

# Forschungsberichtsblatt

Forschungszentrum Karlsruhe  
Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BW-PLUS)  
Projekträger des Landes Baden-Württemberg  
Projekte Umwelt und Gesundheit (PUG)  
Förderkennzeichen: PUG L 97002

## **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**

G. Kunkel

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

### **1. Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse**

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)- $1\beta$ , IL-6, IL-8 und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) 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.

## **2. Welche Fortschritte ergeben sich in Wissenschaft und/oder Technik durch die Forschungsergebnisse ?**

Die von uns nachgewiesene Erhöhung von proinflammatorischen Mediatoren wie Adhäsionsmolekülen und Neuropeptiden sprechen für eine eindeutige Beteiligung von Epithelzellen, Endothelzellen, T- und B-Zellen sowie nervalen Strukturen am Aktivierungsprozeß der durch Ozon ausgelösten Entzündungsreaktion.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der potentiellen Beteiligung von Neuropeptiden vor allem im Bezug auf die noch weitestgehend ungeklärten Ursachen der durch Ozon ausgelösten Lungenfunktionsveränderungen.

Die Befunde aus dem Forschungsvorhaben PUG L 94005 und PUG L 97002 zeigten außerdem, daß das verwendete Organkulturmodell für Expositionsexperimente sehr gut geeignet ist und daß durch die Ozonexposition an der air-liquid interface in Gelfoam eine deutlich bessere Reaktionsbereitschaft des Gewebes besteht, da weniger Störfaktoren zu berücksichtigen sind.

Das verwendete Organkulturmodell bietet dabei folgende Vorteile:

- 1) Es handelt sich um ein humanes System.
- 2) Die Nasenschleimhaut hat als „Erstkontaktgewebe“ eine besondere Bedeutung.
- 3) Die Schleimhaut bildet einen Komplex aus epithelialen, mesenchymalen und neuroektodermalen Komponenten, die im Verlauf der Entzündung miteinander auf zellulärer und molekularer Ebene in Interaktion treten. Durch die Anwesenheit der verschiedensten Zelltypen ist es möglich, Veränderungen in einem Zellverband mit entsprechenden Zell-Zell-Interaktionen zu untersuchen und daher sind Entzündungsvorgänge in ihrer Gesamtheit besser zu beurteilen.
- 4) Es bietet die Möglichkeit gleichzeitig Mediatoren im Überstand zu bestimmen und histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen parallel durchzuführen.
- 5) Außerdem fallen ethische Bedenken bei dem durch Routineoperationen gewonnenen Untersuchungsmaterial nicht ins Gewicht.

Das verwendete Organkulturmodell erwies sich als guter experimenteller Ansatz zur Bearbeitung pathophysiologischer Zusammenhänge zwischen Schadgasen im umweltrelevanten Bereich und der Nasenschleimhaut. Insgesamt bietet die vorgestellte ex vivo in vitro-Kulturmethode die Möglichkeit, die komplexen zellulären und molekularen Zusammenhänge in einem im Vergleich zu anderen in vitro-Testungen relativ hoch organisierten, physiologisch relevanten Modell zu untersuchen.

Das von uns entwickelte Organkulturmodell hat international große Resonanz erfahren.

Ein weitere Anwendungsmöglichkeit dieses Modells ist die Untersuchung von neuen pharmakologisch aktiven Substanzen, die zu einer Beeinflussung der Entzündungsreaktion führen. Hierbei können tierexperimentelle Versuchssysteme teilweise eingeschränkt werden. So konnten von uns bereits Antihistaminika untersucht werden, wobei interessante Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus gefunden wurden. Durch diese Untersuchungen

ergeben sich präklinische Untersuchungsmöglichkeiten, die Aufschlüsse über Wirksamkeit und Wirk-mechanismus sowie die Toxikologie geben. Eine Zusammenarbeit mit der Pharmaindustrie ist bereits entstanden.

### **3. Welche Empfehlungen ergeben sich aus den Forschungsergebnissen für die Praxis ?**

Während im vorausgegangenen Projekt die durch Ozon ausgelöste Entzündungsreaktion an menschlicher Nasenschleimhaut untersucht wurde und als Beitrag zur Risikoabschätzung eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Ozon (umweltrelevanter Bereich von 0,06 bis 0,2 ppm Ozon) erstellt werden konnte, beschäftigte sich die vorliegende Studie vorrangig mit dem Einfluß von Ozon unter zusätzlicher Allergenstimulation. Diese Fragestellung berührt die in der Fachliteratur heftig umstrittene Frage des möglichen Zusammenhangs zwischen Luftschadstoffen und der in den letzten Jahren zu beobachtenden Zunahme von Allergien als auch die Frage der Risikoabschätzung (ob Allergiker und hier insbesondere Patienten mit allergischen Atemwegserkrankungen ein höheres Risiko durch eine Ozonexposition erfahren).

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. Die Ergebnisse konnten somit die Befunde aus dem vorangegangenen Projekt bestätigen, daß Ozon zur Auslösung einer Entzündungsreaktion in vitro führt und daß bei allergischer Disposition

- vor allem bei bestehender Entzündung der Schleimhaut - die Empfindlichkeit gegenüber Ozon erhöht ist. Dieser Befund ist für die Beurteilung der Ozonwirkung bei Allergikern bedeutsam, da Episoden mit hohen Ozonwerten meist mit hohen Pollenkonzentrationen in der Außenluft verbunden sind. Als Handlungsempfehlung ergibt sich daher, daß Personen mit allergischer Disposition, und dabei insbesondere Patienten mit saisonalen Allergien, während des Pollenflugs möglichst eine Ozonexposition vermeiden sollten.

Da die Risikogruppe von „Ozon-überempfindlichen“ Personen immer noch nicht eindeutig definiert ist, sollten auch andere Faktoren, wie das Rauchverhalten der Patienten, untersucht werden. In unseren Untersuchungen zeigte sich 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  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ , IL-4, IL-6 und IL-8). Damit bestätigen sich frühere Befunde, daß Raucher nicht eindeutig ein höheres Risiko durch eine Ozonexposition erfahren. Vielmehr scheinen in diesem Zusammenhang individuelle Unterschiede bei der Sensitivität gegenüber Ozon von größerer Bedeutung zu sein.

In unserem Modell konnten nach Ozonexposition keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität der antioxidativen Enzyme beobachtet werden. Nicht unerheblich wäre die Tatsache, daß an nasaler Mukosa bei einer Ozonexposition gegenüber 0,1 ppm bestimmte unspezifische

Entzündungsreaktionen ausgelöst werden, jedoch die Schutzmechanismen gegenüber dem oxidativen Streß nicht vollständig initiiert werden.

In der Gesamtheit machen die gewonnenen Ergebnisse deutlich, daß die bestehenden Grenzwerte keinesfalls angehoben werden sollten.