

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Zytokinexpressionsmuster und Genexpressionsanalyse der humanen Nasenschleimhaut nach Exposition mit Innenraumstäuben

H. Riechelmann¹⁾, T. Deutsche¹⁾, B. Heinzow²⁾, W. Butte³⁾

¹⁾ Universitäts-HNO-Klinik Ulm

²⁾ Landesamt für Gesundheit und Arbeitssicherheit Schleswig-Holstein

³⁾ Universität Oldenburg, Fachbereich Chemie

Förderkennzeichen: BWW 22010

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des
Landes Baden-Württemberg gefördert

Januar 2005

Zytokinexpressionsmuster und Genexpressionsanalyse der humanen Nasenschleimhaut nach Exposition mit Innenraumstäuben

(Abschlussbericht zu BWW 22010; 1.10.2002 bis 30.11.2004)

H. Riechelmann¹⁾, T. Deutsche¹⁾, B. Heinzow²⁾, W. Butte³⁾

¹⁾ Universitäts-HNO-Klinik Ulm

²⁾ Landesamt für Gesundheit und Arbeitssicherheit Schleswig-Holstein

³⁾ Universität Oldenburg, Fachbereich Chemie

Zusammenfassung

Die Wirkung einer dreistündigen Exposition mit Innenraumstäuben auf die Nasenschleimhaut von 16 Hausstaubmilbenallergikern und 16 Normalprobanden wurde untersucht und mit einer Kontrollexposition mit Reinluft verglichen. Bei der Hälfte der Probanden wurde der Innenraumstaub mit Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) dotiert. Aus einer Nasenschleimhautbiopsie wurde die RNA extrahiert und expositionsbezogene Veränderungen der Gentranskription untersucht. Zusätzlich wurden im Nasensekret unterschiedliche Zytokine und Zellaktivierungsmarker gemessen.

Auf Transkriptionsebene wurden in erster Linie Gene für Bindung und Transport von Metallen, für den Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies sowie immunrelevante Gene aufreguliert. Gene für DNA-Reparatur oder Zellzyklusregulation wurden nur sporadisch differentiell transkribiert. Auf Proteinebene war die Innenraumstaubexposition mit einer signifikanten Erhöhung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und G-CSF sowie des Zellaktivierungsmarkers Elastase assoziiert ($p < 0.05$). Allergiker zeigten unabhängig von der Exposition signifikant höhere Werte von IL-5, IL-13 und nasalem IgE ($p < 0.001$) und reagierten bei diesen Zytokinen auf Innenraumstaubexposition empfindlicher als Nicht-Allergiker ($p < 0.05$). Bei Phthalat-dotiertem Staub war die Zunahme proinflammatorischer Zytokine im Nasensekret entweder geringer als bei Normalstaub oder es kam sogar zu einer Abnahme dieser Zytokine.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Nasenschleimhaut auf eine realitätsnahe Innenraum-Staubexposition mit der Aufregulierung unterschiedlicher Abwehrsysteme reagiert. Hierbei stehen neben der Aktivierung der Immunantwort die Neutralisation und der Metabolismus toxischer Staubinhaltsstoffe im Vordergrund. DEHP scheint die nach nasaler Staubinhalation in der humanen Nasenschleimhaut ablaufende Immunantwort abzuschwächen.

Cytokine release and gene expression profile of human nasal mucosa after short term exposure to indoor dust

(Final report for BWW 22010; 1.10.2002 to 30.11.2004)

H. Riechelmann¹⁾, T. Deutsche¹⁾, B. Heinzow²⁾, W. Butte³⁾

¹⁾ Department of Otorhinolaryngology, University of Ulm

²⁾ State Agency of Nature and Environment of Schleswig-Holstein

³⁾ University of Oldenburg, Department for Chemistry

Summary

Sixteen healthy individuals and 16 persons suffering from house dust mite allergy were exposed to $300\mu\text{g}/\text{m}^3$ indoor dust versus filtered air as a control for 3h in a nose only exposure setting. Half of the participants received dust with an average German household di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) concentration (0,41 mg/g) and the other half dust with a DEHP concentration of 2,09 mg/g, reflecting concentrations observed in phthalate contaminated households. Following exposure, nasal mucosa biopsies were obtained for gene expression analysis of 1051 genes employing long oligonucleotide microarrays. Moreover, several cytokines and cell activation markers were measured in nasal secretions obtained following exposure.

Following indoor dust exposure, genes involved in metal transport and binding, and genes involved in the neutralization of reactive oxygen species were upregulated. Moreover, immune response genes were activated. DNA-repair genes and genes involved in cell cycle control were sporadically altered. On the protein level, indoor exposure resulted in a significant increase of IL-1, IL-6, IL-8 and G-CSF in addition to increased elastase levels ($p<0.05$). Irrespective of dust exposures, participants with house dust mite allergy had higher IL-5, IL13 and nasal IgE levels than non-allergic participants ($p<0.001$). Moreover, these biomarkers responded stronger to indoor dust exposure in allergic participants. The effects of indoor dust with average and high phthalate concentrations differed markedly. DEHP significantly attenuated the nasal biomarker response to indoor dust.

Altogether, the results of this study show that human nasal mucosa responds to indoor dust exposure with the upregulation of several defense systems. Particularly, an activation of metal binding, oxygen radical detoxification and immune activation was found. An attenuated immune response occurs after exposure of the human nasal mucosa after exposure with dusts containing DEHP.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	4
2 Material und Methoden	5
2.1 Gentranskriptionsanalyse	6
2.1.1 Spotting.....	6
2.1.2 RNA-Extraktion und Hybridisierung	6
2.1.3 Auslesen der Microarrays und Datenauswertung.....	7
2.2 Proteinbestimmungen im Nasensekret	7
2.2.1 Zellaktivierungsmarker und Gesamt-IgE im Nasensekret.....	7
2.2.2 Zytokinbestimmungen im Nasensekret	7
3 Ergebnisse	9
3.1 Studienpopulation.....	9
3.2 Gentranskriptionsanalysen an Nasenschleimhautgewebe	9
3.3 Proteinbestimmungen im Nasensekret	10
3.4 Faktorenanalyse	10
3.5 Auswirkungen der Staubexposition auf die Faktorwerte	11
3.5.1 Gesamtpopulation ohne Berücksichtigung des Allergiestatus und der Staubart	11
3.5.2 Auswirkung der Staubart.....	12
3.5.3 Auswirkung des Allergiestatus.....	13
4 Diskussion.....	15
5 Literaturverweise.....	17

1 Einleitung

Innenraumstäube wurden als wesentlicher Träger inhalativer Toxizität identifiziert (Butte & Heinzow 2002). Neben Konzentration und Partikelgröße bestimmen Staubinhaltsstoffe die Toxizität von Stäuben (Riechelmann 2004). In Innenraumstäuben sind mikrobielle Kontaminanten (Bischof et al. 2002), Metalle (Sunderman, Jr. 2001) und organische chemische Verbindungen (Delfino 2002) wesentliche Toxizitätsfaktoren. In der Norddeutsche Leukämie- und Lymphomstudie wurden Hausstäube gesammelt, von denen manche erhebliche Phthalat-Beimengungen aufwiesen. Kürzlich wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Phthalat-Belastung in Innenraumstäuben und der Entstehung von Asthma bronchiale beschrieben (Bornehag et al. 2004). *In vitro* zeigten Phthalate eine verstärkte IgE-Antwort CD4⁺-Zellen (Lee et al. 2004).

In dem beschriebenen Projekt sollten die Wirkungen von Innenraumstäuben in umweltrelevanten Konzentrationen auf die menschliche Nasenschleimhaut untersucht werden. Um besondere Wirkungen einer hohen Phthalatkonzentration zu erfassen, wurde die Hälfte des untersuchten Kollektivs einem Phthalat-dotierten Staub exponiert. Da bei Allergikern eine erhöhte Vulnerabilität gegen Umweltschadstoffe beschrieben ist (Behrendt et al. 1999), wurden zur Hälfte Hausstaubmilbenallergiker rekrutiert. Expositionsbezogene Effekte sollten breitgefächert auf Transkriptionsebene mit einem Oligonukleotid-Chip für ca. 1000 Gene erfasst werden (Shoemaker et al. 2001), speziell proinflammatorische Effekte zusätzlich durch Immunobead-Assay auf Proteinebene (Camilla et al. 2001).

2 Material und Methoden

Beim eingesetzten Innenraumstaub handelt es sich um Hausstaub aus norddeutschen Haushalten. Ein Teil der Hausstaubprobe behielt ihren ursprünglichen Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)-Gehalt von 0,41 mg/g, ein anderer Teil wurde mit 2,09 mg/g DEHP dotiert. Die Aerosolherstellung erfolgte mit einem modifizierten Aerosolgenerator (Small-Scale Powder Dispenser, Modell 3433, TSI GmbH, Aachen). Als Probanden wurden Studenten der Universität Ulm geworben. Sie wurden klinisch und allergologisch auf Übereinstimmung mit den Ein- und Ausschlusskriterien untersucht (s. Zwischenbericht) und als Nicht-Allergiker oder Hausstaubmilbenallergiker klassifiziert. Jeder Proband wurde einmal über 3h nasal mit $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Staub exponiert und einmal mit gefilterter Luft ($0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) als Kontrolle, wobei Allergiker und Nicht-Allergiker den 2 Staubarten und den 2 Expositionsreihenfolgen zufällig zugeordnet wurden (**Abbildung 1**). Zwischen der ersten und zweiten Exposition eines Probanden vergingen mindestens sieben Tage. Drei Stunden nach Ende der Exposition wurde den Probanden Nasensekret und eine Nasenschleimhautbiopsie entnommen. Zusätzlich wurde den Probanden nochmals 24 Stunden nach Ende der Exposition Nasensekret entnommen.

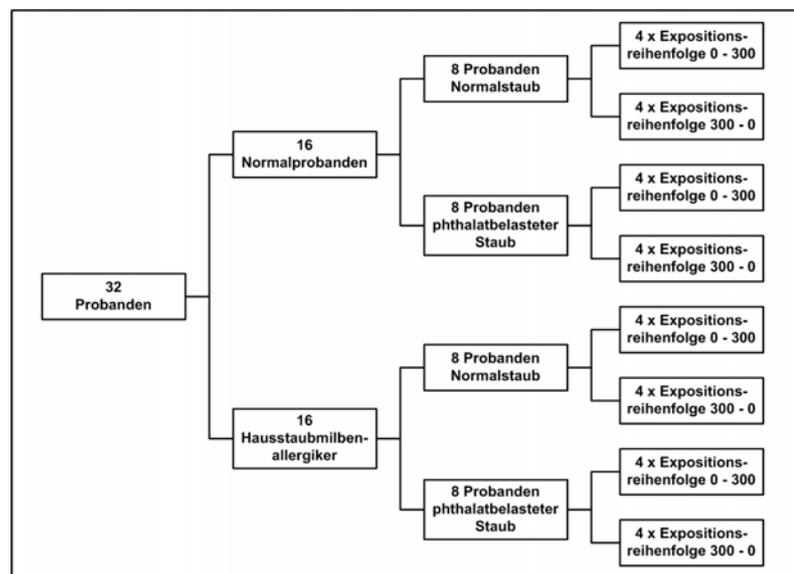


Abbildung 1: Expositionsschema im Projekt BWW 2010

2.1 Gentranskriptionsanalyse

2.1.1 Spotting

Es wurden 1051 unterschiedliche 70mer cDNA-Oligonukleotide (Operon Biotechnologies GmbH, Köln) mit dem OmniGrid 100™ (Genemachines, San Carlos, CA, USA) mit PT 3000 Nadeln (Point Technologies, Boulder, CO, USA) auf aminosilanisierte Mikroarray Objektträger (Ultra Gaps II, Corning B.V., Amsterdam, Holland) in jeweils 4 Spot-Replikaten aufgebracht (IZKF, Universität Ulm). Als Spiking-Kontrollen dienten 10 exogene Oligonukleotide von Arabidopsis- und Sinhorhizobium-Genen. Hierzu passende synthetische RNA-Oligonukleotide wurden von der Fa. PURIMEX, Staufenberg, im Auftrag mit einem ABI 394 Synthesizer™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) hergestellt und nach Deprotektion über PAGE aufgereinigt. Als Negativkontrollen dienten 350 Spots mit Spotting-Buffer (3xSSC Buffer entspr. 0,3 M Na-Citrat und 3 M NaCl mit 1,5 M Betain, Sigma, Deisenhofen, Germany) und 10 randomized negative controls (RNC, Operon Biotechnologies GmbH, Köln) mit beim Menschen nicht vorkommenden Oligonukleotidsequenzen. Nach dem Spotten wurden die Arrays 15 min bei 80°C inkubiert und anschließend mit dem UV-Stratalinker 2400™ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) bei 120mJ/cm² vernetzt. Die Spottingqualität wurde mit Cy3 und Cy5 gekoppelten Random-Nonameren (random 9mere™, Operon Biotechnologies GmbH, Köln) überprüft.

2.1.2 RNA-Extraktion und Hybridisierung

Aus den bei -80°C gelagerten Biopsien wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy™ Mini Kit (Operon Biotechnologies GmbH, Köln) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. Jeweils 5 µg RNA wurden 2,5 µl Spiking-RNA zugesetzt, so dass sich Spiking-RNA-Konzentrationen von 0, 200, 1000 und 10 000 fg je Probe ergaben. Mit dem 3DNA Array 350 Kit™ (Genisphere, Hatfield, PA, USA) wurde die mRNA der Proben in cDNA transkribiert, wobei die Proben nach Reinluft-Exposition mit dem Grünlicht emittierenden Fluorochrom Cy3™ und die Proben nach Staubexposition mit dem Rotlicht emittierenden Fluorochrom Cy5™ markiert wurden. Die cDNA wurde anschließend mit Millipore Microcon YM-30 Centrifugal Filter Devices™ (Millipore, Billerica, MA, USA) aufgereinigt und dann auf den mit BSA für 1h vorinkubierten Objektträgern über Nacht bei 57°C inkubiert. Anschließend wurde die ungebundene cDNA abgewaschen und das 3DNA Bindungs-Reagenz für 3h bei 59°C aufinkubiert.

2.1.3 Auslesen der Microarrays und Datenauswertung

Der Objektträger wurde mit einem Dual-Laser Microarray Scanner (GenePix 4000 B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) ausgelesen und als TIF-Datei gespeichert. Die automatische Spot-Erkennung und Cy3/Cy5-Intensitätsbestimmung erfolgte mit dem Programm Gene Pix pro 4.1™ (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Die Daten wurden weiter mit dem Programm Systat 10.2 (Systat Software GmbH, Erkrath) ausgewertet. Spots mit einer Background-Intensität oberhalb der 99. Perzentile wurden gelöscht. Dann wurde von der Cy3- bzw. Cy5-Intensität der je vier Spot-Replikate eines Gens der Median gebildet, dual logarithmiert und der Cy3/Cy5-Intensitätsquotient (Ratio) gebildet. Nach Lowess- und Blocknormalisierung (Quackenbush 2002) wurde der Interquartilbereich der Kontrollen bestimmt. Gene, deren Cy3-Intensität 3 Interquartile oberhalb des oberen Quartils der Kontrollen lagen, wurden als basal exprimiert angenommen. Gene, deren Ratio-Werte 3 Interquartile oberhalb des oberen Quartils oder unterhalb des unteren Quartils der Kontrollen lagen, wurden als differenziell transkribiert angenommen (Tukey 1977). Die Intensitätswerte der Gene auf den Arrays der Probanden einer Expositionsgruppe wurden mittels des Intraklassen-Koeffizienten auf Übereinstimmung geprüft und durch Medianbildung zusammengefasst. Es werden die Genbezeichnungen des Gene Nomenclature Committee der Human Genome Organisation (HUGO-Kürzel) benutzt (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).

2.2 Proteinbestimmungen im Nasensekret

2.2.1 Zellaktivierungsmarker und Gesamt-IgE im Nasensekret

Eosinophiles kationisches Protein (ECP), Tryptase (TRY) und Gesamt-IgE im Nasensekret (nIgE) wurden mit einem Fluoreszenz-Immunoassay (UniCAP 100 Diagnostic System, Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für ECP und Tryptase wurden die Sekretproben 1:5 verdünnt, nIgE wurde in unverdünnten Proben gemessen. Humane Neutrophilen-Elastase (ELA) wurde mit einem quantitativen ELISA (Bender MedSystems, Wien) bestimmt. Die Sekretproben wurden hierzu 1:100 verdünnt.

2.2.2 Zytokinbestimmungen im Nasensekret

Die Zytokinkonzentrationen wurden in 1:10 verdünnten Nasensekretproben mit dem Bio-Plex™ Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, München) bestimmt. Es wurden die Zytokine Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-

13, IL-17, Tumor Nekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), Monozyten-chemoattraktives Protein-1 (MCP-1), und Makrophagen inflammatorisches Protein-1 β (MIP-1 β) mit dem Multiplex Cytokine Assay für 17 Zytokine (Bio-Rad Laboratories, München) gemäß Herstellerangaben bestimmt. Die Daten wurden mit der Bio-Plex Manager™ Software 3.0 (Bio-Rad Laboratories, München) ausgewertet. Die Detektionsgrenze liegt bei unter 0.5 pg/ml. Die Biomarker-Konzentrationen im Nasensekret wurden dekadisch log-transformiert und deskriptiv durch Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Für die konfirmatorische Auswertung wurden die Ergebnisse der Biomarker-Bestimmungen im Nasensekret einer Hauptkomponentenanalyse mit Varimax-Rotation unterzogen und Faktoren extrahiert, die im Wesentlichen den Kriterien von Guadagnoli und Velicer (Bortz 1999) genügten. Aufgeschlüsselt nach dem Zeitpunkt der Entnahme 3h bzw. 24h nach Expositionsende wurden die Faktorwerte einer Varianzanalyse mit einem Wiederholungsfaktor (Kontrollexposition versus Staubexposition) und den Gruppierungsfaktoren Allergie (ja/nein), Staubart (Normalstaub versus Phthalat-dotierter Staub) und Expositionsreihenfolge („erst-Kontrolle-dann-Staub“ versus „erst-Staub-dann-Kontrolle“) unterzogen.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

An der Untersuchung nahmen 12 Frauen und 20 Männer mit einem mittleren Alter von 24 ± 3 Jahren teil. Davon waren 16 Teilnehmer nach Anamnese, Hauttest, serumspezifischen IgE und konjunktivalem Provokationstest Hausstaubmilbenallergiker. Die Zuordnung zu den einzelnen Expositionsgruppen erfolgte gemäß Randomisierungsplan des Instituts für Biomathematik des Universitätsklinikums Ulm. Zwischen der 1. und der 2. Untersuchung eines Probanden vergingen durchschnittlich 30 ± 17 Tage, das kürzeste Intervall betrug 13 Tage.

3.2 Gentranskriptionsanalysen an Nasenschleimhautgewebe

Bisher sind 16 von 32 Arrays ausgewertet, wobei die Gruppierungsfaktoren ausgewogen berücksichtigt wurden. Von den 1051 untersuchten Genen zeigten 59 konsistent eine differentielle Expression beim Vergleich Kontrolleexposition gegen Innenraumstaubexposition. Davon waren 56 Gene aufreguliert und drei Gene (CD14, LTB4R, NUP62) schwach herunterreguliert. Die Funktion der Genprodukte der aufregulierten Gene wurde nach dem Klassifikationssystem des Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) auf der molekularen Funktionsebene 4 kategorisiert (Abbildung 2).

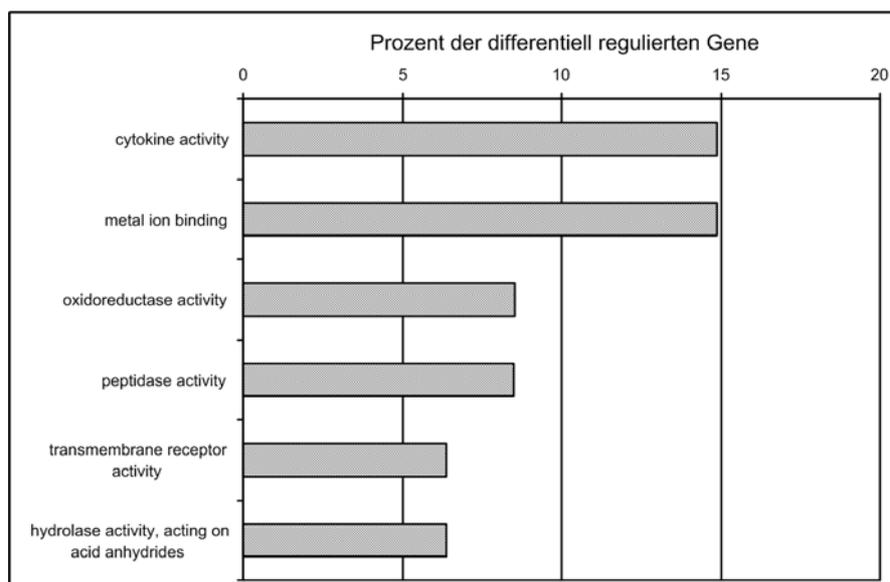


Abbildung 2: Prozentuale Verteilung der Molekülfunktion der Genprodukte der 56 durch Innenraumstaubexposition konsistent aufregulierten Gene

3.3 Proteinbestimmungen im Nasensekret

Die dekadischen Logarithmen der Proteinkonzentrationen im Nasensekret der 32 Probanden (Mittelwert \pm Standardabweichung) zu den insgesamt 4 Entnahmezeitpunkten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für MIP-1 β und MCP-1 wurden keine ausreichend reproduzierbaren Werte erhalten.

Tabelle 1: Mittelwerte \pm Standardabweichung der dekadischen Logarithmen der Proteinkonzentrationen im Nasensekret von 32 Probanden zu 4 Entnahmezeitpunkten. Die Zytokin- Konzentration (IL-1 β bis G-CSF) ist in pg/ml angegeben, die IgE- Konzentration in kU/l und die Konzentrationen der Zellaktivierungsmarker (ELA-TRY) in ng/ml.

	<i>3h nach Expositionsende</i>		<i>24h nach Expositionsende</i>	
	<i>Kontrollexposition</i>	<i>Staubexposition</i>	<i>Kontrollexposition</i>	<i>Staubexposition</i>
IL-1 β	1.48 \pm 0.48	1.48 \pm 0.53	1.54 \pm 0.62	1.7 \pm 0.5
IL-2	1.38 \pm 0.45	1.46 \pm 0.45	1.51 \pm 0.41	1.49 \pm 0.43
IL-4	1.96 \pm 0.21	2.04 \pm 0.21	2.04 \pm 0.22	2.06 \pm 0.26
IL-5	1.01 \pm 0.54	0.99 \pm 0.54	1.16 \pm 0.55	1.14 \pm 0.58
IL-6	2.75 \pm 0.25	2.71 \pm 0.34	2.94 \pm 0.43	3.09 \pm 0.41
IL-7	2.15 \pm 0.2	2.16 \pm 0.21	2.09 \pm 0.18	2.07 \pm 0.14
IL-8	3.25 \pm 0.23	3.26 \pm 0.27	3.21 \pm 0.36	3.27 \pm 0.25
IL-10	0.59 \pm 0.4	0.64 \pm 0.49	0.73 \pm 0.47	0.66 \pm 0.34
IL-12	1.33 \pm 0.42	1.4 \pm 0.5	1.48 \pm 0.42	1.42 \pm 0.43
IL-13	1.18 \pm 0.41	1.24 \pm 0.53	1.37 \pm 0.53	1.35 \pm 0.61
IL-17	0.93 \pm 0.45	1.03 \pm 0.32	0.93 \pm 0.32	0.89 \pm 0.54
IFN- γ	2.1 \pm 0.24	2.19 \pm 0.33	2.21 \pm 0.34	2.27 \pm 0.42
TNF- α	1.39 \pm 0.29	1.49 \pm 0.37	1.54 \pm 0.41	1.66 \pm 0.45
GM-CSF	2.93 \pm 0.4	2.97 \pm 0.5	3 \pm 0.53	2.98 \pm 0.5
G-CSF	3.1 \pm 0.43	3.12 \pm 0.43	3.01 \pm 0.37	3.1 \pm 0.37
nIgE	1.05 \pm 0.55	1.11 \pm 0.6	1.1 \pm 0.53	1.15 \pm 0.55
ELA	2.51 \pm 0.4	2.55 \pm 0.39	2.76 \pm 0.27	2.87 \pm 0.11
ECP	1.72 \pm 0.62	1.88 \pm 0.67	-	-
TRY	1.34 \pm 0.88	1.43 \pm 0.56	-	-

3.4 Faktorenanalyse

Aus den Biomarkerwerten ließen sich durch Hauptkomponentenanalyse mit Varimax-Rotation 3 Faktoren mit einem Eigenwert von mehr als 1 extrahieren. Sie erklären 63% der Daten-Varianz. Die Faktorladungen (Tabelle 2) legen nahe, dass Faktor-A vor allem lymphozytäre Zytokine repräsentiert und Faktor-B für Zytokine steht, die typischerweise von Atemwegsepithelien und Makrophagen gebildet werden. Der Faktor-C lädt auf allergietypische Biomarker.

Tabelle 2: Faktorladungen der gemessenen Analyte im Nasensekret auf die 3 Hauptkomponenten A-C

	<i>Faktor-A</i>	<i>Faktor-B</i>	<i>Faktor-C</i>
IL-2	0.898	-0.102	0.021
IL-12	0.883	-0.153	0.148
GM-CSF	0.826	-0.092	-0.115
IFN- γ	0.798	0.331	0.081
TNF- α	0.783	0.448	0.139
IL-4	0.755	0.275	-0.156
IL-13	0.749	0.169	0.451
IL-17	0.613	0.033	-0.229
IL-10	0.598	0.166	0.386
IL-1 β	0.07	0.829	-0.067
IL-6	0.239	0.818	0.061
ELA	-0.012	0.726	0.094
IL-8	-0.082	0.697	-0.008
IL-5	0.236	0.093	0.818
nIgE	-0.221	-0.033	0.686
G-CSF	0.037	0.46	-0.044

3.5 Auswirkungen der Staubexposition auf die Faktorwerte

3.5.1 Gesamtpopulation ohne Berücksichtigung des Allergiestatus und der Staubart

Bei den 32 Teilnehmern zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontrollexposition und Innenraum-Staubexposition (verbundene Stichprobe) beim Faktor B zum Zeitpunkt 24h nach der Exposition. Der Faktorwert betrug im Mittel 24h nach der Kontrollexposition 0.11 ± 0.99 , nach der Staubexposition 0.57 ± 0.89 ($p=0.02$). Hierbei zeigte sich ein Interaktionseffekt mit der Expositionsreihenfolge ($p<0.01$), also war ein Sequenzeffekt nicht auszuschließen. Sequenzeffekte können die Ergebnisse nicht beeinflussen, wenn nur die 16 Probanden nach erstmaliger Kontrollexposition mit den 16 Probanden nach erstmaliger Staubexposition (unverbundene Stichprobe) verglichen werden. Dieser Vergleich ergab für den Faktor B einen Wert von 0.24 nach Kontrollexposition und 0.73 nach Staubexposition ($p<0.01$, Abbildung 3).

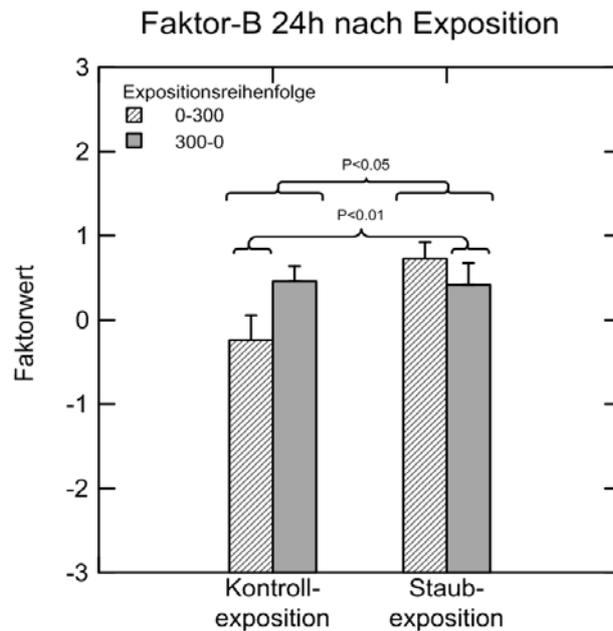


Abbildung 3: Wirkung einer Innenraum-Staubexposition auf die Werte des Faktor-B (s. Text), aufgeschlüsselt nach Expositionsreihenfolge. Die Werte nach Staubexposition liegen signifikant höher als nach Kontrolleexposition ($p < 0.05$). Wegen Interaktionseffekten mit der Expositionsreihenfolge sind zusätzlich nur die 16 Probanden dargestellt, bei denen entweder die Kontrolleexposition oder die Staubexposition als erstes durchgeführt worden war ($p < 0.01$). Der Interaktionseffekt verschleiert eher das wahre Ausmaß der Staubwirkung.

3.5.2 Auswirkung der Staubart

Die Wirkung des Phthalat-dotierten Staubes unterschied sich von der Wirkung des Staubes mit durchschnittlichem Phthalatgehalt. Während es bei den untersuchten drei Faktoren nach Exposition gegenüber dem Staub mit durchschnittlicher Phthalatkonzentration zu einer deutlichen Zunahme der Faktorwerte kam, fiel diese Zunahme beim Faktor-A nach Exposition gegenüber Phthalat-dotiertem Staub niedriger aus. Beim Faktor-B ergab sich im Vergleich zur Normalstaubexposition eine geringfügige Abnahme ($p = 0.14$) – also eine Wirkungsumkehr – und beim Faktor-C ergab eine deutliche Abnahme ($p = 0.06$) zum Zeitpunkt 3h nach Expositionsende (Abbildung 4). Betrachtet man lediglich die Gruppe der Hausstaubmilbenallergiker, ist die Umkehrung des Effektes der Staubexposition von einer Zunahme der Faktorwerte bei Normalstaub in eine Abnahme bei Phthalat-dotiertem Staub für den Faktor-C hochsignifikant ($p = 0.003$).

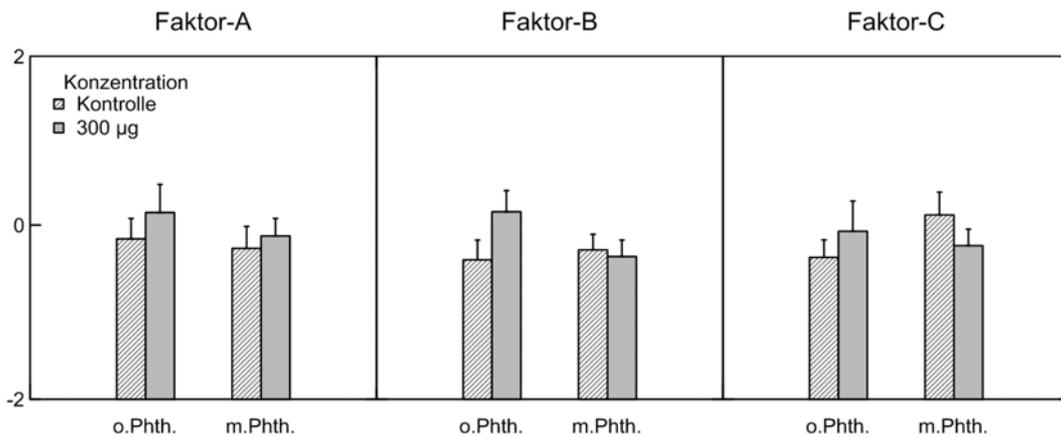


Abbildung 4: Abhängigkeit der Staubwirkung vom Phthalatgehalt des Staubes. Staub ohne Phthalat-Dotierung (o.Phth.) führt zu einer deutlichen Erhöhung der Faktorwerte A bis C (s. Text), während der Phthalat-dotierte Staub (m.Phth.) zu einer geringeren Zunahme bzw. sogar Abnahme der Faktorwerte führte.

3.5.3 Auswirkung des Allergiestatus

Im Vergleich zum nicht-allergischen Kollektiv führte eine Hausstaubmilbenallergie zu keiner vermehrten Zunahme der Faktor-A Werte und einer geringfügig stärkeren Zunahme der Faktor-B Werte ($p < 0.05$) nach Staubexposition. Erwartungsgemäß unterschieden sich Allergiker und Nicht-Allergiker hochsignifikant bei den Faktor-C Werten. Zum Zeitpunkt 3h nach Exposition lagen die Faktor-C Werte bei den Nicht-Allergikern bei -0.53 ± 0.91 und bei den Allergikern 0.27 ± 0.77 ($p < 0.001$, Abbildung 5) und zum Zeitpunkt 24 h nach Exposition bei -0.48 ± 0.94 bzw. 0.79 ± 0.8 ($p < 0.001$). Es fällt auf, dass die Nicht-Allergiker nach Staub-Exposition etwas geringere Faktor-C Werte aufwiesen und die Allergiker nur geringfügig höhere Werte ($p = 0.15$).

Es war ungewöhnlich, dass die Allergiker auf den Staub mit den darin enthaltenen Allergenen nicht signifikant stärker reagierten als die Nicht-Allergiker. Deswegen wurde die Zunahme der Faktor-C Werte bei Allergikern und Nicht-Allergikern nochmals lediglich für Normalstaub ohne Phthalat-Dotierung verglichen. Hier ergab sich, dass die Faktor-C Werte der Allergiker stärker auf die Normalstaubexposition ansprachen als die der Nicht-Allergiker ($p = 0.02$). Die zu erwartende Zunahme der Faktor-C Werte durch die Staubexposition bei den Allergikern war demnach durch die Wirkung des Phthalat-dotierten Staubes verdeckt.

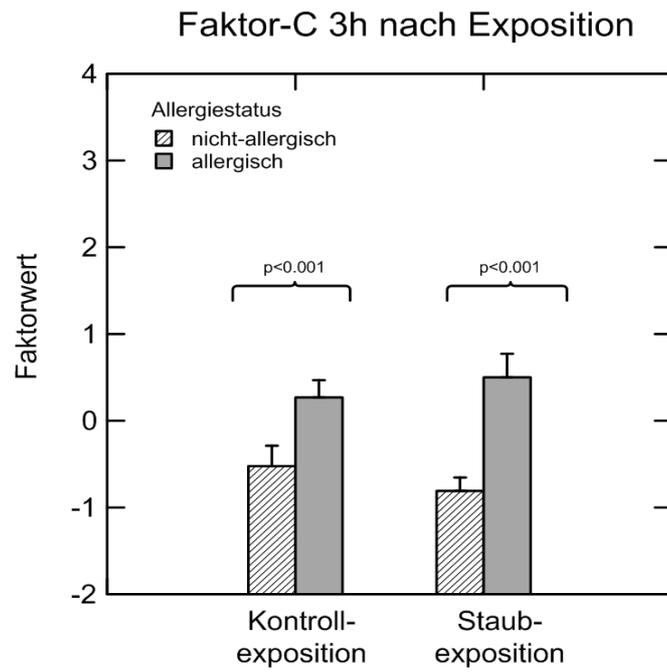


Abbildung 5: Dargestellt sind die Faktor-C Werte (s. Text) von 16 Hausstaubmilbenallergikern und 16 Nicht-Allergikern 3h nach Exposition mit Innenraumstaub. Unabhängig von der Staubexposition haben Allergiker höhere Faktor-C Werte als nicht Allergiker (jeweils $p < 0.001$).

4 Diskussion

Im Projekt BWW 22010 wurde untersucht, wie sich eine 3-stündige nasale Exposition mit Innenraumstaub in einer umweltrelevanten Konzentration von $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ im Vergleich zu einer Reinfluftexposition auf die humane Nasenschleimhaut *in vivo* auswirkt. Als Surrogatmarker für expositionsbezogene Veränderungen dienten einerseits Unterschiede der Transkriptionsrate von ca. 1000 Genen des Nasenschleimhautgewebes. Der RNA Nachweis erfolgte hierbei durch Microarray-Untersuchungen mit langen Oligonukleotiden (9). Als zweiter Indikator für expositionsbezogene Veränderungen wurden die Konzentrationen von Zellaktivierungsmarkern (ECP, Tryptase und Elastase) und von 15 Zytokinen im Nasensekret gemessen. Im Mittelpunkt dieser Proteinbestimmungen stand die Frage nach expositionsbezogenen proinflammatorischen Effekten. Es sollten über die reine Untersuchung der Expositionswirkung hinaus noch zwei weitere Aspekte untersucht werden: a) unterscheiden sich die Effekte bei Nicht-Allergikern und Hausstaubmilbenallergikern und b) zeigt mit Di(2-ethylhexyl)phthalat dotierter Staub charakteristische Wirkungen? Mögliche Sequenzeffekte sollten zudem durch alternierende Expositionsreihenfolgen kenntlich gemacht werden. Um bei der Vielzahl der untersuchten Biomarker im Nasensekret eine konfirmatorische Analyse zu erleichtern, wurden sie mittels Hauptkomponentenanalyse auf drei Faktoren reduziert. Die ermittelten Messwerte sind plausibel und stehen in Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen. Auch die Faktorenextraktion lieferte im Vergleich zu früheren Untersuchungen vollkommen konsistente Ergebnisse.

Auf Transkriptionsebene bestimmte die Aufregulierung von Genen das Bild, die an Bindung und Transport von Metallen beteiligt sind. Außerdem wurden Gene aufreguliert, die in den Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies involviert sind. Aufregulierung von Genen im Zusammenhang mit Immunvorgängen waren ebenfalls nachweisbar. Gene für DNA-Reparatur oder Zellzyklusregulation waren nur sporadisch differentiell transkribiert.

Auf Proteinebene war die Innenraumstaubexposition mit einer signifikanten Erhöhung der Faktor-B Werte vergesellschaftet, die im Wesentlichen die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF und den Zellaktivierungsmarker Elastase repräsentieren. Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen mit Urbanstäuben (Riechelmann et al. 2004). Erwartungsgemäß zeigten Allergiker unabhängig von der Staubeexposition signifikant höhere Werte des Faktor-C, der auf IL-5, IL-13 und nasales IgE lädt, aber

interessanterweise nicht auf IL-4. Allergiker sprachen auf Innenraum-Staubexposition ohne Phthalat-Dotierung empfindlicher mit ihren Faktor-C Werten an als Nicht-Allergiker. Ursache hierfür sind wahrscheinlich die im Innenraum-Staub enthaltenen Hausstaubmilbenallergene (s. Zwischenbericht). Der Einfluss von DEHP auf die Entstehung von Asthma und Allergien ist noch weitgehend unklar. Obwohl in epidemiologischen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen hohen Phthalatkonzentrationen im Innenraumstaub und gehäuftem Auftreten von Asthma bronchiale gezeigt werden konnte (Bornehag et al. 2004), sind die zugrunde liegenden kausalen Mechanismen bisher wenig erforscht. Zwar lässt sich die Assoziation zwischen Asthma bronchiale und Phthalatkonzentration im Innenraumstaub noch mit einer durch DEHP-assoziierten Präferenzierung der T_{H1} -Antwort in der Lunge erklären, doch scheint dieses Erklärungsmuster für die menschliche Nasenschleimhaut nicht geeignet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Allergiker nach nasaler Exposition mit DEHP-dotiertem Innenraumstaub mit einer geringeren Freisetzung der Biomarker Elastase, G-CSF, IL-5 und IL-6 im nasalen respiratorischen Sekret reagierten als nach nasaler Exposition mit normalem Innenraumstaub. Bei den Nicht-Allergikern trat dieser Effekt nicht auf. Phthalate können allergene und adjuvante Wirkungen entfalten (Jaakkola et al. 1999; Oie, Hersoug, & Madsen 1997). In tierexperimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass DEHP als verstärkender Faktor die Immunantwort in Richtung einer T_{H1} -betonten Antwort steuert (Butala et al. 2004; Larsen et al. 2001). DEHP scheint die nach nasaler Staubinhalation in der humanen Nasenschleimhaut ablaufende Immunantwort abzuschwächen.

5 Literaturverweise

Behrendt, H., Ewers, H. J., Hüttl, R. F., Jänicke, M., Plaßmann, E., & Rehbinder, E. 1999, *Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen: Umwelt und Gesundheit - Risiken richtig einschätzen* Verlag Metzeler-Poeschel, Stuttgart.

Bischof, W., Koch, A., Gehring, U., Fahlbusch, B., Wichmann, H. E., & Heinrich, J. 2002, "Predictors of high endotoxin concentrations in the settled dust of German homes", *Indoor.Air*, vol. 12, no. 1, pp. 2-9.

Bornehag, C. G., Sundell, J., Weschler, C. J., Sigsgaard, T., Lundgren, B., Hasselgren, M., & Hagerhed-Engman, L. 2004, "The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study", *Environ.Health Perspect.*, vol. 112, no. 14, pp. 1393-1397.

Bortz, J. 1999, *Statistik für Sozialwissenschaftler* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Butala, J. H., David, R. M., Gans, G., McKee, R. H., Guo, T. L., Peachee, V. L., & White, K. L., Jr. 2004, "Phthalate treatment does not influence levels of IgE or Th2 cytokines in B6C3F1 mice", *Toxicology*, vol. 201, no. 1-3, pp. 77-85.

Butte, W. & Heinzow, B. 2002, "Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination", *Rev.Environ.Contam Toxicol.*, vol. 175, pp. 1-46.

Camilla, C., Mely, L., Magnan, A., Casano, B., Prato, S., Debono, S., Montero, F., Defoort, J. P., Martin, M., & Fert, V. 2001, "Flow cytometric microsphere-based immunoassay: analysis of secreted cytokines in whole-blood samples from asthmatics", *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, vol. 8, no. 4, pp. 776-784.

Delfino, R. J. 2002, "Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research", *Environ.Health Perspect.*, vol. 110 Suppl 4, pp. 573-589.

Jaakkola, J. J., Oie, L., Nafstad, P., Botten, G., Samuelsen, S. O., & Magnus, P. 1999, "Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norway", *Am.J.Public Health*, vol. 89, no. 2, pp. 188-192.

Larsen, S. T., Lund, R. M., Nielsen, G. D., Thygesen, P., & Poulsen, O. M. 2001, "Di-(2-ethylhexyl) phthalate possesses an adjuvant effect in a subcutaneous injection model with BALB/c mice", *Toxicol.Lett.*, vol. 125, no. 1-3, pp. 11-18.

Lee, M. H., Park, J., Chung, S. W., Kang, B. Y., Kim, S. H., & Kim, T. S. 2004, "Enhancement of interleukin-4 production in activated CD4+ T cells by diphtalate plasticizers via increased NF-AT binding activity", *Int.Arch.Allergy Immunol.*, vol. 134, no. 3, pp. 213-222.

Oie, L., Hersoug, L. G., & Madsen, J. O. 1997, "Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma", *Environ.Health Perspect.*, vol. 105, no. 9, pp. 972-978.

- Quackenbush, J. 2002, "Microarray data normalization and transformation", *Nat.Genet.*, vol. 32 Suppl, pp. 496-501.
- Riechelmann, H. 2004, "Wirkmechanismen von Inhalationsnoxen in Umwelt und Beruf", *Laryngorhinootologie*, vol. 83, no. Suppl. 1, pp. 1-35.
- Riechelmann, H., Rettinger, G., Lautebach, S., Schmittinger, S., & Deutsche, T. 2004, "Short-term exposure to urban dust alters the mediator release of human nasal mucosa", *J.Occup. Environ. Med.*, vol. 46, no. 4, pp. 316-322.
- Shoemaker, D. D., Schadt, E. E., Armour, C. D., He, Y. D., Garrett-Engle, P., McDonagh, P. D., Loerch, P. M., Leonardson, A., Lum, P. Y., Cavet, G., Wu, L. F., Altschuler, S. J., Edwards, S., King, J., Tsang, J. S., Schimmack, G., Schelter, J. M., Koch, J., Ziman, M., Marton, M. J., Li, B., Cundiff, P., Ward, T., Castle, J., Krolewski, M., Meyer, M. R., Mao, M., Burchard, J., Kidd, M. J., Dai, H., Phillips, J. W., Linsley, P. S., Stoughton, R., Scherer, S., & Boguski, M. S. 2001, "Experimental annotation of the human genome using microarray technology", *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 922-927.
- Sunderman, F. W., Jr. 2001, "Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals", *Ann.Clin.Lab Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 3-24.
- Tukey, J. W. 1977, *Exploratory data analysis* Addison-Wesley Pub. Co, Reading Massachusetts.