

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Wirkung experimentell hergestellter Stäube auf das
Zell- und Zytokinmuster der humanen Nasenschleimhaut**

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

Förderkennzeichen: PUGL 98002

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

Mai 2001

Wirkung experimentell hergestellter Stäube auf das Zell- und Zytokinmuster der humanen Nasenschleimhaut

H. Riechelmann, T. Deutsche

Universitäts-HNO-Klinik, 89075 Ulm

Zusammenfassung

Die Kenntnisse über Wirkungen partikelförmiger Luftverunreinigungen auf die Schleimhäute der oberen Atemwege sind lückenhaft. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens befassten wir uns mit der Frage, inwieweit Stäube ohne toxische Inhaltsstoffe, sog. Inertstäube, bereits entzündliche Veränderungen der Nasenschleimhaut auslösen können.

Dazu wurden 32 freiwillige Probanden in vier Sitzungen einer jeweils dreistündigen nasalen Exposition mit Kalziumkarbonat-Staub (mittlere Partikelgröße 15 μm) unterzogen. Die applizierten Staubkonzentrationen betragen 0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Kontrollmessung), 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Direkt nach und acht Stunden nach den Expositionen wurden den Probanden nasale Zytologien entnommen und sowohl konventionell nach May-Grünwald-Giemsa, als auch immunzytochemisch gegen CD45, Myeloperoxidase, CD68 und Tryptase gefärbt. Das gleichzeitig gewonnene respiratorische Sekret wurde mittels ELISA auf die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , ENA-78 und das Neuropeptid Substance P untersucht. Die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß Kalziumkarbonat-Staub-Exposition in Konzentrationen von 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ eine diskrete nasale Entzündungsreaktion induziert.

Die Kenntnis der Wirkungen von Inertstäuben auf die humane Nasenschleimhaut ist Voraussetzung dafür, die Effekte umweltrelevanter Stäube mit teilweise giftigen Staubinhaltsstoffen adäquat zu interpretieren.

Short term exposure to inert dust alters cytology and cytokine release in human nasal mucosa

H. Riechelmann, T. Deutsche

Summary

Recent epidemiological investigations have confirmed the impact of particulate matter on human respiratory health. The pathophysiological alterations induced in human respiratory mucosa following exposure to various aerosols are incompletely understood.

In this project we investigated the effects of toxicologically inert dust on human nasal mucosa in a human short term exposure setting. Thirtytwo healthy volunteers were exposed to calcium-carbonate dust (mean mass aerodynamic 15 μm) in concentrations of 150, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for 3 hours. Exposure to filtered air served as control. Directly and 8 hours following exposure, nasal cytologies and nasal secretions were obtained. Cytologies were stained with anti- CD45, myeloperoxidase, -CD68 and -tryptase. In the epithelial lining fluid IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , ENA-78 and substance P were measured using an ELISA technique.

The results suggests that toxicologically inert particulate matter may cause a faint proinflammatory reaction of human nasal mucosa likely due to mechanical and sensible irritation. However this effect is weak and can not explain the profound effects of environmental particulate matter on human respiratory health. It is assumed that the toxicity of various compounds of environmental particulate matter are primarily relevant. The results of this study may provide reliable information to distinguish the effects of toxic components in environmental particulate matter from mechanical and sensible irritation.

1. Einleitung

Umweltstäube sind komplexe partikelförmige Luftverunreinigungen, die bei Verbrennungsprozessen, infolge Aufwirbelungen vom Boden, durch Kondensation gasförmiger Luftbestandteile oder bei mechanischem Abrieb unterschiedlicher Materialien entstehen. Die Charakterisierung von Umweltstäuben erfolgt anhand der toxikologischen Eigenschaften der Staubinhaltsstoffe, der Staubkonzentration sowie der Partikelgröße. Von der Partikelgröße hängt ab, in welchem Atemwegskompartiment der Staub vorwiegend abgeschieden wird. Man unterscheidet Grobstaub (mittlerer massenaerodynamischer Durchmesser $> 50 \mu\text{m}$), Mittelstaub (10 bis $50 \mu\text{m}$), Feinstaub (0,5 bis $10 \mu\text{m}$) und Feinstaub ($< 0,5 \mu\text{m}$). Für die Nase vorrangig relevant sind Partikel mit einem massenaerodynamischen Durchmesser zwischen 10 und $50 \mu\text{m}$. Zahlreiche epidemiologische Befunde zeigen einen Zusammenhang zwischen der Schwebstaubkonzentration in der Außenluft und umweltbedingten Atemwegserkrankungen [ABBEY et al., 1995; POPE et al., 1995; v. MUTIUS et al., 1995]. Expositionsversuche freiwilliger Probanden mit Kohlepartikeln zeigten eine erhöhte bronchiale Reagibilität bei Asthmatikern [ANDERSON et al., 1992] und nach Exposition mit Dieselruß eine gesteigerte nasale IgE-Produktion [DIAZ-SANCHEZ et al., 1994]. In tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach nasaler Exposition mit partikelförmigen Luftverunreinigungen sowohl eine nasale Becherzellhyperplasie als auch eine Schädigung des mukoziliären Transports beschrieben [LEMOIS et al., 1994].

Es bestehen zahlreiche Unklarheiten über die Mechanismen, wie Umweltstäube Schädigungen der menschlichen Nasenschleimhaut hervorrufen. Welche Staubbestandteile für Schädigungen verantwortlich sind, konnte experimentell nur für einzelne Substanzen gezeigt werden. Zudem liegen kaum gesicherte Kenntnisse über die Wirkung von Stäuben ohne toxische Inhaltsstoffe auf die Schleimhäute des oberen Atemtrakts vor. Solche Stäube könnten allein durch mechanische Irritation oder durch Veränderungen der Fluidität des Nasensekrets entzündliche Vorgänge in der Nasenschleimhaut auslösen. Die Kenntnis der Wirkung toxikologisch unbedenklicher Stäube auf die Nasenschleimhaut soll als Grundlage für die Interpretation nasaler Veränderungen durch originäre, schadstoffhaltige Umweltstäube beim Menschen dienen.

In der hier vorgestellten Untersuchung soll die Wirkung von chemisch inerten Stäuben (Kalziumkarbonat-Staub, Partikelgröße $15 \mu\text{m}$) auf die menschliche Nasenschleimhaut an 32 Probanden *in vivo* untersucht werden. Als Marker für mögliche inflammatorische Effekte in der Nasenschleimhaut nach jeder nasalen Staubexposition diene a) das Zytokinsekretionsmuster im Nasensekret und b) die Zellverteilung in den nasalen Zytologien.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsdesign

Jeder Proband wurde drei mal für je drei Stunden nasal Kalziumkarbonat-Staub 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) diene als Kontrollmessung. Dreißig Minuten, acht Stunden und 24 Stunden nach jeder Exposition wurde den Probanden mittels Samplern Sekret und Zytologien aus der Nase entnommen.

Zwischen den einzelnen Expositionen wurde ein Zeitintervall von mindestens einer Woche eingehalten, so dass mögliche carry-over-Effekte ausgeschlossen werden konnten. Die Versuche erfolgten einfach verschleiert, d. h. der Proband wußte nicht, welche Staubkonzentration gerade verwendet wurde. Für die Reihenfolge der Expositionen wurde ein vollständig permutiertes Latin-square-Design gewählt [SPRIET & SIMON, 1985].

2.2 Probanden

Das untersuchte Kollektiv umfaßte 32 freiwillige Probanden (19 männlich, 13 weiblich, Alter: 20-30 Jahre), zu denen jeweils ein umfangreicher Katalog mit expositionsrelevanten Informationen, wie Dokumentationsbögen, allgemeinen Informationen, Angaben zu Symptomscores und Ein- und Ausschlußkriterien vorliegt.

2.3 Herstellung und Inhalation definierter Aerosole

Die Herstellung von definierten Aerosolen (Kalziumkarbonat; Eskal 15 der Fa. KSL Staubtechnik, Lauingen) erfolgt durch einen Aerosolgenerator. Dieser besteht aus einem Staubdispersierger (Vibrierteller-Dispersionseinheit P2; Fa. KSL Staubtechnik, Lauingen), der eine definierte Menge des applizierten Staubs kontinuierlich in einen gefilterten Grundgasstrom (gefilterte Raumluft) einbringt. Das fertig aufbereitete Aerosol wird über eine konventionelle Nasenmaske den Probanden zugeführt (Nasenatmung). Die aktuelle Partikelkonzentration wird kontinuierlich direkt an der Atemmaske mit einem Laserpartikelzähler (Microair 5230, HIAC/ROYCO, Leonberg) erfaßt.

2.4 Nasensekret

2.4.1 Entnahme und Gewinnung

Den Probanden wurde in jedes Nasenloch ein Sampler (standardisiertes Schaumstoffstück von 28×18×6 mm) hinter das Limen nasi eingeführt und dort für zehn Minuten belassen. Dann wurde das Nasensekret aus den Samplern mittels Zentrifugation (5 min, 1.200 rpm, 4°C) in einem Zentrifugengefäß herausgelöst, aliquotiert und eingefroren (-20°C).

2.4.2 Untersuchung auf Zytokine

Die Nasensekret-Proben wurden auf die Zytokine Interleukin-1 β , IL-6, IL-8, Tumor-Nekrose-Factor- α (TNF- α), Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1 (MCP-1), Epitheliales-Neutrophilen-Aktivierendes-Peptid-78 (ENA-78), Makrophagen-Inflammatorisches-Protein-1 α (MIP-1 α), sowie auf das Neuropeptid Substance P untersucht. Dazu wurde eine kolorimetrische Sandwich-Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay-Technik (Quantikine®-ELISA, R&D-Systems, Wiesbaden) verwendet. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5 Nasale Zytologien

2.5.1 Gewinnung

Die Zellen wurden mit 5 ml RPMI-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe), komplementiert mit 1% HEPES, 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung, 1% L-Glutamin (Sigma, Deisenhofen) über einem Zellsieb von den Samplern abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 1.200 rpm, 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, 1.200 rpm, 4°C; Zyto-System, Heraeus, Hanau). Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Zellen konventionell gefärbt oder für spätere immunzytochemische Färbungen in Aceton fixiert und tiefgefroren (-80°C).

2.5.2 Konventionelle Färbung nach May-Grünwald-Giemsa

Die Färbung der nasalen Zytologien erfolgte gemäß dem 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.

Riechelmann

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: neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten sowie alle restlichen kernhaltigen Zellen.

2.5.3 Immunzytochemische Färbung

Nach Fixierung der Zellen in Aceton wurden die Zellen mit Schweinenormalserum (Dako, Hamburg) vorinkubiert (1:10, 30 min, RT). Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper (1:50 in TBS / 1% BSA) zugegeben, und es folgte die Inkubation (ü.N., 4°C). Als Primärantikörper wurden Maus-anti-Human-Myeloperoxidase (MPO), -CD 45, -CD 68 und -Tryptase (alle Dako, Hamburg) eingesetzt. 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 leuchten rot. Es wurden jeweils 300 Zellen ausgezählt und dann der Anteil positiver Zellen in bezug auf die Gesamtzellzahl ermittelt.

3. Ergebnisse

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 durchschnittlich mittels Trypanblaufärbung erhaltene Lebendzellzahl war $6,0 \cdot 10^4$ (Spanne $2,0 \cdot 10^2$ bis $8,3 \cdot 10^5$).

3.1 Zytokinsekretionsmuster im Nasensekret nach Exposition

Weil nicht immer genug Nasensekret zur Verfügung stand, wurde nicht bei allen Probanden jeder Zytokin-ELISA durchgeführt. Deshalb liegen die Fallzahlen teilweise unter 32, jedoch nie unter 16.

Die IL-6-Konzentrationen (Abb. 1A) lagen im Nasensekret 30 Minuten und acht Stunden nach der Kontroll-Exposition mit gefilterter Luft bei 109 pg/ml bzw. 113 pg/ml. Acht Stunden nach Exposition mit $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zeigte sich ein Anstieg von IL-6 auf 153 pg/ml. Die höchste IL-6-Konzentration im Nasensekret wurde 30 Minuten nach Exposition mit $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Staub gemessen (212 pg/ml).

Die IL-8- und ENA-78-Konzentrationen (Abb. 1B und 1E) bewegten sich im Nanogramm-Bereich. Die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen lagen bei IL-8 zwischen 7,4 ng/ml (8 h, $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und 12,4 ng/ml (30 min, Kontrolle) und bei ENA-78 zwischen 27,7 ng/ml (8 h, $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und 33,1 ng/ml (30 min, $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Es wurde keine Erhöhung der IL-8- und ENA-78-Spiegel im Nasensekret nach Applikation der unterschiedlichen Staubkonzentrationen festgestellt.

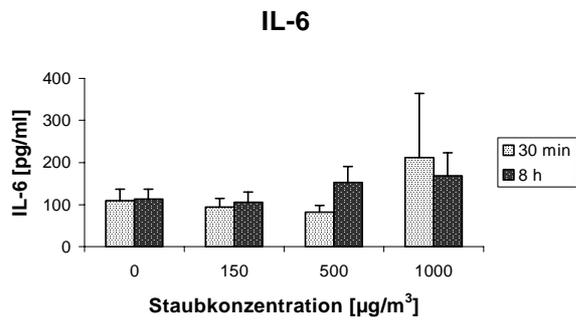
Gleiches gilt für die ermittelten TNF- α -Konzentrationen (Abb. 1C). Es wurde keine Erhöhung der TNF- α -Spiegel beobachtet. Verglichen mit IL-6 und IL-8 kommt TNF- α im Nasensekret in geringeren Konzentrationen vor. Die gemittelten Werte bewegten sich zwischen 5,2 pg/ml (30 min, Kontrolle) und 8,2 pg/ml (8 h, $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Die ermittelten MCP-1-Konzentrationen (Abb. 1D) schwankten zwischen 412 pg/ml (30 min, $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und 605 pg/ml (8 h, Kontrolle). Auch hier wurde keine Veränderung beobachtet.

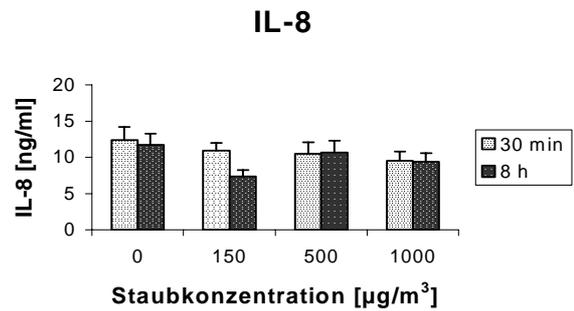
Das Neuropeptid Substance P (Abb. 1F) konnte im Nasensekret in Konzentrationen von 105,2 pg/ml (30 min, Kontrolle) und 129,3 pg/ml (8 h, $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) nachgewiesen werden, wobei keine Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der applizierten Staubmenge beobachtet werden konnte.

Nicht grafisch dargestellt sind die Werte für IL-1 β . Die Durchführung des IL-1 β -ELISA erforderte große Mengen des entsprechenden Probenmaterials, weshalb die Fallzahlen für dieses Zytokin unter zwölf lagen. Eine Veränderung der Konzentrationen, diese bewegten sich zwischen 52 pg/ml und 93 pg/ml, konnte nicht beobachtet werden.

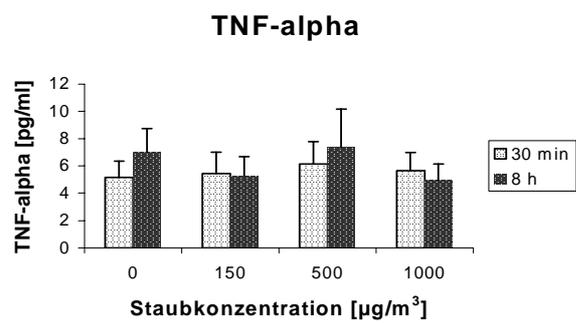
A



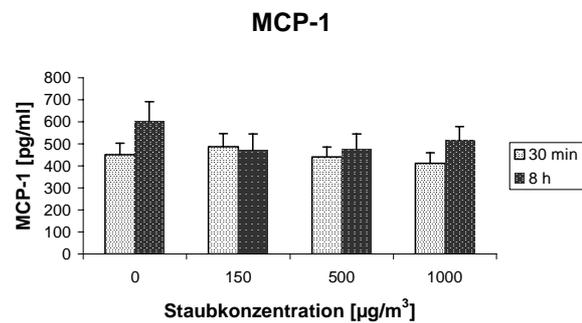
B



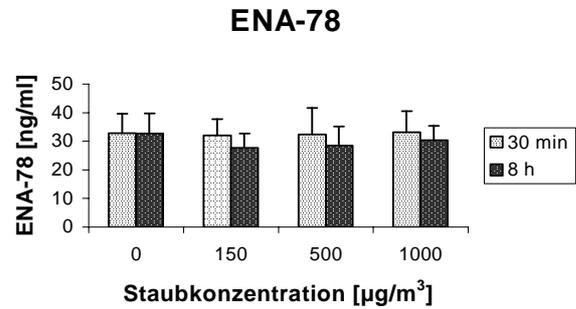
C



D



E



F

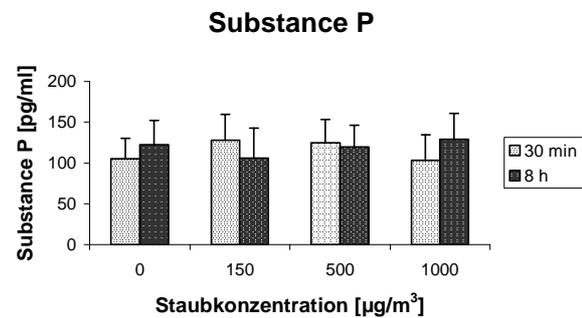


Abb. 1: Gemittelte Konzentrationen der Zytokine IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- α (C), MCP-1 (D), ENA-78 (E) und Substance P (F) im Nasensekret 30 min und 8 h nach dreistündiger nasaler Exposition der Probanden mit inertem Kalziumkarbonat-Staub ($n \geq 16$; für IL6 und IL-8 $n \geq 27$; SEM).

3.2 Zellverteilungsmuster nach nasaler Inertstaub-Exposition

Die gleichzeitig nach jeder Inertstaub-Exposition mit dem Nasensekret entnommenen nasalen Zytologien wurden auf Objektträger fixiert und anschließend sowohl konventionell als auch immunzytochemisch gefärbt.

3.2.1 Differenzierung der Zellen nach May-Grünwald-Giemsa

In Abbildung 2 ist das Verteilungsmuster der differenzierten Zellpopulationen nach konventioneller Färbung dargestellt. Dabei wurden die einzeln erfassten Zelltypen (neutrophile Granulozyten und Lymphozyten) in Prozent bezogen auf die insgesamt ermittelte Zellzahl angegeben.

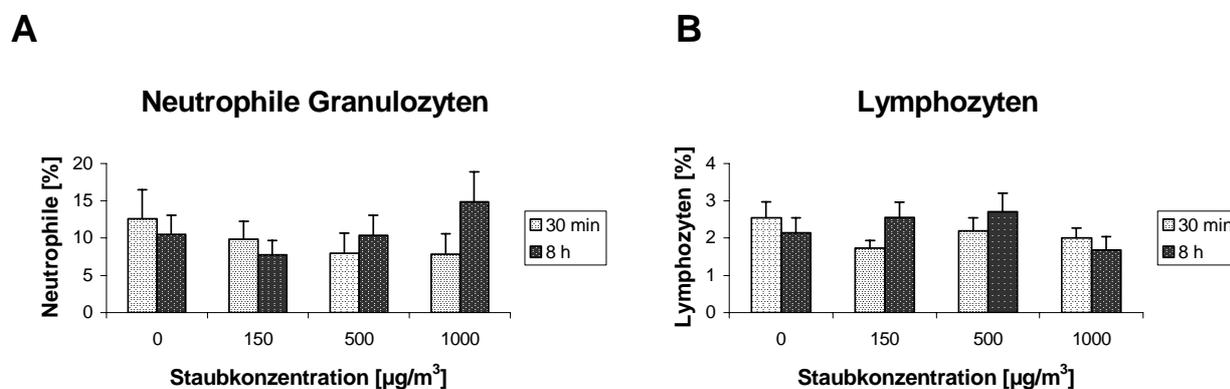


Abb. 2: Prozentuale Verteilung neutrophiler Granulozyten (A) und von Lymphozyten (B) bezogen auf die Gesamtzellzahl (500 Zellen) in nasalen Zytologien. Die Zellentnahme erfolgte 30 min und 8 h nach dreistündiger Exposition der Probanden mit Kalziumkarbonat-Staub (May-Grünwald-Giemsa; $n \geq 28$; SEM).

Acht Stunden nach der Applikation von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Kalziumkarbonat-Staub ist ein Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten in den nasalen Zytologien auf bis 14,9% (Maximum) bezogen auf die Gesamtzellzahl zu beobachten. Die Lymphozyten-Fraktion hat einen gemittelten Anteil von 1,5% bis 3,7% im nasalen Zellbild (Abb. 2B) und ändert sich mit steigender Staubkonzentration nicht.

3.2.2 Immunzytochemische Differenzierung der Zellen

Die Verteilung der immunzytochemisch gefärbten Zellen geht aus Abbildung 3 hervor.

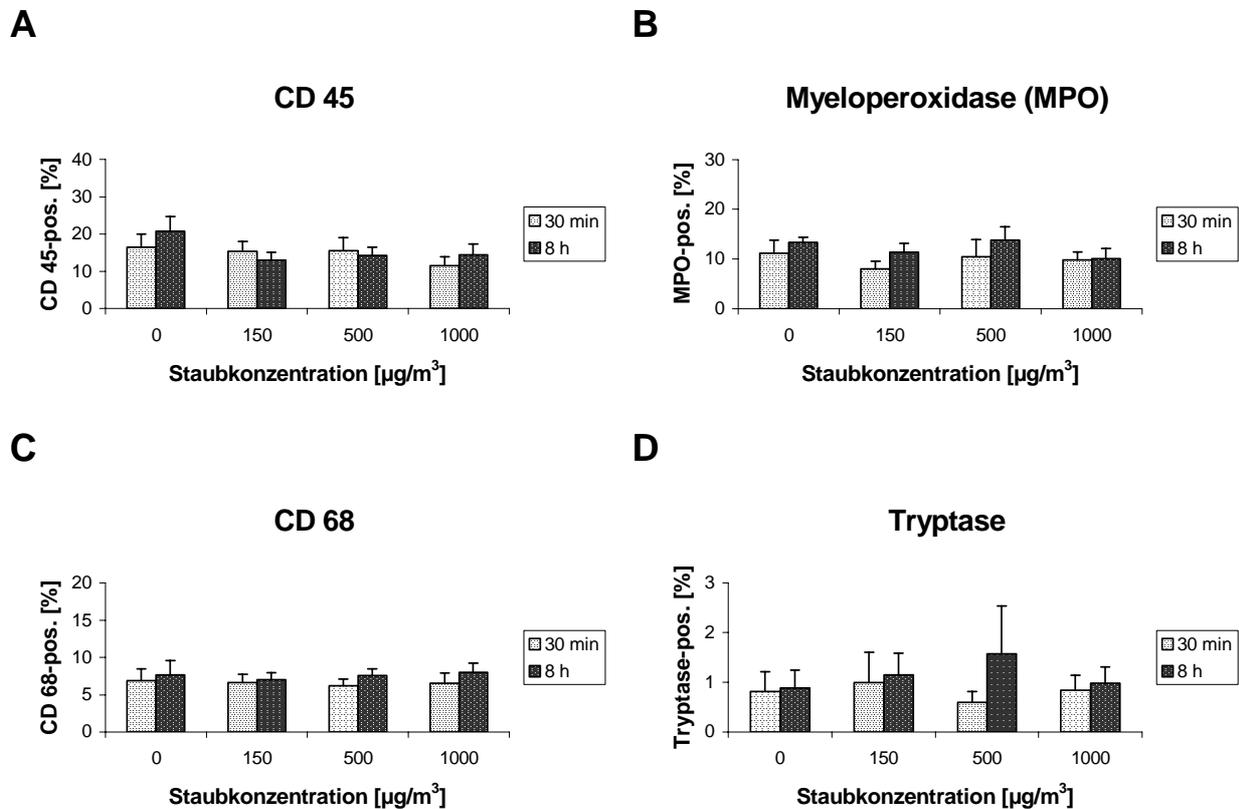


Abb. 3: Prozentuale Verteilung CD 45-positiver (A), MPO-positiver (B), CD 68-positiver (C) und Tryptase-positiver (D) Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl (300 Zellen). Die Entnahme der nasalen Zytologien erfolgte 30 min und 8 h nach dreistündiger Exposition der Probanden mit chemisch inertem Kalziumkarbonat-Staub (Immunzytochemische Färbung; $n \geq 27$; SEM).

Die Gesamtzahl leukozytärer Zellen (CD 45-positiv) bleibt bei steigenden Staubkonzentrationen konstant zwischen 11,4% (30 min, $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$) und 20,6% (8 h, Kontrolle). Der Anteil MPO-positiver Zellen erreicht acht Stunden nach der Applikation von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Staub den Höchstwert von 13,8%. Die Zahl der CD 68-positiven Zellen erreicht acht Stunden nach Exposition mit $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ein Maximum von 8,0%. Bis zu einer Staubkonzentration von $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ steigt die Zahl Tryptase-positiver Zellen auf 1,6% (8 h-Wert) an und fällt bei einer Staubkonzentration von $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ab auf 1,0%.

4. Diskussion

Umweltstäube sind aerosole Gemische unterschiedlicher toxischer und nicht-toxischer Inhaltsstoffe. In mehreren epidemiologischen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen Umweltstäuben und entzündlichen Erkrankungen der oberen Atemwege festgestellt [ABBEY ET AL., 1995]. Dabei ist unklar, in welchem Maß die entzündlichen Veränderungen durch mechanische und sensible Irritation oder durch die Toxizität der Inhaltsstoffe bedingt sind.

Durch nasale Exposition gesunder Probanden mit Inertstäuben ohne toxische Inhaltsstoffe sollte die mögliche proinflammatorische Wirkung durch mechanische und sensible Irritation quantifiziert werden. Als Marker der entzündlichen Reaktion diene der Nachweis der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , ENA-78 und des Neuropeptids Substance P. Außerdem wurde das Verteilungsmuster der Entzündungszellen neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen mittels immunzytochemischer Färbungen untersucht.

Durch die Kontrollexpositionen können die Effekte durch die Zell- und Sekretgewinnung von den Effekten durch die unterschiedlichen Expositionskonzentrationen abgegrenzt werden. Außerdem zeigten sich bei den untersuchten Parametern keine wesentlichen Unterschiede 30 Minuten und acht Stunden nach Kontrollexposition. Dies spricht dafür, daß durch die Expositionsbedingungen selbst keine progrediente entzündliche Reaktion induziert wurde. Acht Stunden nach Staubexposition gegenüber 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 30 Minuten sowie 8 Stunden nach Exposition mit 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ lagen die IL-6-Werte leicht über den Werten nach Kontrolle und 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Dieser Unterschied könnte durch eine vermehrte epitheliale Expression von IL-6 als Reaktion auf die Staubexposition erklärt werden. Bei IL-1 β , IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , ENA-78 und Substance P zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den einzelnen Expositionsgruppen.

Die Auswertung der konventionell gefärbten nasalen Zytologien zeigt keinen Anstieg neutrophiler Granulozyten nach Exposition mit chemisch inertem Kalziumstaub. Das spiegelt sich auch in der immunzytochemischen Färbung der Zellen mit MPO wieder. In der Immunzytochemie zeigt sich eine leichte Erhöhung Tryptase-positiver Zellen (dabei handelt es sich hauptsächlich um Mastzellen) acht Stunden nach der Exposition der Probanden mit einer Staubkonzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Zusammenfassend lassen die bisher vorliegenden Ergebnisse keine bzw. nur eine geringe entzündliche Reaktion der Nasenschleimhaut nach Exposition gegenüber Inertstaub in Konzentrationen von 500 oder 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ erkennen.

5. Literatur

ABBEY, D. E., HWANG, B. L., BURCHETTE, R. J., VANCUREN, T., MILLS, P. K. (1995). Estimated long term ambient concentration of pm10 and development of respiratory symptoms in a nonsmoking population. *Arch. Environ. Health* **50**: 139-152.

ANDERSON, K. R., AVOL, E. L., EDWARDS, S. A., SHAMOO, D. A., PENG, R. C., LINN, W. S., HACKNEY, J. D. (1992). Controlled exposures of volunteers to respirable carbon and sulfuric acid aerosols. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **42**: 770-776.

DIAZ-SANCHEZ, D., DOTSON, A. R., 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**: 1417-1425.

LEMONS, M., LICHTENFELS, A. J., AMARO-JUNIOR, E., MACCHIONE, M., MARTINS, M. A., KING, M., BOHM, G. M., SALDIVA, P. H. (1994). Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ. Res.* **66**: 87-95.

POPE, C. A. 3RD, BATES, D. V., RAIZENNE, M. E. (1995). Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ. Health Perspect.* **103**: 472-480.

SPRIET, A., SIMON, P. (1985). Methodology of clinical drug trials. Karger Verlag Basel, München, Paris.

VON MUTIUS, E., SHERRILL, D. L., FRITZSCH, C., MARTINEZ, F. D., LEBOWITZ, M. D. (1995). Air pollution and upper respiratory symptoms in children from East Germany. *Eur. Respir. J.* **8**: 723-728.