

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Evaluierung subakuter Effekte von Ozon und
Formaldehyd auf Funktion und Zytokinfreisetzung
kultivierter humaner Atemwegsschleimhaut**

von

D. Schäfer, C. Brommer, L. Klimek, W. Mann

HNO-Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, 55101 Mainz

Förderkennzeichen PUG L 96002

Die Arbeiten des Programms Umwelt und Gesundheit wurden mit Mitteln des Landes Baden-
Württemberg gefördert

Juli 1999

1 EINLEITUNG	6
1.1 Bedeutung der oberen Atemwege	6
1.2 Untersuchte Luftschadstoffe	6
1.3 Zilienschlag epithelialer Zellen	9
1.4 Zytokine	10
1.5 Ziel der Untersuchungen	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Patientengut	13
2.2 Methoden	13
2.2.1 Probengewinnung und Exposition	13
2.2.2 Bestimmung der ziliaren Schlagfrequenz	13
2.2.3 Zytokinbestimmung	14
2.2.4 Zytotoxizitäts- und Vitalitätsnachweise	14
2.2.5 Immunhistologie	14
2.2.6 Darstellung der Meßwerte	14
3 ERGEBNISSE	15
3.1 Exposition mit synthetischer Luft	15
3.1.1 Zusammenhang von IL-8 und CBF	15
3.1.2 Einfluß der Inkubationszeit auf die Vitalität	16
3.1.3 Histologische Auswertung	18
3.2 Ozon-Exposition	19
3.2.1 Effekte von Ozon auf die CBF	19
3.2.2 Effekte von Ozon auf die IL-8 Freisetzung	21
3.2.3 Effekte von Ozon auf die IL-4 und g-IFN Freisetzung	21
3.2.4 Effekte von Ozon auf die Zytotoxizität	23

3.3 Formaldehyd-Exposition	24
3.3.1 Effekte von Formaldehyd auf die CBF	24
3.3.2 Effekte von Formaldehyd auf die IL-8 Freisetzung	26
3.3.3 Effekte von Formaldehyd auf die IL-4 und g-IFN Freisetzung	26
3.3.4 Effekte von Formaldehyd auf die Zytotoxizität	28
4 DISKUSSION	29
5 LITERATURNACHWEISE	34
6 DANKSAGUNG	44

Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes wurde untersucht, welchen Einfluß Ozon und Formaldehyd auf gesunde bzw. chronisch entzündete Atemwegsschleimhaut der oberen Atemwege des Menschen ausüben. Hierfür wurden funktionelle und metabolische Effekte der nasalen respiratorischen Epithelien untersucht, indem die ziliaren Schlagfrequenz (CBF) sowie die Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-4 und gamma-Interferon bestimmt wurden.

Die vierwöchige Exposition der primären humanen Zellkulturen erfolgte an einer Gas-/Flüssigkeits-Grenzschicht auf Polycarbonatmembranen gegenüber synthetischer Luft oder Ozon und Formaldehyd in den Konzentrationen 100, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Wöchentlich wurde die Zytokin-Freisetzung mittels 'enzyme-immuno-assays' und die CBF unter Anwendung der Video-Interferenzkontrastmikroskopie bestimmt. Die Vitalitäts- und Zytotoxizitätskontrollen der Zellkulturen erfolgten durch Bestimmung der zytosolischen Esteraseaktivität, DNA-Färbbarkeit und LDH-Aktivität.

Synthetische Luft veränderte die CBF während der vierwöchigen Exposition nicht. Die IL-8 Freisetzung unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa nahm während dieses Expositionszeitraumes stetig ab. *Ozon* beeinflusste weder die CBF noch die IL-8 Freisetzung nach der ersten Expositionswoche bei unauffälliger oder chronisch entzündeter Mucosa. Ab der zweiten Expositionswoche verminderte Ozon die CBF für beide Gewebe. Ab der zweiten Expositionswoche verursachte Ozon bei unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa eine verminderte IL-8 Freisetzung. Zudem wurde bei den höheren Ozon-Konzentrationen auch eine erhöhte Zytotoxizität gemessen, die für chronisch entzündete höher lag, als für unauffällige Mucosa. *Formaldehyd* verminderte die CBF unauffälliger und chronisch entzündete Mucosa konzentrations- und zeitabhängig. Hohe Formaldehyd-Konzentrationen führten bei unauffälliger Mucosa nach der ersten und zweiten Expositionswoche, bei chronisch entzündeter nur nach der ersten Expositionswoche zu einer erhöhten IL-8 Freisetzung. Mittlere und hohe Formaldehyd-Konzentrationen verursachten nach der dritten und vierten Expositionswoche eine verminderte IL-8 Freisetzung bei unauffälliger und entzündeter Mucosa gemessen. Formaldehyd verursachte weder bei unauffälligen noch bei chronisch entzündlichen Mucosaproben eine erhöhte Zytotoxizität. Die *Interleukin-4* und *gamma-Interferon* Freisetzung lag sowohl nach Formaldehyd- als auch nach Ozon-Exposition unterhalb der Nachweisgrenze.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Ozon *in vitro* nach einwöchiger Exposition keinen Einfluß auf die Schleimhautfunktion ausübte, Formaldehyd jedoch bereits ab der ersten Woche eine Beeinträchtigung der Funktion und für die erste Woche eine erhöhte metabolische Aktivität verursachte. Entzündete Atemwegsschleimhaut zeigte unter den hier gewählten *in vitro* Bedingungen, insbesondere bei mittleren und hohen Konzentrationen eine, wenn auch nicht signifikante, erhöhte Sukzeptibilität gegenüber Ozon und Formaldehyd. Die Übertragbarkeit dieser *in vitro* Daten auf die *in vivo* Situation und die Beurteilung des Einflusses der Luftschadstoffe werden im Kontext publizierter Arbeiten zu diesem Themenkomplex diskutiert.

Summary

This study was initiated to investigate the effects of ozone and formaldehyde on normal and chronically inflamed human upper respiratory mucosa upon subchronic exposition. Therefore, functional and metabolic effects on ciliary beat frequency (CBF) and release of interleukin 8 (IL-8) interleukin-4 and gamma-interferon were monitored.

Primary cell culture of unaffected and chronically inflamed human nasal mucosa was exposed to synthetic air, ozone, and formaldehyde using concentrations of 100, 500 or 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The exposition was performed on an air/liquid interface for a four week period. Cytokine release was quantified by enzyme-immuno-assays, CBF was monitored by video-interference phasecontrast microscopy. Cellular viability and cytotoxicity were controlled by measuring of lactat dehydrogenase activity, cytosolic activity of esterases and staining of nuclear DNA.

Synthetic air had no influence on CBF during the four week of exposition. IL-8 release of unaffected and chronically inflamed mucosa was continuously diminished during this period of exposure. *Ozone* neither effected CBF nor IL-8 release of unaffected and chronically inflamed mucosa after the first week of exposure. After the second week of ozone-exposure reduced CBF and IL-8 release of both tissue. After the second week of exposure to ozone the release of IL-8 was reduced in unaffected and chronically inflamed mucosa. Furthermore the higher concentrations of ozone caused increased cytotoxicity, which was for a higher extent in chronically inflamed than in unaffected mucosa. *Formaldehyde* caused an concentration and time dependend reduction of CBF in unaffected and chronically inflamed mucosa. High concentrations of formaldehyde caused an elevated IL-8 release in unaffected mucosa after the first and second week of exposure, whereas in chronically inflamed mucosa this was true only for the first week of exposure. After the third and fourth week of exposure intermediate and high concentration of formaldehyde caused reduced IL-8 release in unaffected and chronically inflamed mucosa. Formaldehyde had no effect on viability or cytotoxicity in both tissues. The release of *interleukin-4* and *gamma-interferon* was not detectable after exposure to formaldehyd or ozone.

In conclusion, ozone has no effect after one week of exposure on upper respiratory epithelium *in vitro*. But formaldehyde reduced the function of ciliated cells from the beginning. Chronically inflamed mucosa of human upper respiratory epithelium had a higher, but not significant, susceptibility to intermediate and high concentrations of ozone and formaldehyde under the *in vitro* conditions used. The *in vivo* relevance of the data obtained by the *in vitro* experiments will be discussed in accordance to the rating of air pollutants on differently pre-affected human respiratory mucosa.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der oberen Atemwege

Inhalierte gasförmige Chemikalien der Umwelt können nach ihrer Resorption den Respirationstrakt nachhaltig schädigen und schadstoffinduzierte Entzündungsreaktionen mit pathophysiologischer Bedeutung auslösen (FRENCH 1973, McMANUS 1989, WAKABAYASHI 1977). Die oberen Atemwege sind hier die primären Kontaktflächen für inhalierte bakterielle, virale, chemische und physikalische Schadstoffe der Luft. Dabei kommt dem mucozilieren Transportsystem der oberen Atemwege eine bedeutende Funktion als erste physikalische Barriere zu. Es ist Teil des nicht-immunologischen Abwehrsystems und dient der Adsorbierung, Neutralisierung und Eliminierung inhalierter Schadstoffe (DEITMER 1989, HEE 1977, PROCTER 1982, TOREMALM 1985). Beeinträchtigungen des mucozilieren Transportsystems und der epithelialen Mucosa beginnen mit Entzündungsreaktionen, die z.B. durch Luftschadstoffe wie Formaldehyd oder Ozon ausgelöst und durch Zytokinfreisetzung der Epithelzellen unterhalten werden können. Dies kann letztlich zu bronchialen Obstruktionen führen (BROOKS 1985, FRENCH 1973, MAGNUSSEN 1989, McMANUS 1989, WAGNER 1994). Der Effektivität des mucozilieren Transportsystems kommt somit eine große Bedeutung zu. Sie wird durch eine koordinierte ziliare Schlagfrequenz (CBF) der respiratorischen Epithelzellen und eine intakte Schleimschicht sichergestellt. Eine Beeinträchtigung der CBF führt bekanntermaßen zu einer verminderten Barrierefunktion des mucozilieren Transportsystems (RIECHELMANN 1994, 1995a 1995b und 1996, ROBSON 1992). Akute Effekte von Luftschadstoffen auf die oberen Atemwege des Menschen hinsichtlich der CBF wurden von unserer Arbeitsgruppe in einem vorangegangenen Projekt untersucht (BROMMER 1996 und 1998). Untersuchungen auf zellulärer Ebene über subakute Effekte von Ozon oder Formaldehyd an humanen respiratorischen Epithelzellen wurden bisher noch nicht beschrieben und waren daher Gegenstand dieses Projektes.

1.2 Untersuchte Luftschadstoffe

Ozon ist ein farbloses, instabiles, chlorähnlich stechend riechendes Gas mit sehr hohem oxidativem Potential. Der MAK-Wert (Maximale Arbeitsplatz-Konzentration) beträgt $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (DFG 1995). Dieser Wert ist definiert über eine 8-stündige Exposition und eine durchschnittliche Wochenarbeitszeit von 40 Stunden, nach der keine gesundheitsschädlichen Gefährdungen zu erwarten sind. Der MIK-Wert (Maximale Immissions-Konzentration) wurde von der Kommission Reinhaltung der Luft im VDI (Verband Deutscher Ingenieure) und DIN (Deutsches Institut für Normung) erarbeitet und ist die wesentliche Basis bei der Festlegung der Immissionswerte der TA Luft. Der zum Schutz des Menschen festgelegte MIK-Wert für Ozon beträgt $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit 30 Minuten), der Luftqualitätsleitwert (Air Quality Guidline) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde mit $150\text{-}200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit 1 Stunde) bzw. $100\text{-}120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit 8 Stunden) festgelegt. Die Immissionsgrenzwerte in den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft betragen $110 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit 8 Stunden) als Schwellenwert für den Gesundheitsschutz, $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit Stundenmittelwert) für die Unterrichtung der Bevölkerung und $360 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit Stundenmittelwert) für die Auslösung des Warnsystems (BRAUER 1997). Die Geruchsschwelle für Ozon liegt bei $40\text{-}50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (COLBECK 1988, WAGNER 1994). Hohe Ozon-Konzentrationen der Umgebungsluft

sind fast ausschließlich auf sonnenreiche Sommermonate beschränkt. Generell nehmen die Mittelwerte der atmosphärischen Ozon-Konzentration in Bodennähe in Deutschland systematisch von Nord nach Süd, die Spitzenwerte von Nordosten nach Südwesten zu. Die höheren mittleren Immissionen treten in ländlichen Gebieten, vor allem in höheren Lagen auf, Spitzenwerte jedoch im Umfeld von größeren Stadtgebieten. Maximale Stundenmittelwerte können $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ überschreiten. Ein Trend der Ozon-Immission ließ sich bisher nicht erkennen. Die Jahresmittelwerte der Ozon-Immissionskonzentrationen in Stadt- und Waldgebieten in Deutschland lagen 1992 zwischen 19 und $79 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (BRAUER 1997). Die bisher höchsten Ozonkonzentrationen wurden 1976 in Mannheim mit $664 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Stundenmittelwert) gemessen. In Ludwigshafen wurde an 11 Tagen Ozonkonzentrationen über $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ gemessen, während in Los Angeles an 141 Tagen Konzentrationen von $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und an 68 Tagen von $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ überschritten wurden. Typische Ozonquellen in Innenräumen sind Kopierer, Laserdrucker und Sonnenbänke. Die Ozonkonzentrationen liegen in der Regel unter $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Aufgrund seiner hohen Reaktionsfähigkeit mit den Raum- und Einrichtungsflächen hat Ozon in Innenräumen eine Halbwertszeit von 2 bis 6 Minuten (WAGNER 1994). Technische Verwendung findet Ozon z.B. beim Bleichen von Ölen, Fetten, Wachsen, Synthesefasern, Papieren, Zellstoff und Textilien, zur Verbesserung der Klebefähigkeiten von Kunststoffoberflächen, als Desinfektionsmittel in Brauhäusern und Kühlräumen und zur Reinigung bzw. Aufbereitung von Trink- und Abwässern (NEUMÜLLER 1981a).

Die Zytotoxizität des Ozons wird zum Teil auf die Oxidation ungesättigter Fettsäuren der Zellmembran zurückgeführt (NEUMÜLLER 1981b). Nach Kurzzeit- und Langzeitexposition von Tieren (PINKERTON 1993) und Menschen (CARSON 1985) mit Ozon wurden keine morphologischen Veränderungen der Schleimhaut beobachtet. Jedoch wurden nach Langzeitexposition (> 2 Stunden) oder intermittierender Kurzzeitexposition (≈ 2 Stunden) mit Ozon entzündliche Irritationen der Atemwege beobachtet. In humanen Bronchieallavagen wurden vermehrt Macrophagen, neutrophile Granulozyten und andere Entzündungszellen nachgewiesen (GERRITY 1993, JÖRRES 1994, KOREN 1989, WAGNER 1994). Auch wurde eine Ozon-induzierte ($1200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 2 Stunden) Hyperreagibilität des Bronchialsystems festgestellt, wobei die Expositionsdauer als wichtiger Faktor vermerkt wurde (HOLTZMAN 1979, LEBOWITZ 1985). Gleiche Expositionzeiten mit 200 - $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Ozon führten auch zu einer Erhöhung des mucozilären Transportes (FOSTER 1987). Bei Kindern, die in besonders belasteten Gebieten lebten, wurde eine erhöhte Rate an DNA-Schäden bei der Untersuchung der nasalen Epithelzellen festgestellt (CALDERON-GARCIDUENAS 1996 und 1997). Auch bei Erwachsenen wurden starke Veränderungen in Form nasaler Entzündungsprozesse nach hoher Ozon-Exposition (ca. 10 Stunden/Tag, kumulativ $10644 \mu\text{g}/\text{m}^3$) beobachtet; erst 2 Wochen nach Expositionsende setzte eine Normalisierung des nasalen Epithels ein (CALDERON-GARCIDUENAS 1994). Nach subakuter Ozon-Exposition (bis zu 3 Stunden, 10 - $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) *in vitro* und *in vivo* wurde vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe berichtet, daß Ozon im hier gewählten humanen System keinen Einfluß auf die ziliäre Schlagfrequenz und das mucoziläre Transportsystem ausübt (BROMMER 1996).

Formaldehyd ist bei Raumtemperatur ein farbloses, stechend riechendes Gas. Der MAK-Wert beträgt $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (DFG 1995). Der Luftqualitätsleitwert der WHO liegt bei $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit 30 Minuten). Der Geruchsschwellenwert, der jedoch keinen Grenzwert darstellt,

wurde in einer vom Länderausschuß für Immissionsschutz veröffentlichten Geruchsimmisions-Richtlinie von 1994 mit $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Bezugszeit 30 Minuten) festgelegt (BRAUER 1997). Zur Vermeidung von Schleimhautreizungen und Belästigungen wurde 1977 vom Bundesgesundheitsamt als maximal zulässige Konzentration in Innenräumen ein Wert von $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ empfohlen (BAHADIR 1995). Die Grundbelastung in Reinluftgebieten liegt bei 1 bis $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$, in Ballungsgebieten treten durchschnittlich Werte von $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ auf, Spitzenbelastungen der Außenluft können 20 bis $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ betragen. Wesentliche Quellen des anthropogenen Anteils von Formaldehyd in der Außenluft sind der Kraftfahrzeugverkehr, die Heizung und die Abfallverbrennung. Weiterhin enthält der Rauch einer Zigarette ca. 1,5 mg Formaldehyd. Die Emissionen der Formaldehydproduzenten und der weiterverarbeitenden Industrie sind gering und werden mit unter 3% des anthropogenen Formaldehydanteils an der Außenluftkonzentration angegeben. Industriell werden durch saure katalytische Kondensation von Formaldehyd mit Phenolen Kunststoffe (Phenol-Formaldehyd-Harze) synthetisiert, die bei der Herstellung von Klebstoffen, Lacken, Farben, Holzschutzmitteln, Spanplatten und Isolations-Ortsschäumen Anwendung finden. Formaldehyd verändert Proteine, indem es sie unlöslich macht, gerbt und damit das Gewebe verhärtet. Daraus läßt sich seine gute bakterizide und viruzide Wirkung ableiten, weshalb es breite Anwendung als Desinfektionsmittelzusatz in Reinigungsmitteln und als Konservierungsmittel in Kosmetika findet. Die Bedeutung von Formaldehyd als gesundheitsgefährdender Innenraumschadstoff ist seit Beginn der 70er Jahre bekannt. Durch die Verwendung formaldehydhaltiger Holzschutzmittel, Isolationsschäume, Spanplatten und Möbeln mit Harnstoffharzverleimung kam es in Innenräumen zu Überschreitungen der zulässigen Grenzwerte (DIEM 1978, NEUMÜLLER 1981a, PESCH 1993, WIEZOREK 1996).

Die sterisch leicht zugängliche, polarisierte Carbonylgruppe des Formaldehyd besitzt eine hohe Reaktivität. An ihr finden typischerweise nucleophile Additionen statt. Formaldehyd geht daher relativ leicht elektrophile aromatische Substitutionen ein. Mit den aktivsten Aromaten, den Phenolaten reagiert es auch ohne Zusatz eines sauren Katalysators (MORRISON 1984). Formaldehyd besitzt eine gute Wasserlöslichkeit. Formaldehyd wird über Atemorgane, Haut und Magen-Darm-Trakt schnell resorbiert. Auf Augen sowie Schleimhäute der Nase, des Mundes und der Lunge hat Formaldehyd eine irritierende und entzündliche Wirkung (WAGNER 1994). Bei anamnestisch besonders empfindlichen Personen erhöht Formaldehyd den nasalen Atemwegswiderstand und induziert eine nasale Entzündungsreaktion, während bei anamnestisch unempfindlichen Personen keine Veränderungen festgestellt wurden (FALK 1994, HOLMSTROM 1988, KOREN 1992). Eine zweistündige Exposition von Normalpersonen mit $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Formaldehyd führte zu einer nasalen Eosinophilie (PAZDRAK 1993). Längere berufliche Exposition führte zu chronischen Entzündungsreaktionen und plattenepithelialen Metaplasien (EDLING 1988). Obwohl in Untersuchungen an Leichenbestattern gezeigt werden konnte, daß Formaldehyd hier zu DNA-Schädigungen in Form von Micronucleoli-Bildung führten (SARUDA 1993), und Formaldehydexposition bei Kinder zu erhöhten Irritationen der oberen Atemwege führten (KOLTAI 1994), wurde im Rahmen einer umfangreichen Literaturstudie herausgearbeitet, daß Formaldehyd kein erhöhtes Risiko für Lungenkarzinome verursacht, ein leicht vermindertes Risiko für sinonasale Karzinome bewirkt, aber ein leicht erhöhtes Risiko für nasopharyngeale Karzinome hervorrufen kann (COLLINS 1997).

Einige der konzentrationsabhängigen Effekte von Ozon und Formaldehyd sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Effekte von Ozon und Formaldehyd auf den Menschen

Effekte	Ozon	Formaldehyd
geruchliche Wahrnehmung:		
Normalpersonen	40-50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	160 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
geruchsempfindliche Personen		60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Augenreizung	200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	125-2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Kehlkopfreizung		600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Reizung der Atemwege	200-700 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	2500-3700 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Atemstörung, Husten, Brennen in Nase und Rachen, Tränenfluß	> 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ab 1h Exposition)	12500-25000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Schleimhautnekrosen, Kehlkopfschwellung, Stimmritzenkrampf, Lungenödem		37000-62000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
MAK-Wert	200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (8 h)	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (8 h)
MIK-Wert	120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (30 min)	
Luftqualitätswert (WHO)	150-200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (1h) 100-120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (8h)	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (30 min)

1.3 **Zilienschlag epithelialer Zellen**

Die Bedeutung der ziliaren Funktion als eines der wichtigsten protektiven Elemente der respiratorischen Epithelzellbarriere wird am deutlichsten, wenn man an das Fehlen dieses Elementes bei der primären ziliaren Dyskinesie denkt. Bei dieser angeborenen Krankheit kommt es zu einem ineffektiven oder fehlenden mucozilaren Transport (JORISSEN 1991). Die gestörte ziliare Funktion führt zu einem erhöhten Infektionsrisiko der unteren und oberen Atemwege (BROOKS 1985, FRENCH 1973, JORISSEN 1991, MAGNUSSEN 1989, McMANUS 1989, WAGNER 1994). Als primäre Kontaktfläche sind die respiratorischen Epithelien der nasalen Mucosa inhalativen Schadstoffe besonders intensiv exponiert. Daß die Bestimmung der CBF bei Untersuchungen zu Wirkungen von Luftschadstoffen ein geeigneter und weitgehend akzeptierter Parameter ist, wurde bereits mehrfach gezeigt. Insbesondere erwies sich die Kultivierung primärer humaner respiratorischer Zellen an einer Flüssig-/Gas-Grenzschicht als eine geeignete Methode (BROMMER 1996 und 1998, KENNEY 1994,

KONDO 1991, McKINNON 1992, RIECHELMANN 1994, 1995a, 1995b und 1996, ROBSON 1992, SCHÄFER 1997 und 1998).

Über subakute Expositionen humaner respiratorischer Epithelien mit Formaldehyd und dessen Einfluß auf die CBF wurden bisher keine Arbeiten veröffentlicht. Jedoch gibt es Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen, die sowohl von einer Verminderung als auch Erhöhung der CBF nach Formaldehyd-Exposition berichten (HASTIE 1990, MORGAN 1984). Ähnlich sieht es bei Untersuchungen von Ozon-induzierten Effekten auf die CBF aus (ABRAHAM 1986, ALLEGRA 1991, FOSTER 1987, GROSE 1980, LIPPMANN 1989, PHALEN 1980, SCHLESINGER 1992).

1.4 **Zytokine**

Zytokine kommt bei entzündlichen Reaktionen der Atemwegsschleimhaut eine grundlegende Bedeutung zu (BACHERT 1993, DURHAM 1992, OKAMOTO 1993), wobei deutliche Unterschiede der Zytokinexpression zwischen gesunden Personen und Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen festgestellt wurden (BACHERT 1993, DURHAM 1992, XAUBET 1994). Zytokine können somit als Marker für die Erfassung zellulärer Reaktionsmuster verwendet werden. Die Zytokinexpression der unteren Atemwege wurde bereits im Rahmen anderer durch PUG geförderte Projekte untersucht (PUG L 88003, 89003, 93005, 93009 und 94003). Die Zytokinsynthese der oberen Atemwege des Menschen nach Exposition mit Luftschadstoffen wie Ozon oder Formaldehyd wurde hingegen bisher wenig untersucht. Aus der Gruppe der Zytokine wurde hier insbesondere ein von respiratorischen Epithelzellen produziertes proinflammatorisches Zytokin (CALDERON 1997, KENNEY 1994) und zwei Zytokine, die lymphozytäre Aktivität anzeigen (IBELGAUFTS 1996 b und c), ausgewählt.

Interleukin-8 (IL-8) gehört zur Superfamilie der Chemokine, einer Gruppe kleiner (8-10 kDa) induzierbarer, sekretierter, proinflammatorischer Zytokine, die in eine Vielzahl immunologischer Antworten involviert sind und primär chemotaktisch sowie aktivierend auf bestimmte Leukozyten wirken. IL-8 wurde 1987 identifiziert. Es handelt sich um ein 8383 Da großes basisches Protein, daß in Lösung als Homodimer vorliegt, welches durch sechs Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (BAGGIOLINI 1992, BAGGIOLINI 1994, MILLER 1992). Es ist aus 72 Aminosäuren aufgebaut und wird von vielen Proteasen, wie z.B. Elastasen nicht abgebaut. Die Chemokine werden wiederum in Abhängigkeit konservierter Cystein-Bereiche in vier Klassen eingeteilt. IL-8 gehört hier zur Klasse der C-X-C Chemokine. Diese können weiter unterteilt werden in zwei Gruppen, wobei IL-8 zu den C-X-C Chemokinen zählt, die charakteristische dreier-Aminosäuresequenz ELR (Glutamin-Leucin-Arginin) aufweisen. Die Gene für IL-8 und die anderen C-X-C Chemokine liegen auf dem Chromosom 4q (BAGGIOLINI 1997, MACKAY 1997, SCHALL 1994). IL-8 entfaltet seine Effekte durch Bindung an membranständige Rezeptoren (CXCR-1, CXCR-2, CXCR-3, CXCR-4), die zu der großen Familie der G-Protein gekoppelten 7-transmembran Domänen Rezeptoren gehören. CXCR-1 besitzt hohe Spezifität für IL-8, während an CXCR-2 auch andere C-X-C Chemokine bindet (BAGGIOLINI 1997, HOLMES 1991, LEE 1992, MURPHY 1994, SCHALL 1994). Die Gene für die Rezeptoren sind auf Chromosom 2q35 lokalisiert (LLOYD 1993). IL-8 wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert; quantitativ weniger bedeutsam

sind Lymphozyten. Eine Vielzahl endogener Mediatoren (Histamin, IL-1, TNF, GM-CSF, Immunkomplexe) aber auch exogener Faktoren (LPS, Viren, Änderung des O₂-Partialdrucks) induzieren die IL-8 Synthese (BRAUN 1993, JEANNIN 1994, SAITO 1994). Mediatoren wie TGF- β und Interleukin-4 oder Kortikosteroide hemmen die IL-8 Synthese.

IL-8 unterstützt die Migration von Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten, aus dem Blutstrom in entzündetes Gewebe, weshalb IL-8 auch als proinflammatorisches Zytokin eingestuft wird. Zudem konnte gezeigt werden, daß IL-8 ein autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen ist (SCHADENDORF (1993) und die Angiogenese in vivo und in vitro begünstigt (HU 1993, KOCH 1992). Anti-inflammatorische Eigenschaften von IL-8 werden aus der Verminderung der Leukozytenadhäsion an Endothelzellen abgeleitet. Einen inhibitorischen Effekt hat IL-8 auf die Interleukin-4 induzierte IgE Synthese. Auf andere Immunglobulinklassen hat es keinen Einfluß (IBELGAUFTS 1996a). Hinsichtlich der IL-8 Expression der Mucosa der oberen und unteren Atemwege wurden Unterschiede festgestellt (XING 1993). Aus Versuchen mit immortalisierten humanen Bronchial-Zelllinien ist zudem bekannt, daß Ozon zu einer Erhöhung der Interleukin-8 Synthese dieser Zellen führt (McKINNON 1992). Weiterhin wurde vor kurzem publiziert, daß Endothelzellen der nasalen Mucosa IL-8 sekretieren (GREVERS 1997). Für Ozon wurde berichtet, das eine Exposition mit 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ für 4 Stunden sowohl bei gesunden Probanden (BALMES 1996) als auch bei Asthmatikern (SCANNELL 1996) IL-8 in der bronchialen Lavage erhöht ist, im Status Asthmaticus ist IL-8 drastisch erhöht (LAMBLIN 1998). In Biopsie-Explantaten nasaler Mucosa von Atopiker wurden erhöhte IL-8 Konzentrationen gemessen (CALDERON 1997). Die mRNA-Expression und IL-8 Synthese wurde für humane nasale Mucosa ebenfalls nachgewiesen (KENNEY 1994).

Interleukin-4 (IL-4) wird vorwiegend von T-Lymphozyten synthetisiert. Endogene Stimuli sind IL-2, IL-3 und PAF; TGF- β hemmt die IL-4 Synthese. IL-4 steigert die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten, hemmt aber die gamma-Interferon Synthese dieser Zellen. Aktivierte B-Lymphozyten werden in ihrer Proliferation und Differenzierung durch IL-4 ebenfalls unterstützt. IL-4 führt zu einer erhöhten MHC-II Expression der B-Lymphozyten und einer erhöhten Sensitivität dieser Zellen gegenüber anderen Stimuli. IL-4 erhöht die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen und aktiviert neutrophile Granulozyten. Andererseits hemmt IL-4 die IL-6 und IL-8 und TNF Synthese, weshalb es auch als anti-inflammatorisches Zytokin eingestuft (IBELGAUFTS 1996b) wird. *Gamma-Interferon (g-INF)* wird vorwiegend von T- und B-Lymphozyten sowie den natürlichen Killerzellen synthetisiert. Seine Synthese wird durch verschiedenste Antigene, und endogene Mediatoren wie IL-2 oder EGF induziert, während Kortikosteroide und Cyclosporin A die g-INF Synthese hemmen. Dem g-INF kommt eine wesentliche immunmodulierende Funktion zu. Es wirkt anti-viral, anti-parasitisch aber auch anti-proliferativ. Dabei hat es umfangreiche stimulierende Effekte auf Makrophagen, T-Lymphozyten, NK-Zellen, Granulozyten sowie die Reifung und Proliferation von B-Lymphozyten. Hingegen hemmt g-INF das Wachstum glatter Muskelzellen und die Proliferation von Tumorzellen (IBELGAUFTS 1996c). Der Nachweis von IL-4 und g-INF erfolgte zum Ausschluß lymphozytärer Zytokineinflüsse der kultivierten respiratorischen Zellen.

1.5 **Ziel der Untersuchungen**

Die hier durchgeführten Experimente sollten die Frage beantworten, ob unauffällige (gesunde) und chronisch entzündete (polypös veränderte) nasale humane Mucosa *in vitro* im Laufe einer vierwöchigen Exposition mit variablen Konzentrationen von Ozon oder Formaldehyd unterschiedliche Suszeptibilitäten gegenüber diesen Substanzen aufweisen. Hierfür wurde zum einen die ziliare Schlagfrequenz bestimmt, um die integrierte zelluläre Funktion der zilientragenden respiratorischen Epithelzellen zu erfassen und dadurch die Effekte exogener Noxen auf das mukoziliaren Transportsystem beurteilen zu können. Zum anderen wurde die Freisetzung des proinflammatorischen Interleukin-8 untersucht, um abzuschätzen, inwieweit die exogenen Noxen entzündliche Reaktionen an den respiratorischen Epithelzellen auslösen bzw. unterhalten. Als Kontrolle der Reinheit der isolierten Epithelzellen von Lymphozyten wurde die Freisetzung von IL-4 und g-INF bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

Im Rahmen chirurgischer Eingriffe wurde unauffällige Mucosa (Patienten ohne chronisch entzündliche Atemwegserkrankungen) und chronisch entzündete Mucosa (Patienten mit Polyposis nasi) von jeweils 50 Patienten gewonnen. Das mittlere Alter der Patienten betrug 53 Jahre und umfaßte die Altersgruppe von 25 bis 73 Jahren.

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Exposition

Die Gewebeproben wurden mechanisch zerkleinert und über 24 Stunden bei 4°C mit einem 0,05%igen pronasehaltigen Medium kalt trypsinisiert. Danach erfolgte die Digestion über 15 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen in phosphat-gepufferter Lösung (PBS) mit Hilfe eines Zellsiebes vereinzelt und abzentrifugiert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte mit Trypanblau und lag über 97%. Die Zellen wurden in Konzentrationen von 3×10^5 Zellen/ml auf Polycarbonatmembranen mit Collagenbeschichtung (Fa. Costar) auf einer Fläche 1 cm² an einer Gas-/Flüssigkeits-Grenzschicht in DMEM/HAM's F12 (Fa. Sigma) kultiviert. In Vorversuchen zeigten wir, daß diese Expositionsbedingungen, gegenüber anderen, Vorteile hinsichtlich Vitalität und Funktionalität für die vierwöchige Exposition aufwiesen (SCHÄFER 1997 und 1998). Die Exposition erfolgte gegenüber synthetischer Luft (mit 5% CO₂ Anteil) oder gegenüber Formaldehyd bzw. Ozon angereicherter synthetischer Luft in den Konzentrationen 100, 500 oder 1000 µg/m³ für die Dauer von vier Wochen bei 37°C. Hierbei handelte es sich um die Erfassung subakuter schädlicher Effekte gemäß §5 Abs. 6 der ChemPrüfV, die für diese Einstufung Expositionszeiten von mindestens 28 Tagen festlegt. Das Kulturmedium wurde dreimal je Woche gewechselt, wobei die Überstände einer Woche vereinigt und bei -20°C gelagert wurden. Bei den Expositionsexperimenten handelte es sich um gebundene Proben, da von dem selben Patienten alle Expositionsformen für den gesamten Expositionszeitraum durchgeführt wurden. Somit wurde eine höchstmögliche Vergleichbarkeit der gewonnenen Meßwerte gewährleistet.

2.2.2 Bestimmung der ziliaren Schlagfrequenz

Für die Bestimmung der CBF wurden von jeder Probe an zehn verschiedenen Orten mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes in Verbindung mit einer Video-Kamera und unter Einblendung des Zeitverlaufes für mindestens 10 Sekunden auf einem Magnetband der Zilienschlag dokumentiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Zeitlupe-Modus für jeden dokumentierten Ort für zehn verschiedenen Zeiteinheiten (RIEHELMANN 1994). Schließlich wurde der Mittelwert dieser 100 Bestimmungen je Expositionsform und Probenart berechnet.

2.2.3 Zytokinbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Interleukin-8, Interleukin-4 und gamma-Interferon erfolgte für jede Probe in Duplikaten mit kommerziell erhältlichen Sandwich-'enzyme-immuno-assays' (Fa. R&D Systems) unter Anwendung der mitgelieferten Assay-Durchführungsbestimmungen.

2.2.4 Zytotoxizitäts- und Vitalitätsnachweise

Die LDH-Aktivität der Kulturüberstände wurden mit einem handelsüblichen Test (Fa. Boehringer-Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Vitalität der Primärzellkultur wurde zudem durch Messung der zytosolischen Esteraseaktivität sowie der gleichzeitigen Messung der DNA-Färbung unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM (Extinktion 485 nm, Emission 530 nm) und Ethidium Homodimer-1 (Extinktion 485 nm, Emission 600 nm) unter Beachtung der Durchführungsbestimmungen des Herstellers (Fa. Molecular Probes) überprüft. Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzaktivität (RFU) erfolgte mit Hilfe des Fluoreskan Ascent (Fa. Labsystems).

2.2.5 Immunhistologie

Für den immunhistologischen Nachweis wurden die kultivierten Epithelzellen mit Aceton fixiert und anschließend mit monoklonalen Antikörpern gegen Vimentin (Nachweis von Fibroblasten und Myofibroblasten), L26-Antigen (Nachweis von B-Lymphozyten), CD 3 (Nachweis von T-Lymphozyten), Cytokeratin-8 (Nachweis von Epithelzellen), SM-Aktin (Nachweis von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten), CD 68 (Nachweis von Makrophagen) oder CD 15 (Nachweis von Granulozyten) angefärbt. Die Antikörper wurden nach Angabe der Hersteller verdünnt eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter polyklonaler Antikörper verwendet. Als Farbpräzipitat wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet.

2.2.6 Darstellung der Meßwerte

Die Ergebnisse für die gegenüber synthetischer Luft exponierten Proben wurden für IL-8 in ng/ml bzw. pg/ml (bezogen auf 3×10^5 eingesetzte Zellen in 12-Lochplatten mit Einsätzen aus Polykarbonatmembranen) angegeben. Von jeder Probe, die grundsätzlich als Duplikate analysiert wurden, erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes. Der arithmetische Mittelwert der CBF dieser Proben wurde in Hz angegeben. Die Ergebnisse der Formaldehyd- und Ozon-Expositionen wurden als prozentuale Änderung gegenüber der mit synthetischer Luft exponierten Probe angegeben. Hierbei wurden die Meßwerte jedes Patienten individuell normiert und anschließend der arithmetische Mittelwert der jeweiligen Patientengruppe bzw. des entsprechenden Zeitpunktes und der entsprechenden Ozon- bzw. Formaldehyd-Konzentration berechnet. Die statistische Datenanalyse erfolgte mit dem zweiseitigen parameterfreien Test für gepaarte Stichproben (Wilcoxon-Signed-Rank-Test) bzw. Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS. Signifikante Ergebnisse (gegenüber der Kontrolle) wurden bei $p < 0,05$ angenommen und mit [*] in den Graphiken gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Exposition mit synthetischer Luft

3.1.1 Zusammenhang von IL-8 und CBF

Ein Zusammenhang zwischen CBF und IL-8 wurde nicht beobachtet. Wie aus den Abbildungen 1.1A und 1.1B zu ersehen ist, kam es während der vierwöchigen Exposition gegenüber synthetischer Luft zu einer Abnahme der IL-8 Freisetzung bei unauffälliger (15,3/7,7/3,6/2,1 ng/ml) und chronisch entzündeter (16,7/12,5/6,4/1,3 ng/ml) Mucosa, jedoch blieb die CBF während dieses Zeitraumes unbeeinflusst (9,2/9,5/9,5/9,3 Hz bzw. 5,2/5,2/5,3/4,8 Hz). Die CBF chronisch entzündeter Mucosa war während des Beobachtungszeitraumes signifikant niedriger als bei unauffälliger Mucosa.

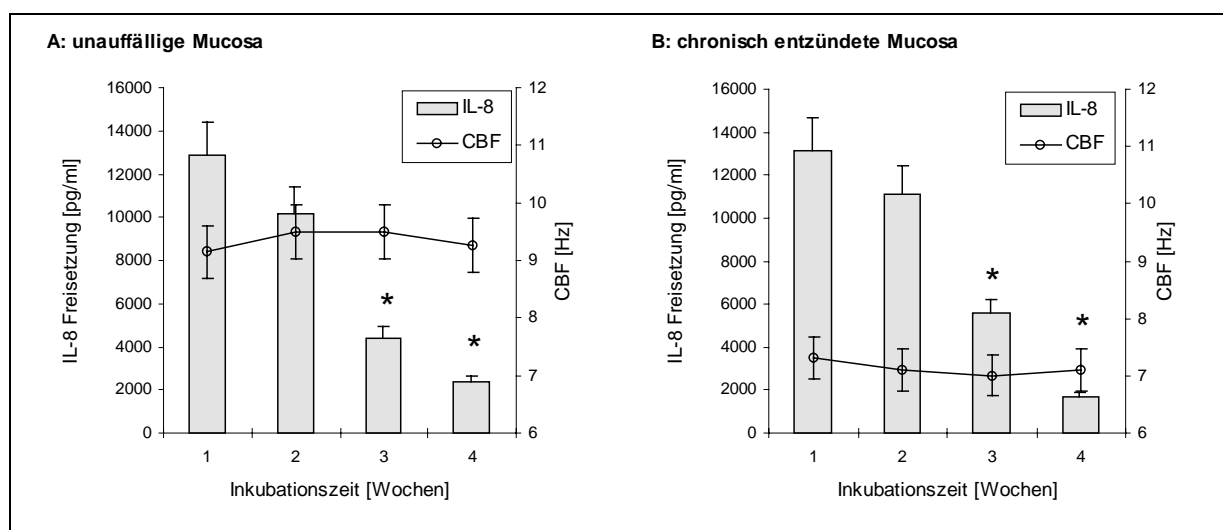


Abb. 1.1: IL-8 Freisetzung und CBF nach Exposition mit synthetischer Luft

Exposition humaner nasaler respiratorischer Epithelzellen, isoliert aus unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa, gegenüber synthetischer Luft für 1 bis 4 Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert der IL-8 Freisetzungswerte von 30 Patienten je Gewebeart. Die IL-8 Freisetzung und CBF-Bestimmung wurden aus gebundenen Stichproben bestimmt.

*: signifikante Änderung der IL-8 Freisetzung gegenüber dem Wert nach der 1. Expositionswoche

3.1.2 Einfluß der Inkubationszeit auf die Vitalität

Die vierwöchige Exposition gegenüber synthetischer Luft hatte keinen Einfluß auf die LDH-Aktivität oder Zytotoxizität der kultivierten respiratorischen Epithelzellen (s. Abb. 1.2). Dies wurde auch durch die Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen bestätigt (s. Abb. 1.3). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa festgestellt.

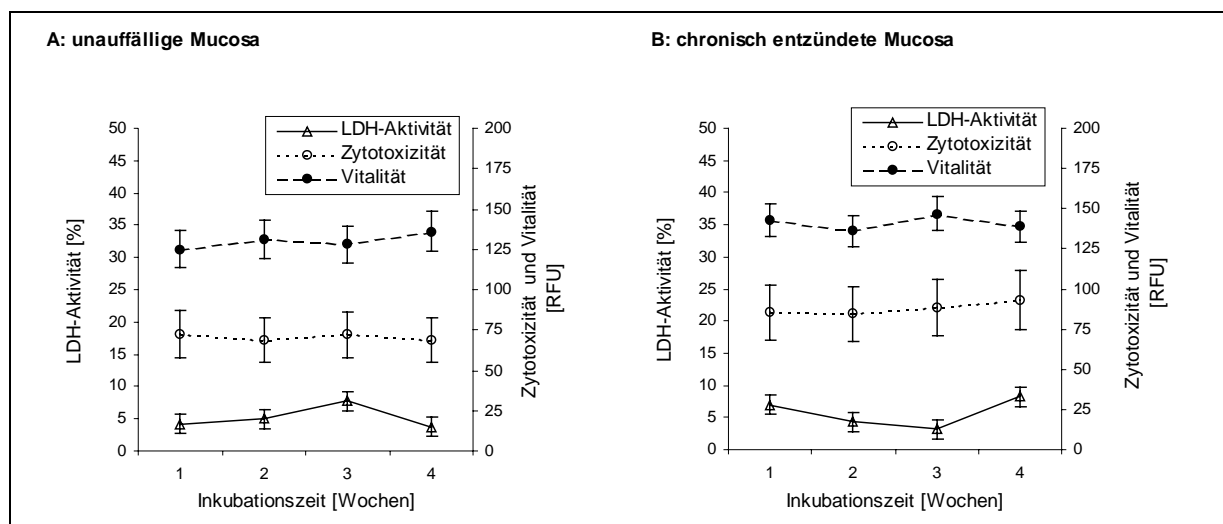


Abb. 1.2: LDH-Aktivität, Zytotoxizität und Vitalität nach Exposition mit synthetischer Luft

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber synthetischer Luft für 1 bis 4 Wochen. Die LDH-Aktivität ist als prozentualer Anteil gegenüber der maximal induzierbaren Zytotoxizität dargestellt. Die LDH-Aktivität und fluorometrisch bestimmte Zytotoxizität stellen zwei unterschiedliche Verfahren der Zytotoxizitätsbestimmung dar. Zum Probenumfang s. Abb. 1.1

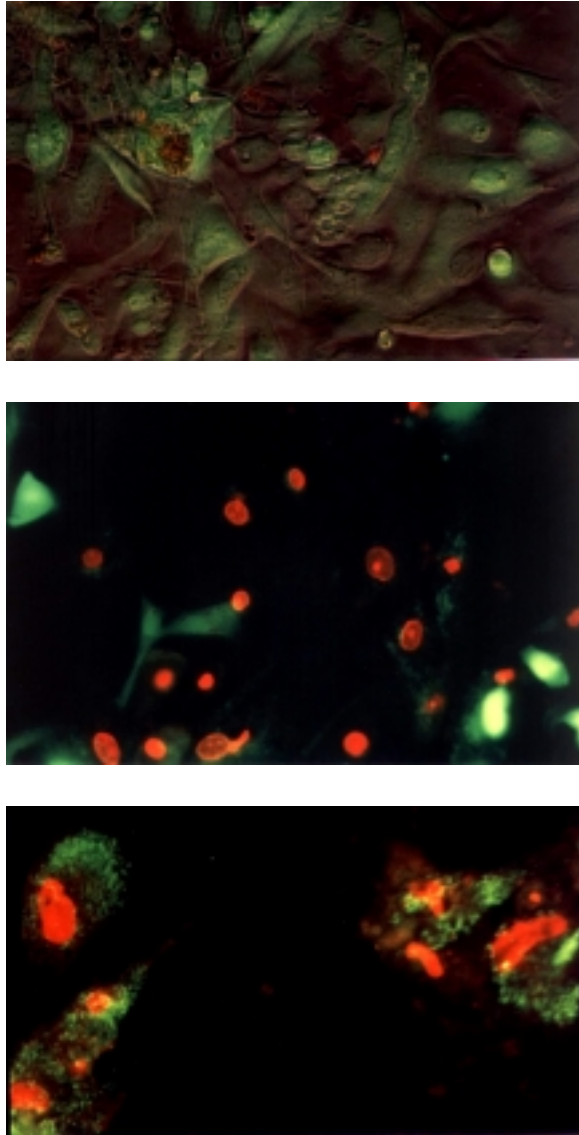


Abb. 1.3: LIVE/DEAD Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie

Abgebildet sind nasale respiratorischer Epithelzellen, die gleichzeitig mit Calcein AM (grün) und Ethidium Homodimer-1 (rot) beladen wurden. Vitale Zellen setzen Calcein AM mit Hilfe zytoplasmatischer Esterasen zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff um und speichern ihn im Zytoplasma. Nur bei geschädigten Zellen mit nicht mehr intakter Zytoplasmamembran kann Ethidium Homodimer-1 in den Zellkern eindringen und mit den Nukleinsäuren interkalieren, wodurch es zu roter Fluoreszenz kommt. Bei toten Zellen oder Zellen, die Membranschädigungen aufweisen kommt es gleichzeitig zu einer Abnahme der zytoplasmatischen Grünfärbung durch Ausfließen des Zytoplasmas.

Extinktion: 485 nm, Emission: 536 nm (Calcein AM) bzw. 620 nm (Ethidium Homodimer-1)

Abb. 1.3 A: vitale primäre nasale Epithelzellen unauffälliger Mucosa; 4 wöchige Exposition mit synthetischer Luft; Anfärbung des Zytoplasma durch Calcein AM; Phasenkontrastaufnahme in Verbindung mit fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (200 fache Vergrößerung)

Abb. 1.3 B: tote primäre nasale Epithelzellen polypöser Mucosa; 4 wöchige Exposition mit Ozon (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$); Anfärbung der zellulären Nukleinsäuren durch Ethidium Homodimer-1 fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (200 fache Vergrößerung)

Abb. 1.3 C: absterbende Zellen polypöser Mucosa nach 2 wöchiger Exposition mit Ozon (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$); abnehmende zytoplasmatische Färbung bei gleichzeitiger zunehmender Färbung des Zellkerns; fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme (400 fache Vergrößerung)

3.1.3 Histologische Auswertung

In allen untersuchten Proben führte die immunhistologische Markierung der Zellen mit dem anti-Cytokeratin-8 Antikörper zu einer positiven Färbung. Dies wurde als erfolgreiche Isolierung von epithelialen Zellen gewertet. Die Verwendung des anti-Vimentin Antikörpers ergab eine sehr schwache Anfärbung (ca. 2-4% der Gesamtzellen) der Präparate. Dies wurde als Hinweis auf geringfügige Kontamination der isolierten Zellen mit Fibroblasten interpretiert. Die ausbleibende Färbung nach Markierung mit dem anti-CD68 Antikörper sprach für das Fehlen von Makrophagen in den primären Zellkulturen. Die ausbleibende bis sehr schwache Färbung (0-2% der Gesamtzellen) nach Markierung mit dem anti-CD15 Antikörper wurde als Granulozyten-freie Präparation der primären Zellkulturen interpretiert. Die negativen Färbungen mit dem anti-L26 oder anti-CD3 Antikörper standen für eine B-Lymphozyten- bzw. T-Lymphozyten-freie Präparation der primären Zellkulturen. Die letzten zwei Markierungsergebnisse korrelierten gut mit den ebenfalls negativen Nachweisen für die IL-4 und g-INF Freisetzung in den Zellkulturüberständen. Weiterhin führte auch die Markierung mit dem anti-SM-Aktin Antikörper zu einem negativen Ergebnis, welches für das Fehlen von glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten stand.

Zusammenfassend zeigten die histologischen Ergebnisse, daß die verwendete Technik ein geeignetes Verfahren zur Isolierung nahezu reiner nasaler Epithelzellen war.

3.2 **Ozon-Exposition**

3.2.1 **Effekte von Ozon auf die CBF**

Nach der 1. Expositionswoche hatte Ozon unabhängig von der gewählten Konzentration (100/500/1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) sowohl bei unauffälliger Mucosa als auch bei chronisch entzündeter Mucosa keinen signifikanten Einfluß auf die CBF. Dies galt auch für die 2. bis 4. Expositionswoche mit der niedrigen Ozon-Konzentration (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Hingegen führten mittlere Ozon-Konzentrationen (500 bzw. 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) nach der 2. Expositionwoche bei unauffälliger Mucosa zu einer leichten (7,1 bzw. 10,3%), bei chronisch entzündeter Mucosa zu einer signifikanten Verminderung der CBF (20,5 bzw. 16,4%).

Ab der 3. und 4. Expositionswoche war die CBF nach höheren Ozon-Konzentrationen (500 bzw. 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) sowohl bei unauffälliger (3. Woche: 18,7 bzw. 37,5% und 4. Woche: 11,1 bzw. 33,3%) als auch bei chronisch entzündeter Mucosa (3. Woche: 33,8 bzw. 26,8 und 4. Woche 21,4 bzw. 38,6%) signifikant vermindert.

Bei niedrigen Ozon-Konzentrationen (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) unterschieden sich die CBF unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa nicht. Bei mittleren und hohen Ozon-Konzentrationen war die CBF chronisch entzündeter Mucosa tendenziell (nicht signifikant, $p < 0,8$ bis $0,13$) vermindert. (s. Abb. 2.1 A bis C).

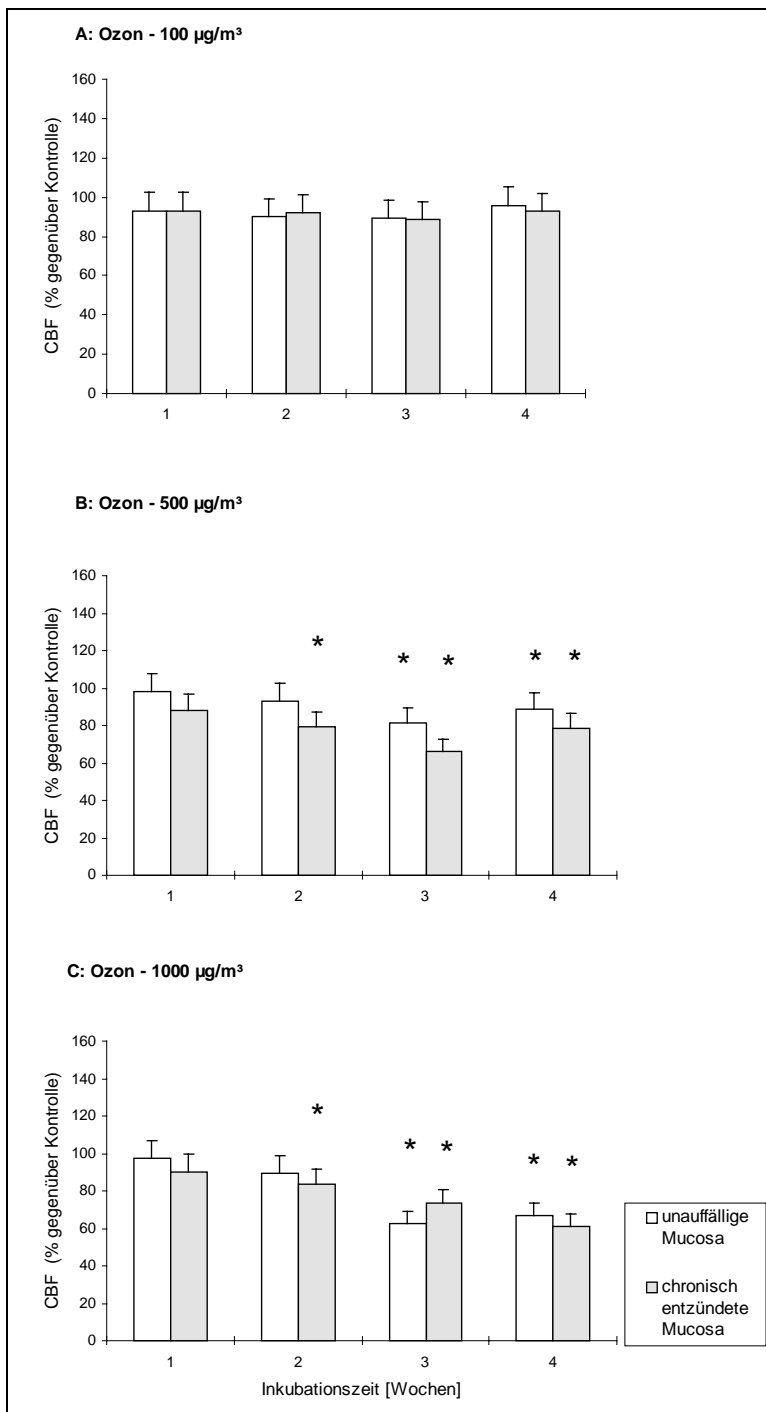


Abb. 2.1: CBF unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa nach Ozon-Exposition

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber variablen Konzentrationen von Ozon für 1 bis 4 Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert der CBF-Werte von jeweils 10 Patienten je Ozon-Konzentration. Berechnet wurde die prozentuale Änderung gegenüber der jeweiligen individuellen Kontrolle nach Exposition mit synthetischer Luft. Es handelte sich um gebundene Stichproben.

*: signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle, die gegenüber synthetischer Luft exponiert wurde (p<0,05)

3.2.2 Effekte von Ozon auf die IL-8 Freisetzung

Die IL-8 Freisetzung unauffälliger Mucosa wurde nach der 1. Expositionswoche mit Ozon unabhängig von der Konzentration (100/500/1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) nicht beeinflusst. Für chronisch entzündete Mucosa wurde für die niedrige Ozon-Konzentration (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) kein Einfluß auf die IL-8 Freisetzung gemessen. Jedoch wies sie gegenüber unauffälliger Mucosa während dieses Expositionszeitraumes für die höheren Ozon-Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) eine signifikante Verminderung (25,8 und 22,6%) IL-8 Freisetzung gemessen wurde.

Ab der 2. Expositionswoche mit Ozon (100/500/1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) zeigten sowohl unauffällige Mucosa (2. Woche: 24,1/60,5/41,6%; 3. Woche: 25,2/63,7/56,1%; 4. Woche: 54,9/82,8/85,9%) als auch chronisch entzündete Mucosa (2. Woche: 27,1/56,1/67,7%; 3. Woche: 55,9/73,9/70,9%; 4. Woche: 41,1/86,5/93,8%) eine konzentrations- und zeitabhängige Verminderung der IL-8 Freisetzung. Diese IL-8 Freisetzungen waren gegenüber den jeweiligen Kontrollen signifikant ($p < 0,05$) vermindert. Die IL-8 Freisetzung zeigten nach den hohen Ozon-Expositionen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit mehr, weder bei unauffälligem noch bei chronisch entzündetem Gewebe.

Für niedrige (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) Ozon-Expositionen wurde kein Unterschied hinsichtlich der IL-8 Freisetzung zwischen unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa gemessen. Nach Exposition mit mittleren oder hohen Ozon-Konzentrationen (500 bzw. 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) war die IL-8 Freisetzung in entzündetem Gewebe nicht signifikant niedriger ($p > 0,07$ bis 0,15) als in unauffälligem Gewebe. (s. Abb 2.2)

3.2.3 Effekte von Ozon auf die IL-4 und g-IFN Freisetzung

Die IL-4 und g-IFN Freisetzung lag für alle Ozon-Expositionen sowie für unauffälliges und entzündetes Gewebe unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden.

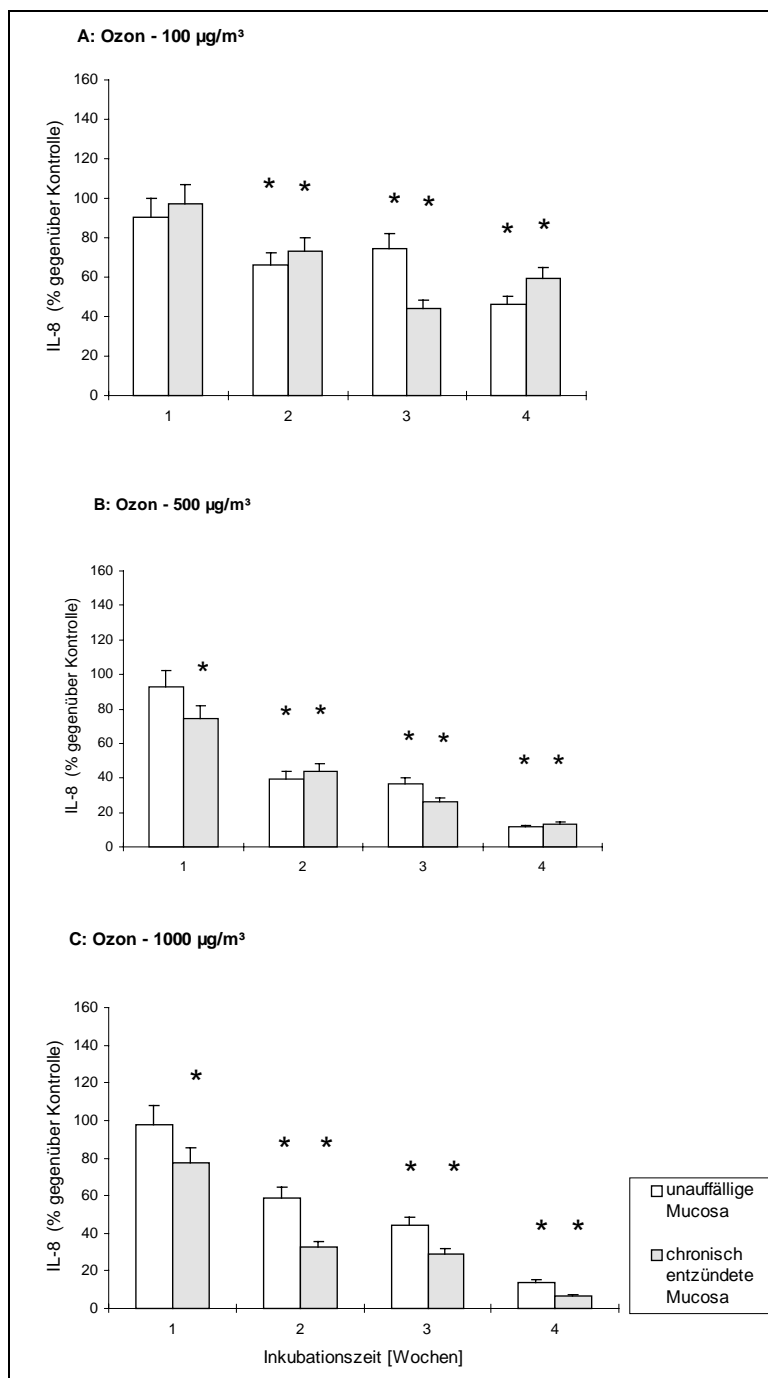


Abb. 2.2: IL-8 Freisetzung unauffälliger und entzündeter Mucosa nach Ozon-Exposition

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber variablen Konzentrationen von Ozon für 1 bis 4 Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert der IL-8 Freisetzungswerte von jeweils 10 Patientenproben je Ozon-Konzentration. Dargestellt wurde die prozentuale Änderung gegenüber der jeweiligen individuellen Kontrolle nach Exposition mit synthetischer Luft.

*: signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle, die gegenüber synthetischer Luft exponiert wurde ($p < 0,05$)

3.2.4 Effekte von Ozon auf die Zytotoxizität

Nach der 3. und 4. Expositionwoche mit Ozon wurde sowohl eine signifikant erhöhte LDH-Aktivität, als auch ein signifikant erhöhter Anteil zytotoxischer Zellen gemessen. (s. Abb. 2.5). Dabei wiesen Zellen aus chronisch entzündeter Mucosa gegenüber denjenigen aus unauffälliger Mucosa tendenziell höhere, jedoch nicht signifikante Werte für LDH-Aktivität bzw. fluorometrisch bestimmter Zytotoxizität auf. (s. Abb 2.3)

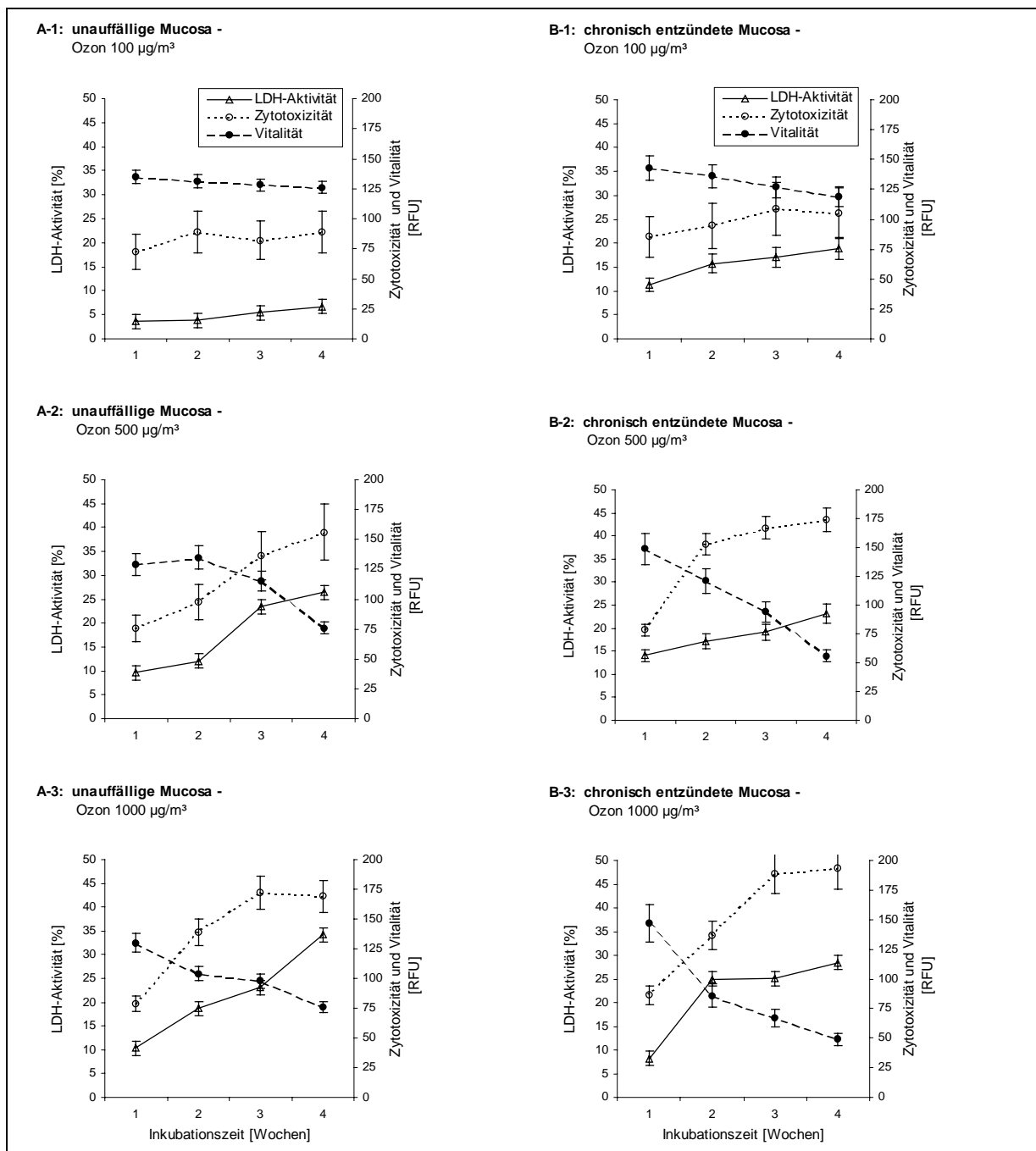


Abb. 2.3: Zytotoxizität und Vitalität nach Ozon-Exposition

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber synthetischer Luft für 1 bis 4 Wochen. Die LDH Aktivität ist als prozentualer Anteil gegenüber der maximal induzierbaren Zytotoxizität dargestellt. Die LDH-Aktivität und fluorometrisch bestimmte Zytotoxizität stellen zwei unterschiedliche Verfahren der Zytotoxizitätsbestimmung dar. Probenumfang je Konzentration und Zeitpunkt: N = 10 Patienten

3.3 **Formaldehyd-Exposition**

3.3.1 **Effekte von Formaldehyd auf die CBF**

Formaldehyd (100/500/1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) bewirkte bei unauffälliger Mucosa eine konzentrations- und zeitabhängige Verminderung der CBF über den gesamten Beobachtungszeitraum (1. Woche: 11,4/12,6/14,3%; 2. Woche: 17,9/19,9/43,8%; 3. Woche: 20,3/15,4/45,9%; 4. Woche: 29,5/43,9/51,4%). Die höheren Formaldehyd-Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) führten unabhängig von der Expositionszeit zu einer signifikanten Verminderung der CBF.

Bei Zellen chronisch entzündeter Mucosa zeigte die niedrige Formaldehyd-Konzentration (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) nach der 1. bis 3. Woche keinen Effekt auf die CBF. Nach der 4. Woche war die CBF signifikant (19,8 %) vermindert. Mittlere (500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) bzw. hohe (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) Formaldehyd-Konzentration führten bei diesen Zellen nach der 1. bis 4. Woche zu einer signifikanten Verminderung (18,7/23,3/26,6/37,2% bzw. 18,8/35,1/36,2/41,3%) der CBF.

Zellen chronisch entzündeter Mucosa reagierten bei niedrigen Formaldehyd-Konzentrationen (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) mit einer gegenüber unauffälliger Mucosa nicht signifikant erhöhten CBF. Nach Exposition mit mittleren (500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) oder hohen (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) Formaldehyd-Konzentrationen wurde hinsichtlich der CBF kein Unterschied zwischen chronisch entzündeter und unauffälliger Mucosa festgestellt (s. Abb. 3.1 A bis C).

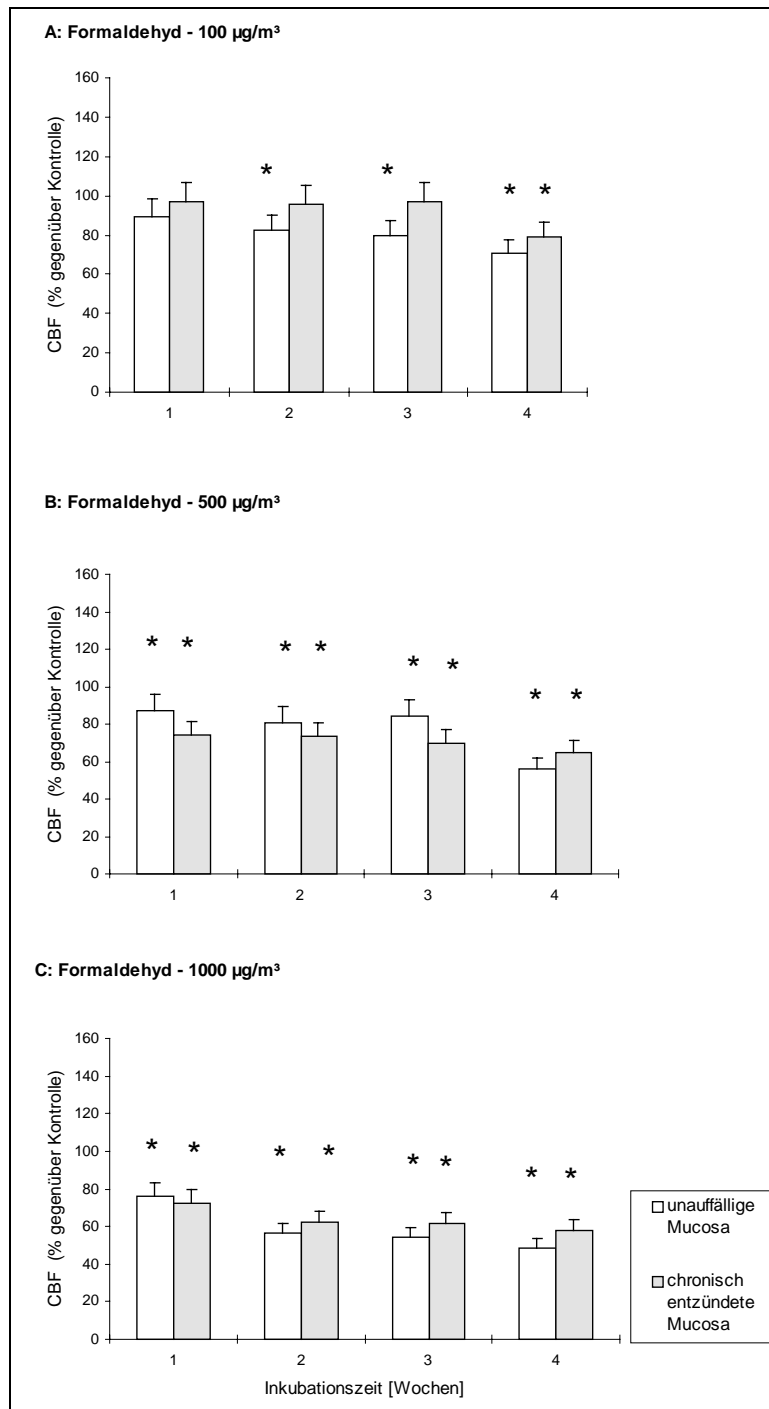


Abb. 3.1: Vergleich der CBF unauffälliger und entzündeter Mucosa nach Formaldehyd-Exposition

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber variablen Konzentrationen von Formaldehyd für 1 bis 4 Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert der CBF-Werte von jeweils 10 Patienten je Formaldehyd-Konzentration. Berechnet wurde die prozentuale Änderung gegenüber der jeweiligen individuellen Kontrolle nach Exposition mit synthetischer Luft. Es handelte sich um gebundene Stichproben. *: signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$)

3.3.2 Effekte von Formaldehyd auf die IL-8 Freisetzung

Bei unauffälliger Mucosa zeigte die niedrige Formaldehyd-Konzentration ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) während der vierwöchigen Exposition keinen signifikanten Einfluß auf die IL-8 Freisetzung. Die höheren Formaldehyd-Konzentrationen (500 und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) bewirkten nach der 1. Expositionswoche eine leichte ($4,9$ und $17,2\%$) und nach 2. Expositionswoche eine signifikante ($22,8$ und $28,8\%$) konzentrationsabhängige Erhöhung der IL-8 Freisetzung. Nach der 3. Woche kam es nur noch zu einer leicht erhöhten IL-8 Freisetzung ($15,8$ und $9,5\%$). Nach der 4. Woche wurde eine signifikant verminderte IL-8 Freisetzung gemessen ($25,4$ und $40,3\%$).

Chronisch entzündete Mucosa zeigte nur nach der 1. Expositionswoche für die hohen Formaldehyd-Konzentrationen (500 und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) eine konzentrationsabhängig signifikant erhöhte IL-8 Freisetzung ($11,19$ und $20,3\%$). Für die nachfolgenden Expositionswochen führte Formaldehyd hier zu einer konzentrationsabhängigen signifikant verminderten IL-8 Freisetzung (2. Woche: $12,4$ und $17,2\%$; 3. Woche: $13,6$ und $50,5\%$; 4. Woche: $39,6$ und $57,6\%$).

Für niedrige Formaldehyd-Expositionen ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) wurde hinsichtlich der IL-8 Freisetzung kein Unterschied zwischen unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa festgestellt. Mittlere und hohe Formaldehyd-Konzentrationen (500 und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) führten zu einer tendenziell, jedoch nicht signifikant höheren IL-8 Freisetzung bei entzündetem Gewebe. (s. Abb. 3.2 A bis C).

3.3.3 Effekte von Formaldehyd auf die IL-4 und g-IFN Freisetzung

Die IL-4 und g-IFN Freisetzung lag für alle Formaldehyd-Expositionen sowie für unauffälliges und entzündetes Gewebe unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden.

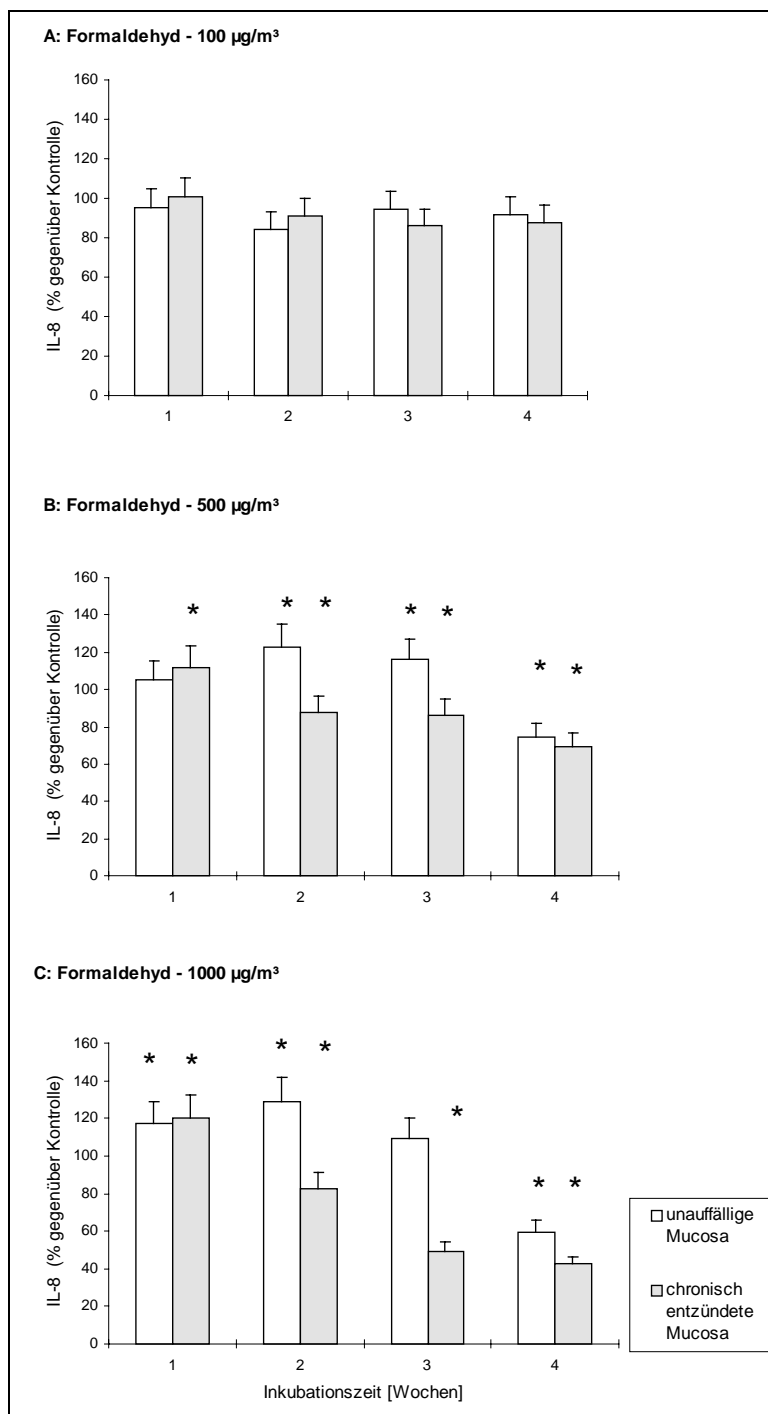


Abb. 3.2: IL-8 Freisetzung unauffälliger und entzündeter Mucosa nach Formaldehyd-Exposition

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber variablen Konzentrationen von Formaldehyd für 1 bis 4 Wochen. Dargestellt ist der Mittelwert der IL-8 Freisetzungswerte von jeweils 10 Patientenproben je Formaldehyd-Konzentration. Berechnet wurde die prozentuale Änderung gegenüber der jeweiligen individuellen Kontrolle nach Exposition mit synthetischer Luft.

*: signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$)

3.3.4 Effekte von Formaldehyd auf die Zytotoxizität

Es konnte keine Formaldehyd-induzierte veränderte Zytotoxizität oder Vitalität gemessen werden (s. Abb. 3.3).

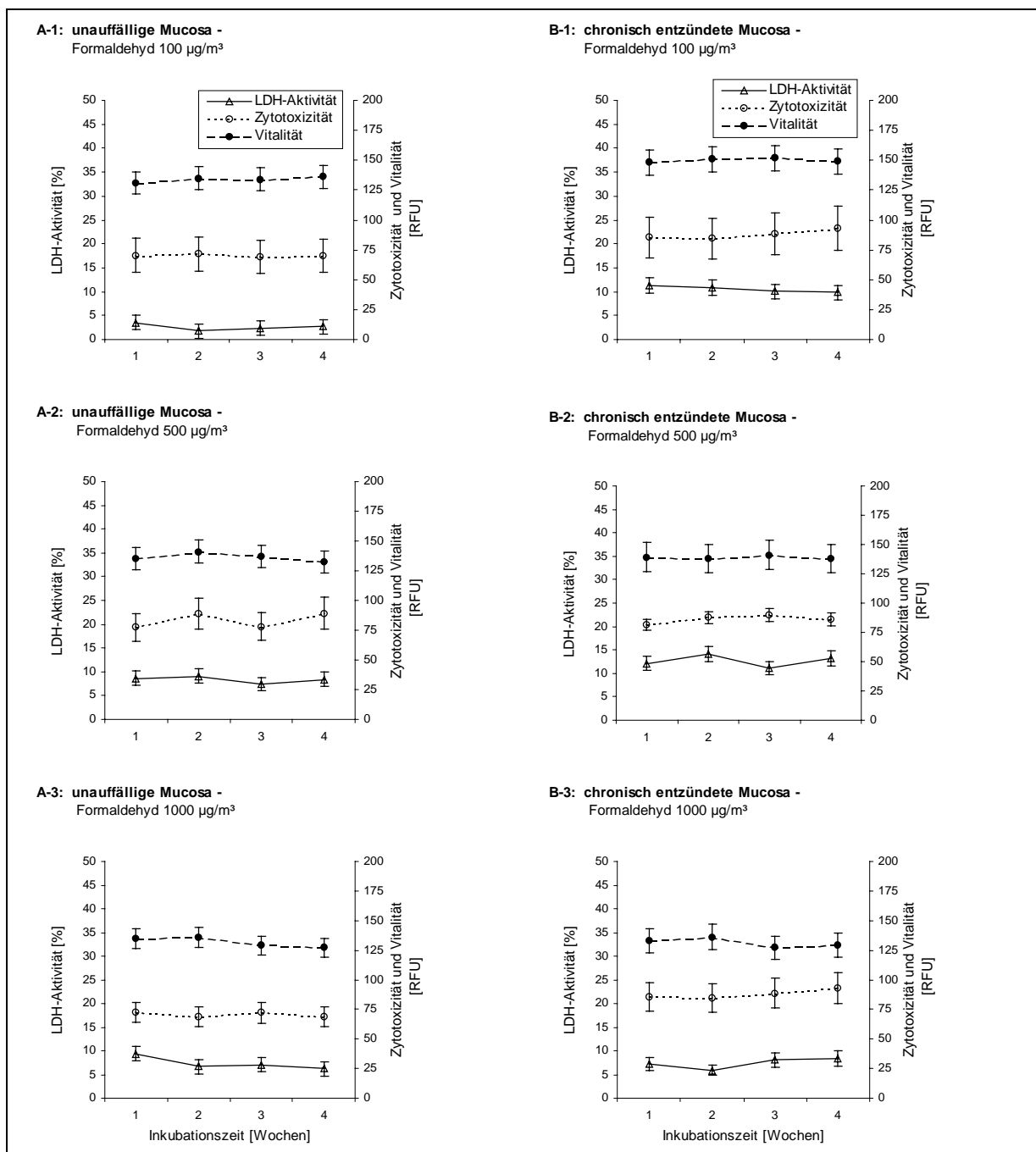


Abb. 3.3: LDH-Aktivität, Zytotoxizität und Vitalität nach Formaldehyd-Exposition

Exposition respiratorischer Epithelzellen unauffälliger und chronisch entzündeter nasaler Mucosa gegenüber synthetischer Luft für 1 bis 4 Wochen. Dargestellt ist der mittlere Wert der LDH-Aktivität und die mittlere Zytotoxizität (prozentuale Anteil gegenüber Maximal-Kontrolle). Probenumfang: je Konzentration und Zeitpunkt: N = 10 Patienten

4 Diskussion

Untersucht wurde die Wirkung von Ozon und Formaldehyd auf kultivierte humane Atemwegsschleimhaut im Verlauf einer vierwöchigen Exposition. Die analysierten Effekte umfaßten die ziliare Schlagfrequenz (CBF), die IL-8 Freisetzung und Vitalität der Zellen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich von unauffälliger und chronisch entzündeter Atemwegsschleimhaut. *Ozon* bewirkte, unabhängig von der gewählten Konzentration, ab der zweiten Expositionswoche eine um ca. 10% leicht verminderte CBF. Gleiches galt für die IL-8 Freisetzung. Die hohen Ozon-Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) führten hier zu einer ca. 40-90%, die niedrige Ozon-Konzentration (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) zu einer ca. 25-40% verminderten IL-8 Freisetzung. Die IL-8 Freisetzung verminderte sich mit zunehmender Expositionsdauer. Gleichzeitig stieg auch die Zytotoxizität. Dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen unauffälliger und chronisch entzündeter Mucosa beobachtet werden. *Formaldehyd* verminderte die CBF konzentrations- und zeitabhängig um ca. 10-50%, zunehmend über den gesamten Expositionszeitraum. Die IL-8 Freisetzung unauffälliger Mucosa war hingegen für die hohen Formaldehyd-Konzentrationen nach der ersten Woche um ca. 5-17% sowie nach der zweiten Woche um 20-28% erhöht und für die nachfolgenden Wochen reduziert (ca. 10-40%). Chronisch entzündete Mucosa wies nur nach der ersten Expositionswoche mit hohen Formaldehyd-Konzentrationen eine um ca. 10-20% erhöhte IL-8 Freisetzung auf. Ab der zweiten Expositionswoche wurde eine um ca. 12-57% verminderte IL-8 Freisetzung gemessen. Insgesamt wies die chronisch entzündete Atemwegsschleimhaut tendenziell eine höhere Sukzeptibilität gegenüber den Schadstoffen auf.

Die *in vitro* Exposition humaner respiratorischer Epithelien an einer Luft/Flüssigkeits-Grenzschicht ist eine etablierte Methode für Schadstoffuntersuchungen (BROMMER 1996 und 1998, KENNEY 1994, KONDO 1991, McKINNON 1992, RIECHELMANN 1994, 1995a, 1995b und 1996, ROBSON 1992, SCHÄFER 1997 und 1998). Jedoch wurde diese Methode bisher nur für kurzzeitige (maximal sechsstündige) Expositionen verwendet. Über die Anwendung dieser Expositionsmethode für längere Zeiträume wurde bisher, mit Ausnahme unserer Vorversuche (SCHÄFER 1997 und 1998), noch nicht berichtet. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten, daß diese Methode auch für subakute Expositionen für eine Zeitraum von bis zu vier Wochen geeignet ist. Sowohl die CBF als auch die Vitalität der kultivierten primären Epithelzellen von unauffälliger und chronisch entzündeter Atemwegsschleimhaut blieben nach vierwöchiger Exposition mit synthetischer Luft unverändert (s. Abb. 1). Auch die linear abnehmende Freisetzung des proinflammatorischen IL-8 wird im Sinne eines sich stabilisierenden *in vitro* Systems interpretiert: Die enzymatische Dissoziation der Epithelzellen kann als sehr starker inflammatorischer Reiz angesehen werden. Hiervon erholen sich die Zellen während der nachfolgenden Kultivierungsperiode kontinuierlich, was als lineare Abnahme der IL-8 Freisetzung gemessen wurde. Daß humane nasale Epithel- und Endothelzellen die mRNA exprimieren und IL-8 auch unter Exposition mit synthetischer Luft freisetzen, wurde vor kurzem gezeigt (CALDERON 1997, GREVERS 1997, KENNEY 1994).

Dennoch ist dieses *in vitro* Expositionsverfahren kritisch hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation zu sehen. Nach *in vivo* Exposition muriner nasaler Epithelien mit Formaldehyd konnte gezeigt werden, daß dieser Schadstoff sehr schnell und effektiv von der

Mucosa abtransportiert wird (PRIHA 1996). Obwohl in der von uns gewählten Versuchsanordnung das Kulturmedium alle zwei bis drei Tage erneuert wurde, handelte es sich im Vergleich zur *in vivo* Situation um ein eher statisches Expositionsmodell. Mögliche Effekte von Schadstoffen nach längerer Exposition könnten hier falsch positive Ergebnisse widerspiegeln, da, im Gegensatz zur *in vivo* Situation, ein stetiger Abtransport des Formaldehyds *in vitro* nicht erfolgen konnte. Hierauf wird bei der Diskussion der einzelnen Schadstoffe noch eingegangen werden. Auch die Übertragbarkeit der zuvor erwähnten tierexperimentellen Ergebnisse ist problematisch, da von Interspezies-Unterschieden berichtet wurde. So konnte gezeigt werden, daß Formaldehyd von murinem nasalem Epithel besser abgebaut wurde, als dies bei Ratten der Fall war (BOLT 1987). Desweiteren gibt es kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der CBF für die unterschiedlichen tierexperimentellen Ansätze (MORGAN 1984, HASTIE 1990, ZWARST 1988, PHALEN 1980), worauf nachfolgend noch ausführlicher eingegangen wird.

Ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Arbeiten zur Ozon- oder Formaldehyd-Exposition ist nicht möglich, da einerseits kürzere Expositionszeiten (meist ein bis sechs Stunden) gewählt wurden und andererseits unterschiedliche Expositionsformen und Spezies bzw. Zelltypen verwendet wurden.

Zur *Ozon-Exposition* der oberen Atemwegsschleimhaut liegen einige Arbeiten vor, die einen eingeschränkten Vergleich mit unseren Experimenten ermöglichen.

Unsere Versuche ergaben, daß Ozon in allen getesteten Konzentrationen (100, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) die CBF in der ersten Expositionswoche nicht beeinflusste, jedoch danach deutlich verminderte (s. Abb. 2.1). Gleiches galt bei der IL-8 Freisetzung insbesondere für die beiden höheren Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), während die niedrige Ozon-Konzentration (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) hier einen schwächeren Einfluß ausübte (s. Abb. 2.2). Zudem wurde mit zunehmender Expositionsdauer eine erhöhte Zytotoxizität gemessen (s. Abb. 2.3).

In den publizierten Arbeiten über den Einfluß von Ozon auf die CBF findet man lediglich Untersuchungen zu kurzzeitigen, maximal fünfstündigen, Expositionen. Dabei handelt es sich, mit Ausnahme der von unserer Arbeitsgruppe kürzlich publizierten Experimente (BROMMER 1994, Schäfer 1998b) fast ausschließlich um tierexperimentelle Ansätze. Die publizierten Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich. Eine Erhöhung der CBF nasaler Epithelzellen wurde für hohe und kurzzeitige Expositionen bei Ratten (1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 4h; PHALEN 1980) und Schafen (2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 2h; ALLEGRA 1991), sowie für kultivierte humane bronchiale Epithelzellen (DEVALIA 1996) gemessen. Andere Untersuchungen konnten keinen Effekt auf die CBF bei Ratten (196 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 3h; GROSE 1980), Schafen (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 2h; ABRAHAM 1986) oder Hasen (SCHLESINGER 1989, 1992) nachweisen. Einen Verlust der Zilien nach Exposition mit 200 bis 800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Ozon wurde bei Epithelzellen der Ratte gesehen (REUZEL 1990). *In vivo* Exposition von Bonnet-Affen (Makaken) mit Ozon (0-300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, bis zu 90 Tagen) führte zu Nekrosen der zilientragenden Zellen, zum Einstrom von Entzündungszellen und zu Läsionen des Nasenepithels (HARKEMA 1987 und 1997). Personen, die umweltbedingt für längere Zeit sehr hohen Konzentrationen von Ozon ausgesetzt waren (ca. 5000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 10h/d), wiesen auch bis zu zwei Wochen nach Expositions-ende erhöhte Schädigungen der nasalen Epithelzellen auf (CALDERON-GARCIDUENAS 1994). Kurzzeitige Expositionen mit mittleren Ozon-Konzentrationen (400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 4h) führten bei gesunden Probanden zu morphologischen Veränderungen, ohne daß es Hinweise auf

Verletzungen des Epithels gab (CARSON 1985). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten keinen Einfluß kurzzeitiger Ozon-Expositionen (10, 100 oder 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; 1 oder 2h) auf die CBF nachweisen (BROMMER 1994, SCHÄFER 1998b).

Hinsichtlich der IL-8 Freisetzung liegen Ergebnisse aus Messungen in humaner nasaler Lavage vor. Niedrige Ozon-Konzentrationen (80 bis 240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) bei kurzen Expositionszeiten (1,5 bis 8h) führten hier grundsätzlich zu einer erhöhten IL-8 Freisetzung (FRAMPTON 1997, HILTERMANN 1997, McBRIDE 1994, STEERENBERG 1996, TORRES 1997). Dabei wurde kein Unterschied der IL-8 Freisetzung zwischen Asthmatikern, Ozon-sensitiven Asthmatikern und gesunden Probanden (McBRIDE 1994) oder Rauchern und Nichtrauchern (FRAMPTON 1997) gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Analyse humaner bronchioalveolare Lavage von Personen berichtet, die vergleichbaren Ozon-Konzentrationen ausgesetzt waren (stellvertretend seien hier BALMES 1996, FRAMPTON 1997, SCANNELL 1996 und TORRES 1997 genannt). Auch nach Exposition humaner Alveolarmakrophagen (100-1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ARSALANE 1995), humaner Atemwegsepithelzelllinien (0-2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, DEVLIN 1994, NORGAUER 1997) oder primärer bronchialer Epithelzellen (0-500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, RUSZNAK 1996) wurde eine erhöhte IL-8 Freisetzung gemessen. Aber auch Ozon-exponierte Alveolarmakrophagen von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern (Sarkoidose, Fibrose, Bronchitis) wiesen keinen Unterschied hinsichtlich der IL-8 Freisetzung auf (MULEY 1997).

Die von uns gemessene erhöhte Zytotoxizität ab der zweiten Expositionswoche bei höheren Ozon-Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) steht in Übereinstimmung mit den stark membranschädigenden Eigenschaften des Ozons durch Oxidation ungesättigter Fettsäuren (NEUMÜLLER 1981b). Auch die ausbleibende Reaktion bei Funktion und metabolischer Aktivität, d.h. kein Einfluß auf die CBF oder IL-8 Freisetzung nach einwöchiger Exposition, wird durch andere Untersuchungen - keine morphologischen Veränderungen der Schleimhaut - an Menschen (CARSON 1985) und Tieren (PINKETRON 1993) untermauert.

Unsere Untersuchungen können somit als Bestätigung der festgelegten Richt- und Grenzwerte für Ozon (s. Tab. 1) interpretiert werden, soweit die hier diskutierte Aussagekraft der von uns gewählten Versuchsbedingungen und Meßparameter Berücksichtigung findet. Dies gilt zum einen für den Luftqualitätswert der WHO von 100-120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (BAUER 1997) oder den Immissionsgrenzwert von 110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ als Schwellenwert für den Gesundheitsschutz der Bevölkerung (BAUER 1997) in den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft. Auch findet die Festlegung des höheren Schwellenwertes von 360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (BAUER 1997) für die Auslösung der Warnsysteme in unseren Untersuchungen insoweit ein Korrelat, als daß wir für höhere Konzentrationen (500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) eine verminderte CBF (ca. 20-40%) sowie eine erhöhte Zytotoxizität gemessen haben. Das erste Ergebnis spricht für eine potentielle Schädigung des mukoziliaren Transportsystems und damit für eine Beeinträchtigung der primären Barriere des humanen respiratorischen Epithels bei länger andauernder Exposition mit Ozon. Das zweite Ergebnis gibt einen Hinweis auf einen möglichen zugrundeliegenden zellulären Mechanismus: nämlich den der bereits erörterten oxidativen Schädigung zellulärer Membranen. Unsere Ergebnisse stehen auch in Übereinstimmung mit Untersuchungen, die zeigten, daß erhöhte Ozon-Konzentrationen der Umgebungsluft zu vermehrten DNA-Schädigungen insbesondere bei Kindern führten (CALDERON-GARCIDUENAS 1996 und 1997). Exposition von Ratten mit hohen Ozon-Konzentrationen (1600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 7 Tage) führte zu vorübergehend erhöhter DNA-Replikation im Übergangsepithel der Nase (JOHNSON

1990). Zudem wurde gezeigt, daß höhere Ozon-Konzentrationen ($1200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 2h) eine Hyperreagibilität des humanen Bronchialsystems verursachen (HOLTZMANN 1979, LEBOWITZ 1985). Andererseits wurde auch berichtet, daß etwa zwei Wochen nach Expositionsende eine Erholung des nasalen Epithels einsetzt (CALDERON-GARCIDUENAS 1994). Dies wiederum sind dynamische Prozesse, die in der von uns gewählten statischen Versuchsanordnung (Austausch des Zellkulturmediums nur alle zwei bis drei Tage, keine Erneuerung der Epithelzellen durch Reifung von Basalzellen, keine Unterstützung durch endogene Wachstumsfaktoren oder Antioxidantien durch die Submucosa) nicht untersucht werden konnten, weshalb das hohe Maß an Zytotoxizität nicht überbewertet werden sollte.

Die hier vorgestellten Versuche zur *Formaldehyd-Exposition* zeigten eine Verminderung der CBF von der ersten bis zur vierten Expositionswoche. Die IL-8 Freisetzung wurde durch Formaldehyd nach der ersten Woche erhöht und von der zweiten bis zur vierten Woche vermindert. Eine mögliche Erklärung dieser verminderten IL-8 Freisetzung könnte sein, daß Formaldehyd mit zunehmender Expositionszeit eine Vernetzung zellulärer Proteine verursacht, wodurch es zu einer verminderten IL-8 Freisetzung im Zellkulturüberstand kommt. Formaldehyd beeinflusste in der von uns gewählten Versuchsanordnung die Vitalität der kultivierten respiratorischen Epithelzellen nicht nachteilig.

Wie von unserer Arbeitsgruppe vor kurzem für die kurzzeitige Exposition humaner nasaler respiratorischer Epithelzellen mit Formaldehyd ($100, 500, 5000 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 1 oder 2h) berichtet wurde, führte nur die höchste Formaldehyd-Konzentration bei der längsten Expositionszeit zu einer Verminderung der CBF (BROMMER 1994, SCHÄFER 1998b). Bei Tracheaexplantaten vom Hasen und Hausschwein verminderte Formaldehyd auch hier konzentrationsabhängig die CBF bei gleichzeitiger Koordinationsstörung des gerichteten Zilienschlages (HASTIE 1990). Untersuchungen am Gaumenapparat des Frosches zeigten, daß nach Formaldehyd-Exposition anfänglich eine erhöhte CBF gemessen wurde, jedoch später bei höheren Konzentrationen eine Hemmung der CBF auftrat (MORGAN 1984). Untersuchungen zum Einfluß auf die Clearance der humanen nasalen Mucosa stellten ebenfalls einen hemmenden Einfluß fest (HOLMSTROM 1988). Längere Expositionen von Ratten mit Formaldehyd (ca. 300 bis $3700 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 6h/d, 5d/w, 13 w) verursachten bei der hohen Konzentration eine Schädigung des Epithels (EDLING 1988, ZWART 1988). In einem anderen Versuch langzeitiger Formaldehyd-Expositionen von Ratten wurde zudem ein Verlust zilienträger Zellen beobachtet (REUZEL 1990). Hinsichtlich des Einflusses von Formaldehyd auf die IL-8 Freisetzung konnten noch keine Publikationen gefunden werden.

Die für Formaldehyd festgelegten höheren Schwellenwerte (MAK-Wert, Reizung der Atemwege, s. Tab. 1) werden insoweit durch die hier vorgestellten Versuche bestätigt, als daß mit zunehmender Expositionsdauer die ziliäre Aktivität abnimmt und damit die Funktion der respiratorischen Epithelien beeinträchtigt wird. Auch steht die anfänglich erhöhte IL-8 Freisetzung in Übereinstimmung mit dem Modell, daß IL-8 als proinflammatorischer Marker die Induktion einer Entzündungsantwort anzeigt. Dennoch sind die längerfristigen Expositionen mit Formaldehyd in dem von uns gewählten Modell kritisch zu bewerten, da Formaldehyd sich *in vitro* im Kultursystem anreichern kann. *In vivo* hingegen wird Formaldehyd, wie bereits zuvor ausgeführt, sehr zügig und effektiv von der mucosalen Epithelschicht entfernt wird. Dieser Prozeß konnte in dem von uns gewählten Expositionsmodell nicht gewährleistet werden. Daher erscheint dieses Modell der

Langzeitexposition respiratorischer Zellen für Stoffe mit solchen komplexen biologischen Eigenschaften nur bedingt geeignet, da es hier mit höherer Wahrscheinlichkeit falsch positive Ergebnisse liefert und solchen Stoffen zu starke biologische Aktivitäten zuordnet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das von uns verwendete *in vitro* Expositionsmodell realitätsnahe Ergebnisse für ein- bis zweiwöchige Expositionszeiten liefern kann, obwohl die Funktion respiratorischer Zellen - gemessen als CBF - durchaus bis zu vier Wochen verfolgt werden kann. Effekte nach längeren Expositionszeiten sind kritisch zu bewerten, da der *in vivo* stattfindende Abtransport von Schadstoffen bei diesem *in vitro* Modell nicht mitberücksichtigt werden konnte.

Hinsichtlich der Effekte ergab sich für Ozon nach einwöchiger Dauereexposition kein Hinweis auf eine Funktionsstörung der respiratorischen Epithelzellen. Jedoch zeigten sich nach zwei- bis vierwöchiger Exposition mit mittleren und hohen Ozon-Konzentrationen zellschädigende Wirkungen. Formaldehyd wirkte hemmend auf diese zelluläre Funktion, zeigte jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit. Während Formaldehyd anfänglich eine Entzündungsantwort in Form einer erhöhten Freisetzung des proinflammatorischen Interleukin-8 induzierte, konnte dies für Ozon-Expositionen nicht gemessen werden.

Obwohl das verwendete Expositionsmodell mit den oben beschriebenen Einschränkungen behaftet ist, kann festgehalten werden, daß die beiden Luftschadstoffe, Ozon und Formaldehyd, die Funktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unterschiedlich beeinflussen. Eine generell signifikant unterschiedliche Reaktion von chronisch entzündeter und unauffälliger Atemwegsschleimhaut konnte nicht gemessen werden, jedoch zeichnete sich eine tendenziell höhere Sukzeptibilität der chronisch entzündeten Atemwegsschleimhaut ab. Dies steht in Einklang mit anderen Beobachtungen nach Formaldehyd-Exposition, wonach z.B. Kinder zu erhöhten Irritationen neigen (KOLTAI 1994) und Explantate nasaler Biopsien von Atopikern eine erhöhte IL-8 Freisetzung zeigen, oder sensitive Personen auf Ozon stärker reagieren als insensitive (CALDERON 1997, SCANNELL 1996). Bedeutsam ist weiterhin eine Untersuchung an nasalen Epithelzellen der Ratte nach Exposition mit verschiedenen Gemischen aus Ozon und Formaldehyd (CASSEE 1994, REUZEL 1990). Diese histopathologischen Untersuchungen ergaben unterschiedliche Schädigungen der Epithelien je nach gewählter Schadstoffkombination, wobei die Schädigungen sich von denen, die durch die Einzelschadstoffe verursacht wurden, unterschieden. Zukünftige Projekte sollten daher kombinierte Schadstoffgemische als Untersuchungsschwerpunkt haben, um dadurch das Schädigungspotential umweltrelevanter Gemische auf die Funktion und Zytokinfreisetzung humaner Atemwegsschleimhaut mit Hilfe von *in vitro* Verfahren abschätzen zu können.

5 Literaturnachweise

1. Abraham WM, Sielczakkk MW, Delehunt JC, Marchette B, Wanner A (1986):
Impairment of tracheal mucociliary clearance but not ciliary beat frequency by a combination of low level ozone and sulfur dioxide in sheep.
Eur J Respir Dis **68**: 114-120.
2. Allegra L, Moavero NE, Rampoldi C (1991):
Ozone-induced impairment of mucociliary transport and its prevention with n-acetylcysteine.
Am J Med **91**: 67-71.
3. Arsalane K, Gosset P, Vanhee D, Voisin C, Hamid Q, Tonnel AB, Wallaert B (1995):
Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro.
Am J Respir Cell Moll Biol **13**: 60-68.
4. Bachert C & Ganzer U (1993):
Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine bei der Rekrutierung von Entzündungszellen an der Nase.
Laryngo-Rhino-Otologie, **72**, 585-589.
5. Baggiolini M & Clark-Lewis I (1992):
Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.
FEBS Lett **307**, 97-101.
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994):
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines.
Adv. Immunol **55**, 97-179.
7. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997):
Human chemokines: an update.
Annu Rev Immunol **15**: 657-705.
8. Bahadir M, Parlar H, Spiteller M (1995):
Springer Umweltlexikon.
Springer-Verlag, Berlin, S. 399.
9. Balmes JR, Aris RM, Chen LL, Scannell C, Tager I, Finkbeiner W, Christian D, Kelly T, Hearne PQ, Ferrando R, Welch B (1996a):
Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part I: Airway inflammation and responsiveness to ozone in normal and asthmatics.
Res Rep Health Eff Inst Jun (78): 1-37; 81-99.
10. Balmes JR, Chen LL, Scannell C, Tager I, Christian D, Hearne PQ, Kelly T, Aris RM. (1996b):
Ozone-induced decrements in FEV1 and FVC do not correlate with measures of inflammation.
Am J Respir Crit Care Med **153**: 904-909.
11. Balmes JR, Chen LL, Scannell C, Tager I, Christian D, Hearne PQ, Kelly T, Aris RM. (1996):
Ozone-induced decrements in FEV1 and FVC do not correlate with measures of inflammation.
Am J Respir Crit Care Med **153**: 904-909.

12. Braun RK, Franchini M, Erard F, Rihs S, DeVries IJ, Blaser K, Hansel TT, Walker C (1993):
Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore.
Eur J Immunol **23**: 956-960.
13. Brauer H (1997):
Handbuch des Umweltschutzes und der Umweltschutztechnik, Band 1: Emissionen und ihre Wirkungen.
Springer Verlag, Berlin, S. 115, 174-181.
14. Brommer C, Riechelmann H, Mann WJ (1996):
Schädigung des mukoziliaren Transportes der oberen Atemwege durch Umweltchemikalien:
Entwicklung eines in vitro-Testmodells.
Aschlußbericht Projekt Umwelt und Gesundheit PUG L 94002, Forschungszentrum Karlsruhe.
15. Calderon MA, Devalia JL, Prior AJ, Sapsford RJ, Davies RJ (1997):
A comparison of cytokine release from epithelia cells cultured from nasal biopsy specimens of atopic patients with and without rhinitis and nonatopic subjects without rhinitis.
J Allergy Clin Immunol **99**: 65-76.
16. Calderon-Garciduenas L, Rodriguez Alcaraz A, Garcia R, Sanchez G Barragan G, Camacho R, Ramirez L (1994):
human nasal mucosal changes after exposure to urban pollution.
Environ Health Perspect **102**: 1074-1080.
17. Calderon-Garciduenas L, Osnaya-Brizuela N, Ramirez-Martinez L, Villarreal-Calderon A (1996):
DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution.
Environ Health Perspect **104**: 160-168.
18. Calderon-Garciduenas L, Osnaya N, Rodriguez Alcaraz A, Villarreal-Calderon A (1997):
DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution.
Environ Mol Mutagen **30**: 11-20.
19. Carson JL, Collier AM, Henshaw NG, Smith CA, Hu S (1985):
Response of human ciliated respiratory epithelium to brief in vivo ozone exposure: an ultrastructural study.
Env. Res. **37**: 212-227.
20. Cassee FR & Feron VJ (1994):
Biochemical and histopathological changes in nasal epithelium of rats after 3.day intermittent exposure to formaldehyde and ozone alone or in combination.
Toxicol Lett **72**: 257-268.
21. Colbeck I (1988):
Photochemical ozone pollution in Britain.
Sci Prog Oxf **72**: 207 - 226.

22. Collins JJ, Acquavella JF, Esmen NA (1997):
An update meta-analysis of formaldehyde exposure and upper respiratory tract cancers.
J Occup Environ Med **39**: 639-651.

23. Deitmer T (1989):
Physiology and pathology of the mucociliary system. Special regards to mucociliary transport in malignant lesions of the human larynx.
Adv. Otolaryngol **43**: 1-136
24. Devalia JL, Rusznak C, Abdelaziz MM, Davies RJ (1996):
Nedocromil sodium and airway inflammation in vivo and in vitro.
J Allergy Clin Immunol **98**: S51-S55; S64-S66.
25. Devlin RB, McKinnon KP, Noah, T, Becker S, Koren HS (1994):
Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells.
Am J Physiol **266**: L612-L619.
26. DFG (1995):
Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed): MAK- und BAT-Werte-Liste 1995.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
27. Diem H & Hilt A (1978):
Formaldehyd.
In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie. Verlag Chemie, Weinheim, S. 687-702
28. Durham SR, Yin S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IA, Kay AB, Hamid QA (1992):
Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia.
J Immunol, **148**, 2390-2394.
29. Edling C, Hellquist H, Odkvist L (1988):
Occupational exposure to formaldehyde and histopathological changes in the nasal mucosa.
Br J Ind Med **45**: 761-765.
30. Falk J, Juto J, Stridh G, Bylin G (1994):
Dose-response study of formaldehyde on nasal mucosa swelling - a study on residents with nasal distress at home.
Am J Rhinol, **8**: 143-1446.
31. Foster WM, Costa DL, Langenback EG (1987):
Ozone exposure alters tracheobronchial mucociliary function in humans.
J Appl Physiol **63**: 996-1002.
32. Frampton MW, Balmes JR, Cox C, Krein PM, Speers DM, Tsai Y, Utell MJ (1997a):
Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part III: Mediators of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid from nonsmokers, smokers, and asthmatic subjects exposed to ozone: a collaborative study.
Res Rep Health Eff Inst **Jun (78)**: 73-79; 81-99.

33. Frampton MW, Morrow PE, Torres A, Voter KZ, Whitin JC, Cox C, Tsai Y, Utell MJ (1997b): Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part II: Airway inflammation and responsiveness to ozone in nonsmokers and smokers. *Res Rep Health Eff Inst Jun (78)*: 39-72; 81-99.
34. French JG, Lowrimore G, Nelson WC, Finklea JF, English T, Hertz M (1973): The effect of sulfur dioxide and suspended sulfates on acute respiratory disease. *Arch Environ Health 27*: 129-131.
35. Gerrity TR, Bennett WD, Kehrl H, DeWitt PJ (1993): Mucociliary clearance of inhaled particles measured at 2h after ozone exposure in humans. *J Appl Physiol, 74*: 2984-2989.
36. Grevers G & Sturm C (1997): Significance of vascular endothelium for specific functional behavior of nasale mucosa. *Laryngorhinootologie 76*: 398-404.
37. Grose E, Gardner DE, Miller FJ (1980): Response of ciliated epithelium to ozone and sulfuric acid. *Env Res 22*: 377-385.
38. Harkema JR, Plopper CG, Hyde DM, St.-George JA, Wilson DW, Dungworth (1987): Response of macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone. A morphologic and morphometric study of the transitional and respiratory epithelium. *A J Pathol 128*: 29-44.
39. Harkema JR, Barr EB, Hotchkiss JA (1997): Responses of rat nasal epithelium to short- and long-term exposures of ozone: image analysis of epithelial injury, adaptation and repair. *Microsc Res Tech 36*: 276-286.
40. Hastie AT, Patrick H, Fish JE (1990): Inhibition and recovery of mammalian respiratory ciliary function after formaldehyd exposure. *Toxicol Appl Pharmacol 102*: 282-291.
41. Hiltermann TJ, de Bruijne CR, Stolk J, Zwinderman AH, Spijksma FT, Roemer W, Steerenberg PA, Fischer PH, van Bree L, Hiemstra PS (1997): Effects of photochemical air pollution and allergen exposure on upper respiratory tract inflammation in asthmatics. *Am J Respr Crit Care Med 156*: 1765-1772.
42. Hee J & Guilerm R (1977): La fonction muco-ciliaire et ese modifications sous linfluence de certaine aggressions. *Bull Eur Physiopathol Respir 13*: 11-25.
43. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI (1991): Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science 253*: 1278-1280.

44. Holmstrom M & Wilhelmsson B (1988):
Respiratory symptoms and pathophysiological effects of occupational exposure to formaldehyde and wood dust.
Scand J Work Environ Health **14**: 306-311.
45. Holtzmann MJ, Cunningham JH, Sheller JR, Irsigler BG, Nadel JA, Boushey HA (1979):
Effect of ozone on bronchial reactivity in atopic and nonatopic subjects.
Am Rev Respir Dis **120**: 1059-1067.
46. Hu DE, Hori Y, Fan TP (1993):
Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats.
Inflammation **17**: 135-143.
47. Ibelgaufts H (1996a):
Handbook of Cytokines.
VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2. Auflage, S: 411-414.
48. Ibelgaufts H (1996b):
Handbook of Cytokines.
VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2. Auflage, S: 351-355.
49. Ibelgaufts H (1996c):
Handbook of Cytokines.
VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 2. Auflage, 394-398.
50. Jeannin P, Delneste Y, Gosset P, Molet S, Lassalle P, Hamid Q, Tsiocopoulos A, Tonnel AB (1994):
Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells.
Blood **84**: 2229-223.
51. Jorissen M & Cassiman JJ (1991):
Relevance of ciliary ultrastructure in primary and secondary ciliary dyskinesia.
Am J Rhinol **5**: 91-101.
52. Jörres R, Nowak D, Magnussen H (1994):
Die Wirkung der Einatmung von Ozon auf die allergische Reaktion des Bronchialsystems. In:
Horsch F. et al. (Hrsg.). 1. u. 2. Statuskolloquium des PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit),
Kernforschungszentrum Karlsruhe.
KfK-PUG **4**: 37-47, sowie **9**: 97-107.
53. Johnson NF, Hotchkiss JA, Harkema JR, Henderson RF (1990):
Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone.
Tox Appl Pharm, **103**: 143-155.
54. Kenney JS, Baker C, Welch MR, Altman LC (1994):
Synthesis of interleukin-1 alpha, interleukin-6, and interleukin-8 by cultured human nasal epithelial cells.
J Allergy Clin Immun, **93**, 1060-1067.

55. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Karlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM (1992):
Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.
Science 258: 1798-1801.
56. Koltai PJ (1994):
Effects of air pollution on upper respiratory tract of children.
Otolaryngol Head Neck Surg, **111**: 9-11.
57. Kondo M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH (1991):
Simple technique for culture of highly differentiated cells from dog tracheal epithelium.
Am J Physiol, **261**, L106-L117.
58. Koren HS, Graham DE, Devlin RB (1992):
Exposure of humans to a volatile organic mixture. III Inflammatory response.
Arch Environ Health **47**: 39-44.
59. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquett CH, Wallaert B, Tonnel AB (1998):
Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus.
Am J Respir Crit Care Med **157**: 394-402.
60. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI (1992):
Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors.
J Biol Chem, **167**: 16283- 16287.
61. Lebowitz MD, Holberg CJ, Boyer B, Hayes C (1985):
Respiratory symptoms and peak flow associated with indoor and outdoor air pollutants in the southwest.
JAPAC **35**: 1154-1158.
62. Lippmann M (1989):
Effects of ozone on respiratory function and structure.
Annu Rev Public Health **10**: 49-67.
63. Lloyd A, Modi W, Sprenger H, Cevario S, Oppenheim J, Kelvin D (1993):
Assignment of genes for interleukin-8 receptors (IL(R) A and B to human chromosom band 2q35.
Cytogenet Cell Genet **63**: 238-240.
64. Mackay CR (1997):
Chemokines: what chemokine is that?
Curr Biol **7**: R384.
65. Magnussen H, Jorre R, von Niedling G, Wagner HM (1989):
Allergische Atemwegserkrankungen und Umweltschadstoffe: Vergleich der Atemwegsreaktionen nach Einatmung von Schwefeldioxid und Histamin bei Patienten mit Asthma bronchiale.
Allergologie **12**: 109-111.
66. McBirde DE, Koenig JQ, Luchtel DL, Williams PV, henderson WR (1994):
Inflammation effects of ozone on the upper airways of subjects with asthma.
Am J Respir Crit Care Med **149**: 1192-1197.

67. McManus MS, Koenig JQ, Altman LC, Pierson WE (1989): Pulmonary effects of sulfur dioxide exposure and ipratropium bromide pretreatment in adults with nonallergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **83**:619-26.
68. McKinnon K, Noah T, Madden M, Koren H, Devlin R (1992): Cultured human bronchial epithelial cells release cytokines, fibronectin, and lipids in response to ozone exposure. *Chest*, **101**, 22S.
69. Miller MD & KRANGEL MS 1892): Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* **12**: 17-47.
70. Morgan KT, Patterson DL, Gross EA (1984): Frog palate mucociliary apparatus: structure, function, and response to formaldehyde gas. *Fundm Appl Toxicol* **4**: 58-68.
71. Morrison RT & Boyd RN (1984): Lehrbuch der organischen Chemie. Kapitel 19: Aldehyde und Ketone. Verlag Chemie, Weinheim, S. 675-712.
72. Muley T, Segräfe P, Wiebel M, Schulz V, Ebert W (1997) Wirkung von Ozon auf die in vitro-Bildung und -Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren durch Alveolarmakrophagen bei Patienten mit chronisch bronchopulmonalen Entzündungen. In: F. Horsch et al. (Hrsg.).- 6. Statuskolloquium des PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit), Forschungszentrum Karlsruhe. *FZKA-PUG* **27**: 19-31.
73. Neumüller OA (1981a): Römpps Chemie-Lexikon. Formaldehyd. Franckh'sche Vlg., Stuttgart, 1981, S. 1653-1355.
74. Neumüller OA (1981b): Römpps Chemie-Lexikon. Ozon. Franckh'sche Vlg., Stuttgart, 1981, S. 2963-2965.
75. Norgauer J & Kownatzki E (1997): Ozonbegasung der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B steigert die mRNA-Expression und Proteinsynthese von Chemokinen und reduziert die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung von Metalloproteinase-Inhibitoren. In: F. Horsch et al. (Hrsg.).- 6. Statuskolloquium des PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit), Forschungszentrum Karlsruhe. *FZKA-PUG* **27**: 33-48.
76. Okamoto Y, Shirotori K, Kudo K, Ishikawa K, Ito E, Togawa K, Saito I (1993): Cytokine expression after the topical administration of substance P to human nasal mucosa. The role of substance P in nasal allergy. *J Immunol*, **151**, 4391-4398.

77. Pazdrak K, Gorski P, Krakowiak A, Ruta (1993):
Changes in nasal lavage fluid due to formaldehyde inhalation.
Int Arch Occupl Environ Health **64**: 515-519.
78. Pesch B, Schlipköther HW, Wichmann HE (1993):
Organische Verbindungen/Formaldehyd VI-4.
In: Wichmann, Schlipköther, Fülgraff: *Handbuch Umweltmedizin* (Hrsg.). Ecomed Vlg.,
Landsberg/Lech, 6/93, 1. Erg. Lfg., S. 1-19.
79. Phalen RF, Kenoyer JL, Crocker TT, McClure TR (1980):
Effects sulfate fluid aerosols in combination with ozone on elimination of tracer particles inhaled
by rats.
J Toxicol Environ Health **6**: 797-810.
80. Pinkerton KE Dodge DE, Cederdahl-Demmler J (1993):
Differentiated bronchiolar epithelium in alveolar ducts of rats exposed to ozone for 20 month.
Am J Pathology **142**: 947-955.
81. Priha , iesivuori J, Santa H, Laatikainen R (1996):
Reactions of hydrated formaldehyde in nasal mucus.
Chemosphere **32**: 1077-1082.
82. Procter DF (1982):
The mucociliary system. In: Procter DF & Andersen I: *The nose: Upper airway physiology and
the atmospheric environment*, Elsevier, Amsterdam.
83. Reuzel PG, Wilmer JW, Woutersen RA, Zwart A, Rombout PJ, Feron VJ (1990):
Interactive effects of ozone and formaldehyde an nasal respiratory lining epithelium in rats.
J Toxicol Environ Health **29**: 279-292.
84. Riechelmann H, Kienast K, Schellenberg J, Mann WJ (1994):
An in vitro model to study effects of airborne pollutants on human ciliary activity.
Rhinology **32**: 105-108.
85. Riechelmann H, Maurer J, Kienast K, Hafner B, Mann WJ (1995a):
Respiratory epithelium exposed to sufur dioxide- functional and ultrastructural alterations.
Laryngoscope **105**: 295-299.
86. Riechelmann H, Brommer C, Mann WJ (1995b):
Schädigung des mukoziliaren Transportes der oberen Atemwege durch Umweltchemikalien:
Entwicklung eines in vitro-Testmodells. In: F. Horsch et al. (Hrsg.)- 4. Statuskolloquium des
PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit), Forschungszentrum Karlsruhe.
FZKA-PUG 17: 1-10.
87. Riechelmann H, Brommer C, Mann WJ (1996):
Schädigung des mukoziliaren Transportes der oberen Atemwege durch Umweltchemikalien:
Entwicklung eines in vitro-Testmodells. In: F. Horsch et al. (Hrsg.)- 5. Statuskolloquium des
PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit), Forschungszentrum Karlsruhe.
FZKA-PUG 22: 1-10.

88. Robson AM, Smallman LA, Drake Lee AB (1992):
Factors affecting ciliary function in vitro: a preliminary study.
Clin Otolaryngol **17**: 125-129.

89. Rusznak C, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ (1996):
Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium.
Eur Respir J **9**: 2298-2305.
90. Saruda A, Schulte P, Boeniger M, Hayes RB, Livingston GK, Steenland K, Stewart P, Herrick R, Douthit D, Fingerhut MA (1993):
Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, **2**: 453-460.
91. Saito S, Kasakura T, Sakahura S, Enomoto M, Umselage H, Harada N, Morii T, Nishikawa K, Narita N, Ichijo M (1994):
Interleukin-8 production by CD16-CD56 bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua.
Biochem Biophys Res Commun **200**: 378-383.
92. Scannell C, Chen L, Aris RM, Tager I, Christian D, Ferrando R, Welch B, Kelly T, Balmes JR (1996):
Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma.
Am J Respir Crit Care Med **154**: 24-29.
93. Schadendorf D, Moller A, Agermissen B, Worm M, Sticherling M, Czanetzi BM (1993):
IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor.
J Immunol **151**: 2667-2668.
94. Schall TJ (1994):
Chemokines.
In: *The Cytokine Handbook*, 2nd ed. Thomson A, editor, Academic Press, New York, p. 418-260.
95. Schäfer D, Brommer C, Klimek L, Mann W (1997):
Evaluation subakuter Effekte von Ozon und Formaldehyd auf Funktion und Zytokinfreisetzung kultivierter humaner Atemwegsschleimhaut. In: F. Horsch et al. 6. Statuskolloquium des PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit), Forschungszentrum Karlsruhe.
FZKA-PUG **27**: 73-84.
96. Schäfer D, Brommer C, Klimek L, Mann W (1998):
Evaluation subakuter Effekte von Ozon und Formaldehyd auf Funktion und Zytokinfreisetzung kultivierter humaner Atemwegsschleimhaut. In: F. Horsch et al. 7. Statuskolloquium des PUG (Projekt Umwelt und Gesundheit), Forschungszentrum Karlsruhe.
97. Schäfer D, Brommer C, Riechelmann H, Mann JW (1998b):
In vivo and in vitro effect of ozone and formaldehyde on human nasal mucociliary transport system.
Rhinology (submitted).
98. Schlesinger RB, Gorczynski JE, Dennison J, Richards L, Kinney PL, Bosland MC (1992):
Long-term intermittent exposure to sulfuric acid aerosol, ozone, and their combination: alterations in tracheobronchial mucociliary clearance and epithelial secretory cells.
Exp. Lung Res **18**: 505-534.

99. Steerenberg PA, Fischer PH, Gmelig-Meyling F, Willighagen J, Geerse E, van de Vliet H, Ameling C, Boink AB, Dormans JA, van Bree L, Van-Lovren H (1996):
Nasal lavage as tool for health effect assessment of photochemical air pollution.
Hum Exp Toxicol **15**: 111-119.
100. Toremalm NG (1985):
Aerodynamics and mucociliary function of upper airways.
Eur J Respir Dis **139**: 54-56.
101. Torres A, Utell MJ, Morow PE, Voter KZ, Whitin, Cox C, Looney RJ, Speers DM, Tsai Y, Frampton MW (1997):
Airway inflammation in smokers and nonsmokers with varying responsiveness to ozone.
Am J Respir Crit Care Med **156**: 728-736.
102. Wagner HM (1994):
Anorganische Gase/Ozon.
In: *Handbuch für Umweltmedizin*, Wichmann, Schlipkötter, Fülgraff, Ecomed
Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech, 1/94, 3. Erg. Lfg., 1-32
103. Wakabayashi M, Bang BG, Bang FB (1977):
Mucociliary transport in chickens infected with newcastle disease virus and exposed to sulfur dioxide.
Arch Envir Health, 32:101-108.
104. Wiezorek C (1996):
Schadstoffe im Alltag.
Thieme Verlag, Stuttgart, S. 70-71.
105. Xaubet A, Mullol J, Lopez E, Roca-Ferrer J, Rozman M, Carrion T, Fabra JM, Picado C (1994):
Comparism of the role of nasal polyp and normal nasal mucosal epithelial cells on in vitro eosinophil survival. Mediation by GM-CSF and inhibition by dexamethasone.
Clin Exp Allergy, **24**, 307-317.
106. Xing Z, Jordana M, Braciak T, Ohtoshi T, Gauldie J (1993):
Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung, fibroblasts: evidence for heterogeneity within the respiratory tract.
Am J Resp Cell Mol Biol, 9, 255-263.
107. Zwarst A, Woutersen RA, Wilmer JW, Spit BJ, Feron VJ (1988):
Cytotoxic and adaptative effects in rat nasal epithelium after 3-day and 13-week exposure to low concentrations of formaldehyde vapour.
Toxicology 51: 87-99.

6 Danksagung

Wir danken an dieser Stelle Herrn Dr. Bittinger für seine kompetente Unterstützung bei der Durchführung und Bewertung der immunhistologischen Färbungen. Besonderen Dank schulden wir Frau B. Mros, die mit ihrem labortechnische Fachwissen zum Gelingen dieses Forschungsvorhabens beitrug. Ausdrücklich bedanken wir uns bei der Stiftung Tumorforschung Kopf-Hals (Wiesbaden) für die finanzielle Unterstützung bei der Anschaffung des Fluorometers.

Schließlich gilt unser besonderer Dank dem Land Baden-Württemberg und seinem Vertreter als Projekträger, dem Forschungszentrum Karlsruhe, durch dessen finanzielle Unterstützung während der vergangenen zwei Jahre dieses Projekt erst ermöglicht wurde.