

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Die Wirkung wiederholter Ozonexpositionen in umweltrelevanter
Konzentration auf die Spätreaktion gegenüber Allergenen bei
Patienten mit Asthma bronchiale oder allergischer Rhinitis**

von

Olaf Holz, Rudolf A. Jörres, Marion Mücke, Kerstin Paasch, Petra Timm, Stefanie Böhme,
Helgo Magnussen

Krankenhaus Großhansdorf GmbH, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, LVA
Freie und Hansestadt Hamburg, 22927 Großhansdorf

Förderkennzeichen: PUGL 96010

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

September 2000

Die Wirkung wiederholter Ozonexpositionen in umweltrelevanter Konzentration auf die Spätreaktion gegenüber Allergenen bei Patienten mit Asthma bronchiale oder allergischer Rhinitis

Olaf Holz, Rudolf A. Jörres, Marion Mücke, Kerstin Paasch, Petra Timm, Stefanie Böhme, Helgo Magnussen

Krankenhaus Großhansdorf GmbH, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, LVA Freie und Hansestadt Hamburg, 22927 Großhansdorf

Zusammenfassung

Unsere Untersuchung sollte die Frage klären, ob Ozon in umweltrelevanter Konzentration die bronchiale Allergenempfindlichkeit am Tage nach der Exposition zu steigern vermag und ob eine wiederholte Exposition mit Ozon diesen Effekt weiter verstärkt. Dazu wurden 11 Probanden mit allergischem Asthma bronchiale, 23 mit allergischer Rhinitis und 5 asymptotische Atopiker jeweils einmalig gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb oder 250 ppb Ozon und an vier aufeinanderfolgenden Tagen gegenüber 125 ppb Ozon exponiert. Am nächsten Morgen erfolgte eine einmalige Allergenprovokation. Gemessen wurden neben der Lungenfunktionsantwort auch die Atemwegsempfindlichkeit auf Methacholin und Allergen sowie die zelluläre und biochemische Zusammensetzung des induzierten Sputums und die Konzentrationen von NO und H₂O₂ in der Ausatemluft. Sowohl die funktionelle wie auch die inflammatorische Reaktion auf Allergen und Ozon zeigten starke interindividuelle Unterschiede. Der deutlichste Abfall des Atemstosses (FEV₁) zum Zeitpunkt der Sofortreaktion, und in geringerem Ausmaß auch zum Zeitpunkt der Spätreaktion, war nach vorausgegangener einmalig, hoher sowie wiederholter, niedriger Ozonexposition zu beobachten. Im Sputum waren die Zahl der Granulozyten und die Konzentration der LDH nach diesen Expositionen am höchsten. Erhöhte Werte für NO konnten nach den Expositionen gegenüber FA und 125 ppb Ozon beobachtet werden, sowie zum Zeitpunkt der Spätreaktion. Am deutlichsten waren die beschriebenen Effekte in der Regel bei den Patienten mit allergischer Rhinitis. Darüber hinaus fand sich auch ein Zusammenhang zwischen der Gesamt- und spezifischen IgE Konzentration im Blut und dem Ausmaß der Verstärkung der Allergenantwort durch Ozon. Unsere Daten zeigen, daß wiederholte Expositionen mit Ozon in umweltrelevanter Konzentration bei Patienten mit vorbestehender allergischer Atemwegsreaktion die Allergenantwort verstärken können.

The effect of repeated exposures to ambient air levels of ozone on the late phase response to allergen in subjects with asthma and allergic rhinitis

Olaf Holz, Rudolf A. Jörres, Marion Mücke, Kerstin Paasch, Petra Timm, Stefanie Böhme, Helgo Magnussen

Summary

The aim of our study was to reveal whether ambient air levels of ozone exert an effect on bronchial allergen responsiveness the day after exposure, and whether repeated ozone exposures lead to effects which are different from those of single exposures. To quantify the

response, we assessed lung function and airway responsiveness to methacholine and allergen, and in addition potential cellular and biochemical effects by the method of induced sputum and the analysis of exhaled NO and H₂O₂. We included 11 subjects with allergic asthma, 23 subjects with allergic rhinitis, and 5 subjects with a positive skin prick test to allergens without a history of asthma or rhinitis. Subjects underwent either a single exposures to filtered air, 125 ppb or 250 ppb ozone, as well as four repeated exposures to 125 ppb ozone; the day after (the last) exposure, allergen challenges and sputum induction were performed. The effect on lung function as well as the effects on inflammatory parameters showed large interindividual differences. After single exposure with 250 ppb and after the repeated exposures with 125 ppb ozone we observed the largest decline in FEV₁ during early phase response and to a lower extent during late phase response. Corresponding changes in induced sputum were characterized by increases in the proportions of granulocytes and sputum fluid-phase parameters such as LDH. Increased levels of NO in exhaled air could be detected after exposure to filtered air and 125 ppb ozone, as well as during late phase response. The described effects were most pronounced in subjects with rhinitis. In addition we found an association between the extent of ozone induced enhancement of the allergic response and the concentration of total and specific IgE in blood. Our data demonstrate that repeated exposures with high ambient concentration of ozone are able to enhance the response to allergen in subjects with existing allergic airway reactions.

1 Einleitung

Epidemiologische Untersuchungen weisen darauf hin, daß Ozon klinisch signifikante Verschlechterungen bei Patienten mit Asthma bronchiale hervorrufen kann und diese Effekte verzögert auftreten (BURNETT et al. 1994; BASCOM et al. 1996). Darüber hinaus haben experimentelle Untersuchungen gezeigt, daß Ozon die allergische Sofortreaktion bei Patienten mit Asthma oder Heuschnupfen verstärken kann (PEDEN et al., 1995; JÖRRES et al. 1995, 1996b). Der Einfluß von Ozon auf die klinisch bedeutsame allergische Spätreaktion ist allerdings nicht bekannt. Während die Lungenfunktion nach wiederholter Ozonexposition eine Toleranzentwicklung zeigt (FOLINSBEE et al. 1994), gehen die in der bronchialen Lavage meßbaren entzündlichen Veränderungen des Bronchialsystem nach mehrmaliger Exposition zurück, sind aber in der Schleimhaut weiterhin zu beobachten (JÖRRES et al. 2000, CHRISTIAN et al. 1998). Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen, daß die Empfindlichkeit gegenüber Ozon und das entsprechende individuelle Gesundheitsrisiko aus einem Zusammenspiel funktioneller und entzündlicher Veränderungen, möglichen Verstärkungsmechanismen wie einer Allergenreaktion und Anpassungsreaktionen bei wiederholter Exposition resultieren.

2 Fragestellung

Unsere Untersuchung sollte die Frage klären, (1) ob Ozon in umweltrelevanten Konzentrationen die bronchiale Allergenreaktion am Tage nach der Exposition steigern kann, (2) ob dieser Effekt auch die klinisch relevante Spätreaktion umfaßt, (3) ob eine wiederholte Ozonexposition andere Effekte auf die allergische Reaktion ausübt als eine einmalige Exposition, (4) ob neben den funktionellen Größen auch zelluläre und biochemische Veränderungen im induzierten Sputum und in der ausgeatmeten Luft durch die Kombination von Ozon und Allergen auftreten, (5) ob diese Parameter mit den funktionellen Größen korrelieren, möglicherweise sensitiver in der Detektion und Vorhersage klinisch bedeutsamer Effekte sind, sowie ein Verständnis der funktionellen Änderungen erlauben.

3 Methodik

3.1 Probanden

Es wurden 11 Patienten mit leichtgradigem allergischem Asthma, 23 Patienten mit allergischer Rhinitis und 5 Probanden mit positivem Haut-Pricktest, jedoch ohne die Anamnese eines Asthma bronchiale oder einer allergischen Rhinitis untersucht (Tabelle 1). Die Eignung der Probanden wurde in drei Vortestungen geklärt, welche eine Anamnese, Lungenfunktionsmessung, die Prüfung auf die Fähigkeit, induziertes Sputum zu produzieren, die Bestimmung von Standardlaborwerten, Gesamt- und spezifischem IgE, ferner Haut-Prick-Test, EKG, die Messung von NO und H₂O₂ in der Ausatemluft sowie je eine inhalative Methacholin- und Allergenprovokation umfaßten. Alle Probanden waren Nichtraucher, nahmen zur Zeit der Studie keine Corticosteroide, Theophyllin oder Dinatriumchromoglicinsäure und waren mindestens 3 Wochen vor jeder Untersuchung frei von Atemwegsinfekten. Die Testungen fanden außerhalb der individuellen Allergensaison statt.

3.2. Protokoll

Es erfolgten vier Haupttestungen in zufälliger Reihenfolge und im Abstand von mindestens 4 Wochen, um Übertrageneffekte der Allergenreaktion zu vermeiden. In drei der Haupttestungen wurden die Probanden jeweils an einem Tag gegenüber Ozon (125 oder 250 ppb) oder gefilterter Luft exponiert; am folgenden Tag fand morgens eine Allergenprovokation statt. In der vierten Haupttestung wurde der Proband an vier aufeinanderfolgenden Tagen gegenüber 125 ppb Ozon exponiert, und am fünften Tag erfolgte morgens wiederum eine Allergenprovokation. Das Protokoll ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

3.3 Exposition

Die dreistündige Ozonexposition erfolgte während intermittierender körperlicher Belastung. Die Probanden atmeten über ein Mundstück Ozon in einer Konzentration von 125 ppb (250 µg/m³) oder 250 ppb (500 µg/ m³) oder gefilterte Luft ein. Hierbei alternierten jeweils 15 min fahradergometrische Belastung und 15 min Ruhe. Nach jeweils einer Stunde wurde die Lungenfunktion gemessen und ein Symptomen-Score erfragt. Dieses Protokoll orientierte sich an gängigen und von uns bereits mehrfach verwandten Protokollen (JÖRRES et al. 1995, 1996b, 2000; HOLZ et al. 1997).

3.4 Allergenprovokation

In der Voruntersuchung wurde gemäß einem Standardverfahren (JÖRRES et al. 1995, 1996b) die kumulative Provokationsdosis PD₂₀FEV₁ des individuell ausgewählten Allergens bestimmt, die einen Abfall des Atemstosses FEV₁ um 20 % bewirkt. Zugleich wurde dabei die Dosis PD₁₅FEV₁ ermittelt, die eine Abfall um 15 % hervorruft (Tabelle 1). Am Tage nach der Exposition wurde jeweils als Einzeldosis die dem PD₁₅FEV₁ entsprechende Allergendosis gegeben; diese Anordnung wurde getroffen, um bei einer eventuellen Steigerung der Allergenempfindlichkeit die Atemwegsreaktion und gleichzeitig die Variabilität der Antwort in tolerablen Grenzen zu halten. Somit war in den Haupttestungen die Zielgröße die Atemwegsreaktion auf die Einatmung einer definierten einmaligen Allergendosis. Nach Gabe des Allergens wurde die Lungenfunktion über 1 h im Labor, danach mit einem elektronisch

aufzeichnenden Peak-Flow-Meter in Mehrfachmessungen alle 60 min über mindestens 10 h erfaßt (RICHTER et al. 1998).

3.5 Methacholinprovokation

Wir verwendeten ein von uns entwickeltes Schnellverfahren, das dem etablierten Standardverfahren nach Chai und Rosenthal äquivalent ist (JÖRRES et al. 1997a), und bestimmten in üblicher Weise die Provokationskonzentration $PC_{20}FEV_1$, die eine Abnahme des FEV_1 um 20 % bewirkte. In den Haupttestungen hingegen wurde diejenige Konzentration ermittelt, die einen Abfall des FEV_1 um nur 15 % hervorrief ($PC_{15}FEV_1$), um die Probanden so wenig als möglich zu belasten und den Einfluß auf den Gesamtablauf gering zu halten.

3.6 Analyse der Ausatemluft

Die Konzentration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), einem vermuteten Marker der endogenen und exogenen oxidativen Belastung, wurde fluorometrisch im Exhalat gemessen, welches unter Messung der Ventilation während einer Ruheatmung von 20 min Dauer durch Ausfrieren gewonnen wurde. Ferner bestimmten wir die Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO), einem Marker der Zellaktivierung, in der Ausatemluft mittels eines schnellansprechenden Chemilumineszenz-Analysators (Sievers NOA 280). Zu diesem Zweck atmeten die Probanden gegen definierte Widerstände mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit aus. Durch einen Überdruck von 20 cm H_2O wurde ein Verschuß des Gaumensegels erreicht, so daß Kontaminationen durch die nasale NO-Produktion ausgeschlossen werden konnten.

3.7 Induziertes Sputum

Zur Sputuminduktion atmeten die Probanden nach Gabe eines β_2 -Sympatikomimetikums steigende Konzentrationen (3, 4, 5 %) einer ultraschallvernebelten Kochsalzlösung für insgesamt 3x10 min ein. Um das Auftreten einer Bronchokonstriktion zu erkennen, wurde die Lungenfunktion alle 5 min überprüft. Erstmals nach 10 min und sodann alle 5 min versuchte der Proband, Sputum zu produzieren, welches für die drei aufeinanderfolgenden 10minütigen Perioden getrennt gesammelt und aufgearbeitet wurde. Dieses Vorgehen sollte eine Zuordnung der Proben zu verschiedenen Tiefen der Atemwege ermöglichen (HOLZ et al. 1998). Durch die Trennung der Sputumflocken vom Speichel unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Kontamination mit Plattenepithel und Bakterien weitgehend vermieden. Sodann wurde das Sputum durch Inkubation mit Dithiotreitol (Sputolysin) homogenisiert; anschließend wurden Überstand und Zellen voneinander getrennt.

Nach Zellzählung und Vitalitätsbestimmung wurden Zytospinpräparate hergestellt. Zwei Präparate wurden für die Zelldifferenzierung herangezogen. Die Überstände wurden bei -80 °C bis zur Analyse der löslichen Komponenten gelagert.

Die Zelldifferenzierung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern vorgenommen. Hierbei wurden mindestens 400 nichtplattenepitheliale Zellen ausgezählt und die Ergebnisse der Auswerter gemittelt. Zum Zweck der Darstellung wurden für die Daten der 3 aufeinanderfolgenden, getrennt aufgearbeiteten Proben unter Berücksichtigung der absoluten Zellzahlen gepoolte Werte berechnet. Die löslichen Komponenten wurden aus Mengengründen in dem aus den drei Teilproben gepoolten Gesamtsputum untersucht. Hierbei wurden Laktatdehydrogenase (LDH), Mastzell-Tryptase und Histamin bestimmt.

3.8 Auswertung

Für die vorliegende Darstellung berechneten wir arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) oder Standardfehler (SEM). Für Parameter, die keine Normalverteilung aufwiesen, werden geometrische Mittel und Mediane angegeben. Vergleiche zwischen den Expositionen wurden mittels ANOVA und mittels des Wilcoxon-Matched-Pairs-Testes durchgeführt.

4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 60 Probanden voruntersucht, von denen aufgrund der Anamnesedaten sowie der Allergen- und Methacholinvortestungen 55 Probanden für die Studie geeignet waren, bei denen die komplette Vortestung durchgeführt wurde. 11 Probanden traten aus unterschiedlichen Gründen die Haupttestungen nicht an, 5 brachen nach 1 bzw. 2 Haupttestungen die Studie, hauptsächlich aus Termingründen, ab. Somit konnten wir im Rahmen dieser Studie bei 39 der geplanten 40 Probanden die Untersuchung abschließen.

Das Protokoll sah einen Zeitabstand von mindestens 28 Tagen zwischen den Allergeninhalationen vor, die Mediane dieser Abstände lagen bei 85, 36, 46 und 42 Tagen. Der Median der Gesamtdauer der Studie pro Proband lag bei 330 Tagen.

4.1 Belastungsparameter und Lungenfunktion

Die Belastungsstärken auf dem Fahrradergometer während der verschiedenen Expositionen waren gleich gewählt. Bei einer Belastung von im Mittel (\pm SD) 82 ± 23 Watt lag die Herzfrequenz im Mittel bei 118 ± 9 Schlägen/min. Unter Ruheatmung betrug sie 82 ± 9 Schläge/min. Die Ventilationsrate lag unter Belastung bei 28 ± 6 L/min und in Ruhe bei 8 ± 2 L/min. Die Änderungen des Atemstoßes (FEV_1) und der langsamen inspiratorischen Vitalkapazität (VK) sind in Abb. 2 und 3 dargestellt. Nach Einatmung von 125 ppb Ozon traten im Mittel kleine Änderungen, nach 250 ppb Ozon deutlichere Änderungen der Lungenfunktion auf. Nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon zeigte sich eine Adaptation der Lungenfunktion, insbesondere in der Gruppe der Rhinitiker.

4.2 Methacholinprovokation

Die unspezifische Atemwegempfindlichkeit war nach der Exposition gegenüber der hohen Ozonkonzentration (250 ppb) signifikant verstärkt (Abb. 4). Darüberhinaus war ein Trend zu einer Adaptation der Methacholinreaktion während der wiederholten Exposition gegenüber 125 ppb Ozon zu beobachten.

4.3 Allergenprovokation

Die Sofortreaktion auf Allergen am Tage nach der Exposition gegenüber gefilterter Luft oder Ozon war interindividuell stark verschieden (Abb. 5). Dennoch zeigte sich in der Gruppe der Rhinitiker, daß sowohl eine vorausgegangene einmalige Exposition mit 250 ppb Ozon als auch die wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon die allergische Sofortreaktion zu steigern vermögen. Innerhalb der Gruppe der leichtgradigen Asthmatiker war ein ähnlicher Verlauf zu beobachten, aber die Unterschiede in der Sofortreaktion nach den verschiedenen Expositionen waren aufgrund der höheren Variabilität in dieser Gruppe nicht signifikant. In einer

Untergruppe der Asthmatiker (n=8) mit einer Rastklasse >10 war nach 250 ppb Ozon ein Trend zu einer im Mittel gesteigerten Sofortreaktion (p=0.068) zu beobachten.

Die Häufigkeit des Auftretens einer klinisch relevanten Sofortreaktion, daß heißt eines Abfalls von FEV₁ um mindestens 20 %, war nach der einmaligen hohen und der wiederholten niedrigen Ozonexposition erhöht. Wir beobachteten 6 derartige Fälle nach gefilterter Luft, 8 nach 125 ppb, 14 nach 250 ppb und 13 Fälle nach wiederholter Exposition mit 125 ppb Ozon. Auch hier traten die meisten Fälle (n=29) in der Gruppe der Rhinitiker auf, ein Fall wurde nach 250 ppb in der Gruppe der asymptomatischen Atopiker und insgesamt 11 Fälle in der Gruppe der leichtgradigen Asthmatiker beobachtet.

Die allergischen Spätreaktion (Abfall im FEV₁ 6-13 Std nach Allergenprovokation) fiel insgesamt niedriger aus als die Sofortreaktion. Im Mittel waren auch hier bei den Rhinitikern die Reaktionen nach vorausgegangenen Ozonexpositionen stärker ausgeprägt, diese Verstärkungen erreichten aber keine statistische Signifikanz.

Die Zahl der klinisch bedeutsamen Abfälle im FEV₁ (>15 %) während der Spätreaktion war mit 8 Fällen nach wiederholter Exposition mit 125 ppb Ozon am höchsten. Nach gefilterter Luft wurden 3 Fälle, nach 125 ppb Ozon 2 Fälle und nach 250 ppb Ozon wurden 4 derartige Fälle beobachtet. In der Gruppe der Rhinitiker traten insgesamt 7 Fälle auf, und zwar ausschließlich nach 250 ppb und wiederholter Exposition mit 125 ppb Ozon. Insgesamt 2 Fälle wurden bei den asymptomatischen Atopikern beobachtet, und 8 Fälle bei den Asthmatikern.

Um zu prüfen, welche Faktoren die funktionelle Reaktion auf Allergen beeinflussen, haben wir die Probanden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfaßte die Probanden, bei denen weder die Sofort- noch die Spätreaktion durch Ozon verstärkt wurde (n=10), die zweite Gruppe die Probanden, bei denen entweder die Sofort- oder die Spätreaktion durch Ozon verstärkt war (n=15), und die dritte Gruppe alle Probanden, bei denen sowohl die Sofort- als auch die Spätreaktion durch Ozon verstärkt wurde (n=14). Auffallend war, daß sowohl das Gesamt-IgE als auch das spezifische IgE im Serum in der Gruppe 3 am höchsten war.

4.4 Analyse der Ausatemluft

4.4.1. Stickstoffmonoxid

Im Vortest und zu allen drei Meßzeitpunkten (1 h nach Exposition, 1 h und 6 h nach Allergenprovokation) waren die mittleren NO-Konzentrationen bei den asymptomatischen Atopikern am niedrigsten. Sie waren bei den Rhinitikern leichtgradig erhöht, und bei den Asthmatikern fanden sich die höchsten NO-Konzentration in der ausgeatmeten Luft. Da die NO-Konzentrationen auch im Vergleich länger auseinanderliegender Messungen hochgradig korreliert waren, ist von einer sehr guten Reproduzierbarkeit dieses Meßparameters auszugehen. Im Vergleich zum Vortest fanden sich unmittelbar nach Exposition gegenüber FA, 125 ppb und wiederholt 125 ppb Ozon signifikant erhöhte NO-Werte. Der Vergleich der 3 Meßzeitpunkte für die 4 verschiedenen vorausgegangenen Expositionen zeigte, daß die signifikant niedrigsten NO-Konzentration nach der Sofortreaktion und nach 250 ppb Ozon auftraten (Abb. 7).

4.4.1. Wasserstoffperoxid

Während die Konzentration von NO in der Ausatemluft auch über längere Zeiträume nur geringen Schwankungen unterlag, beobachteten wir für die Konzentration von H₂O₂ im Exhalat nur zwischen der Messung unmittelbar nach Allergenprovokation und der Messung 6 h später eine gute Korrelation. Diese zeigte, daß die beobachteten Schwankungen weniger auf meßtechnische Faktoren als auf intraindividuelle Veränderungen zurückzuführen waren. Aufgrund dieser Variabilität war nur eine eingeschränkte Interpretation dieses Parameters möglich. Im Vergleich zum Vortest konnten unmittelbar nach den Expositionen gegenüber FA und Ozon keine signifikanten Änderungen beobachtet werden. Ähnlich wie beim NO wurden zum Zeitpunkt der Sofortreaktion die niedrigsten Werte beobachtet, es konnte aber kein konsistenter Einfluß der Ozonexposition beobachtet werden (Abb.6).

Die Konzentrationen von NO und H₂O₂ waren nicht miteinander korreliert; daher scheint es sich um zwei unabhängige Parameter zu handeln.

4.5 Induziertes Sputum

4.5.1 Allgemein

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie an den eingeschlossenen Probanden 194 Sputuminduktionen durchgeführt (1 Proband wurde aus Sicherheitsgründen nicht gegenüber 250 ppb Ozon exponiert). Nur in einem Fall war das gesamte während der Induktion produzierte Material ungenügend, in weiteren 16 Fällen konnte nur während einer oder zwei der drei Induktionsperioden Material in ausreichender Qualität produziert werden. In zwei dieser Fälle fiel der Wert des FEV₁ während Sputuminduktion um mehr als 20 %, so daß die Induktion aus Sicherheitsgründen abgebrochen wurde. In beiden Fällen waren die Probanden vorher gegenüber 250 ppb Ozon exponiert worden und hatten bereits Probleme während der Sofortreaktion.

Es wurden im Mittel 35.4, 45.4 und 54.9 mg Sputum während der drei aufeinanderfolgenden Induktionsperioden gewonnen. Durch die vorgenommene Selektion der Sputumflocken aus dem Speichel konnte die Plattenepithelkontamination des Sputums mit im Mittel 7.4, 4.1 und 6.1 % niedrig gehalten werden. Die Vitalität der Zellen lag bei 74.5, 75.3 und 72.1 %.

4.5.1 Zelldifferenzierung

In den Vortestungen zeigten die Asthmatiker im Vergleich zu den Rhinitikern und asymptomatischen Atopikern leicht erhöhte Anteile eosinophiler Granulozyten im Sputum der drei aufeinanderfolgenden Induktionsperioden (3.5, 2.0 und 1.4 % vs. 1.3, 0.7 und 1.0 % vs. 1.1, 0.8 und 1.1 %). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, und hinsichtlich der anderen Zellarten konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Im Vergleich zum Vortest war die prozentuale Zusammensetzung des Sputums in den Haupttestungen hinsichtlich der Anteile der Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten signifikant verändert. Der Anteil der Granulozyten stieg nach den Expositionen und Allergenprovokationen deutlich an, während der Anteil der Makrophagen korrespondierend abnahm (Abb. 8). Diese Änderungen waren in der Gruppe der Rhinitiker in der Regel am größten, aber die in der Richtung der Änderungen unterschieden sich die Gruppen der Probanden nicht voneinander.

Im Vergleich zur Exposition gegenüber gefilterter Luft lag der Anteil der Makrophagen nach wiederholter Exposition mit 125 ppb Ozon signifikant niedriger (47.8 vs 40.8, $p=0.044$). Die höchsten Werte der neutrophilen Granulozyten wurden nach 250 ppb Ozon beobachtet, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Die höchsten Anteile der eosinophilen Granulozyten wurden nach wiederholter Exposition mit 125 ppb Ozon beobachtet ($p=0.06$ im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft). Da die Reaktion auf Ozon eher eine neutrophile Antwort beinhaltet, die Reaktion auf Allergen aber sowohl einen Anstieg der eosinophilen wie auch der neutrophilen Granulozyten bewirkt, wurden auch die Gesamt-Granulozyten analysiert. Die Anteile der Summe der Granulozyten waren nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon am größten (Abb. 9). Im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft war dieser Effekt signifikant (42.6 % vs 52.5 %, $p=0.044$). Allergen- oder expositionsbedingte Effekte auf die Anteile der Lymphozyten wurden nicht beobachtet.

Wie aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt, konnten wir auch in dieser Studie die typischen Änderungen der Zellzusammensetzung während der Sputuminduktion beobachten. Die Anteile der Makrophagen nahmen während der Induktion zu, die Anteile der Granulozyten nahmen ab. Dieser Effekt, der für die Herkunft des Sputums aus tieferen Regionen der Atemwege im Laufe der Induktion spricht, wurde weder durch das Allergen noch durch die Expositionen beeinflusst.

4.5.2. Zellzahlen

Die mittlere Zellzahl pro mL Sputum lag im Vortest bei 6.1 Mio Zellen/mL. Nach den Expositionen und den Allergenprovokationen stiegen die Werte im Mittel um ca. 2 Mio Zellen/mL an und waren nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon mit 10.4 Mio Zellen/mL am höchsten ($p=0.03$ gegenüber Vortest). Dieses spricht für einen entzündungsbedingten Zelleinstrom in die Atemwege. Entsprechend der Änderungen der Anteile der einzelnen Zelltypen zeigten sich bei den Granulozyten auch die höchsten Zellzahlen/mL nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon.

4.5.3 Analyse der Sputumüberstände

Die Ergebnisse der Analyse der Sputumüberstände sind in Abb. 10-12 dargestellt. Beim LDH fanden sich nach Reinluftexposition im Mittel nur geringfügig höhere Werte im Vergleich zu den Vortestungen. Dieser Parameter spiegelte daher scheinbar eher die Folgen der Exposition wider, weniger die Effekte der Allergenprovokation. Im Gegensatz dazu wurde die Konzentration der Tryptase im Sputumüberstand deutlich durch die Allergenprovokation beeinflusst, die Verstärkung dieses Effektes durch Ozon war jedoch nur gering. Dennoch wurden auch hier die höchsten Werte nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon gefunden. Die Ergebnisse für Histamin waren vergleichbar den Daten der Tryptase. Der Einfluß des Allergens war hier noch etwas stärker ausgeprägt. Für beide Parameter waren die Effekte in der Gruppe der Rhinitiker am deutlichsten.

4.5.4 Reproduzierbarkeit der Allergenantwort

Sowohl der Anteil der eosinophilen als auch derjenige der neutrophilen Granulozyten wurden deutlich durch die Allergenprovokation erhöht. Vergleicht man die Anteile dieser Zelltypen zwischen den 4 Haupttestungen, so fand sich für beide Zellarten eine sehr gute Korrelation. Die zelluläre Antwort auf das Allergen war folglich gut reproduzierbar. Es gab sowohl Probanden, die immer mit einer starken Neutrophilie bzw. Eosinophilie auf ein inhalatives Allergen reagierten, und solche, die in der Regel nur schwache Effekte zeigten. Abbildung 13 zeigt die

Korrelationen für die Änderungen der Granulozyten nach den Ozonexpositionen im Vergleich zu gefilterter Luft.

5 Diskussion

Unsere Untersuchung sollte zunächst die Frage klären, ob Ozon auch in umweltrelevanter Konzentration die bronchiale Allergenreaktion am Tage nach der Exposition steigern kann. Frühere Daten, u.a. aus einer vorangegangenen, vom PUG geförderten Studie (JÖRRES et al. 1996b), haben gezeigt, daß hohe Ozonkonzentrationen die Allergenempfindlichkeit zu steigern vermögen. Im Gegensatz zu dieser ersten Studie, die bei fast allen Probanden eine eindeutige Steigerung des Allergeneffektes 3 h nach der Exposition ergab, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Allergenexposition erst am Morgen nach der Ozonexposition vorgenommen. Damit wurde das Allergen nicht mehr während der akuten ozonbedingten Entzündungsreaktion gegeben, und die Effekte fielen nach 250 ppb Ozon insgesamt schwächer und stärker variabel aus. Dennoch war auch in dieser Studie eine Verstärkung der allergischen Sofortreaktion zu beobachten. Zusätzlich konnten wir diesen Effekt auch nach wiederholter umweltrelevanter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon zeigen.

Als zweites sollte die Frage geklärt werden, ob Ozon auch die klinisch relevante allergische Spätreaktion verstärkt. Ähnlich wie bei der Sofortreaktion zeigte auch die Spätreaktion starke interindividuelle Unterschiede; jedoch war die Zahl der klinisch relevanten Abfälle des FEV₁ nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon am höchsten. Neben der Beeinflussung der Lungenfunktion wurde auch die inflammatorische Antwort erfaßt. Da die Sputuminduktion 6-7 h nach der Allergenprovokation, also zum Zeitpunkt einer beginnenden bzw. bereits laufenden Spätreaktion durchgeführt wurde, spiegelt sie die Prozesse innerhalb der Atemwege zu diesem Zeitpunkt wider. Die Analyse des induzierten Sputums zeigte die stärksten Veränderungen nach wiederholter Ozonexposition in umweltrelevanter Konzentration. So fanden wir die höchsten Anteile an Granulozyten, aber auch durch die höchsten Werte für LDH, Tryptase und Histamin im Sputumüberstand nach vorausgegangener wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon.

Als drittes sollte die Frage geklärt werden, ob eine wiederholte Ozonexposition andere Effekte auf die allergische Reaktion ausübt als eine einmalige Exposition. Zu diesem Zweck hatten wir auch eine einmalige Exposition mit 125 ppb Ozon in das Studiendesign mit aufgenommen. Es zeigte sich deutlich, daß sich die Effekte nach der einmaligen Exposition gegenüber dieser Konzentration bezüglich der funktionellen Antwort überhaupt nicht und bezüglich der inflammatorischen Antwort nur in Ausnahmefällen von den Kontrollwerten nach gefilterter Luft unterschieden. Nach wiederholter Exposition mit 125 ppb fanden sich dagegen sowohl funktionell als auch inflammatorisch Effekte, die den Effekten nach einmaliger Exposition gegenüber 250 ppb Ozon vergleichbar waren oder diese noch überstiegen. Diese Beobachtungen stehen mit unseren Daten aus einem vorausgegangenen PUG-Projekt in Einklang (JÖRRES et al. 1996b), die zeigen konnten, daß die funktionelle Antwort auf wiederholte Ozonexpositionen (250 ppb) eine Adaptation oder Toleranz zeigt, die inflammatorische Antwort aber erhalten bleibt bzw. sich hinsichtlich der zellulären Reaktion in der Atemwegsmukosa sogar verstärkt (JÖRRES et al. 2000). Die vorliegende Untersuchung ist die erste, welche wiederholte Ozonexpositionen in umweltrelevanter Konzentration verwandte und dabei zeigte, daß (1) die funktionelle Allergenantwort gesteigert wurde und daß (2) die stärksten Veränderungen der Sputumzusammensetzung nach der wiederholten Exposition mit nachfolgender Allergenprovokation zu beobachten waren.

Als viertes sollte die Frage geklärt werden, ob neben den funktionellen Größen auch zelluläre und biochemische Veränderungen im induzierten Sputum und in der ausgeatmeten Luft durch die Kombination von Ozon und Allergenen auftreten. Weiterhin sollte dabei geklärt werden, ob diese Parameter mit den funktionellen Größen korrelieren oder möglicherweise sensitiver in der Detektion und Vorhersage klinisch bedeutsamer Effekte sind, sowie ein Verständnis der funktionellen Änderungen erlauben. Insgesamt zeigten sich nur schwache Korrelationen zwischen den funktionellen und inflammatorischen Parametern, die bei der Vielzahl der möglichen Vergleiche auch mit der entsprechenden Vorsicht interpretiert werden müssen. Es zeigte sich z.B. ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Eosinophilen im Sputum und dem Ausmaß der ca. 6 h von der Induktion aufgetretenen allergischen Sofortreaktion. Die Konzentration von Histamin im Sputumüberstand schien dagegen umso höher, je deutlicher die Spätreaktion ausgefallen war.

Im Gegensatz zur Ausgangshypothese, war ein vorbestehendes Asthma bronchiale nicht mit deutlicheren Reaktionen verbunden. Vielmehr war es die Gruppe der Rhinitiker, die die eindeutigsten und stärksten Reaktion auf Allergene und Ozon zeigten. Es ist dabei zu berücksichtigen, daß die Allergendosis in dieser Gruppe etwa um den Faktor 10 höher lag als bei den Asthmatikern. Zum zweiten zeichneten sich die Asthmatiker durch eine höhere intrinsische Variabilität aus, die eventuell auch auf Reaktionen auf unvermeidbare Allergenkontakte (Hausstaubmilbe, Katze) im Alltag zurückzuführen und damit schlechter kontrollierbar waren.

Die Beeinflussung der allergischen Reaktion durch Ozon schien mit der allergischen Reaktionsbereitschaft allgemein zusammenzuhängen. So zeigte sich, daß insbesondere bei den Probanden mit einem hohen Gesamt- und spezifischen IgE im Serum die Reaktion auf Allergene durch Ozon verstärkt wurde. Da die Messung dieser Parameter nicht so aufwendig ist, wären sie möglicherweise zur Vorhersage einer möglichen Gefährdung bei gleichzeitiger Ozon und Allergenexposition geeignet.

Zusätzlich zur zellulären Analyse des induzierten Sputums verwandten wir die nichtinvasive Messung von Komponenten in der ausgeatmeten Luft bzw. des Exhalats. Es zeigte sich, daß NO auch über lange Zeiträume reproduzierbar nachweisbar war, während H_2O_2 nur für die Messungen innerhalb eines Tages gute Korrelationen und damit eine gute Reproduzierbarkeit aufwies. Im Vergleich zu den Ausgangsmessungen aus den Vortestungen zeigten sich erhöhte NO-Werte unmittelbar nach der Exposition und zum Zeitpunkt der Spätreaktion. Dies galt nicht für die Exposition gegenüber 250 ppb Ozon, da hier im Vergleich zu den anderen Expositionen deutlich niedrigere Werte gemessen wurden. Diese Beobachtung und die niedrigeren Werte zum Zeitpunkt der Sofortreaktion sind zum Teil durch die Einschränkung der Lungenfunktion nach dieser Exposition bzw. zu diesem Zeitpunkt zu erklären.

Für H_2O_2 können nur eingeschränkte Aussagen gemacht werden. Hier waren die Werte im Mittel zum Zeitpunkt der Sofortreaktion erniedrigt. Da auch für H_2O_2 eine Flußabhängigkeit der ausgeatmeten Konzentration beobachtet wurde, könnten auch hier noch vorhandene leichte Einschränkungen der Lungenfunktion für diesen Effekt verantwortlich sein.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie zeigen, daß wiederholte (4malige) Expositionen gegenüber Ozon in umweltrelevanter Konzentration (125 ppb) die allergische Sofort- und Spätreaktion verstärken konnten. Dieser Effekt war zwar aufgrund der Variabilität der allergischen Atemwegsreaktionen im Mittel nur schwach ausgeprägt, zeigte sich jedoch in einer deutlichen Zunahme klinisch relevanter Lungenfunktionsreaktionen. Er war in der Gruppe der Rhinitiker am stärksten, und diejenigen, bei denen Ozon die Allergenantwort

verstärkte, zeichneten sich durch höhere Konzentrationen an Gesamt- und spezifischem IgE im Serum aus. Neben den funktionellen Parametern zeigten sich die größten Änderungen der zellulären Zusammensetzung ebenfalls nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon.

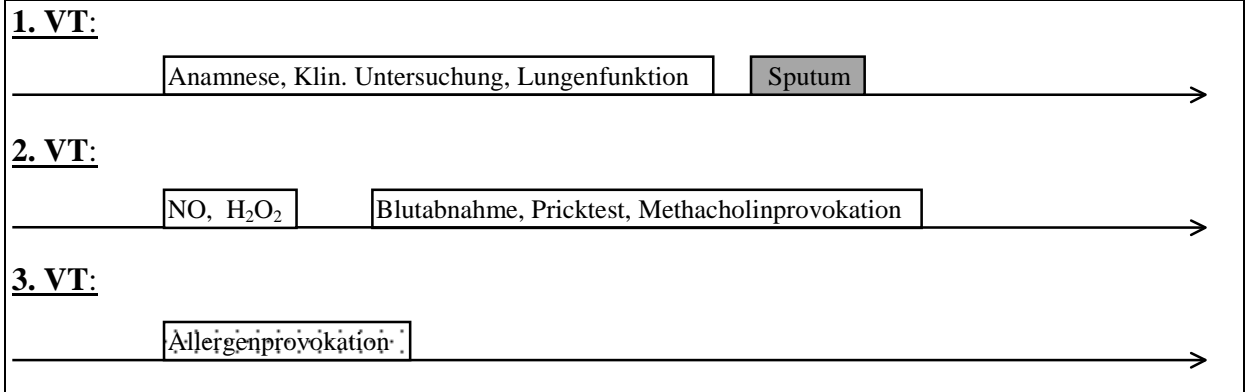
Diese Daten deuten an, daß zumindest einzelne Personen mit allergischen Atemwegserkrankungen markante Verstärkungen der Allergenreaktion durch Ozon erleiden können und daß dieser Effekt nach wiederholter Exposition gegenüber einer hohen, jedoch in der Umwelt tatsächlich vorkommenden Ozonkonzentration auftreten kann. Es erscheint bemerkenswert, daß angesichts der unkontrollierbaren Umweltbedingungen, denen die Probanden während der im Mittel ein Jahr in Anspruch nehmenden Untersuchung ausgesetzt waren, dennoch ein experimenteller Nachweis möglich war.

6 Literatur

- BASCOM, R., P.A. BROMBERG, D.A. COSTA, R. DEVLIN, D.W. DOCKERY, M.W. FRAMPTON, W. LAMBERT, J.M. SAMET, F.E. SPEIZER, M. UTELL (1996): State of the art: health effects of outdoor air pollution. - *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**:3-50.
- BURNETT, R.T., R.E. DALES, M.E. RAIZENNE, D. KREWSKI, P.W. SUMMERS, G.R. ROBERTS, M. RAAD-YOUNG, T. DANN, J. BROOK (1994): Effects of low ambient levels of ozone and sulfates on the frequency of respiratory admissions to Ontario hospitals. - *Environ. Res.* **65**:172-194.
- CHRISTIAN, D.L., L.L.CHEN, C.H. SCANNELL, R.E. FERRANDO, B.S. WELCH, J.R. BALMES (1998): Ozone-induced inflammation is attenuated with multiday exposure. - *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**:532-537.
- FOLINSBEE, L.J., D.H. HORSTMAN, H.R. KEHRL, S. HARDER, S. ABDUL-SALAAM, P.J. IVES (1994) Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**:98-105.
- HOLZ, O., R.A. JÖRRES, P. TIMM, M. MÜCKE, K. RICHTER, S. KOSCHYK, H. MAGNUSSEN (1999): Ozone-induced inflammatory changes differ between subjects and are reproducible. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**:776-784.
- HOLZ, O., R.A. JÖRRES, S. KOSCHYK, P. SPECKIN, L. WELKER, H. MAGNUSSEN (1998): Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. - *Clin. Exp. Allergy.* **28**:274-292.
- JÖRRES, R., D. NOWAK, H. MAGNUSSEN (1995): Die Wirkung der Einatmung von Ozon auf die allergische Reaktion des Bronchialsystems. XI, 168 S., Berichte Umweltforschung Baden-Württemberg, FZKA-PUG **19**, ISSN 0948-5511.
- JÖRRES, R.A., O.HOLZ, W. ZACHGO, P. TIMM, S.KOSCHYK, B. MÜLLER , F. GRIMMINGER, W. SEEGER, F.J. KELLY, C. DUNSTER, T. FRISCHER, G. LUBEC, M. WASCHESKI, A. NIENDORF, H. MAGNUSSEN (2000) The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (im Druck).
- JÖRRES, R., D. NOWAK, H. MAGNUSSEN (1996b): The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. - *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**: 56-64.
- JÖRRES, R., D. NOWAK, D. KIRSTEN, GRÖNKE, L., H. MAGNUSSEN (1997a): A short protocol for methacholine provocation testing adapted to the Rosenthal-Chai dosimeter technique. - *Chest* **111**:866-869.

- PEDEN, D.B., R.W. SETZER, R. DEVLIN (1995): Ozone exposure has both a priming effect on allergen-induced responses and an intrinsic inflammatory action in the nasal airways of perennially allergic asthmatics. - Am. J. Resp. Crit. Care Med. **151**:1336-1345.
- RICHTER, K. F. KANNIESS, B. MARK, R.A. JÖRRES, H. MAGNUSSEN (1998): Assessment of accuracy and applicability of a new electronic peak flow meter and asthma monitor. Eur. Respir. J. **12**:457-462.

Vortest



Haupttest:

(zufällige Reihenfolge, Abstand mindestens 4 Wochen)

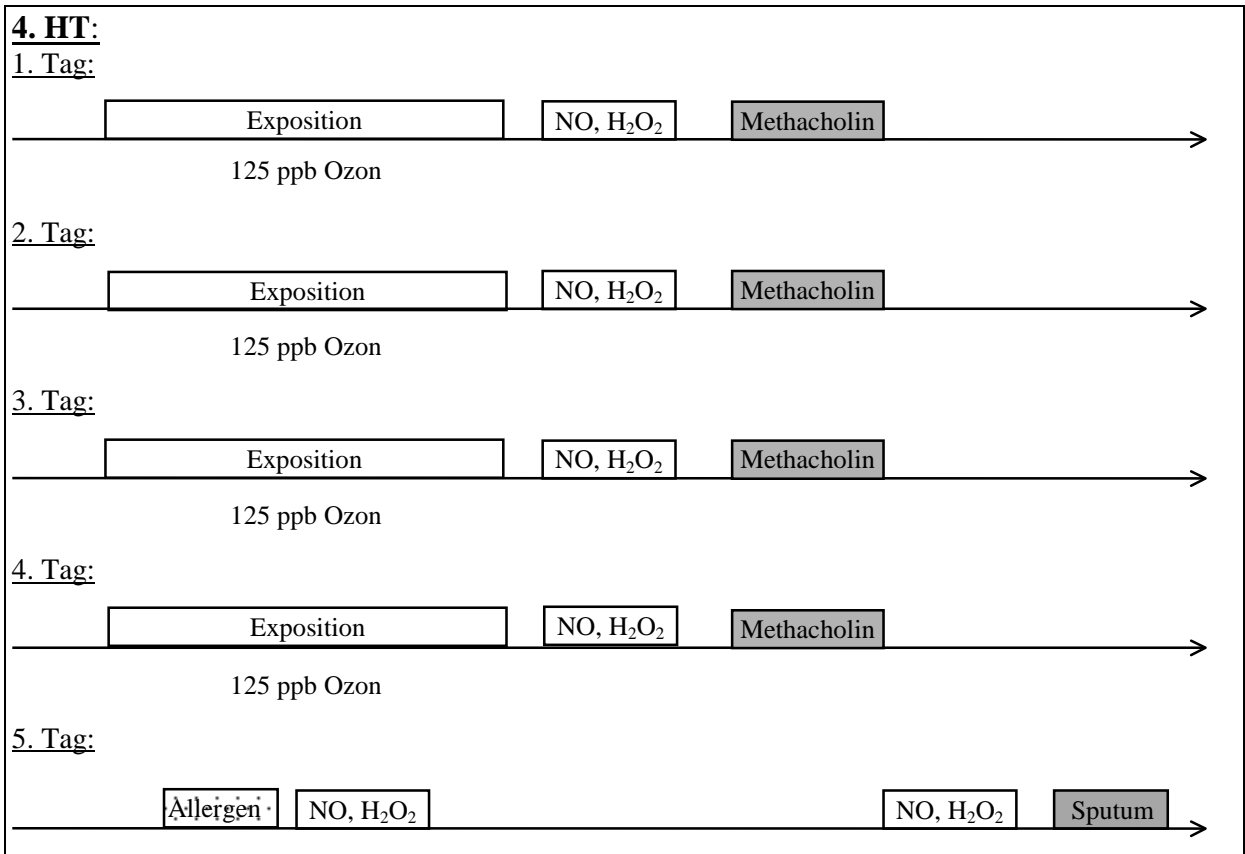
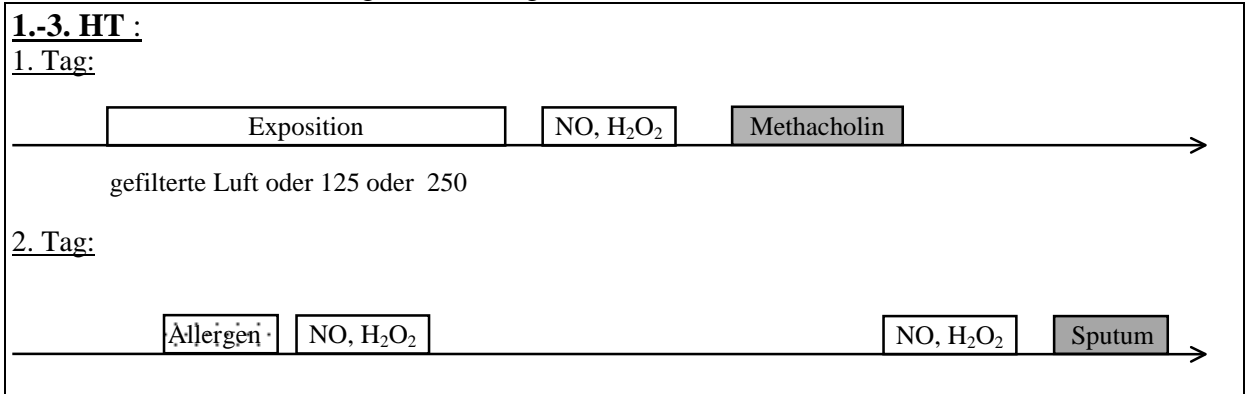


Abbildung 1: Studiendesign

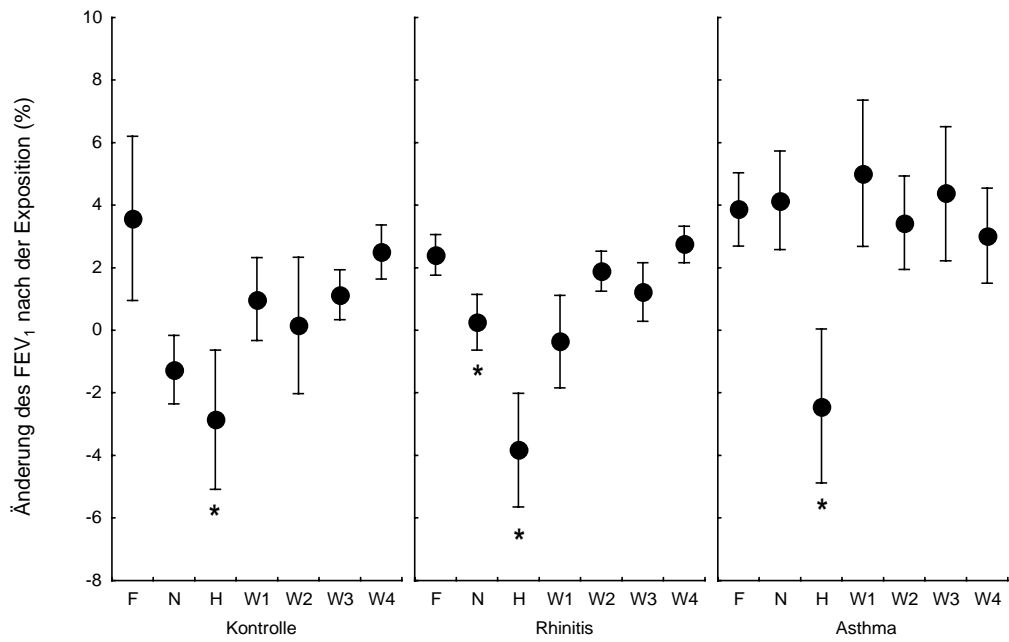


Abbildung 2: Mittelwert und Standardfehler der Änderung des FEV₁ während der Exposition. (F: gefilterte Luft, N: 125 ppb, H: 250 ppb W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen). (*: p < 0.05 im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft)

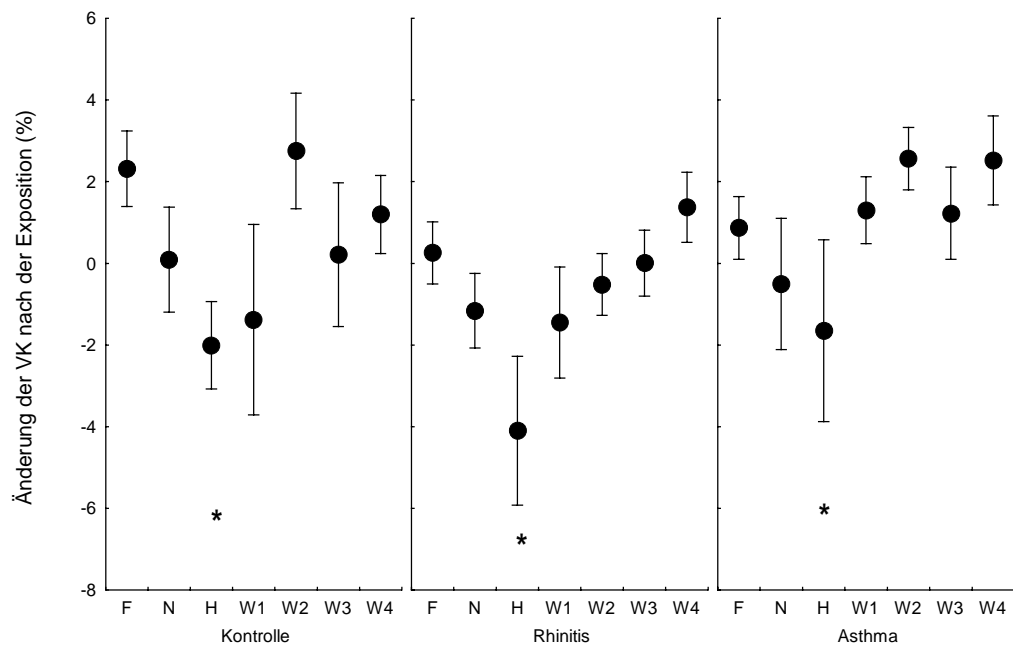


Abbildung 3: Mittelwert und Standardfehler der Änderung der Vitalkapazität (VK) während der Exposition (F: gefilterte Luft, N: 125 ppb, H: 250 ppb W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen). (*: p < 0.05 im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft).

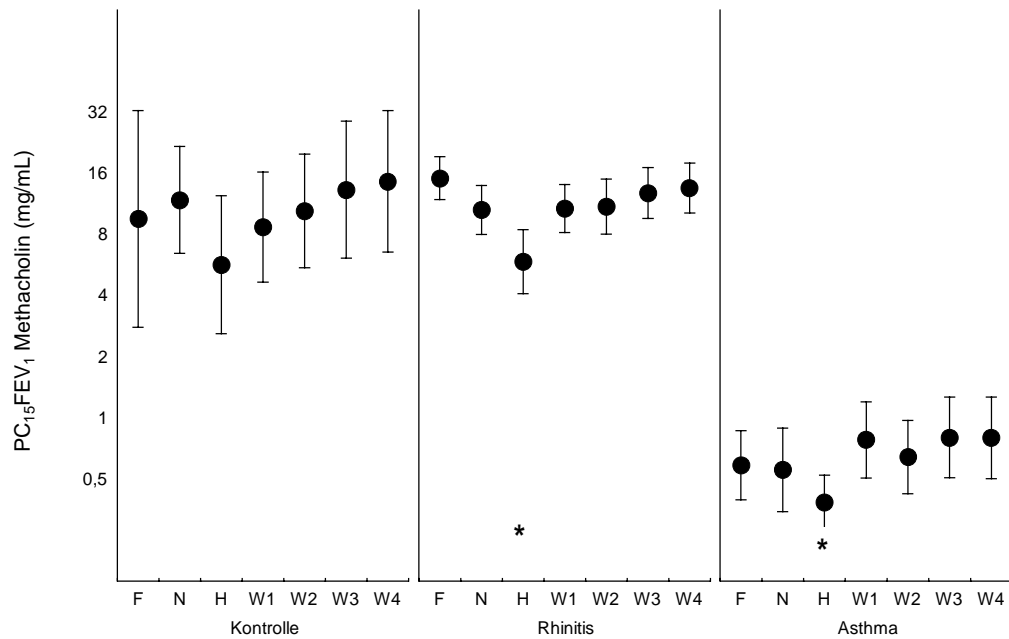


Abbildung 4: Mittelwert und Standardfehler der Atemwegempfindlichkeit nach Ozonexposition. (F: gefilterte Luft, N:125 ppb, H: 250 ppb W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen). (*: $p < 0.05$ im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft).

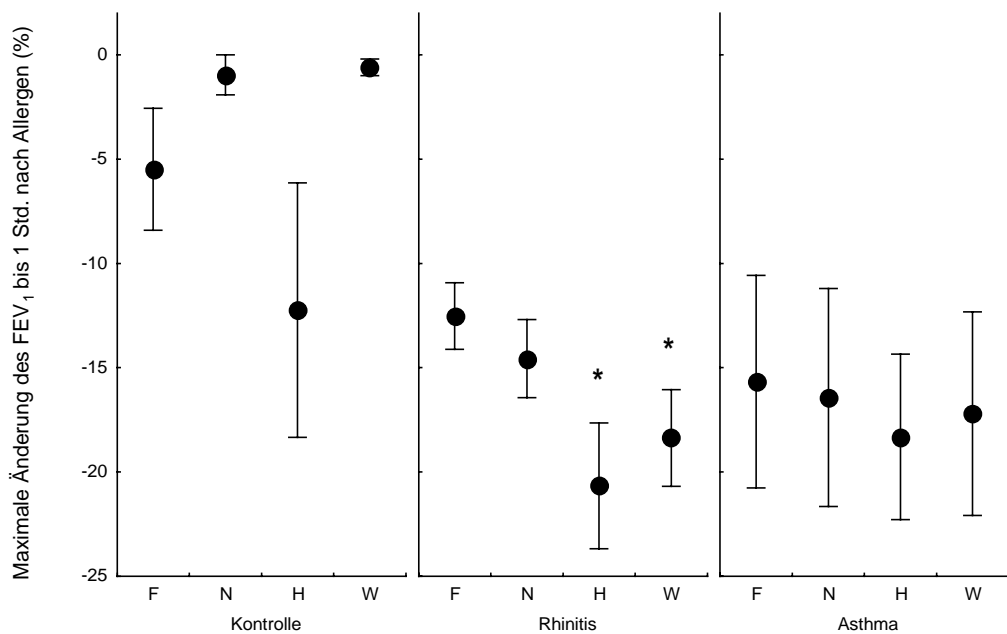


Abbildung 5: Mittelwert und Standardfehler der Änderung des FEV₁ innerhalb 1 Std. nach Allergenprovokation. (F: gefilterte Luft, N:125 ppb, H: 250 ppb W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen). (*: $p < 0.05$ im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft).

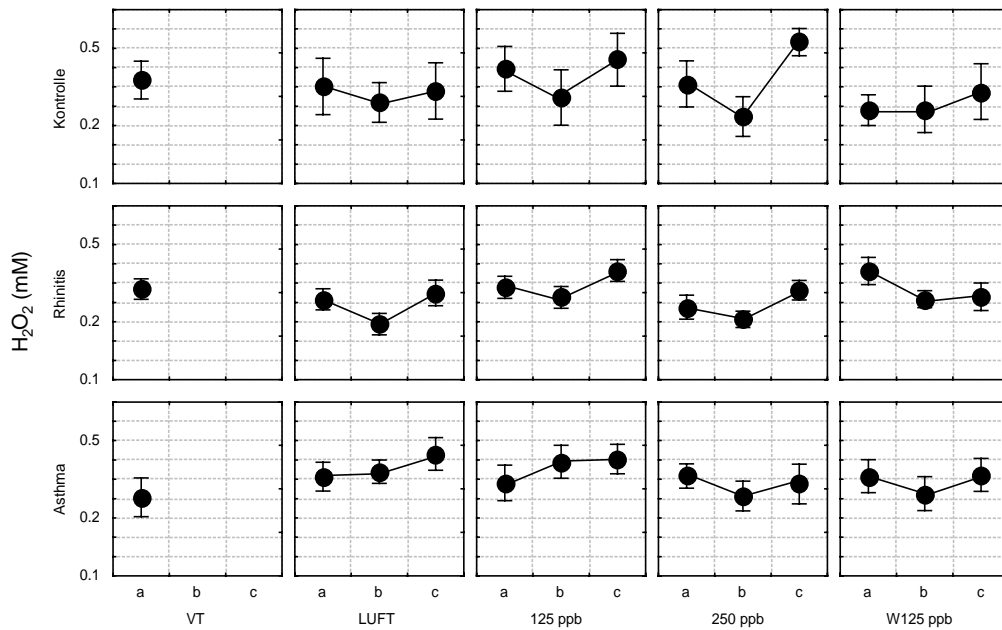


Abbildung 6: Geometrischer Mittelwert und Standardfehler der H_2O_2 -Konzentration im Exhalat. (a: nach Exposition, b: 1h nach Allergenexposition, c: 6h nach Allergenexposition).

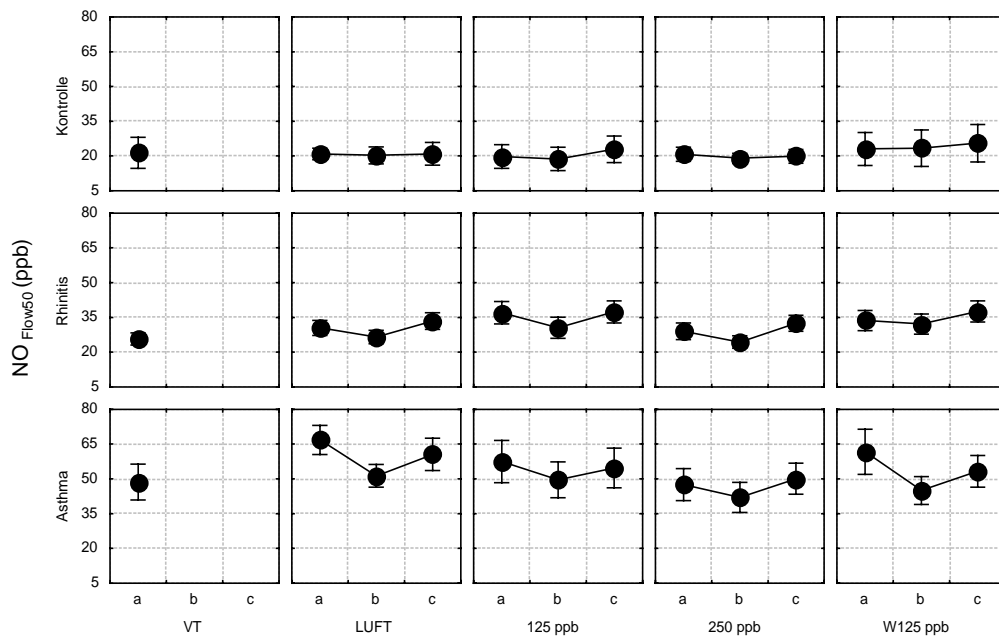


Abbildung 7: Mittelwert und Standardfehler der NO -Konzentration in der ausgeatmeten Luft (a: nach Exposition, b: 1h nach Allergenexposition, c: 6h nach Allergenexposition).

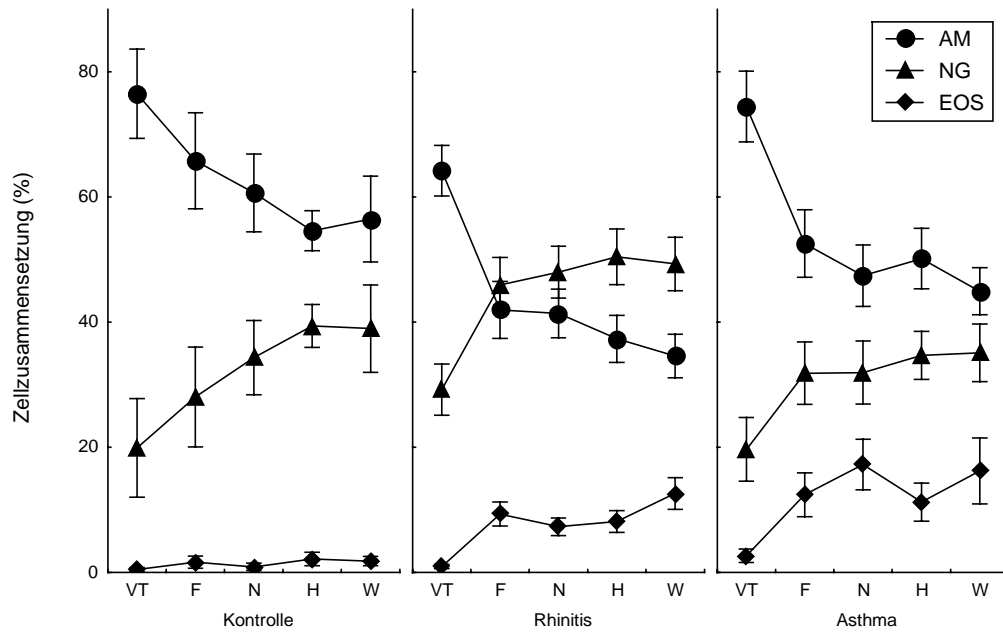


Abbildung 8: Zellzusammensetzung des induzierten Sputums 6-7 h nach Allergenprovokation. (F: gefilterte Luft, N:125 ppb, H: 250 ppb W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen). AM: Alveolarmakrophagen, NG: neutrophile Granulozyten, EOS: eosinophile Granulozyten).

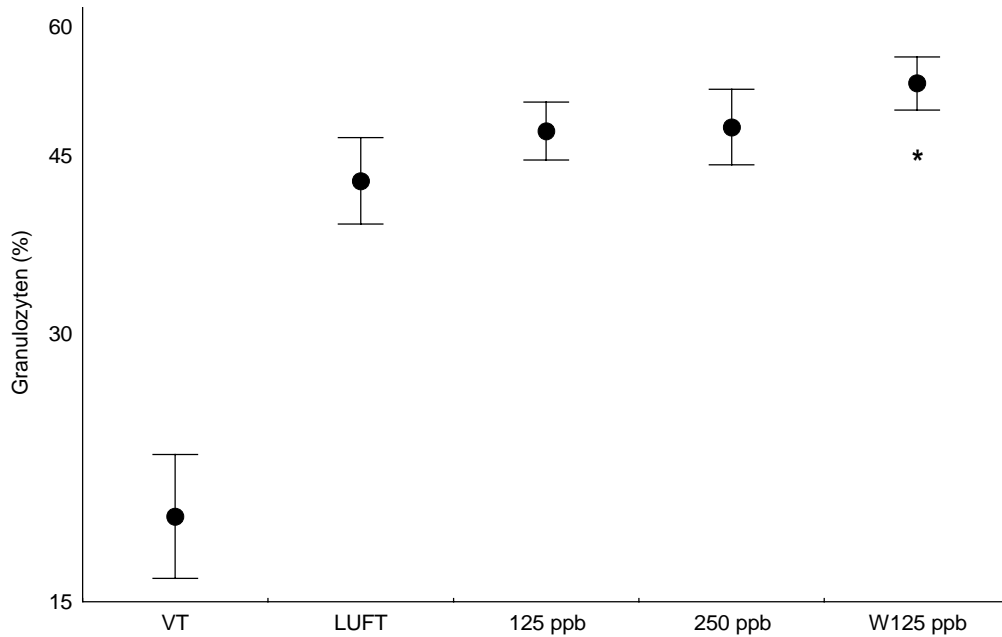


Abbildung 10: Geometrischer Mittelwert und Standardfehler der Summe der Granulozyten im induzierten Sputum. (* : p < 0.05)

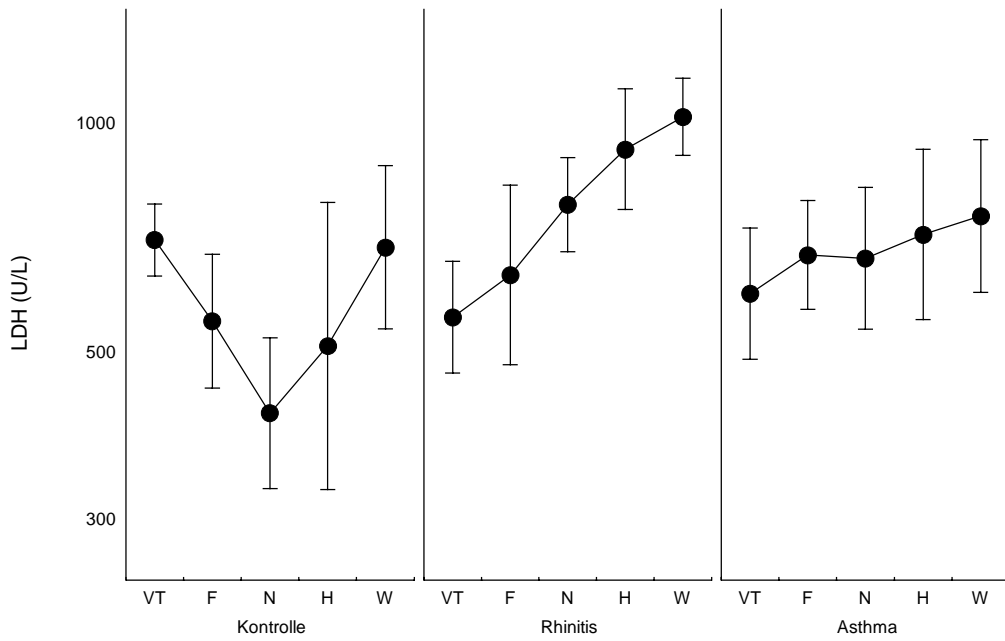


Abbildung 11: Geometrischer Mittelwert und Standardfehler der LDH-Konzentration. (F: gefilterte Luft, N:125 ppb, H: 250 ppb, W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen).

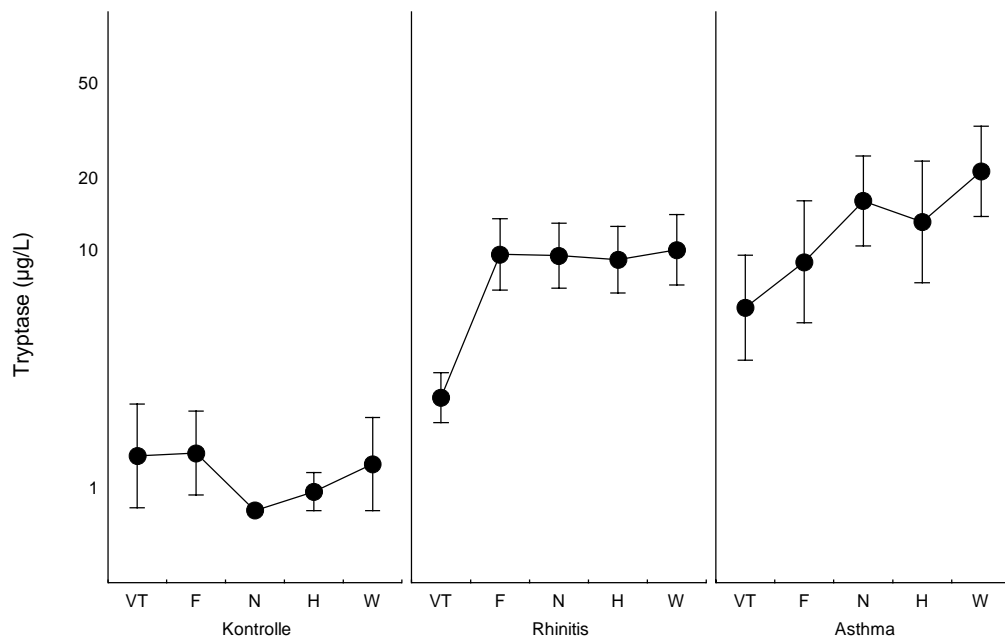


Abbildung 12: Geometrischer Mittelwert und Standardfehler der Tryptase-Konzentration. (F: gefilterte Luft, N:125 ppb, H: 250 ppb, W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen).

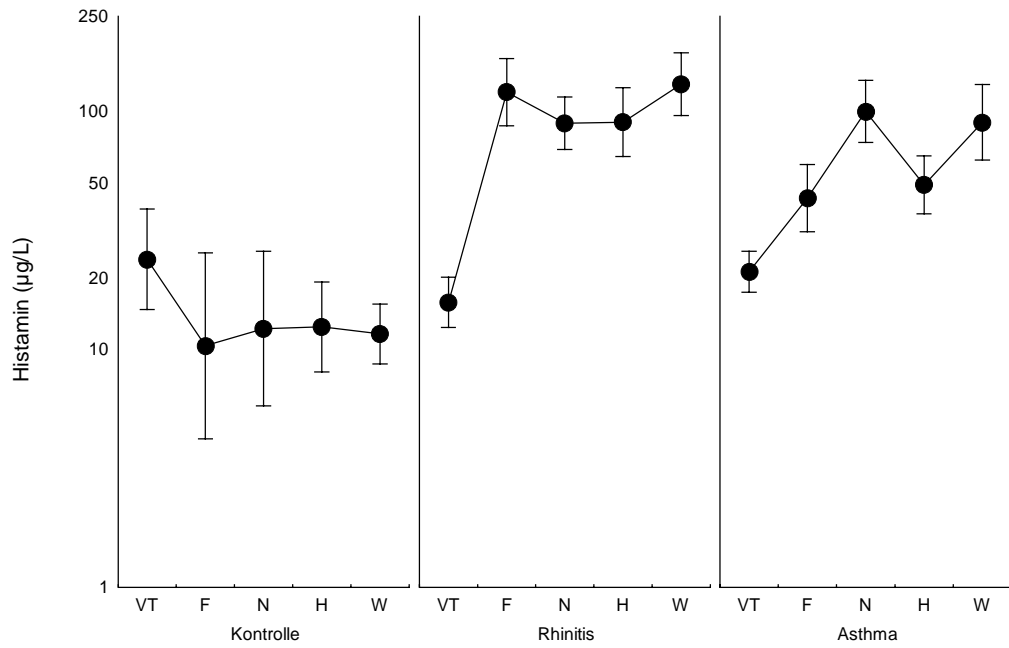


Abbildung 13: Geometrischer Mittelwert und Standardfehler der Histamin-Konzentration. (F: gefilterte Luft, N:125 ppb, H: 250 ppb W: wiederholte Exposition mit 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen).

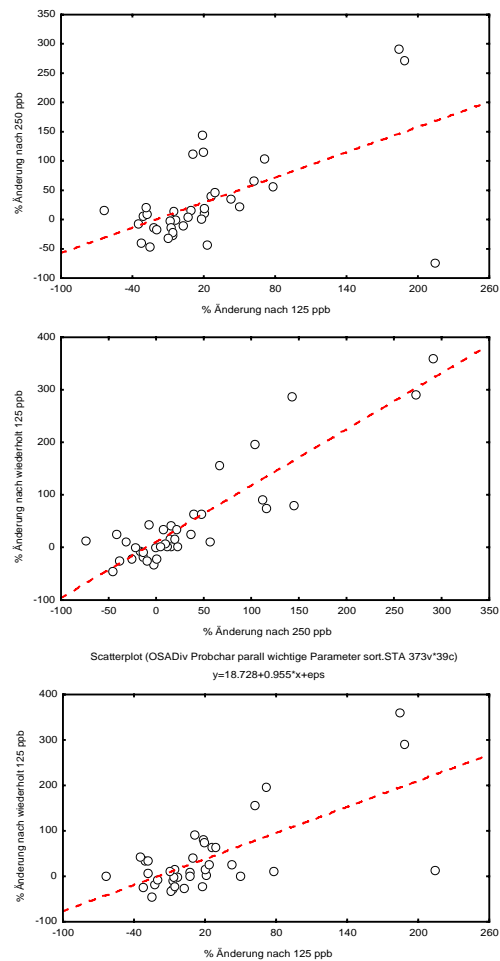


Abbildung 14: Änderung der Gesamtzahl der Granulozyten im Vergleich zu gefilterter Luft. A: Korrelation zwischen der Änderungen nach 125 ppb und 250 ppb Ozon, B: Korrelation zwischen der Änderungen nach 250 ppb und wiederholter Exposition mit 125 ppb Ozon, C: Korrelation zwischen der Änderungen nach 125 ppb und wiederholter Exposition mit 125 ppb.