

Durchflußzytometrische nichtradioaktive Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von natürlichen Killerzellen: Vergleich mit dem klassischen ^{51}Cr -Release-Assay

Flow Cytometric Non-radioactive Method for the Determination of the Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells: Comparison with the Classical ^{51}Cr -Release Assay

H. Lötzerich^{1,2}, W. Hirt³

Zusammenfassung: Die Aktivität von natürlichen Killer(NK)-Zellen im Blut ist ein wichtiger Parameter des Immunstatus. Ihre Bestimmung kann bei der Diagnose, Prognose und bei der Überwachung des Therapieverlaufs verschiedener Erkrankungen hilfreich sein. Dazu gehören Krebserkrankungen, Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematosus, das Sjögren Syndrom, das Chronique Fatigue Syndrom und die HIV-Infektion. In der immunologischen Forschung wird zur Bestimmung der zytotoxizität von NK-Zellen der Chrom-Release-Test als Standard-Methode eingesetzt, wobei die Lyserate der NK-Zellen mit Hilfe radioaktiv markierter Tumorzellen (K562) quantifiziert wird. In der vorliegenden Arbeit werden zwei Methoden zur Bestimmung der NK-Zellaktivität gegenübergestellt. Dazu wurden gleichzeitig 25 Proben mit einem Chrom-Release-Test und einem nichtradioaktiven durchflußzytometrischen Testverfahren unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Unterscheidung vitaler und toter Targetzellen untersucht. Die mit beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse weisen keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) auf. Zur Vermeidung von Radioaktivität ist deswegen das neue durchflußzytometrische Verfahren die Methode der Wahl, zumal es insgesamt einen wesentlich geringeren Zeitaufwand erfordert.

Schlüsselwörter: Killerzellen, Natürliche/Blut; Zytotoxizität, Immunologische/Blut; Chrom Radioisotope; Durchflußzytometrie; Carbocyanine; Fluoreszenzfarbstoffe.

Summary: The activity of natural killer (NK) cells in peripheral blood is an important parameter of the immune status. Activity determination can be used for diagnosis, prognosis and monitoring of therapy under different disease states like cancer, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, chronic fatigue syndrome and infection with human immunodeficiency virus. In immunological research the chromium release assay is the standard method for the determination of the cytotoxicity of NK cells. In this method the lysis of $^{51}\text{chromium}$ -labelled tumor cells (K562) is observed. In the present investigation two methods for measuring the activity of NK cells were compared. NK cell activity was simultaneously determined in 25 blood samples with both a $^{51}\text{chromium}$ release assay and a flow cytometric procedure using fluorescent dyes for the differentiation between vital and killed target cells. Results obtained with both methods did not show significant differences ($p < 0.05$). As the flow cytometric method does not require radioactive substances and as it is in total less time-consuming, it appears to be the method of choice.

Keywords: Killer Cells, Natural/blood; Cytotoxicity, Immunologic/blood; Chromium Radioisotopes; Flow Cytometry; Carbocyanines; Fluorescent Dyes.

Die natürlichen Killer (NK)-Zellen gehören neben den Phagozyten zu den zellulären Bestandteilen des unspezifischen Abwehrsystems. Beim Menschen ist der größte Teil der NK-Zellen morphologisch anhand intrazytoplasmatischer azurophiler Granula zu erkennen, weshalb die Zellen in der Literatur auch als LGLs (large granular lymphocytes) bezeichnet werden. Als Effektorzellen der natürlichen Immunität verfügen sie nicht über ein immunologisches Gedächtnis

¹ Deutsche Sporthochschule Köln, Institut f. Experimentelle Morphologie, Lehrstuhl für Morphologie und Tumorforschung

² Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. Hejmut Lötzerich, Deutsche Sporthochschule Köln, Institut f. Experimentelle Morphologie, Lehrstuhl für Morphologie und Tumorforschung, D-50927 Köln. Fax: +49-221-4995765

³ Orpegen Pharma, Heidelberg

Eingegangen: 18. Juni 1996/Angenommen: 11. November 1996

Nicht standardisierte Abkürzungen: CD, cluster designation; cpm, counts per minute; HIV, human immunodeficiency virus; LGL, large granular lymphocyte; NK, natural killer (cell); PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PBS, phosphate-buffered saline; RPMI, Roswell Park Memorial Institute (medium); RT, Raumtemperatur.

und unterliegen nicht der MHC-Restriktion. Sie sind in der Lage, ihre zytotoxische Wirkung ohne vorherige Stimulation zu entfalten. Als akzessorische Effektorzellen mit Fc-Rezeptor können sie verschiedene immunologisch bedeutende Mediatoren, u.a. Interferon- γ , sezernieren. Die NK-Zellen werden in der Regel anhand ihrer Oberflächenmarker CD16 und CD56 identifiziert. Dabei handelt es sich um den Fc RIII (CD 16), der von mehr als 95% der Zellen exprimiert wird, und das NCAM (neural cell adhesion molecule; CD56), das 80% bis 90% der NK-Zellen tragen [1-3]. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich damit die NK-Zellen als CD3⁺ und CD16/CD56⁺ darstellen. Weitere für NK-Zellen charakteristische Oberflächenmarker sind aus der Tabelle 1 [1,4,2] zu entnehmen.

Tabelle 1 Die wichtigsten Oberflächenmarker von NK-Zellen (nach [1,2,4])

Oberflächenmarker	Merkmal	Verteilung
CD 56	Neural Cell Adhesion Molecule	>95%
CD 16	Fc γ R III	80-90%
CD 11b	Komplementrezeptor (CR 3)	80-90%
CR 1	Komplementrezeptor (CR 1)	80-90%
CD 7	Fc μ R	80-90%

Die biologische Bedeutung der NK-Zellen liegt in der Abwehr von Viren und Tumorzellen [5,6]. Im Rahmen der Krebsabwehr spielen sie eine große Rolle bei der Abstoßung transplantierte Tumor- oder Knochenmarkszellen sowie der Prävention von Metastasen. Dagegen verlieren sie an immunologischer Kompetenz bei bereits etabliertem Krebs, wobei ihre Zahl abnimmt und ihre Funktion eingeschränkt ist [7]. Ihre antitumorale Wirkung liegt damit mehr in der frühen Phase im Kampf gegen einen entstehenden Tumor. Dies erklärt auch die reduzierte NK-Zellaktivität von Krebspatienten bei der Diagnose und in der ersten Phase der Rehabilitation neben einer möglichen Suppression als Folge verschiedener Krebstherapien [2]. Eine erniedrigte NK-Zellaktivität ist häufig ein Zeichen für eine Immunschwäche. So ist eine Abnahme der NK-Zellzahl und -funktion im Laufe einer HIV-Infektion zu beobachten [2,8,9]. Eine Abnahme der NK-Zellzytotoxizität spielt auch bei anderen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose [10], beim systemischen Lupus erythematodes [11], dem Sjögren Syndrom [12,13,14] und dem Chronique Fatigue Syndrom [15] eine Rolle. Auch bei starken psychischen Belastungen oder Depressionen kann eine reduzierte NK-Zellaktivität nachgewiesen werden [16,17,18,19,20].

Daher ist die Bestimmung der NK-Zellzytotoxizität ein wichtiger Parameter bei der Ermittlung eines Immunstatus. Sie kann hilfreich bei der Diagnose, Prognose und im Therapieverlauf sein [21]. In der immunologischen Forschung wird zur Bestimmung der Zytotoxizität von NK-Zellen der ⁵¹Chrom-Release-Test

als Standard-Methode eingesetzt, wobei die Lyserate der NK-Zellen mit Hilfe radioaktiv-markierter Tumorzellen (K562) quantifiziert wird. Ziel dieser Arbeit war die Erprobung eines modifizierten Testverfahrens, das auf den Einsatz der Radioaktivität zu Gunsten eines Fluoreszenz-Signals zu verzichten erlaubt. Die Ergebnisse beider Testverfahren wurden gleichzeitig erhoben und miteinander verglichen.

Material und Methoden

Probanden

Zur Bestimmung der NK-Zellwerte wurden 25 venöse Blutproben von gesunden Probanden morgens zwischen 8 und 9 Uhr im nüchternen Zustand liegend aus der Cubitalvene entnommen. Davon wurden 2,7 ml EDTA-Blut für die Erstellung des Blutbildes und die durchflußzytometrische Immunphänotypisierung sowie 5 ml Ammoniumheparinat-Blut zur Bestimmung der NK-Zell-Lyse verwendet.

Durchflußzytometrische Analyse zur Bestimmung der NK-Zellzahl

Der prozentuale Anteil der NK-Zellen wurde mit Hilfe eines Durchflußzytometers bestimmt. Dazu wurden 100 μ l EDTA-Vollblut mit 10 μ l einer Mischung aus Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (CD56/CD16; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden die Ansätze in einem Probenvorbereitungssystem (Q-Prep, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) weiterverarbeitet, wobei die Erythrozyten lysiert werden und eine Fixierung der Leukozyten erfolgt. Die durchflußzytometrische Bestimmung wurde innerhalb einer Stunde am Epics Profile II (Argonlaser 488 nm; Coulter, Krefeld) durchgeführt.

Die absoluten Zahlen der NK-Zellen wurden mit Hilfe der Leukozyten- und Lymphozytenzahlen errechnet. Die Bestimmung der Gesamtleukozyten und der prozentualen Differenzierung in Lymphozyten, Monozyten und der Granulozyten erfolgte an einem Leukozytenzählgerät (MD-18, Coulter) aus EDTA-Vollblut.

Bestimmung der NK-Zellzytotoxizität:

Die nichtradioaktive durchflußzytometrische Bestimmung der NK-Zellzytotoxizität erfolgte mit kryokonservierten Targetzellen und weiteren Reagenzien eines kommerziell erhältlichen Testkits (NKTEST[®] der Fa. ORPEGEN Pharma, Heidelberg).

Isolierung der Effektorzellen

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden nach der Standard-Ficoll-Hypaque (Dichte 1,077) Methode gewonnen. Dazu wurden 5 ml Heparin-Blut im Verhältnis 1:2 mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt und vorsichtig in ein mit 5 ml Ficoll gefülltes Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurde bei RT 20 min mit 700 g (ohne Bremse)

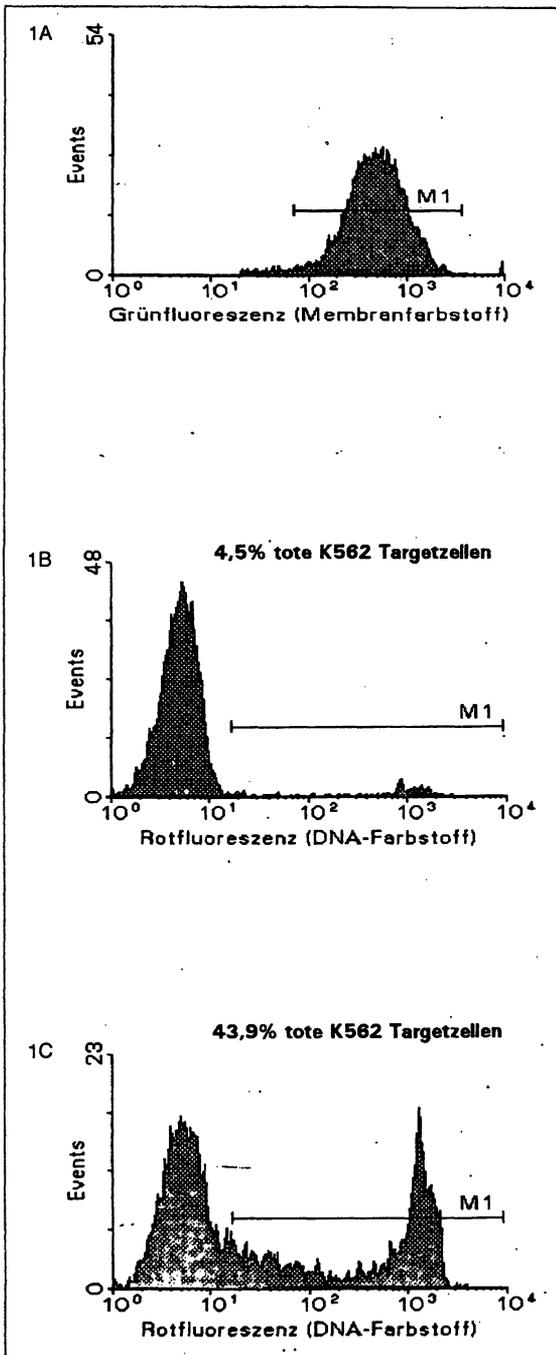


Abbildung 1 Bestimmung der NK-Zellcytotoxizität mittels Durchflußzytometrie.

Oben: Setzen eines „Gate“ oder „Bitmap“ auf grünfluoreszente Targetzellen im FL1-Histogramm.

Mitte: Typisches FL2-Histogramm zur Bestimmung des Anteils an rotfluoreszenten, toten Targetzellen im Kontrollansatz (Targetzellen ohne Effektorzellen).

Unten: Typisches FL2-Histogramm zur Bestimmung des Anteils an rotfluoreszenten, toten Targetzellen im Testansatz (Target- und Effektorzellen, Effektor : Targetverhältnis von 50 : 1).

zentrifugiert. Die obere Schicht wurde entfernt und die Interphase, die die mononukleären Zellen beinhaltet, vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit PBS gemischt und bei RT 10 min mit 250 g zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf die Konzentrationen 5×10^6 /ml, $2,5 \times 10^6$ /ml und $1,25 \times 10^6$ /ml mit Komplettmedium (RPMI 1640 Medium + 10% (v/v) fötales Rinderserum) eingestellt.

Präparation der Targetzellen

Die bei -70°C gelagerten K562 Zellen wurden schnell, innerhalb von 2 min, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in ein mit 50 ml vorgewärmtem Komplettmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach kurzem Schwenken wurde bei RT 5 min mit 120 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und mit 10 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Targetzellen wurden zum einen mit dem grünfluoreszenten Membranfarbstoff (DiOC₁₈) und zum anderen mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ markiert.

Markierung der Targetzellen mit dem Membranfarbstoff (DiOC₁₈)

Zu 5 ml der s.o. präparierten Zellsuspension wurden 20 µl Membranfarbstoff DiOC₁₈ gegeben und nach sofortigem kurzen Mischen für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Komplettmedium zugegeben und bei RT 5 min mit 120 g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^5 /ml mit Komplettmedium eingestellt.

Dieser Schritt entfällt bei Einsatz des kommerziell erhältlichen Testkits, da dieser Targetzellen enthält, die bereits mit dem Membranfarbstoff markiert sind.

Markierung der Targetzellen mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$

Die s.o. präparierte Zellsuspension wurde auf $1 \times 10^6/0,5$ ml Komplettmedium eingestellt. Nach Zugabe von 100 Ci $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (spezifische Aktivität von 400 bis 1200 mCi / mg; Fa. Amersham) wurden die Zellen 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei RT 8 min mit 400 g zentrifugiert und mit Komplettmedium resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen auf 1×10^5 /ml mit Komplettmedium eingestellt.

Testansatz der nichtradioaktiven Methode

Je 100 µl Targetzellen und 100 µl Effektorzellen der jeweiligen Zellkonzentration (50:1; 25:1; 12,5:1) wurden in einem Zentrifugenröhrchen zusammengegeben und bei RT 3 min mit 120 g zentrifugiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Effektorzellen, um die spontane Absterberate der Targetzellen zu bestimmen. Die Röhrchen wurden mit Deckel versehen und 4 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben in ein Eiswasserbad gestellt und mit je 50 µl DNA-Färbelösung versetzt und auf dem Vortexer gemischt. Der rot-

fluoreszente DNA-Farbstoff färbt die durch die Aktivität der NK-Zellen membrangeschädigten Targetzellen an. Die Proben wurden nach 3-5 min mit dem Durchflußzytometer (Epics Profile II, Coulter, Krefeld) analysiert. Dabei wurde ein Probenvolumen von 180 µl bei einer Durchflußrate von 60 µl/min untersucht. Durch das Setzen eines „Gate“ oder „Bitmap“ wurden zur Unterscheidung zwischen Effektor- und Targetzellen nur grünfluoreszente Targetzellen (s. Abb. 1A) registriert. Ausgewertet wurde der Anteil an toten, d.h. rotfluoreszenten Targetzellen (s. Abb. 1B, 1C). Die prozentuale Lyserate wurde durch die Differenz von Kontrollwert (Targetzellen ohne Effektoren) und Testwert (Targetzellen mit Effektoren) ermittelt.

Ansatz des radioaktiven Chrom-Release-Tests

Im Dreifach-Ansatz wurde eine Mikrotiterplatte mit je 100 µl Targetzellen und 100 µl Effektorzellen der jeweiligen Zellkonzentration (50:1; 25:1; 12,5:1) beschickt und bei RT 3 min mit 25 g zentrifugiert. Proben zur Ermittlung der spontanen (Targetzellen ohne Zugabe von Effektorzellen) und maximalen Isotop-Freisetzung (Targetzellen mit Zugabe von 0,25% Dodecyl Schwefelsäure Natriumsalz = SDS) wurden parallel angesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde 4 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde bei RT 5 min mit 400 g zentrifugiert und aus allen Proben 100 µl zellfreier Überstand entnommen.

Die enthaltene Radioaktivität (cpm) wurde in einem Gammacounter (Fa. Berthold) gemessen. Die Lyserate in Prozent wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Lyserate} = \frac{(\text{cpm der Probe} - \text{cpm Spontanfreisetzung}) \times 100}{\text{cpm Maximalfreisetzung}}$$

Berechnung der NK-Zellaktivität pro Zelle

Die Berechnung der NK-Zellaktivität pro Zelle erfolgte über Lytic Units nach der Formel von Pross und Mitarbeitern [22]:

$$\text{NK-Zellaktivität pro Zelle} = \frac{\text{Lytic Units}}{\% \text{ NK-Zellen} \times (10^6 \text{ PBMC} - \% \text{ Monozyten})}$$

Dabei wird ein „Lytic Unit“ definiert als Zahl der Effektorzellen, die benötigt werden, um 20% von 10.000 Targetzellen zu lysieren [22, 23].

Berechnung der NK-Zellen zur Lyse einer Targetzelle

Zur Berechnung der NK-Zellen, die zur Lyse einer Targetzelle benötigt werden, wird die absolute Zahl der Gesamtleukozyten, der prozentuale Anteil Lymphozyten und der NK-Zellen benötigt, um dann die absolute Zahl der NK-Zellen im Zellansatz zu ermitteln. Anhand der Lyserate wird dann berechnet, wieviele NK-Zellen nötig sind, um eine K562-Zelle zu töten.

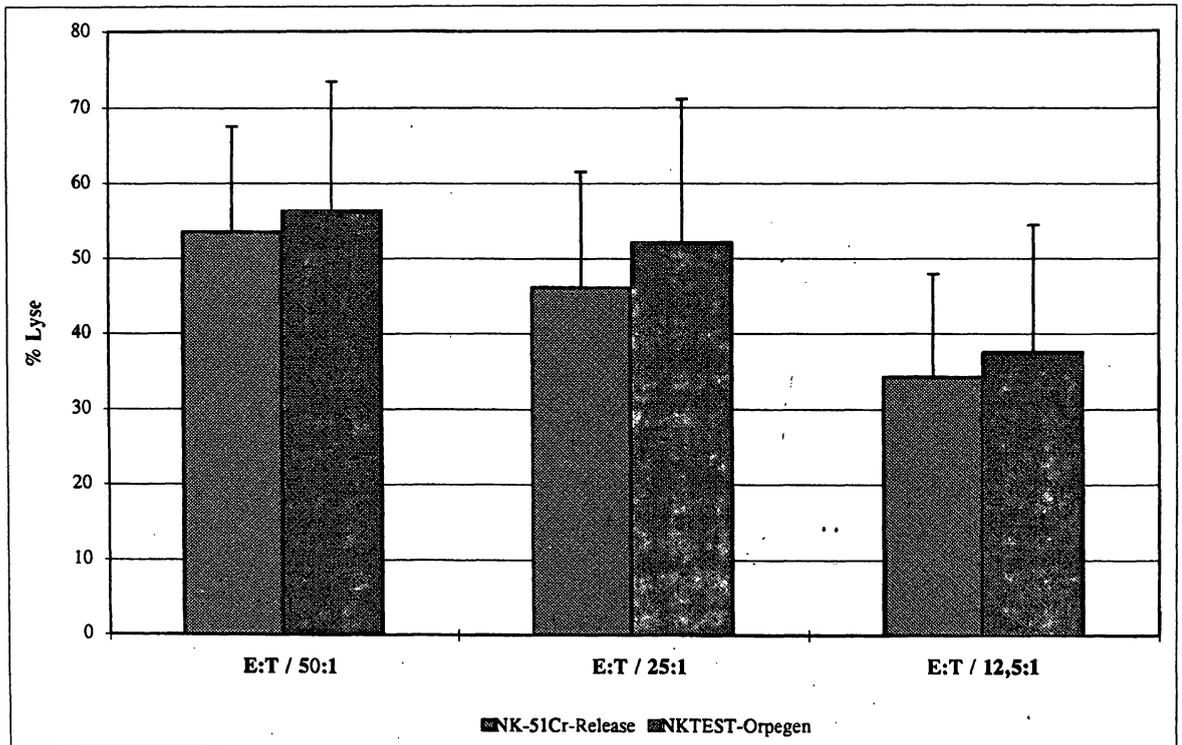


Abbildung 2 Vergleich der Lyserate im ⁵¹Chrom-Release-Test zur nichtradioaktiven durchflußzytometrischen Methode (n=25, p > 0,05)

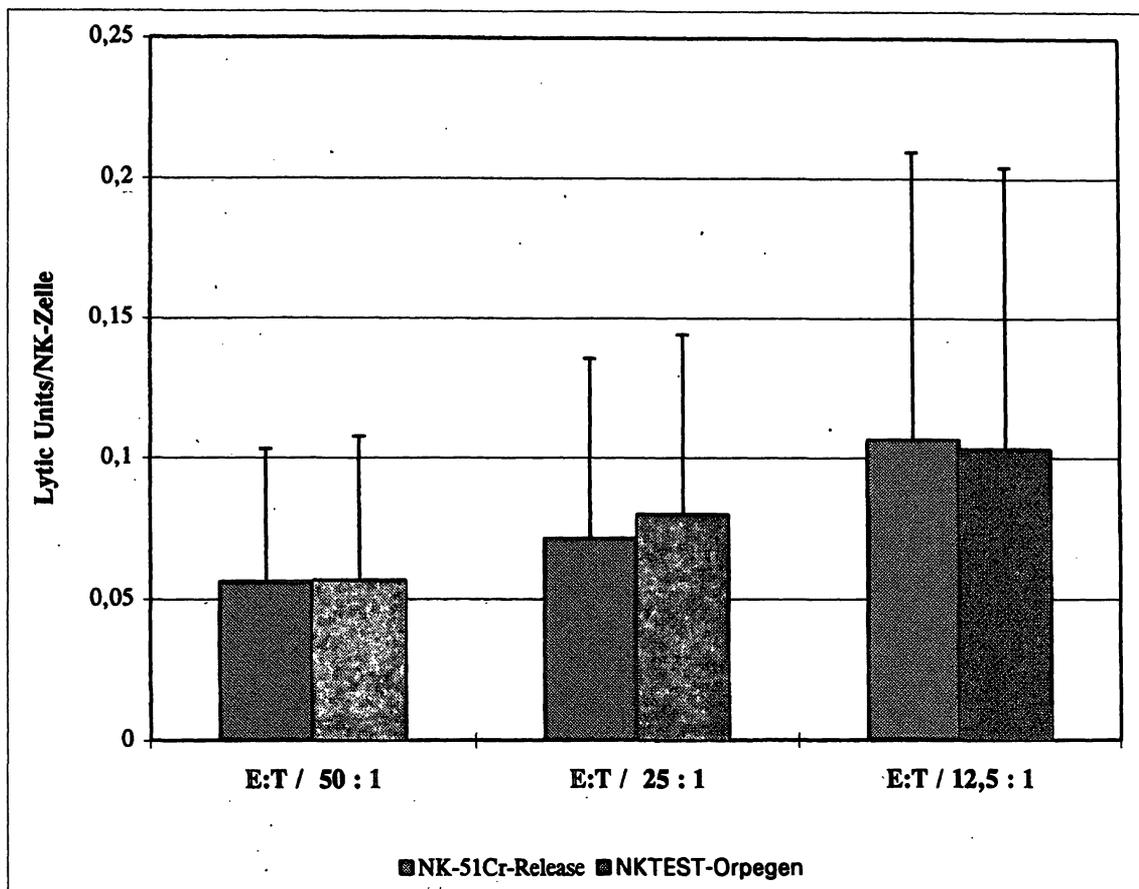


Abbildung 3 Vergleich der Lytic Units pro NK-Zelle im ^{51}Cr -Release-Test zur nichtradioaktiven durchflußzytometrischen Methode (n=25, p > 0,05)

Statistik

Die statistische Auswertung wurde an einem Personalcomputer mit Hilfe des Programms SPSS/PC+ (Version 4.0) durchgeführt. Zum Vergleich der Stichproben wurde ein t-Test eingesetzt, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Methoden weisen bei den gewählten Effektor : Targetverhältnissen von 50 : 1, 25 : 1 und 12,5 : 1 keine signifikanten Unterschiede bei der Lyserate auf (Abb. 2). Die Werte der nichtradioaktiven Methode liegen im Mittelwert bei allen Effektor : Targetverhältnissen immer etwas höher, was aber statistisch keine Bedeutung hat. Dementsprechend treten auch keine statistischen Unterschiede nach der Berechnung über die Lytic Units auf (Abb. 3). Ebenso liefern beide Methoden vergleichbare Ergebnisse, wenn die Zahl der NK-Zellen berechnet wird, die erforderlich sind, um eine Targetzelle zu lysieren (Abb. 4). In Abb. 5 sind beispielhaft

für ein Effektor : Targetverhältnis von 25 : 1 die Lyseraten der durchflußzytometrischen Methode als x-Werte dargestellt, die y-Werte repräsentieren die Werte des ^{51}Cr -Release-Tests. Wie ersichtlich, besteht eine sehr gute Korrelation zwischen beiden Methoden, der Korrelationskoeffizient beträgt 0,935.

Weiterhin wurde die Präzision der durchflußzytometrischen Methode anhand einer dreifachen Bestimmung der NK-Zellzytotoxizität von PBMC-Proben gesunder Probanden ermittelt. Wie Tabelle 2 entnommen werden kann, ergaben sich durchschnittliche Variationskoeffizienten von 5,9 bis 7,6%.

Diskussion

Die Befunde zeigen deutlich, daß die beiden Methoden alternativ benutzt werden können. Da sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden, ist die nichtradioaktive Methode als Methode der Wahl zu empfehlen. Damit wurde weiterhin gezeigt, daß die Markierung der Effektorzellen mit dem Membranfarbstoff zu gleichen Resultaten führt wie die radioaktive Markie-

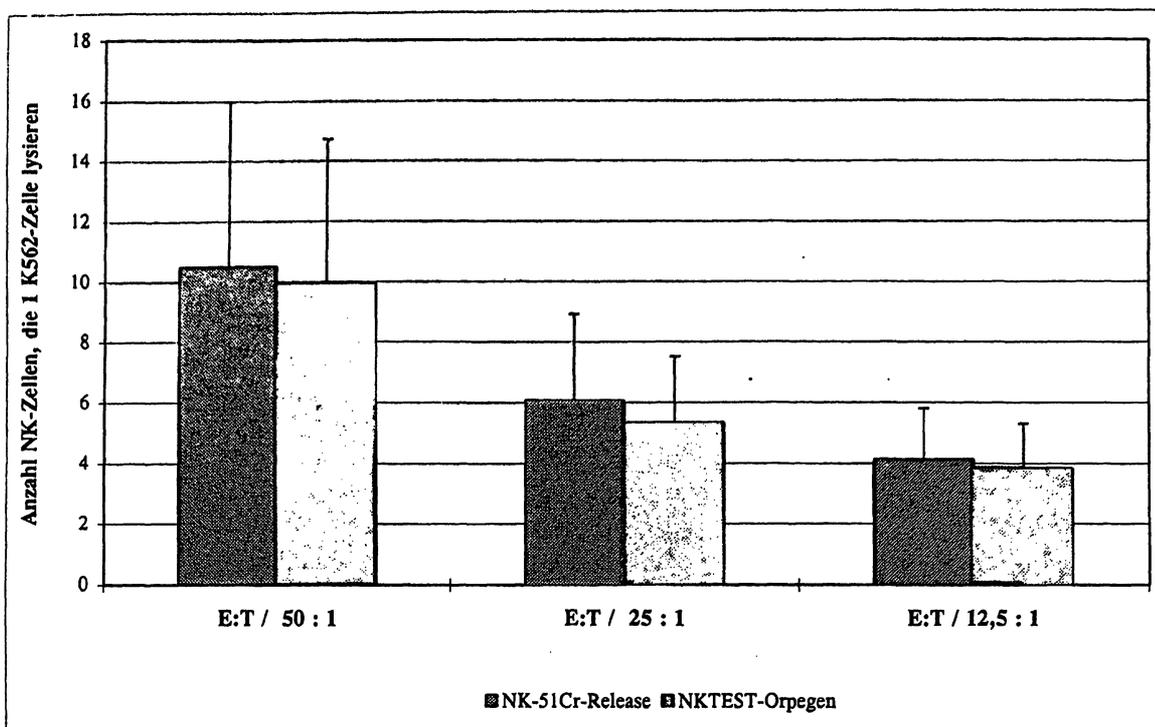


Abbildung 4 Vergleich der NK-Zellaktivität pro Targetzelle im ⁵¹Chrom-Release-Test zur nichtradioaktiven durchflußzytometrischen Methode (n=25, p > 0,05)

nung mit ⁵¹Chrom und daß die Art der Markierung keinen Einfluß auf die Effektorzellen oder deren Lysierbarkeit hat. Ebenso entstehen keine Unterschiede durch die unterschiedlichen Meßprinzipien (Radioaktivitätsmessung oder Durchflußzytometrie).

Die in der Literatur gefundenen unterschiedlichen Werte für Lyseraten des Chrom-Release-Tests lassen sich durch unterschiedliche Effektor:Targetverhältnisse erklären. Dabei spielt nicht nur das Verhältnis, sondern auch die Zusammensetzung der Effektorzellen eine große Rolle. Geht man davon aus, daß nur die NK-Zellen für die Lyse der K562 Targetzellen verantwortlich sind, spielt der Anteil der NK-Zellen in der Effektorzellpopulation eine wichtige Rolle. In der Regel werden PBMC ungereinigt als Effektorzellen verwendet, d.h. es handelt sich hier um eine Mischpopulation von Monozyten und Lymphozyten. Über die

Eliminierung der Monozyten, wobei deren Adhärenzverhalten ausgenutzt wird, kann der Anteil der NK-Zellen erhöht werden. Insbesondere Monozyten können über die Produktion von Prostaglandinen die NK-Zellen in ihrer Funktion beeinträchtigen (24). Dementsprechend werden mit zunehmendem Anteil an NK-Zellen in der Effektorzellpopulation höhere Lyseraten erzielt. Die Reinigung kann bis zur Isolierung von NK-Zellen nach der Methode von *Cosentino* und *Cathart* [25] führen. Der Nachteil liegt aber in einer sehr zeit- und materialaufwendigen Arbeit, die in der Routine nicht zu realisieren ist; darüber hinaus werden größere Blutmengen benötigt.

Während die Lyserate über die natürliche Killeraktivität des peripheren Blutes eine Auskunft gibt, wird versucht durch die nachträgliche Berechnung des genauen Effektor:Targetverhältnisses eine Aussage über

Tabelle 2 Präzision der durchflußzytometrischen Methode

	Lyserate (E:T = 12,5:1)	Lyserate (E:T = 25:1)	Lyserate (E:T = 50:1)
Wertebereich	7,8–33,5	15,8–54,1	20,4–63,7
Durchschnittlicher Variationskoeffizient (%)	6,9	7,6	5,9
n	6	6	6

E:Effektorzellen, T:Targetzellen

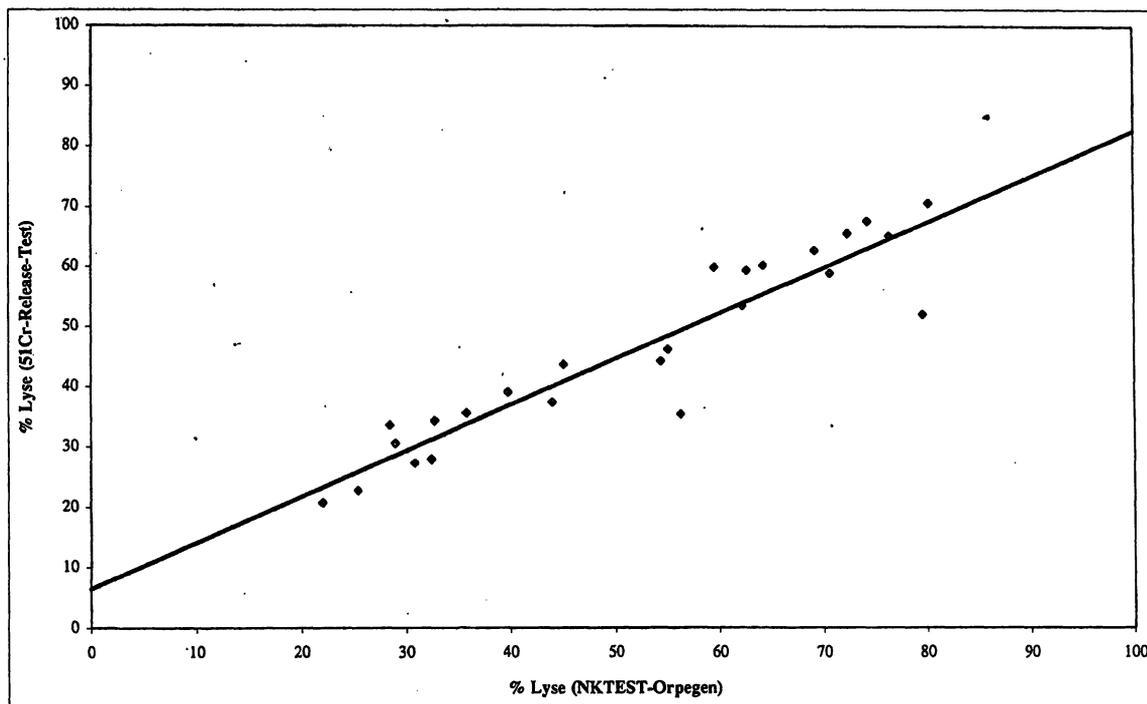


Abbildung 5 Korrelation zwischen ^{51}Cr -Release-Test und durchflußzytometrischer Methode. Die Lyseraten der durchflußzytometrischen Methode sind auf der x-Achse aufgetragen, die Lyseraten des ^{51}Cr -Release-Tests auf der y-Achse. Dargestellt sind individuelle Werte von 25 Vergleichsmessungen bei einem Effektor : Targetverhältnis von 25 : 1, Korrelationskoeffizient = 0,935, Steigung = 0,76.

die Lyseaktivität der einzelnen NK-Zellen zu machen. Da die beiden Testmethoden sich bei der Lyserate nicht unterscheiden, ist es leicht verständlich, daß die Berechnungen über die Lytic Units oder die Menge der NK-Zellen, die benötigt werden, um eine Targetzelle zu lysieren, ebenfalls zu keinen Unterschieden in den Ergebnissen beider Tests führten. Da die Effektor:Targetverhältnisse und auch die Zellzahlen in der Literatur nicht immer standardisiert sind, erscheint die Berechnung pro NK-Zelle geeigneter als die Berechnung über die Lytic Units, obwohl beide Berechnungen letztendlich zum gleichen Ergebnis führen.

Für die Durchführung in der Praxis ist es wichtig, die benötigte Blutmenge zu minimieren, um die Belastung der Patienten besonders bei Verlaufsbeobachtungen so gering wie möglich zu halten. Weiterhin ist eine möglichst schnelle Verarbeitung der Blutproben anzustreben. Die gesamte Testdauer sollte so kurz sein, daß der Test in der Routine auch mit größeren Probenzahlen durchführbar ist. Hier hat sich der alternative nichtradioaktive Test ebenfalls bewährt, da er schon nach zwei Stunden und nicht erst nach vier Stunden, wie beim Chrom-Release-Test, reproduzierbare Ergebnisse liefert. Außerdem entfällt bei dem kommerziell erhältlichen Testkit die mühsame und zeitaufwendige Anzucht der K562 Targetzellen, da im Kit kryokonservierte fluoreszenzmarkierte Zellen enthalten sind.

Der vermehrte Einsatz von NK-Zelltesten wird in der Zukunft zeigen welche Bedeutung die Aktivität der

NK-Zellen bei der Diagnose und der Überwachung des Therapieverlaufs verschiedener Erkrankungen hat.

Danksagung

Unser Dank gilt *Magdalena Euler, Margot Maskus, Alexander Wink* und *Hannes Höchemer* für ihre exzellente technische Mitarbeit und der großen Geduld bei der Erstellung des Manuskripts.

Literaturverzeichnis

1. Robertson MJ, Ritz J. Biological and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421-38.
2. Roitt I, Brostoff J, Male D. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart (DE): Thieme Verlag, 1991.
3. Janeway C, Travers P. Immunobiologie. Heidelberg(DE): Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
4. Landey A, George S, Bray R. Phenotyping Cells of the Immune System: Methodes and Applications. In: Coon JS, Weinstein RS, editors. Diagnostic flow cytometry. New York: United States and Canadian Academy of Pathology Inc., 1991
5. Whiteside TL, Herbermann, RB. Characteristics of natural killer cells and lymphocyte-activated killer cells. *Immunol Allergy Clin Am* 1990;10: 663-704.
6. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-205.
7. Kadish AS, Doyle AT, Steinhauer EH, Ghossein NA. Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J Immunol* 1981;127:1817.

8. Rosenberg ZF, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv Immunol* 1989;47:377-431.
9. Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM. *Klinische Immunologie*. Weinheim(DE):VCH Verlagsgesellschaft, 1993.
10. McGarry RC, Roder JC, Brunet D. Mechanisms of natural killer cell depression in multiple sclerosis. In:Herberman RB, editor. *NK Cells and other Natural Effektor Cells*. New York (USA): Academic Press.1982;1219-25.
11. Strannegard O, Hermodsson S, Westberg G. Interferon and natural killer cells in systematic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1982;50:246.
12. Goto M, Tanimoto K, Horuichi Y. Natural killer cell-mediated cytotoxicity in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1980;24:1274.
13. Miyasaka N, Seaman W, Bakshi A, Sauvezie B, Strand V, Pope R, Talal N. Natural killing activity in Sjögren's syndrome. An analysis of the defective mechanisms. *Arthritis Rheum* 1983; 26:954.
14. Nagahiro JK, Ahira T, Shogo K, Fulmanaro T. Studies of the function of the natural killer-interferon systems in patients with Sjögren's syndrome. *Clin Invest* 1982;69:581.
15. Klimas NG, Salvato FR, Morgan R, Fletcher MA . Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. *J Clin Microbiol* 1990;28:1403-10.
16. Caldwell CL, Irwin M, Lohr J . Reduced natural killer cell cytotoxicity in depression but not in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1991;30:1131-8.
17. Locke SE, Kraus L, Leserman J, Hurst MW, Heisel JS, Williams M. Life change stress, Psychiatric symptoms, and Natural killer cell activity. *Psychosomatic Med* 1984;46:441-53.
18. Schedlowski M, Jacobs R, Stratmann G, Richter S, Hädicke A, Tewes U, Wagner TOF, Schmidt RE. Changes of natural killer cells during acute psychological stress. *J Clin Immunol* 1993;13: 119-126.
19. Glaser R, Rice J, Speicher CE, Stont JC, Kiecolt-Glaser JK. Stress depresses interferon production by leukocytes concomitant with decrease in natural killer cell activity. *Behav Neurosci* 1986;100: 675-8.
20. Irwin M, Daniels M, Bloom E, Weiner H. Depression, and natural killer cell activity. *Psychopharmacol Bull* 1986;22: 1093-96.
21. Whiteside TL, Bryant J, Day R, Herberman RB. Natural killer cytotoxicity in the Diagnosis of immune dysfunction: Criteria for a reproducible assay. *J Clin Lab Anal* 1990;4:102-114.
22. Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The Quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* 1981;1: 51-63.
23. Pross HF, Maroun JA. The standardization of NK cell assays for use in studies of biological response modifiers. *J Immunol Meth* 1984;68:235-49.
24. Baxevanis CN, Reclus G, Gritzapis AD, Dedousis GVZ, Mitsitzi I, Papamichail M. Elevated prostaglandin E2 production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. *Cancer* 1993;72:491-501.
25. Cosentino LM, Cathart MK. A multi-step isolation scheme for obtaining CD16⁺ human natural killer cells. *J Immunol Meth* 1987;103,195-204.

Hämatologie in der Praxis. 2. Auflage. H. Heimpel, D. Hoelzer, H.-P. Lohrmann, E. Seifried. Unter Mitarbeit von E. Kleihauer. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1996, 372 pp, 21 Abbildungen im Text, 47 Farabbildungen im Anhang, 24 x 17 cm, gebunden, 118,00 DM. 873.00 öS, 113.50 sFr. ISBN 3-334-60815-8.

Die zweite, als völlig überarbeitet und erweitert angekündigte Auflage entspricht ausnahmsweise den Versprechungen. Sowohl die Bildqualität des schmalen Anhangs als auch die graphische Aufbereitung der Tabellen und Merksätze haben eine deutliche Verbesserung erfahren. Zwar fehlen die Randstichworte, die die 1. Auflage kennzeichneten, aber die Übersichtlichkeit hat darunter keineswegs gelitten. Klar ist die Gliederung der einzelnen Kapitel in die Abschnitte:

- Systematik und klin. Befund
- Diagnostik
- Stadieneinteilung
- Therapie
- Verlauf und Prognose (incl. Therapie-Nebenwirkungen)
- Aufgaben der Praxis

Es werden die Themenkreise Anämien, Neoplasien der Hämopoese, wie chronisch myeloproliferative Syndrome (MPS), akute Leukämien, myelodysplastische Syndrome (MDS), Morbus Hodgkin, maligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), Plasmozytom sowie seltenerer Erkrankungen des Makrophagensystems nach diesem Schema abgehandelt, wobei erfreulich ist, daß obsoletere Methoden der Diagnostik und Therapie rigoros gestrichen wurden, dafür neuere Behandlungsmethoden mit Wachstumsfaktoren, Knochenmark-Transplantation etc., übersichtlich dargestellt, Eingang fanden. Auch der aktuellen Entwicklung mit automatisierter Blutbilderstellung wurde Rechnung getragen.

Der Buchumfang wurde dadurch nur unwesentlich erweitert, was der Lesbarkeit und Orientierung deutlich zugute kommt. Als Erleichterung zum Verständnis können auch die Abkürzungen und gebräuchlichen Werte (jeweils im Deckel plaziert) angesehen werden.

Ärgerlich sind einige Druckfehler, die im Falle der Anämiediagnostik (Tab. 7) zu Verständnisschwierigkeiten führen könnten. Hyperchrom-mikrozytär bei Vit. B₁₂-Mangel ist schlechterdings ein Unding. Ein Erratum sowie eine Verbesserung der nächsten Auflage wäre hier angebracht.

Das Buch, das sich vorwortgemäß überwiegend an Haus- und Kinderärzte wendet, ist darüber hinaus sicher auch für Laborärzte und -personal höchst interessant, die sich neben ihrer unmittelbaren Befundung für Therapieverlauf und Prognose, sprich das Schicksal der Patienten interessieren, für die sie diese Befunde erheben.

Dr. Silke Heller, Berlin

NKTEST[®]

Testkit for the Quantification of the Cytotoxic Activity of Natural Killer (NK) Cells

- Simple and sensitive method for the routine clinical assessment of NK lytic activity
- Easy discrimination between effector and target cells
- Avoidance of radioisotope usage and reduction of overall assay time

- No cell culture equipment necessary
- Complete testkit containing cryopreserved K562 target cells, complete medium and staining reagents
- Standardized test procedure

Testkit contains cryopreserved K562 target cells and required reagents
Evaluation by flow cytometry or fluorescence microscopy

ORPEGEN[®] Pharma

organic · peptidic · genetic · pharmaceutical
 Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Entwicklung und Produktion mbH

Czernyring 22 · D-69115 Heidelberg · FR.G · Tel: (06221) 9105-0
 Fax (06221) 9105 10 · Internet: <http://www.orpegen.com>
 E-mail: Inf@orpegen.com