosporium herbarum	0,0544	0,0765	0,0004	0,0036	0,9328	0,18351	0,02879	0,10489	1,38
9	23	Propionibakterien	0,1683	0,0143	0,0040	0,028	0,5427	0,12393	0,33588	0,02913	1,25
10	25	Proteus vulgaris	0,0164	0,0015	9E-05	0,0001	0,3900	0,00318	0,06753	0,12149	0,6
11	99	Botrytis cinerea	0,0081	0,0020	8E-05	7E-05	0,1356	0,00741	0,01351	0,06935	0,24

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ = einfache Standardabweichung    X,YZ = zweifache Standardabweichung    X,YZ = dreifache Standardabweichung

18.1.2010

Diese Versuchsbedingungen basierten auf dem Bemühen ein einheitliches standardisiertes Verfahren mit wiederholbaren Ergebnissen zu erzielen. Es ist leicht einsehbar, dass bspw. der Glucosegehalt bei der Blutentnahme variiert, die Kultivierung bei Raumtemperatur unterschiedlichen Einflüssen unterliegt und auch der pO<sub>2</sub> Gehalt des entnommenen Venenblutes differieren kann.

Die Gabe eines exakt definierten O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> Gemisches nach obigen Vorgaben sollte den pO<sub>2</sub> Gehalt weitestgehend standardisieren. Desgleichen ist die Kultivierung über exakt 12 Stunden im Brutschrank bei 37 °C eine standardisierte Größe, ebenso wie die Gabe von 0,5 ml 0,5%iger Glucoselösung und 75 mg Ascorbinsäure (Basis: Ringerlösung) als Versuch zu sehen, die metabolischen Prozesse zu standardisieren aufgrund vorhandener Literaturangaben (7, 11) (Tabellen 11 – 18)

Tabelle 11

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	20.1.1940
Diagnose:	Mit 20 µg Ozon + Asc. + Glucose		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 6.1.2010 um: 11:00:00			Stimulationsdatum: 6.1.2010 um: 15:51:00					Labortestdatum: 7.1.2010 um: 12:00:00			
lfd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	5	Grippe	3,2885	3,3018	0,0788	3,3001	0,7993	3,08528	3,34666	3,15690	20,36
2	960	Wespen 1:100	0,3708	0,0027	3,3514	0,1895	0,3496	0,96121	0,61668	0,00837	5,85
3	108	Serpula lacrymans	0,6362	0,1345	0,0572	0,0724	0,4496	0,47124	0,48098	0,84194	3,14
4	18	Meningokokken	0,3088	0,0033	0,0904	0,0038	2,0981	0,03811	0,31122	0,25829	3,11
5	100	Cladosporium herbarum	0,1328	0,0056	0,0376	0,0109	0,9991	0,06211	0,54752	0,26708	2,06
6	82	Röteln	0,0125	0,0001	0,0012	2E-05	1,0990	0,00051	0,12260	0,81741	2,05
7	26	Rotaviren	0,0029	0,0004	0,0018	4E-05	1,4987	0,01069	0,0131	0,11958	1,65
8	23	Propionibakterien	0,0097	1E-06	0,4178	6E-06	0,5994	0,0024	0,00734	0,00176	1,04
9	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,0243	0,0082	0,0055	0,0011	0,4496	0,07187	0,04890	0,33604	0,95
10	25	Proteus vulgaris	0,0684	0,0003	0,1853	0,0034	0,1998	0,03166	0,33602	0,02792	0,85
11	99	Botrytis cinerea	0,0177	0,0002	0,0156	0,0003	0,1998	0,00731	0,14696	0,08566	0,47

lfd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ = einfache Standardabweichung

X,YZ = zweifache Standardabweichung

X,YZ = dreifache Standardabweichung

7.1.2010

Tabelle 12

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	20.1.1940
Diagnose:	Ohne Ozon + Asc. + Glucose		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 6.1.2010 um: 11:00:00			Stimulationsdatum: 6.1.2010 um: 15:50:00					Labortestdatum: 7.1.2010 um: 12:00:00			
lfd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	25	Proteus vulgaris	2,0304	0,0193	2,7859	3,1441	0,1376	0,73546	1,60205	0,02051	10,48
2	26	Rotaviren	0,6686	0,0055	0,6476	1,1466	2,9253	0,14738	2,91544	0,02906	8,49
3	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,4585	3,3276	0,0076	0,3067	0,1376	1,53629	0,07480	1,69103	7,54
4	100	Cladosporium herbarum	2,0612	0,1847	0,2396	1,5299	0,1720	0,59537	0,96299	0,24215	5,99
5	23	Propionibakterien	0,1921	0,0002	1,0947	0,1118	1,7896	0,02627	1,59521	0,00494	4,81
6	5	Grippe	0,1019	0,1159	0,001	0,0065	0,9292	0,03064	0,07900	2,95361	4,22
7	107	Rhizopus nigricans	1,1142	0,0166	0,5504	0,6919	0,2064	0,22764	1,13900	0,05698	4
8	99	Botrytis cinerea	0,5616	0,6784	0,0667	0,0535	6,8830	2,23468	0,00897	0,23702	3,91
9	960	Wespen 1:100	1,0583	0,0543	0,3485	0,5391	0,6194	0,49643	0,40694	0,08546	3,61
10	18	Meningokokken	0,4097	0,1405	0,1323	0,1574	1,2389	1,25845	0,04688	0,08717	3,47
11	82	Röteln	0,4711	0,0017	1,5512	0,307	3,4415	0,15176	0,75803	0,00855	3,28

lfd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ = einfache Standardabweichung

X,YZ = zweifache Standardabweichung

X,YZ = dreifache Standardabweichung

7.1.2010

Tabelle 13

Name des Patienten:		N. N.					Geburtstag:		20.1.1940		
Diagnose:		Mit 30 µg Ozon + Asc. + Glucose									
KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse											
Entnahmedatum: 6.1.2010 um: 11:00:00			Stimulationsdatum: 6.1.2010 um: 15:53:00					Labortestdatum: 7.1.2010 um: 12:00:00			
lfd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	107	Rhizopus nigricans	1,469	0,0377	2,3908	2,5661	0,7591	0,94046	1,16767	0,03505	9,37
2	5	Grippe	0,0413	3,0538	0,0009	0,0467	0,8626	1,03068	0,01939	2,59121	7,65
3	960	Wespen 1:100	2,3279	0,5632	0,7033	0,7974	0,1840	2,60813	0,13084	0,18884	7,5
4	100	Cladosporium herbarum	1,142	0,032	1,9167	1,3262	0,8281	0,82251	0,68998	0,03399	6,79
5	26	Rotaviren	0,802	0,0976	0,1708	1,5106	0,4601	0,31869	2,0284	0,26781	5,66
6	25	Proteus vulgaris	0,1659	0,6531	0,0035	0,1198	0,6671	0,21246	0,24131	2,68842	4,75
7	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,3904	0,0232	0,1716	0,6669	0,6441	0,15622	1,82679	0,12979	4,01
8	99	Botrytis cinerea	0,4854	0,0445	0,241	0,6113	1,0352	0,33900	0,77166	0,11491	3,64
9	18	Meningokokken	0,2879	0,3670	0,0283	0,2196	0,6441	0,55303	0,16992	0,58043	2,85
10	23	Propionibakterien	0,0716	0,0083	0,0211	0,0095	2,3005	0,03749	0,10862	0,19356	2,75
11	82	Röteln	0,0529	0,0077	0,0091	0,0041	0,3795	0,02031	0,08692	0,33047	0,89

lfd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

7.1.2010

Tabelle 14

Name des Patienten:		N. N.					Geburtstag:		20.1.1940		
Diagnose:		Mit 40 µg Ozon + Asc. + Glucose									
KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse											
Entnahmedatum: 6.1.2010 um: 11:00:00			Stimulationsdatum: 6.1.2010 um: 15:55:00					Labortestdatum: 7.1.2010 um: 12:00:00			
lfd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	23	Propionibakterien	2,6955	1,0362	1,0985	2,7928	0,3043	0,68155	3,10113	2,61023	14,32
2	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,3513	3,113	0,1904	0,5343	0,2705	2,72379	0,14846	1,96223	9,29
3	25	Proteus vulgaris	0,7617	0,9495	0,919	0,2447	1,5218	1,84889	0,10015	0,88168	7,23
4	82	Röteln	0,9284	0,7867	1,373	0,9272	0,1352	1,87789	0,37367	0,71926	7,12
5	18	Meningokokken	0,4254	1,0963	0,4137	0,4258	1,6909	1,7208	0,18726	1,09381	7,05
6	26	Rotaviren	0,7527	0,4458	0,6902	0,6339	1,1836	0,65980	0,72714	1,16010	6,25
7	100	Cladosporium herbarum	0,6595	0,3863	1,0583	0,7985	0,4565	1,00058	0,60393	0,66291	5,63
8	960	Wespen 1:100	0,1727	0,2307	0,1349	0,0473	2,7055	0,29103	0,12304	1,36118	5,07
9	99	Botrytis cinerea	0,1673	0,0067	2,0758	0,0050	1,1836	0,13393	0,02828	0,08572	3,69
10	5	Grippe	0,0914	0,1296	0,0629	0,0440	0,4058	0,14380	0,23178	1,54680	2,66
11	107	Rhizopus nigricans	0,0591	0,0146	0,1725	0,0015	0,1014	0,06868	0,01666	0,36460	0,8

lfd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

7.1.2010

Tabelle 15

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	20.1.1940
Diagnose:	Mit 40 µg Ozon + Asc. + Glucose		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 6.1.2010 um: 11:00:00		Stimulationsdatum: 6.1.2010 um: 15:55:00					Labortestdatum: 7.1.2010 um: 12:00:00				
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	23	Propionibakterien	2,6955	1,0362	1,0985	2,7928	0,3043	0,68155	3,10113	2,61023	14,32
2	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,3513	3,113	0,1904	0,5343	0,2705	2,72379	0,14846	1,96223	9,29
3	25	Proteus vulgaris	0,7617	0,9495	0,919	0,2447	1,5218	1,84889	0,10015	0,88168	7,23
4	82	Röteln	0,9284	0,7867	1,373	0,9272	0,1352	1,87789	0,37367	0,71926	7,12
5	18	Meningokokken	0,4254	1,0963	0,4137	0,4258	1,6909	1,7208	0,18726	1,09381	7,05
6	26	Rotaviren	0,7527	0,4458	0,6902	0,6339	1,1836	0,65980	0,72714	1,16010	6,25
7	100	Cladosporium herbarum	0,6595	0,3863	1,0583	0,7985	0,4565	1,00058	0,60393	0,66291	5,63
8	960	Wespen 1:100	0,1727	0,2307	0,1349	0,0473	2,7055	0,29103	0,12304	1,36118	5,07
9	99	Botrytis cinerea	0,1673	0,0067	2,0758	0,0050	1,1836	0,13393	0,02828	0,08572	3,69
10	5	Grippe	0,0914	0,1296	0,0629	0,0440	0,4058	0,14380	0,23178	1,54680	2,66
11	107	Rhizopus nigricans	0,0591	0,0146	0,1725	0,0015	0,1014	0,06868	0,01666	0,36460	0,8

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

7.1.2010

Tabelle 16

Name des Patienten:	N. N.	Geburtstag:	20.1.1940
Diagnose:	Ohne Ozon + Asc. + Glucose		

**KT-Test: relevante Antigene, numerische Einzel- und Summenergebnisse**

Entnahmedatum: 6.1.2010 um: 11:00:00		Stimulationsdatum: 6.1.2010 um: 15:54:00					Labortestdatum: 7.1.2010 um: 12:00:00				
Ifd.Nr	ID	Antigene	KTT 1	KTT 2	KTT 3	KTT 4	KTT 5	Δ% Gran.	Δ% Kern.	Δ% ZV	σ Kumulativ Wert
1	960	Wespen 1:100	2,7319	3,2934	0,2598	0,8386	0,2881	3,11451	0,10587	1,64594	12,28
2	23	Propionibakterien	0,9636	0,0194	2,4834	3,2449	1,1526	0,49605	2,57189	0,06074	10,99
3	82	Röteln	0,7026	0,0478	0,3693	1,0654	0,2881	0,24965	1,67793	0,29784	4,7
4	100	Cladosporium herbarum	0,1852	0,1031	0,0141	0,0582	1,8009	0,07801	0,29323	2,05742	4,59
5	25	Proteus vulgaris	0,5097	0,0126	0,4022	0,3598	1,4407	0,09879	1,43206	0,19839	4,45
6	99	Botrytis cinerea	0,4140	0,0265	0,4296	0,4676	1,5128	0,27356	0,67211	0,15088	3,95
7	18	Meningokokken	0,4278	0,0086	2,0717	0,1799	7,2039	0,41459	0,17061	0,03233	3,38
8	5	Grippe	0,9868	0,0062	0,9275	0,1263	7,2039	0,05795	0,85694	0,16655	3,2
9	97	Pilze I (Altern. ten., Botr. cin., Cladosp. herb., C	0,0828	0,0165	0,0074	0,0013	0,7203	0,01459	0,0349	1,76350	2,64
10	107	Rhizopus nigricans	0,2001	0,0079	0,1537	0,1693	0,7203	0,06018	1,10575	0,20378	2,62
11	26	Rotaviren	0,1338	0,0003	0,1572	0,007	1,1526	0,00405	0,67681	0,13324	2,27

Ifd.Nr = laufende Nummer, Antigene geordnet nach der Priorität ihrer immunologischen Effizienz

SEITE 1 VON 1

X,YZ

= einfache Standardabweichung

X,YZ

= zweifache Standardabweichung

X,YZ

= dreifache Standardabweichung

7.1.2010

Die Tabellen 11 – 16 lassen dabei gewisse Zusammenhänge erkennen:

Bei einer geringen Ozonkonzentration von 20µg überwiegt der metabolische Effekt der Glukoseascorbinsäuregabe: Die Leukozyten werden sensibler (Tabelle 11 und 12). Ab einer Ozonkonzentration von 30µg und noch erkennbar bei 40 µg überwiegt der oxidative Effekt des Ozons (Tabelle 13 – 16). Die mögliche Schlussfolgerung daraus ist, dass die metabolischen Mechanismen durch Glukose und Ascorbinsäure einerseits und Ozon andererseits –zumindest unter diesen Versuchsbedingungen – sich in einem Dosiswirkungsbereich bewegen müssen, die in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander stehen.

### **Zusammenfassung der Messergebnisse**

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden die Einflüsse verschiedener Parameter auf den Leukozytenfunktionstest ermittelt. Diese Parameter waren

1. **Der Einfluss standardisierter Zugaben von O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> Gemischen auf die Reagibilität der Leukozyten (Grafiken 10 – 39)**
2. **Die Zeitspanne zwischen Blutentnahme, Kontaminierung und Meßkontrolle der Blutproben (Tabellen 5 und 6)**
3. **Der Einfluss einer zwölfstündigen Inkubation der Blutproben im Brutschrank bei 37°C im Vergleich zu Raumtemperatur ( Tabellen 7, 8, 9 und 10)**
4. **Die Veränderung der Versuchsergebnisse durch standardisierte metabolische Einflussnahme (Zugabe von Glucose und Vitamin C) (Tabellen 11 – 18)**

Neben dem klassischen Leukozytenfunktionstest wird in einem weiteren Prüfverfahren auch das Verhalten der Thrombozyten - unter Berücksichtigung ihrer Funktion bei allergisch-hyperergischen Prozessen - (Grafik 40 – 45, Tabellen 3 und 4, KTT 5 in weiteren Tabellen) gemäß den geschilderten Bedingungen untersucht.

Unter Berücksichtigung der Vorgabe, dass hier 54 Antigene und Antigenkombinationen untersucht wurden, zeigt die Variation der Versuchsanordnung zwar einen deutlichen Einfluss auf die Reagibilität der Antigene, jedoch bleibt **die Gesamtzahl der reagiblen Antigene außerhalb der Standardabweichung weitestgehend konstant.**

**Mit zunehmender Ozonkonzentration erreicht das Messverfahren der Leukozytendegranulation die wünschenswerte Konstanz im Ergebnis** und unterstützt damit die Reproduzierbarkeit und Sicherheit der diagnostischen Aussage dieser Technik. (Grafik 28 - 33) (KTT 2 in den Tabellen 5 – 16)

Besonderes Augenmerk verdienen **die Resultate der RNA-Induktion, die durch O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Gemische unterschiedlicher Stärke weitgehend unbeeinflusst blieben, im Gegensatz zur Leukozytendegranulation, die einen ausreichenden kontrollierten O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> Zusatz erfordert, um eine sichere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erzielen.** Alle Blutproben stammten von ein und derselben Versuchsperson.

Die beschriebenen Testverfahren, insbesondere die Ermittlung der Leukozytendegranulation, der RNA-Induktion und der weiter unten skizzierte Einfluss von Antigenen auf die Thrombozyten als diagnostische Verfahren sind Gegenstand einer Patentanmeldung.

Besonderen Dank gebührt vier Mitarbeiterinnen der Fa. FBM-Pharma GmbH, Ludwigshafen

Frau Sabine Andres  
Frau Stephanie Fischer

Frau Melanie Franz  
Frau Christa Hoffmann-Kautz

für ihre tatkräftige und begeisterte Kooperation.

Ludwigshafen, im März 2010

## Literaturhinweise

1. Kief H, Raum und Zeit Nr. 11, 84-91, 1984.
2. Kief H., Vorträge 1980-1999 in Bad Hersfeld, Baden Baden, Salzburg, Shreveport, San Francisco und Kasan, Literatur beim Verfasser
3. Beck WS, Valentine WN: The aerobic metabolism of leukocytes in health and leukemia. I. Glycolysis and respiration. *Cancer Res* 12:818, 1952.
4. Beck WS: A kinetic analysis of the glycolytic rate and certain glycolytic enzymes in normal and leukemic leukocytes. *J Biol Chem* 216:333, 1955.
5. Borregaard N, Herlin T: Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest* 70:550, 1982.
6. Bisset SK, Alexander WD: The effect of intravenous injections of triiodoacetic acid and 1-triiodothyronine on the oxygen consumption of circulating human leukocytes. *Q J Exp Physiol* 46:50, 1961.
7. Bicz W: The influence of carbon dioxide tension on the respiration of normal and leukemic leukocytes. I. Influence on endogenous respiration. *Cancer Res* 20:184, 1960.
8. McKinney GR, Martin SP, Rundles RW, Green R: Respiration and glycolytic activities of human leukocytes in vitro. *J Appl Physiol* 5:355, 1953.
9. McLeod J, Rhoads C: Metabolism of leukocytes in Ringer-phosphate and in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 41:268, 1939.
10. Cline MJ, Melmon KL, Davis WC, Williams HE: Mechanism of endotoxin interaction with human leukocytes. *Br J Haematol* 15:539, 1968.
11. Strauss BS, Stetson CA Jr: Studies on the effect of certain macromolecular substances on the respiratory activity of the leukocytes of peripheral blood. *J Exp Med* 112:652, 1960.
12. Cline MJ: *The White Cell*. Harvard, Cambridge, MA, 1975.
13. Beutler E, Lichtmann M. A., Coller B. S., Kipps, T. J.: *Williams Hematology* 5<sup>th</sup> Edition, S. 788, 1995.
14. Beutler E, Lichtmann M. A., Coller B. S., Kipps, T. J.: *Williams Hematology* 5<sup>th</sup> Edition, S. 828, 1995.
15. Selsted ME, Harwig SSL, Ganz T, et al: Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 76:1436, 1985.
16. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al: Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76:1427, 1985.
17. Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J: Chronic granulomatous disease: A syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine (Baltimore)* 62:286, 1983.
18. Bretz U, Baggiolini M: Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 63:251, 1974.
19. Spitznagel JK, Dalldorf FG, Leffel MS, et al: Character of azurophil and specific granules purified from human polymorphonuclear leukocytes. *Lab Invest* 30:744, 1974.
20. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M: Collagenase as a component of the specific granules of human neutrophil leukocytes. *Biochem J* 162:195, 1977.

21. Kane SP, Peters TJ: Analytical subcellular fractionation of human granulocytes with reference to the localization of vitamin B12-binding proteins. *Clin Sci Mol Med* 49:171, 1975.
22. Leffell MS, Spitznagel JK: Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 6:761, 1972.
23. Matzner Y, Vlodavsky I, Bar-Ner M, et al: Subcellular localization of heparanase in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 51:519, 1992.
24. Ambruso DR, Johnston RB Jr: Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J Clin Invest* 67:352, 1981.
25. Boxer LA, Haak RA, Yang HH, et al: Membrane-bound lactoferrin alters the surface properties of polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 70:1049, 1982.
26. Ellison RT III, Giehl TJ: Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 88:1080, 1991.
27. Mollinedo F, Pulido R, Lacal PM, Sanchez-Madrid F: Mobilization of gelatinase-rich granules as a regulatory mechanism of early functional responses in human neutrophils. *Scand J Immunol* 34:33, 1991.
28. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365, 1989.
29. Todd RF III, Arnaout MA, Rosin RE, et al: Subcellular localization of the large subunit of Mol, a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 74:1280, 1984.
30. Petrequin PR, Todd RF III, Devall LJ, et al: Association between gelatinase release and increased plasma membrane expression of the Mol glycoprotein. *Blood* 69:605, 1987.
31. Bainton DF, Miller LJ, Kishimoto TK, Springer TA, Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J Exp Med* 166:1641, 1987.
32. Anderson DC, Schmalstieg FC, Arnaout MA, et al: Abnormalities of polymorphonuclear leukocyte function associated with heritable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP138): Common relationship to diminished cell adherence. *J Clin Invest* 74:536, 1984.
33. Mollinedo F, Gajate C, Schneider DL: Cytochrome b co-fractionates with gelatinase-containing granules in human neutrophils. *Mol Cell Biochem* 105:49, 1991.
34. Kief H., *Der Kulturtransformationstest II*, Monographie 2009, Literatur beim Verfasser
35. Kief, H., *Cofaktoren der Psoriasis, Ein Beitrag zur Pathogenese der Schuppenflechte*, Monographie 2009, Literatur beim Verfasser

Die Grafiken 1 bis 6 stammen aus Vorträgen, die vom Verfasser auf den Bad Hersfelder Ozontagen 1980 – 1990 gehalten wurden.

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. Horst Kief  
 Londoner Ring 105  
 67069 Ludwigshafen  
 Tel.: 0621-66936-0  
 Fax: 0621-66936-36  
 E-Mail: dr.kief@gmx.net