

Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Untersuchungen zur Wechselwirkung von Ozon und Allergenen,
sowie die Beeinflussung pathophysiologisch bedeutsamer Faktoren wie
Raucher-Nichtraucher, Regulation antioxidativer Enzyme, Neuropeptide
und Adhäsionsmoleküle in menschlicher Nasenschleimhaut in Organkultur**

von

K. Schierhorn, E. Olowson-Saviolaki, C. Büttner, K. Jurgovsky, C. Pfeiffer,
A. O'Connor, G. Kunkel

Abt. für Klinische Immunologie und Asthma-Poliklinik, Virchow-Klinikum, Charité,
Humboldt-Universität zu Berlin

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

Förderkennzeichen: PUG L 97002

25 Seiten
7 Abbildungen
3 Tabellen
50 Literaturstellen

September 2000

Inhaltsverzeichnis	Seite
Zusammenfassung	3
Summary	4
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Materialgewinnung und Aufarbeitung	6
2.2 Organkultur und Ozonexposition	6
2.3 Bestimmung von Entzündungsmediatoren im Kulturüberstand	7
2.4 Bestimmung von Protein und Aktivität antioxidativer Enzyme im Zytosol	7
2.5 Immunhistochemische Studien	8
2.6 Statistische Analysen	8
3. Ergebnisse	9
3.1 Stimulation mit Allergen	9
3.2 Regulation antioxidativer Enzyme	12
3.3 Vergleich der Ergebnisse Raucher versus Nichtraucher	13
3.4 Freisetzung von NKA und SP	15
3.5 Freisetzung von sICAM-1; Expression von ICAM und E-Selektin	16
4. Diskussion	17
5. Literaturverzeichnis	22

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Ozon und Allergenen, sowie die Beeinflussung pathophysiologisch bedeutsamer Faktoren wie Raucher-Nichtraucher, Regulation antioxidativer Enzyme, Neuropeptide und Adhäsionsmoleküle in menschlicher Nasenschleimhaut in Organkultur

K. Schierhorn, E. Olowson-Saviolaki, C. Büttner, K. Jurgovsky, C. Pfeiffer, A. O'Connor, G. Kunkel

Abt. für Klinische Immunologie und Asthma-Poliklinik, Virchow-Klinikum, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Zusammenfassung

In der vorausgegangenen Studie wurde der Einfluß von Ozon (0,06 bis 0,2 ppm) auf Nasenschleimhaut-Organokulturen über eine Expositionsdauer von 24 Stunden untersucht. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), Thromboxan B_2 (TXB_2), Leukotrien B_4 (LTB_4), Interleukin (IL)- 1β , IL-6, IL-8 und Tumor Nekrose Faktor- α ($TNF-\alpha$) nachgewiesen werden. Weiterhin konnten für Histamin (0,15 ppm); IL-4, IL-6, IL-8 und $TNF-\alpha$ (0,1 ppm) signifikant erhöhte Werte zwischen ozonexponierten Proben nichtatopischer vs. atopischer Patienten festgestellt werden.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde im gleichen Modell der Einfluß von Ozon (0,1 ppm, 24 h) auf eine zusätzliche Stimulation des Gewebes mit dem spezifischen Allergen des Patienten; sowie die Regulation von antioxidativen Enzymen, mögliche Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern, die Freisetzung von Neuropeptiden [Neurokinin A (NKA), Substance P (SP)] und löslichem Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1), sowie die Expression von ICAM-1 und E-Selektin (immunhistologisch) untersucht.

Bei Stimulation von Nasenschleimhaut von Hausstaubmilbenallergikern mit Milbenallergen wurde ein leichter Anstieg (8%) in der Histaminfreisetzung ozonexponierter zu ozonexponierter + allergenstimulierter Proben beobachtet, wobei bei gleichem Versuchsansatz bei Nichtatopikern (Negativkontrollen) keine derartigen Veränderungen auftraten. Bei Pollenallergikern, die innerhalb ihrer Saison operiert wurden, belief sich die Steigerung auf 87%; bei Pollenallergikern, die außerhalb ihrer Saison operiert wurden auf 24%.

Ozonexponierte Kulturen von Rauchern setzten im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant weniger Histamin (gleiche Tendenz bei Bradykinin), aber signifikant mehr $PGF_{2\alpha}$ und $LTC_4/D_4/E_4$ (gleiche Tendenz bei IL-4, IL-6 und IL-8) frei.

Nach Ozonexposition konnten keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-S-Transferase, Glutathion-Peroxidase (GPX), Glutathion-Reduktase und Katalase beobachtet werden. Allerdings konnte bei GPX (28%) und SOD (15%) eine Erhöhung festgestellt werden.

Andererseits führte die Ozonexposition zu einer signifikanten Erhöhung in der Freisetzung von NKA, SP und sICAM-1 im Vergleich zu den luftexponierten Kontrollkulturen. Eine

Erhöhung konnte außerdem in der Expression von ICAM-1 und E-Selektin festgestellt werden.

Interaction of ozone and allergens, and the influence of ozone on pathophysiological important factors (smoking, regulation of antioxidant enzymes, neuropeptides and adhesion molecules) in human nasal mucosa in organ culture

K. Schierhorn, E. Olowson-Saviolaki, C. Büttner, K. Jurgovsky, C. Pfeiffer, A. O'Connor, G. Kunkel

Department of Clinical Immunology and Asthma-OPD, Virchow-Clinics, Charité, Humboldt-University Berlin

Summary

Recently we examined the influence of ozone (0.2-0.06 ppm, 24 h exposure) on human nasal mucosa using a specially designed organ culture system. Following ozone exposure (0,1 ppm) a significant elevation of histamine, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), leukotriene B_4 (LTB_4), thromboxane B_2 (TXB_2), interleukin (IL)- 1β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was observed. Furthermore we found significant differences in the release of histamine (0.15 ppm); IL-4, IL-6, IL-8 and TNF- α (0.1 ppm) of ozone-exposed samples of non-atopic vs. atopic patients.

In the presented project we used this model to study the influence of ozone (0.1 ppm, 24 h exposure) under additional stimulation of the tissue of allergic patients with the specific allergen; as well as the regulation of antioxidant enzymes, possible differences between smokers and non-smokers, the release of neuropeptides [neurokinin A (NKA), substance P (SP)], soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and the expression of ICAM-1 and E-selectin (immunohistochemical studies) following ozone exposure.

Stimulation of nasal mucosa of patients with house dust mite allergy resulted in a weak increase in the release of histamine (8%) of ozone-exposed to ozone-exposed + allergen-stimulated samples, whereas stimulation of tissue of non-atopics (as negative control) does not effect histamine release. Stimulation of tissue of patients with pollen allergy in season showed an increase in the release of histamine of ozone-exposed to ozone-exposed + allergen-stimulated samples of 87%, tissue of patients with pollinosis out of season of 24%.

Ozone-exposed cultures of smokers released significantly less histamine (the same tendency was seen for bradykinin), but significantly more $PGF_{2\alpha}$ and $LTC_4/D_4/E_4$ (the same tendency was seen for IL-4, IL-6 and IL-8) compared to cultures of non-smokers following ozone exposure.

Following ozone exposure we did not find significant differences in the activity of antioxidant enzymes like superoxide-dismutase (SOD), glutathione-S-transferase, glutathione-peroxidase (GPX), glutathione-reductase and katalase. However an increase of GPX (28%) and SOD (15%) was observed.

Additionally we found a significantly elevated release of NKA, SP and sICAM-1 following ozone exposure compared to air-exposed control cultures. Moreover an increase in the expression of ICAM-1 and E-selectin was observed.

1. Einleitung

Die in den letzten Jahren vorgelegten epidemiologischen, in vivo- und in vitro-Studien weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Luftschadstoffen - insbesondere der Ozonbelastungs- und Atemwegserkrankungen hin. Allerdings bestehen starke individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber den Ozonwirkungen. Beim Menschen ist die Risikogruppe von „Ozon-überempfindlichen“ Personen immer noch nicht eindeutig definiert. Die Frage, ob Patienten mit allergischen Atemwegserkrankungen v.a. im Zusammenhang mit allergenspezifischen Provokationen ein höheres Risiko durch eine Ozonexposition erfahren, wurde in den letzten Jahren heftig diskutiert (MOLFINO et al. 1991, PIERSON & KOENIG 1992, DEVALIA et al. 1994, KRISHNA et al. 1995, KOREN & BROMBERG 1995, JÖRRES et al. 1996).

Während sich eine Reihe von Studien mit den durch Ozon ausgelösten Lungenfunktionsveränderungen bei Rauchern und Nichtrauchern beschäftigt (HAZUCHA et al. 1973, KERR et al. 1975, FRAMPTON et al. 1997, TORRES et al. 1997), liegen in diesem Zusammenhang nur sehr wenige Ergebnisse zu möglichen Unterschieden in der Freisetzung von Entzündungsmediatoren vor.

In vitro und in vivo werden durch Ozonexposition zahlreiche Enzyme induziert, die zu den Schutzmechanismen gegen oxidativen Streß gehören. Zu diesen zählen die Superoxid-Dismutase, die Glutathion-Peroxidase, die Glutathion-Reduktase und die Katalase sowie das Glutathion (RAHMAN et al. 1991, BOEHME et al. 1992). Allerdings liegen in diesem Zusammenhang vorwiegend tierexperimentelle Befunde mit Langzeitexpositionen unter hohen Ozonkonzentrationen vor.

Der zugrundeliegende Mechanismus der durch Ozon ausgelösten Veränderungen ist noch nicht geklärt. In letzter Zeit werden Zusammenhänge zu Veränderungen auf neuronaler Ebene über Neuropeptide (PEDEN 1997) und die Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen (DEVALIA et al. 1997) diskutiert.

Da insbesondere bei in vivo-Untersuchungen enge Grenzen in der ethischen Vertretbarkeit gegeben sind und in vitro-Untersuchungen an Zellkulturen nur Einzelaspekte einer solchen Fragestellung bearbeiten können, wurde ein Organkulturmodell für menschliche Nasenschleimhaut (SCHIERHORN et al. 1995) entwickelt. Um einen Beitrag zur Aufklärung der pathophysiologischen Zusammenhänge und zur Risikoabschätzung zu leisten, wurde unter Nutzung dieses Modells der Einfluß von Ozon auf eine zusätzliche Stimulation mit Allergenen; mögliche Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern, die Regulation von antioxidativen Enzymen, die Freisetzung von Neuropeptiden (NKA, SP) und sICAM-1, sowie die Expression von ICAM-1 und E-Selektin (immunhistologisch) unter Ozonexposition untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialgewinnung und Aufarbeitung

Die Nasenschleimhaut wurde von Patienten, die sich wegen chronischer Nasenatmungsbehinderung einer Konchotomie unterzogen, gewonnen. Bei den Patienten wurde eine ausführliche Anamnese einschließlich Hautpricktest und Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE (CAP, Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Schleimhaut der unteren Nasenmuschel wurde unmittelbar in ein steriles Transportmedium [HEPES-Puffer: pH 7,4; 137 mM NaCl, 4 mM KCl (Merck, Darmstadt), 11 mM Glucose (Braun, Melsungen), 10 mM HEPES, 100 µg/ml Gentamicin (Sigma, St. Louis, USA)] überführt, bei 4°C gelagert und innerhalb von 30 Minuten auf Eis ins Labor transportiert. Unter sterilen Bedingungen wurden dann im Labor hämorrhagische und/oder nekrotische Teile des Gewebes manuell entfernt. Anschließend wurden aus nicht entzündlich veränderten Bereichen der Präparate mittels Biopsiestanzen (Ø 4 mm; Stiefel, Offenbach am Main) 8 bis 14 Gewebestanden gewonnen. Diese wurden 3 mal in HEPES-Puffer gewaschen um Blut- und Schleimreste zu entfernen.

2.2 Organkultur und Ozonexposition

Die Gewebestanden aus intakter, vollständiger Nasenschleimhaut wurden zuerst für eine Stunde bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ vorinkubiert. Hierdurch sollte eine Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse durch eventuell verletzungsbedingt freigesetzte Mediatoren vermieden werden. Anschließend wurden die Gewebestücke einzeln mit dem Epithel nach oben in 1 cm x 1 cm x 0,7 cm große Stücke kollagenhaltiger Gelatineschwämme (Gelfoam, Upjohn, Kalamazoo, USA), die für mindestens 4 Stunden mit Kulturpuffer prähydriert worden waren, implantiert und einzeln in 6-Well-Kulturschalen (Nunclon, Roskilde, Dänemark) plaziert. Jedes Well enthielt 4 ml HEPES-Puffer [137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, (Merck), 11 mM Glucose, 10 mM HEPES, 1,1 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 50 µg/ml Gentamicin (Sigma)]. Auf diese Weise befand sich das Epithel oberhalb der flüssigen Phase (air-liquid interface). Die Schleimhautoberflächen wurden jeweils unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen) beurteilt. Die Kontrollproben wurden bis zu 24 Stunden in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Parallel dazu wurden in einem anderen Begasungsbrutschrank (Heraeus), der an eine Ozondosierungsanlage Ozocontrol (Sorbios, Berlin) angeschlossen war, die Versuchskulturen mit Ozon (0,08 ppm = 160 µg/m³; 0,1 ppm = 200 µg/m³ oder 0,15 ppm = 300 µg/m³) exponiert und unter den gleichen Bedingungen gehalten. Um einen direkten Kontakt zwischen dem Gewebe und Ozon zu gewährleisten, wurden die Deckel von den Gewebekulturschalen entfernt. Die Nasenschleimhaut von bestimmten Patienten (Allergikern und Nichtallergikern) wurde mit 0,1 ppm Ozon exponiert und außerdem mit/ohne Hausstaubmilben- (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Gräser-, Birken- bzw. Katzen-Provokationsallergen (Allergopharma J. Ganzer KG, Hamburg) [Lyophilisat gelöst in Kulturpuffer; 500 bis 2000 SBE (Standardisierte Biologische Einheiten)/4-mm-Gewebestanze (500 SBE/4-mm-Gewebestanze = 137 SBE/ml)] stimuliert. Zur Untersuchung der Wirkung von H₁-Antagonisten wurde ein Teil der Kulturen mit/ohne Fexofenadin (10⁻⁶, 10⁻⁵ bzw. 10⁻⁴ M) behandelt und bis zu 24

Stunden inkubiert. Um eine mögliche Gewebheterogenität auszugleichen, wurden je Ansatz 2 bis 3 Stanzen parallel inkubiert. Der Kulturüberstand wurde nach 24 Stunden Inkubation auf Eis abgenommen und bis zur Analyse sofort bei -80°C gelagert. Nach Abschluß der Inkubation wurden die einzelnen Gewebeprobe gewogen. Jeweils am Anfang und am Ende der Kultivation wurde je ein repräsentatives Gewebefragment für die Aufbereitung zur Zytosolgewinnung mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für die Routinehistologie bzw. Immunhistologie fixiert.

2.3 Bestimmung von Entzündungsmediatoren im Kulturüberstand

Die Histaminkonzentration im Überstand wurde nach Proteinfällung mit 2% HClO_4 mit einer automatischen fluorometrischen Technik [SIRAGANIAN (1974), Bestimmungsgrenze (BG) 0,4 ng/ml] gemessen. Immunreaktive Kinine wurden mit einem spezifischen Radioimmunoassay (PROUD et al. (1983), BG 20 pg/ml) bestimmt. $\text{PGF}_{2\alpha}$ (BG 24 pg/ml), SP (BG 17,2 pg/ml, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA), TXB_2 (BG 3,6 pg/ml), LTB_4 (BG 6 pg/ml), $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ (BG 10 pg/ml, Amersham, Little Chalfont, GB), $\text{IL-1}\beta$ (BG 0,083 pg/ml), IL-4 (BG 0,065 pg/ml), IL-5 (BG 4 pg/ml), IL-6 (BG 0,104 pg/ml), IL-8 (BG 10 pg/ml), IL-13 (BG 12 pg/ml), Tumor Nekrose Faktor- α ($\text{TNF-}\alpha$, BG 0,112 pg/ml, Biosource, Camarillo, USA), NKA (BG 40 pg/ml, Peninsula Laboratories, Belmont, USA) und sICAM-1 (BG 0,2 ng/ml, Immunotech, Marseille, Frankreich) wurden mit kommerziellen Enzyme Immuno Assays (EIA) bzw. ultrasensitiven Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA) bestimmt.

2.4 Bestimmung von Protein und Aktivität antioxidativer Enzyme im Zytosol

Die gefroren Nasenschleimhautstanzen wurden mit 200 μl Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Kalzium und Magnesium, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) aufgeschlossen. Um die Mukosa im PBS-Puffer zu lösen wurden die Proben in Pufferlösung mit einem Ultraschallhomogenisator (Sonifier B-12 Cell Disruptor, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA) für 3 Sekunden zerkleinert. Anschließend wurden die Proben in einem Tiefkühler (Herafreeze, Heraeus) auf -80°C schockgefroren. Jede Probe verblieb 10 Minuten bei dieser Temperatur und wurde danach auf Eis langsam aufgetaut. Die Proben wurden kurz nach dem Erreichen der Flüssigphase ein weiteres mal für 3 Sekunden dem Ultraschallgerät ausgesetzt. Nach dem Homogenisieren wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei 4°C und 14000 Umdrehungen (13148 g) für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Zytosol) wurde in Aliquote aufgeteilt und auf -80°C tiefgefroren. Während Aufschluß, Homogenisierung und Aliquotierung wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert, um eine Erwärmung der Probensubstanz zu verhindern.

Zur Bestimmung von Protein im Zytosol diente eine spektrophotometrische Methode mit Hilfe eines BCA Protein Assays (Pierce, Rockford, USA). Die Glutathion-S-Transferase-Aktivität (GST) wurde mit einer Methode nach HABIG et al. (1974) bestimmt. Die Bestimmung der Katalase-Aktivität (KAT) (BEERS & SIZER 1952), Glutathion-Peroxidase-Aktivität (GPX) (WENDEL 1980) und Glutathion-Reduktase-Aktivität (GR) (MAVIS & STELLWAGEN 1968) erfolgte mit Methoden unter Nutzung der kontinuierlichen spektrophotometrischen Messung der Umsatzrate. Die Superoxid-Dismutase-Aktivität

(Cu/Zn-SOD) im Zytosol der Proben wurde mit einem spektrophotometrischen Assay (Bioxytech SOD-525; Oxis, Portland, OR, USA) bestimmt.

2.5 Immunhistochemische Studien

Um Veränderungen bei der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin nach Ozonexposition (0,1 ppm) beurteilen zu können, wurden 4- μ m Gefrierschnitte, die auf mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma) beschichteten Objektträgern aufgezogen waren, mit Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP, Dako, Hamburg) nach CORDELL et al. (1984) gefärbt. Monoklonaler Maus Anti-Human ICAM-1 (Clone 6.5B5, Dako) bzw. E-Selektin (Clone ENA1, Monosan, Uden, Niederlande) wurden dabei als Primärantikörper benutzt. Bei den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch 50 mM Tris-HCl (Sigma, pH 7,6) ersetzt. Die gebundenen Phosphatasemoleküle wurden mit Naphtol-AS-bi-Phosphat/Neu Fuchsin (Sigma) sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden dann mit Mayer's Hämalaunlösung gegengefärbt und in flüssige Glyzeringelatine eingebettet (Merck).

Um mögliche Veränderungen auf neurogener Ebene zu untersuchen, wurde ein Teil der Gewebeproben vor bzw. mit/ohne Ozonexposition (0,1 ppm) mit Zamboni-Lösung fixiert. Zunächst wurde die Gesamt-Innervation der Proben (nach Lokalisation getrennt - Lamina propria, Drüsen, venöse Sinus) durch Immunreaktivität gegen PGP 9.5 (ein Marker aller Nerven, UltraClone, London, GB) bestimmt und anschließend die Immunreaktivität für SP (Serva, Heidelberg) mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (Prof. Dr. A. Fischer, Inst. für Anatomie & Zellbiologie, Klinikum, Justus-Liebig-Universität Giessen; jetzt Humboldt-Universität zu Berlin).

2.6 Statistische Analysen

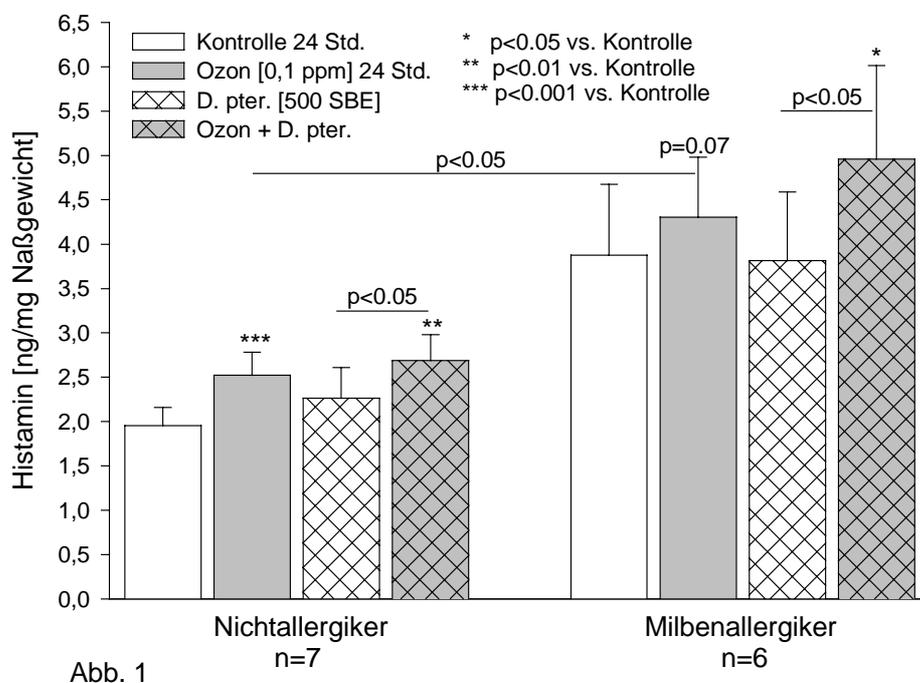
Die Mediatorkonzentrationen wurden nach Abzug der entsprechenden Leerwerte auf die Menge des Überstandes der Organkulturen bezogen und auf das ermittelte Naßgewicht der Stenzen berechnet. Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt der entsprechenden Proben bezogen. Außerdem wurden die jeweiligen prozentualen Mediatorfreisetzungen im Vergleich zur Kontrolle (100 %), ggf. auch zur entsprechenden Vergleichsprobe (z.B. ozon-exponierte Probe zu ozon-exponierte + allergenstimulierte Probe) ermittelt und als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die statistische Analyse wurde an einem IBM kompatiblen Computer mit der Software Statgraphics[®] Version 2.6 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA) bzw. SPSS Version 7.5 2G (SPSS In., Chicago, USA) durchgeführt. Für den Vergleich der Ergebnisse der Kontrollen versus exponierter bzw. stimulierter Proben wurde der verteilungsunabhängige Wilcoxon-Test für verbundene Paare verwendet. Die Ergebnisse von Atopikern versus Nichtatopikern bzw. Allergikern versus Nichtallergikern bzw. Rauchern versus Nichtraucher wurden mit dem verteilungsunabhängigen U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney für unabhängige Stichproben verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

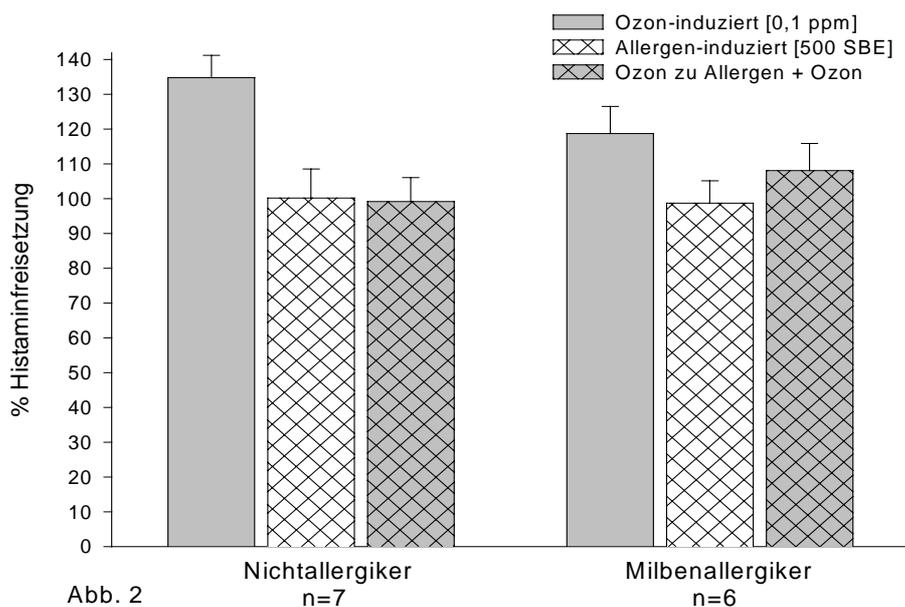
3. Ergebnisse

3.1 Stimulation mit Allergen

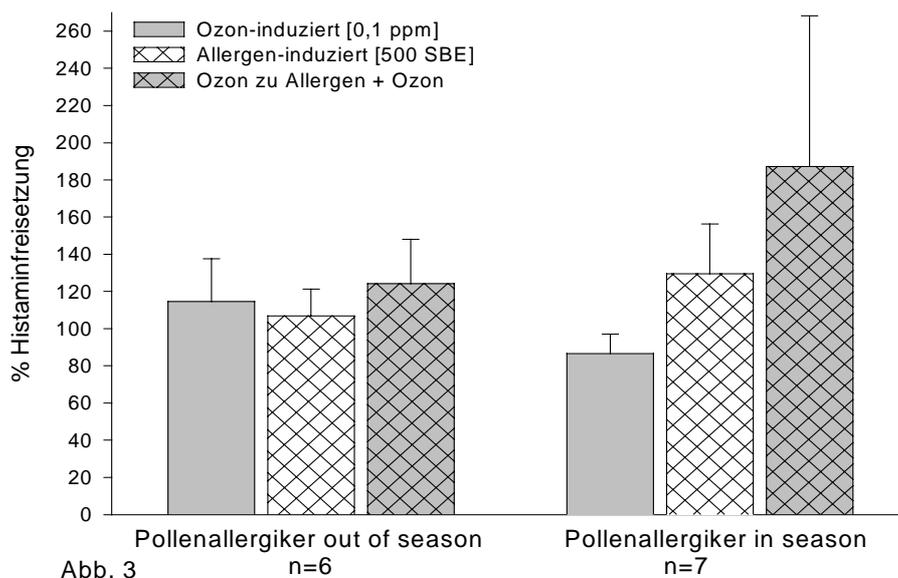
Um zunächst den Einfluß von Allergen auf die Nasenschleimhaut allgemein im Sinne von „Negativkontrollen“ zu testen, wurde die Schleimhaut von Nichtatopikern mit Hausstaubmilbenallergen (D. pter.) stimuliert. Dies führte erwartungsgemäß zu keiner Veränderung in der Histaminfreisetzung (HR). Während sich zwischen den nichtexponierten Kontrollen und den ozonexponierten Proben (0,1 ppm) ein signifikanter Anstieg in der HR zeigte, wurde beim Vergleich von ozonexponierten zu ozonexponierten + allergenstimulierten Proben kein Anstieg in der HR beobachtet (Abb. 1 und Abb. 2). Aber auch bei der Stimulation von Gewebe von Hausstaubmilbenallergikern mit D. pter. (500 SBE) konnten keine Veränderungen in der HR im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden.



Allerdings wurde ein leichter Anstieg (8%) in der HR ozonexponierter zu ozonexponierter + allergenstimulierter Proben beobachtet. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur Nichtatopikergruppe (Abb. 1 und Abb. 2). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Bestimmung von IL-6 in den entsprechenden Organkulturüberständen.



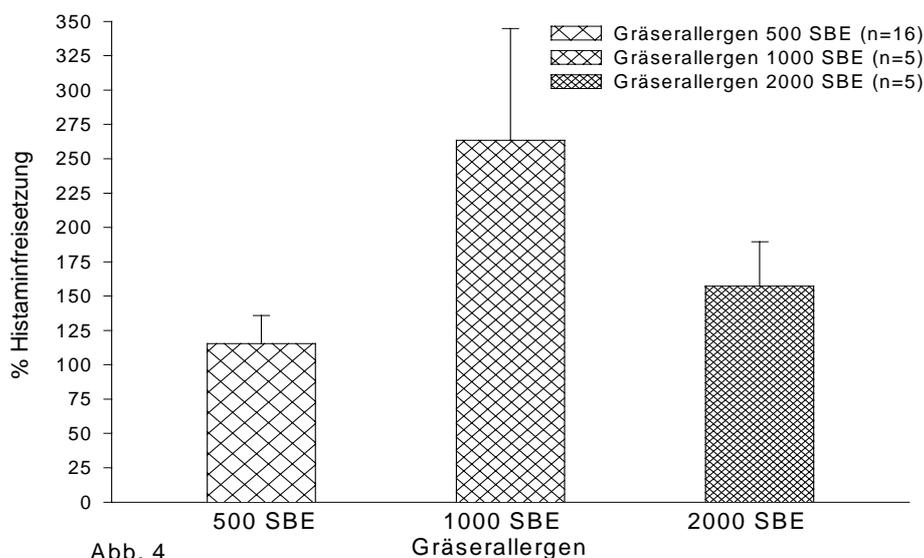
Bei den Pollenallergikern handelte es sich hauptsächlich um Gräserallergiker. Diese Gewebe wurden mit Gräserpollenallergen stimuliert. Zwei Patienten waren Birkenpollenallergiker und wurden mit Birkenpollenallergen stimuliert. Bei Pollenallergikern, die außerhalb ihrer Saison („out of season“) operiert wurden, betrug die Steigerung der HR von ozonexponierten zu ozonexponierten + allergenstimulierten Proben 24%; bei Pollenallergikern, die innerhalb ihrer Saison („in season“) operiert wurden, 87%. Die Gewebe von Patienten „in season“ reagierten etwas stärker auf die Allergenstimulation, aber weniger stark auf die Ozonexposition (Abb. 3).



Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Bestimmung von IL-6 in den entsprechenden Organkulturüberständen.

Außerdem erschien es notwendig, die erforderliche Dosis für eine erfolgreiche Allergenprovokation in diesem Modell zu ermitteln. Der Versuch einer Dosisfindung am Beispiel der Gräserallergenstimulation bei Gewebe von Patienten mit Graspollenallergie ist in Abb. 4 dargestellt. Bei Stimulation mit 1000 SBE ließ sich dabei die HR um 163% steigern. Insgesamt zeigten sich vor allem bei der Allergenstimulation und bei der Ozonexposition + Allergenstimulation große individuelle Unterschiede.



Weiterhin mußten unterschiedliche Formen der Applikation (Allergenyophilisat gelöst im Kulturpuffer oder lokale Applikation auf die Epitheloberfläche) bzw. unterschiedliche Inkubationszeiten untersucht werden.

Insgesamt wurden die gesamten Untersuchungen durch die Tatsache erschwert, daß nur sehr wenig Patienten mit allergischer Disposition -Typ I-Sensibilisierung und entsprechender allergischer Klinik- konchotomiert wurden, so daß uns nur begrenzt Gewebe für alle notwendigen Untersuchungen an „allergischen“ Schleimhäuten zur Verfügung stand.

3.2 Regulation antioxidativer Enzyme

Nach Ozonexposition konnten keine signifikanten Veränderungen in der Enzymaktivität von Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-S-Transferase (GST), Glutathion-Peroxidase (GPX), Glutathion-Reduktase (GR) und Katalase (KAT) im Vergleich zu den luftexponierten Kontrollkulturen festgestellt werden (Tab. 1). Eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung wurde für die SOD (15%) und die GPX (28%) beobachtet.

Tab. 1 Enzymaktivitäten antioxidativer Enzyme nach Ozonexposition (0,12 ppm)

Enzym-Aktivität	n	Kontrolle [mU/mg Protein] [#] , 24 Std.			p Kontrolle vs. Ozon-induziert	Ozon-induziert [mU/mg Protein], 24 Std.			Veränderung [%] Median
		Median	untere Quartile	obere Quartile		Median	untere Quartile	obere Quartile	
SOD	22	8,415	7,550	10,187	n.s.	9,675	8,315	10,525	15
GST	58	37,045	27,873	50,937	n.s.	34,455	24,113	50,617	-7
GPX	18	13,751	9,384	18,852	n.s.	17,664	13,532	20,6041	28
GR	67	621,070	530,185	710,605	n.s.	614,624	456,039	725,383	-1
KAT [#]	67	54,523	47,819	63,500	n.s.	52,422	43,463	65,830	-3,9

[#] bei Katalase (KAT) [U/mg Protein]

3.3 Vergleich der Ergebnisse Raucher versus Nichtraucher

Beim Vergleich der Ergebnisse von Rauchern mit Nichtrauchern wurden folgende Unterschiede beobachtet: ozonexponierte Kulturen von Rauchern setzten signifikant weniger Histamin im Vergleich zu den exponierten Kulturen von Nichtrauchern frei (Tab. 2). Die gleiche Tendenz wurde für die Freisetzung von Bradykinin festgestellt (Tab. 3). Demgegenüber setzten die Kulturen von Rauchern nach Exposition gegenüber 0,1 ppm Ozon (24 Std.) signifikant mehr $\text{PGF}_{2\alpha}$ und $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ im Vergleich zu den exponierten Kulturen von Nichtrauchern frei (Tab. 3). Die gleiche Tendenz konnte bei der Freisetzung von IL-4, IL-6 und IL-8 beobachtet werden (Tab. 3). Die nichtexponierten Kontrollkulturen von Rauchern setzten signifikant weniger TXB_2 im Vergleich zu den Nichtrauchern frei (Tab. 3).

Tab. 2 Histaminfreisetzung nach Ozonexposition bei Nichtrauchern vs. Rauchern

Nichtraucher									
Ozon [ppm]	n	Kontrolle Histamin [ng/mg Naßgewicht]			p Kontrolle vs. Ozon- induziert	Ozon-induzierte Freisetzung Histamin [ng/mg Naßgewicht]			Ozon- induzierte Erhöhung Median
		Median	untere Quartile	obere Quartile		Median	untere Quartile	obere Quartile	
24 Std.									
0,08	12	1,88	1,32	2,98	p<0,01	2,48	1,69	3,80	0,564
0,10	18	2,09	1,67	2,72	p<0,001	2,85	2,25	3,94	0,836
0,15	15	0,88	0,69	3,00	p<0,01	1,89	1,57	2,45	0,910
Raucher									
Ozon [ppm]	n	Kontrolle Histamin [ng/mg Naßgewicht]			p Kontrolle vs. Ozon- induziert	Ozon-induzierte Freisetzung Histamin [ng/mg Naßgewicht]			Ozon- induzierte Erhöhung Median
		Median	untere Quartile	obere Quartile		Median	untere Quartile	obere Quartile	
24 Std.									
0,08	9	1,41*	0,92	1,68	n.s.	1,80*	0,79	2,03	0,200
0,10	18	1,68	0,88	2,49	p<0,01	2,21**	1,48	2,46	0,452***
0,15	15	1,24	0,42	1,92	n.s.	1,38	0,46	3,19	0,147

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (vs. Nichtraucher)

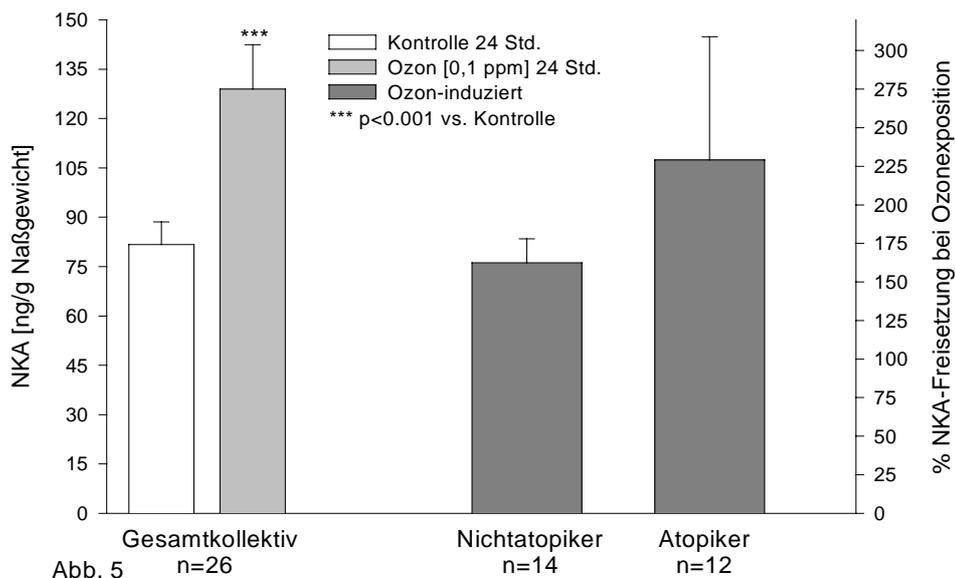
Tab. 3 Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Ozonexposition (0,1 ppm) bei Nichtrauchern vs. Rauchern

Nichtraucher									
Mediator	n	Kontroll-Freisetzung [pg/mg Naßgewicht], 24 Std.			p Kontrolle vs. Ozon- induziert	Ozon-induzierte Freisetzung [pg/mg Naßgewicht], 24 Std.			Ozon- induzierte Erhöhung Median
		Median	untere Quartile	obere Quartile		Median	untere Quartile	obere Quartile	
PGF _{2α}	11	270,897	185,083	423,023	p<0,01	497,704	423,710	580,730	230,06
TXB ₂	11	1,636	0,905	2,463	p<0,05	2,249	1,869	3,090	0,650
LTB ₄	5	0,803	0	2,789	p<0,05	3,588	2,404	5,173	2,026
LTC ₄ /D ₄ /E ₄	11	1,354	0	1,864	n.s.	1,460	0	2,406	0,023
IL-1β	10	0,096	0,042	0,121	n.s.	0,138	0,090	0,216	0,053
IL-4	10	0,131	0,121	0,138	n.s.	0,126	0,100	0,158	0,004
IL-6	10	9,253	6,854	12,045	n.s.	12,045	9,720	15,713	2,698
IL-8	10	119,691	20,865	179,417	p<0,01	250,711	134,963	408,195	106,48
TNF-α	10	0,467	0,064	0,983	n.s.	0,644	0,332	1,034	0,246
Bradykinin	6	65,994	12,654	115,210	n.s.	91,613	68,810	133,327	38,057
Raucher									
Mediator	n	Kontroll-Freisetzung [pg/mg Naßgewicht], 24 Std.			p Kontrolle vs. Ozon- induziert	Ozon-induzierte Freisetzung [pg/mg Naßgewicht], 24 Std.			Ozon- induzierte Erhöhung Median
		Median	untere Quartile	obere Quartile		Median	untere Quartile	obere Quartile	
PGF _{2α}	10	301,283	233,153	369,085	p<0,01	684,60**	614,586	787,670	399,93*
TXB ₂	10	0,981*	0,479	1,201	p<0,01	1,974	1,079	2,557	0,812
LTB ₄	3	0,739	0,514	1,651	n.s.	3,089	1,470	4,454	2,351
LTC ₄ /D ₄ /E ₄	10	1,789	0,674	2,867	p=0,06	2,763*	1,916	3,048	0,617
IL-1β	7	0,049	0,042	0,116	n.s.	0,110	0,061	0,225	0,079
IL-4	7	0,131	0,089	0,179	n.s.	0,160	0,096	0,199	0,006
IL-6	7	10,134	8,667	11,052	p<0,05	15,930	12,330	18,806	4,072
IL-8	7	94,312	87,733	110,619	p<0,05	296,816	259,655	625,179	202,50*
TNF-α	7	1,042	0,141	1,092	n.s.	1,036	0,152	1,527	0,152
Bradykinin	3	34,056	0	62,284	n.s.	58,546	0	85,941	23,657

* p<0,05; ** p<0,01 (vs. Nichtraucher)

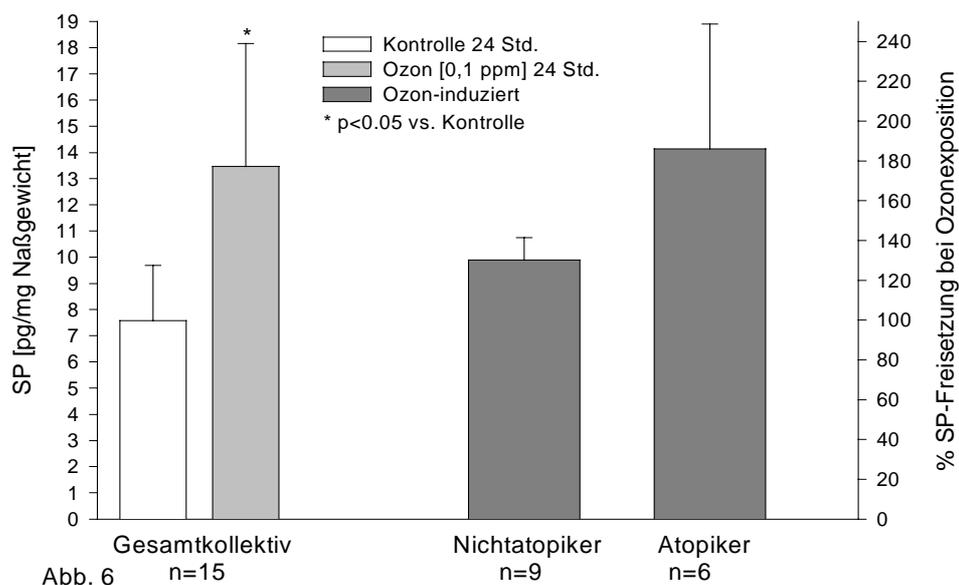
3.4 Freisetzung von NKA und SP

Nach Ozonexposition gegenüber 0,1 ppm wurde eine signifikante Erhöhung in der Freisetzung von Neurokinin A (NKA) beim Gesamtkollektiv ($p < 0,001$), den Nichtatopikern ($p < 0,01$) und Atopikern ($p < 0,01$) im Vergleich zu den luftexponierten Kontrollkulturen beobachtet. Die Freisetzung von NKA stieg dabei bei den Nichtatopikern um 62% und bei den Atopikern um 129% (Abb. 5).



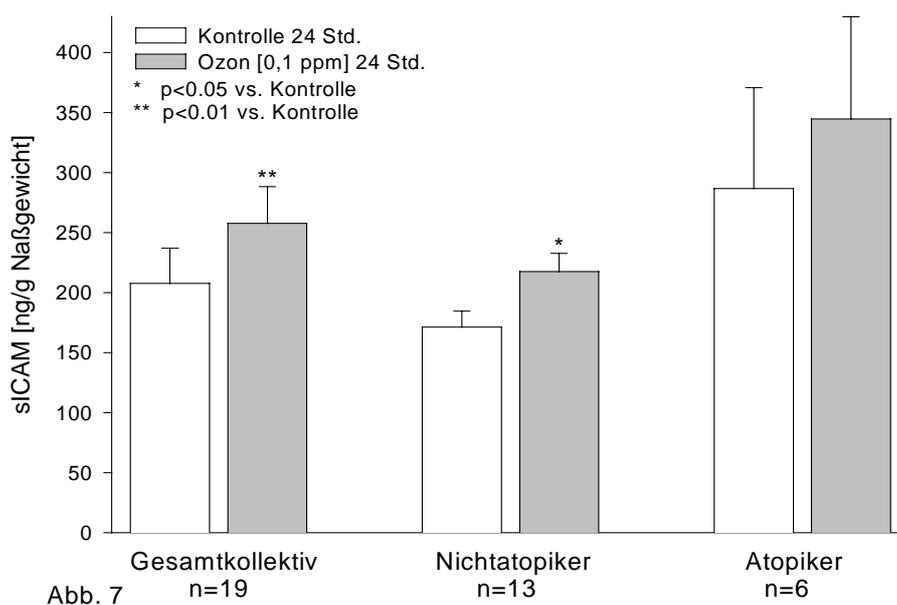
In mit Zamboni fixierten Gewebeproben konnten bezüglich der Gesamt-Innervation und dem prozentualen Anteil Substance P (SP)-haltiger Nervenfasern an der Gesamtheit aller Nervenfasern keine signifikanten Unterschiede zwischen mit 0,1 ppm Ozon exponierten Gewebeproben und Kontrollkulturen festgestellt werden ($n=3$). Interessant war allerdings die Tatsache, daß nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sowohl in den Kontrollproben als auch in den Ozonkulturen immer noch Substance P-haltige Nervenfasern immunhistologisch nachgewiesen werden konnten.

Bei der Bestimmung von SP im Kulturüberstand wurde eine signifikante Erhöhung nach Ozonexposition beim Gesamtkollektiv ($p < 0,05$) festgestellt. Die Freisetzung von SP stieg dabei bei den Nichtatopikern um 30% und bei den Atopikern um 86% (Abb. 6).



3.5 Freisetzung von sICAM-1; Expression von ICAM und E-Selektin

Nach Ozonexposition gegenüber 0,1 ppm wurde eine signifikante Erhöhung in der Freisetzung von löslichem Interzellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) beim Gesamtkollektiv ($p<0,01$) und den Nichtatopikern ($p<0,05$) im Vergleich zu den luftexponierten Kontrollkulturen beobachtet (Abb. 7). Die Freisetzung von sICAM-1 stieg dabei bei den Nichtatopikern um 34% und bei den Atopikern um 27%. Außerdem konnte in immunhistologischen Untersuchungen mittels semiquantitativer Auswertung eine Verstärkung in der Expression von ICAM-1 und E-Selektin ($n=6$) festgestellt werden.



4. Diskussion

Durch Ozonexposition werden Lungenfunktionsveränderungen und Entzündungsreaktionen der Atemwege ausgelöst (HAZUCHA et al. 1973, KOREN et al. 1989, DEVLIN et al. 1991, ARIS et al. 1993). Sowohl epidemiologische, in vivo- als auch in vitro-Studien weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Ozon und entzündlich allergischen und nicht allergischen Atemwegserkrankungen hin.

In der vorausgegangenen Studie konnte in einem speziell entwickelten Organkulturmodell (SCHIERHORN et al. 1995) für humane Nasenschleimhaut bei einer Exposition gegenüber 0,1 ppm Ozon eine signifikante Erhöhung verschiedener Entzündungsmediatoren wie Histamin, $\text{PGF}_{2\alpha}$, TXB_2 , LTB_4 , $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 und $\text{TNF-}\alpha$ im Kulturüberstand, sowie eine signifikante Erhöhung von degranulierten Mastzellen im Gewebe nachgewiesen werden (SCHIERHORN et al. 1997, 1999 a).

Trotz der zahlreichen bisherigen Ergebnisse gibt es in der Ozondiskussion immer noch offene Fragen. Weiterhin diskutiert wird die Frage, ob Allergiker und hier besonders Patienten mit allergischen Atemwegserkrankungen ein höheres Risiko durch eine Ozonexposition erfahren. Für die Beurteilung der Ozonwirkung bei Allergikern ist wichtig, daß Episoden mit hohen Ozonwerten meist mit hohen Pollenkonzentrationen in der Außenluft verbunden sind. Aber gerade die Befunde mit allergenspezifischen bronchialen Provokationen an Asthmatikern im Zusammenhang mit einer Ozonexposition erbrachten unterschiedliche Ergebnisse (MOLFINO et al. 1991, PIERSON & KOENIG 1992). Inzwischen zeigen neuere Untersuchungen, daß neben dem Schweregrad der klinischen Symptomatik der untersuchten Asthmatiker, die Höhe der Ozonkonzentration und eine gleichzeitige körperliche Belastung entscheidend sind. So konnten JÖRRES et al. (1996) ermitteln, daß bei Asthmatikern die Ozonexposition zusammen mit körperlicher Anstrengung zu einer erhöhten Empfindlichkeit in der Allergen-Provokationsantwort führt. Weitere Befunde dieser Art werden auch für die oberen Luftwege mitgeteilt (KOREN & BROMBERG 1995). Außerdem konnten Untersuchungen zur Allergen-induzierten nasalen Entzündungsreaktionen von Asthmatikern zeigen, daß 0,4 ppm Ozon die in der Spätreaktion auftretende Eosinophilie auf Allergen verstärkte (PEDEN et al. 1995).

In der vorausgegangenen Studie konnte bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Gewebekulturen atopischer Patienten mit denen von nicht atopischen Patienten nach Ozonexposition bei einer Ozonkonzentration von 0,15 ppm für Histamin und bei 0,1 ppm Ozon für $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 , IL-6 und IL-4 eine signifikant erhöhte Freisetzung ozonexponierter Proben nichtatopischer vs. atopischer Patienten festgestellt werden (SCHIERHORN et al. 1999 a).

Zur Durchführung der hier vorgestellten Studie mußten zunächst einige wichtige Einflußgrößen, wie verschiedene Allergentypen, Allergendosis, Inkubationszeit, Applikationsform, Stimulation innerhalb oder außerhalb der Allergensaison des Patienten, näher untersucht werden, was den Ablauf der eigentlichen Hauptexperimente verzögerte. Außerdem wurden die gesamten Untersuchungen insgesamt durch die Tatsache erschwert, daß nur begrenzt Patienten mit allergischer Disposition -Typ I-Sensibilisierung und entsprechender allergischer

Klinik- konchotomiert wurden, so daß uns wenig Gewebe für alle notwendigen Untersuchungen an „allergischen“ Schleimhäuten zur Verfügung stand.

Die Hypothesen, daß Ozon über eine Verringerung der ziliaren Aktivität und vermehrten Epithelzellschäden zu einer Verminderung in der Clearance und damit erhöhter Zugänglichkeit für Allergene führt, und damit irritative Vorgängen in der Submukosa mit einer Aktivierung von Entzündungszellen auslöst, konnte in unserem Modell ansatzweise nachgewiesen werden.

So wurde vorrangig bei Pollenallergikern „in season“ (Experimente innerhalb der entsprechenden Pollensaison) ein Unterschied in der Reaktion von ozonexponierten zu ozonexponierten + allergenstimulierten Proben beobachtet. Bei Pollenallergikern „out of season“ und bei Milbenallergikern war dieser Effekt wesentlich weniger stark ausgeprägt. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Darüber hinaus wurden gerade bei diesen Patienten vor allem bei den durch Ozon bzw. Ozon + Allergen ausgelösten Entzündungsreaktionen eine große individuelle Streubreite in den Ergebnissen festgestellt. Trotzdem scheint in diesem Zusammenhang eine bestehende Entzündungsreaktion der „allergischen“ Schleimhaut ein wesentliches Kriterium zu sein. Einen ähnlichen Zusammenhang konnten CALDERÓN et al. (1997) feststellen. Dabei setzten nasale Epithelzellen von Patienten mit allergischer Rhinitis, die während der Pollensaison biopsiert wurden, nach Ozonexposition signifikant mehr IL-8, GM-CSF, TNF- α und RANTES, als die nasalen Epithelzellen der gleichen Patienten, wenn sie aus außerhalb der Pollensaison biopsierten Gewebe stammten, frei.

Bei den Milbenallergikern und den Pollenallergikern „out of season“ führte eine Allergenstimulation mit 500 SBE nur eingeschränkt zu den erwarteten Anstiegen in der Histaminfreisetzung. Diese ließ sich allerdings bei Gräserallergikern durch eine Dosiserhöhung auf 1000 SBE deutlich steigern. Bei Geweben von Patienten mit saisonalen Allergenen zeigten sich außerdem abhängig vom OP-Datum Unterschiede in der Reagibilität. Was die Histaminfreisetzung nach Allergenstimulation betrifft, war Gewebe von Gräser- und Birkenpollenallergikern innerhalb ihrer Saison besser stimulierbar, reagierte dafür aber weniger auf eine Ozonexposition. Es wäre möglich, daß bei der Schleimhaut von Patienten „in season“ die Effekte der Allergen-induzierten Entzündungsantwort, gegenüber der Ozon-ausgelösten Entzündungsreaktion dominieren. Wichtig ist in diesem Zusammenhang sicher auch der unterschiedliche zeitliche Ablauf zwischen den durch das Allergen ausgelösten und den unspezifisch Ozon-ausgelösten irritativen Veränderungen im Gewebe. Insgesamt wurden bei der Auswertung der hier untersuchten Allergiker im Vergleich zu den Nichtallergikern keine bedeutenden Anstiege in der Histaminfreisetzung nach Ozonexposition beobachtet. In diesem Zusammenhang muß hinzugefügt werden, daß es nicht wie bei den früheren Studien und den unten genannten Ergebnissen möglich war, immer alle Patienten mit vorhergehender Medikation mit z.B. nasalen Steroiden und abschwellenden Nasentropfen auszuschließen. Patienten mit einer bis an die Operation reichenden Therapie mit Antihistaminika wurden ausgeschlossen. So konnte unter Nutzung des hier vorgestellten Modells nach Behandlung des Gewebes mit Fexofenadin (H_1 -Antagonist) im Kulturüberstand eine signifikant erniedrigte Freisetzung von Histamin, IL-1 β , IL-13 und ein verminderter Gehalt an IL-4, IL-5 und NKA beobachtet werden (SCHIERHORN et al. 1999 c). Aber bei der gerade in dieser

Patientengruppe vorherrschenden verstärkten anti-entzündlichen Medikation sind eventuelle Irritationen nicht völlig auszuschließen. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um DAVIES zu nennen, dabei konnte die Ozon-induzierte Freisetzung von verschiedenen Zytokinen aus humanen Epithelzellen ex vivo-in vitro durch eine Behandlung mit z.B. Nedocromil-Natrium, Fluticason, bzw. Beclometason blockiert werden (DAVIES et al. 1997).

Im Zusammenhang mit einer Ozonexposition erbrachten vor allem die Befunde mit allergenspezifischen bronchialen Provokationen an Asthmatikern bisher unterschiedliche Ergebnisse. Eine neuere in vitro-Studie an isolierten humanen passiv sensibilisierten Bronchien konnte nach Ozonexposition bei Stimulation mit Hausstaubmilbenallergen einen synergistischen Effekt auf die kontraktile Reaktion aufzeigen (ROUX et al. 1999). Allerdings wurde dabei das Gewebe mit einer hohen Ozonkonzentration (1 ppm, 20 Min.) exponiert. Welchen entscheidenden Einfluß die Ozonkonzentration im Gegensatz zur verwendeten Ozondosis (Konzentration x Zeit) im Zusammenhang mit bronchialen Allergenprovokationen hat, zeigte sich auch in einer neueren in vivo-Studie von JENKINS et al. (1999). Dabei war die Sensitivität gegenüber inhaliertem Allergen bei Patienten mit mildem Asthma bronchiale nur bei Exposition gegenüber 0,2 ppm Ozon für 3 Stunden signifikant erhöht, nicht jedoch bei Exposition der gleichen Patienten mit 0,1 ppm für 6 Stunden. Auch HANANIA et al. (1998) konnten bei Exposition von allergischen Asthmatikern mit 0,12 ppm Ozon für eine Stunde keinen Effekt auf die Reaktivität gegenüber inhaliertem Allergen feststellen. Was die oberen Atemwege betrifft kam es bei Exposition von allergischen Asthmatikern gegenüber 0,4 ppm Ozon zu keiner Verstärkung in der Reaktion (Freisetzung von Entzündungsmediatoren des Soforttyps) auf eine nasale Allergenapplikation. Allerdings wurde durch die Ozonexposition der eosinophile Influx nach Allergenexposition erhöht (MICHELSON et al. 1999).

Da die Risikogruppe von „Ozon-überempfindlichen“ Personen immer noch nicht eindeutig definiert ist, sollten auch andere Faktoren, wie das Rauchverhalten der Patienten, untersucht werden. Beim Vergleich der Ergebnisse ozonexponierter Proben von Rauchern mit Nichtrauchern konnten folgende Unterschiede festgestellt werden: Kulturen von Rauchern setzten signifikant weniger Histamin (gleiche Tendenz bei Bradykinin), aber signifikant mehr $\text{PGF}_{2\alpha}$ und $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ (gleiche Tendenz bei IL-4, IL-6 und IL-8) im Vergleich zu den Kulturen von Nichtrauchern frei (SCHIERHORN et al. 1999 b).

Es existieren eine Reihe von Arbeiten die sich mit den Veränderungen der Atemwegsreagibilität von Rauchern und Nichtrauchern nach Ozonexposition beschäftigen. KERR et al. (1975) und FRAMPTON et al. (1997) konnten zeigen, daß Raucher weniger Lungenfunktionsveränderungen nach Exposition gegenüber Ozon zeigten. In einer Untersuchung von HAZUCHA et al. (1973) konnte dies nicht bestätigt werden. Was die durch Ozon ausgelösten Entzündungsreaktionen bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern betrifft, ist nur sehr wenig bekannt. Erschwerend kommt in diesem Kontext hinzu, daß der Zusammenhang zwischen Lungenfunktionsveränderungen und der Entzündungsreaktion in den Atemwegen noch nicht vollständig etabliert ist.

In Untersuchungen von FRAMPTON et al. (1997) und BALMES et al. (1997) wurden nach Ozonexposition von Rauchern, Nichtrauchern und Asthmatikern keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinfreisetzung in den Atemwegslavagen festgestellt. TORRES et al. (1997)

studierten den Einfluß von Ozon auf gesunde Probanden, eingeteilt nach ihrer individuellen Atemwegsreagibilität gegenüber Ozon und ihrem Rauchverhalten. Die durch Ozon ausgelöste Entzündungsreaktion, wie die verstärkte Freisetzung von IL-6 und IL-8 direkt nach Exposition (0,22 ppm), sowie der Anstieg von PMNs, Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophilen in der bronchialen bzw. nasalen Lavage (BAL, NAL) 18 Stunden nach Exposition, war dabei in den drei untersuchten Gruppen (Nichtraucher-Nonresponder, Nichtraucher-Responder und Raucher) nicht signifikant unterschiedlich.

Die Komplexität dieses potentiellen Zusammenhangs dokumentieren zwei in vitro-Studien, in denen bei der Untersuchung von Makrophagen von Nichtrauchern bzw. Rauchern Unterschiede in der Reaktion auf Ozon festgestellt wurden. DEVLIN et al. (1994) exponierten Alveolar-Makrophagen, welche aus der BAL von gesunden Nichtrauchern isoliert und kultiviert worden waren, gegenüber 0,1 ppm Ozon für 30 bis 60 Minuten. Im Vergleich zu den luftexponierten Kontrollen konnten sie eine signifikant erniedrigte Lebensfähigkeit der Zellen um 50 %, aber keinen Effekt auf die Freisetzung von IL-6, IL-8 bzw. Fibronectin feststellen. ARSALANE et al. (1995) untersuchten den Effekt einer Ozonexposition gegenüber 0,1 bis 1 ppm (1 Std.) auf aus der BAL isolierten und kultivierten Makrophagen von Rauchern. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von DEVLIN et al. führte die Exposition bei allen untersuchten Konzentrationsstufen zu keiner Veränderung in der Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase, zu keiner Veränderung des Adenosin Triphosphat-Gehalts und damit zu keiner signifikanten Zellschädigung. Allerdings induzierte eine Exposition gegenüber 0,4 ppm Ozon eine signifikante Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α .

In ähnlicher Weise zeigte sich in unseren Untersuchungen im exponierten Gewebe von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern ein unterschiedliches Muster in der Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Ozon (verminderte Freisetzung von Histamin und Bradykinin, vermehrte Freisetzung von PGF_{2 α} , LTC₄/D₄/E₄, IL-4, IL-6 und IL-8). Dies beruht sicher vor allem auf der Tatsache, daß die durch Ozon ausgelösten Entzündungsreaktionen multi-zellulären Ursprungs sind. Auf der einen Seite scheinen Raucher, vor allem was die Lungenfunktion betrifft, relativ tolerant gegenüber Ozon zu sein. Eine mögliche Ursache könnte in der verminderten Empfindlichkeit und einer abweichenden Anzahl von immun-kompetenten Zellen gesehen werden. Einige in dieser Gruppe auftretenden patho-physiologischen Merkmale wie z.B. eine vermehrte Schleimproduktion könnten die Mukosa von Rauchern in einem gewissen Maße vor den reaktiven Produkten des Ozons schützen. Auf der anderen Seite sind bei Rauchern Unterschiede in der Anzahl und Aktivierung von Entzündungszellen festzustellen. Darum scheint es naheliegend, daß zusammen mit einer permanent vorherrschenden Entzündungsreaktion bei Rauchern, deren Sensitivität gegenüber Ozon erhöht ist. Insgesamt scheinen in diesem Zusammenhang individuelle Unterschiede bei der Sensitivität gegenüber Ozon von größerer Bedeutung zu sein.

Bei der Abwehr von oxidativem Streß wird dem Komplex der antioxidativen Enzyme eine besondere Bedeutung beigemessen. Allerdings fehlen Untersuchungen an humanen Geweben bei umweltrelevanten Konzentrationen. Die bisher erhobenen Befunde einer Induktion von Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase, Katalase sowie Glutathion wurden in Tierversuchen, meist im Lungengewebe oder der Lungenspülflüssigkeit von Ratten nach Exposition gegenüber 0,8 ppm über 5 Tage (RAHMAN et al. 1991, BOEHME et

al. 1992), erhoben. In unserem Modell konnten nach Ozonexposition keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-S-Transferase, Glutathion-Peroxidase (GPO), Glutathion-Reduktase und Katalase beobachtet werden. Allerdings konnte für die SOD und die GPX eine Erhöhung festgestellt werden. Eine Erklärung wären die vergleichsweise niedrige Konzentration und kürzere Expositionszeit. Auch bestehen eindeutig speciesspezifische und organspezifische Unterschiede in der Enzymausstattung (BRYAN & JENKINSON 1987). Nicht unerheblich wäre die Tatsache, daß bei einer Ozonexposition gegenüber 0,1 ppm bestimmte unspezifische Entzündungsreaktionen ausgelöst werden, jedoch die Schutzmechanismen gegen den oxidativen Streß nicht vollständig initiiert werden.

In letzter Zeit rücken Neuropeptide wie Substance P (SP) und Neurokinin A (NKA) immer mehr als wichtige Faktoren bei der (allergischen) Entzündungsreaktion ins Blickfeld.

Eine Reihe von Studien zur Wirkung von pharmazeutischen Wirkstoffen im Zusammenhang mit den Atemwegsreaktionen nach Ozonexposition unterstützten das Konzept, daß die durch Ozon ausgelösten Effekte in der Lungenfunktion wenigstens zum Teil durch neurale Mechanismen vermittelt sind (BECKETT et al. 1985, FOLINSBEE 1993, PASSANNANTE et al. 1995). Es wird außerdem vermutet, daß Neuropeptide bei den durch Ozon ausgelösten Effekten beteiligt sind. HAZBUN et al. (1993) berichten von einem Anstieg von SP und 8-epi-PGF_{2α} (Marker für oxidativen Streß) in der BAL nach einer Stunde Exposition gegenüber 0,25 ppm Ozon. KRISHNA et al. (1997 a) konnten nach Ozonexposition (0,2 ppm, 2 h) von gesunden Probanden unter periodischer körperlicher Aktivität in den bronchialen Biopsien (gewonnen 6 Stunden nach Exposition) zwar Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-haltige, aber nicht SP-haltige submukosale Neuronen (sensorische Nerven) darstellen, während in den Kontrollproben (Luftexposition) sowohl CGRP als auch SP-haltige Neuronen vorhanden waren. Diese Tatsache deuteten die Autoren als Folge einer möglicherweise stattfindenden SP-Freisetzung unter Ozonexposition. Um den Zusammenhang zwischen Ozon und Neuropeptiden näher zu untersuchen, wurde SP und NKA in den Kulturüberständen bestimmt und SP-haltige Nervenfasern in den Gewebeproben immunhistologisch dargestellt. Die von uns nachgewiesene signifikant erhöhte Freisetzung von NKA und SP im Kulturüberstand nach Ozonexposition verdeutlichen die Notwendigkeit einer weiteren Untersuchung dieser potentiellen Interaktion. Die Freisetzung von NKA wurde dabei erstmalig im Zusammenhang mit einer Ozonexposition untersucht.

In einigen exemplarisch durchgeführten Untersuchungen zwischen den mit 0,1 ppm Ozon exponierten Gewebeproben und den luftexponierten Kontrollkulturen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gesamt-Innervation und dem prozentualen Anteil SP-haltiger Nervenfasern an der Gesamtheit aller Nervenfasern festgestellt werden. Allerdings konnte eindeutig gezeigt werden, daß nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sowohl in den Kontrollproben als auch in den Ozonkulturen immer noch SP-haltige Nervenfasern immunhistologisch vorhanden waren.

In letzter Zeit werden im Zusammenhang mit einer Ozonexposition häufig Veränderungen in der Freisetzung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM diskutiert. Es existieren sowohl in vitro als auch in vivo-Befunde, die von einer vermehrten Freisetzung von sICAM in Kulturüberständen bzw. der ICAM-Expression im Gewebe nach Ozonexposition berichten

(TAKAHASHI et al. 1995, BECK et al. 1994, RUSZNAK et al. 1996, BALMES et al. 1997). Allerdings liegen, vor allem was in vivo-Kurzzeitexpositionen gegenüber relativ geringen Ozonkonzentrationen betrifft, auch gegenteilige Befunde vor (KRISHNA et al. 1997 b, 1998). Die vorhandenen Studien beziehen sich fast ausschließlich auf die unteren Atemwege und die Trachea. Die in der hier vorliegenden Studie für menschliche Nasenschleimhaut nachgewiesene signifikant erhöhte Freisetzung von sICAM und eine vermehrte Expression von ICAM und E-Selektin im Gewebe nach Ozonexposition unterstützt die Hypothese, daß bei den durch Ozon ausgelösten entzündlichen Veränderungen Adhäsionsmoleküle, wie auch allgemein bei der allergischen Entzündungsreaktion, wichtige Bindeglieder im Entzündungsablauf darstellen.

Bei der Bestimmung von NKA und SP wurde bei den Atopikern eine erhöhte Reagibilität gegenüber Ozon beobachtet, allerdings waren diese Befunde statistisch nicht signifikant. Was die Freisetzung von NKA, SP und sICAM in Gewebeproben von Atopikern (vor allem bei ozonexponierten Proben) betrifft, war eine große individuelle Streubreite in den Ergebnissen festzustellen. Die höchsten Werte bzw. Steigerungen wurden dabei in der Atopikergruppe vorrangig bei Patienten mit allergischer Klinik, und dabei erstrangig bei Patienten „in season“ beobachtet, was mit den Ergebnissen zur Histaminfreisetzung übereinstimmt.

Die Ergebnisse legen nahe, daß Ozon zur Auslösung einer Entzündungsreaktion in vitro führt und daß bei allergischer Disposition mit bestehender Entzündung der Schleimhaut die Empfindlichkeit gegenüber Ozon erhöht ist. Zusammenfassend läßt sich einschätzen, daß bei den insgesamt zu beobachtenden Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber Ozon außerdem verschiedene, individuelle Faktoren von Bedeutung sind.

5. Literaturverzeichnis

- ARIS, R.M., D. CHRISTIAN, P.Q. HEARNE, K. KERR, W.E. FINKBEINER, J.R.
BALMES (1993): Ozone induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 1363-1372.
- ARSALANE, K., P. GOSSET, D. VANHEE, C. VOISIN, Q. HAMID, A.B. TONNEL, B. WALLAERT (1995): Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13, 60-68.
- BALMES, J.R., R.M. ARIS, L.L. CHEN, C. SCANNELL, I.B. TAGER, W. FINKBEINER, D. CHRISTIAN, T. KELLY, P.Q. HEARNE, R. FERRANDO, B. WELCH (1997) Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part I: Airway inflammation and responsiveness to ozone in normal and asthmatic subjects. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 78, 1-37, discussion 81-99.
- BECK, N.B., J.Q. KOENIG, D.L. LUCHTEL (1994): Ozone can increase the expression of intercellular adhesion molecule-1 and the synthesis of cytokines by human nasal epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 6, 345-357.
- BECKETT, W.S., W.F. McDONNELL, D.H. HORSTMAN, D.E. HOUSE (1985): Role of the parasympathetic nervous system in acute lung response to ozone. *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise. Physiol.* 59, 1879-1885.

- BEERS, R.F. JR., I.W. SIZER (1952) *J. Biol. Chem.* 195, 133-140.
- BOEHME, D.S., J.A. HOTCHKISS, R.F. HENDERSON (1992): Glutathione and GSH-dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone. *Exp. Mol. Pathol.* 56, 37-48.
- BRYAN, C.L., S.G. JENKINSON (1987): Species variation in lung antioxidant enzyme activities. *J. Appl. Physiol.* 63, 597-602.
- CALDERÓN, M.A., J.L. DEVALIA, A.J. PRIOR, R.J. SAPSFORD, R.J. DAVIES (1997): A comparison of cytokine profiles generated by epithelial cells cultured from nasal biopsies of atopic rhinitic atopic non-rhinitic and non-atopic non-rhinitic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 65-76.
- CORDELL, J., B. FALINI, O.N. ERBER, A.K. GOSH, Z. ABDULAZIZ, S. MACDONALD, K. POLFORD, H. STEIN, D.Y. MASON (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 32, 219-227.
- DAVIES, R.J., C. RUSZNAK, M.A. CALDERON, J.H. WANG, M.M. ABDELAZIZ, J.L. DEVALIA (1997): Allergen-irritant interaction and the role of corticosteroids. *Allergy* 52, 59-65.
- DEVALIA, J.L., H. BAYRAM, C. RUSZNAK, M. CALDERON, R.J. SAPSFORD, M.A. ABDELAZIZ, J. WANG, R.J. DAVIES (1997): Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy* 52(38 Suppl.), 45-51, discussion 57-58.
- DEVALIA, J.L., J.H. WANG, C. RUSZNAK, M. CALDERÓN, R.J. DAVIS (1994): Does air pollution enhance the human airway response to allergen ? *ACI News* 6, 80-84.
- DEVLIN, R.B., W.F. McDONNELL, R. MANN, S. BECKER, D.E. HOUSE, D. SCHREINEMACHERS, H.S. KOREN (1991): Exposure of humans to ambient ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 4, 72-81.
- DEVLIN, R.B., K.R. McKINNON, T. NOAH, S. BECKER, H.S. KOREN (1994): Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 266, L612-L619.
- FOLINSBEE L.J. (1993): Human health effects of air pollution. *Environ. Health Perspect.* 100, 45-56.
- FRAMPTON, M.W., P.E. MORROW, A. TORRES, C. COX, K.Z. VOTER, M.J. UTELL (1997): Ozone responsiveness in smokers and nonsmokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 116-121.
- HABIG, W.H., M.J. PABST, W.B. JAKOBY (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- HANANIA, N.A., S.M. TARLO, F. SILVERMAN, B. URCH, N. SENATHIRAJAH, N. ZAMEL, P. COREY (1998): Effect of exposure to low levels of ozone on the response to inhaled allergen in allergic asthmatic patients. *Chest* 114, 752-756.
- HAZBUN, M.E., R. HAMILTON, A. HOLIAN, W.L. ESCHENBACHER (1993): Ozone induced increases in substance P and 8-epi-prostaglandin F2 α in the airways of human subjects. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 9, 568-572.

- HAZUCHA, M., F. SILVERMAN, C. PARENT, S. FIELD, D.V. BATES (1973): Pulmonary function in man after short-term exposure to ozone. *Arch. Environ. Health* 27, 183-188.
- JENKINS, H.S., J.L. DEVALIA, R.L. MISTER, A.M. BEVAN, C. RUSZNAK, R.J. DAVIES (1999): The effect of exposure to ozone and nitrogen dioxide on the airway response of atopic asthmatics to inhaled allergen: dose- and time-dependent effects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 33-39.
- JÖRRES, R., D. NOWAK, H. MAGNUSSEN (1996): The effects of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 56-64.
- KERR, H.D., T.J. KULLE, M.L. McLLHANY, P. SWIDERSKY (1975): Effects of ozone on pulmonary function in normal subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111, 763-773.
- KOREN, H.S., P.A. BROMBERG (1995): Is ozone a risk factor in „environmental asthma“? *Allergo J.* 4, 215-218.
- KOREN, H.S., R.B. DEVLIN, D.E. GRAHAM, R. MANN, M.P. McGEE, D.E. HORSTMAN, W.J. KOZUMBO, S. BECKER, D.E. HOUSE, W.F. McDONNELL, P.A. BROMBERG (1989): Ozone induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139, 407-415.
- KRISHNA, M.T., A. BLOMBERG, G.L. BISCIONE, F. KELLY, T. SANDSTROM, A. FREW, S. HOLGATE (1997 b): Short-term ozone exposure upregulates P-selectin in normal human airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1798-1803.
- KRISHNA, M.T., J. MADDEN, L.M. TERAN, G.L. BISCIONE, L.C. LAU, N.J. WITHERS, T. SANDSTROM, I. MUDWAY, F.J. KELLY, A. WALLS, A.J. FREW, S.T. HOLGATE (1998): Effects of 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid and bronchial mucosa of healthy subjects. *Eur. Respir. J.* 11, 1294-1300.
- KRISHNA, M.T., I. MUDWAY, F.J. KELLY, A.J. FREW, S.T. HOLGATE (1995): Ozone, airways and allergic airway disease. *Clin. Exp. Allergy* 25, 1150-1158.
- KRISHNA, M.T., D. SPRINGALL, Q.H. MENG, N. WITHERS, D. MACLEOD, G. BISCIONE, A. FREW, J. POLAK, S. HOLGATE (1997 a): Effects of ozone on epithelium and sensory nerves in the bronchial mucosa of healthy humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 943-950.
- MAVIS, R.D., E. STELLWAGEN (1968): Purification and subunit structure of glutathione reductase from bakers' yeast. *J. Biol. Chem.* 243, 809-814.
- MICHELSON, P.H., L. DAILEY, R.B. DEVLIN, D.B. PEDEN (1999): Ozone effects on the immediate-phase response to allergen in the nasal airways of allergic asthmatic subjects. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 120, 225-232.
- MOLFINO, N.A., S.C. WRIGHT, I. KATZ, S. TARLO, F. SILVERMAN, P.A. McCLEAN, J. SZALAI, M. RAIZENNE, A.S. SLUTSKY, N. ZAMEL (1991): Effect of low concentrations of inhaled allergen responses in asthmatic patients. *Lancet* 338, 199-203.
- PASSANNANTE, A., M.J. HAZUCHA, P.A. BROMBERG, E. SEAL, L. FOLINSBEE, G. KOCH (1995): Nociceptive mechanisms modulate ozone-induced human lung function decrements. *J. Appl. Physiol.* 1998 85, 1863-1870.
- PEDEN D.B. (1997): Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. *Allergy* 52, 37-44.

- PEDEN, D.B., R.W. SETZER JR., R.B. DEVLIN (1995): Ozone exposure has both a priming effect on allergen-induced responses and an intrinsic inflammatory action in the airways of perennially-allergic asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1336-1345.
- PIERSON, W.E., J.Q. KOENIG (1992): Respiratory effects of air pollution on allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 557-566.
- PROUD, D., A. TOGIAS, R. M. NACLERIO, S. A. CRUSH, P. S. NORMAN, L. M. LICHTENSTEIN (1983): Kinins are generated in vivo following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *J. Clin. Invest.* 72, 1678-1685.
- RAHMAN, L.U., L.B. CLERCH, D. MASSARO (1991): Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am. J. Physiol.* 260, L412-L418.
- ROUX, E., J.M. HYVELIN, J.P. SAVINEAU, R. MARTHAN (1999): Human isolated airway contraction: interaction between air pollutants and passive sensitization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 439-444.
- RUSZNAK, C., J.L. DEVALIA, R.J. SAPSFORD, R.J. DAVIES (1996): Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium. *Eur. Respir. J.* 9, 2298-2305.
- SCHIERHORN, K., T. BRUNNÉE, R. PAUS, K.-D. SCHULTZ, J. NIEHUS, P. AGHAMIR-SALIM, G. KUNKEL (1995): Gelatin sponge-supported histoculture of human nasal mucosa. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31, 215-220.
- SCHIERHORN, K., M. ZHANG, M. KACY, G. KUNKEL (1997): Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113, 312-315.
- SCHIERHORN, K., M. ZHANG, C. MATTHIAS, G. KUNKEL (1999 a): Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa system. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20, 1013-1019.
- SCHIERHORN, K., M. ZHANG, C. MATTHIAS, G. KUNKEL (1999 b): Ozone-induced release of histamine in human nasal mucosa of smokers and nonsmokers in organ culture. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118, 333-334.
- SCHIERHORN, K., B. WOBST, G. KUNKEL (1999 c): Influence of fexofenadine on inflammatory mediator release in a human nasal mucosa organ culture system. *Allergy*, 54: 57.
- SIRAGANIAN R. (1974): An automated continuous flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal. Biochem.* 57, 283-294.
- TAKAHASHI, N., X.Y. YU, B.H. SCHOFIELD, S.R. KLEEBERGER, A.L. SCOTT, S. HASEGAWA, E.W. SPANNHAKE (1995) Expression of ICAM-1 in airway epithelium after acute ozone exposure in the mouse. *J. Appl. Physiol.* 79, 1753-1761.
- TORRES, A., M.J. UTELL, P.E. MOROW, K.Z. VOTER, J.C. WHITIN, C. COX, R.J. LOONEY, D.M. SPEERS, Y. TSAI, M.W. FRAMPTON (1997): Airway inflammation in smokers and Nonsmokers with varying responsiveness to ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 728-736.
- WENDEL A. (1980): *Enzymatic Basis of Detoxication.* - Vol. 1, 333 S. Academic Press, New York