

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Wirkung niedrig-toxischer und urbaner Stäube auf das Zell- und Zytokinmuster der humanen Nasenschleimhaut

H. Riechelmann, T. Deutsche
Universitäts-HNO-Klinik, 89075 Ulm

Förderkennzeichen: PUGL 98002 und BWB 20004

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

Juli 2003

Inhalt

Zusammenfassung	4
Summary	5
Einleitung	6
In-vitro Untersuchungen	10
Tierexperimentelle Untersuchungen	12
Humanexpositionsuntersuchungen.....	14
Fragestellung	16
Material und Methoden	18
Probandenkollektive.....	18
Staubexpositionen	19
Nasales Expositionssystem.....	20
Aerosolgeneratoren	22
Laserpartikelzähler	24
Kalziumkarbonatstaub.....	25
Urbanstaub	26
Effektparameter.....	28
Gewinnung von Nasensekret.....	29
Gewinnung nasaler Zytologien	30
Biomarker im Nasensekret.....	30
Nasale Zytologien	34
Symptomscores	36
Auswertung	37
Ergebnisse	39
Validität der Staubexposition	39
Biomarker im Nasensekret.....	39
Biomarker im Nasensekret nach Kalziumkarbonatstaubexposition.....	42
Biomarker im Nasensekret nach Urbanstaubexposition	48
Zellverteilungsmuster im Nasensekret.....	53
Zellverteilungsmuster im Nasensekret nach Kalziumkarbonatstaubexposition.....	53
Zellverteilungsmuster im Nasensekret nach Urbanstaubexposition	55
Visuelle Analogskalen.....	57
Visuelle Analogskalen nach Kalziumkarbonatstaubexposition	57

Visuelle Analogskalen nach Urbanstaubexposition	58
Sequenzeffekte	59
Einflussgrößen und Korrelationen	60
Vergleich der Wirkungen von Kalziumkarbonatstaub und Urbanstaub	62
Diskussion	65
Staubexpositionen	65
Erfassung der biologischen Effektparameter	68
Experimentelles Design und Auswertungsmodell	71
Bewertung der Ergebnisse	72
Risikogruppen	73
Bedeutung von Staubinhaltsstoffen	74
Forschungsbedarf	75
Anhang	77
Abkürzungsverzeichnis	77
Danksagung	78
Literatur	79

Zusammenfassung

Kurzfristige Erhöhung der Konzentration partikelförmiger Verunreinigungen der Außenluft geht mit einer Zunahme von Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege einher. Im Rahmen der zwei Forschungsprojekte wurde untersucht, ob Stäube bei Kurzzeitexposition eine Entzündungsreaktion der humanen Nasenschleimhaut auslösen.

Zwei Probandenkollektive wurden untersucht. Das erste Kollektiv umfasste 32 freiwillige gesunde Probanden, die in vier Sitzungen einer jeweils dreistündigen nasalen Exposition mit niedrig-toxischem Kalziumkarbonat-Staub in Konzentrationen von $0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Kontrollmessung), $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ unterzogen wurden. Das zweite Kollektiv umfasste 30 freiwillige gesunde Probanden, die in drei Sitzungen einer jeweils dreistündigen nasalen Exposition mit dem Urbanstaub SRM 1649a in Konzentrationen von $0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Kontrolle), $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ unterzogen wurden. Dreißig Minuten, 8 und 24 Stunden nach Expositionsende wurde den Probanden Nasensekret entnommen und die Konzentration von IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , ENA-78, MIP-1 α , MCP-1 und Substanz P bestimmt. Gleichzeitig gewonnene nasale Zytologien wurden immunzytochemisch gegen CD45, CD68 und Myeloperoxidase gefärbt. Zusätzlich wurden nasale Symptomscores mit visuellen Analogskalen erfasst. Ausgewertet wurde die relative Veränderung der gemessenen Parameter nach Staubexposition im Vergleich zur Kontrollexposition.

Die Expositionen mit niedrig-toxischen Kalziumkarbonatstaub in Konzentrationen von bis zu $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ führten zu keiner relevanten Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut während die Exposition mit Urbanstaub in einer Konzentration von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ einen Anstieg der untersuchten Zytokine induzierte. 24 h nach Exposition lagen die Nasensekretkonzentrationen von IL-1 β um 72.3 % über den Werten der Kontrollexposition (0 - 150.2 %, $p = 0.004$), von IL-6 um 42.2 % (-28 - 161.9 %, $p = 0,01$) und für IL-8 um 19.7 % (-20.3 - 60.5 %, $p = 0.03$, Median, in Klammern 95 % Vertrauensintervall). Diese Zytokine gelten hinsichtlich einer nasalen Entzündungsreaktion als besonders relevant. Die untersuchten Entzündungszellen zeigten keine signifikante Veränderung in Abhängigkeit von der Urbanstaubexposition.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Urbanstäube auch nach kurzfristiger Exposition bei gesunden Probanden eine subklinische Entzündungsreaktion der oberen Atemwege auslösen können. Entscheidend hierfür ist nicht nur die Massekonzentration des Staubes und dessen Partikelgrößen, sondern auch dessen toxikologisches Profil.

Low-toxicity- and urban dust effects on inflammatory cell and cytokine release of human upper airway mucosa

H. Riechelmann, T. Deutsche

Summary

Short term increase of ambient air particle concentration is associated with a raise of upper and lower respiratory system diseases. In two research projects, the inflammatory response of human nasal mucosa following short term exposure to a low-toxicity and an urban dust were evaluated.

In the first project, 32 healthy volunteers underwent a three-hour nasal exposure to a low-toxicity calcium carbonate dust in concentrations of 0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (control), 150, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. In the second project, 30 healthy volunteers were exposed for three hours to the urban dust SRM 1649a in concentrations of 0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (control), 150 and 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Thirty minutes, 8h and 24h after exposure, nasal secretions were obtained and the concentration of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , ENA-78, MIP-1 α , MCP-1 and substance P were assessed. Nasal cytologies were examined for CD45⁺, CD68⁺ and MPO⁺ cells. Additionally visual analog scales for nasal symptom scores were obtained. For these parameters, the ratio following dust exposure and control exposure was calculated and evaluated non-parametrically.

Exposure to the low-toxicity dust in concentrations of up to 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ did not induce a relevant inflammatory response of human nasal mucosa, whereas urban dust in a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ resulted in an increase of proinflammatory cytokines in nasal secretions. Twenty-four hours after exposure, IL-1 β had increased 72.3% when compared with the control (0 - 150,2 %, p = 0,004), IL-6 42.2 % (-28 - 161,9 %, p = 0.01) and IL-8 19.7 % (-20.3 - 60,5 %, p = 0,03, median, in brackets 95% confidence interval). No relevant changes of nasal inflammatory cells or nasal symptom scores were observed.

The consistent increase of these characteristic nasal proinflammatory mediators strongly suggest a nasal inflammatory response following short term urban dust exposure. Moreover, these data suggest that toxic effects of environmental particulates do also depend on the toxicity of their components, rather than solely on mass concentration and particle size.

Einleitung

Staub ist eine disperse Verteilung fester Stoffe mit Korngrößen unter $200\ \mu\text{m}$ (1995). Luftgetragene Stäube haben eine Korngröße unter $100\ \mu\text{m}$ und zählen neben Rauchen und Nebeln zu den Aerosolen. Staubkonzentrationen werden in Masse/Volumen angegeben, typischerweise in $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Weil Staubpartikel unterschiedliche Formen und Rauigkeiten besitzen, die das Sedimentationsverhalten und das Abscheideverhalten in Impaktoren beeinflussen, werden die Partikelgrößen in äquivalente Kugeldurchmesser umgerechnet. Dieser aerodynamische Durchmesser entspricht dem Durchmesser einer Kugel mit der Einheitsdichte $1\text{g}/\text{cm}^3$ und der gleichen Sedimentationsgeschwindigkeit wie das betrachtete Staubpartikel. Vom aerodynamischen Durchmesser hängt ab, in welchem Atemwegskompartiment der Staub vorwiegend abgeschieden wird (Abbildung 1). Der Massenmedian des aerodynamischen Durchmessers (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) eines Staubes ist derjenige aerodynamische Durchmesser, der von 50% der betrachteten Staubmasse überschritten bzw. unterschritten wird. Als pm_{10} werden Staubpartikel bezeichnet, deren aerodynamischer Durchmesser kleiner oder gleich $10\ \mu\text{m}$ ist. Pm_{10} ist thoraxgängig und deswegen für lungentoxikologische Untersuchungen relevant, während die extrathorakale Fraktion für toxikologische Untersuchungen der oberen Atemwege von vorrangigem Interesse ist.

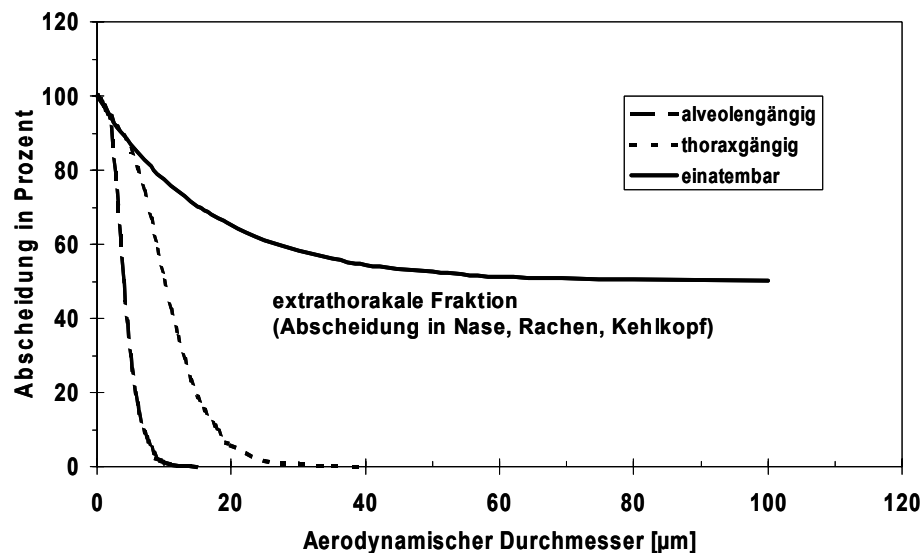


Abbildung 1: Staubabscheidekurven in unterschiedlichen Atemwegskompartimenten in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser der Staubpartikel (Deutsche Forschungsgemeinschaft 1996).

Neben Staubkonzentration und Partikelgröße bestimmt die chemische Zusammensetzung die Gesundheitswirkungen von Stäuben. **Niedrig-toxische Stäube** enthalten chemische Verbindungen, die im menschlichen Organismus auch in deutlich höheren Konzentrationen als unter den aktuellen Expositionsbedingungen keine wesentliche Schädigung verursachen. Als niedrig-toxische Stäube werden u.a. Titandioxid, Bariumsulfat, Kalziumkarbonat oder native Stärke ((C₆H₁₀O₅)_n) experimentell verwendet. Der Begriff nicht-toxisch, ungiftig oder inert ist für diese Stäube unzutreffend, da sie durchaus Veränderungen im Organismus auslösen können. Zum Beispiel wird Titanoxid von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Dies führt zu einer Aktivierung von Sauerstoffradikalen, die ihrerseits Gewebeschäden verursachen können. **Umweltstäube** sind komplexe partikelförmige Luftverunreinigungen aus der realen Umwelt, die z.B. bei Verbrennungsprozessen, infolge Aufwirbelungen vom Boden, durch Kondensation gasförmiger Luftbestandteile oder bei mechanischem Abrieb unterschiedlicher Materialien entstehen. Urbanstäube sind Umweltstäube, die in städtischen Agglomerationszonen gesammelt wurden. **Verbrennungsrückstände** sind Bestandteil von Umweltstäuben und Stäuben am Arbeitsplatz mit besonderen toxikologischen Eigenschaften. Sie enthalten unter anderem Polyaromate und Nitroaromate. Flugstaub ist ein Verbrennungsprodukt vornehmlich aus Steinkohlefeuerungen (hoher Quarz- und Aluminiumhydroxidanteil) und Heizölfeuerungen. Es kann durch Filter aus dem Abgas als Flugasche (engl. fly ash, oil fly ash, fuel fly ash) abgeschieden werden. Dieselabgase entstammen dem Kraftfahrzeugverkehr oder stationären Anlagen und zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Polyaromaten und Nitroaromaten aus. **Bioorganische Stäube** entstammen organischem Material, das seine Herkunft biologischen Prozessen verdankt. Die sehr inhomogene Substanzgruppe umfasst z.B. Nutztierstäube, Labortierstäube, Futtermittel- und Getreidestäube, Nahrungsmittelstäube, Holzstäube sowie milben- und pilzhaltige Stäube, z.B. aus der Abfallwirtschaft. Sie enthalten unter anderem Endotoxine und Glukane. Sie wirken proinflammatorisch, toxisch-irritativ und allergisierend. Auch Umweltstäube aus der Außenluft und insbesondere Innenraumstäube enthalten bioorganische Verunreinigungen (Pollen, Sporen, Milbenkot), die mit Gesundheitsstörungen in Verbindung gebracht werden.

Partikelförmige Luftverunreinigungen beeinträchtigen die menschliche Gesundheit. Die WHO geht global von 460.000 zusätzlichen Todesfällen pro Jahr durch Schwebstäube aus (Schwela 1996). Im Vordergrund epidemiologischer Untersuchungen stehen die Wirkungen partikelförmiger Luftverunreinigungen auf die unteren Atemwege. Dabei zeigte sich ein be-

sonders deutlicher Zusammenhang zwischen Erkrankungen der unteren Atemwege und der Staubfraktion pm_{10} (Donaldson et al. 2000). Beispielhaft für pm_{10} -Wirkungen auf die unteren Atemwege sind die Ergebnisse der in der Schweiz durchgeführten SAPALDIA- und SCARPOL- Untersuchungen, die in Tabelle 1 zusammengefasst dargestellt sind (Braun-Fahrlander et al. 1997; Zemp et al. 1999).

Tabelle 1: Auswirkungen von Veränderungen der Feinstaubkonzentration (pm_{10}) in der Außenluft (Schweiz). Ergebnisse der SAPALDIA- und SCARPOL- Studien (Braun-Fahrlander et al. 1997; Zemp et al. 1999).

	Zunahme in %
Kurzfristige Verschlechterung der Luftqualität um $10 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{pm}_{10}$	
Tägliche Sterblichkeit wegen Atemwegserkrankungen / Asthma	3-4
Krankenhausaufnahmen wegen Atemwegserkrankungen / Asthma	1,5-2
Notfallkonsultationen wegen Asthma	2
Asthmaanfälle	5
Arbeitsunfähigkeiten wegen Atemwegserkrankungen	10
Langfristige Verschlechterung der Luftqualität um $10 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{pm}_{10}$	
Sterblichkeit insgesamt	3-8
Chronische Bronchitis bei Erwachsenen	25
Husten und Auswurf bei Erwachsenen	13
Akute Bronchitis im letzten Jahr bei Kindern	35
Atemwegsbeschwerden bei Kindern	54

Neben Erkrankungen der Atemwege stehen Staubbelastungen auch in Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankungen. In einer Kohortenstudie stieg das Risiko, binnen 16 Jahren an Herz- Kreislaufkrankungen zu sterben, um bis zu acht Prozent je $10 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{pm}_{2,5}$ (Pope et al. 2002). Darüber hinaus erhöhen zahlreiche partikelförmige Luftverunreinigungen das Krebsrisiko (Calderon-Garciduenas et al. 1997; Van den Oever 1996; Zeise et al. 1999).

Die Kenntnisse über den Zusammenhang partikelförmiger Luftverunreinigungen und Erkrankungen der oberen Atemwege sind weniger umfassend (Abbey et al. 1995; Calderon-Garciduenas et al. 1998; Keles et al. 1999; Keles und Ilicali 1998; Pope et al. 1995; Riechelmann 2000a; Riechelmann 2000b; von-Mutius et al. 1995). Dabei gehören Erkrankungen von Nase und Nasennebenhöhlen zu den häufigsten Gesundheitsstörungen in westlichen Industrienationen. Nach einer amerikanischen Erhebung leiden ca. 15% der Befragten an chronischen Nasen- und Nasennebenhöhlenbeschwerden (Benson und Marano 1998). Die epidemiologische Datenlage zu Erkrankungen der oberen Atemwege in Deutschland ist weniger eindeutig. Die Diagnose 'akute oder chronische Sinusitis', einfache Infekte der oberen Atemwege

sind damit nicht erfasst, wurde nach Angaben der IMS Health, Frankfurt von Juli 2000 bis Juni 2001 in der BRD 9,1 Millionen mal gestellt (Bachert et al. 2003). Erkrankungen der oberen Atemwege beeinträchtigen die Lebensqualität nachhaltig und verursachen hohe direkte und indirekte Gesundheitskosten (Benson und Marano 1998; Craig et al. 1998; Durr et al. 2001; Leynaert et al. 2000; Radenne et al. 1999). Außerdem sind chronisch entzündliche Erkrankungen der oberen Atemwege ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung sekundärer Erkrankungen. So haben Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der oberen Atemwege ein relatives Risiko von 11-17, ein Asthma bronchiale zu entwickeln (Leynaert et al. 1999).

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung korrelierte die Zahl der Hausarztbesuche wegen Krankheiten der oberen Atemwege in London mit der Konzentration von Urbanstaub in der Außenluft (Hajat et al. 2002). Ähnlich war in Finnland die Häufigkeit von Erkrankungen der oberen Atemwegen bei Kindern in Gebieten mit hoher Schadstoffbelastung der Außenluft höher als in Reinluftgebieten. Der Unterschied war in erster Linie auf partikuläre Luftverunreinigungen zurückzuführen (Jaakkola et al. 1991). In einer Untersuchung in Alaska stieg die Zahl der Arztbesuche wegen Erkrankungen der oberen Atemwege um 3-6% je $10 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{pm}_{10}$ (Gordian et al. 1996). Ähnliche Zahlen ergaben sich für Santiago de Chile (Ostro et al. 1999). Doch auch niedrig-toxische Stäube können mit Erkrankungen der oberen Atemwege einhergehen. Nach Sandstürmen, die im Südosten des Bundesstaats Washington im Oktober 1991 zu Schwebstaubkonzentrationen bis $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{pm}_{10}$ führten, war die Inzidenz akuter Sinusitiden um 4,5% je $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ erhöht (Hefflin et al. 1994). Stäube in Innenräumen sind ebenfalls mit nasalen Symptomen und einer Erhöhung proinflammatorischer Biomarker im Nasensekret assoziiert (Lonnkvist et al. 1999; Walinder et al. 1999; Walinder et al. 2001).

Epidemiologische Untersuchungen können lediglich eine Assoziation zwischen unterschiedlichen Faktoren wie zum Beispiel Luftschadstoffen und Erkrankungen der Atemwege beschreiben. Um eine Kausalbeziehung herzuleiten, müssen weitere Voraussetzungen erfüllt sein (Bradford-Hill 1966). So können unter anderem Daten aus in-vitro-Studien, tierexperimentellen Studien und Humanexpositionsuntersuchungen die Annahme einer Kausalbeziehung zwischen der Belastung durch staubförmige Luftverunreinigungen und Gesundheitsstörungen stützen.

In-vitro Untersuchungen

In-vitro Untersuchungen zu Wirkungen von Stäuben auf die Atemwege wurden überwiegend an Atemwegsepithelien durchgeführt. Primäre Funktion von Atemwegsepithelien ist es, eine mechanische Barriere zwischen Organismus und inhalativen Noxen zu bilden (Riechelmann 1997). Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass Atemwegsepithelien auch Immunfunktionen wahrnehmen können (Cunningham und Mahon 2001). In Kultur genommene Zellen aus humanem Nasenmuschelgewebe sezernieren schon konstitutiv IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Kenney et al. 1994). Interessanterweise sind primäre humane nasale Epithelzellen auch zur Phagozytose fähig (Boland et al. 1999).

Auch nach Exposition gegenüber nicht-biologischen Luftverunreinigungen setzen Atemwegsepithelien eine Vielzahl von Signalmolekülen frei, die die Immunantwort beeinflussen (Calderon-Garciduenas et al. 1998; Mills et al. 1999). Übereinstimmend zeigte sich in annähernd allen gesichteten Untersuchungen, dass respiratorische Epithelien auf Exposition mit partikelförmigen Luftverunreinigungen IL-6 und IL-8 freisetzen. Während Stäube mit toxischen Inhaltsstoffen eine IL-8 Freisetzung direkt bewirken können, erhöhten niedrig-toxische Stäube die IL-8 Freisetzung von Atemwegsepithelien nicht (Stringer und Kobzik 1998). Anscheinend setzen aber ortsständige Makrophagen nach Exposition gegenüber niedrig-toxischen Stäuben Faktoren frei, die eine IL-8 Sekretion durch respiratorische Epithelien induzieren (Jimenez et al. 2002; Tao und Kobzik 2002).

Partikelförmige Verbrennungsrückstände erhöhten die Freisetzung von IL-8 aus BEAS-2B-Zellen (Diabate et al. 2002; Stringer und Kobzik 1998). Weitere in-vitro Befunde weisen darauf hin, dass epitheliale Rattenlungenzellen auf die Stimulation mit Flugasche reaktive Sauerstoffspezies bilden. Es kommt jedoch nicht zu einem signifikanten Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) (Voelkel et al. 2003). Expositionen mit Dieselrußpartikeln führten bei BEAS-2B-Zellen und bei primären humanen nasalen Epithelzellen zur Sekretion von IL-6 und IL-8 (Steerenberg et al. 1998). Dieselruße induzierten die Freisetzung unterschiedlicher Biomoleküle wie IL-8, GM-CSF, sICAM-1 und RANTES auch aus Bronchialepithelien, wobei Epithel von chronischen Bronchitikern höhere Freisetzungsraten zeigten als Epithelzellen von gesunden Probanden. Bei beiden Gruppen bewirkten Dieselruße eine Reduktion der Ziliartätigkeit (Bayram et al. 1998; Boland et al. 1999; Bonvallot et al. 2001).

Hausstaub induzierte in A549-Lungenzellen dosisabhängig die Sekretion von IL-6 und IL-8 (Saraf et al. 1999). Staub mit hohen Konzentrationen organischer Inhaltsstoffe führt ebenfalls zu erhöhter Zytokinfreisetzung aus Atemwegsepithelien. Endotoxine und 1,3 β -D-Glukan, bekannte biologische Luftverunreinigungen (Peltola et al. 2001), induzieren die Freisetzung von IL-6, IL-8 und RANTES und geringfügig von MCP aus kultivierten Atemwegsepithelien (Abbildung 2). Park und Mitarbeiter beobachteten die dosisabhängige Freisetzung von IL-8 durch BEAS-2B-Zellen nach Stimulation mit Getreidestaub (Park et al. 1999). Staub aus Schweineställen erhöht die Freisetzung zahlreicher Zytokine aus Atemwegsepithelien und Makrophagen (Wang et al. 1999).

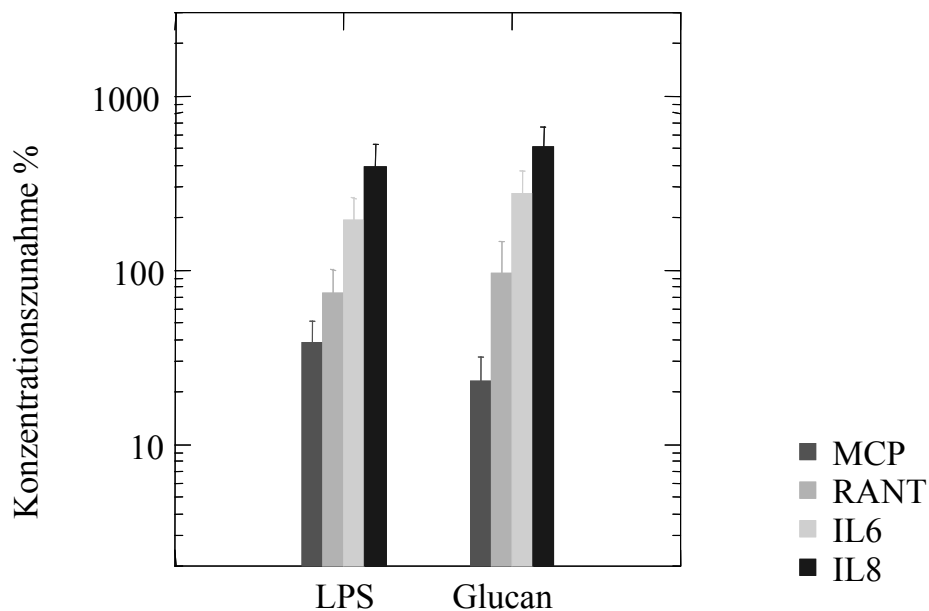


Abbildung 2: Dosisabhängige Zunahme der MCP, RANTES, IL-6 und IL-8 Freisetzung von Atemwegsepithelien nach Stimulation mit LPS und 1,3 β -D-Glukan (Polzehl et al. 2003).

Zusammenfassend ergeben sich demnach *in vitro* deutliche Hinweise darauf, dass nasale Epithelien auf partikelförmige Luftverunreinigungen mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reagieren. Dass diese Zytokine auch pathophysiologisch relevant sind, kann man daraus ersehen, dass sie bei viral oder bakteriell induzierten Erkrankungen der oberen Atemwegschleimhaut regelhaft erhöht sind (Calderon-Garciduenas et al. 1998; Noah et al. 1995c; Noah et al. 1995b; Ohkubo et al. 1998; Suzuki et al. 1996; Varga et al. 1999; Zhu et al. 1997).

Bei Personen mit vorbestehenden nasalen Erkrankungen ist die zelluläre Zusammensetzung der Nasenschleimhaut verändert. Es finden sich wesentlich häufiger modulatorische Zellen und Effektorzellen des Immunsystems, deren Zytokinfreisetzungsprofil sich wesentlich von dem epithelialer Zellen unterscheidet (Bradding et al. 1993). Dieser besondere Umstand bleibt bei Untersuchungen an isolierten Epithelien im Regelfall unberücksichtigt.

Tierexperimentelle Untersuchungen

Grundsätzlich können die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen nur mit Vorbehalt auf die Situation beim Menschen übertragen werden (Brain 1988; Kalberlah et al. 1999). Ein wesentlicher Vorteil tierexperimenteller Untersuchungen besteht in der Möglichkeit, Langzeiteffekte auch stark toxischer Umweltschadstoffe unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen.

Bei Ratten können niedrig-toxische Partikel entzündliche Veränderungen der Lungen auslösen, wahrscheinlich durch die Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen sowie durch Überlastung weiterer Clearance- Mechanismen (Oberdorster 1995). Die Auswirkungen niedrig-toxischer Partikel ("particulates (insoluble) not otherwise classified" (PNOC) gemäß ACGIH) auf die Atemwege von Ratten zeigten, dass Titandioxid und Bariumsulfat unterschiedliche auf die Clearance- Raten und die Translokation der Partikel in ortsständige Lymphknoten wirkten. Titandioxid induzierte eine deutlich ausgeprägtere neutrophile Entzündungsreaktion in der BAL als Bariumsulfat. Die Autoren führen diese Veränderungen auf unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen und Oberflächencharakteristika zurück. (Cullen et al. 2000; Donaldson 2000; Driscoll et al. 1990; Tran et al. 2000; Warheit et al. 1997). Darüber hinaus führt die Langzeit- Exposition gegenüber Titanoxid zu einer erhöhten Tumorraten und geht mit der Bildung pulmonaler Keratinzysten einher (Warheit et al. 1996). Inwiefern niedrig-toxische Stäube eine nasale Entzündungsreaktion auslösen können, ist tierexperimentell nicht untersucht.

Umweltstäube ($360 \mu\text{g}/\text{m}^3$) induzierten tierexperimentell eine Blutneutrophilie und bei Tieren mit experimentell induzierter pulmonaler Hypertonie eine Erhöhung der Proteinfraction der

BAL als Ausdruck einer Entzündungsreaktion. Außerdem kam es als Ausdruck einer Stressreaktion zu erhöhter Pulsfrequenz während der Staubexposition im Vergleich zur Kontrollexposition (Gordon et al. 1998). Urbane Feinstäube (MMAD 0,18 μm) führten in Konzentrationen zwischen 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ über drei Tage bei Ratten zu einer Erhöhung von Neutrophilen und Lymphozyten in der BAL, vergesellschaftet mit Veränderungen unterschiedlicher atemphysiologischer Parameter. Außerdem wurde eine Verengung pulmonaler Blutgefäße beobachtet, die auf eine Beeinflussung der perivaskulären Muskulatur zurückgeführt wurde (Batalha et al. 2002; Clarke et al. 1999; Saldiva et al. 2002). Eine erhöhte Infektionsrate bei Influenzavirus-Inokulation beobachteten Hahon und Mitarbeiter bei Ratten nach Exposition gegenüber Kohlestäuben und Dieselabgasen (Hahon et al. 1985). Dieselruße führten bei Meerschweinchen zu nasaler Hyperreagibilität, Eosinophilie und erhöhter Antigenabsorption (Hiruma et al. 1999). Urbane Luftverunreinigungen führten zu strukturellen Veränderungen der Nasenschleimhaut bei Ratten. Es zeigte sich eine Becherzellhyperplasie, eine Veränderung des sezernierten Mukus sowie Zilienschäden (Lemos et al. 1994; Saldiva et al. 1992).

Siliziumdioxid (2 mg/m^3 für 5 Monate) führte bei Ratten zu einer Erhöhung der Immunreaktivität für SP und der Präprotachykinin-mRNA-Expression im Ganglion trigeminale, was von den Autoren als Ausdruck einer Aktivierung sensibler Bahnen im Rahmen einer neurogen mitverursachten Entzündung interpretiert wurde (Hunter et al. 1998). Ebenfalls nach Siliziumdioxid-Exposition bei Ratten wurde eine Lymphozytose der BAL ohne Erhöhung des Alveolarmakrophagenanteils beobachtet. Außerdem zeigten sich interstitielle Lungenveränderungen (Oghiso et al. 1986). Die Exposition mit Siliziumdioxid führte zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Influenzavirus-Infektionen (Zarkower et al. 1979).

Für Stäube mit organischen Inhaltsstoffen wurden tierexperimentell zahlreiche proinflammatorische Effekte beobachtet. So führte die Exposition gegenüber baumwollhaltigen Stäuben (33 mg/m^3 Baumwollstaub) bei Meerschweinchen zu einer akuten Entzündungsreaktion der Atemwege mit erhöhter Atemfrequenz, Husten und Bronchokonstriktion. Die Autoren vermuten, dass der Endotoxingehalt baumwollhaltiger Stäube für diese Effekte sowie für die erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Werte in der BAL verantwortlich ist. (Ryan und Karol 1991). Die proinflammatorischen Wirkungen von Endotoxinen wurden in weiteren tierexperimentellen Untersuchungen bestätigt (Urbain et al. 1999), unter anderem wurde nach Exposition von Mäusen gegenüber

Maisstäuben eine erhöhte Genexpression für $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, und $\text{MIP-2}\alpha$ beobachtet, die mit einer Neutrophilie der BAL vergesellschaftet war (Wohlford-Lenane et al. 1999; Yuen et al. 1996). Ein vor allem veterinärmedizinisches Problem ist die atrophische Rhinitis des Hauschweins durch Ammoniak und organische Stäube in Ställen (Hamilton et al. 1999).

Humanexpositionsuntersuchungen

Humanexpositionsuntersuchungen haben den Vorteil der Realitätsnähe. Die Unsicherheiten eines Interspezies-Vergleichs oder gar der Extrapolation von in-vitro Untersuchungen auf die reale Expositionssituation entfallen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, dass besonders gefährdete Personengruppen untersucht werden können, die auf Schadstoffexposition möglicherweise sensibler reagieren als Gesunde mittleren Lebensalters (van der Zee et al. 2000). Im Regelfall handelt es sich hierbei um Personen höheren Lebensalters oder um Personen mit vorbestehenden Atemwegserkrankungen oder Immunstörungen. Kinder, ebenfalls eine besonders gefährdete Gruppe, kommen für Expositionsuntersuchungen im Regelfall nicht in Frage, da sie nicht eigenverantwortlich in solche Untersuchungen einwilligen können. Aus ethischen Gründen darf die Toxizität der Exposition die reale Exposition im Alltags- und Berufsleben nicht wesentlich übersteigen. Aus praktischen Gründen ist die Expositionszeit meist auf einige Stunden beschränkt, es handelt sich somit um Akutexpositionsuntersuchungen. Während schon für subakute (14-tägige) Exposition Zeitextrapolationen auf subchronische (90 Tage) und chronische (2 Jahre) Expositionssituationen üblich sind (Kalberlah et al. 1999), ist dies für akute Expositionen nicht möglich. Umweltmedizinische Aussagen sind demzufolge auch nur für tatsächliche Akutexpositionen sinnvoll.

Der eingeschränkte Dosis- und Zeitrahmen bei Humanexpositionsuntersuchungen macht es erforderlich, expositionsbezogene Veränderungen mit möglichst sensitiven Methoden zu erfassen und progressiv zu interpretieren. Es ist nicht zu erwarten, dass Akutexpositionen mit potentiellen Schadstoffen in umweltrelevanten Konzentrationen zu gravierenden Veränderungen physiologischer Parameter führen. Man darf darauf vertrauen, dass der Gesetzgeber in diesem Fall schon in früheren Jahren adäquate Maßnahmen zur Expositionsbegrenzung ergriffen hätte. Es geht also darum, subtile Veränderungen relevanter Messparameter zu erfassen. Auch hinsichtlich der eingesetzten Stoffkonzentrationen hat der Akutcharakter von Humanexpositionsuntersuchungen Bedeutung. Es macht wenig Sinn, sich an Jahresmittelwerten von Schadstoffkonzentrationen zu orientieren. Vielmehr orientiert man sich an Spitzenbelastungen

in besonderen Belastungsgebieten, in der Regel industriellen oder urbanen Agglomerationszonen.

Die Ergebnisse von Humanexpositionsuntersuchungen können unter diesen Gesichtspunkten dazu beigetragen, tolerable Spitzenbelastungswerte zu definieren. Darüber hinaus sind sie geeignet, pathophysiologische Mechanismen der Schadstoffwirkung zu beschreiben. Humanexpositionsuntersuchungen erlauben auch, die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Schadstoffwirkungen zu beobachten und Toxizitätsvergleiche unterschiedlicher Schadstoffe anzustellen.

Niedrig-toxische Stäube (Plastikpartikel mit Kohlestaub in Konzentrationen von 2–25 mg/m³, MMAD 2-12 µm) führten in einer Humanexpositionsuntersuchung über 5h zu nasalen Missempfindungen und einer Abnahme des FEV₁. Die nasale mukoziliare Clearance oder der nasale Atemwegswiderstand veränderten sich dabei nicht (Andersen et al. 1979).

Verbrennungsrückstände (Flugasche 250 µg/m³, MMAD 0,5 µm) mit und ohne gleichzeitige Exposition gegenüber schwefliger Säure führten zu entzündlichen Veränderungen der Atemwegsschleimhaut (Anderson et al. 1992) und zu erhöhter bronchialer Reagibilität bei Asthmatikern (Anderson et al. 1992). Eine Beeinflussung des mukoziliaren Transportsystems durch Kohlestäube wiesen Untersuchungen von Camner und Mitarbeitern nach (Camner et al. 1973). Heizölasche führte bei Heizkesselarbeitern zu einer Neutrophilie in der nasalen Lavageflüssigkeit (Hauser et al. 1995). Nach Exposition mit Dieselruß wurde eine gesteigerte nasale IgE-Produktion beobachtet (Diaz-Sanchez et al. 1994). Es wurde darüber hinaus beobachtet, dass sowohl gesunde Probanden als auch Beifuss-Allergiker auf nasale Dieselrußexposition mit einer gesteigerten IgE-Synthese reagierten (Nel et al. 1998). Dieselruße induzierten zudem eine nasale Hyperreagibilität (Kobayashi und Ito 1995)

Umweltstäube führten bei gesunden freiwilligen Probanden ca. 18h nach der Exposition in einer Konzentration von 300 µg/m³ zu einer Neutrophilie in der BAL sowie zu einer Erhöhung des Blutfibrinogens (Ghio et al. 2000). Über Veränderungen der Nasenschleimhaut nach experimenteller Exposition gegenüber Umweltstäuben liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Stäube mit biologischen Inhaltsstoffen sind wegen ihrer arbeitsmedizinischen Bedeutung gut untersucht. Getreidestäube führten bei 15 Probanden zu einer erhöhten IL-1β und IL-8 Frei-

setzung aus bronchialen Epithelien, während Bronchialepithelien in dieser Untersuchung keine Veränderungen von IL-6 und TNF α zeigten. Die Zellen der BAL, überwiegend Alveolarmakrophagen, exprimierten ähnliche IL-8-mRNA Mengen wie Bronchialepithelien, aber die IL-1 mRNA-Expression lag bei Alveolarmakrophagen 11 mal höher (Becker et al. 1999). Die Autoren folgerten, dass sich die immunologische Antwort auf biologische Stäube in Bronchien und Alveolen unterscheidet. Dies ist vor allem durch die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung der Gewebe bedingt. Ein für die toxischen Wirkungen biologischer Stäube wesentlicher Inhaltsstoff ist LPS. In mehreren Untersuchungen induzierten biologische Stäube sehr ähnliche Veränderungen wie analog konzentriertes LPS (Jagiello et al. 1996; Keman et al. 1998). Neben LPS führt 1,3 β -D-Glukan aus der Zellwand von Pilzen zu nasaler IL-6 Freisetzung, wobei LPS potenter war als Glukan (Sigsgaard et al. 2000)

Beschäftigte in der Abfallwirtschaft (Stalder und Verkoyen 1994) und in landwirtschaftlichen Betrieben (Nowak 1997) sind hohen biologischen Schwebstaubbelastungen ausgesetzt. Nach dreistündigem Aufenthalt freiwilliger Probanden im Käfigbereich einer Hühnerfarm (Staubbelastung: 4000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, Endotoxinbelastung: 100 ng/m^3) wurden akut entzündliche Veränderungen der Nasenschleimhaut und eine erhöhte bronchiale Reagibilität beobachtet (Clapp et al. 1993; Larsson et al. 1999). Eine konzentrationsabhängige Zunahme von IL-6 in der nasalen Lavage zeigte sich nach Exposition gegenüber Staub in Sägewerken (Dahlqvist et al. 1996). Holzstäube führten in einer Untersuchung außerdem zu nasaler Obstruktion (Schlunssen et al. 2002).

Fragestellung

In den zwei geförderten Projekten sollten Wirkungen von Stäuben auf die oberen Atemwege untersucht werden. Dabei ging es um folgende Fragen:

- 1) Induzieren niedrig-toxische Stäube eine subklinische nasale Entzündungsreaktion?
- 2) Induzieren niedrig-toxische Stäube eine Veränderung der subjektiven nasalen Befindlichkeit?
- 3) Induzieren Urbanstäube eine subklinische nasale Entzündungsreaktion?
- 4) Induzieren Urbanstäube eine Veränderung der subjektiven nasalen Befindlichkeit?

- 5) Sind mögliche Effekte eher von der Konzentration der Stäube oder von deren chemischen Zusammensetzung abhängig?
- 6) Lassen sich Kenntnisse zur Zeit- und Konzentrationskinetik einer nasalen Entzündungsantwort auf die Staubexpositionen gewinnen.

Dabei sollten bestimmte Rahmenbedingungen eingehalten werden. So sollten die Expositionskonzentrationen realen Umweltbelastungen in Baden-Württemberg entsprechen, die Untersuchungen sollten an gesunden freiwilligen Probanden durchgeführt werden und 3 Stunden dauern. Es war ein explorativer Studiencharakter mit wiederholten Messungen an den gleichen Probanden nach Exposition gegenüber unterschiedlichen Staubkonzentrationen vorgesehen. Die Frage nach einer subklinischen Entzündungsreaktion sollte durch Bestimmung der Konzentration proinflammatorischer Zytokine und des Färbeindex typischer Entzündungszellen im Nasensekret 30 min, 8 h und 24 h nach Expositionsende operationalisiert werden. Die subjektive nasale Befindlichkeit sollte anhand visueller Analogskalen erfasst werden.

Die Ergebnisse sind relevant für die umweltmedizinische Bewertung kurzfristiger Spitzenbelastungen mit niedrig-toxischen Stäuben und partikelförmigen Staubbelastungen in städtischen Agglomerationszonen. Sie dienen damit auch als Beitrag zur Grenzwertdiskussion für diese Luftverunreinigungen. Darüber hinaus können relevante Daten zur aktuellen Frage gewonnen werden, ob ein lediglich die Konzentration berücksichtigender Grenzwert die umweltmedizinische Bedeutung partikelförmiger Luftverunreinigungen ausreichend charakterisiert. Möglicherweise sollte, wie in der Arbeitsmedizin, eine Gruppe von Indikatorsubstanzen in Umweltstäuben identifiziert werden, die deren Gefährdungspotential differenziert beurteilen lässt.

Material und Methoden

Es handelte sich um zwei Teilprojekte mit unterschiedlichen Probandenkollektiven. Im Teilprojekt I wurden die Effekte einer 3-stündigen Exposition mit niedrig-toxischem Kalziumkarbonatstaub in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 150, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ untersucht. Im Teilprojekt II wurden die Effekte einer 3-stündigen Exposition mit dem Urbanstaub SRM 1649a in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 150 und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ untersucht. Die ursprünglich geplante Exposition mit 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ wurde auf Empfehlung der Gutachter nicht durchgeführt.

Probandenkollektive

Das erste Kollektiv umfasste 32 Probanden und wurde vom 10. Januar 1999 bis 30. Juni 2000 rekrutiert. Neunzehn Probanden waren männlich, 13 weiblich, das Alter lag zwischen 20 und 30 Jahren. Das zweite Kollektiv umfasste 30 freiwillige Probanden (11 männlich, 19 weiblich) im Alter von 22 bis 32 Jahren, die vom 15. Dezember 2000 bis 10 Juli 2001 rekrutiert wurden.

Es handelte sich um Studenten der Universität Ulm, die sich auf einen Aushang im Hörsaal freiwillig meldeten. Für die Teilnahme wurde eine adäquate Aufwandsentschädigung gezahlt. Die Probanden unterzogen sich einer Eingangsuntersuchungen durch einen Arzt der Universitätsklinik und Hochschulambulanz für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Ulm. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde eine vordere und hintere Rhinoskopie, ein Hauttest gegen gängige Inhalationsallergene und bei klinischem Verdacht eine Ultraschalluntersuchung der Nasennebenhöhlen zum Ausschluss einer Sinusitis durchgeführt. Im Rahmen diese Untersuchung wurde die Einhaltung der Einschluss- und Ausschlusskriterien (Tabelle 2) geprüft.

Für beide Teilprojekte wurde eine Stellungnahme der Ethikkommission der Universität Ulm eingeholt (Nr. 137/96 und Nr. 200/2000). Die Probanden wurden schriftlich und mündlich eingehend über den Versuch und mögliche Risiken informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter zwischen 18 und 60 Jahren	Schwangerschaft oder Stillzeit klinisch relevante Nasenscheidewandverkrümmung oder Nasenmuschelhyperplasie Nasentropfenmissbrauch
Nichtrauchen	akute oder chronische Erkrankungen von Nase und Nasennebenhöhlen
Einverständnis bei vollständiger Information	Zustand nach Nasennebenhöhlenoperation
Zusage, an allen Untersuchungsterminen zu erscheinen	akute oder chronische Erkrankungen der unteren Atemwege, hyperreagibles Bronchialsystem, Lungenemphysem
Unterzeichnen der Probandeninformation/Einwilligungserklärung.	Allergie gegen Inhalationsallergene Therapie mit oralen Steroiden oder nicht-steroidalen Antiphlogistika in den letzten 6 Wochen sonstige schwerwiegende Erkrankungen

Tabelle 2: Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an den Expositionsuntersuchungen in Teilprojekt I und II

Staubexpositionen

Im Teilprojekt I wurde jeder Proband drei mal für je drei Stunden Kalziumkarbonat-Staub nasal exponiert. Die applizierten Staubkonzentrationen betragen $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Eine vierte, ebenfalls dreistündige Exposition mit $0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Staub (Reinluftfilter gefilterte Luft) diente als Kontrollmessung. Die Probanden wurden randomisiert einer von vier Expositionsreihenfolgen zugeordnet. Für Reihenfolgen der Expositionen wurde ein balanciertes Versuchsdesign gewählt (Tabelle 3). Vor und nach jeder Exposition wurde von den Probanden die nasale Befindlichkeit anhand visueller Analogskalen erfasst. Dreißig Minuten, acht Stunden und 24 Stunden nach jeder Exposition wurden den Probanden mittels Schaumstoffsammlern Sekret und Zytologien aus der Nase entnommen. Zwischen den einzelnen Expositionen eines Probanden wurde ein Zeitintervall von 1 Woche eingehalten, um Sequenzefekte zu reduzieren. Die Versuche erfolgten einfach verschleiert, d. h. der Proband wusste nicht, welche Staubkonzentration gerade verwendet wurde.

	1. Exposition	2. Exposition	3. Exposition	4. Exposition
Exp.-Reihenfolge 1 (n=8)	0 µg/m ³	150 µg/m ³	500 µg/m ³	1000 µg/m ³
Exp.-Reihenfolge 2 (n=8)	150 µg/m ³	1000 µg/m ³	0 µg/m ³	500 µg/m ³
Exp.-Reihenfolge 3 (n=8)	1000 µg/m ³	500 µg/m ³	150 µg/m ³	0 µg/m ³
Exp.-Reihenfolge 4 (n=8)	500 µg/m ³	0 µg/m ³	1000 µg/m ³	150 µg/m ³

Tabelle 3: Expositionsreihenfolge und Expositionskonzentrationen nasaler Kalziumkarbonatstaubexpositionen in Teilprojekt I.

In Teilprojekt II wurde jeder Proband für je 3 Stunden dem Urbanstaub 1649a in Konzentrationen von 150 und 500 µg/m³ exponiert. Eine weitere Exposition mit Reinfluftfilter-Luft diente als Kontrolle (0 µg/m³). Das weitere Vorgehen entsprach dem Teilprojekt 1. Für die Expositionen wurde ein Versuchsplan mit Messwiederholungen gewählt, wobei 3 von 6 möglichen Expositionsreihenfolgen realisiert wurden (Tabelle 4). Zwischen den einzelnen Expositionen wurde zur Vermeidung möglicher Sequenzeffekte ein Zeitintervall von mindestens einer Woche eingehalten. Die Versuche erfolgten wiederum einfach verschleiert, d. h. der Proband wusste nicht, welche Staubkonzentration gerade verwendet wurde.

	1. Exposition	2. Exposition	3. Exposition
Expositionsreihenfolge 1 (n = 10)	0 µg/m ³	500 µg/m ³	150 µg/m ³
Expositionsreihenfolge 2 (n = 10)	150 µg/m ³	0 µg/m ³	500 µg/m ³
Expositionsreihenfolge 3 (n = 10)	500 µg/m ³	150 µg/m ³	0 µg/m ³

Tabelle 4: Expositionsreihenfolge und Expositionskonzentrationen nasaler Urbanstaubexpositionen in Teilprojekt II.

Nasales Expositionssystem

Die Expositionen erfolgten über nasales ('nose only') Expositionssystem (Abbildung 3) mit einer dicht sitzenden Nasenmaske (Comfort classic, Respironics Deutschland, Herrsching). Bei normaler Nasenatmung beträgt der Spitzenfluss während der Einatmung ca. 30 l/min. Dieser Flusswert muss in der Nasenmaske zur Verfügung gestellt werden, um problemloses

Einatmen ohne Sogkräfte im System zu ermöglichen. Bei geringerem Einatemstrom oder bei Ausatmung wird überschüssige Luft über ein leichtgängiges Rückschlagventil der Maske entsorgt. Der Volumenstrom in der Atemmaske wurde bei allen Versuchen auf 34 l/min eingestellt.

Um die benötigten sehr niedrigen Staubkonzentrationen zu erreichen, musste zunächst ein Primäraerosol hergestellt und nachverdünnt werden. Hierzu wurde Druckluft nach Passage durch einen Reinluftfilter (BB50T, Firma Pall GmbH, Dreieich) zunächst durch einen Gaswaschbehälter (25l Fassungsvermögen, Edelstahl, Sonderanfertigung der Abteilung Biomedizintechnik des Universitätsklinikums Ulm) geleitet und auf 40% rel. Feuchte und 20°C gebracht. Über eine Ventil-Rohrweiche (QH-1/2, Festo AG, Esslingen) wurde der Luftstrom geteilt. Ein Teil wurde mit konstantem Volumenfluss durch einen Staubgenerator geleitet. Dort wurde der Luft der Teststaub mit konstantem Massestrom beigemischt (Primäraerosol). Es wurde also bei allen Versuchen zunächst unter konstantem hohem Volumenfluss ein konstant konzentriertes Primäraerosol hergestellt. Der überwiegende Teil dieses Primäraerosols wurde über eine Ventil-Rohrweiche (QH-1/2, Festo AG, Esslingen) in einen Abscheider geleitet und als Überschussanteil verworfen.

Ein variabler Nutzanteil des Primäraerosols wurde in einen Verdünnungsluftstrom in unterschiedlichen Volumenstrom-Relationen eingeleitet, um das Sekundäraerosol mit den gewünschten Staubkonzentrationen herzustellen. Der Volumenfluss des Primäraerosols, der dem Verdünnungsluftstrom zugeführt wurde, wurde je nach benötigter Endkonzentration des Sekundäraerosols über einen Schwebekörper-Durchflussmesser (RAGH01, Yokogawa Deutschland GmbH, Ratingen) reguliert.

Das Sekundäraerosol wurde konstant auf einem Volumenfluss von 34 l/min gehalten. Möglicherweise im Aerosol entstehende Staubaggregate wurden durch einen Low-Pass-Filter (KSL-Staubtechnik, Lauingen) vor der Maske ausgefiltert. Direkt vor der Maske wurde ein Partikelzähler (Royco Microair 5230, Pacific Scientific Instruments, Ludinghausen, Deutschland) angeschlossen. Alle Rohrleitungen waren innen kantenfrei aus antistatischem Material gefertigt (PUN-12x2-SI, Festo AG & Co. KG, Esslingen) und so kurz wie möglich ausgeführt, um Staubansammlungen im Expositionssystem zu reduzieren.

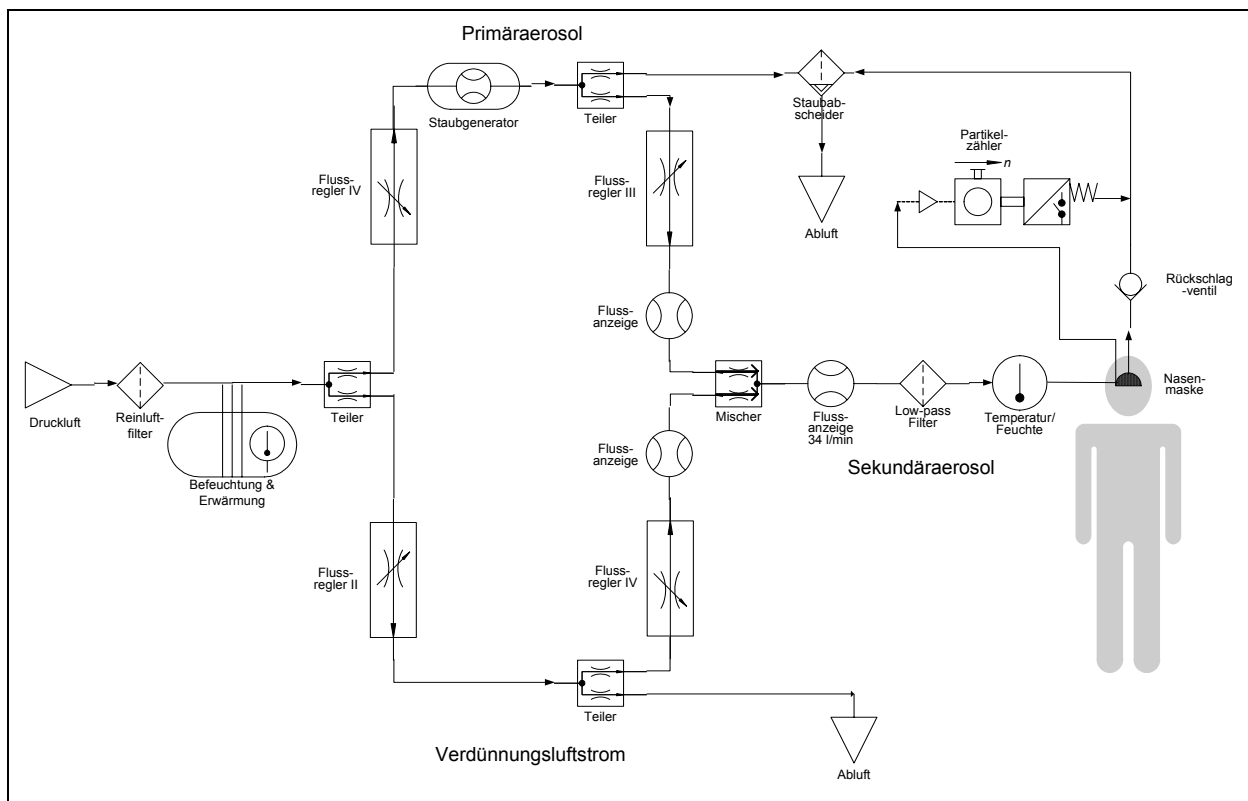


Abbildung 3: Schema des nasalen Expositionssystems. Druckluft wurde zunächst gefiltert, befeuchtet und erwärmt und dann geteilt. In den einen Luftstrom wurde der Teststaub eingebracht (Primäraerosol), der zweite Luftstrom diente der Verdünnung des Primäraerosols. Die Staubkonzentrationen im Sekundäraerosols wurde durch das Mischungsverhältnis von Primär- und Verdünnungsluft bestimmt. Das Sekundäraerosol wurden den Probanden über eine Nasenmaske zugeführt.

Aerosolgeneratoren

Im Teilprojekt I wurde eine Vibrierteller-Dispersionseinheit (P2, KSL-Staubtechnik, Lauingen) zur Staubgenerierung eingesetzt. Hierbei rieselt der Teststaub durch eine feine Öffnung mit verstellbarer Blende auf einen Vibrierteller, über den ein Luftstrom geleitet wird. Im Teilprojekt II wurde ein Small-Scale Powder Dispenser (Modell 3433, TSI GmbH, Aachen) eingesetzt (Abbildung 4). Es handelt sich um eine Drehteller-Dispersionseinheit. Der zu dispergierende Staub wird in die konzentrisch angeordneten Rillen des Drehtellers eingebracht und von dort mit einer Venturi-Düse abgesaugt. Beim Übergang von der Absaugkapillare zur Venturi-Düse werden aufgrund der dort herrschenden Scherkräfte agglomerierte Staubpartikel aufgebrochen.

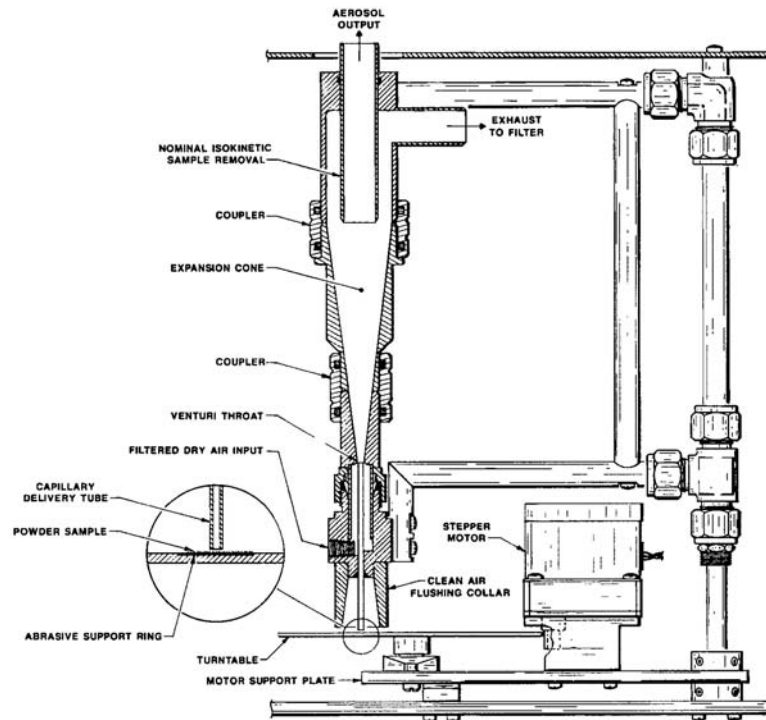


Abbildung 4: Schemazeichnung des Small-Scale Powder Disperser, Modell 3433. In einer auf dem Drehteller (“turntable”) eingelassenen Rille wurde eine definierte Staubmenge eingebracht, die mittels der Absaugkapillare (“capillary delivery tube”) in einen Gasstrom eingebracht wurde.

Um die in das Primäraerosol eingebrachte Staubmenge zu reduzieren, wurde der Schrittmotor im Rahmen einer Sonderanfertigung stärker untersetzt. Da über die Drehteller-Umdrehungsfrequenz in dieser Spezialuntersetzung keine werksseitigen Angaben vorlagen, wurde die Drehteller-Umdrehungsfrequenz in Abhängigkeit von den Drehreglereinstellungen des Dispersers ermittelt (Abbildung 5). Es zeigte sich, dass in Drehreglerstellung 3 der Drehteller in ca. 3h eine Umdrehung durchführt. Da dies der geplanten Expositionszeit entsprach, wurde diese Schalterstellung für alle Untersuchungen gewählt.

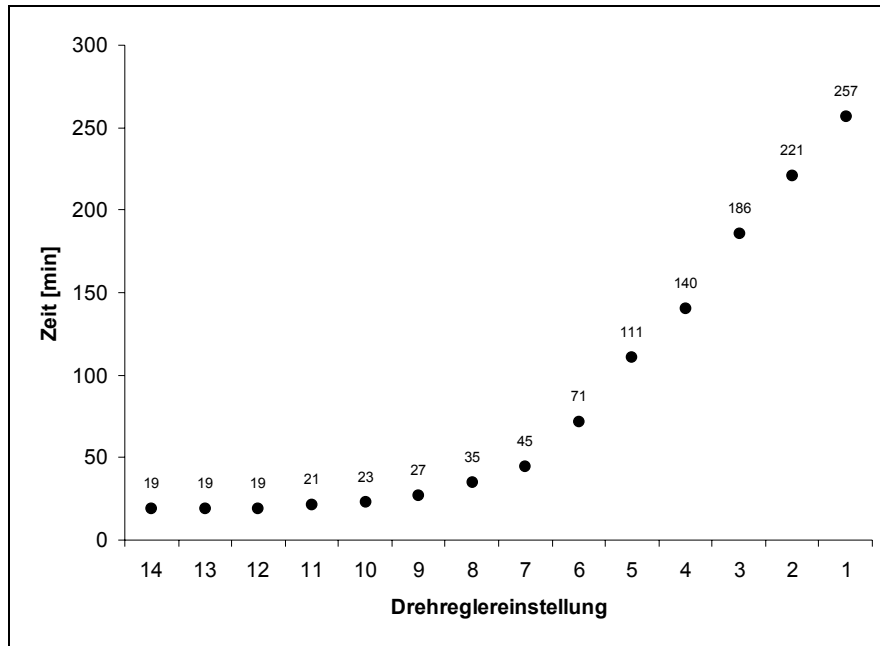


Abbildung 5: Umdrehungszeit des Drehtellers (min) des Small-Scale Powder Dispersers in Abhängigkeit von der Drehreglereinstellung nach zusätzlicher Unter-
setzung des Stepermotors.

Laserpartikelzähler

Mit einem Laserpartikelzähler konnten die aktuellen Partikelzahlen im Expositionssystem nach Korngrößen aufgeschlüsselt annähernd in Echtzeit erfasst werden. So konnte während eines Expositionsversuches sichergestellt werden, dass der Proband auch tatsächlich die gewünschten Staubkonzentrationen einatmet. In den vorgestellten Untersuchungen wurde der Mehrkanal-Laserpartikelzähler Royco Microair 5230 (Pacific Scientific Instruments, Ludinghausen) eingesetzt. Die Messzelle des Laserpartikelzählers besteht aus einem Messkanal und einer Laserdiode. Am Gerät lassen sich acht Kanäle für die Erfassung von acht unterschiedlichen Partikelgrößen einstellen. Die Größenverteilung des Kalziumkarbonat-Staubs wurde dem Datenblatt zu Eskal 15 entnommen und die acht Kanäle von 10 μm bis 26 μm bei einer Schrittweite von 2 μm programmiert. Der Partikelzähler wurde mit einem Computer verbunden und die vom Laserpartikelzähler gelieferten Daten kontinuierlich aufgezeichnet. Verwendet wurde die vom Hersteller des Laserpartikelzählers mitgelieferte Software Royco Logger Version 1.5 (Pacific Scientific Instruments, Ludinghausen, Deutschland).

Kalziumkarbonatstaub

Im Teilprojekt I wurde ein Kalziumkarbonat-Staub mit einem massemedianen aerodynamischen Durchmesser von 15 µm (Eskal 15, KSL Staubtechnik, Lauingen) verwendet. Eskal 15 besteht zu 99,1 % aus CaCO₃, weitere Bestandteile sind MgCO₃, SiO₂ (< 0,25 %), Al₂O₃ und Fe₂O₃. Die Partikelgrößenverteilung geht aus Abbildung 6 hervor..

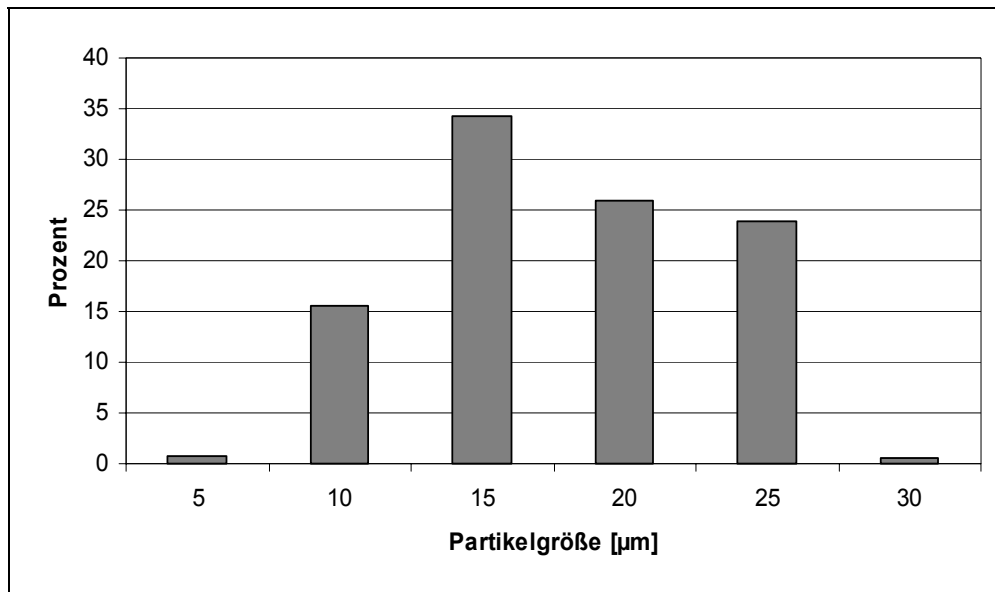


Abbildung 6 Verteilung der Partikelgrößen von Eskal 15

Die benötigten Partikelzahlen wurden anhand der Angaben im Datenblatt des Herstellers rechnerisch ermittelt. Geht man von einem mittleren aerodynamischen Durchmesser von 15 µm aus, berechnet sich das Volumen eines Partikels nach $V = \frac{\pi}{6} * d^3$. Bei einem spezifischen Gewicht 2,7 g/cm³ ergibt sich nach $G = \rho * V$ das Gewicht eines Teilchens. Demnach beziffert sich die Anzahl der Teilchen in 1 µg Eskal 15 zu 209,6 ≈ 210 Teilchen. Daraus resultieren die Partikelzahlen für die gewünschten Staubkonzentrationen von 150, 500 und 1000 µg/m³ zu 31 500/m³, 105 000/m³ und 210 000/m³. Der verwendete Partikelzähler hat ein Messvolumen von 28,32 Litern. Demnach müssen für die gewünschten Staubkonzentrationen die Volumenflüsse von Primäraerosol und Verdünnungsaerosol so eingestellt werden, dass sich Partikelzahlen von 900, 3000 und 6000 ergeben.

Urbanstaub

Bei dem verwendeten Staub handelt es sich um das Referenzmaterial SRM 1649a des “National Institute of Standards & Technology (NIST)” des Wirtschaftsministeriums der USA (May et al. 1992). SRM 1649a wurde in Washington DC während eines Jahres gesammelt. Wesentliche Staubinhaltsstoffe (zahlreiche PAK, PCB-Kongenere, halogenierte Kohlenwasserstoffverbindungen, Metalle usw.), der Gesamt-Kohlenstoffanteil, die Mutagenität und die Verteilung der Partikelgrößen sind bei diesem Staub gut charakterisiert. Die wichtigsten charakterisierten Inhaltsstoffe sind:

- 22 polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (47,27 mg/kg)
- 35 polychlorierte Biphenyle (893 µg/kg)
- 8 chlorierte Pestizide (411 µg/kg)
- Kohlenstoff (176,8 g/kg)
- 25 verschiedene Metalle mit einem Anteil von 2230 mg/kg. Hauptelemente sind Barium, Cadmium, Chrom, Kupfer, Mangan, Nickel und Vanadium.

Die genauen Analysen gehen aus dem Prüfzertifikat hervor, das unter <http://patapco.nist.gov/srmcatalog/certificates/1649a.pdf> abrufbar ist. SRM 1649a ähnelt in seiner Zusammensetzung urbanen Stäuben in Baden-Württemberg (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg 1998). Die Korngrößenverteilung geht aus Tabelle 5 hervor. Bei der angegebenen Korngrößenverteilung handelt es sich um flächengewichtete Laserdiffraktionsmessungen, durchgeführt von der Fa. Honeywell, Particle and Components Measurement Laboratory, USA. Der Anteil an Partikeln mit einem Durchmesser von mehr als 10 µm ist für Untersuchungen an der Nasenschleimhaut günstig.

Tabelle 5 Korngrößenverteilung von SRM 1649a

Perzentil	Flächendurchmesser (Gruppenmittel in µm)
0-10	2,5
11-20	4,3
21-30	5,8
31-40	7,3
41-50	9,3
51-60	11,6
61-70	14,5
71-80	18,9
81-90	27,7
90-100	37,9

Da bei SRM1649a die Korngrößenverteilung wesentlich stärker streut als bei ESKAL 15, ist eine Berechnung der im Expositionssystem einzusetzenden Staubmengen anhand der Partikelzahl unzuverlässig. Deswegen wurde ein anderer Weg zur Eichung des Expositionssystems beschritten. Eine Rille des Drehtellers wurde so ausgefräst, dass darin 13,2 Milligramm des Urbanstaubs eingebracht werden können. Die Rotationsgeschwindigkeit des Drehtellers wurde über den angeschlossenen Schrittmachermotor so eingestellt, dass der Drehteller in drei Stunden eine vollständige Umdrehung ausführte. Die Parameter “abgewogene Staubmenge”, “Rotationsgeschwindigkeit” und “Spurrille” waren bei allen Expositionen konstant. Die erforderlichen Staubkonzentrationen 150 und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ wurden ausschließlich über die Nachverdünnung des Primäraerosols erzielt.

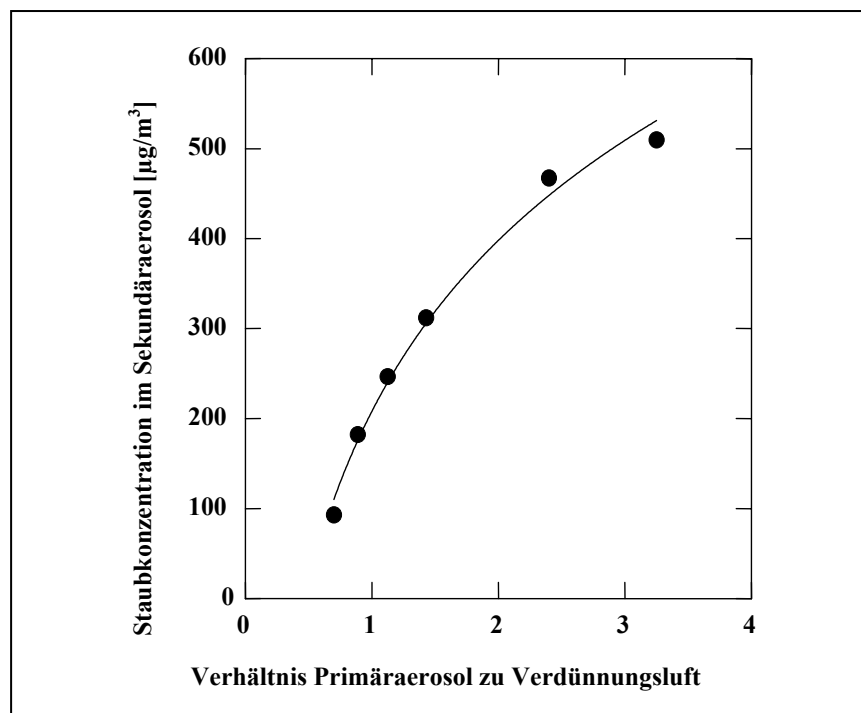


Abbildung 7: Urbanstaubkonzentration im Sekundäraerosol in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses von Primäraerosol und Verdünnungsluftstrom

Zur Eichung des Expositionssystems wurde die Atemmaske durch einen Membranfilter (EMFAB, 47 mm, Pall Corporations, Dreieich) ersetzt. Vor und nach der dreistündigen Eichexposition wurde die Membranfilterscheibe gewogen (BP211 D, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und aus der Gewichts Differenz die Staubmenge im Filter berechnet. Das Luftvolumen, das in diesen 3h den Filter durchströmt hatte, berechnet sich zu $34 \text{ l}/\text{min} * 180 \text{ min} = 6,12 \text{ m}^3$. Bei einer gewünschten Staubkonzentration von $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sollte unter diesen Bedingungen 0,92 mg Staub im Filter befinden, bei einer Expositionskonzentration von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$

sollten es 3,06 mg sein. Es wurde dann eine Eichkurve für die Staubkonzentrationen im Sekundäraerosol erstellt, indem die Volumenflüsse des Primäraerosols und des Verdünnungsluftstroms verändert wurden, der Volumenstrom des Sekundäraerosols aber immer konstant 34 l/min betrug. Aus den erhaltenen Messwerten wurde eine Eichkurve erstellt (Abbildung 7).

Für ein Sekundäraerosol von nominell $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub und einem Volumenstrom von 34 l/min wurden 16 l/min Primäraerosol und 18 l/min Verdünnungsaerosol gemischt, für ein Sekundäraerosol von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ waren 26 l/min und 8 l/min. Mit diesen Einstellungen wurden je 6 Testläufe durchgeführt und Konzentration im Sekundäraerosol ermittelt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Wiederholte Messungen mit den Einstellungen $V1 = 16$ Liter und $V2 = 18$ Liter sowie $V1 = 26$ Liter und $V2 = 8$ Liter zur Validierung der Staubkonzentrationen von $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bzw. $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub im Sekundäraerosol.

Staubkonzentration im Sekundäraerosol in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bei Mischung von Primäraerosol und Verdünnungsluft im Verhältnis 16/18	Staubkonzentration im Sekundäraerosol in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bei Mischung von Primäraerosol und Verdünnungsluft im Verhältnis 26/8
176,47	509,8
160,13	385,62
192,81	571,9
174,84	526,14
165,03	544,12
223,86	522,88

Es ergab sich für die nominelle Konzentration von $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ein gemessener Wert von $182 \pm 23 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei einem Variationskoeffizienten von 12,8%. Für die nominelle Konzentration von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ergab sich ein gemessener Wert von $508 \pm 64 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bei einem Variationskoeffizienten von 12,7%.

Effektparameter

Der sicherste Nachweis einer nasalen Entzündungsreaktion erfolgt durch den klinischen Befund von z.B. freiem Eiter im Rahmen einer Rhinoskopie oder einer endoskopischen Untersuchung der Nase. Es war aber a priori nicht davon auszugehen, dass bei den eingesetzten umweltrelevanten Konzentrationen solche offenkundigen Veränderungen zu beobachten sind.

Deswegen wurde auf subtilere Methoden zum Nachweis einer subklinischen Entzündungsreaktion zurückgegriffen. Hierzu zählen die Bestimmung proinflammatorischer Zytokine im Nasensekret sowie die Zunahme entzündlicher Zellpopulationen wie neutrophiler Granulozyten, Makrophagen oder lymphoplasmazellulärer Zellelemente in der nasalen Zytologie.

Gewinnung von Nasensekret

Zur Gewinnung von Nasensekret wurde den Probanden beidseits ein Schaumstoffsammler (offenporiger Polyurethan- Schaumstoff, 35 kg/m^3 , $28 \times 18 \times 6 \text{ mm}$, Abbildung 8) bis hinter das Limen nasi eingebracht und dort für zehn Minuten belassen. Dann wurde das Nasensekret aus den Schaumstoffsammlern auszentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Osterode, 5 min, 250 g, 4°C), durch Ultraschallbehandlung (30 s, 35 kHz, Hochleistungs-Ultraschallreinigungsgerät RK 100 H, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin) homogenisiert, in Portionen zu $100 \mu\text{l}$ aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren (-20°C).



Abbildung 8: Zur Sekretsammlung verwendete Schaumstoffsammler (offenporiger Polyurethanschaumstoff, 35 kg/m^3 , $28 \times 18 \times 6 \text{ mm}$). Zum Größenvergleich: Liebhaberstück.

Gewinnung nasaler Zytologien

Die nasalen Zytologien konnten ebenfalls aus den Schaumstoffsammlern gewonnen werden. Nachdem das Nasensekret auszentrifugiert worden war, wurden die Schaumstoffsammler in 5 ml RPMI-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe), komplementiert mit 1 % HEPES, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und 1 % L-Glutamin (Sigma, Deisenhofen), eingelegt und dann die daran haftenden Zellen mit sanftem Druck über einem Zellsieb abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 250 g, 4°C). Nach einem weiteren Waschvorgang mit 1×PBS wurde die Lebendzellzahl in einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) nach Trypanblau-Färbung bestimmt und die Zellen in definierter Zahl auf Objektträger zytozentrifugiert (10 min, 250g, 4°C; Zyto-System, Heraeus, Hanau). Nach Trocknen an der Luft wurden die Zellen konventionell gefärbt oder für spätere immunzytochemische Färbungen in Aceton fixiert und tiefgefroren (-80°C).

Biomarker im Nasensekret

Die Bestimmung von Biomarkern im Nasensekret weist einige Besonderheiten auf, die Gegenstand intensiver Voruntersuchungen waren (Riechelmann et al. 2003a). Bei den üblichen nasalen Lavage-Techniken wird das Nasensekret teils stark verdünnt, so dass gerade bei ge-

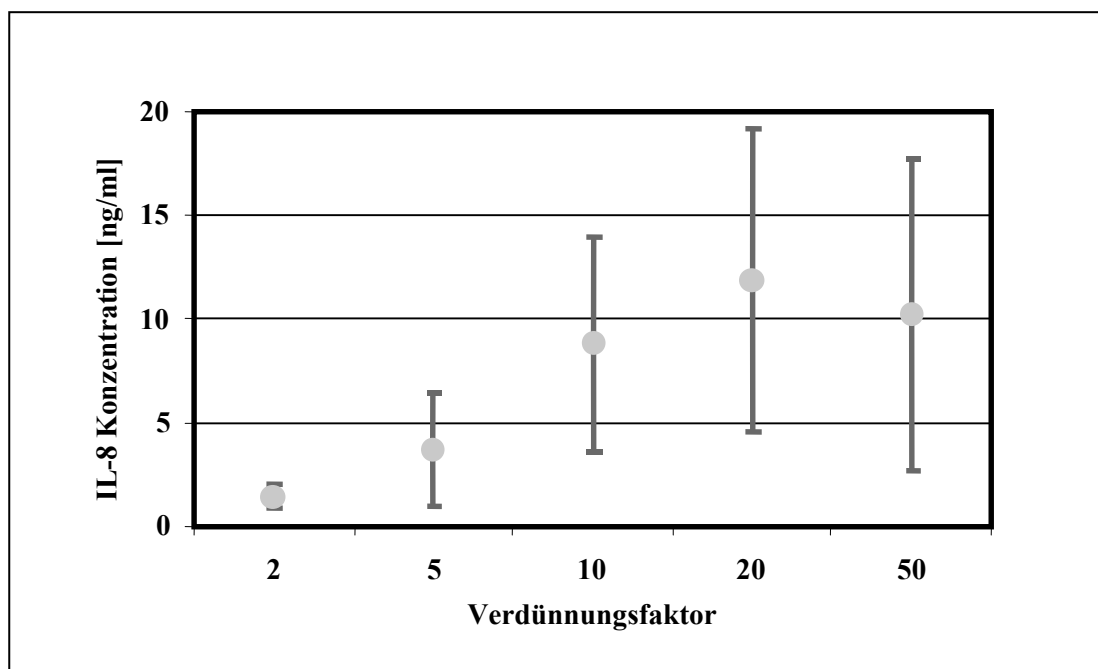


Abbildung 9: Anhand sog. Checkerboard-Titrationen wird die Verdünnung einer Probe ermittelt, die die Analyt-Konzentration in den optimalen Arbeitsbereich eines Enzymimmunoassays überführt. Mit Schaumstoffsammlern gewonnenes Nasensekret muss 1:10 bis 1:20 verdünnt werden, um an den Arbeitsbereich des verwendeten Assays angepasst zu werden.

sunden Probanden einzelne Biomarker- Konzentrationen unter der Nachweisgrenze auch hochsensitiver, kostenaufwendiger ELISA- Verfahren liegen. Außerdem weisen die Biomarker- Konzentrationen bei nasaler Lavage hohe Streuungen auf. Um diese Probleme zu reduzieren, wurden unverdünnte Sekrete wie oben beschrieben mit Schaumstoffsammlern gewonnen. Wesentlicher Nachteil dieser Methode ist, dass nur begrenzte Sekretmengen zur Verfügung stehen. Außerdem kann es im sehr proteinreichen Nasensekret zu Matrixeffekten, also sterischen Behinderungen der Bindung des Analyten an die Primärantikörper des Assays kommen. Es musste für jeden Assay eine Verdünnungstitration durchgeführt werden, um die Konzentration des Analyten in der Probe auf den Nachweisbereich des Assays zu adaptieren. In Abbildung 9 ist eine solche Verdünnungstitration beispielhaft für IL-8 gezeigt. Mit Schaumstoffsammlern gewonnenes Nasensekret muss demnach 1:10 bis 1:20 verdünnt werden, um es an den Arbeitsbereich des verwendeten normal-sensitiven IL-8- Assays zu adaptieren. Durch diese Verdünnung steht als positiver Effekt mehr Sekret für andere Untersuchungen zur Verfügung, die Ausbeute wird erhöht. Dennoch kam es vor, dass bestimmte Untersuchungen wegen Mangel an Sekretvolumen nicht durchgeführt werden konnten. In diesem Fall wurden insbesondere Untersuchungen unterlassen, die große Volumina unverdünnten Sekretes benötigen. Für Zytokine wurden kolorimetrische Sandwich- Enzym- Linked- Immunosorbent- Assay- Technik ELISA (Quantikine®-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) verwendet. Das Neuropeptid Substance P wurde mittels eines kompetitiven ELISA (Quantikine®-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) bestimmt.

Im Teilprojekt II wurden IL-1 β , IL-6 und IL-8 mit den kostengünstigeren Duo-Set-ELISA-Development-Kits (Duo-Set®-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) bestimmt. Die Duo-Set-ELISA-Development-Kits enthalten die Basis-Komponenten für 15 96-well-Platten. Die 15 Platten (MaxiSorp Surface, Nunc, Dänemark) wurden mit dem Capture-Antikörper gemäß Protokoll des Herstellers zeitgleich beschichtet. Mit einer Platte wurden anschließend die Homogenität der Beschichtung und die untere Nachweisgrenze bestimmt. Dazu wurde in die ersten 16 wells eine Standardkurve (Doppelbestimmungen) - bestehend aus acht Werten - aufgetragen. In 32 wells der Platte wurde ein Standard (Konzentration: 80 pg/ml) und in 48 wells ein Null-Standard (nur Verdünnungsmittel) pipettiert. Dann wurde der ELISA gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt und ausgewertet. Aus den 48 Werten für den Null-Standard wurden der Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung ($SD(\bar{x})$) gebildet und die untere Nachweisgrenze als $\bar{x} + 2 \times SD(\bar{x})$ berechnet.

Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Messung der Farbintensitäten erfolgte mit einem vollautomatischen ELISA- Lesegerät (MRX, Dynatech, England), das an einen PC angeschlossen war. Gesteuert und programmiert wurde das Lesegerät über die auf dem Computer installierte Software Biolinx Version 2.21 (Dynatech Laboratories, Virginia, USA).

Interleukin (IL)-1 β

Verwendet wurde der hochsensitive IL-1 β -HS-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden). Zur Verstärkung des Signals wird in diesem Kit ein NADPH-Diaphorase-Tetrazoliumsalz-Amplifikationssystem verwendet. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,1 pg/ml, die Detektionswellenlänge beträgt 490 nm, die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 650 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 300 μ l verdünntes Nasensekret benötigt. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:15. Im Teilprojekt II wurde IL-1 β mit dem kostengünstigeren Duo-Set-ELISA-Development-Kit (Duo-Set[®]-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 1,3 pg/ml.

Interleukin (IL)-6

Verwendet wurde der humane IL-6-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden). Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,7 pg/ml, die Detektionswellenlänge beträgt 450 nm, die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 550 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 200 μ l verdünntes Nasensekret benötigt. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:6. Im Teilprojekt II wurde IL-6 mit dem kostengünstigeren Duo-Set-ELISA-Development-Kit (Duo-Set[®]-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 3,4 pg/ml.

Interleukin (IL)-8

Verwendet wurde der humane IL-8-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden) mit einer unteren Nachweisgrenze von 10 pg/ml. Die Detektionswellenlänge lag bei 450 nm, die Wellenlängenkorrektur bei 550 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 100 μ l verdünntes Nasensekret benötigt. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:10. Im Teilprojekt II wurde IL-8 mit dem

kostengünstigeren Duo-Set-ELISA-Development-Kit (Duo-Set®-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 2,6 pg/ml.

Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α)

Verwendet wurde der hochsensitive TNF α -HS-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden). Zur Verstärkung des Signals wird in diesem Kit ein NADPH-Diaphorase-Tetrazoliumsalz-Amplifikationssystem verwendet. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,12 pg/ml, die Detektionswellenlänge bei 490 nm und die Wellenlängenkorrektur bei 650 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 200 μ l unverdünntes Nasensekret benötigt.

Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1 (MCP-1)

Verwendet wurde der humane MCP-1-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden). Die untere Nachweisgrenze lag bei 5 pg/ml, die Detektionswellenlänge bei 450 nm und die Wellenlängenkorrektur bei 550 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 100 μ l verdünntes Nasensekret benötigt. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:5.

Epitheliales-Neutrophilen-Aktivierendes-Peptid-78 (ENA-78)

Verwendet wurde der humane ENA-78-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden) mit einer unteren Nachweisgrenze von 15 pg/ml, einer Detektionswellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur bei 550 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 100 μ l verdünntes Nasensekret benötigt. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:1000.

Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 α (MIP-1 α)

Verwendet wurde der humane MIP-1 α -Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden). Die untere Nachweisgrenze lag bei 10 pg/ml, die Detektionswellenlänge bei 450 nm und die Wellenlängenkorrektur bei 550 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 100 μ l verdünntes Nasensekret benötigt. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:10.

Substanz P (SP)

Verwendet wurde der Substance-P-Immunoassay-Kit (R&D-Systems, Wiesbaden). Bei diesem kompetitiven ELISA konkurrieren markiertes und unmarkiertes (nachzuweisendes) Antigen um freie Bindungsstellen an den immobilisierten Antikörpern. Anhand der Standardkurve kann der Verdrängungsgrad von markiertem Antigen durch unmarkiertes Antigen quantifiziert werden. Die untere Nachweisgrenze lag bei 8 pg/ml, die Detektionswellenlänge bei

450 nm und die Wellenlängenkorrektur bei 550 nm. Für eine Doppelbestimmung wurden 100 µl unverdünntes Nasensekret benötigt.

Nasale Zytologien

Um den Probanden die gesonderte Entnahme von Sekret und Zytologien zu ersparen, wurden für die zytologischen Untersuchungen die an den Schaumstoffsammlern adhärenen Zellen verwendet. Die zelluläre Zusammensetzung nasaler Zytologien wird maßgeblich von der Entnahmetechnik bestimmt. In Voruntersuchungen an 9 gesunden Probanden wurde das Zellverteilungsmuster nasaler Zytologien verglichen, die mit unterschiedlichen Entnahmetechniken gewonnen worden waren. Untersucht wurden die nasale Lavage, die Bürsten- oder Kürettentechnik sowie die hier verwendete Schaumstoffsammlertechnik. Dabei betrug nach May-Grünwald-Färbung der Anteil leukozytärer Zellen in der Lavage annähernd 60%, während er bei der Bürsten/Kürettentechnik lediglich 6% betrug. Die Schaumstoffsammlertechnik lag mit 30% zellulären Zellelementen dazwischen (Abbildung 10). In unterschiedlichen immunzytologischen Färbungen bestätigten sich diese Befunde im wesentlichen. Man kann also davon ausgehen, dass mit der Schaumstoffsammlertechnik ein ausreichend differenziertes und repräsentatives Zellbild gewonnen wird.

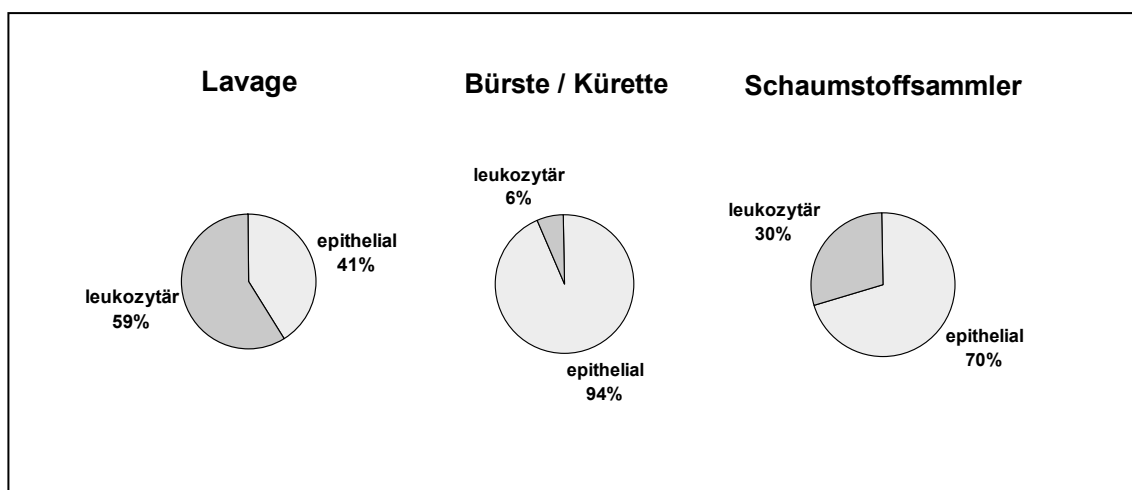


Abbildung 10: Relativer Anteil epithelialer und leukozytärer Zellelemente in der nasalen Zytologie in Abhängigkeit unterschiedlicher Zellgewinnungstechniken.

Konventionelle Färbung nach May-Grünwald-Giemsa

Die Färbung der nasalen Zytologien erfolgte nach einem Standardprotokoll der panoptischen Färbung von Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung). Die Objektträger wurden nach dem Trocknen für vier Minuten in May-Grünwald-Lösung getaucht, dann in Aqua dest. (pH=7,0) zwei Minuten gewaschen und anschließend 15 Minuten in Giemsa-Gebrauchslösung (3%, Aqua dest. pH=7,0) überführt. Zuletzt wurden die Objektträger 2 Minuten in Aqua dest. (pH=7,0) gespült und an der Luft getrocknet. Die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Es wurden jeweils 500 Zellen ausgezählt und in vier Zellpopulationen differenziert:

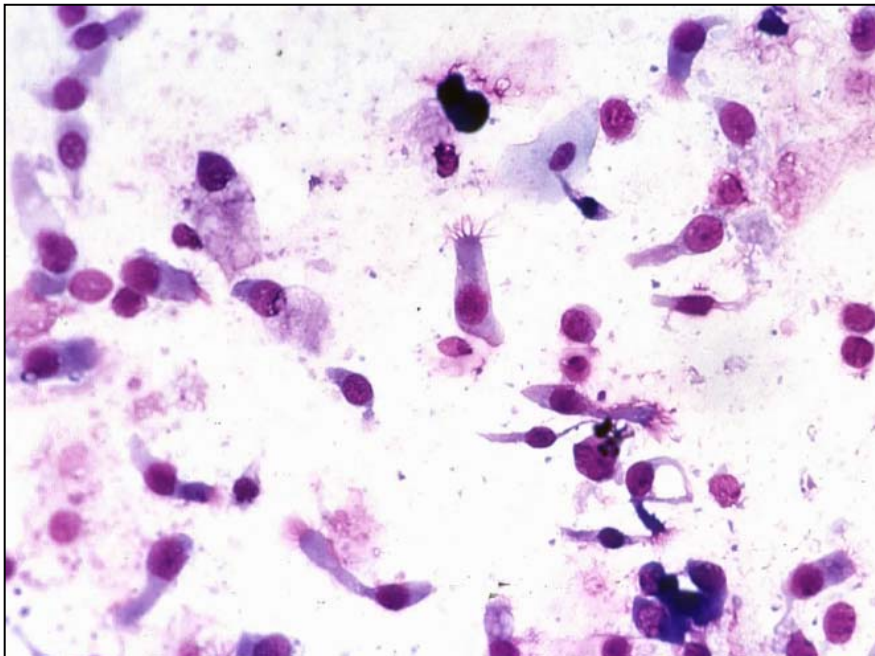


Abbildung 11: Konventionelle nasale Zytologie (May-Grünwald Giemsa, x 400) überwiegend mit hochprismatischen Flimmerepithelien, einigen Basal- und Intermediärzellen sowie Zell- und Kernschatten abgeschilfter nekrotischer Zellen. Dazwischen eosinophile Schleimreste.

neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten sowie alle restlichen kernhaltigen Zellen, also überwiegend unterschiedliche epitheliale Zellformen.

Immunzytochemische Färbung

Nach Fixierung der Zellen in Aceton wurden die Objektträger mit Schweinenormalserum (Dako, Hamburg) vorinkubiert (Verdünnung 1:10, 30 min, RT). Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper (1:50 verdünnt in TBS/1 % BSA) zugegeben, und es folgte die Inkubation (ü.N., 4°C). Als Primärantikörper wurden Maus-anti-Human-Myeloperoxidase (MPO), -CD45, -CD68 und -Tryptase eingesetzt (alle Dako, Hamburg). Nach Spülen der Objektträger in TBS wurde mit einem kommerziellen APAAP-Kit-Maus (Dako, Hamburg) weitergearbeitet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun (Sigma, Deisenhofen) für 30 Sekunden. In den Präparaten erscheinen die Zellkerne blau und die spezifisch angefärbten Zellen rot (Abbildung 12). Es wurden jeweils 300 Zellen ausgezählt und dann der relative Anteil positiver Zellen als Färbeindex (%) ermittelt.

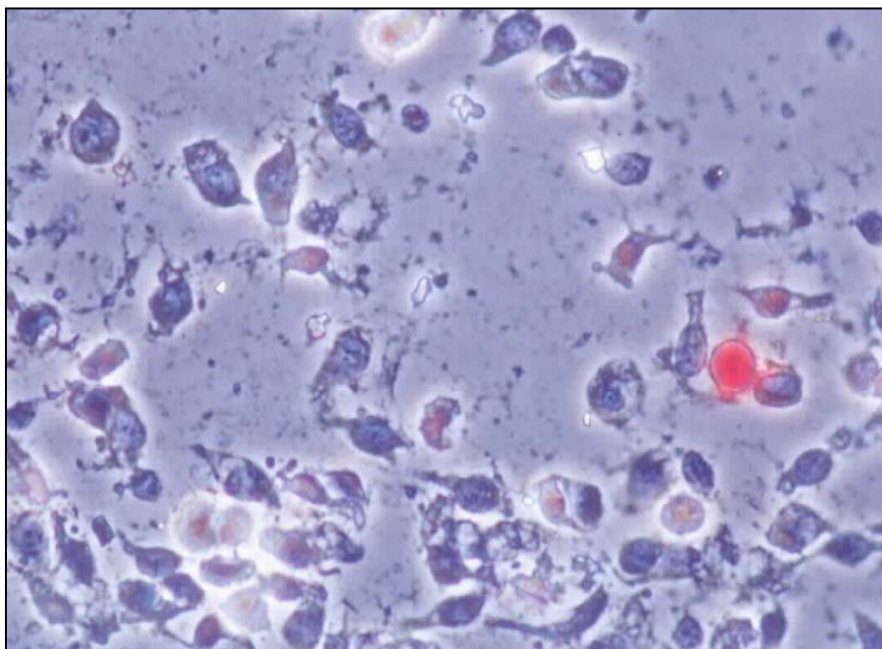


Abbildung 12: Nasale Zytologie nach immunzytochemischer Färbung mit Antitryptase. Man erkennt die rundliche Zelle mit dem zytosolischen Reaktionsprodukt. Granula sind nicht erkennbar. Gegenfärbung mit Hämalaun, x 400.

Symptomscores

Für die Untersuchung subjektiver Befindlichkeiten und Symptome sind unterschiedliche Verfahren etabliert. Häufig werden Erhebungsbögen eingesetzt, in denen die Ausprägung einer

Meinung, einer Befindlichkeit oder der Schwere eines Symptoms auf verbalen Ratingskalen, numerischen Ratingskalen oder visuellen Analogskalen vom Probanden selbst eingetragen wird. Bei visuellen Analogskalen wird eine solche Ausprägung vom Probanden als Abstand eines Zeichens (z.B. Kreuzchen) vom Rand einer Linie dargestellt. Üblich sind horizontale Linien, wobei der linke Rand die Minimalausprägung einer Befindlichkeit angibt und der rechte Rand die Maximalausprägung. Es ist gebräuchlich, diese Linien 10 cm lang zu gestalten und den Abstand vom linken Rand in mm als analoge Größe zur Ausprägung der Befindlichkeit zu interpretieren. Der Vorteil visueller Analogskalen ist das hohe Skalenniveau und die vergleichsweise gute Übereinstimmung mit physiologischen Messwerten, insbesondere im Bereich der Atemphysiologie (Grant et al. 1999; Paul-Dauphin et al. 1999)

Im Teilprojekt I und II wurden folgende folgenden Symptomausprägungen und nasalen Befindlichkeiten mit visueller Analogskalen erfasst:

- Verstopfungsgefühl der Nase
- Nasenlaufen
- Juck- und Niesreiz der Nase
- Trockenheitsgefühl der Nase
- Geruchsbelästigung
- Schmerzen im Nasenbereich

Vor und nach jeder Exposition wurden die Probanden aufgefordert ihr subjektives Empfinden für die genannten Kriterien auf einer 100 mm langen, horizontalen Geraden aufzutragen. Die Empfindungsstärke reichte von „überhaupt nicht“, am linken Ende der Geraden (entspricht 0 mm) bis „sehr stark“, am rechten Ende der Geraden (entspricht 100 mm). Für jeden Probanden wurden so für jede Exposition und jedes Kriterium zwei Werte - vor und nach Exposition - erhalten. Die aus diesen Werten gebildete Differenz diente als Bewertungsgrundlage für die nasalen Empfindungen der Probanden durch die Exposition.

Auswertung

Aus den Biomarkerkonzentrationen im Nasensekret und den Färbeindices der immunzytochemischen Präparate wurden jeweils zu den drei Entnahmezeitpunkten die medianen prozen-

tualen Veränderungen nach Staubexposition im Vergleich zur Kontrollexposition berechnet und mit dem Wilcoxon Vorzeichenrangtest zweiseitig ausgewertet. Die Mediane und Interquartilintervalle der prozentualen Veränderungen wurden tabelliert. Für die visuellen Analogskalen wurden die Differenzen vor und nach Exposition berechnet und mit dem Page-Test auf einen positiven Trend in Abhängigkeit von der eingesetzten Staubkonzentration untersucht. Die Berechnungen erfolgten mit den Programmen SYSTAT 10.2 (Richmond, USA) und StatXact 4.2 (CYTEL, Cambridge, USA).

Ergebnisse

Validität der Staubexposition

Im Expositionssystem wurden die vorgesehenen Staubkonzentrationen im wesentlichen eingehalten (Abbildung 13). Bei der Kontrollexposition betrug die im System gemessene Staubkonzentration im Median $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 90% der Werte lagen zwischen $0,5$ und $11,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Bei geplanten $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ lag der gemessene Median bei $161 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (142 bis $239 \mu\text{g}/\text{m}^3$), bei geplanten $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bei $510 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (469 bis $644 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und bei geplanten $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bei $1003 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (828 – $1303 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

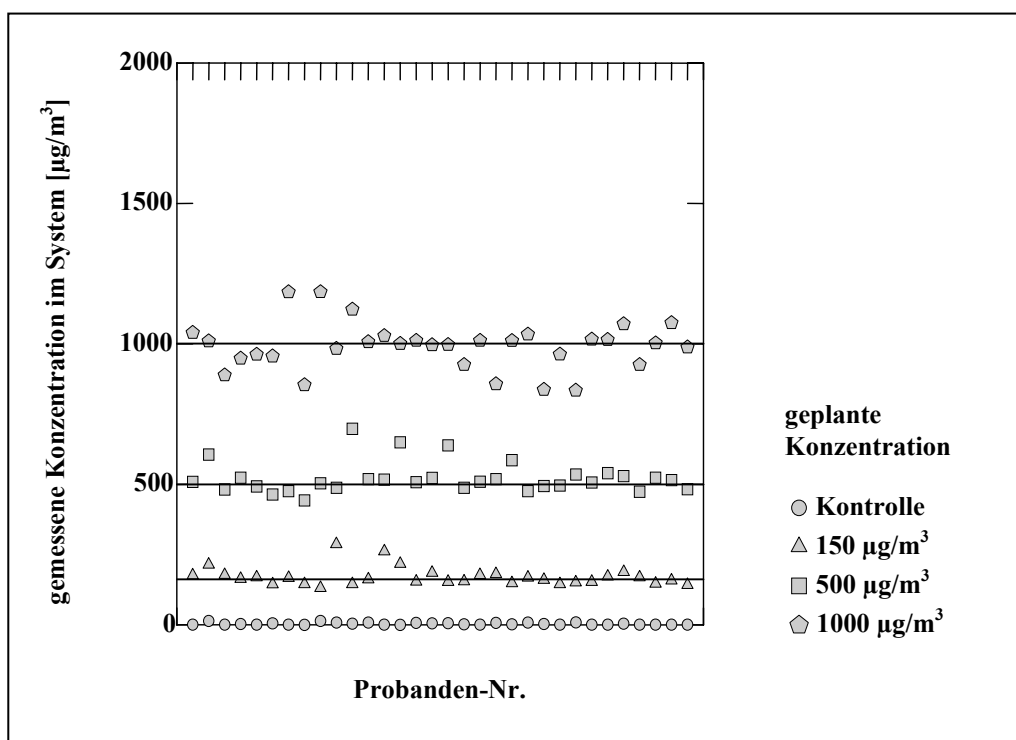


Abbildung 13: Soll- und Istwertvergleich der Staubkonzentrationen im Expositionssystem bei Exposition gesunder Probanden mit Kalziumkarbonatstaub.

Biomarker im Nasensekret

Die Expression von Zytokinen und SP im Nasensekret unterschied sich interindividuell erheblich. So gab es Teilnehmer, die konstitutiv ohne Vorliegen einer nasalen Erkrankung hohe nasale Biomarkerwerte aufwiesen und solche mit niedrigen. Bei den Personen mit hoher Zy-

tokinexpression lagen die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 in der Regel gemeinsam bei hohen Werten. Personen mit konstitutiv hohen nasalen Zytokinwerten setzten auf einen Reiz hin absolut mehr zusätzliches Zytokin frei als Personen mit niedriger konstitutiver Zytokinexpression. Die zusätzliche Biomarkerfreisetzung als Antwort auf einen Stimulus war bei doppeltlo-

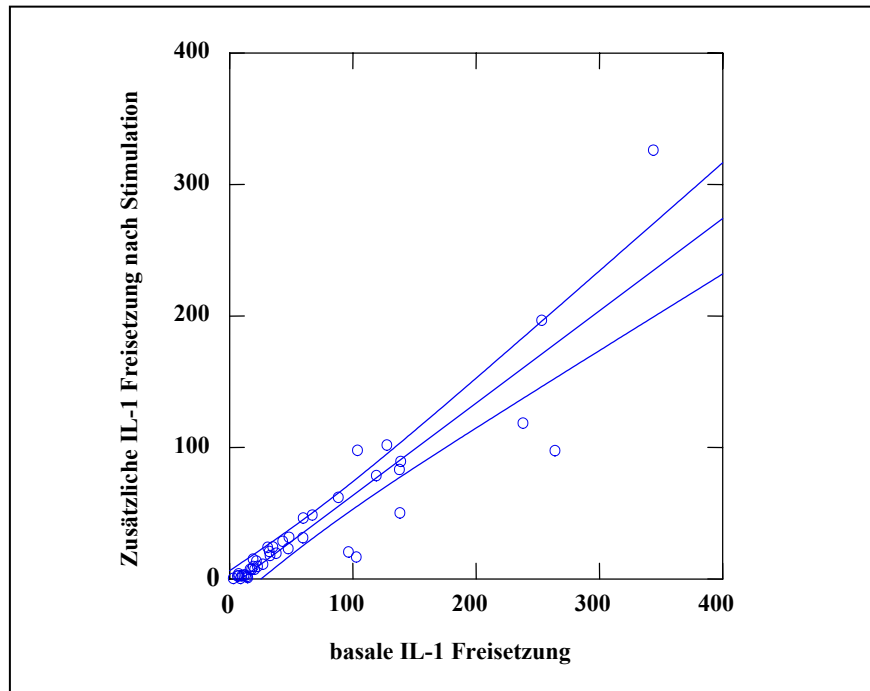


Abbildung 14: Abhängigkeit der expositionsbedingten Zunahme nasaler Zytokinspiegel (hier: IL-1) von der Basiskonzentrationen vor Exposition.

garithmischer Darstellung in etwa proportional zur Basissekretion (Abbildung 14). Dies entspricht den Verhältnissen bei früheren Untersuchungen (Riechelmann et al. 2003a).

Es zeigte sich außerdem, dass nach der Kontrollexposition bei manchen Biomarkern die Sekretkonzentrationen mit jeder der drei Entnahmen nach Beendigung der Exposition zunahmen (Abbildung 15). In Voruntersuchungen waren im Gegensatz hierzu die Zytokinkonzentrationen bei wiederholter Probengewinnung 8h nach der Erstentnahme in etwa konstant geblieben.

Beide Verzerrungsfaktoren konnten kompensiert werden, indem die Werte zu den drei Zeitpunkten nach Staubexpositionen als prozentuale Veränderungen der jeweiligen Werte nach der Kontrollexposition ausgedrückt wurden. Biologisch entspricht dies der Annahme, dass

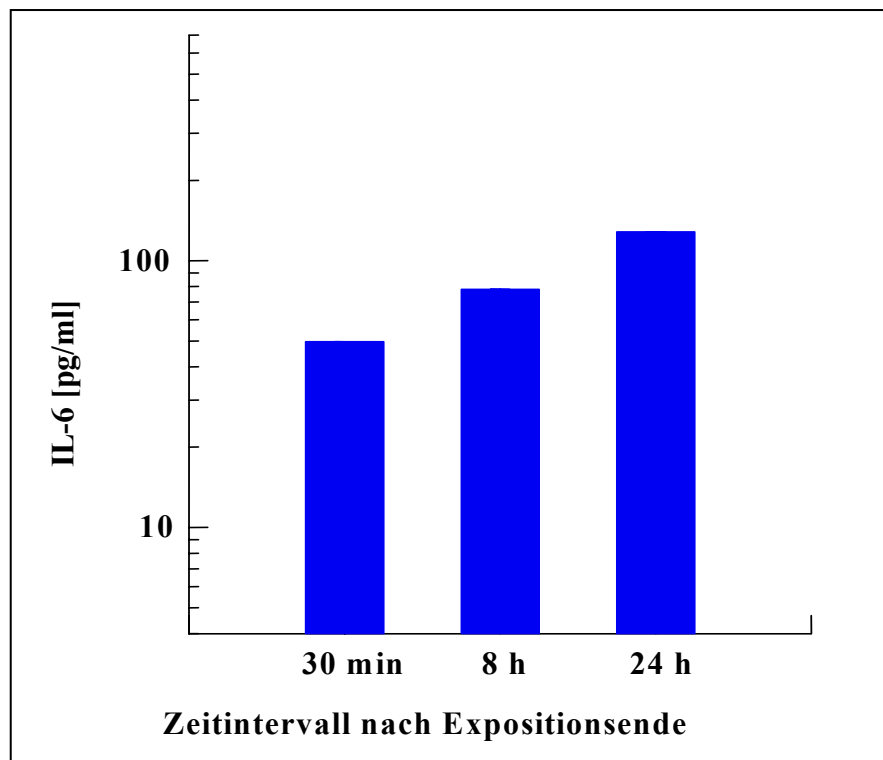


Abbildung 15: Zunahme der Zytokinkonzentration bei wiederholter Probengewinnung 30 min, 8 h und 24 h nach Kontrollexposition. Dieser wahrscheinlich durch die Probengewinnung selbst verursachte Effekt wurde bei IL-6 und MCP beobachtet.

die Wirkungen nicht von der absoluten Zunahme der Biomarkerkonzentration abhängen, sondern von der relativen Zunahme. Dieses Auswertungsmodell erscheint plausibel und entspricht gängigen Standards (ADaM Working Group 2001) und dem Vorgehen in anderen Publikationen mit ähnlicher Fragestellung (van Eeden et al. 2001; Wagner et al. 1987). Diese Form der Auswertung hat zusätzlich den Vorteil, dass Veränderungen unterschiedlicher Biomarker besser in Beziehung zueinander gebracht werden können, da sich die Wertebereiche relativer Zunahmen ähneln.

Im Teilprojekt I wurde die Probengewinnung 24h nach Expositionsende erst ab dem 01.03.2000 durchgeführt. Ebenso verhält es sich mit der Bestimmung von SP im Nasensekret. Deswegen liegen für diese Parameter bzw. Messzeitpunkte nur unvollständige Daten vor.

Biomarker im Nasensekret nach Kalziumkarbonatstaubexposition

Im Mittel konnten nach jeder Exposition 630 μl Nasensekret gewonnen werden, wobei die geringste Menge 20 μl und die höchste Menge 2600 μl betrug. Die Konzentration der Biomarker wurde durch die gewonnene Sekretmenge beeinflusst, nicht jedoch die relativen Zunahmen. Dies rührt wahrscheinlich daher, dass die zu gewinnende Sekretmenge intraindividuell nur unerheblich schwankte.

IL-1 β induziert wie TNF- α und IL-6 die Synthese von Akutphaseproteinen. Es gilt als typisches proinflammatorisches Zytokin. IL-1 β wird in Makrophagen und Monozyten gebildet, aber auch in neutrophilen Granulozyten, Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten sowie in T- und B-Lymphozyten. Im Vergleich zu gesunden Personen waren bei Graspollenallergikern die IL-1 β -Konzentrationen im Nasensekret auch außerhalb der Pollensaison erhöht (Bachert et al. 1999). Die Durchführung des IL-1 β -ELISA erforderte vergleichsweise große Mengen an Probenmaterial, weshalb die Fallzahlen für dieses Zytokin teilweise unter zwölf liegen. Zu den drei Entnahmezeitpunkten nach der Kontrollexposition lagen die Werte im Median bei ca. 60 pg/ml (Tabelle 7). Nach Kalziumkarbonatstaubexposition zeigten sich teilweise Konzentrationsschwankungen, aber keine richtungweisenden zeit- oder konzentrationsabhängigen Effekte.

Tabelle 7: IL-1 β Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

IL-1	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	59.9 (33.6 bis 130.4)	12	-35.3 (-46.8 bis 60)	0.72	-21 (-63.5 bis 72.2)	0.80	-39 (-69.4 bis 100)	0.86
8 h	56.6 (18.7 bis 189.5)	11	-53.8 (-73 bis 29)	0.42	-50.5 (-61.6 bis 93.8)	0.79	-19.1 (-59.8 bis 41.5)	0.79
24 h	68.9 (37.2 bis 174.6)	6	-17.6 (-81.2 bis 47.2)	0.35	-53.4 (-79.1 bis 75.1)	0.75	-62.1 (-71.6 bis -24.2)	0.35

IL-6 ist ein pleiotropes proinflammatorisches Zytokin und wird hauptsächlich von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten synthetisiert. Bei Patienten, die mit Influenza-A-Virus infiziert wurden, konnte eine erhöhte Sekretion von IL-6 in die nasale Lavageflüssigkeit gemessen werden (Gentile et al. 1998) und die nasale Provokation mit IL-6 führte zu nasaler Hyper-

sekretion bei Patienten mit allergischer Rhinitis (Gentile et al. 2001). Die IL-6-Konzentrationen im Nasensekret zeigten nach der Kontrollexposition einen zeitabhängigen Anstieg von ca. 50 pg/ml 30 min nach der Exposition bis annähernd 130 pg/ml nach 24 h (Tabelle 8). Dieser Anstieg wirkt sich jedoch nicht auf relativen Änderungen der IL-6 Konzentrationen nach Staubexposition aus.

Tabelle 8: IL-6 Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

IL-6	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	49.6 (30.8 bis 98.5)	29	15.8 (-48.8 bis 127.4)	0.20	-23.1 (-75 bis 87)	0.97	-1.2 (-52.9 bis 46.1)	0.99
8 h	78 (47.5 bis 118.8)	24	-28.7 (-50.7 bis 38.9)	0.63	14.9 (-46.2 bis 114.4)	0.15	-19 (-69.1 bis 102.4)	0.95
24 h	128 (74.2 bis 157.5)	11	-38.3 (-73.3 bis 63.4)	0.79	38.7 (-44.8 bis 298.2)	0.26	-32.2 (-65.2 bis 104.9)	0.93

Nach 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub zeigte sich tendenziell eine Zunahme der IL-6 Konzentration mit einem Maximum nach 24 h. Nach Exposition gegenüber 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ wurde eher eine Suppression der IL-6 Konzentrationen im Nasensekret beobachtet, die 24 h nach Expositionsende am ausgeprägtesten war (Abbildung 16).

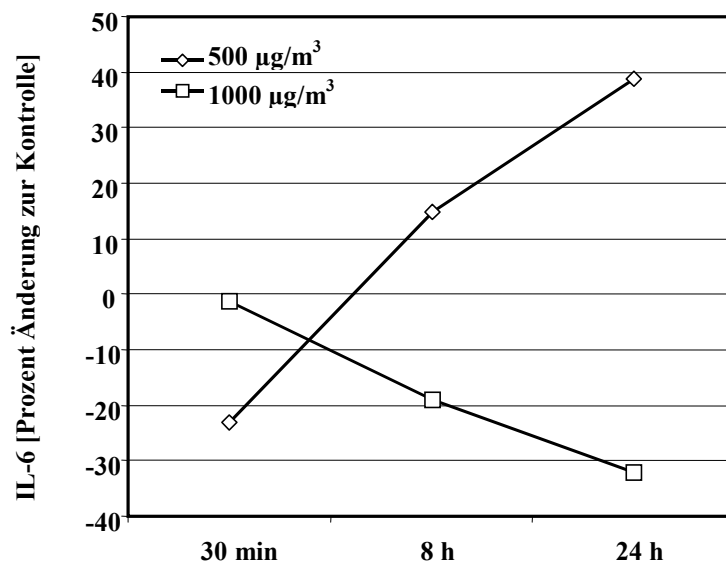


Abbildung 16: Änderung der IL-6 Konzentration im Nasensekret nach Exposition gegenüber Kalziumkarbonatstaub in einer Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

IL-8 wird hauptsächlich von mononukleären phagozytierenden Zellen, Endothelzellen und Epithelzellen, aber auch von T-Zellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, Keratinozyten und Hepatozyten gebildet. Es hat eine granulozytenmigrationsfördernde Wirkung, bewirkt eine Histaminfreisetzung bei basophilen Granulozyten und wirkt auch auf T-Lymphozyten chemotaktisch (Mukaida und Matsushima 1992). IL-8 konnte im Nasensekret in 10- bis 100-fach höheren Konzentrationen als im Blutserum nachgewiesen werden (Riechelmann et al. 2003a; Sylvester et al. 1992). Die IL-8- Konzentrationen bewegten sich im Nanogramm-Bereich, lagen also ca. 3 Zehnerpotenzen höher als z.B. die IL-1 β -Konzentrationen. Nach Kontrollexposition wurden Werte zwischen 8 und 12 ng/ml gemessen. Nach Exposition mit 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub zeigten sich eine Zunahme der IL-8 Konzentration, die 24 h nach Exposition am ausgeprägtesten war, während 30 min nach Exposition gegenüber 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ eine geringfügige Suppression der Werte beobachtet wurde. (Tabelle 9).

Tabelle 9: IL-8 Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

IL-8	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [ng/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	11 (5.7 bis 16.8)	27	4.9 (-31.7 bis 26.7)	0.75	-10.8 (-52.3 bis 16.1)	0.23	-24.8 (-48.3 bis 5.7)	0.03
8 h	12.1 (5.4 bis 15.9)	27	-21.8 (-60.1 bis 15)	0.17	9.4 (-58.4 bis 63)	0.62	-26.1 (-55.3 bis 65.2)	0.87
24 h	8.2 (3.6 bis 9.8)	10	14.8 (-23.3 bis 43.3)	0.33	69.7 (16.6 bis 93.2)	0.01	32.7 (-44.8 bis 64.7)	0.45

Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) kommt in zwei Formen vor: als lösliches Protein (17 kDa, Homodimer oder -trimer) und als zellverankertes transmembranöses Protein (26 kDa) (Armitage 1994). Freigesetzt wird TNF- α bei bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen sowie bei Tumorerkrankungen (Smith et al. 1994). Zelluläre Herkunftsorte sind hauptsächlich Makrophagen und Monozyten, aber auch NK-Zellen, neutrophile Granulozyten, CD4⁺-T-Lymphozyten, Fibroblasten und Mastzellen. Nasale Provokation von Allergikern mit Beifuß- oder Wiesenlieschgrasextrakt außerhalb der Saison führte zu einem Anstieg von TNF α im Nasensekret (Bensch et al. 2002). Verglichen mit IL-1 β und IL-6 kommt TNF α nur in geringen Konzentrationen im Nasensekret vor. Für die Bestimmung von TNF α wurden erhebliche

Sekretmengen benötigt, trotzdem blieb die Konzentration dieses Biomarkers teilweise unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten hochempfindlichen Assays. Deswegen ist die Datenlage für TNF α dürftig. Zum Zeitpunkt 24 h nach Exposition liegen keine Daten vor. Die Werte nach Kontrollexposition lagen im Median bei 9 - 12 pg/ml, die beobachteten prozentualen Veränderungen sind irregulär (Tabelle 10) und erlauben keine Rückschlüsse.

Tabelle 10: TNF α Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

TNF α	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	9 (6.7 bis 10)	11	18 (2.7 bis 98.5)	0.03	55.9 (3.2 bis 71.1)	0.26	25 (-16.1 bis 64.1)	0.21
8 h	11.9 (7.1 bis 14.7)	10	-31 (-50.4 bis 6.6)	0.14	37.5 (-0.4 bis 67.3)	0.13	-33.6 (-57.3 bis 29.7)	0.58
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-

Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1 (MCP-1) wirkt chemotaktisch auf Monozyten. Es wird sowohl von Monozyten als auch von Lymphozyten sezerniert. Nach Stimulation mit TNF α bildeten Epithelzellen der humanen Nasenschleimhaut MCP-1 (Becker et al. 1994).

Die medianen MCP-1-Konzentrationen stiegen nach der Kontrollexposition von ca. 370 pg/ml 30 min nach Expositionsende auf ca. 500 pg/ml nach 24 h an. Ein zeit- oder konzentrationsabhängiger Trend der MCP-1 Konzentrationen nach Exposition gegenüber 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ oder 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub war nicht zu erkennen (Tabelle 11).

Tabelle 11: MCP Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

MCP	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	373.9 (257.3 bis 643.3)	24	16.7 (-15.8 bis 30.6)	0.27	0.3 (-35.2 bis 47.5)	0.78	-15.4 (-29.1 bis 13.3)	0.21
8 h	441.8 (353.2 bis 735)	20	-27 (-53.3 bis 1.5)	0.01	-20.3 (-32.8 bis 6.9)	0.06	-13.7 (-34.2 bis 29.1)	0.60
24 h	503.3 (333.2 bis 888.8)	14	5.8 (-38 bis 69.3)	0.43	36.9 (19.7 bis 84.9)	0.03	11.6 (-34.7 bis 33.2)	0.78

Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 α (MIP-1 α) hat eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten. Es stimuliert Makrophagen und spielt eine wichtige Rolle bei der Blutbildung. Nasale Provokation von Probanden mit Dieselrußpartikeln führte im Nasensekret zu einer signifikanten Erhöhung von MIP-1 α im Vergleich zur Kontrollprovokation mit isotonischer Kochsalzlösung (Diaz-Sanchez et al. 2000a). Erhöhte MIP-1 α -Level im Nasensekret konnten auch bei Kindern mit Virusinfektionen beobachtet werden (Teran et al. 1999). Allergiker reagierten nach nasaler Allergenprovokation mit einer erhöhten MIP-1 α -Sekretion in der Spätphase-Reaktion (Kramer et al. 2001). Die medianen Konzentrationswerte für MIP-1 α lagen nach Kontrollexposition bei ca. 45 pg/ml. Sie zeigten nach Kalziumkarbonatstaubexposition keine konzentrationsabhängigen Veränderungen (Tabelle 12).

Tabelle 12: MIP-1 α Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

MIP-1 α	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	37.1 (16.1 bis 100.5)	10	-34 (-63.4 bis 133.3)	0.51	33.5 (-63.9 bis 134.5)	0.44	-61.6 (-67.6 bis 27.6)	0.77
8 h	56.8 (40.2 bis 131.5)	10	-58.4 (-66.8 bis -26.7)	0.16	-53.1 (-91.7 bis -18.9)	0.07	-31 (-71.3 bis 7.8)	0.26
24 h	41.5 (35.4 bis 77)	6	58.7 (-37 bis 120.8)	0.23	13.6 (-26.7 bis 96.4)	0.59	33.4 (-35.5 bis 169.3)	0.35

Epitheliales-Neutrophilen-Aktivierendes Peptid-78 (ENA-78) aktiviert und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Es scheint allerdings, dass die chemotaktische Wirkung von ENA-78 nicht so stark ist wie die von IL-8 (Rudack et al. 2003). Gebildet wird das Zytokin von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und Makrophagen. Murine Mastzellen sezernieren ENA-78 konstitutiv (Lukacs et al. 1998). ENA-78 ist ähnlich wie IL-8 ein neutrophilenchemotaktischer Stoff, der von Atemwegsepithelien konstitutiv exprimiert wird. Es kommt im humanen Nasensekret in sehr hohen Konzentrationen vor. Im untersuchten Kollektiv lagen die Nasensekretkonzentrationen bei 20 – 25 ng/m^3 . Eine zeit- oder dosisabhängige Zunahme der ENA-78 Konzentration nach Staubeexposition war nicht festzustellen (Tabelle 13).

Tabelle 13: ENA-78 Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³, 500 µg/m³ und 1000 µg/m³ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

ENA-78	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³		1000 µg/m ³	
	absolut [ng/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	21.2 (14 bis 47.4)	21	-2.7 (-19.8 bis 58.1)	0.31	-18.1 (-33.5 bis 24.7)	0.29	-7.7 (-29.2 bis 19)	0.31
8 h	22.1 (8.4 bis 32.7)	19	29.9 (-29.6 bis 54.8)	0.20	-15.5 (-24 bis -1.3)	0.03	1 (-4.8 bis 34.2)	0.42
24 h	24.8 (7.3 bis 31.6)	15	10.9 (-3.9 bis 48.6)	0.06	0.2 (-21.3 bis 41.7)	0.37	5.5 (-19.9 bis 29.6)	0.73

Substanz P

Die Perzeption von schädigenden Reizen in der Nasenschleimhaut erfolgt durch sub- und intraepitheliale Nocizeptoren (Udem und Carr 2001). Transmitter ist das Oligopeptid Substanz P (SP). SP wird mit CGRP in nicht myelinisierten trigeminalen Gruppe-C Fasern der humanen Nasenschleimhaut coexprimiert (Riechelmann et al. 1991; Uddman et al. 1999). Die antidrome Freisetzung von SP an Gefäßen und Drüsen führt zu einer neurogenen Entzündung mit Vasodilatation, Extravasation und Hypersekretion (Tai und Baraniuk 2002). Nach nasaler Provokation mit hypertotonischer Salzlösung fanden sich erhöhte SP Konzentrationen im Nasensekret (Baraniuk et al. 1999). Explantate humaner Nasenschleimhaut setzten nach Ozon-Exposition vermehrt SP in das Zellkulturmedium frei (Schierhorn et al. 2002). Im untersuchten Kollektiv fand sich SP nach Kontrollexposition in Konzentrationen zwischen 130 und 210 pg/ml. Die beobachteten Schwankungen nach Karbonatstaubexposition waren gering und standen mit diesen in keinem offensichtlichen Zusammenhang (Tabelle 14).

Tabelle 14: Substanz P- Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³, 500 µg/m³ und 1000 µg/m³ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

SP	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³		1000 µg/m ³	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	134.4 (69.7 bis 165.7)	11	34.4 (-6.4 bis 178.9)	0.11	3.7 (-33.6 bis 47.9)	0.52	14.2 (-38.8 bis 45.9)	0.51
8 h	210.5 (154 bis 229.8)	13	-34.8 (-48.9 bis -2.6)	0.29	-32 (-55.8 bis 15.4)	0.33	-9 (-51.7 bis 37.7)	0.86
24 h	146.5 (51.2 bis 195.8)	8	37.8 (29.1 bis 78)	0.17	22.5 (-32.5 bis 159)	0.47	-9.5 (-24.8 bis 11.9)	0.50

Biomarker im Nasensekret nach Urbanstaubexposition

Die Biomarkerkonzentrationen im Nasensekret zeigten nach Urbanstaubexposition eine irreguläre Verteilung. Annähernd normale Verteilungen konnten für die Gesamtheit der Werte eines Biomarkers durch Logarithmieren erreicht werden (Abbildung 17). Die Abbildung 17 verdeutlicht auch, dass die einzelnen Biomarker untereinander korreliert sind. Eine ausreichende Normalverteilung und Homoskedastizität ergab sich jedoch nicht für die Daten in den einzelnen Konzentrations- und Zeitstufen. Deswegen wurde wie bei den Kalziumkarbonatstaub-Daten auf ein rangbasiertes nicht-parametrisches Auswertungsmodell zurückgegriffen.

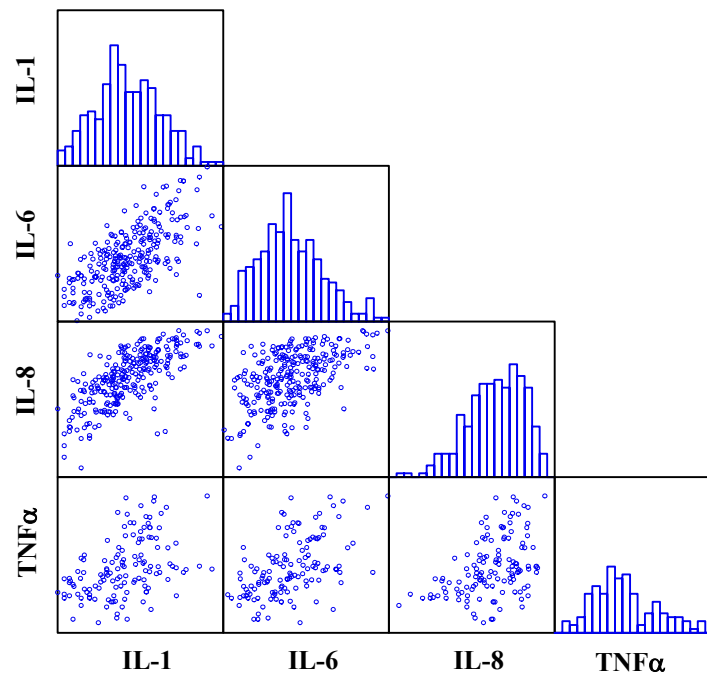


Abbildung 17: Streudiagramme und Histogramme der logarithmierten Biomarkerkonzentrationen im Nasensekret im Teilprojekt II. Man erkennt, dass für einige Biomarker durch Logarithmieren Normalverteilung hergestellt werden kann und dass einzelne Biomarkerkonzentrationen kovariieren.

Die Werte für IL-1β lagen nach der Kontrolleexposition zwischen 17 und 30 pg/ml. Nach Exposition mit Urbanstaub nahmen die IL-1β-Konzentrationen im Nasensekret zum Zeitpunkt 24 h um 13% bei 150 µg/m³ und um 72% bei 500 µg/m³ ($p < 0,005$) zu.

Tabelle 15: IL-1 β - Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

IL-1 β	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	18.4 (5.9 bis 47.7)	29	9.2 (-48.9 bis 153.9)	0.16	22.5 (-44.1 bis 129.8)	0.16
8 h	17.3 (10.9 bis 37.8)	30	-19.3 (-49.8 bis 54.5)	0.89	-29.1 (-50.5 bis 103.2)	0.85
24 h	30 (15.3 bis 59.6)	30	13 (-52.7 bis 75.1)	0.34	72.3 (-33.9 bis 233.7)	0.004

In Voruntersuchungen hatte sich die Sekretkonzentration von IL-6 als besonders empfindlicher Parameter bei nasaler Exposition gegenüber Umweltnoxen gezeigt, was auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Capellier et al. 1997). Ähnlich wie bei den Karbonatstaubexpositionen nahm die IL-6- Konzentration zu den drei Untersuchungszeitpunkten nach der Kontrollexposition zu (Tabelle 16).

Tabelle 16: IL-6- Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

IL-6	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	29.8 (15.6 bis 47.3)	30	-16.9 (-58.2 bis 73.7)	0.62	-18.8 (-50.5 bis 66)	0.79
8 h	56.9 (15 bis 126.7)	30	-9.5 (-45.8 bis 70)	0.38	-14.2 (-55.9 bis 78.6)	0.47
24 h	59 (23.2 bis 296.5)	30	55.3 (-60.5 bis 164.6)	0.04	42.2 (-62.3 bis 367.9)	0.03

In dieser Untersuchung zeigten sich für IL-6 schon bei einer Expositionskonzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ eine Zunahme der Zytokinkonzentration um median 55% ($p < 0,05$) und gleichsinnig nach 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ um median 42% ($p < 0,05$, Abbildung 18). Diese Zunahme der Biomarkerkonzentration wurde 24 h nach der Exposition beobachtet.

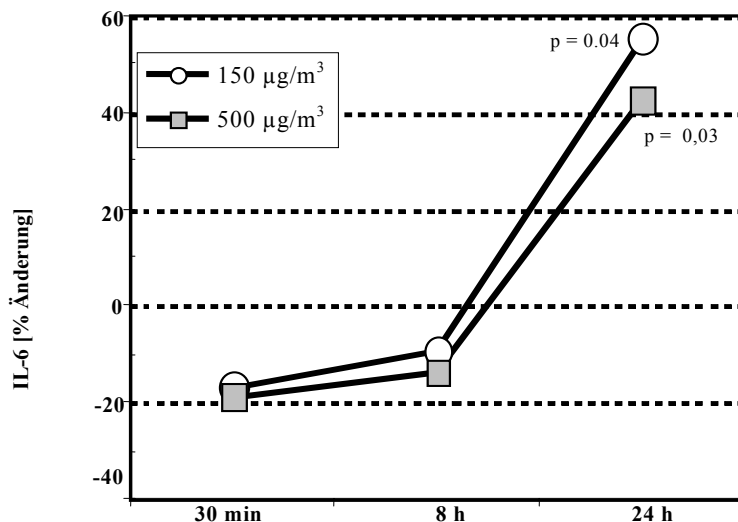


Abbildung 18: Mediane prozentuale Veränderung der Inteleukin-6 Konzentration im Nasensekret 30 min, 8 h und 24 h nach Exposition gegenüber 150 µg/m³ und 500 µg/m³ Urbanstaub im Vergleich zur Kontrolleexposition.

Wie bei den Kalziumkarbonatstaubexpositionen lagen die IL-8 Werte ca. 2-3 Zehnerpotenzen höher als die Werte für IL-1β. Bei IL-8 zeigte sich ähnlich wie bei IL-1β eine Zunahme der Zytokinkonzentration im Nasensekret 24 h nach Exposition gegenüber 500 µg/m³ Urbanstaub (Tabelle 17).

Tabelle 17: IL-8- Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrolleexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³ und 500 µg/m³ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

IL-8	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³	
	absolut [ng/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	6.1 (2.8 bis 11)	29	-27.8 (-53.1 bis 17.9)	0.22	-14 (-42.3 bis 82.2)	0.74
8 h	4.4 (3.1 bis 7.9)	29	8.7 (-23 bis 53.6)	0.08	-30.3 (-50.5 bis 10.4)	0.12
24 h	6.2 (2.8 bis 11.2)	30	-7.9 (-38.8 bis 82.1)	0.59	19.7 (-30.7 bis 76.3)	0.06

Bei den Zytokinbestimmungen nach Kontrollexposition lagen die TNF α - Konzentrationen etwas höher als bei den Kalziumkarbonatstaub-Versuchen (Tabelle 18). Es zeigten sich jedoch keine zeit- oder konzentrationsabhängigen Veränderungen der TNF α -Konzentrationen nach Urbanstaubexposition.

Tabelle 18: TNF α - Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

TNF α	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	9 (5.6 bis 14.6)	17	-7.6 (-31.4 bis 23.4)	0.55	-14 (-45.2 bis 11.5)	0.42
8 h	10.5 (7.3 bis 16.6)	17	5 (-20.3 bis 23.9)	0.69	-25.6 (-53.2 bis 33.5)	0.34
24 h	17.3 (8.3 bis 50.2)	17	-2.6 (-41.5 bis 85.5)	0.39	0 (-37.5 bis 76)	0.59

Auch bei den MCP-1 stimmten die nach Kontrollexposition gemessenen Konzentrationen im Nasensekret gut mit den Werten der Kalziumkarbonatstudie überein. Sie lagen um 100 pg/ml. Veränderungen im Zusammenhang mit der Urbanstaubexposition zeigten sich nicht (Tabelle 19).

Tabelle 19: MCP- Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

MCP	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	81 (57.5 bis 140.5)	24	-13.2 (-57.2 bis 89.2)	0.95	-8.9 (-45.3 bis 37.7)	0.77
8 h	91 (43.1 bis 252)	26	25.8 (-45.9 bis 75.4)	0.22	-23.3 (-44.7 bis 33.6)	0.53
24 h	107.5 (47.6 bis 351)	26	-5.5 (-30.9 bis 69.2)	0.55	-9.2 (-57.1 bis 106.6)	0.74

Es zeigte sich ebenfalls keine Veränderungen der ENA-78 Konzentration im Nasensekret in Abhängigkeit von der Urbanstaubkonzentration. Es ist auffallend, dass sich die mediane Konzentration von ca. 11 ng/ml 30 min nach Kontrollexposition auf über 24 ng/ml zum Zeitpunkt 24 h nach Exposition mehr als verdoppelte (Tabelle 20). Dabei sind im Hinblick auf die Er-

gebnisse von Voruntersuchungen und der Kalziumkarbonatexpositionen eher die Konzentrationen 30 min und 8 h nach Exposition als ungewöhnlich niedrig anzusehen.

Tabelle 20: ENA-78- Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrolleexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

ENA-78	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [ng/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	11.8 (4.9 bis 30)	24	1.6 (-27.5 bis 35.5)	0.51	-1.3 (-34.4 bis 26.9)	0.94
8 h	12.1 (4.5 bis 29.3)	24	13.2 (-21.2 bis 57.4)	0.06	0 (-21.8 bis 40.2)	0.41
24 h	24.3 (5.8 bis 43.9)	25	-7 (-27.5 bis 18.9)	0.47	-16.4 (-30.3 bis 24.3)	0.52

Die Konzentrationen von SP im Nasensekret sind bemerkenswert konstant und zeigten keine Veränderungen im Zusammenhang mit der gewählten Staubkonzentration oder mit dem Untersuchungszeitpunkt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Substanz P- Konzentrationen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrolleexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1648a (p = Wilcoxon Rangtest).

SP	Kontrolle		150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	absolut [pg/ml]	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	139.3 (91.8 bis 172.1)	29	-11.3 (-38.7 bis 19.2)	0.26	-1.5 (-31.7 bis 35.4)	0.87
8 h	140.4 (67.7 bis 172.3)	28	-3.9 (-17.9 bis 42.6)	0.29	-2.9 (-21.7 bis 44.5)	0.25
24 h	131.4 (91.9 bis 202.7)	29	5.9 (-30.8 bis 29.2)	0.55	5.9 (-23.1 bis 52.6)	0.37

Fasst man die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen im Nasensekret nach Urbanstaubexposition zusammen, so zeigte sich konsistent eine Zunahme der medianen Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 nach Exposition gegenüber 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bei Probenentnahme 24 h nach Exposition. Die IL-6 Konzentration im Nasensekret ist der einzige Parameter, bei dem sich ein Anstieg in Zusammenhang mit der Urbanstaubexposition auch nach 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ annehmen lässt.

Zellverteilungsmuster im Nasensekret

Im Nasenabstrich kommen neben epithelialen Zellen verschiedene Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe vor (Farr et al. 1984; Mygind und Thomsen J. 1973; Pipkorn et al. 1988b; Pipkorn und Karlsson 1988; Ruppmann 1969). Trotz tageszeitlicher Schwankungen ist die Reproduzierbarkeit nasaler Zytologien akzeptabel (Hauser et al. 1994; Holopainen 1976; Lee et al. 1991; Lee et al. 1993). Sie werden für diagnostische (Heppt 1995; Jirapongsananuruk und Vichyanond 1998), physiologische (Janowski et al. 1995; Ronchetti et al. 2002), pathophysiologische (Juliusson et al. 1991; Lim et al. 1995; Peden et al. 1999; Pelikan 1983; Pelikan und Pelikan-Filipek M. 1988; Pelikan und Pelikan-Filipek M. 1989; Pipkorn et al. 1988a) und pharmakologische Untersuchungen (Lozewicz et al. 1990; Meltzer 1988; Meltzer et al. 1990) eingesetzt. Nasale Zytologien sind als Indikator für umweltbedingte Schäden der oberen Atemwegsschleimhaut verbreitet (Calderon Garciduenas et al. 1998; Calderon-Garciduenas et al. 1994; Calderon-Garciduenas et al. 1995; Frischer et al. 1993; Gluck und Gebbers 2000; Kopp et al. 1999; Pazdrak et al. 1993; Plamenac et al. 1985; Purokivi et al. 2002; Purokivi et al. 2001; Willes et al. 1998).

Zellverteilungsmuster im Nasensekret nach Kalziumkarbonatstaubexposition

In der Färbung nach May-Grünwald lassen sich epitheliale, lymphozytäre und leukozytäre Zellelemente differenzieren. Die Daten sind mit den immunzytochemischen Daten redundant und die Ergebnisse stimmten weitgehend überein, so dass die aussagekräftigeren immunzytochemischen Ergebnisse detailliert dargestellt sind. Eosinophile Granulozyten, ein relevanter Zelltyp, der immunzytochemisch nicht differenziert wurde, war bei den May-Grünwald-Färbungen nur vereinzelt nachweisbar und spielte bei diesen Untersuchungen an gesunden Probanden keine Rolle.

CD45 ist ein Plasmamembran- Glykoprotein, das ausschließlich auf kernhaltigen hämatopoetischen Zellen gefunden wird (Swinzer 1989). Der Anteil CD45-positiver ($CD45^+$) Zellen entspricht im wesentlichen der Relation leukozytärer und epithelialer ($CD45$ -negativer) Zellelemente in der nasalen Zytologie. Nach Kontrollexposition wurde ein Anstieg der $CD45^+$ -Zellen von unter 10% zum Zeitpunkt 30 min und 8 h auf über 30% zum Zeitpunkt 24 h nach Exposition beobachtet (Tabelle 22). Ungewöhnlich ist der niedrige Anteil $CD45^+$ -Zellen zu

den ersten beiden Entnahmezeitpunkten. In Voruntersuchungen hatten mit Schaumstoffsamplern gewonnene Zytologien einen Anteil von durchschnittlich 30% CD45⁺-Zellen erbracht. Bemerkenswerte Veränderungen des Anteils CD45⁺-Zellen in Abhängigkeit von der gewählten Kalziumkarbonatstaubexposition zeigten sich nicht.

Tabelle 22: Färbeindex CD45⁺ Zellen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³, 500 µg/m³ und 1000 µg/m³ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

CD45	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³		1000 µg/m ³	
	Färbeindex	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	7.7 (3 bis 25.4)	32	-21 (-65.5 bis 90.2)	0.60	14.3 (-39.4 bis 142.4)	0.09	-2.2 (-65.8 bis 114.7)	0.61
8 h	9.9 (4.2 bis 38.2)	27	-22.4 (-61.1 bis 36.7)	0.37	-5.1 (-50.8 bis 163.8)	0.23	-8.1 (-54.5 bis 48.5)	0.99
24 h	31.4 (18.2 bis 40.2)	15	-14.4 (-26.4 bis 15.2)	0.39	-32.1 (-64.9 bis 43.6)	0.64	-14.2 (-41.6 bis 76.7)	0.82

CD68 ist ein vorwiegend auf Monozyten und Makrophagen vorkommendes Glykoprotein (Cordell et al. 1995). Es wird aber auch von anderen leukozytären Zellen in geringem Ausmaß exprimiert. Anders als in der BAL, in der Makrophagen den wesentlichen zellulären Bestandteil darstellen, machen Makrophagen in den Zellen des Nasensekrets nur einen geringen Teil aus. Nach Kontrollexposition trugen in den mit Schaumstoffsamplern gewonnenen nasalen Zytologien ca. 4-5% der Zellen den Differenzierungsmarker CD68. Der Prozentsatz nahm 8h nach Exposition gegenüber Kalziumkarbonatstaub in allen drei Konzentrationen deutlich zu (Tabelle 23). Nach 24 h waren diese Veränderungen rückläufig.

Tabelle 23: Färbeindex CD68⁺ Zellen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³, 500 µg/m³ und 1000 µg/m³ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

CD68	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³		1000 µg/m ³	
	Färbeindex	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	4.3 (2 bis 7.6)	30	-16.7 (-51.5 bis 103.6)	0.79	-22.9 (-48.2 bis 214.3)	0.26	-7.7 (-57.3 bis 100.2)	0.21
8 h	4.8 (2.6 bis 6.6)	29	67.5 (-38.3 bis 131.7)	0.01	29.7 (-24.5 bis 129.2)	0.05	42.5 (-15.1 bis 122.2)	0.01
24 h	4.4 (3.3 bis 7.1)	14	40.8 (-41.4 bis 92.3)	0.24	18.7 (-35.4 bis 93.6)	0.35	12.5 (-54.5 bis 37.7)	0.68

Myeloperoxidase ist ein in den azurophilen Granula vorwiegend neutrophiler Granulozyten lokalisiertes Enzym (Olsson et al. 1972). Es ist ein gängiger, wenn auch nicht vollständig se-

lektiver immunzytochemischer Marker für neutrophile Granulozyten (Nauseef 2001). Nach Kontrollexposition machten MPO⁺- Zellen 6-12 % der Zellen im Nasensekret aus (Tabelle 24). Dreißig min nach Exposition mit 1000 µg/m³ nahm die Anzahl MPO⁺-Zellen median um ca. 35% zu, 8 h nach Exposition war eine Zunahme nach 150 µg/m³ und 500 µg/m³ zu beobachten.

Tabelle 24: Färbeindex MPO⁺ Zellen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³, 500 µg/m³ und 1000 µg/m³ Kalziumkarbonatstaub (p = Wilcoxon Rangtest).

MPO	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³		1000 µg/m ³	
	Färbeindex	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	6.3 (2 bis 14.8)	29	0 (-54.6 bis 150.5)	0.25	8.6 (-43.6 bis 123.4)	0.16	36.5 (-47.1 bis 122.3)	0.04
8 h	9 (3.2 bis 20.9)	29	29.2 (-45.4 bis 129.7)	0.05	39.3 (-60.3 bis 213.9)	0.08	-25.3 (-54.2 bis 205)	0.26
24 h	12.5 (5.9 bis 22.8)	15	-30 (-72.7 bis 119.5)	0.81	-12.4 (-72.7 bis 82.8)	0.88	-9.6 (-78.6 bis 50.1)	0.57

Tryptase ist ein immunzytochemischer Marker für Mastzellen, jedoch nicht für basophile Granulozyten (Walls et al. 1990). TRP⁺- Zellen kamen in dem untersuchten gesunden Kollektiv nur vereinzelt vor und das änderte sich auch durch die Staubexpositionen nicht.

Zellverteilungsmuster im Nasensekret nach Urbanstaubexposition

Im Untersuchungskollektiv ließen sich nach Kontrollexposition immunzytochemisch zwischen ca. 25% (30 min) und 50% (8 h und 24 h) der Zellen im Nasensekret der hämatopoetischen Linie zuordnen (Tabelle 25). Expositionsbezogene Veränderungen der CD45⁺-Zellen wurden nicht beobachtet.

Tabelle 25: Färbeindex CD45⁺ Zellen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³ und 500 µg/m³ Urbanstaub 1649a (p = Wilcoxon Rangtest).

CD45	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³	
	Färbeindex	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	28.3 (14.4 bis 46.8)	28	4.4 (-43.1 bis 61.5)	0.52	-4.7 (-52.3 bis 78.1)	0.59
8 h	48.7 (30.6 bis 66.2)	29	-12.7 (-29.1 bis 27)	0.74	-19.2 (-52.9 bis 30)	0.35
24 h	45.8 (29.4 bis 61.2)	29	11.1 (-14.6 bis 48.4)	0.14	-11.3 (-25.4 bis 36.5)	0.99

CD68⁺ Zellen, also vor allem Makrophagen, waren nach Kontrollexposition bei 2-3 % der Zellen nachweisbar (Tabelle 26). Es zeigte sich 30 min nach Exposition gegenüber 150 µg/m³ eine Zunahme um 13%. Außerdem nahm der Färbeindex 24 h nach Exposition gegenüber 500 µg/m³ um ca. 10% zu (p > 0,05)

Tabelle 26: Färbeindex CD68⁺ Zellen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³ und 500 µg/m³ Urbanstaub 1649a (p = Wilcoxon Rangtest).

CD68	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³	
	Färbeindex	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	2 (1 bis 3.5)	28	13.3 (-39.4 bis 200)	0.07	0 (-37.8 bis 79.5)	0.30
8 h	2.6 (1.7 bis 3.9)	29	0 (-35.7 bis 60.5)	0.25	-8.1 (-45.6 bis 108.9)	0.35
24 h	2.9 (1.7 bis 5.7)	29	0 (-46.2 bis 95.1)	0.25	10.3 (-56.2 bis 107.5)	0.07

Die hämatopoetischen Zellen waren überwiegend MPO⁺. Es handelt sich demnach vorwiegend um neutrophile Granulozyten (Tabelle 27). Die MPO⁺- Zellen stiegen 30 min nach Exposition gegenüber 150 µg/m³ und 500 µg/m³ um ca. 25% an. Bemerkenswerte Veränderungen der MPO⁺- Zellen zu späteren Entnahmezeitpunkten wurden nicht beobachtet.

Tabelle 27: Färbeindex MPO⁺ Zellen im Nasensekret (Median mit 25. bis 75. Perzentile) 30 min, 8h und 24h nach Kontrollexposition sowie prozentuale Veränderung gegenüber diesem Wert nach Exposition mit 150 µg/m³ und 500 µg/m³ Urbanstaub 1649a (p = Wilcoxon Rangtest).

MPO	Kontrolle		150 µg/m ³		500 µg/m ³	
	Färbeindex	n	Änderung in %	p	Änderung in %	p
30 min	21.8 (4.8 bis 43.6)	27	24.3 (-45.3 bis 398.9)	0.04	28.2 (-38.6 bis 124.8)	0.09
8 h	43.2 (25.3 bis 60)	28	-22 (-46 bis 72.9)	0.60	-6.5 (-52.6 bis 49.6)	0.84
24 h	48.6 (34.3 bis 62.5)	27	4.3 (-44.8 bis 40.2)	0.74	-0.9 (-29.2 bis 75.2)	0.60

Tryptase- positive Zellen kamen bei der überwiegenden Mehrzahl der Proben nicht zur Darstellung und lagen vereinzelt bei unter 1 %.

Visuelle Analogskalen

Die VAS wurden von den Probanden vor und ca. 30 min nach der Exposition ausgefüllt. Ausgewertet wurden die Differenzen der Werte nach und vor der Exposition. Es zeigten sich geringfügige expositionsbezogene Veränderungen der nasalen Befindlichkeit.

Visuelle Analogskalen nach Kalziumkarbonatstaubexposition

Nach Kalziumkarbonatstaubexposition ergab sich ein positiver Trend bei den Parametern nasales Verstopfungsgefühl, Trockenheitsgefühl der Nase und Schleimhautbrennen mit zunehmenden Kalziumkarbonatstaubkonzentrationen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Symptomscores (Median mit 25. bis 75. Perzentile) für Verstopfung, Nasenlaufen, Juck- Niesreiz, Trockenheitsgefühl, Geruchsbelästigung und Schleimhautbrennen nach Exposition mit 150 µg/m³, 500 µg/m³ und 1000 µg/m³ Kalziumkarbonatstaub (p = Trendtest nach Page).

	n	Kontrolle	150 µg/m ³	500 µg/m ³	1000 µg/m ³	p
Verstopfung	32	0.5 (-8.5 bis 6.5)	0 (-3.5 bis 13)	0.5 (-2 bis 8.5)	1 (-1.5 bis 17)	0,05
Nasenlaufen	32	0 (-3 bis 3.5)	0 (-5.5 bis 1)	0 (-5.5 bis 3.5)	0 (-7 bis 1)	0,65
Juck- Niesreiz	32	0 (-1.5 bis 1)	0 (-1.5 bis 0.5)	0 (0 bis 2)	0 (-1.5 bis 1)	0,26
Trockenheitsgefühl	32	0 (-2.5 bis 5)	2 (-1.5 bis 12.5)	3 (-0.5 bis 18)	2 (-1 bis 20)	0,05
Geruchsbelästigung	32	0 (-1 bis 1.5)	0 (-1 bis 2)	0 (0 bis 2)	0 (-1.5 bis 2)	0,41
Schleimhautbrennen	32	0 (-1 bis 0)	0 (-1 bis 1)	0 (-1 bis 0.5)	1 (-0.5 bis 2)	0,01

Die Ergebnisse ergeben in dem sensitiven Trend-Test nach Page zwar teilweise p-Werte von 0,05 oder weniger, doch handelt es sich jeweils um Verschiebungen um wenige Millimeter auf einer 100 mm langen Skala. Somit ist die Effektgröße gering (Abbildung 19).

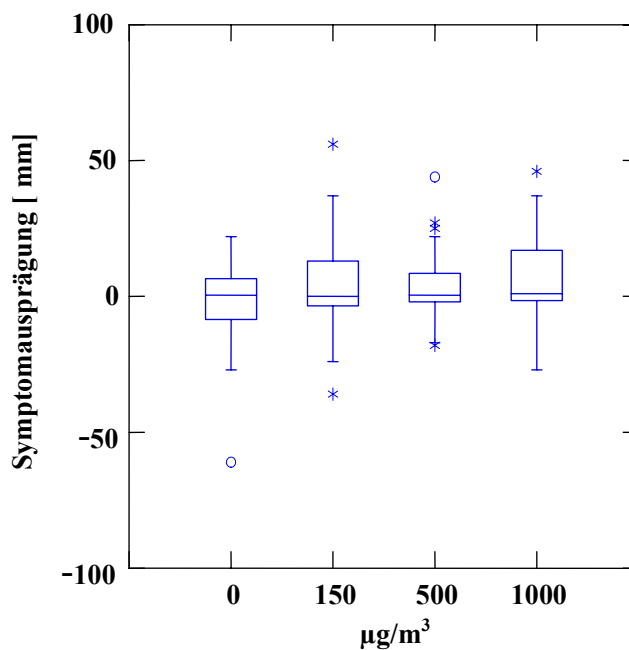


Abbildung 19: Box-Plot der Symptomscores für nasales Verstopfungsgefühl nach Exposition gegenüber Kalziumkarbonatstaub. Man erkennt zwar einen konzentrationsabhängigen Trend, die Unterschiede sind jedoch gering.

Visuelle Analogskalen nach Urbanstaubexposition

Die Differenzen der nasalen Symptomscores vor und nach Exposition, aufgeschlüsselt nach der Urbanstaubkonzentration, sind in Tabelle 29 wiedergegeben. Für die erfassten Befindlichkeitsparameter ergab sich keine Abhängigkeit von der eingesetzten Urbanstaubkonzentration.

Tabelle 29: Symptomscores (Median mit 25. bis 75. Perzentile) für Verstopfung, Nasenlaufen, Juck- Niesreiz, Trockenheitsgefühl, Geruchsbelästigung und Schleimhautbrennen nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Urbanstaub 1649a (p = Trendtest nach Page).

	n	Kontrolle	150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	p
Verstopfung	30	1.5 (-6 bis 13.5)	3.5 (-3 bis 13)	-2 (-8 bis 3)	0.28
Nasenlaufen	30	-0.5 (-9 bis 1)	0 (-6 bis 5)	-1 (-4 bis 0)	0.36
Juck- Niesreiz	30	0 (-1 bis 2)	0 (-1 bis 2)	0 (-2 bis 1)	0.64
Trockenheitsgefühl	30	5 (-1.5 bis 20.5)	9.5 (0 bis 25)	5 (-1 bis 21)	0.56
Geruchsbelästigung	30	0.5 (-1 bis 5)	2 (-1 bis 14)	1 (-1 bis 6)	0.33
Schleimhautbrennen	30	1 (-1.5 bis 3)	0 (-1 bis 5)	0 (-1 bis 5)	0.24

Sequenzeffekte

Die Probanden des Teilprojektes I wurden in 4 Gruppen aufgeteilt, die in unterschiedlichen Reihenfolgen exponiert wurden (s. Tabelle 3). Es wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests geprüft, ob die Reihenfolge der Expositionen einen Einfluss auf die untersuchten Parameter hatte. Dabei zeigte sich kein Einfluss der Expositionsreihenfolge auf die überwiegende Mehrzahl der untersuchten Parameter. Lediglich die Konzentrationen von MIP-1 α lagen nach Exposition gegenüber 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ höher, wenn bei der vorhergehenden Exposition 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ anstatt 0 oder 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ gegeben worden waren. Da MIP-1 α aber sonst keine konzentrationsabhängigen Veränderungen aufwies, führt dieser wahrscheinlich rein statistische Zusammenhang nicht zu einer Verzerrung der Ergebnisse.

Die Probanden des Teilprojektes II wurden in 3 Gruppen aufgeteilt, die in unterschiedlichen Reihenfolgen exponiert wurden (Tabelle 4). Auch hier zeigten sich außer bei Substanz P keine Sequenzeffekte. Bei Substanz P war die prozentuale Zunahme nach Exposition mit 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ höher (p < 0,01), wenn in der Vorexposition 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ gegeben worden war. Analog hierzu war die prozentuale Zunahme nach Exposition gegenüber 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ niedriger, wenn vorher noch gar keine Exposition stattgefunden hatte. Da Substanz P in dieser Untersuchung keine konzentrationsabhängigen Veränderungen gezeigt hatte, sind mögliche Staubwirkungen durch diese Sequenzeffekte unter Umständen verdeckt worden. Es ist aber auch möglich, dass durch eine Vorexposition, auch wenn sie Tage zurückliegt, das sensible Nervensystem der Nasenschleimhaut - ohne SP-Ausschüttung ins Nasensekret - in einen erhöhten

Sensibilitätszustand versetzt worden war, so dass erst bei nachfolgenden Expositionen eine messbare Ausschüttung ins Sekret erfolgte. Diese Fragestellung kann nur durch ein spezielles Versuchsdesign angegangen werden.

Einflussgrößen und Korrelationen

Wie zu erwarten und aus Voruntersuchungen auch bekannt, korreliert die Konzentration zahlreicher Biomarker invers mit der Menge des gesammelten Nasensekretes (Abbildung 20). Dies ist am ehesten durch den Verdünnungseffekt durch unterschiedlich starke glanduläre Sekretion während des Sammelvorgangs zu erklären.

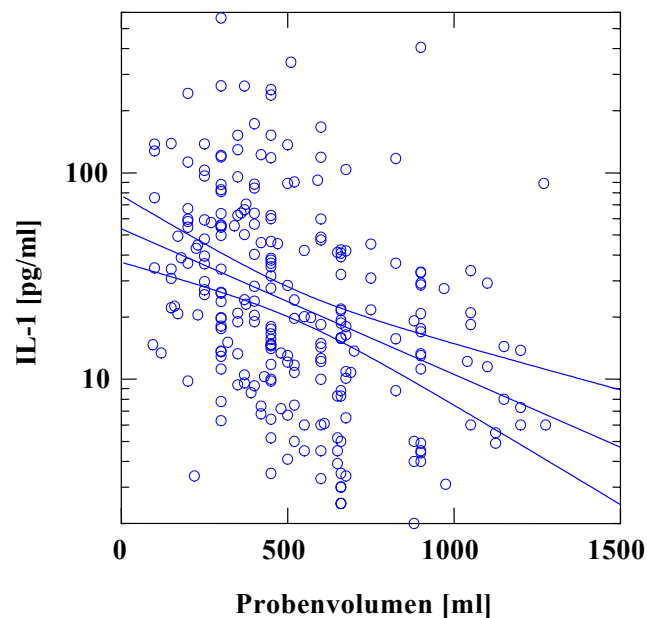


Abbildung 20: Inverse Korrelation zwischen Probenvolumen und Biomarkerkonzentration (hier IL-1). Regressionsgerade mit 95% Vertrauensbereich.

Es handelt sich bei dem gesammelten Sekretvolumen zwar um eine interindividuell erheblich, intraindividuell aber wenig variierende Größe. Durch die Standardisierung der Biomarkerkonzentrationen auf die Werte bei der Kontrollmessung wurde der Einfluss unterschiedlicher Probenvolumina kompensiert.

Die Expositionen erfolgten während eines Jahres, jedoch vorwiegend in den Sommermonaten. Es zeigten sich keine relevanten jahreszeitlichen Schwankungen der Biomarker- Konzentrationen im Nasensekret (Abbildung 21).

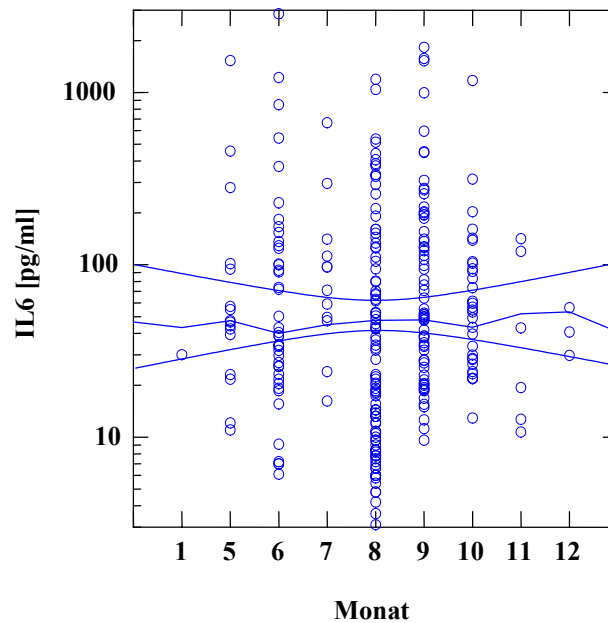


Abbildung 21: Die Biomarkerkonzentrationen im Nasensekret von Normalprobanden (hier IL-6) zeigten keine relevante Abhängigkeit von der Jahreszeit. Dargestellt sind die mediane Verlaufskurve mit deren 95% Vertrauensbereich

Tageszeitliche Schwankungen sind für zahlreiche Analyte im menschlichen Nasensekret beschrieben. Geringen tageszeitlichen Schwankungen unterlagen auch die Biomarkerkonzentrationen im Teilprojekt I. So ergaben sich für IL-6 und SP morgens und abends höhere Werte als nachmittags, während IL-8 vormittags leicht erniedrigte Werte zeigte (Abbildung 22). Im Teilprojekt II wurden deswegen alle Untersuchungen vormittags zwischen 7:30 und 9:30 Uhr begonnen. Diese Maßnahme reduzierte tatsächlich die Variabilität der Biomarkerkonzentrationen im Nasensekret.

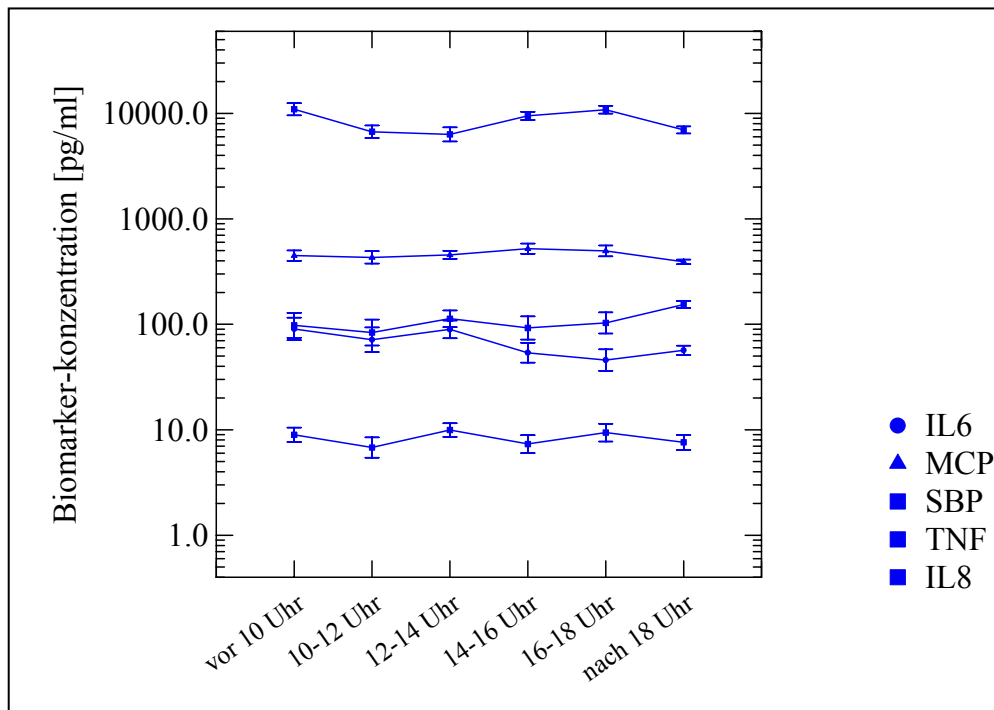


Abbildung 22: Tageszeitliche Schwankungen der Konzentration der Biomarker Interleukin 6 (IL-6), Monozyten chemotaktisches Protein (MCP), Substanz P (SBP), Tumornekrosefaktor α (TNF), und Interleukin-8 (IL-8) im humanen Nasensekret.

Die deutlichsten Korrelationen von Zytokinen und Entzündungszellen im Nasensekret fanden sich im Teilprojekt II für IL-1 und MPO ($r = 0.44$, $p \ll 0.001$), IL-6 und MPO ($r = 0.46$, $p \ll 0.001$), sowie IL-8 und MPO ($r = 0.32$, $p < 0.001$). MCP korrelierte schwach mit $CD68^+$ Zellen ($r = 0.21$, $p < 0.01$) und ENA-78 schwach mit $CD45^+$ Zellen, aber nicht mit MPO^+ -Zellen. SP korrelierte nicht mit den untersuchten Zelltypen.

Vergleich der Wirkungen von Kalziumkarbonatstaub und Urbanstaub

Aufgrund der unterschiedlichen Korngrößenverteilung kann man davon ausgehen, dass vom Kalziumkarbonatstaub eine größere Fraktion in der Nase deponiert wurde als vom Urbanstaub. Die mit $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ höhere Maximalkonzentration des Kalziumkarbonatstaubes wird in dem hier angestellten Vergleich nicht berücksichtigt.

Kalziumkarbonat- und Urbanstaubexposition führten 30 min nach Expositionsende vorwiegend zu einer Suppression der im Nasensekret untersuchten Zytokine um ca. 20-25% (Abbildung 23). Vergleicht man die Effekte 24 h nach Expositionsende, zeigen sich je nach eingesetztem Staub unterschiedliche Profile. Während nach Kalziumkarbonatstaub eine Reduktion von IL-1 β um annähernd 50% beobachtet wurden, stieg die IL-1 β Konzentration nach Urbanstaubexposition um über 70% an ($p < 0,005$). Gleichzeitig war der IL-8 Anstieg nach

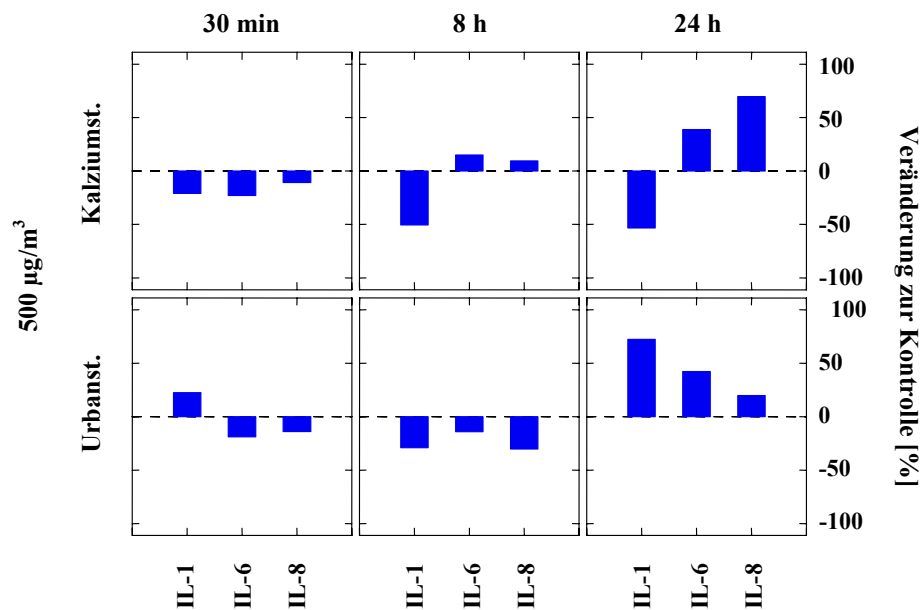


Abbildung 23: Vergleich der Wirkungen von Urbanstaub und Kalziumkarbonatstaub [500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$] auf die relative Änderung der Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IL-8 im Nasensekret 30 min, 8 h und 24 h nach Expositionsende.

Kalziumkarbonatstaubexposition mit annähernd 70% ($p = 0,01$) wesentlich ausgeprägter als nach Urbanstaubexposition. Die IL-6 Konzentrationen ähnelten sich nach Exposition gegenüber den beiden Stäuben.

Bei den immunzytochemischen Untersuchungen fällt nach Exposition gegenüber beiden Stäuben die überwiegende Abnahme leukozyitärer (CD45⁺) Zellelemente zu den 3 Untersuchungszeitpunkten nach Exposition auf (Abbildung 24). CD68⁺ und MPO⁺ Zellen liegen 8 h nach Exposition gegenüber Kalziumkarbonatstaub ca. 20-25% über den Werten nach Kontrolleexposition, während sich nach Urbanstaubexposition keine relevante Änderung dieser Zelltypen zeigte.

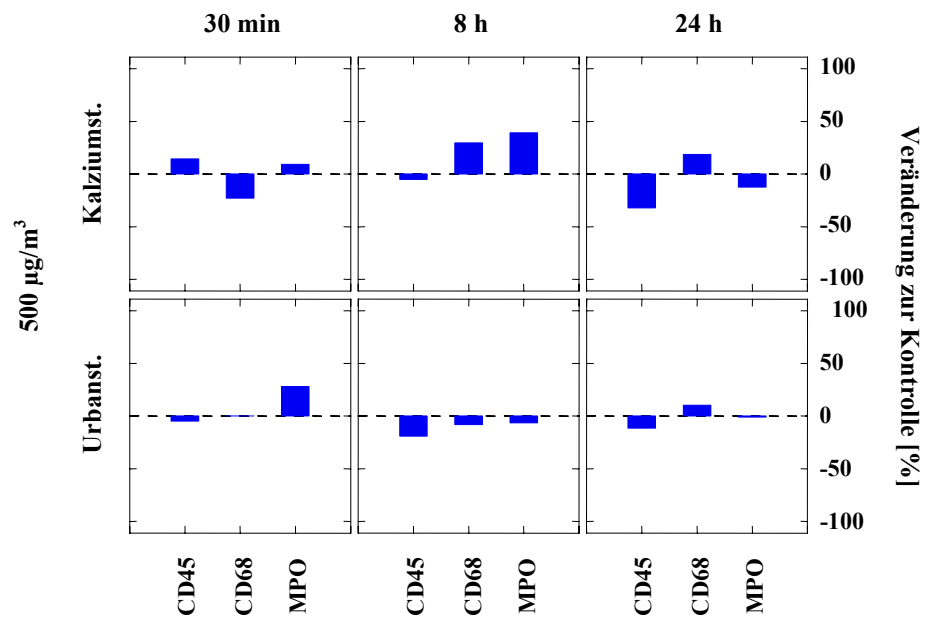


Abbildung 24: Vergleich der Wirkungen von Kalziumkarbonatstaub und Urbanstaub [500 µg/m³] auf die relative Änderung des Färbeindex für CD45, CD68 und Myeloperoxidase (MPO) im Nasensekret 30 min, 8 h und 24 h nach Expositionsende.

Diskussion

Umweltstäube sind aerosole Gemische unterschiedlich toxischer Inhaltsstoffe. In mehreren epidemiologischen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen Umweltstäuben und entzündlichen Erkrankungen der oberen Atemwege festgestellt (Abbey et al. 1995). In den 2 beschriebenen Projekten wurde untersucht, ob eine nasale Kurzzeitexposition mit einem niedrig-toxischen Kalziumkarbonatstaub und einem Umweltstaub aus einer städtischen Agglomerationszone (Urbanstaub 1648a des National Institute of Standards and Technology) eine Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut hervorruft.

Staubexpositionen

Kalziumkarbonatstaub wurde in Konzentrationen von 150, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ eingesetzt, der Urbanstaub in Konzentrationen von 150 und 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Nach der 22. BImSchV liegt der Jahresmittelwert für Schwebstaubbelastung bei 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, dieser Wert wird in Baden-Württemberg im Jahresmittel jedoch nicht erreicht (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg 1998). Eine Staubkonzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ entspricht kurzzeitigen Spitzenbelastungen in städtischen Agglomerationszonen oder einer Fahrt in der Münchner U-Bahn (EPA 2001; Praml und Schierl 2000; Stanners und Bourdeau 1995). Die beim niedrig-toxischen Kalziumkarbonatstaub verwendete Höchstkonzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ kommt nur während ungewöhnlicher Belastungssituationen vor, etwa bei Sandstürmen oder bei Ferntransport von Saharastaub im Rahmen besonderer meteorologischer Verhältnisse (Hefflin et al. 1994). Die für die 2 Projekte gewählten Staubkonzentrationen werden insgesamt als realitätsnah für mehrstündige Luftschadstoff- Spitzenbelastungen in Deutschland erachtet.

Es handelte sich um Humanexpositionsuntersuchungen. Als Modell diente der Mensch selbst. Für Humanexpositionsuntersuchungen mit Luftschadstoffen werden unterschiedliche Expositionssysteme beschrieben. Für Humanexpositionen werden gelegentlich Luftschadstoffe in flüssigem Medium aufgeschwemmt und in die Atemwege instilliert (Danuser et al. 2000; Ghio et al. 2000). In Tierversuchen führte die Instillation von Partikeln jedoch zu einer stärkeren Schädigung von Geweben als eine Inhalation (Osier und Oberdorster 1997) oder bildete die Wirkungen inhalierter Substanzen nur näherungsweise ab (Henderson et al. 1995; Künst-

ler 1983; McConnell 1995). Außerdem bleibt bei einer Instillation unklar, welche Dosis der Umweltexposition entspricht und ob sich wasserlösliche und wasserunlösliche Substanzen ähnlich verhalten wie bei einer Inhalation.

Für die inhalative Exposition stehen mehrere Optionen zur Verfügung: die Nasenmaske, die Gesichtsmaske, das Mundstück, die Ganzkopf-Exposition und die Ganzkörperexposition (Holländer 1988; Utell 1988). Während für Untersuchungen der unteren Atemwege und Lungen die Ganzkörperexposition am zuverlässigsten ist, ist die Nasenmaske für nasale Expositionsuntersuchungen ausreichend (Dorato und Wolff 1991). Sie entspricht weitgehend den Verhältnissen bei natürlicher Nasenatmung. Bei geschlossenem Mund gelangen die Testsubstanzen vollständig in das untersuchte Kompartiment und bei unerwünschten Wirkungen braucht der Proband die Untersuchung nicht abbrechen, sondern atmet kurz durch den Mund unbelastete Luft ein und kann die Untersuchung fortsetzen. Probanden mit relevanter Nasenatmungsbehinderung (chronische Mundatmer) können mit diesem Expositionssystem nicht untersucht werden.

Die auf der Nasenschleimhaut deponierte Staubmenge hängt vom Atemminutenvolumen des Probanden, von der Expositionskonzentration, der Dauer der Exposition sowie von den eingesetzten Partikelgrößen ab. Der Schwellungszustand der Nasenschleimhaut oder geringfügige Formveränderungen des inneren Nasenskeletts beeinflussen die nasale Staubdeposition ab Partikelgrößen von ca. 5 μm nicht wesentlich (Keck et al. 2000; Zwartz und Guilmette 2001). Bei Partikeln im Submikrometerbereich beobachteten Rasmussen und Koautoren jedoch eine Abhängigkeit von der nasalen Querschnittsfläche und der nasalen Luftströmungsgeschwindigkeit (Rasmussen et al. 2000). Der im Teilprojekt I eingesetzte Kalziumkarbonatstaub mit einem medianen massenaerodynamischen Durchmesser von 15 μm wird annähernd vollständig in der Nase ausgefiltert. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass zwischen 80 und 90% dieses Staubes in den vorderen Nasenabschnitten ausgefiltert werden (Keck et al. 2000). Dies ist die gleiche Region, die von den verwendeten Schaumstoffsammlern erreicht wird. Die Partikelgrößen-Verteilungskurve des Umweltstaubes 1649a zeigt einen wesentlich flacheren Verlauf als die des Kalziumkarbonatstaubs. Es wird angenommen, dass ein größerer Massenanteil des Urbanstaubes klein genug ist, die Nase zu passieren und deswegen die in der Nase deponierte Fraktion geringer ist.

Die Staubgenerierung erfolgte in den beiden Teilprojekten mit unterschiedlichen Dispersionsgeräten. Die im Teilprojekt I eingesetzte Vibrierteller-Dispersionseinheit hatte einige Nachteile. Zwar war über eine dreistündige Exposition eine ausreichend genaue durchschnittliche Staubkonzentration erreichbar (Riechelmann et al. 2003b), innerhalb dieser 3 Stunden kam es jedoch immer wieder zu Konzentrationsspitzen, wenn größere Staubaggregate aus dem Vorratsbehälter auf den Vibrierteller rieselten (Abbildung 25). Während dies bei niedrigtoxischen Stäuben noch hinnehmbar erschien, erlaubte die Humanexposition mit Urbanstäuben eine solche unregelmäßige Staubabgabe nicht. Außerdem konnten bei der Vibrierteller-Dispersionseinheit durch Bedienungsfehler Überdosierungen entstehen, die den Probanden möglicherweise gefährdet hätten. Zuletzt waren mit der Vibrierteller-Dispersionseinheit nur sehr hochkonzentrierte Primäraerosole herstellbar, von denen nur geringe Bruchteile als Nutzstaub dem Probanden zugeführt werden konnten. Dies führte zu großem Staubverbrauch, der bei den geringen Kosten des Teststaubes im Teilprojekt I zu verschmerzen war, nicht aber bei den hohen Kosten für den Urbanstaub 1649a.

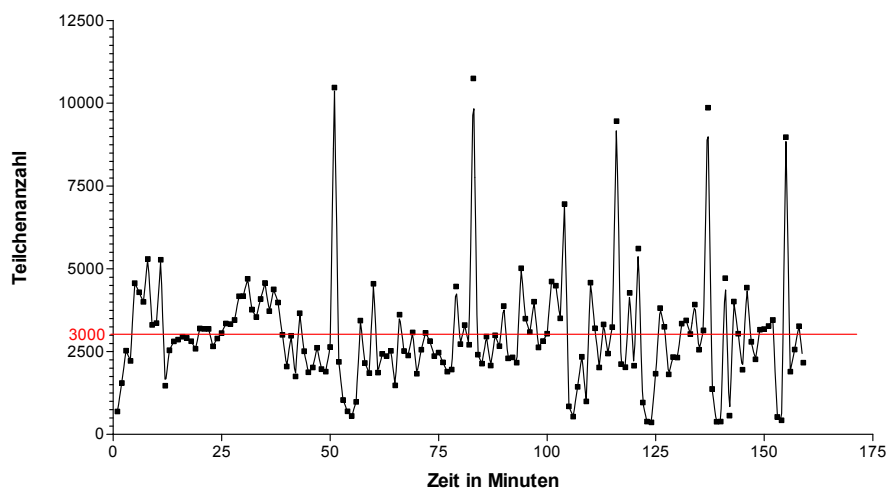


Abbildung 25: Partikelzahlen bei Aerosolgeneration mit einer Vibrierteller-Dispersionseinheit. Obwohl die durchschnittliche Partikelzahl den Sollwert von 3000 (graue Linie) einhält, kommt es zu steilen Spitzen.

Die genannten Probleme treten bei der Drehteller-Dispersionseinheit nicht auf. Die Staubabgabe ist wesentlich gleichförmiger. Die für eine dreistündige Exposition erforderliche Staubmenge wird bei Expositionsbeginn auf den Drehteller aufgetragen. Dies ist gleichzeitig die maximale Dosis, die bei Bedienfehlern appliziert werden kann. Außerdem konnte durch die

Modifikation des Schrittmachermotors die Drehfrequenz des Drehtellers reduziert werden. Das Primäraerosol lag schon in niedrigen Konzentrationen vor, die nur eine geringe Nachverdünnung erforderte und eine gute Ausbeute des eingesetzten Staubes ermöglichte. Aufgrund der Geräteeigenschaften und der vorangegangenen Eichexperimente war eine Konzentration von $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ schwieriger herzustellen als eine Konzentration von $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Die nominelle Konzentration von $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ entspricht daher einer durchschnittlichen aktuellen Konzentration von $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Insgesamt wird davon ausgegangen, dass die Staubexpositionen mit ausreichender Genauigkeit und Wirklichkeitstreue erfolgt sind, um die Fragestellungen der Untersuchungen zu beantworten.

Erfassung der biologischen Effektparameter

Im Rahmen dieser 2 Projekte wurden gesunde Probanden über 3 Stunden Stäuben in Konzentrationen exponiert, die in der realen Umwelt vorkommen. Es durfte nicht mit ausgeprägten, klinisch unmittelbar augenfälligen entzündlichen Veränderungen gerechnet werden, da solche Veränderungen im Alltagsleben nicht beobachtet werden. Vielmehr mussten subklinische entzündliche oder entzündungsfördernde Reaktionen der Nasenschleimhaut erfasst werden. Die Operationalisierung der Zielgröße 'subklinische nasale Entzündungsreaktion' ist komplex. Selbst bei normaler, gesunder Nasenschleimhaut finden sich Entzündungszellen in der nasalen Zytologie, vorrangig neutrophile Granulozyten (Hauser et al. 1994). Der Pionier der nasalen Immunologieforschung, Niels Mygind, bezeichnet dies als ‚expression of the physiological inflammation of a nasal mucosa, which is continuously exposed to microorganisms and inhaled particles‘ (Mygind 1979). Es gibt keinen Parameter oder Grenzwert, der eine nasale Entzündung definiert. Erschwerend kommt für Untersuchungen an der Nasenschleimhaut hinzu, dass sich der Funktionszustand der Nasenschleimhaut laufend ändert. Dies betrifft auch immunologische Parameter (Greiff et al. 1996; Harada et al. 1984; Mygind und Thomsen 1976).

Es wurden deshalb Surrogatmarker untersucht, von denen angenommen wird, dass sie ausreichend sensitiv und spezifisch sind, um eine subklinische Entzündungsreaktion nachzuweisen. Die Bestimmung von Zytokinen im Nasensekret ist ein gebräuchlicher Surrogatmarker für eine nasale Entzündungsreaktion (Steerenberg et al. 1997). Am häufigsten werden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α zum Nachweis einer nicht-allergischen nasalen Entzün-

dungsreaktion eingesetzt (Gentile et al. 1998; Mann et al. 2002; Noah et al. 1995c; Noah et al. 1995a; Turner et al. 1998). Darüber hinaus wurde in dieser Untersuchung noch MCP-1, (Becker et al. 1994), ENA-78 (Williams et al. 1999) und das Neuropeptid SP (Baraniuk et al. 1999) explorativ untersucht. Außerdem wurde das Verteilungsmuster von Leukozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen im Nasensekret konventionell und immunzytochemisch untersucht. Eosinophile Granulozyten und Mastzellen kamen im untersuchten Normalkollektiv nur sporadisch vor. Ein Anstieg neutrophiler Granulozyten wurde nach zahlreichen Humanexpositionsuntersuchungen mit Umweltschadstoffen festgestellt (Calderon-Garciduenas et al. 1994; Devlin et al. 1991; Diaz-Sanchez et al. 2000a; Frischer et al. 1993; Nordenhall et al. 2000). CD68⁺ Zellen im Nasensekret erhöhten sich z. B. nach LPS Stimulation (Tulic et al. 2002), während ein Anstieg eosinophiler Granulozyten nur bei Atopikern (Peden et al. 1999) oder nach Dieselrußexposition beobachtet wurde.

Neben der Auswahl geeigneter Surrogatmarker zum Nachweis einer nasalen Entzündungsreaktion war eine entscheidende Frage, zu welchen Zeitpunkten nach der Exposition diese Marker erfasst werden sollen. Die Zeitkinetik nasaler Entzündungsreaktionen kann je nach Entzündungsart sehr unterschiedlich verlaufen. Bei der allergischen Sofortreaktion der Nasenschleimhaut kommt es unmittelbar nach Allergenexposition zur Freisetzung präformierter Entzündungsmediatoren aus Mastzellen. Im Rahmen der Sofortreaktion aus Mastzellen freigesetzte Zytokine und Chemokine induzieren eine zweite entzündliche Reaktion, die 6-8 h nach der Exposition beginnt. Sie ist zytologisch durch neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten charakterisiert. Die ausgeprägtesten Zellzahlerhöhungen fanden sich 24 h nach Exposition (Raulf-Heimsoth et al. 2000).

Die maximale Erhöhung neutrophiler Granulozyten nach nasaler Exposition mit flüchtigen organischen Verbindungen beobachteten Koren und Mitarbeiter 18 h nach Exposition (Koren und Devlin 1992). Nach nasaler LPS- Instillation [40 µg/ml] beobachteten Danuser und Mitarbeiter einen IL-6-Anstieg mit Maximum 6 h nach Instillation, der im Verlauf der folgenden 23 Stunden zwar rückläufig war, sich aber von der Kontrollexposition immer noch signifikant abhob (Danuser et al. 2000). Nach Virusinokulation erfolgte ein IL-6 Anstieg im Nasensekret nach 2 Tagen (Gentile et al. 1998). In Humanexpositionsuntersuchungen sind demnach messbare Effekte auf die Zytokinkonzentration im Atemwegssekret 6-24 h nach der Exposition zu erwarten.

In Tierversuchen wurden teils schon nach kürzerem Intervall nasale Entzündungsreaktionen gemessen (Yuen et al. 1996). Dies mag teils an Speziesunterschieden im immunologischen Antwortverhalten liegen, wahrscheinlicher aber ist, dass die Zeitkinetik durch die eingesetzten Stimuluskonzentrationen mitbestimmt wird, die im Tierversuch oft wesentlich höher als bei Humanexpositionsuntersuchungen gewählt werden. Die zeitliche Kinetik der epithelialen Zytokinsekretion hängt nämlich von der Intensität des Stimulus ab. Bei starker Reizintensität werden Veränderungen der Zytokinkonzentration frühzeitiger erkennbar als bei schwacher Reizintensität. Dieser Zusammenhang wurde in Vorversuchen an immortalisierten Atemwegsepithelien nach LPS- Stimulation untersucht (Abbildung 26). Während bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration erst nach 6–24 h ein Anstieg der Zytokinkonzentration

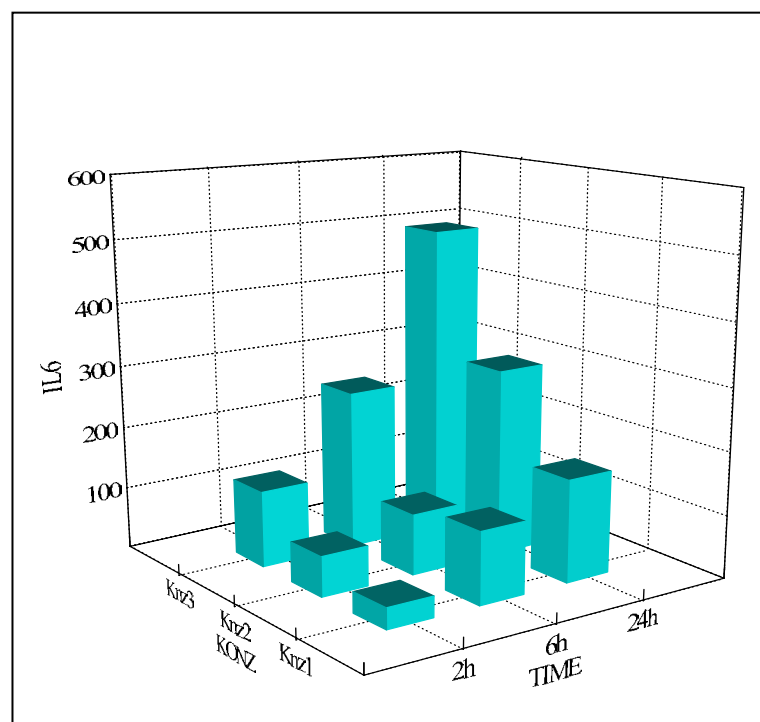


Abbildung 26: Biomarkerkonzentration (hier IL-6 [pg/ml]) im Zellkulturüberstand von BEAS-2B Zellen 2 h, 6 h und 24 h nach LPS- Stimulation (Knz1 = 20 µg/ml, Knz2 = 40 µg/ml und Knz3 = 80 µg/ml). Bivariater Zusammenhang zwischen Stimuluskonzentration und Zeitintervall nach Stimulus.

eingesetzten Konzentration erst nach 6–24 h ein Anstieg der Zytokinkonzentration feststellbar war, konnte nach Stimulation mit der höchsten Konzentrationsstufe schon nach 2 h ein deutlicher Konzentrationsanstieg des Biomarkers gemessen werden. Übertragen auf die durchgeführten Expositionsversuche bedeutet dies, dass aufgrund der sehr niedrigen Expositionskonzentrationen ein Anstieg der gemessenen Biomarker erst nach 24 h zu erwarten war. Diese

Kinetik passt auch gut zu dem von Hajat und Mitarbeitern berichteten Zeitintervall zwischen dem Anstieg der Umweltstaubkonzentration und der Anzahl von Arztbesuchen in London. Zwischen diesen Ereignissen lag ein Zeitraum von 24 – 72 Stunden (Hajat et al. 2002).

Substanz P wird schon wenige Minuten nach dem Stimulus im Nasensekret nachweisbar (Baraniuk et al. 1999). Es wird durch sekretständige Peptidasen rasch abgebaut (Josefsson et al. 1998). Somit ist für SP ein möglichst früher Nachweis wünschenswert. Deswegen wurde mit 30 min nach der Exposition ein erster sehr früher Zeitpunkt für die Sekretgewinnung gewählt. Insgesamt erschien für die Wahl der Sekretgewinnungszeitpunkte 30 min, 8 h und 24 h geeignet, wobei man zukünftig im Hinblick auf zytologische Veränderungen noch 48 h nach Exposition Proben gewinnen sollte.

Die Gewinnung von Nasensekret stellt selbst einen proinflammatorischen Reiz dar, so dass die Auswirkungen wiederholter nasaler Sekretgewinnung als Einflussgröße erfasst werden müssen. Probleme bei wiederholter Probengewinnung durch entnahmebedingte Neutrophilie sind zum Beispiel beim induzierten Sputum bekannt (Nelson et al. 1999; Nordenhall et al. 2000). Die Biomarkerkonzentrationen wurden auf den jeweiligen Wert zum gleichen Zeitpunkt nach Kontrollexposition normiert. Dadurch konnte der direkte Effekt zwar kompensiert werden, nicht aber mögliche Interaktionen zwischen Schadstoffwirkung und Probengewinnung, z.B. im Sinne einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung. Ausführliche Voruntersuchungen zur wiederholten Probengewinnung mit unterschiedlichen Sekretgewinnungstechniken zeigten aber, dass der Effekt insgesamt gering ist (Riechelmann et al. 2003a). Von einer relevanten Verzerrung durch die wiederholte Probengewinnung wird, auch aufgrund der Auswertungsmethode, nicht ausgegangen.

Experimentelles Design und Auswertungsmodell

Das experimentelle Design mit wiederholten Messungen an identischen Individuen ist allgemein varianzreduzierend, erfordert aber die Kontrolle von Sequenzeffekten. Hierzu wurden die Probanden randomisiert unterschiedlichen Expositionsreihenfolgen zugeordnet und die hierdurch bedingten Ergebnisunterschiede geprüft. Es zeigten sich keine relevanten sequenzabhängigen Ergebnisunterschiede. Die Ergebnisse der vorangegangenen Exposition eines Probanden beeinflussten somit die Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen nicht. Die

erheblichen individuellen Unterschiede der nasalen Zytokinproduktion wurden durch die Normierung auf den individuellen Kontrollwert kompensiert. Die Auswertung erfolgte im Sinne einer explorativen Analyse immer zweiseitig für jeden untersuchten Parameter getrennt. Eine Korrektur für wiederholtes Testen wurde wegen des nicht-konfirmatorischen Charakters der Studie nicht durchgeführt, ebenso keine β -Fehler-Betrachtung. Bei der Datenbewertung muss berücksichtigt werden, dass es grundsätzlich darum geht, Bürger vor möglichen Schäden durch eine akute Spitzenbelastung mit partikelförmigen Luftschadstoffen zu schützen. Eine sehr konservative Auswertungsstrategie könnte dazu führen, tatsächliche Effekte zu verdecken, was dem Sinn der Untersuchung zuwider liefe. Für die Datenanalyse wurde auch ein varianzanalytisches Modell in Betracht gezogen. Dies hätte aufgrund der bei manchen Parametern auch durch Transformation nicht zu behebenden irregulären Verteilung, der Multikollinearität mehrerer Variablen, gelegentlich fehlenden Daten und der zahlreichen Einflussfaktoren, teilweise als Messwiederholungsfaktoren, zu einem außerordentlich komplexen Auswertungsmodell geführt. Durch das hier angewendete schlichte Auswertungsmodell sind die Ergebnisse anschaulicher und besser nachvollziehbar. Insgesamt werden die nasalen Staub-Expositionen, die Messung der biologischen Effekte und die Auswertung der Ergebnisse als wirklichkeitsnah und valide erachtet.

Bewertung der Ergebnisse

Nach Urbanstaubexposition in einer Konzentration von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zeigte sich für die etablierten nasalen Entzündungsmarker IL-1 β , IL-6 und IL-8 konsistent eine Zunahme der Sekretkonzentration 24 h nach Exposition. Diese Zunahme wird als durch den Urbanstaub induzierte nasale Entzündungsreaktion gewertet. Die zeitliche Kinetik ist konsistent mit den Ergebnissen experimenteller und epidemiologischer Untersuchungen. Dieser Wertung steht nicht entgegen, dass MCP-1, ENA-78 und SP nicht angestiegen sind. Über die Bedeutung dieser letztgenannten Biomarker zum Nachweis nasaler Entzündungsreaktionen liegen bisher kaum Erfahrungen vor und sie korrelierten im Gegensatz zu IL-1 β , IL-6 und IL-8 nicht mit dem Färbindex nasaler Entzündungszellen.

Die Zunahme von IL-1 β , IL-6 und IL-8 ging nicht mit einer Zunahme nasaler Entzündungszellen einher. Hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache ausschlaggebend, dass die letzte Sekretgewinnung 24 h nach Expositionsende erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt wurde erstmals ein relevanter Zytokinanstieg gemessen. Der Anstieg der Zytokinkonzentration geht der Zellmigrati-

on ins Gewebe aber voraus. Da in dieser Untersuchung der Zytokinanstieg erst am Ende des Beobachtungszeitraumes auftritt, wird angenommen, dass Veränderungen der Zellpopulationen erst zu einem noch späteren Zeitpunkt zu erfassen gewesen wären.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass man aus umweltmedizinischer Sicht auch kurzfristige Spitzenbelastungen partikelförmiger Luftverunreinigungen durchaus ernst nehmen muss. Aus mehreren epidemiologischen Untersuchungen geht hervor, dass eine kurzfristige Erhöhung luftgetragener Staubpartikel unter anderem die Inzidenz von Erkrankungen der oberen Atemwege erhöht (Calderon-Garciduenas et al. 1994; Gordian et al. 1996; Hajat et al. 2002; Hefflin et al. 1994; Jaakkola et al. 1991; Ostro et al. 1999). Diese epidemiologischen Befunde werden durch in vitro Untersuchungen und tierexperimentelle Untersuchungen gestützt (Clarke et al. 1999; Clarke et al. 2000; Cullen et al. 2000; Devalia et al. 1997; Fujimaki et al. 1995; Ghio et al. 1999; Gulisano et al. 1997; Hiruma et al. 1999; Long et al. 2001a; Timblin et al. 1998; Warheit et al. 1997; Yuen et al. 1996). Hierbei bleiben aber erhebliche Interpretationsprobleme durch die unklare Dosis- und Speziesextrapolation bestehen (Kalberlah et al. 1999; Lippmann und Schlesinger R.B. 1984; Plopper et al. 1988; Thornton Manning und Dahl 1997). Durch die beiden Forschungsprojekte liegen erstmals Daten aus Humanexpositionsuntersuchungen bei realitätsnahen Expositionsbedingungen vor, die die genannten epidemiologischen Beobachtungen substantiell stützen.

Es wird angenommen, dass bei gesunden jungen Erwachsenen eine einmalige Exposition gegenüber Urbanstaub in den verwendeten Konzentrationen keine nachteiligen Folgen für die Schleimhaut der oberen Atemwege hat. Bei wiederholter Exposition könnte sich jedoch auch bei dieser Personengruppe das Bild einer minimal persistierenden Entzündung entwickeln, die als Teilursache chronischer Atemwegserkrankungen diskutiert wird {Ciprandi, 1995 13661 /id} {Ricca, 2000 8502 /id}.

Risikogruppen

Für diese Untersuchung wurden gesunde, junge Erwachsene mit normaler Nasenatmung ohne Atemwegsallergie rekrutiert. Dieses Kollektiv ist nicht repräsentativ für die Bevölkerung. Man darf annehmen, dass diese Probanden robuster auf die nasalen Staubexpositionen reagieren als Personen, deren lokale und systemische Abwehrfunktionen aufgrund ihres Alters oder

vorbestehender Erkrankungen beeinträchtigt sind. Solchen besonders gefährdeten Personengruppen wurden vom Rat der Sachverständigen für Umweltfragen u.a. Allergiker, Kinder und ältere Menschen zugeordnet. Die Empfindlichkeit solcher typischen Risikogruppen muss bei der Normsetzung miteinbezogen werden (Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen 1999).

Es gibt zahlreiche Befunde, die eine erhöhte Empfindlichkeit von Allergikern gegen partikelförmige Luftschadstoffe nahe legen. Schon isolierte nasale Epithelien von Allergikern setzen signifikant mehr Zytokine frei als die von nicht Allergikern (Calderon et al. 1997). Nach Exposition gegenüber Dieselrußpartikeln war die allergische Reaktion gegenüber Ragweed verstärkt (Diaz-Sanchez et al. 1997). Die erhöhte Empfindlichkeit von Allergikern ist auch aus Untersuchungen mit anderen Luftschadstoffen gut belegt (Bascom et al. 1990; Devalia et al. 1997; Jorres et al. 1996; Rusznak et al. 1996; Scannell et al. 1996). Kinder sind eine weitere Risikogruppe für die Entwicklung von Atemwegserkrankungen durch partikelförmige Umweltschadstoffe (Mathieu-Nolf 2002; Raizenne et al. 1998). Die besondere Vulnerabilität betrifft dabei vor allem chronische Expositionssituationen im Niedrigdosisbereich, während akute Wirkungen auf die oberen Atemwege bei Kindern nicht wesentlich schwerer wirken als bei Erwachsenen (Hajat et al. 2002). Eine besondere Risikogruppe sind ältere Mitbürger, insbesondere bei vorbestehenden Atemwegserkrankungen. Sie zeigten in einer Untersuchung die ausgeprägtesten respiratorischen Effekte nach erhöhter Partikelbelastung der Außenluft (Hajat et al. 2002) und in einer niederländischen Untersuchung zeigten sich bei einem Seniorenkollektiv nach erhöhter Luftpartikelbelastung teils gravierende Veränderungen unterschiedlicher Atemwegparameter und eine signifikante Zunahme von Symptomen seitens der oberen Atemwege (van der Zee et al. 2000).

Bedeutung von Staubinhaltsstoffen

In der Arbeitsmedizin ist eine Bewertung von Stäuben auch nach der Toxizität bestimmter Inhaltsstoffe seit vielen Jahren selbstverständlich (Deutsche Forschungsgemeinschaft 1996). Die gültigen oder beschlossenen Grenzwerte für partikelförmige Außenluftverunreinigungen in Deutschland, der EU und den USA berücksichtigen die Massekonzentration des Staubes und die Partikelgröße. Die sehr unterschiedliche Toxizität der diversen Inhaltsstoffe von Umweltstäuben wird bei diesen Grenzwerten bisher nicht berücksichtigt (Mage 2002). In vitro zeigten Umweltstäube mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen stark differierende proinflammato-

rische Effekte (van Eeden et al. 2001). Auf die besondere proinflammatorische Wirkung von Metallen in Umweltstäuben weisen in vitro Untersuchungen an bronchialen Epithelzellen hin (Carter et al. 1997; Hetland et al. 2000). Auch die Art der Entzündungsreaktion wird durch die Inhaltsstoffe von partikelförmigen Luftverunreinigungen beeinflusst. Bestandteile des Dieselrußes induzieren eine Entzündungsreaktion mit typischen T_{H2} -Zytokinprofil (Devouassoux et al. 2002; Diaz-Sanchez et al. 2000b), während Urbanstäube eher eine T_{H1} -betonte Immunantwort induzieren. In tierexperimentellen Untersuchungen mit unterschiedlicher partikelangereicherter Luft konnten Saldiva und Mitarbeiter verschiedene Metalle und Kohlenstoffverbindungen als vorrangige Bestandteile identifizieren, die eine pulmonale Entzündungsreaktion induzieren (Saldiva et al. 2002). Auch jüngere umweltmedizinische Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der toxikologischen Zusammensetzung partikelförmiger Luftverunreinigungen. Stäube aus Innenräumen und aus der Außenluft wirken unterschiedlich (Long et al. 2001b; Monn und Becker 1999) und Außenluftstäube aus unterschiedlichen Regionen haben eine unterschiedliche Zusammensetzung (Harrison und Yin 2000) und können auch deutlich differierende biologische Wirkungen aufweisen (Alfaro-Moreno et al. 2002). Osunsanya und Mitarbeiter berichten, dass die Bewertung von Umweltstäuben ausschließlich nach der Partikelgröße womöglich dazu führt, wesentliche toxische Staubinhaltsstoffe, die nicht in das richtige Größenraaster fallen, fälschlicherweise unberücksichtigt zu lassen (Osunsanya et al. 2001).

Die in dieser Untersuchung eingesetzten Stäube unterstreichen die Bedeutung des toxikologischen Profils eingeatmeter Stäube. Während der niedrig-toxische Staub in einer Konzentration bis $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nicht zu relevanten immunologischen Effekten führte, induzierte der Urbanstaub bei $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ eine subklinische Entzündungsreaktion.

Forschungsbedarf

Trotz der erfreulichen Verbesserung der Luftqualität in den letzten drei Jahrzehnten zeigen aktuelle epidemiologische Untersuchungen, dass die Gesundheit der Bevölkerung nach wie vor durch Luftschadstoffe beeinträchtigt ist. Hinsichtlich Erkrankungen der Atemwege sind in erster Linie Risikogruppen betroffen. Demnach ist es sinnvoll, die umweltmedizinische Forschung in diesem Bereich auf Risikogruppen zu fokussieren. Die Mechanismen der besonderen Suszeptibilität von Angehörigen von Risikopopulationen sind noch weitgehend unklar.

Diese Mechanismen können *in vitro* an Zellen und Geweben von Personen mit besonderem Risiko untersucht werden, wobei moderne molekularbiologische Screeningverfahren wie DNA-Mikroarray-Technologie oder Proteomik in den nächsten Jahren eine Vielzahl viel versprechender Hypothesen generieren werden. Tierexperimentell lassen sich Untersuchungen an natürlichen oder transgenen Stämmen mit unterschiedlicher Suszeptibilität gegenüber Umweltschadstoffen durchführen. Dies wird dazu beitragen können, genetische Faktoren einer erhöhten Schadstoffsuszeptibilität zu ermitteln. Die außerordentliche Komplexität der menschlichen Reaktion auf Umweltschadstoffe, insbesondere bei definierten Risikopopulationen, lässt sich jedoch aus Sicht der Autoren nur durch Humanexpositionsuntersuchungen adäquat beschreiben.

Wesentlicher Forschungsbedarf besteht auch hinsichtlich der Charakterisierung toxikologisch relevanter Substanzen in komplexen Umweltschadstoffen wie z.B. in partikelförmigen Luftverunreinigungen. Hier sind in erster Linie *in vitro* Untersuchungen an humanen Atemwegs- und Lungenzellen sinnvoll. Sie erlauben es, die Effekte einer Vielzahl toxikologisch relevanter Staubinhaltsstoffe auf zellulärer Ebene zu charakterisieren. So sollte es gelingen, Indikatormoleküle zu identifizieren, die eine verbesserte toxikologische Bewertung von Umweltschadstoffen erlauben. Für die weiterführende Bewertung sind dann Humanexpositionsuntersuchungen mit Stäuben sinnvoll, deren toxikologisches Profil basierend auf den Ergebnissen von *in vitro* Untersuchungen definiert wurde.

Wahrscheinlich macht es weder umweltmedizinisch noch ökonomisch Sinn, die Grenzwerte von Umweltschadstoffen in Massekonzentrationen immer weiter nach unten zu korrigieren. Das zeigen auch die Ergebnisse dieser Untersuchung. Vielmehr erscheint die gezielte Reduktion toxikologisch bedenklicher Staubinhaltsstoffe in der Außenluft und in Innenräumen als erstrebenswertes Ziel.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

°C	=	Grad Celsius
µg	=	Mikrogramm
µl	=	Mikroliter
µm	=	Mikrometer
ACGIH	=	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
BAL	=	Bronchoalveoläre Lavage
BEAS-2B	=	Bronchiales Epithel Adenovirus SV40 immortalisiert
bzw.	=	beziehungsweise
ca.	=	circa
CD	=	Cluster of Differentiation
cm	=	Zentimeter
d	=	Durchmesser
d.h.	=	das heißt
Diff.	=	Differenz
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENA	=	epitheliales-Neutrophilen-aktivierendes-Peptid
GM-CSF	=	Granulocyte-macrophage colony stimulatın factor
h	=	Stunden
IL	=	Interleukin
l	=	Liter
m	=	Meter
MCP	=	Monozyten-chemotaktisches Protein
min	=	Minute
MIP	=	Makrophagen-inflammatorisches Protein
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
MMAD	=	Massemedian des aerodynamischen Durchmessers

MPO	=	Myeloperoxidase
ng	=	Nanogramm
pg	=	Picogramm
PNOC	=	Particles not otherwise classified
RANTES	=	Regulated on an activation normal T-cell expressed and secreted
SAPALDIA	=	Swiss study on air pollution and lung diseases in adults
SCARPOL	=	Swiss Surveillance Program of Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with respect to airpollution and climate
sICAM1	=	Soluble intercellular adhesion molecule 1
SP (SBP)	=	Substanz P
SRM	=	Standard Reference Material
TNF	=	Tumor-Nekrose-Faktor
TRP	=	Tryptase
U	=	Unit
V	=	Volumen
VAS	=	visuelle Analogskalen
WHO	=	World Health Organization

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Frau Jäger-Bertele, Frau Jerg und Herrn Leiacker für deren exzellente technische Unterstützung. Herr Thess, Frau Schopohl, Frau Schmittinger und Frau Lautebach haben im Rahmen ihrer Doktorarbeiten die beiden Projekte substantiell gestützt und weiterentwickelt sowie die Probanden vorbildlich betreut. Den vielen Probanden, die sich geduldig den wiederholten Staubexpositionen unterzogen haben, gilt unser besonderer Dank. Dem Projektträger des Programms BWPLUS am Forschungszentrum in Karlsruhe, hier insbesondere Herrn Dr. Krug und Frau Hübner, danken wir für ihre konstruktive Begleitung der Projekte sowie ihre Anregungen und Verbesserungsvorschläge, die wir immer gerne aufgenommen und den Möglichkeiten entsprechend umgesetzt haben. Als sehr hilfreich haben sich die Diskussionsbeiträge von Experten unterschiedlicher Fachgebiete bei den Statuskolloquien in Karlsruhe erwiesen. Last not least danken die Autoren dem Land Baden-Württemberg, das durch die Förderung im Rahmen des Programmes BWPLUS zum Schutz von Umwelt und Bevölkerung beiträgt und die Forschungslandschaft in Baden-Württemberg stützt.

Literatur

1. Römpp Chemie Lexikon. 1995. Falbe J, Regitz M (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, IX-53124.
2. Abbey DE, Hwang BL, Burchette RJ, Vancuren T, Mills PK. 1995. Estimated long-term ambient concentrations of PM10 and development of respiratory symptoms in a nonsmoking population. *Arch Environ Health* 50(2):139-52.
3. ADaM Working Group. 2001. "CDISC Submission Metadata Model." Available from http://www.cdisc.org/pdf/CDISC_SDS_Model_1-1.PDF.
4. Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC et al. 2002. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ. Health Perspect.* 110(7):715-720.
5. Andersen I, Lundqvist GR, Proctor DF, Swift DL. 1979. Human response to controlled levels of inert dust. *Am Rev Respir Dis* 119(4):619-27.
6. Anderson KR, Avol EL, Edwards SA, Shamoo DA, Peng RC et al. 1992. Controlled exposures of volunteers to respirable carbon and sulfuric acid aerosols. *J Air Waste Manage Assoc* 42(6):770-6.
7. Armitage RJ. 1994. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 6(3):407-13.
8. Bachert C, Hormann K, Mosges R, Rasp G, Riechelmann H et al. 2003. An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis. *Allergy* 58(3):176-191.
9. Bachert C, van Kempen M, van Cauwenberge P. 1999. Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 118(2-4):375-9.
10. Baraniuk JN, Ali M, Yuta A, Fang SY, Naranch K. 1999. Hypertonic saline nasal provocation stimulates nociceptive nerves, substance P release, and glandular

- mucous exocytosis in normal humans. *Am J Respir Crit Care Med* 160(2):655-62.
11. Bascom R, Naclerio RM, Fitzgerald TK, Kagey-Sobotka A, Proud D. 1990. Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am Rev Resp Dis* 142:594-601.
 12. Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC et al. 2002. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect* 110(12):1191-7.
 13. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ et al. 1998. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 102(5):771-82.
 14. Becker S, Clapp WA, Quay J, Frees KL, Koren HS et al. 1999. Compartmentalization of the inflammatory response to inhaled grain dust. *Am J Respir Crit Care Med* 160(4):1309-18.
 15. Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS. 1994. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1):278-86.
 16. Bensch GW, Nelson HS, Borish LC. 2002. Evaluation of cytokines in nasal secretions after nasal antigen challenge: lack of influence of antihistamines. *Ann Allergy Asthma Immunol* 88(5):457-62.
 17. Benson V, Marano MA. 1998. Current estimates from the National Health Interview Survey, 1995. *Vital Health Stat* 10(199):1-428.
 18. Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC et al. 1999. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1):604-13.
 19. Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S et al. 2001. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in

- human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(4):515-21.
20. Bradding P, Feather IH, Wilson S, Bardin PG, Heusser CH et al. 1993. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. *J Immunol* 151(7):3853-65.
 21. Bradford-Hill A. 1966. The environment and disease: Association or causation? *Proc.Royal Soc.Med.* 58:295-300.
 22. Brain J. Species differences in inhalation toxicology: variations in exposure-dose relationships and macrophage function. 1988. In: Mohr U, Dungworth D, Kimmerle G et al. (Hrsg.) *Inhalation toxicology*, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 11-23.
 23. Braun-Fahrlander C, Vuille JC, Sennhauser FH, Neu U, Kunzle T et al. 1997. Respiratory health and long-term exposure to air pollutants in Swiss schoolchildren. SCARPOL Team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen. *Am J Respir Crit Care Med* 155(3):1042-9.
 24. Calderon Garciduenas L, Rodriguez Alcaraz A, Villarreal Calderon A, Lyght O, Janszen D et al. 1998. Nasal epithelium as a sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicol Sci* 46(2):352-64.
 25. Calderon MA, Devalia JL, Prior AJ, Sapsford RJ, Davies RJ. 1997. A comparison of cytokine release from epithelial cells cultured from nasal biopsy specimens of atopic patients with and without rhinitis and nonatopic subjects without rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 99(1 Pt 1):65-76.
 26. 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(1):11-20.

27. Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Garcia R, Ramirez L, Barragan G. 1995. Nasal inflammatory responses in children exposed to a polluted urban atmosphere. *J Toxicol Environ Health* 45(4):427-37.
28. Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Garcia R, Sanchez G, Barragan G et al. 1994. Human nasal mucosal changes after exposure to urban pollution. *Environ Health Perspect* 102(12):1074-80.
29. Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Villarreal-Calderon A, Lyght O, Janszen D et al. 1998. Nasal epithelium as a sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicol Sci* 46(2):352-64.
30. Camner P, Helstrom PA, Philipson K. 1973. Carbon dust and mucociliary transport. *Arch Environ Health* 26(6):294-6.
31. Capellier G, Zhang Z, Maheu MF, Pointet H, Racadot E et al. 1997. Nasal mucosa inflammation induced by oxygen administration in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 41(8):1011-6.
32. Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. 1997. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol* 146(2):180-8.
33. Clapp WD, Thorne PS, Frees KL, Zhang X, Lux C.R. et al. 1993. The effects of inhalation of grain dust extract and endotoxin on upper and lower airways. *Chest* 104(3):825-30.
34. Clarke RW, Catalano PJ, Koutrakis P, Murthy GG, Sioutas C et al. 1999. Urban air particulate inhalation alters pulmonary function and induces pulmonary inflammation in a rodent model of chronic bronchitis. *Inhal Toxicol* 11(8):637-56.
35. Clarke RW, Coull B, Reinisch U, Catalano P, Killingsworth CR et al. 2000. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environ Health Perspect* 108(12):1179-87.
36. Cordell J, Falini B, Flenghi L, Jones D, Pileri S et al. CD68 cluster workshop report. 1995. In: Schlossman SF (Hrsg.) *Leucocyte typing V - white cell differentiation*

antigens : proceedings of the fifth international workshop and conference held in Boston, USA, 3-7 November, 1993, Oxford University Press, Oxford, 925-927.

37. Craig TJ, Teets S, Lehman EB, Chinchilli VM, Zwillich C. 1998. Nasal congestion secondary to allergic rhinitis as a cause of sleep disturbance and daytime fatigue and the response to topical nasal corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 101(5):633-7.
38. Cullen RT, Tran CL, Buchanan D, Davis JM, Searl A et al. 2000. Inhalation of poorly soluble particles. I. Differences in inflammatory response and clearance during exposure. *Inhal Toxicol* 12(12):1089-particulates 111.
39. Cunningham R, Mahon B. 2001. The immunological role of respiratory tract epithelium. *Mod Asp Immunobiol* 1(5):204-209.
40. Dahlqvist M, Palmberg L, Malmberg P, Sundblad BM, Ulfvarson U et al. 1996. Acute effects of exposure to air contaminants in a sawmill on healthy volunteers. *Occup Environ Med* 53(9):586-90.
41. Danuser B, Rebsamen H, Weber C, Krueger H. 2000. Lipopolysaccharide-induced nasal cytokine response: a dose-response evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257(10):527-532.
42. Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen. Umwelt und Gesundheit - Risiken richtig einschätzen. 1999. Verlag Metzeler-Poeschel, Stuttgart, 251.
43. Deutsche Forschungsgemeinschaft SzPgA. MAK- und BAT-Werte-Liste 1996. 1996. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 5-XXII.
44. Devalia JL, Bayram H, Rusznak C, Calderon M, Sapsford RJ et al. 1997. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy* 52(38 Suppl):45-51.
45. Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE et al. 1991. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4(1):72-81.

46. Devouassoux G, Saxon A, Metcalfe DD, Prussin C, Colomb MG et al. 2002. Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 109(5):847-53.
47. Diabate S, Mulhopt S, Paur HR, Wottrich R, Krug HF. 2002. In vitro effects of incinerator fly ash on pulmonary macrophages and epithelial cells. *Int J Hyg Environ Health* 204(5-6):323-6.
48. Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. 1994. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 94(4):1417-25.
49. Diaz-Sanchez D, Jyrala M, Ng D, Nel A, Saxon A. 2000a. In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans. *Clin Immunol* 97(2):140-5.
50. Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. 2000b. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol* 106(6):1140-6.
51. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. 1997. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 158(5):2406-13.
52. Donaldson K. 2000. Nonneoplastic lung responses induced in experimental animals by exposure to poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* 12(1-2):121-39.
53. Donaldson K, Gilmour MI, MacNee W. 2000. Asthma and PM10. *Respir Res* 1(1):12-5.
54. Dorato MA, Wolff RK. 1991. Inhalation exposure technology, dosimetry, and regulatory issues. *Toxicol.Pathol.* 19(4 Pt 1):373-383.
55. Driscoll KE, Maurer J.K., Lindenschmidt R.C., Romberger D., Rennard S.I. et al. 1990. Respiratory tract responses to dust: Relationships between dust burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release, and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicology and applied Pharmacology* 106:88-101.

56. Durr DG, Desrosiers MY, Dassa C. 2001. Impact of rhinosinusitis in health care delivery: the Quebec experience. *J Otolaryngol* 30(2):93-7.
57. EPA. 2001. Latest Findings on National Air Quality 2000: Status and Trends. EPA 454/K-01-02.
58. Farr B, Hackett SF, Winther B, Hendley JO. 1984. A method for measuring polymorphonuclear leukocyte concentrations in nasal mucus. *Acta Otolaryngol Suppl* 413:15-8.
59. Frischer TM, Kuehr J, Pullwitt A, Meinert R, Forster J et al. 1993. Ambient ozone causes upper airways inflammation in children. *Am Rev Respir Dis* 148(4 Pt 1):961-4.
60. Fujimaki H, Saneyoshi K, Nohara O, Shiraishi F, Imai T. 1995. Intranasal instillation of diesel exhaust particulates and antigen in mice modulated cytokine productions in cervical lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol* 108(3):268-73.
61. Gentile D, Doyle W, Whiteside T, Fireman P, Hayden FG et al. 1998. Increased interleukin-6 levels in nasal lavage samples following experimental influenza A virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(5):604-8.
62. Gentile DA, Yokitis J, Angelini BL, Doyle WJ, Skoner DP. 2001. Effect of intranasal challenge with interleukin-6 on upper airway symptomatology and physiology in allergic and nonallergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 86(5):531-6.
63. Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. 2000. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 162(3 Pt 1):981-8.
64. Ghio AJ, Stonehuerner J, Dailey LA, Carter JD. 1999. Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress. *Inhal Toxicol* 11(1):37-49.
65. Gluck U, Gebbers JO. 2000. The comet assay of nasal epithelia: measurement of DNA damage for the assessment of genotoxic air pollution. *Laryngoscope* 110(1):123-5.

66. Gordian ME, Ozkaynak H, Xue J, Morris SS, Spengler JD. 1996. Particulate air pollution and respiratory disease in Anchorage, Alaska. *Environ. Health Perspect.* 104(3):290-297.
67. Gordon T, Nadziejko C, Schlesinger R, Chen LC. 1998. Pulmonary and cardiovascular effects of acute exposure to concentrated ambient particulate matter in rats. *Toxicol Lett* 96-97:285-8.
68. Grant S, Aitchison T, Henderson E, Christie J, Zare S et al. 1999. A comparison of the reproducibility and the sensitivity to change of visual analogue scales, Borg scales, and Likert scales in normal subjects during submaximal exercise. *Chest* 116(5):1208-17.
69. Greiff L, Akerlund A, Andersson M, Svensson C, Alkner U et al. 1996. Day-night differences in mucosal plasma proteins in common cold. *Acta Otolaryngol* 116(1):85-90.
70. Gulisano M, Marceddu S, Barbaro A, Pacini A, Buiatti E et al. 1997. Damage to the nasopharyngeal mucosa induced by current levels of urban air pollution: a field study in lambs. *Eur Respir J* 10(3):567-72.
71. Hahon N, Booth J.A., Green F., Lewis T.R. 1985. Influenza virus infection in mice after exposure to coal dust and diesel engine emissions. *Environ Res* 37:44-60.
72. Hajat S, Anderson HR, Atkinson RW, Haines A. 2002. Effects of air pollution on general practitioner consultations for upper respiratory diseases in London. *Occup Environ Med* 59(5):294-9.
73. Hamilton TD, Roe JM, Hayes CM, Jones P, Pearson GR et al. 1999. Contributory and exacerbating roles of gaseous ammonia and organic dust in the etiology of atrophic rhinitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(2):199-203.
74. Harada T, Hamaguchi Y, Sakakura Y, Miyoshi Y. 1984. Circadian variation of secretory IgA in nasal secretions from normal subjects. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 97(3-4):359-62.

75. Harrison RM, Yin J. 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci.Total Environ.* 249(1-3):85-101.
76. Hauser R, Elreedy S, Hoppin JA, Christiani DC. 1995. Upper airway response in workers exposed to fuel oil ash: nasal lavage analysis. *Occup Environ Med* 52(5):353-8.
77. Hauser R, Garcia-Closas M, Kelsey KT, Christiani DC. 1994. Variability of nasal lavage polymorphonuclear leukocyte counts in unexposed subjects: its potential utility for epidemiology. *Arch Environ.Health* 49(4):267-272.
78. Hefflin BJ, Jalaludin B, McClure E, Cobb N, Johnson CA et al. 1994. Surveillance for dust storms and respiratory diseases in Washington State, 1991. *Arch Environ Health* 49(3):170-4.
79. Henderson RF, Driscoll KE, Harkema JR, Lindenschmidt RC, Chang IY et al. 1995. A comparison of the inflammatory response of the lung to inhaled versus instilled particles in F344 rats. *Fundam.Appl Toxicol.* 24(2):183-197.
80. Heppt W. *Zytologie der Nasenschleimhaut.* 1995. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1-87.
81. Hetland RB, Refsnes M, Myran T, Johansen BV, Uthus N et al. 2000. Mineral and/or metal content as critical determinants of particle-induced release of IL-6 and IL-8 from A549 cells. *J Toxicol.Environ.Health A* 60(1):47-65.
82. Hiruma K, Terada N, Hanazawa T, Nomoto M, Maesako K et al. 1999. Effect of diesel exhaust on guinea pig nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108(6):582-8.
83. Holländer W. Exposure facilities and aerosol generation and characterization for inhalation experiments. 1988. In: Mohr U, Dungworth D, Kimmerle G et al. (Hrsg.) *Inhalation toxicology*, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 67-86.
84. Holopainen E. 1976. Nasal cytology as a nasal test. *Rhinology* 14(1):29-35.

85. Hunter DD, Castranova V, Stanley C, Dey RD. 1998. Effects of silica exposure on substance P immunoreactivity and preprotachykinin mRNA expression in trigeminal sensory neurons in Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A* 53(8):593-605.
86. Jaakkola JJ, Paunio M, Virtanen M, Heinonen OP. 1991. Low-level air pollution and upper respiratory infections in children. *Am.J.Public Health* 81(8):1060-1063.
87. Jagielo PJ, Thorne PS, Watt JL, Frees KL, Quinn TJ et al. 1996. Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. *Chest* 110(1):263-70.
88. Janowski R, Coffinet L, Audouy H, Foliguet B. 1995. Leukocyte compartments in the nasal secretion medium. *Rhinology* 33(4):203-7.
89. Jimenez LA, Drost EM, Gilmour PS, Rahman I, Antonicelli F et al. 2002. PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(2):237-48.
90. Jirapongsananuruk O, Vichyanond P. 1998. Nasal cytology in the diagnosis of allergic rhinitis in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 80(2):165-70.
91. Jorres R, Nowak D, Magnussen H. 1996. The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am.J Respir Crit Care Med.* 153(1):56-64.
92. Josefsson M, Becker M, Stroman F, Brenner DG, Petersson G. 1998. Effect of recombinant neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) on neuropeptide-mediated nasal fluid secretion and plasma exudation in the rat. *Am.J Rhinol.* 12(2):135-141.
93. Juliusson S, Bachert C., Klementsson H., Karlsson G., Pipkorn U. 1991. Macrophages on the nasal mucosal surface in provoked and naturally occurring allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol* 111:946-53.
94. Kalberlah F, Schneider K, Schuhmacher US, Voss JU, Ioannidis I et al. 1999. Zeitextrapolation und Interspeziesextrapolation bei lokal wirksamen Stoffen mit begrenzter Datenlage. *Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeits-*

medizin, Wirtschaftsverlag NW, Verlag für neue Wissenschaft GmbH, Bremerhaven.

95. Keck T, Leiacker R, Klotz M, Lindemann J, Riechelmann H et al. 2000. Detection of particles within the nasal airways during respiration. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257(9):493-7.
96. Keles N, Ilicali C. 1998. The impact of outdoor pollution on upper respiratory diseases. *Rhinology* 36(1):24-7.
97. Keles N, Ilicali OC, Deger K. 1999. Impact of air pollution on prevalence of rhinitis in Istanbul. *Arch Environ Health* 54(1):48-51.
98. Keman S, Jetten M, Douwes J, Borm PJ. 1998. Longitudinal changes in inflammatory markers in nasal lavage of cotton workers. Relation to endotoxin exposure and lung function changes. *Int Arch Occup Environ Health* 71(2):131-7.
99. 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 Immunol* 93(6):1060-7.
100. Kobayashi T, Ito T. 1995. Diesel exhaust particulates induce nasal mucosal hyperresponsiveness to inhaled histamine aerosol. *Fundam Appl Toxicol* 27(2):195-202.
101. Kopp MV, Ulmer C, Ihorst G, Seydewitz HH, Frischer T et al. 1999. Upper airway inflammation in children exposed to ambient ozone and potential signs of adaptation. *Eur Respir J* 14(4):854-61.
102. Koren HS, Devlin RB. 1992. Human upper respiratory tract responses to inhaled pollutants with emphasis on nasal lavage. *Ann NY Acad Scienc* 641:215-24.
103. Kramer MF, Ostertag P, Pfrogner E, Rasp G. 2001. Nasal IL-16 and MIP-1 alpha in late-phase allergic response. *Allergy Asthma Proc* 22(3):127-32.
104. Künstler K. 1983. Failure to induce tumors by intratracheal instillation of automobile exhaust condensate and fractions thereof in Syrian golden hamsters. *Cancer Letters* 18:105-8.

105. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. 1998. Schwebstaubbelastung in Baden-Württemberg. UMEG Gesellschaft für Umweltmessungen und Umwelterhebungen mbH, Karlsruhe:1-117.
106. Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Martensson L, Palmberg L. 1999. Airway responses in naive subjects to exposure in poultry houses: comparison between cage rearing system and alternative rearing system for laying hens. *Am J Ind Med* 35(2):142-9.
107. Lee HS, Majima Y, Sakakura Y, Shinogi J, Kawaguchi S et al. 1993. Quantitative cytology of nasal secretions under various conditions. *Laryngoscope* 103(5):533-7.
108. Lee HS, Majima Y, Sakakura Y, W. KB. 1991. A technique for quantitative cytology of nasal secretions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 248:406-8.
109. Lemos M, Lichtenfels AJ, Amaro Junior E, Macchione M, Martins MA et al. 1994. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res* 66(1):87-95.
110. Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, Liard R, Neukirch F. 1999. Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 104(2 Pt 1):301-4.
111. Leynaert B, Neukirch C, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. 2000. Quality of life in allergic rhinitis and asthma. A population-based study of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 1):1391-6.
112. Lim MC, Taylor RM, Naclerio RM. 1995. The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 151(1):136-44.
113. Lippmann M, Schlesinger R.B. 1984. Interspecies comparisons of particle deposition and mucociliary clearance in tracheobronchial airways. *J Toxicol Environ Health* 13:441-69.

114. Long CM, Suh HH, Kobzik L, Catalano PJ, Ning YY et al. 2001a. A pilot investigation of the relative toxicity of indoor and outdoor fine particles: in vitro effects of endotoxin and other particulate properties. *Environ Health Perspect* 109(10):1019-26.
115. Long CM, Suh HH, Kobzik L, Catalano PJ, Ning YY et al. 2001b. A pilot investigation of the relative toxicity of indoor and outdoor fine particles: in vitro effects of endotoxin and other particulate properties. *Environ. Health Perspect.* 109(10):1019-1026.
116. Lonkvist K, Hallden G, Dahlen SE, Enander I, van Hage-Hamsten M et al. 1999. Markers of inflammation and bronchial reactivity in children with asthma, exposed to animal dander in school dust. *Pediatr Allergy Immunol* 10(1):45-52.
117. Lozewicz S, Gomez E., Clague J., Gatland D., Davies R.J. 1990. Allergen-induced changes in the nasal mucous membrane in seasonal allergic rhinitis: effect of nedocromil sodium. *J Allergy Clin Immunol* 85(1 Pt 1):125-31.
118. Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL, Chensue SW, Burdick MD et al. 1998. Mast cells produce ENA-78, which can function as a potent neutrophil chemoattractant during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 63(6):746-51.
119. Mage DT. 2002. A particle is not a particle is not a PARTICLE. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 12(2):93-95.
120. Mann WJ, Muttray A, Schaefer D, Klimek L, Faas M et al. 2002. Exposure to 200 ppm of methanol increases the concentrations of interleukin-1beta and interleukin-8 in nasal secretions of healthy volunteers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111(7 Pt 1):633-8.
121. Mathieu-Nolf M. 2002. Poisons in the air: a cause of chronic disease in children. *J Toxicol. Clin Toxicol.* 40(4):483-491.
122. May WE, Benner BA, Jr., Wise SA, Schuetzle D, Lewtas J. 1992. Standard reference materials for chemical and biological studies of complex environmental samples. *Mutat. Res.* 276(1-2):11-22.

123. McConnell EE. 1995. Advantages and limits of in vivo screening tests. *Ann Occup Hyg* 39(5):727-35.
124. Meltzer EO. 1988. Evaluating rhinitis: clinical, rhinomanometric, and cytologic assessments. *J All Clin Immun* 82:900-908.
125. Meltzer EO, Orgel HA, Bronsky EA, Furukawa CT, Grossman J et al. 1990. A dose-ranging study of fluticasone propionate aqueous nasal spray for seasonal allergic rhinitis assessed by symptoms, rhinomanometry, and nasal cytology. *J Allergy Clin Immunol* 86(2):221-30.
126. Mills PR, Davies RJ, Devalia JL. 1999. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants. *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 2):38-43.
127. Monn C, Becker S. 1999. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol.Appl Pharmacol* 155(3):245-252.
128. Mukaida N, Matsushima K. 1992. Regulation of IL-8 production and the characteristics of the receptors for IL-8. *Cytokines* 4:41-53.
129. Mygind N. *Nasal Allergy*. 1979. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, VII-363.
130. Mygind N, Thomsen J. 1973. Cytology of the nasal mucosa. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 204:123-129.
131. Mygind N, Thomsen J. 1976. Diurnal variation of nasal protein concentration. *Acta Otolaryngol* 82(3-4):219-21.
132. Nauseef WM. 2001. Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system. *Int J Hematol.* 74(2):125-133.
133. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. 1998. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 102(4 Pt 1):539-54.

134. Nelson ME, Wald TC, Bailey K, Wesselius LJ. 1999. Intrapulmonary cytokine accumulation following BAL and the role of endotoxin contamination. *Chest* 115(1):151-7.
135. Noah TL, Henderson FW, Henry MM, Peden DB, Devlin RB. 1995a. Nasal lavage cytokines in normal, allergic, and asthmatic school-age children. *Am J Respir Crit Care Med* 152(4 Pt 1):1290-6.
136. Noah TL, Henderson FW, Henry MM, Peden DB, Devlin RB. 1995b. Nasal lavage cytokines in normal, allergic, and asthmatic school-age children. *Am J Respir Crit Care Med* 152(4 Pt 1):1290-6.
137. Noah TL, Henderson FW, Wortman IA, Devlin RB, Handy J et al. 1995c. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J Infect Dis* 171(3):584-92.
138. Nordenhall C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandstrom T et al. 2000. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* 15(6):1046-51.
139. Nowak D. Klinisch-experimentelle und epidemiologische Untersuchungen zur Wirkung irritativer Berufs- und Umweltnoxen auf den Atemtrakt. 1997. S. Roderer Verlag, Regensburg, 1-207.
140. Oberdorster G. 1995. The NTP talc inhalation study: a critical appraisal focused on lung particle overload. *Regul Toxicol Pharmacol* 21(2):233-41.
141. Oghiso Y, Yamada Y, Kubota Y, Matsuoka O. 1986. Pulmonary deposition and effects of inhaled silica particles after short-term exposures in the rat. *J Toxicol Sci* 11(1):1-13.
142. Ohkubo K, Ikeda M, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T et al. 1998. Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology* 36(4):156-61.
143. Olsson I, Olofsson T, Odeberg H. 1972. Myeloperoxidase-mediated iodination in granulocytes. *Scand.J Haematol.* 9(5):483-491.

144. Osier M, Oberdorster G. 1997. Intratracheal inhalation vs intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fundam Appl Toxicol* 40(2):220-7.
145. Ostro BD, Eskeland GS, Sanchez JM, Feyzioglu T. 1999. Air pollution and health effects: A study of medical visits among children in Santiago, Chile. *Environ. Health Perspect.* 107(1):69-73.
146. Osunsanya T, Prescott G, Seaton A. 2001. Acute respiratory effects of particles: mass or number? *Occup. Environ. Med.* 58(3):154-159.
147. Park HS, Suh JH, Kim HY, Kwon OJ, Choi DC. 1999. Grain dust induces IL-8 production from bronchial epithelial cells: the effect of dexamethasone on IL-8 production. *Ann Allergy Asthma Immunol* 82(4):371-4.
148. Paul-Dauphin A, Guillemin F, Virion JM, Briancon S. 1999. Bias and precision in visual analogue scales: a randomized controlled trial. *Am J Epidemiol* 150(10):1117-27.
149. Pazdrak K, Gorski P, Krakowiak A, Ruta U. 1993. Changes in nasal lavage fluid due to formaldehyde inhalation. *Int Arch Occup Environ Health* 64(7):515-9.
150. Peden DB, Tucker K, Murphy P, Newlin-Clapp L, Boehlecke B et al. 1999. Eosinophil influx to the nasal airway after local, low-level LPS challenge in humans. *J Allergy Clin Immunol* 104(2 Pt 1):388-94.
151. Pelikan Z. 1983. The changes in the nasal secretions of eosinophils during the immediate nasal response to allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 72(6):657-62.
152. Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. 1988. Cytologic changes in the nasal secretions during the immediate nasal response. *J Allergy Clin Immunol* 82:1103-12.
153. Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. 1989. Cytologic changes in the nasal secretions during the late nasal response. *J Allergy Clin Immunol* 83:1068-79.
154. Peltola J, Andersson MA, Haahtela T, Mussalo-Rauhamaa H, Rainey FA et al. 2001. Toxic-Metabolite-Producing Bacteria and Fungus in an Indoor Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):3269.

155. Pipkorn U, Karlsson G., Enerback L. 1988a. The cellular response of the human allergic mucosa to natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 82(6):1046-54.
156. Pipkorn U, Karlsson G. 1988. Methods for obtaining specimens from the nasal mucosa for morphological and biochemical analysis. *Eur Respir J* 1(9):856-862.
157. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. 1988b. A brush method to harvest cells from the nasal mucosa for microscopic and biochemical analysis. *J Immunol Methods* 112(1):37-42.
158. Plamenac P, Santic Z, Nikulin A, Serdarevic H. 1985. Cytologic changes of the respiratory tract in vineyard spraying workers. *Eur J Respir Dis.* 67(1):50-55.
159. Plopper CG, Weir A., St George J., Tyler N., Mariassy A. et al. 1988. Cell populations of the respiratory system: interspecies diversity in composition, distribution and morphology. in: Mohr U. *Inhalation toxicology*. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo.
160. Polzehl D, Wantia N, Reiter R, Riechelmann H. 2003. Zytokinsekretionsmuster von Atemwegsepithel nach Stimulation mit LPS und 1,3 β -D Glucan. *Eur Arch Otorhinolaryngol* in Druck.
161. Pope CA, Bates D.V., Raizenne M.E. 1995. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ Health Pers* 103:472-780.
162. Pope CA3, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D et al. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* 287(9):1132-41.
163. Praml G, Schierl R. 2000. Dust exposure in Munich public transportation: a comprehensive 4-year survey in buses and trams. *Int Arch Occup Environ Health* 73(3):209-14.
164. Purokivi M, Hirvonen MR, Roponen M, Randell J, Vahteristo M et al. 2002. Comparison of inflammatory elements in nasal lavage and induced sputum following occupational exposure to moldy-building microbes. *Inhal Toxicol* 14(6):653-62.

165. Purokivi MK, Hirvonen MR, Randell JT, Roponen MH, Meklin TM et al. 2001. Changes in pro-inflammatory cytokines in association with exposure to moisture-damaged building microbes. *Eur Respir J* 18(6):951-8.
166. Radenne F, Lamblin C, Vandezande LM, Tillie-Leblond I, Darras J et al. 1999. Quality of life in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 104(1):79-84.
167. Raizenne M, Dales R, Burnett R. 1998. Air pollution exposures and children's health. *Can.J Public Health* 89 Suppl 1:S43-S53.
168. Rasmussen TR, Andersen A, Pedersen OF. 2000. Particle deposition in the nose related to nasal cavity geometry. *Rhinology* 38(3):102-7.
169. Raulf-Heimsoth M, Wirtz C, Papenfuss F, Baur X. 2000. Nasal lavage mediator profile and cellular composition of nasal brushing material during latex challenge tests. *Clin Exp Allergy* 30(1):110-21.
170. Riechelmann H. Anatomie, Physiologie, und Immunologie der Nasenschleimhaut, spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen. 1997. In: Klimek L, Riechelmann H, Saloga J et al. (Hrsg.) *Allergologie und Umweltmedizin - Einführung in Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des oberen Respirationstraktes*, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, New York, 1-14.
171. Riechelmann H. 2000a. Bedeutung von Umwelt und Beruf für die Nasenschleimhaut. *Laryngorhinootologie* 79(11):653-4.
172. Riechelmann H. 2000b. Impact of environment and occupation on human nasal mucosa. 4th European Congress of Oto Rhino Laryngology Head and Neck Surgery, Berlin, May 1(260).
173. Riechelmann H, Deutsche T, Friemel E, Gross H-J, Bachem M. 2003a. Biological markers in nasal secretions. *Eur Respir J* 21(4):600-605.
174. Riechelmann H, Krekel J, Weihe E, Mann WJ. 1991. Immunhistochemischer Nachweis peptiderger Nervenfasern in der Nasenschleimhaut. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl. II*:157-158.

175. Riechelmann H, Rettinger G, Weschta M, Keck T, Deutsche T. 2003b. Effects of low-toxicity particulate matter on human nasal function. *J.Occup.Environ.Med.* 45(1):54-60.
176. Ronchetti R, Villa MP, Martella S, La Grutta S, Ronchetti F et al. 2002. Nasal cellularity in 183 unselected schoolchildren aged 9 to 11 years. *Pediatrics* 110(6):1137-1142.
177. Rudack C, Maune S, Eble J, Schroeder JM. 2003. The Primary Role in Biologic Activity of the Neutrophil Chemokines IL-8 and GRO-alpha in Cultured Nasal Epithelial Cells. *J Interferon Cytokine Res* 23(2):113-23.
178. Ruppman E. 1969. Zytodiagnostische Untersuchungen im Bereich der oberen Luftwege. *Aktuelle Otorhinolaryngol* 1:53-88.
179. Rusznak C, Devalia JL, Davies RJ. 1996. Airway response of asthmatic subjects to inhaled allergen after exposure to pollutants. *Thorax* 51(11):1105-1108.
180. Ryan LK, Karol MH. 1991. Release of tumor necrosis factor in guinea pigs upon acute inhalation of cotton dust. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5(1):93-8.
181. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J et al. 2002. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med* 165(12):1610-7.
182. Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA et al. 1992. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res* 57(1):19-33.
183. Saraf A, Larsson L, Larsson BM, Larsson K, Palmberg L. 1999. House dust induces IL-6 and IL-8 response in A549 epithelial cells. *Indoor Air* 9(4):219-25.
184. Scannell C, Chen L, Aris RM, Tager I, Christian D et al. 1996. Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma. *Am.J Respir Crit Care Med.* 154(1):24-29.

185. Schierhorn K, Hanf G, Fischer A, Umland B, Olze H et al. 2002. Ozone-induced release of neuropeptides from human nasal mucosa cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129(2):145-51.
186. Schlunssen V, Schaumburg I, Andersen NT, Sigsgaard T, Pedersen OF. 2002. Nasal patency is related to dust exposure in woodworkers. *Occup Environ Med* 59(1):23-9.
187. Schwela D. 1996. Exposure to environmental chemicals relevant for respiratory hypersensitivity: global aspects. *Toxicol Lett* 86(2-3):131-42.
188. Sigsgaard T, Bonefeld-Jorgensen EC, Kjaergaard SK, Mamas S, Pedersen OF. 2000. Cytokine release from the nasal mucosa and whole blood after experimental exposures to organic dusts. *Eur Respir J* 16(1):140-5.
189. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76(6):959-62.
190. Stalder K, Verkoyen C. Gesundheitsrisiken bei der Entsorgung kommunaler Abfälle. 1994. Stalder K, Verkoyen C (Hrsg.) Verlag Die Werkstatt, Göttingen, 7-217.
191. Stanners D, Bourdeau P. Air. 1995. In: Stanners D, Bourdeau P (Hrsg.) Europe's Environment - The Dobbris Assessment, EEA (European Environment Agency), Copenhagen, 1-652.
192. Steerenberg PA, Fischer PH, van Bree L, van Loveren H. 1997. Nasal lavage biomarkers in air pollution epidemiology. *Arch Toxicol Suppl* 19:207-16.
193. Steerenberg PA, Zonnenberg JA, Dormans JA, Joon PN, Wouters IM et al. 1998. Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro. *Exp Lung Res* 24(1):85-100.
194. Stringer B, Kobzik L. 1998. Environmental particulate-mediated cytokine production in lung epithelial cells (A549): role of preexisting inflammation and oxidant stress. *J Toxicol Environ Health A* 55(1):31-44.

195. Suzuki H, Takahashi Y, Wataya H, Ikeda K, Nakabayashi S et al. 1996. Mechanism of neutrophil recruitment induced by IL-8 in chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 98(3):659-70.
196. Swinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. 1989. In: Knapp W (Hrsg.) *Leucocyte typing IV*, Oxford University Press, Oxford, 628-634.
197. Sylvester I, Yoshimura T, Sticherling M, Schroder JM, Ceska M et al. 1992. Neutrophil attractant protein-1-immunoglobulin G immune complexes and free anti-NAP-1 antibody in normal human serum. *J Clin Invest* 90(2):471-81.
198. Tai CF, Baraniuk JN. 2002. Upper airway neurogenic mechanisms. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2(1):11-19.
199. Tao F, Kobzik L. 2002. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(4):499-505.
200. Teran LM, Seminario MC, Shute JK, Papi A, Compton SJ et al. 1999. RANTES, macrophage-inhibitory protein 1alpha, and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children. *J Infect Dis* 179(3):677-81.
201. Thornton Manning JR, Dahl AR. 1997. Metabolic capacity of nasal tissue interspecies comparisons of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Mutat Res* 380(1-2):43-59.
202. Timblin C, Berube K, Churg A, Driscoll K, Gordon T et al. 1998. Ambient particulate matter causes activation of the c-jun kinase/stress-activated protein kinase cascade and DNA synthesis in lung epithelial cells. *Cancer Res* 58(20):4543-7.
203. Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD et al. 2000. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol* 12(12):1113-26.
204. Tulic M, Manoukian J, Eidelman D, Hamid Q. 2002. T-cell proliferation induced by local application of LPS in the nasal mucosa of nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol* 110(5):771-776.

205. Turner RB, Weingand KW, Yeh CH, Leedy DW. 1998. Association between interleukin-8 concentration in nasal secretions and severity of symptoms of experimental rhinovirus colds. *Clin Infect Dis* 26(4):840-6.
206. Uddman R, Cantera L, Cardell LO, Edvinsson L. 1999. Expression of NPY Y1 and CGRP1 receptors in human nasal mucosa: implications in allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108(10):969-73.
207. Udem BJ, Carr MJ. 2001. Pharmacology of airway afferent nerve activity. *Respir Res.* 2(4):234-244.
208. Urbain B, Mast J, Beerens D, N'Guyen TQ, Goddeeris B et al. 1999. Effects of inhalation of dust and endotoxin on respiratory tracts of pigs. *Am J Vet Res* 60(9):1055-60.
209. Utell M. Human clinical exposure studies: Body box or Pandora's box. 1988. In: Mohr U, Dungworth D, Kimmerle G et al. (Hrsg.) *Inhalation toxicology*, Springer, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 67-86.
210. Van den Oever R. 1996. Occupational exposure to dust and sinonasal cancer. An analysis of 386 cases reported to the N.C.C.S.F. Cancer Registry. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 50(1):19-24.
211. van der Zee SC, Hoek G, Boezen MH, Schouten JP, van Wijnen JH et al. 2000. Acute effects of air pollution on respiratory health of 50-70 yr old adults. *Eur.Respir.J.* 15(4):700-709.
212. van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T et al. 2001. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med* 164(5):826-830.
213. Varga EM, Jacobson MR, Till SJ, Masuyama K, O'Brien F et al. 1999. Cellular infiltration and cytokine mRNA expression in perennial allergic rhinitis. *Allergy* 54(4):338-45.
214. Voelkel K, Krug HF, Diabate S. 2003. Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J Biosci* 28(1):51-5.

215. von-Mutius E, Sherrill DL, Fritzsche C, Martinez FD, Lebowitz MD. 1995. Air pollution and upper respiratory symptoms in children from East Germany. *Eur Respir J* 8(5):723-8.
216. Wagner F, Fink R, Hart R, Danczygier H. 1987. Substance P enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul. Pept.* 19(5-6):355-364.
217. Walinder R, Norback D, Wessen B, Venge P. 2001. Nasal lavage biomarkers: effects of water damage and microbial growth in an office building. *Arch Environ. Health* 56(1):30-36.
218. Walinder R, Norback D, Wieslander G, Smedje G, Erwall C et al. 1999. Nasal patency and lavage biomarkers in relation to settled dust and cleaning routines in schools. *Scand J Work Environ Health* 25(2):137-43.
219. Walls AF, Bennett AR, McBride HM, Glennie MJ, Holgate ST et al. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for human mast cell trypsinase. *Clin Exp. Allergy* 20(5):581-589.
220. Wang Z, Malmberg P, Ek A, Larsson K, Palmberg L. 1999. Swine dust induces cytokine secretion from human epithelial cells and alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 115(1):6-12.
221. Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI et al. 1997. Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 145(1):10-22.
222. Warheit DB, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr S, Hartsky MA. 1996. Subchronic inhalation of high concentrations of low toxicity, low solubility particulates produces sustained pulmonary inflammation and cellular proliferation. *Toxicol Lett* 88(1-3):249-53.

223. Willes SR, Fitzgerald TK, Permutt T, Proud D, Haley NJ et al. 1998. Acute respiratory response to prolonged, moderate levels of sidestream tobacco smoke. *J Toxicol Environ Health A* 53(3):193-209.
224. Williams MA, Cave CM, Quaid G, Solomkin JS. 1999. Chemokine regulation of neutrophil function in surgical inflammation. *Arch Surg* 134(12):1360-6.
225. Wohlford-Lenane CL, Deetz DC, Schwartz DA. 1999. Cytokine gene expression after inhalation of corn dust. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1):736-43.
226. Yuen IS, Hartsky MA, Snajdr SI, Warheit DB. 1996. Time course of chemotactic factor generation and neutrophil recruitment in the lungs of dust-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(2):268-74.
227. Zarkower A, Scheuchenzuber WJ, Burns CA. 1979. Effects of silica dust inhalation on the susceptibility of mice to influenza infection. *Arch Environ Health* 34(5):372-6.
228. Zeise L, Cardis E, Hemminki K, Schwarz M. 1999. Quantitative estimation and prediction of cancer risk: review of existing activities. *IARC Sci Publ*(131):11-59.
229. Zemp E, Elsasser S, Schindler C, Kunzli N, Perruchoud AP et al. 1999. Long-term ambient air pollution and respiratory symptoms in adults (SAPALDIA study). The SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med* 159(4 Pt 1):1257-66.
230. Zhu Z, Tang W, Gwaltney JM, Jr., Wu Y, Elias JA. 1997. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: role of NF-kappaB. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1):814-24.
231. Zwartz GJ, Guilmette RA. 2001. Effect of flow rate on particle deposition in a replica of a human nasal airway. *Inhal Toxicol* 13(2):109-27.