

*Fachbereich
Umweltwissenschaften - Institut für Ökologie und Umweltchemie
der Universität Lüneburg*

**Die Wirkung wiederholter Ozonexpositionen in
umweltrelevanter Konzentration auf die Allergenantwort von
Patienten mit Asthma bronchiale oder allergischer Rhinitis**

Dissertation

zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Umweltwissenschaften
der Universität Lüneburg

vorgelegt von

Olaf Holz

aus Hamburg

Hamburg Januar 2006

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden unter der Leitung von Dr. R.A. Jörres in der Zeit vom 1. Juli 1997 bis zum 16. Dezember 1999 im Forschungslabor des Krankenhauses Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie (Ärztliche Leitung: Prof. Dr. med. H. Magnussen) durchgeführt. Die Daten wurden im Jahr 2000 ausgewertet, am 1. Juni 2001 zur Publikation bei *Clinical Experimental Allergy* eingereicht, nach Revision am 28. November 2001 zur Publikation angenommen und im Jahre 2002 publiziert:

Repeated ozone exposures enhance bronchial allergen responses in subjects with rhinitis or asthma. Holz O, Mücke M, Paasch K, Böhme S, Timm P, Richter K, Magnussen H, Jörres RA. *Clin Exp Allergy* 2002;32:681-689.

Am 1. November 2004 wurde der Antrag auf Zulassung zur Dissertation beim Prüfungsausschuss des Fachbereiches Umweltwissenschaften - Institut für Ökologie und Umweltchemie der Universität Lüneburg gestellt, und nach Zulassung der Arbeit im Januar 2005 wurde diese von Prof. Dr. W. Ruck, Fachbereich Umweltwissenschaften, betreut.

Gutachter: Prof. Dr. W. Ruck

Gutachter: Prof. Dr. med D. Nowak, Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin, LMU München

I INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1. Die Entstehung von Ozon	9
1.2. Die Wirkung von Ozon auf die Atemwege	10
1.2.1. Lungenfunktionsantwort und Symptome	11
1.2.2. Atemwegsentzündung	13
1.2.3. Hyperreagibilität	15
1.3. Allergie	16
1.3.1. Allergische Atemwegserkrankungen	16
1.3.2. Sensibilisierung	16
1.3.3. Allergische Frühreaktion	17
1.3.4. Allergische Spätreaktion	17
1.4. Wirkung von Ozon auf die allergische Reaktion der Atemwege	18
1.5. Nichtinvasive Verfahren zum Nachweis der Atemwegsentzündung	19
1.5.1. Sputumanalytik	20
1.5.2. Stickstoffmonoxid in der Ausatemluft	24
1.5.3. Atemkondensat	27
2. FRAGESTELLUNG	29
3. MATERIAL UND METHODEN	33
3.1. Protokoll der Untersuchung	33
3.2. Probanden	35
3.3. Methoden	35
3.3.1. Messung der Lungenfunktion	35
3.3.2. Messung der Hyperreagibilität	37
3.3.3. Allergietest und Allergenprovokation	38
3.3.4. Ozonexposition	40
3.3.5. Sputuminduktion	42
3.3.6. Sputumaufarbeitung und Sputumanalyse	43
3.3.7. Nachweis von Stickstoffmonoxid in der Ausatemluft	44
3.3.8. Atemkondensat	45
3.3.9. Statistik	46
4. ERGEBNISSE	47
4.1. Vergleich der Gruppen in den Voruntersuchungen	47
4.2. Expositionsbedingungen und Untersuchungsdauer	49
4.3. Lungenfunktionsantwort auf Ozon	49

4.4.	Methacholin-Empfindlichkeit nach Ozonexposition	52
4.5.	Lungenfunktionsantwort während der Frühreaktion auf Allergen	53
4.6.	Lungenfunktionsantwort während der Spätreaktion auf Allergen	55
4.7.	Messung der Atemwegsentzündung im induzierten Sputum	57
4.8.	Messung von NO in der Ausatemluft	66
4.9.	Messung von H ₂ O ₂ im Atemkondensat	69
5.	DISKUSSION	71
5.1.	Versuchsdesign	72
5.2.	Probanden	77
5.3.	Lungenfunktion nach Ozon	77
5.4.	Änderung der unspezifischen Atemwegsempfindlichkeit nach Ozon	78
5.5.	Einfluss von Ozon auf die funktionelle Allergenantwort	79
5.6.	Einfluss von Ozon auf die allergische Atemwegsentzündung	82
5.7.	Nachweis von NO in der ausgeatmeten Luft	87
5.8.	Nachweis von H ₂ O ₂ im Atemkondensat	90
5.9.	Mechanismen	91
5.10.	Ausblick	95
5.11.	Schlussfolgerungen	95
6.	ZUSAMMENFASSUNG	97
7.	SUMMARY	99
8.	LITERATUR	101

II ABKÜRZUNGEN

AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BAL	bronchoalveoläre Spülung (bronchoalveolar lavage)
BALF	bronchoalveoläre Spülflüssigkeit
BHR	Atemwegsüberempfindlichkeit (bronchial hyperresponsiveness)
BSA	body surface area (= Wurzel (Körpergröße (cm) x Gewicht (kg) / 3600))
BW	bronchiale Spülflüssigkeit (bronchial wash)
EBC	Atemkondensat (exhaled breath condensate)
ELF	epithelial lining fluid
eNO	exhalierendes Stickstoffmonoxid (exhaled nitric oxide)
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FA	gefilterte Luft (filtered air)
FEIA	fluorescent-enzyme immunoassay
FcεRI	hochaffiner IgE Rezeptor
FcεRII	niedrigaffiner IgE Rezeptor
FEV ₁	Einsekundenvolumen (maximal in 1 s ausatembares Volumen)
FVC	expiratorische Vitalkapazität
g	Fallbeschleunigung
GSH	reduziertes Glutathion (L-γ-glutamyl-L-cysteinglycine)
h	Stunde
H	Exposition mit 250 ppb Ozon
LDH	Laktatdehydrogenase
ICAM 1	intercellular adhesion molecule 1
IFN-γ	Interferon gamma
IgE	Immunoglobulin E
IL	Interleukin
INOS	induzierbare NO Synthase
Min	Minuten
n	Anzahl
N	Exposition mit 125 ppb Ozon
NGF	nerve growth factor

NK	natural killer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
MMD	Medianer aerodynamischer Durchmesser gemäß Massenverteilung
p	Irrtumswahrscheinlichkeit I. Art
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor
PHPA	p-hydroxyphenylacetic acid
PGE ₂	Prostaglandin E2
TLC	Gesamtlungenkapazität
PC ₂₀ FEV ₁	Provokationskonzentration von Methacholin, die einen Abfall von 20 % gegenüber dem Ausgangswert hervorruft
PD ₂₀ FEV ₁	Kumulative Provokationsdosis von Allergen, die einen Abfall von 20 % gegenüber dem Ausgangswert hervorruft
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
r	linearer Korrelationskoeffizient nach Pearson
RK	Rastklasse
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
VC	inspiratorische Vitalkapazität (maximal einatembares Volumen)
W1-W4	Tage mit wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon
±	vor arithmetischer SD oder SEM (additiv)
÷	vor geometrischer SEM (faktoriell)

1. Einleitung

Unter den Umweltbelastungen, denen der menschliche Organismus ausgesetzt ist, spielen Luftschadstoffe eine wesentliche Rolle. Nach wie vor lassen sich Assoziationen zwischen Atemwegsbeschwerden und einer Reihe von Komponenten der Luftverschmutzung nachweisen, auch wenn in Mitteleuropa beispielsweise die Belastung mit Schwefeldioxid zurückgegangen ist. Ähnliches gilt für Stickstoffdioxid und auch für die Belastung mit Grobstäuben. Zugenommen hat hingegen die Freisetzung von feinen und ultrafeinen Stäuben, die heute für einen wesentlichen Teil der Morbidität und Mortalität kardiopulmonaler Erkrankungen verantwortlich gemacht werden [BRUNEKREEF 2002]. Die Konzentrationen des troposphärischen Ozons weisen zwar dank der Reduktion der Produktion einiger Vorläufersubstanzen seit einer Reihe von Jahren einen Trend nach unten auf, doch ist dieser nicht sehr stark ausgeprägt; dies gilt sowohl für die Gesamtbelastung als auch für die Spitzenwerte. Nach wie vor können bemerkenswerterweise in der Umwelt Konzentrationen erreicht werden, die im Gegensatz zu anderen Luftschadstoffen den Konzentrationen nahekommen oder gleichen, die im kurzzeitigen Akutversuch am Menschen Effekte auslösen können [BASCUM 1996, UMWELTBUNDESAMT 2003]. Auch hat sich über die Jahre genügend Evidenz dafür angesammelt, dass Ozon allergische Atemwegserkrankungen beeinflussen kann. Aus diesen Gründen ist Ozon nach wie vor von hohem Interesse hinsichtlich seiner Wirkungen auf die menschliche Gesundheit, auch wenn die Effekte nicht so dramatisch bzw. folgenreich sein mögen wie beim Feinstaub. Die spezifischen Befunde, die vorstehend skizziert sind, lassen darüber hinaus das Ozon - und speziell seine Interaktion mit Allergenen - als besonders interessante Komponente erscheinen, wenn man gesundheitliche Auswirkungen der Umweltverschmutzung experimentell am Menschen unter Bedingungen untersuchen möchte, die die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Umweltbedingungen zulassen und zugleich ethisch vertretbar sind.

1.1. Die Entstehung von Ozon

Ozon ist ein Luftschadstoff, der in der Troposphäre durch die photochemische Reaktion zwischen Sauerstoff, Kohlenwasserstoffen und Oxiden des Stickstoffs entsteht [BASCUM 1996, DICKERSON 1986, SANDSTRÖM 1995]. Wesentlicher Ausgangspunkt der Reaktion ist Stickstoffmonoxid (NO), das bei der Verbrennung in Automotoren gebildet wird ($O_2 + N_2 \rightarrow 2NO$). Das NO wird durch den Luftsauerstoff weiter zu NO_2 oxidiert ($NO + 1/2 O_2 \rightarrow NO_2$). Dieses braune Gas absorbiert Licht und kann dabei in NO und atomaren Sauerstoff zerfallen ($NO_2 + hv (< 420nm) \rightarrow NO + O\bullet$). Der atomare Sauerstoff reagiert sofort mit dem Luftsauerstoff zu Ozon ($O_2 + O\bullet \rightarrow O_3$) [DICKERSON 1986]. Bedingt durch die lichtabhängige Reaktion sind die durchschnittlichen Ozonkonzentrationen im Winter am niedrigsten, im Sommer am höchsten und erreichen in der Regel am Nachmittag die Tagesspitzenwerte. In den meisten Industrieländern liegen die Jahresmittelwerte bei 40-80 $\mu g/m^3$ (1000 $\mu g/m^3 = 500$ ppb bei 25°C / 101.3 kPa), die jahreszeitlichen Spitzenwerte können aber deutlich über diesen Werten liegen [SANDSTRÖM 1995]. So finden sich in Deutschland 1 h Mittelwert-Maxima (1990-2003), die bei ca. 300 $\mu g/m^3$ (150

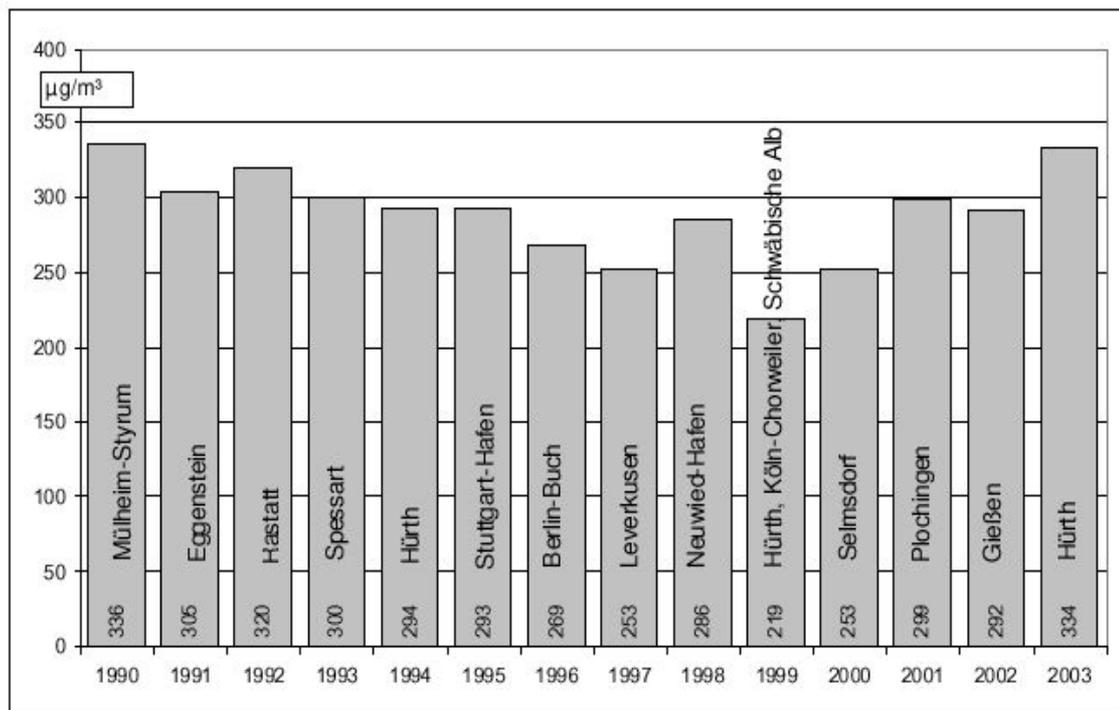


Abbildung 1 : Maximale Ozonkonzentrationen in $\mu g/m^3$ mit Angabe der registrierenden Messstelle, unabhängig von der jeweiligen Messdauer (aus [UMWELTBUNDESAMT 2003])

ppb) liegen (Abb. 1). Der Schwellenwert für die Unterrichtung der Bevölkerung liegt zur Zeit bei $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (90 ppb), der Schwellenwert zur Auslösung des Warnsystems bei $360 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [UMWELTBUNDESAMT 2003]. Bedingt durch die für die Ozonbildung günstigen meteorologischen Bedingungen im Jahre 2003 gab es in diesem Jahr an insgesamt 11425 Stunden registrierte Überschreitungen des $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Schwellenwertes.

1.2. Die Wirkung von Ozon auf die Atemwege

Ozon ist ein Oxidationsmittel und nur relativ wenig in Wasser löslich, daher erreicht es bei Inhalation die gesamte Lunge bis hin zu den Alveolen [HU 1992]. Dies konnte durch Studien mit $^{18}\text{O}_3$ an Primaten bestätigt werden [PLOPPER 1998]. Seine biologische Wirkung wird durch oxidative Schädigung von Biomolekülen (Proteinen, Lipiden) hervorgerufen. Es sind dabei insbesondere Moleküle mit Thiol- und Aminogruppen sowie ungesättigte C=C Verbindungen gefährdet [BASCUM 1996]. Aus der Reaktion mit ungesättigten Lipiden entstehen z.B. freie Radikale und intermediäre Produkte wie H_2O_2 und Aldehyde. Zunächst reagiert Ozon mit den Molekülen der Flüssigkeitsschicht (ELF), die die Oberfläche der Lunge bedeckt. Meist sind es die dabei entstehenden Reaktionsprodukte, die zur eigentlichen Zellschädigung beitragen. Das in der ELF in hohen Konzentrationen enthaltene Glutathion (in der reduzierten Form: GSH) [CANTIN 1987] sowie andere Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E und Harnstoff nehmen dabei eine wichtige Abwehrfunktion wahr [MUDWAY 1999a, MUDWAY 1999b, MUDWAY 2001]. Abbildung 2 fasst die wesentlichen Bestandteile des antioxidativen Systems der Lunge zusammen [MACNEE 2005].

Trotz dieser Abwehrmechanismen kann es zur Schädigung von residenten Leukozyten und Epithelzellen in der Lunge kommen [MUDWAY 1999b]. Diese Prozesse, die ursächlich für die durch Ozon ausgelöste Atemwegsentzündung sind, können zur erhöhten Durchlässigkeit der Epithelschicht und damit zu einer Anreicherung von Proteinen aus dem Plasma in der Lunge führen. Umgekehrt kann dies aber auch die Zugänglichkeit für Allergene in das Gewebe erhöhen sowie zur verstärkten Reizung von Nervenendigungen beitragen [BASCUM 1996].

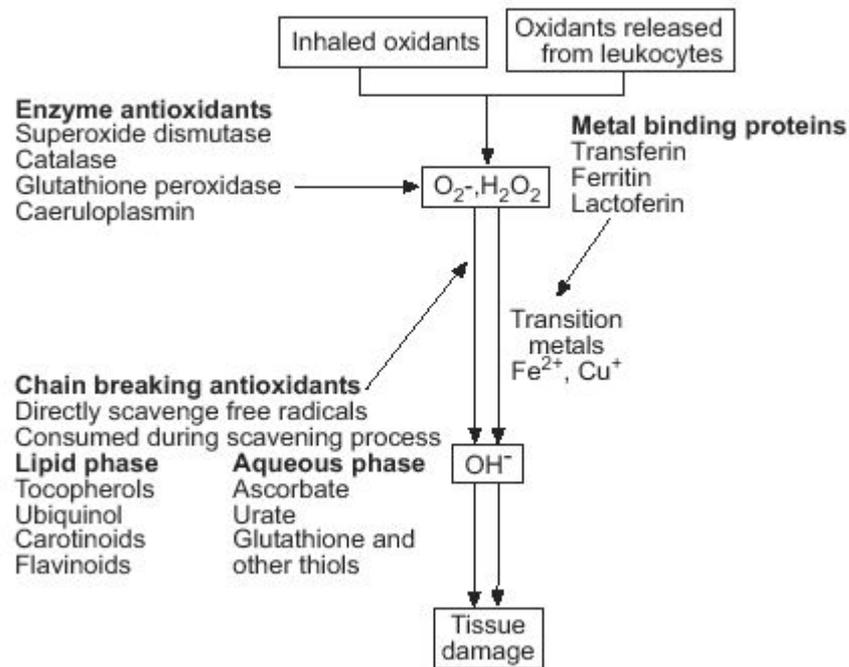


Abbildung 2: Das antioxidative System der Lunge [MACNEE 2005]

1.2.1. Lungenfunktionsantwort und Symptome

Aus epidemiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Inhalation von Ozon zu Atemwegssymptomen und zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führt [CASTILLEJOS 1992, KINNEY 1988], wobei diese Effekte bereits nach kurzzeitiger Exposition beobachtet werden [BRAUNFAHRLÄNDER 1994]. Experimentelle Ozonexpositionen konnten zeigen, dass Ozon neben Husten, Halsbeschwerden und Heiserkeit im wesentlichen Schmerzen bei der tiefen Einatmung verursacht [GOLDEN 1978] und damit für eine vorübergehende Einschränkung der inspiratorischen Kapazität (VC) verantwortlich ist. Dieser Effekt lässt sich auch anhand eines vermindertes Einsekundenvolumens (FEV₁) und einer verminderten forcierten Vitalkapazität (FVC) nachweisen [HAZUCHA 1987]. Damit führt die Inhalation von Ozon zu einer sogenannten „restriktiven Ventilationsstörung“ und nicht zu einer Obstruktion der Atemwege, bei der sich diese verengen und weniger Luft durchlassen. Die Verminderung der tiefen Einatmung wird nicht durch den Verlust der Elastizität der Lunge, durch pulmonale Ödeme oder durch eine

Verminderung der Atemmuskulaturkraft verursacht, sondern scheint auf einer neuronal vermittelten Hemmung der Inspiration zu beruhen [HAZUCHA 1989]. Es gibt Daten, die darauf hindeuten, dass dabei das Neuropeptid Substance P die im Epithel vorkommenden Nervenendigungen der C-Fasern stimuliert [COLERIDGE 1993, JOOS 2000]. Substance P wurde demgemäß nach Ozonexpositionen vermehrt in den Atemwegen gefunden [HAZBUN 1993, SCHIERHORN 2002].

Das Ausmaß der Lungenfunktionsantwort auf die Einatmung von Ozon wird durch die effektive Dosis bestimmt. Diese Dosis hängt von der Ozonkonzentration, der Menge an Luft, die inhaliert wird (Atemminutenvolumen), und der Dauer der Exposition ab [MCDONNELL 1997]. So lassen sich bei niedrigen Ozonkonzentrationen von $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (80 ppb) nur nach extremen körperlichen Belastungen (6 h Fahrradfahren mit hoher Ventilationsrate) Effekte auf die Lungenfunktion nachweisen [HORSTMAN 1990]. Bei normaler körperlicher Belastung (3 h Fahrradfahren mit moderater Ventilationsrate) wurden Effekte erst bei $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (250 ppb) Ozon nachgewiesen [DIMEO 1981].

Die Lungenfunktionsantwort auf Ozon zeigt reproduzierbare, interindividuelle Unterschiede [HOLZ 1999, MCDONNELL 1985]. Etwa 10-20 % der Bevölkerung lassen sich bezogen auf ihre Lungenfunktionsantwort je nach gewähltem Kriterium als „Responder“ bezeichnen [WEINMANN 1995], wobei Patienten mit Asthma bronchiale im Durchschnitt sehr ähnlich wie Gesunde auf Ozon reagieren [BALMES 1997, KREIT 1989]. Bekannt ist, dass die Lungenfunktionsantwort auf Ozon mit zunehmendem Alter abnimmt [MCDONNELL 1993]. Nachdem bereits im Tierversuch gezeigt werden konnte, dass die Empfindlichkeit gegenüber Ozon auch genetisch bedingt sein kann [KLEEBERGER 1997], gibt es neue Daten, die auf einen solchen Zusammenhang auch beim Menschen hindeuten. Bei der genetischen Untersuchung von Probanden, die im Krankenhaus Großhansdorf an Ozonexpositionen teilgenommen hatten, wurde eine Assoziation zwischen einem Polymorphismus im Tumor Nekrosis Faktor- α Promotor und der Lungenfunktionsantwort auf Ozon gefunden [YANG 2005].

Die wiederholte experimentelle Exposition gegenüber Ozon führt zur Toleranzentwicklung [FOLINSBEE 1994, HORVATH 1981, JÖRRES 2000b]. Dabei wird

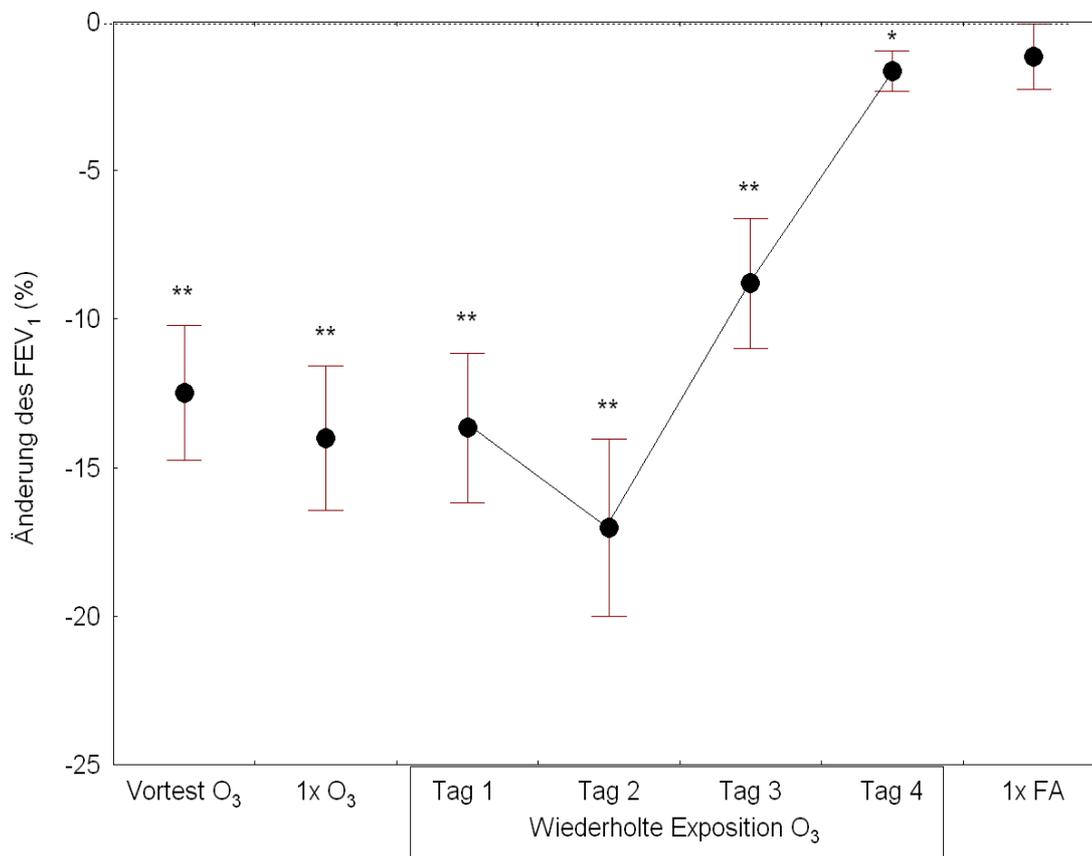


Abbildung 3: Adaptation der Lungenfunktionsantwort nach wiederholter Exposition gegenüber Ozon (aus [JÖRRES 2000b]).

der größte Effekt auf die Lungenfunktion meist an Tag 2 beobachtet. Die Einschränkung nimmt dann ab und ist an Tag 4 der Exposition nicht mehr messbar [FOLINSBEE 1994, JÖRRES 2000b] (Abb. 3).

1.2.2. Atemwegsentzündung

Die Inhalation von Ozon verursacht eine Entzündung der großen und kleinen Atemwege, deren wesentliches Merkmal der Einstrom neutrophiler Granulozyten ist [ARIS 1993, BALMES 1996, BASHA 1994, DEVLIN 1991, FRISCHER 1993, KOREN 1989, SCANNELL 1996]. Die Atemwegsentzündung lässt sich anhand der Veränderung der zellulären und biochemischen Zusammensetzung der bronchialen Spülflüssigkeit (BALF) und anhand der Untersuchung von Biopsien aus der Atemwegswand belegen. In der BALF wurden insbesondere erhöhte Konzentrationen von LDH und IL-8 beobachtet [ARIS 1993, JÖRRES 2000b], darüber hinaus auch eine Reihe weiterer Entzündungsmediatoren wie PGE₂, IL-6 und Fibronectin [DEVLIN 1991]. Auch bei der Untersuchung von Sputum aus experimentell gegenüber Ozon exponierten Probanden konnten Anstiege von IL-8 und Albumin gemessen werden [HOLZ 1999]. IL-8 ist bereits 1 h nach Ende der Exposition erhöht und wurde in einer

Reihe von BAL-Studien noch 18 h nach Exposition vermehrt gefunden [ARIS 1993]. Die Entzündungsmediatoren in der BALF und im Sputum können durch die erhöhte Permeabilität aus dem Plasma stammen oder von residenten Leukozyten oder Epithelzellen freigesetzt werden. Letzteres erscheint auf der Basis zahlreicher *in-vitro* Experimente an Makrophagen oder Epithelzellen wahrscheinlicher, da diese Zellen in Kultur nach Ozonbegasung ein ähnliches Spektrum an Mediatoren freisetzen [BASCUM 1996]. Wie bei der Lungenfunktion sind auch bei der Entzündungsreaktion reproduzierbare interindividuelle Unterschiede zu beobachten [HOLZ 1999], jedoch ist bemerkenswerterweise die Entzündungsreaktion unabhängig von der Lungenfunktionsantwort [BALMES 1996, HOLZ 1999].

Im Gegensatz zur Lungenfunktionsantwort fand sich bei der Entzündungsreaktion auf Ozon keine Toleranzentwicklung [JÖRRES 2000b]. Untersuchungen der BALF nach wiederholten Expositionen zeigten zwar einen leichten Rückgang der neutrophilen Granulozyten [CHRISTIAN 1998], aber der Anteil dieser Zellen in Schleimhautbiopsien der Bronchialwand nahm gegenüber der einmaligen Ozonexposition sogar noch zu [JÖRRES 2000b]. Darüber hinaus wiesen eine erhöhte Proteinkonzentration in der BALF [JÖRRES 2000b] und deutlich erhöhte makroskopische Bewertungen des Entzündungsgrades und der Hypervulnerabilität der Atemwege durch den bronchoskopierenden Arzt (verblindet gegenüber der Expositionart) auf eine Zunahme der Schleimhautentzündung nach wiederholter Inhalation von Ozon hin [JÖRRES 2000b].

Während der Gesamtanteil der Lymphozyten nach wiederholter Exposition zwar gegenüber einer einmaligen Ozonexposition abnahm [JÖRRES 2000b], konnte gezeigt werden, dass sich auch die Zusammensetzung der Lymphozyten-subpopulationen in der BALF änderte [HOLZ 2001]. Der Anteil der T_{Helfer} – (CD4+) Lymphozyten war nach einmaliger Exposition erhöht, stieg aber im Mittel nach wiederholter Exposition noch deutlicher an. Gleichzeitig wurde eine Abnahme der $T_{\text{Suppressor}}$ – (CD8+) Lymphozyten nach wiederholter Ozonexposition beobachtet, und die Zahl der NK-Zellen war ebenfalls nach wiederholter Exposition am niedrigsten [HOLZ 2001]. Insgesamt waren die Änderungen der Lymphozyten-subpopulationen zwar gering im Vergleich zu Änderungen, die bei manifesten Lungenerkrankungen wie z.B. der Bronchiolitis obliterans beobachtet werden [COSTABEL 1992], dennoch ist insbesondere

der Anstieg der T_{Helfer} – Lymphozyten mit der Hypothese kompatibel, dass wiederholte Ozonexpositionen zu einer veränderten Reaktion der Atemwege auf Allergen führen können. T_{Helfer} – Lymphozyten sind die wesentlichen an der immunologischen Antwort beteiligten Zellen. Durch die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 tragen T_{Helfer} – Lymphozyten vom Typ 2 (TH2-Zellen) wesentlich zur Steuerung der Allergen-induzierten Entzündung bei, während Zytokine wie IFN- γ und IL-12 aus T_{Helfer} – Lymphozyten mit einem TH1-Phänotyp diesen Vorgängen entgegenwirken [HOLGATE 1999]. Eine nähere Untersuchung des TH-Typus nach wiederholter Ozongabe [HOLZ 2001] war in der vorliegenden Studie wegen des begrenzten Probenmaterials nicht möglich.

1.2.3. Hyperreagibilität

Eine bronchiale Hyperreagibilität (BHR) ist eine verstärkte Reaktion der Atemwege auf einen unspezifischen Stimulus wie z.B. Histamin oder Methacholin. Während Lungengesunde diese Substanzen in relativ hohen Dosen (> 32 mg) inhalieren können, ohne dass es zu einer Bronchokonstriktion kommt, reagieren ca. 15 % der Bevölkerung bereits bei niedrigeren Dosen [BOULET 2003]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältiger Natur und häufig mit einem veränderten Verhalten der Atemwegsmuskulatur und Entzündungsprozessen in den Atemwegen assoziiert [GINA 2002, SOLWAY 1997]. Bei einem Abfall des FEV₁ um 20 % bei einer Provokationsdosis von < 8 mg spricht man von einer Hyperreagibilität der Atemwege, deren klinisches Korrelat z.B. ein Asthma bronchiale sein könnte [CHAI 1975].

Die Einatmung von Ozon führt zu einer vorübergehend erhöhten unspezifischen Empfindlichkeit der Atemwege; wie bei der Lungenfunktion hängt das Ausmaß der Veränderung von der Dauer der Inhalation und der inhalierten Ozonkonzentration ab [HORSTMAN 1990]. Hinsichtlich einer Toleranzentwicklung der bronchiale Reagibilität liegen widersprüchliche Berichte vor [DIMEO 1981, FOLINSBEE 1994]. Das Ausmaß der Zunahme der BHR steht nicht im Zusammenhang mit dem Ausmaß Lungenfunktionsantwort. Man kann aus der Änderung der BHR auch nicht die Veränderung der Lungenfunktionsreaktion gegenüber spezifischen Allergenen ableiten [JÖRRES 1996].

1.3. Allergie

1.3.1. Allergische Atemwegserkrankungen

Bei Allergien im allgemeinen handelt es um eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit [RING 1995]. Das heißt, es kommt zu einer unangemessenen Immunreaktion gegenüber Substanzen, die normalerweise nicht gefährlich für den Körper sind [ABBAS 1994, HOLGATE 1999]. Allergische Atemwegserkrankungen wie das allergische Asthma bronchiale und die allergische Rhinokonjunktivitis gehören dabei zu den sogenannten Typ 1 oder Soforttyp-Reaktionen, die über Immunglobulin E (IgE) vermittelt werden [STAINES 1999]. Meist liegt eine Sensibilisierung gegenüber weit verbreiteten Allergenträgern wie Pollen, Tierepithelien, Schimmelpilzen, Hausstaubmilben oder Insektengiften vor, d.h. der Körper hat gegen Bestandteile dieser Stoffe IgE-Antikörper gebildet [HOLGATE 1999]. Lassen sich IgE-Antikörper direkt nachweisen oder liegt ein positiver Hauttest (Skin-Prick-Test) für ein typisches Allergen vor, dann spricht man zunächst nur von einer Atopie. Diese kann ohne Symptome vorliegen (asymptomatische Atopie) oder sich klinisch entsprechend dem betroffenen Organ manifestieren. Reagieren die Atemwege auf das Allergen, liegt häufig ein Asthma bronchiale vor. Bei der Reaktion der Nasenschleimhäute spricht man von einer allergischen Rhinitis, ist auch die Augenbindehaut betroffen von einer (allergischen) Rhinokonjunktivitis. Die Schätzungen für das Vorliegen einer Atopie liegen bei 30-50 % der Bevölkerung [ARSHAD 2001]. In der sogenannten ISAAC Studie [ISAAC 1998] wurde versucht, durch standardisierte Befragung die Prävalenz des Asthma bronchiale und weiterer allergischer Erkrankungen im Kindesalter zu ermitteln. Man schätzt die Prävalenz weltweit auf 1,6 - 36,8 % und konnte einen Anstieg dieser Werte innerhalb wiederholter Befragungen der gleichen Populationen feststellen. Die höchsten Werte fanden sich dabei in Nordeuropa, Australien, Neuseeland und den USA. Ähnliche Werte (1,4 – 39,7 %) fanden sich für die allergische Rhinitis, ebenfalls mit steigender Prävalenz [ISAAC 1998].

1.3.2. Sensibilisierung

Die Sensibilisierung ist ein Prozess, bei dem das Allergen oder Antigen zunächst von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen oder

dendritischen Zellen aufgenommen, verarbeitet und an der Zelloberfläche präsentiert wird. Naive (TH0) Lymphozyten erkennen dieses Antigen und werden in Gegenwart des Zytokins IL-4 in TH2-Lymphozyten differenziert, die wiederum durch sezernierte Zytokine für das Antigen spezifische B-Lymphozyten zur Proliferation anregen und in IgE produzierende B-Zellen und Plasmazellen differenzieren. Das spezifische IgE gegen das Antigen wird freigesetzt und erreicht über das Blut die Schleimhäute der Atemwege oder die Haut, wo es an hochaffine Rezeptoren (FcεRI) an der Oberfläche von Mastzellen bindet. Auch niedrigaffine (FcεRII) Rezeptoren auf Eosinophilen, Makrophagen und Blutplättchen werden besetzt. [HOLGATE 1999, STAINES 1999].

1.3.3. Allergische Frühreaktion

Kommt es bei einer sensibilisierten oder atopischen Person zu einem Allergenkontakt, bindet eine spezifische Struktur des Allergens (das Antigen bzw. die entsprechenden Epitope) an das spezifische IgE und vernetzt die an den Rezeptoren sitzenden Moleküle, so dass die sterische Veränderung der Rezeptoren zu einer Degranulation und Aktivierung der Mastzelle führen [ABBAS 1994]. Die Granula enthalten unter anderem Mediatoren wie Histamin, Tryptase und Zytokine [BUSSE 2001]. Das Histamin ist dabei für die Sofortreaktion verantwortlich, denn es führt zur Kontraktion von Muskelzellen innerhalb der Atemwege und damit zur Verengung der Bronchien beim Asthmaanfall. Darüber hinaus führt es zur Vasodilatation, d.h. zur Gefäßerweiterung und erhöhten Durchblutung, sowie zur gesteigerten Schleimhautdurchlässigkeit und erhöhter Mukusproduktion [ABBAS 1994]. Letzteres führt zur typischen „laufenden Nase“ im Rahmen einer Rhinitis bzw. zur Ödembildung und damit zum Hustenreiz innerhalb der Atemwege. Beide Prozesse sollen dabei das Allergen möglichst aus dem Körper schwemmen. Verstärkt werden diese Vorgänge durch weitere Mediatoren, die über die Wirkung auf bestimmte Nervenzellen sowohl die Bronchokonstriktion wie auch die Mukusproduktion steigern können. Durch die Aktivierung beginnt die Mastzelle, unter anderem Lipidmediatoren wie Prostaglandine oder Leukotriene neu zu bilden [ABBAS 1994].

1.3.4. Allergische Spätreaktion

Die Symptomatik der Sofortreaktion klingt meist innerhalb der ersten Stunde

nach Allergenkontakt wieder ab. Die bei dieser Reaktion freigesetzten Zytokine und Lipidmediatoren setzen aber bei vielen Patienten mit Asthma oder Rhinitis eine weitere Kaskade in Gang. Dabei werden Eosinophile, Lymphozyten, neutrophile und basophile Granulozyten über chemotaktische Reize angelockt und aktiviert. Diese Vorgänge dauern in der Regel einige Stunden. Sodann setzen diese Zellen am Ort des initialen Allergenkontaktes erneut Histamin und Mediatoren frei, mit ähnlichen Folgen wie zum Zeitpunkt der Sofortreaktion [ABBAS 1994, O'BYRNE 1987]. Bei manchen Allergikern kommt es daher zu diesem Zeitpunkt zu einer erneuten Bronchokonstriktion, die darüber hinaus wesentlich länger anhalten kann und damit klinisch bedeutsamer ist. Man schätzt, dass ca. 50-60 % der Patienten mit Asthma und/oder Rhinitis diese Spätreaktion zeigen [ARSHAD 2001].

1.4. Wirkung von Ozon auf die allergische Reaktion der Atemwege

Aus epidemiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen erhöhten Ozonkonzentrationen in der Umwelt und einer erhöhten Anzahl von Krankenhauseinweisungen aufgrund von Asthma-Exazerbationen [BURNETT 1994, BURNETT 1997, CODY 1992, STIEB 1996]. Da in experimentellen Ozonexpositionen Asthmatiker aber nicht wesentlich stärker auf Ozon reagieren als Gesunde, nahm man bereits in den 90er Jahren an, dass Ozon zu einer verstärkten Reaktion auf Allergen führen könnte. Eine erste experimentelle Studie von Peden und Mitarbeitern (EPA, amerikanische Umweltbehörde) zeigte eine verstärkte Entzündung nach Ozon in Kombination mit nasaler Allergenprovokation [PEDEN 1995]. Darüber hinaus wurde eine Studie aus den Niederlanden publiziert, die eine verstärkte nasale Entzündungsreaktion nach Ozon und Allergenexposition in der Umwelt fand, aber keine synergistischen Effekte feststellen konnte [HILTERMANN 1997]. In einer Untersuchung am Krankenhaus Großhansdorf wurde hingegen nach einmaliger, experimenteller Inhalation einer hohen Ozonkonzentration eine verstärkte Lungenfunktionsreaktion auf Allergen gemessen [JÖRRES 1996]. In dieser Untersuchung wurde jedoch nur die Lungenfunktionsantwort auf Allergen betrachtet und nicht die inflammatorische Antwort bzw. potentielle Effekte auf die entzündliche Spätreaktion analysiert. Die Spätreaktion und die assoziierte Entzündung könnten jedoch von besonderer Bedeutung für die Erklärung der

epidemiologischen Daten sein, da sie als besonders klinisch relevant gelten und die Krankenhauseinweisungen aufgrund von Asthmasymptomen häufig zeitverzögert nach Ozonexpositionen beobachtet wurden.

In drei weiteren Studien, in denen jeweils einmalig und kurzzeitig sowie z.T. ohne körperliche Belastung eine relativ niedrige Ozonkonzentration inhaliert wurde, fanden sich keine oder nur begrenzte Effekte bei einigen wenigen Probanden [BALL 1996, CHEN 2004, HANANIA 1998, JENKINS 1999]. Jedoch liegt eine Studie vor, in der zunächst Asthmatiker Allergene inhalierten und sodann 24 h später gegenüber Ozon exponiert wurden. Die Ozonexposition während bzw. kurz nach der allergischen Spätreaktion führte in der Tat zu einer leichtgradig erhöhten eosinophilen Entzündung [VAGAGGINI 2002].

Seit Ende der 90er Jahre werden in Davis, Kalifornien, Untersuchungen an Primaten durchgeführt, bei denen sowohl wiederholte Ozon- wie auch wiederholte Allergenexpositionen eingesetzt werden. Das primäre Ziel dieser Arbeiten liegt in der Untersuchung des Einflusses von Umweltschadstoffen auf die allergische Sensibilisierung. Die ersten Arbeiten dieser Gruppe deuten auf eine verstärkte Lungenfunktionsantwort sowie eine verstärkte Entzündung der Atemwege nach wiederholter Ozon- und Allergeninhalation hin [SCHELEGLE 2003]. Da es sich hier um tierexperimentelle Daten handelt und der Schwerpunkt auf den möglichen Einflüssen auf die Lungenentwicklung von sehr jungen Tieren liegt [EVANS 2003, EVANS 2004], sind nur begrenzte Folgerungen hinsichtlich der möglichen Effekte von Ozonexpositionen bei bereits allergisch sensibilisierten, erwachsenen Menschen möglich.

1.5. Nichtinvasive Verfahren zum Nachweis der Atemwegsentzündung

Für die Untersuchung der Entzündungsvorgänge in den Atemwegen stehen sowohl invasive als auch nicht-invasive Verfahren zur Verfügung. Zu den invasiven Verfahren gehört die Bronchoskopie, bei der man nicht nur optisch die Atemwege begutachten, sondern auch Probenmaterial direkt aus den Atemwegen gewinnen kann, indem durch das Bronchoskop Spülflüssigkeit in die Atemwege gegeben wird. Je nach Tiefe der Spülung spricht man von bronchialer Spülung (BW) bzw. von bronchoalveolärer Spülung oder Lavage (BAL). Diese Spülflüssigkeit enthält nach dem Absaugen sowohl Zellen als auch nichtzelluläres Material, das man für eine biochemische Analyse heranziehen

kann. Durch ein Bronchoskop können auch kleine Zangen in die Atemwege eingeführt werden, um dort Schleimhautbiopsien zu entnehmen. Bronchoskopien werden heutzutage routinemäßig bei der ärztlichen Untersuchung der Lunge eingesetzt. Für wissenschaftliche Zwecke ist das Verfahren ebenfalls wertvoll und wurde im Rahmen vieler Studien verwendet. Es ist allerdings nicht ohne Belastung des Patienten durchführbar; wiederholte Untersuchungen innerhalb einer Studie sind zwar unter besonderen Umständen ethisch vertretbar, werden aber von den Probanden schwerlich akzeptiert und sind letztlich des hohen Aufwandes wegen nicht praktikabel.

Für aufwendige Studiendesigns, bei denen die Atemwegsentzündung u.U. vielfach wiederholt gemessen werden soll, werden daher heute weniger invasive Verfahren eingesetzt. Dazu gehört die Sputumuntersuchung, bei der spontan oder induziert abgehustetes Bronchialsekret (Sputum) auf biochemische und zelluläre Veränderungen hin untersucht wird. Es gibt darüber hinaus neuere Verfahren, die anhand der Analyse der ausgeatmeten Luft bzw. des Atemkondensates indirekt Rückschlüsse auf den Grad der Entzündung in den Atemwegen zulassen.

1.5.1. Sputumanalytik

Die Beschaffenheit und die Zytologie des Sputums diente bereits im 19. Jahrhundert zur Diagnose von Atemwegs- und Lungenerkrankungen; schon 1889 wurde die eosinophile Entzündung als „asthmatischer Katharr“ beschrieben [GOLLASH 1889]. Diese Untersuchungen beschränkten sich aber auf spontan produziertes Sputum. Erst 1958 wurde von Bickerman eine Methode beschrieben, Sputum mittels Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung zu induzieren [BICKERMAN 1958]. Eine vergleichbare, aber im verwendeten Stimulus mildere Methode zur Untersuchung der Atemwegsentzündung bei asthmatischen Kindern wurde 1992 von Pin und Mitarbeitern veröffentlicht [PIN 1992b]. Die Beweggründe für die neuerliche Nutzung der Sputuminduktion waren zum einen das geringere Risiko im Vergleich zur Bronchoskopie, zum anderen die Tatsache, dass nicht alle Patienten spontanes Sputum produzieren können. Auf der Methode von Pin et al. basieren heute die meisten zur Sputuminduktion verwendeten Verfahren. Zur Standardisierung der Methode des induzierten Sputums wurde 1996 die Taskforce der European Respiratory Society gebildet, und

entsprechende Empfehlungen wurden 2002 veröffentlicht [DJUKANOVIC 2002]. Bei einer Sputuminduktion wird durch Inhalation von Ultraschall-vernebelter Kochsalzlösung die Flüssigkeitsmenge in den Atemwegen erhöht. Zur Inhalation werden in der Regel hypertone Lösungen eingesetzt, so dass es zusätzlich zu einer vermehrten Mukusproduktion in den Atemwegen kommt, um die Veränderung des lokalen Milieus wieder auszugleichen [PAGGIARO 2002]. Beide Vorgänge fördern die Lockerung des die Atemwege auskleidenden Schleimes, so dass dieser auch von Gesunden oder nur leichtgradig Erkrankten ohne größere Anstrengungen abgehustet werden kann. Dieser Auswurf wird Sputum genannt und enthält sowohl Zellen als auch lösliche Mediatoren und Entzündungsstoffe aus den Atemwegen [FAHY 1993, HARGREAVE 1998, PIN 1992a]. Die wesentlichen Zelltypen sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Bei gesunden Menschen finden sich außerdem kleine Anteile von Lymphozyten sowie Flimmerepithelzellen im Sputum.

Während einer Sputuminduktion verändert sich die zelluläre und biochemische Zusammensetzung des Sputums [HOLZ 1998a]. Das zuerst abgehustete Material enthält in der Regel höhere Anteile von Neutrophilen, später im Verlauf der Induktion ist das Sputum dagegen reicher an Makrophagen [HOLZ 1998a]. Vergleicht man diese Zusammensetzung mit bronchoskopisch aus unterschiedlichen Tiefen der Atemwege gewonnenem Material [LAM 1985, MOODLEY 2000, VAN VYVE 1992], dann ist diese Veränderung der Zusammensetzung mit der Annahme kompatibel, dass das Sputum im Verlauf einer Induktion zunächst aus den zentralen oberen Atemwegen stammt, sodann zunehmend aus größeren Tiefen oder mehr peripheren Bronchien heraus gefördert wird [ALEXIS 2001, HOLZ 1998a]. Konsequenz dieser Beobachtungen ist, dass eine Induktion hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs standardisiert sein sollte [HOLZ 1998a, PAGGIARO 2002].

Die Sputuminduktion ist im Vergleich zur Bronchoskopie ein nicht-invasives Verfahren. Nur mit einer solchen Methode ist es in der Praxis möglich, wiederholte Untersuchungen der Atemwegsentzündung im Rahmen einer experimentellen Studie durchzuführen. Dennoch birgt auch eine Sputuminduktion ein gewisses Risiko, denn gerade Patienten mit empfindlichen Atemwegen können auf die Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung mit einer Bronchokonstriktion reagieren. Dies kann im Extremfall zu einer massiven

Verengung der Atemwege und somit zu einer bedrohlichen Atemnot führen. Daher werden grundsätzlich alle Probanden vor einer Sputuminduktion mit einem Medikament behandelt, das einer Verengung der Atemwege vorbeugt (β -Sympatikomimetikum). Diese Behandlung hat nachweislich keinen Einfluss auf die Sputumzusammensetzung [PAGGIARO 2002]. Zur Kontrolle sollte die Lungenfunktion in kurzen Abständen (5 min) während einer Induktion überprüft werden, um erste Symptome rechtzeitig zu erkennen und gegebenenfalls eine Induktion abbrechen zu können. Es ist weiterhin bekannt, dass die Induktion bzw. Inhalation selbst zu einer Reizung der Atemwege führt. Als Folge finden sich bis zu 48 h nach einer Induktion erhöhte Anteile von neutrophilen Granulozyten im Sputum [HOLZ 1998b].

Zur Vernebelung der Kochsalzlösungen sollten Ultraschall-Vernebler eingesetzt werden, da sich gezeigt hat, dass diese im Vergleich zu sogenannten Jet- oder Düsenverneblern größere Mengen vernebeln können. Eine Verneblerleistung von mindestens 3 mL/min Flüssigkeit hat sich als ausreichend erwiesen, um auch bei Gesunden oder leichtgradigen Asthmatikern Sputum erfolgreich zu induzieren. Im Vergleich zu den Düsenverneblern (MMAD 7,3 μ m) verfügen die Ultraschallvernebler auch über ein feineres Partikelspektrum (MMAD 4,6 μ m) und erhöhen damit den Anteil der Aerosole, der die tieferen Atemwege erreicht [HOLZ 2003].

Obwohl die Probanden angehalten sind, vor dem Abhusten des Sputums gründlich Mund und Nase zu spülen, ist das Sputum doch meist sehr stark mit Speichel kontaminiert. Bei der weiteren Aufarbeitung kann man zunächst versuchen, das eigentliche Sputum vom Speichel zu trennen, oder man nimmt das gesamte abgegebene Material für die Analyse. Die erste Methode wird als „plug selection“-Methode bezeichnet [HARGREAVE 1998], die zweite als „whole sputum“-Methode [FAHY 1993]. Letzteres Verfahren erfordert zwar zunächst weniger Aufarbeitungszeit, man erhält aber häufig sehr stark und vor allem variabel verdünnte Proben, die eine Bewertung der biochemischen Analyse erschweren. Darüber hinaus enthält dieses Material einen hohen Anteil an Plattenepithelien, d.h. Zellen, die von der Mund- und Rachenschleimhaut abgerieben werden und später die Zelldifferenzierung stark behindern können. Zwar zeigen einige Untersuchungen, dass auch mit diesem Verfahren reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können [IN'T VEEN 1996], aufgrund der

starken Kontamination mit Speichel sind diese Daten jedoch nicht unumstritten. Die Selektion der sogenannten „Sputumflocken“ aus dem Speichel ist zwar aufwendiger, hat aber deutliche Vorteile. So sind die Konzentrationen der Entzündungsmediatoren höher, für die Zelldifferenzierung stehen bessere Präparate zur Verfügung, und dieses Verfahren führt unumstritten zu sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen [PIZZICHINI 1996a, PIZZICHINI 1996b]. Die „plug-selection“-Methode wurde aus den genannten Gründen für diese und alle anderen in Großhansdorf durchgeführten Studien gewählt, bei denen die Atemwegsentzündung mittels Sputuminduktion gemessen wurde [HOLZ 1998b, HOLZ 1998a, HOLZ 1999, RICHTER 1999, TAUBE 2001].

Nach der Selektion der Sputumflocken müssen diese zunächst homogenisiert werden. Dazu wird als Wirkstoff Dithiothreitol (DTT) zum Sputum gegeben, das durch seine reduzierenden Eigenschaften die Disulfidbrücken im Mukus aufbricht und dadurch den Schleim verflüssigt. Nach diesem Schritt lassen sich dann Zellen und Sputumüberstand durch Zentrifugation voneinander trennen. Die Zellen werden gezählt, ihre Vitalität überprüft; sie werden dann durch ein spezielles Verfahren (Zytospin) auf Objektträger zentrifugiert. Die Zellen sind dort optimal verteilt und lassen sich mikroskopisch differenzieren. Der Sputumüberstand wird zunächst eingefroren. Entzündungsmediatoren werden mittels Immunoassays analysiert, sobald eine ausreichende Anzahl an Proben erreicht ist und ein Immunoassay wirtschaftlich durchgeführt werden kann. Bei der Analyse der Sputumüberstände kann sich die Zugabe von DTT negativ auswirken, denn auch die Proteine, die analysiert werden sollen, können durch die DTT-Behandlung in ihrer Konformation geändert werden und damit für spezifische Antikörper ggf. nicht mehr erkennbar sein [KELLY 2002]. Das DTT kann auch bei der Analyse die Reagenzien und Antikörper in den entsprechenden Immunoassays beeinflussen. Daher sind Vorversuche über die Eignung von Sputumüberständen für eine Analyse unumgänglich [KELLY 2002].

Die Normwerte der zellulären Sputumzusammensetzung hängen zum Teil von der benutzten Induktions- und Aufarbeitungsmethode ab [DJUKANOVIC 2002]. Die neutrophilen Granulozyten (20-40 %) stellen zusammen mit den Makrophagen (60-80 %) den Hauptanteil der Zellen. Alle übrigen Zelltypen zusammen machen in der Regel weniger als 1-3 % aus. Ein Anteil an eosinophilen Granulozyten über 3 % deutet auf eine zugrundeliegende allergische Erkrankung

oder Hyperreagibilität der Atemwege hin [JAYARAM 2000]. Deutliche Anstiege werden nach Allergenexposition beobachtet [GAUVREAU 1999b]. Erhöhte Zahlen neutrophiler Granulozyten finden sich im Rahmen von Infekten sowie nach unspezifischen Reizungen der Atemwege, z.B. nach Kochsalzinhalation [HOLZ 1998c] oder Inhalation von Ozon [HOLZ 1999]. Bei der durch Zigarettenrauchen verursachten chronisch-obstruktiven Bronchitis sind die Anteile der neutrophilen Granulozyten ebenfalls deutlich erhöht [KEATINGS 1997, RICHTER 1999, TAUBE 2001].

1.5.2. Stickstoffmonoxid in der Ausatemluft

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines, relativ unstabiles Molekül, das als Botenstoff, bei der Vasodilatation (Gefäßerweiterung) [IGNARRO 1987] und im Rahmen der Infektabwehr [TSAI 1997] eine wichtige Rolle im Körper spielt. NO wird von NO-Synthasen (NOS; EC 1.14.13.39) durch Oxidation der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin produziert [NATHAN 1992]. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOSII) kann dabei im Vergleich zu anderen NO-Synthasen wesentlich größere Mengen produzieren [MORRIS, Jr. 1994]. Eine Induktion findet z.B. im Rahmen von Entzündungsreaktionen in der Lunge statt. Das NO, das in den Atemwegen größtenteils durch Epithelzellen produziert wird [KOBZIK 1993], kann mit Hilfe von schnellen und sensitiven Detektoren online, d.h. direkt beim Ausatmen, nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze der NO-Analysatoren liegt bei 1-5 ppb. 1993 wurde erstmals beschrieben, dass die Konzentration von ausgeatmetem NO (eNO) bei Asthmatikern erhöht ist [ALVING 1993]. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von Publikationen, die belegen, dass man durch die nicht-invasive Messung von NO in der Ausatemluft wertvolle Hinweise auf das Vorliegen einer Atemwegsentzündung erhalten kann [Exhaled nitric oxide - a noninvasive marker for inflammation 2005, ATS 2005]. Das eNO wird durch die Behandlung mit Corticosteroiden deutlich abgesenkt, da ein Steroid die Entzündungsprozesse dämpft und die Expression der NO-Synthasen abreguliert [KHARITONOV 2000]. Erst kürzlich veröffentlichte Arbeiten belegen darüber hinaus den klinischen Nutzen des Verfahrens im Rahmen der Asthma Diagnose [SMITH 2004] und Therapieeinstellung [SMITH 2005a, SMITH 2005b].

Während die NO-Konzentration in den unteren Atemwegen bei Gesunden selten 30 ppb überschreitet, finden sich in der Nase Konzentrationen bis zu 1000

ppb, in den Nasennebenhöhlen sogar bis zu 20 ppm [LUNDBERG 1995]. Um bei der Ausatmung eine Kontamination der Luft aus den unteren Atemwegen mit Luft aus dem Nasenraum zu vermeiden, atmet man bei der Messung gegen einen Widerstand aus, denn dadurch wird das Gaumensegel geschlossen [ATS 2005].

Die NO-Konzentration in der Ausatemluft hängt von der Flussgeschwindigkeit ab [JÖRRES 2000a, SILKOFF 1997]. Atmet man mit konstantem Fluss aus, steigt die NO-Konzentration zunächst an und erreicht dann einen Plateauwert [JÖRRES 2000a]. Diese beiden Phänomene lassen darauf schließen, dass das eNO in den Bronchien gebildet wird, wie auch mathematische Modellrechnungen belegen konnten [JÖRRES 2000a]. Das sogenannte NO-Diffusionsmodell teilt die Lunge in 2 Kompartimente auf, zum einen ein alveoläres Kompartiment, zum anderen eine bronchiale Röhre, in der im wesentlichen das ausgeatmete NO gebildet wird (Abb. 4).

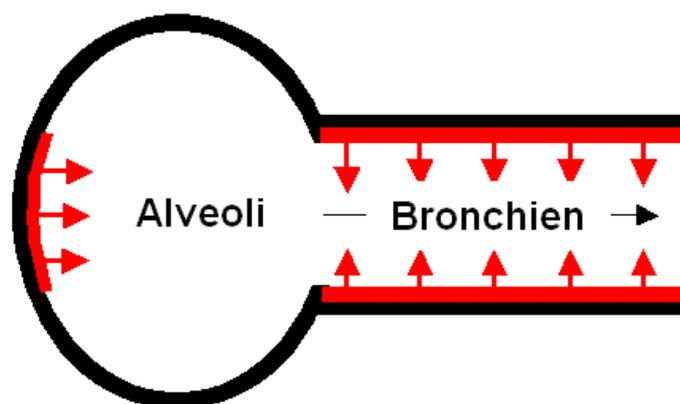


Abbildung 4: Modell der Lunge bestehend aus 2 Kompartimenten. Luft aus den Alveolen passiert mit einer bestimmten Flussrate die Bronchien. Dabei diffundiert das NO von der bronchialen Wand in das Lumen. Die NO-Konzentration in der bronchialen Wand wird als konstant angenommen. Die Konzentration im Lumen hängt von der Flussgeschwindigkeit und dem Konzentrationsgefälle ab [aus JÖRRES 2000a].

Die Plateaubildung kann nach dem Modell dadurch erklärt werden, dass zunächst nur Luft den Analysator erreicht, die die „NO-produzierende Röhre“ nicht vollständig passiert und damit nur teilweise NO aufgenommen hat. Ab einem bestimmten Zeitpunkt erreicht dann nur noch Luft den Analysator, die komplett durch die Bronchien geströmt ist, wodurch die Konzentration konstant bleibt. Bei schneller Ausatmung besteht wenig Zeit für den NO-Transfer von der Bronchialwand in das Lumen, die eNO-Konzentration und das Plateau sind

niedrig, bei langsamer Ausatmung hingegen steht mehr Zeit zur Verfügung und die eNO-Konzentration ist höher. Der Verlauf der Funktion (Flussgeschwindigkeit gegen eNO-Konzentration) wird darüber hinaus noch durch das NO-Konzentrationsgefälle zwischen Atemwegswand und Luftstrom sowie durch etwaige Diffusionswiderstände, z.B. aufgrund von Mukus oder verfügbarer bronchialer Oberfläche, beeinflusst [JÖRRES 2000a]. Baut man auch diese Faktoren in das Modell ein, so ergibt sich eine hervorragende Übereinstimmung zwischen den realen Messpunkten und der vorhergesagten Funktion (Abb. 5).

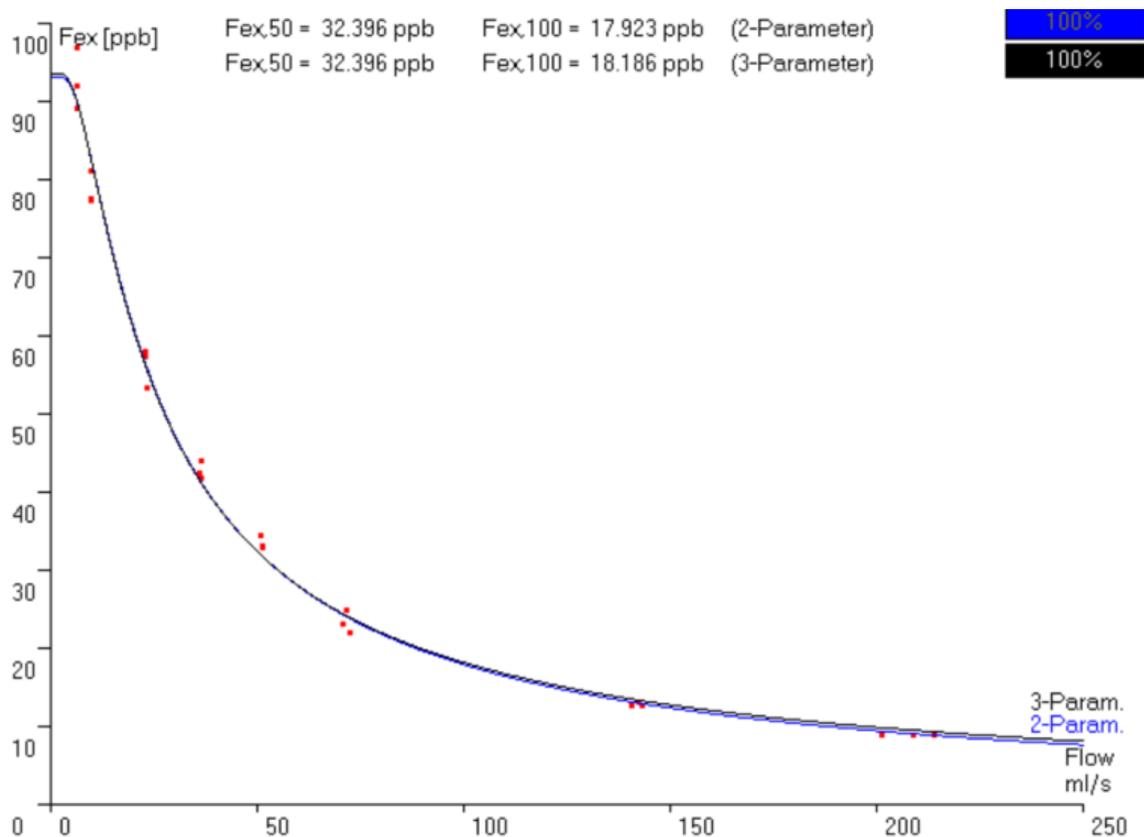


Abbildung 5: Vergleich zwischen realen Messpunkten und den nach dem NO-Diffusionsmodell [JÖRRES 2000a] berechneten Funktionen. Das 2-Parameter-Modell setzt die alveoläre NO-Konzentration bei einer theoretisch unendlich großen Flussgeschwindigkeit auf 0, beim 3-Parameter-Modell werden diese Konzentrationen berechnet und ergeben einen Wert < 5 ppb. ($F_{ex\ 50}$ = eNO-Konzentration beim Ausatemfluss 50 mL/s).

Internationale Richtlinien empfehlen die eNO-Messung bei einer Flussrate der Ausatemluft von 50 mL/s [ATS 2005]. In dieser Studie wurde das eNO bei bis zu 5 verschiedenen Flussraten gemessen und mit Hilfe des Modells der Wert bei 50 mL/s exakt berechnet.

1.5.3. Atemkondensat

Neben der Messung von eNO gehört auch die Messung von Substanzen im Atemkondensat (EBC) zu den nicht-invasiven Verfahren zum Nachweis der Atemwegsentzündung [HORVÁTH 2005, HUNT 2002]. Der Einsatz dieses Verfahrens im Rahmen dieser Studie hatte aber weitgehend explorativen Charakter, da diese Methode in der Entwicklung noch nicht so weit fortgeschritten ist wie die Sputumanalyse oder die Messung von eNO [EFFROS 2002, VAN BEURDEN 2005]. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist eine der am besten untersuchten Substanzen im Atemkondensat [HORVÁTH 2005, SCHLEISS 2000, VAN BEURDEN 2005]. Jedoch ist über den genauen zellulären Ursprung sowie die Beeinflussung durch Art und Umfang der Atemwegsentzündung wenig bekannt [HORVÁTH 2005]. Es gibt nur einen Kongressbericht (Abstrakt) über erhöhte H_2O_2 Werte nach Ozoninhalation [MADDEN 1996]. Weiterhin sind Fragen der Langzeitreproduzierbarkeit ungeklärt. Daher war es das Ziel, im Rahmen dieser Studie die Eignung dieser Methode zum Nachweis der Atemwegsentzündung im Vergleich zum Sputum zu testen.

EBC wird durch Kondensation der ausgeatmeten Luft gewonnen. Der Proband atmet dazu mit normaler Atemfrequenz durch einen Kühler aus, der auf mindestens $-10^\circ C$ heruntergekühlt ist. In dem Kühler strömt die Luft durch inerte Sammelgefäße, z.B. Teflonschläuche, und kondensiert. Dabei werden neben Wasserdampf auch Aerosolpartikel in der Ausatemluft mit abgeschieden. Bei jeder Ausatmung werden ca. $0,1 - 4$ Aerosole/ cm^3 mit einer mittleren Größe von $0,3 \mu m$ ausgeatmet. Es wurde spekuliert, dass diese durch turbulente Strömungen in den Atemwegen entstehen [FAIRCHILD 1987], doch ist eine Erzeugung im peripheren Lungenbereich durch temporäres Kollabieren und Öffnen von Atemwegen viel wahrscheinlicher. Über die Herkunft des H_2O_2 , das im Atemkondensat gemessen wird, ist nicht viel bekannt [HORVÁTH 2005]. Es wird angenommen, dass H_2O_2 das Ausmaß der oxidativen Prozesse in den Atemwegen widerspiegelt [VAN BEURDEN 2005]. Ein wesentlicher Anteil basiert dabei auf der Aktivität von Entzündungszellen, die reaktive Sauerstoffradikale im Rahmen der Infektabwehr produzieren. Ein weiterer Hinweis darauf, dass insbesondere neutrophile Granulozyten eine Quelle des H_2O_2 im EBC sind, konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe erbracht werden [WEWEL 2006]. Zusammen mit bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe, die

eine Flussabhängigkeit des H_2O_2 analog der des eNO zeigen [SCHLEISS 2000], lässt dies die oberen Atemwege, die reich an Neutrophilen sind [HOLZ 1998a], als vermutlich primäre Quelle des ausgeatmeten H_2O_2 erscheinen. Neuere Daten zeigen auch, dass die Konzentration von H_2O_2 im EBC einer zirkadianen Rhythmik mit Peakkonzentrationen um 12:00 und 24:00 Uhr und den niedrigsten Konzentrationen um 8:00 und 20:00 Uhr unterliegt [JÖRRES 2002, NOWAK 2001].

H_2O_2 oder in entsprechenden Assays reaktives Material kommt auch im Speichel in hohen Konzentrationen vor, daher muss bei der Sammlung darauf geachtet werden, dass das EBC nicht durch Speichel kontaminiert wird. Dies wird durch entsprechendes Unterbrechen der Sammlung und Herunterschlucken von Speichel sowie durch eine vorgeschaltete Speichelfalle erreicht. Zur Kontrolle wird darüber hinaus die Konzentration von α -Amylase im EBC gemessen. Dieses Enzym kommt in hohen Konzentrationen nur im Speichel vor, und nachweisbare Werte im EBC deuten auf eine Kontamination hin [HORVÁTH 2005].

H_2O_2 ist in wässrigen Lösungen in niedriger Konzentration instabil und zerfällt innerhalb kurzer Zeit auch in Proben, die bei -70°C oder -192°C gelagert werden. Die im EBC gefundenen Werte von gesunden Probanden liegen zwischen $0,05$ und $1,5 \mu\text{M}$ und lassen sich in diesem Konzentrationsbereich mit verschiedenen Methoden nachweisen. Die photometrische Analyse gelingt durch Zugabe von TMB und Peroxidase, allerdings muss die Probe unmittelbar nach der Gewinnung vermessen werden. Dies ist häufig, wie auch in dieser Studie, aus logistischen Gründen nicht möglich. Als sehr geeignet hat sich dagegen der fluorometrische Nachweis erwiesen [HYSLOP 1984]. Hier wird der Probe nach der Sammlung p-Hydroxyphenylacetic acid (PHPA) und Peroxidase zugesetzt. Die Peroxidase setzt das H_2O_2 mit dem PHPA quantitativ in eine fluoreszierende Substanz (2,2'-dihydroxy-biphenyl-5,5'-diacetat) um. Unmittelbar nach der Zugabe und kurzem Mischen ist diese Reaktion bereits abgeschlossen; das Produkt ist dann über Monate bei -20°C stabil, so dass eine zeitlich verzögerte Analyse der gesammelten Proben möglich wird [HYSLOP 1984].

2. Fragestellung

Die Fragestellung dieser Untersuchung und die Wahl der Methoden und des Untersuchungsprotokolls basierte auf einer Reihe von Überlegungen, die im folgenden dargestellt sind.

Epidemiologische Studien zeigen, dass Ozon den Zustand von Patienten mit Asthma bronchiale in signifikanter Weise verschlechtern kann und dass es nach Perioden erhöhter Ozonkonzentrationen in der Umwelt zeitverzögert zu vermehrten Krankenhauseinweisungen kommt. Studien mit experimenteller Ozonexposition von Probanden mit Asthma haben aber keine Unterschiede in der Änderung der Lungenfunktion im Vergleich zu Gesunden beobachten können. Folglich ist anzunehmen, dass bei der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Ozon und dem sich daraus ergebenden Gesundheitsrisiko mögliche Verstärkungsmechanismen wie beispielsweise eine Allergenreaktion eine wichtige Rolle spielen könnte. Tatsächlich konnte man zeigen, dass Ozon die akute bronchiale Lungenfunktionsantwort auf Allergen bei Patienten mit Asthma und sogar bei Probanden mit allergischer Rhinitis verstärken kann. Bislang ungeklärt ist dagegen die Frage, ob Ozon auch die entzündliche allergische Reaktion verstärken kann, insbesondere die Spätreaktion, die als klinisch besonders relevant erachtet wird. Die Inhalation von Ozon führt zu einer Atemwegsentzündung, die im wesentlichen durch den Einstrom von Neutrophilen charakterisiert ist. Die Inhalation von Allergenen hat bei Gesunden keinen Effekt, kann aber bei einer vorliegenden Allergie, insbesondere bei Patienten mit Asthma bronchiale, zu einer primär eosinophilen Atemwegsentzündung führen. Eine durch Allergene hervorgerufene oder verstärkte Entzündung ist meist die Ursache für die funktionelle Symptomatik, insbesondere die Atemnot, die bei Asthmatikern zur Krankenhauseinweisung führt. Ob und in welchem Ausmaß eine Ozonexposition die durch Allergene ausgelöste Atemwegsentzündung verstärkt, war somit eine zentrale Frage dieser Untersuchung.

Basierend darauf sollte in dieser Untersuchung sowohl die Lungenfunktionsantwort als auch die Atemwegsentzündung zum Zeitpunkt der Spätreaktion nach sequentieller Inhalation von Ozon und Allergen möglichst detailliert erfasst werden.

Bedingt durch das aufwendige Versuchsdesign wurden ausschließlich nicht-invasive Verfahren eingesetzt, wie die Sputuminduktion, der Nachweis von NO in

der Ausatemluft und die Messung von H_2O_2 im Exhalat. Im Sputum wurden neben der zellulären Zusammensetzung auch die Konzentrationen von LDH, Histamin, Tryptase und Nerve-Growth-Factor (NGF) in der Flüssigphase gemessen. LDH ist ein Marker für Zellschädigung. Erhöhte Mengen von LDH finden sich im Sputum, wenn nekrotische Zellen unkontrolliert zerfallen und damit zellinterne Substanzen freisetzen. Histamin und Tryptase werden von Mastzellen ausgeschüttet und sind Mediatoren der allergischen Reaktion und Entzündung. Diese Ausschüttung wird durch Vernetzung der IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche der Mastzellen durch allergenspezifische Immunglobuline E (IgE) vermittelt. Neutrophine wie NGF werden unter anderem vom Epithel produziert und können das Überleben von eosinophilen Granulozyten verlängern. NGF induziert die Aktivierung von Immunzellen und wird beim allergischen Asthma in der BALF vermehrt gefunden. Nach Ozon- und Allergenexposition könnte NGF daher für verstärkte Entzündungsprozesse mit verantwortlich sein.

Ein weiteres Ziel der Untersuchung war somit, durch vergleichende Analyse die Eignung verschiedener nichtinvasiver Entzündungsmarker zur Detektion einer möglichen verstärkenden Wirkung von Ozon auf die entzündliche Allergenantwort zu bestimmen.

Perioden erhöhter Ozonwerte umfassen häufig mehrere Tage, und wiederholte Ozonbelastungen können in den Atemwegen zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führen, obwohl gleichzeitig eine Adaptation der Lungenfunktionsantwort zu beobachten ist. In diesem Zusammenhang spielen vermutlich individuell verschiedene funktionelle Anpassungsmechanismen auf Ozon eine wichtige Rolle.

Als weitere Frage sollte daher im Rahmen dieser Untersuchung die sowohl pathophysiologisch als auch umweltmedizinisch relevante Frage beantwortet werden, inwieweit eine wiederholte, niedrigdosierte Ozonexposition im Vergleich zu einer einmaligen, hochdosierten Ozonexposition die allergische Früh- und Spätreaktion verändert.

Die Wahl der Expositionsmodi basierte auf folgenden Überlegungen. Es gibt nur wenige experimentelle Studien, in denen freiwillige Probanden gegenüber Ozon in umweltrelevanter Konzentrationen exponiert wurden. Meist waren dann die Expositionszeiten bzw. die Ventilationsraten sehr hoch gewählt, um überhaupt

Effekte von Ozon messen zu können. In dieser Studie erfolgten alle Expositionen über 3 Stunden und bei mittelgradiger Ventilationsrate, so dass bei Exposition gegenüber 250 ppb Ozon, die als Positivkontrolle gewählt wurde, mit deutlichen Effekten auf die Lungenfunktion und die Atemwegsentzündung, aber nicht mit massiven Reaktionen zu rechnen war. Außerdem wurde unter diesen Expositionsbedingungen die Verstärkung der akuten Allergenantwort (Frühreaktion) bereits beschrieben. Zur Kontrolle, inwieweit die körperliche Anstrengung durch Fahrradbelastung während Exposition einen Einfluss auf die Reaktion hat, wurden alle Probanden an einem Versuchstag gegenüber gefilterter Luft exponiert. Basierend auf den Erfahrungen vorangegangener Studien mit wiederholten Ozonexpositionen erschien die Kombination einer hohen Ozonkonzentration (>200ppb) mit einer Allergenprovokation als für die Praxis weniger relevant, zumal in der Grundhypothese dieser Studie von einer Verstärkung der Allergenreaktion durch niedrigere Ozondosen ausgegangen wurde.

Daher wurde für die wiederholte, experimentelle Ozonexposition erstmals eine umweltrelevante Konzentration von 125 ppb gewählt; entsprechend wurde eine zum Vergleich nötige einmalige Exposition gegenüber 125 ppb in das Versuchsdesign aufgenommen.

Eine weitere Frage war die nach dem zweckmäßigen Zeitpunkt der Allergengabe. Die Allergenprovokation erfolgte jeweils am Morgen nach der einmaligen Exposition bzw. nach wiederholter Exposition über 4 Tage, somit zu einem Zeitpunkt, zu dem ein Ozoneffekt noch anhält und messbar ist. Dieser Ansatz hatte ferner den Vorteil, dass die allergischen Früh- und Spätreaktionen mit den gewählten, teils zeitaufwendigen Methoden zu den optimalen Zeitpunkten im Labor erfasst werden konnten. Ferner wurde festgelegt, dass alle Testungen in zufälliger Reihenfolge und im Abstand von mindestens 4 Wochen stattfanden, um Übertragseffekte durch die Allergenprovokation zu vermeiden.

Die Verwendung nicht-invasiver Verfahren machte es möglich, jeden Probanden im Rahmen eines Versuchsdesigns, das einen Vortest (Probandenauswahl und Basischarakterisierung) und 4 Haupttestungen umfasste, mehrmals zu untersuchen. Somit war jeder Proband seine eigene Kontrolle und es konnten die unterschiedlichen individuellen Reaktionen auf die vier verschiedenen Expositionen mit maximaler statistischer Teststärke (power) miteinander verglichen werden.

Als weitere interessante Frage hatten die vorangegangenen Untersuchungen die Möglichkeit aufgezeigt, dass auch Patienten mit allergischer Rhinitis ohne Asthma eine bronchiale Allergenantwort nach kombinierter Gabe von Ozon und Allergen zeigen konnten. Basierend darauf waren drei Gruppen mit unterschiedlicher Ausprägung allergischer Atemwegserkrankungen von Interesse. Im Mittelpunkt standen Personen mit mittel- bis leichtgradigem allergischem Asthma bronchiale, bei denen eine deutliche bronchiale Reaktion auf Allergene auch ohne Ozoninhalation bereits vorher bekannt war. Darüber hinaus sollten Personen mit allergischer Rhinitis, aber ohne asthmatische Beschwerden, untersucht werden, bei denen Allergene in der Regel keine Symptome in den unteren Atemwegen verursachen. Diese Gruppe ist auch deshalb von Interesse, weil sie in der Bevölkerung mehr Personen als die Gruppe der Asthmatiker umfasst. Zusätzlich wurde als notwendig erachtet die Untersuchung einer kleinen Gruppe von asymptomatischen Atopikern, d.h. von Patienten, die zwar eine Allergie im Hauttest, aber keinerlei Atemwegssymptome aufwiesen. Diese Kontrollgruppe diente dazu, zu testen, ob eine Ozonexposition in der Lage war, die Reaktionsschwelle sogar bei bislang stets symptomlosen Personen zu verändern.

Aus diesem Grunde wurden drei Gruppen von Personen mit vorbestehender Allergie, jedoch einer Abstufung der Symptomatik als interessante Untersuchungsgruppen identifiziert.

Somit sollte diese Untersuchung die folgenden spezifischen Fragen beantworten:

1. Führt die Inhalation von Ozon in umweltrelevanten Konzentration zu einer verstärkten bronchialen Allergenempfindlichkeit am Tage nach der Exposition?
2. Ist neben der akuten Frühreaktion auch die als klinisch relevant erachtete allergische Spätreaktion verstärkt?
3. Führt eine wiederholte Ozonexposition zu stärkeren Effekten auf die allergische Früh- und Spätreaktion als eine einmalige Exposition?
4. Ändert sich neben den funktionellen Größen auch die Atemwegsentzündung als besonders wichtige Kenngröße der Ozon- und Allergenreaktion?
5. Lassen sich derartige Effekte nicht nur direkt im induzierten Sputum, sondern auch indirekt durch die Messung von Entzündungsparametern in der ausgeatmeten Luft nachweisen?

6. Ist es möglich, die vermuteten kombinierten Wirkungen einer Ozon- und Allergeninhalation auch bei Patienten mit allergischer Rhinitis ohne gleichzeitiges Asthma bronchiale auszulösen?

3. Material und Methoden

3.1. Protokoll der Untersuchung

Alle Probanden wurden durch Anzeigen und ähnliche Maßnahmen rekrutiert und nahmen freiwillig an der Untersuchung teil. Sie wurden zunächst voruntersucht, um die Eignung für die Studie festzustellen. Die Voruntersuchungen wurden an insgesamt 3 Tagen durchgeführt (V1-V3):

- V1. Anamnese, klinische Untersuchung, Lungenfunktion sowie Test auf die Fähigkeit, induziertes Sputum in genügend hoher Qualität zu produzieren. Die Daten dieser Sputumtestung gingen als Ausgangswerte in die Untersuchung ein.
- V2. Laboruntersuchung, spezifisches IgE, Haut-Pricktest, EKG, Messung von NO in der Ausatemluft und H₂O₂ im Exhalat, Methacholinprovokation als Dosiswirkungskurve.
- V3. Inhalative Provokation mit einem anamnestisch bekannten Allergen als Dosiswirkungskurve.

Es wurden nur solche Probanden in die Studie eingeschlossen, die Sputum in ausreichender Qualität produzieren konnten. Patienten mit Asthma wurden eingeschlossen, wenn der Abfall der Lungenfunktion nach Allergenprovokation mindestens 15 % betrug, da *per definitionem* eine positive Allergenreaktion gefordert war ($\Delta FEV_1 \geq 15\%$).

Die vier Haupttestungen (FA, H, N, W) erfolgten in zufälliger Reihenfolge und im Abstand von mindestens 4 Wochen, um Übertragseffekte 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 (der Proband war gegenüber der Art der Exposition in diesen Fällen verblindet); 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 eine Allergenprovokation. Das Protokoll ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt und im Folgenden detailliert beschrieben:

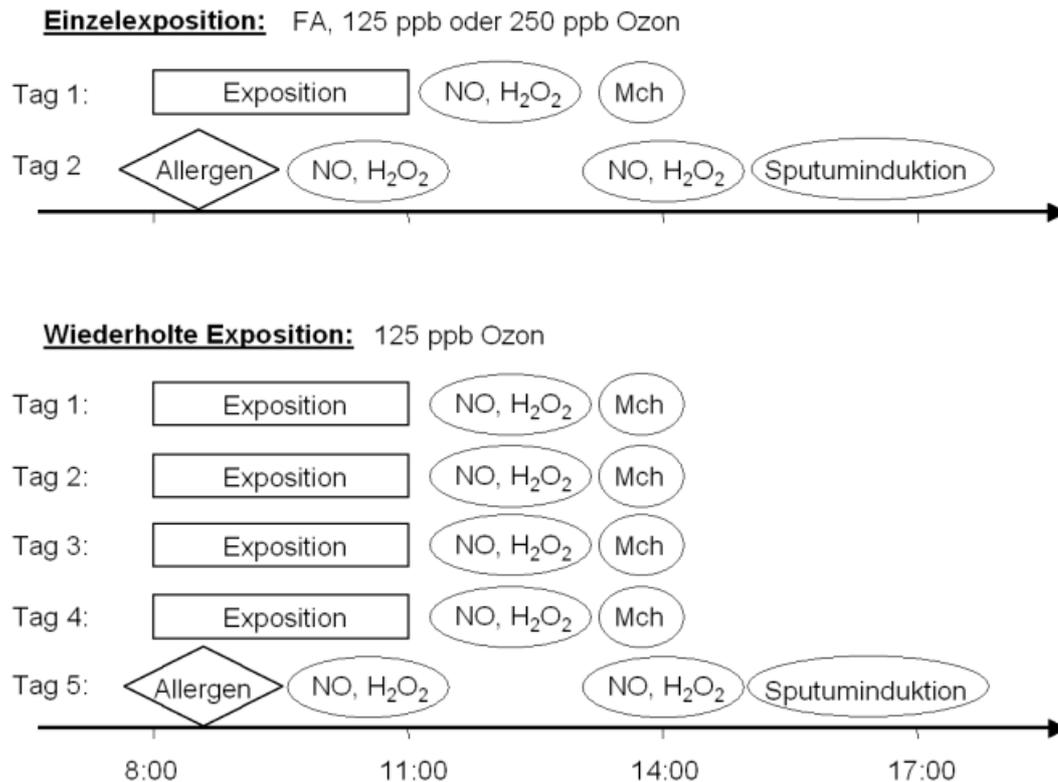


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns.

- FA1. Zwischen 8:00 und 9:00 Uhr begann die 3-stündige Exposition gegenüber gefilterter Luft. Anschließend Messung von NO und H₂O₂; 1 h danach wurde die Methacholinempfindlichkeit mittels einer Einmaldosis gemessen. 30 min später verließ der Proband das Labor.
- FA2. Am nächsten Morgen inhalierten die Probanden das ausgewählte Allergen als Einmaldosis 20 h nach Exposition. Die Lungenfunktion wurde zunächst alle 15 min, sodann alle 30 min gemessen. 3 h nach Allergengabe wurden NO und H₂O₂ gemessen. Es erfolgte eine Sputuminduktion 6 h nach Allergengabe.
- H1. Der Ablauf an Tag H1 glich dem an Tag FA1 mit der Ausnahme, dass die Probanden statt gefilterter Luft eine hohe Konzentration von Ozon (250 ppb = 500 µg/m³) einatmeten.
- H2. wie Tag FA2.
- N1. Der Ablauf an Tag N1 glich dem an Tag FA1 mit der Ausnahme, dass die Probanden statt gefilterter Luft eine niedrige Konzentration von Ozon (125 ppb = 250 µg/m³) einatmeten.

N2. wie Tag FA2.

W1-W4. An vier aufeinanderfolgenden Tagen war der Ablauf jeweils der gleiche wie an Tag FA1. Jedoch atmeten die Probanden jeweils die niedrige Ozonkonzentration (125 ppb = 250 µg/m³) ein.

W5. wie Tag FA2.

3.2. Probanden

22 Probanden mit allergischer Rhinitis, 11 Probanden mit allergischem Asthma bronchiale und 5 Probanden mit asymptomatischer Atopie wurden in die Untersuchung eingeschlossen (Tabelle 1). Alle Probanden zeigten im Hauttest auf mindestens ein Allergen eine positive Reaktion. Ferner waren alle Probanden Nichtraucher und mindestens 3 Monate ohne Einnahme von inhalativen oder systemischen Kortikosteroiden. Inhalative β -Adrenozeptor-Agonisten wurden mindestens 8 h vor den Untersuchungen nicht appliziert. Alle Probanden wurden außerhalb ihrer jeweiligen Allergensaison getestet und mussten mindestens 3 Wochen vor einer Testung frei von Atemwegsinfekten sein. Als Kompensation und Anerkennung für die Zeit, die die Probanden für die Untersuchung aufbringen mussten, wurde eine Aufwandsentschädigung gezahlt. Die Untersuchung wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Landes Schleswig-Holstein begutachtet und für unbedenklich befunden. Alle Probanden gaben nach einer ausführlichen Information das schriftliche Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

3.3. Methoden

3.3.1. Messung der Lungenfunktion

Die Lungenfunktion wurde gemäß internationalen Richtlinien und Empfehlungen [QUANJER 1993] mittels einer Spirometrieinheit (Jaeger/Viasys, Würzburg) gemessen. Nach 2-3 Atemzügen zur Einstellung der Atemruhelage atmeten die Probanden soweit wie möglich aus, atmeten dann so tief wie möglich ein (Differenz = langsame inspiratorische Vitalkapazität, VC), und versuchten anschließend, so schnell wie möglich die gesamte Luft auszuatmen.

Tabelle 1: Probanden-Charakteristika (*geometrisches Mittel)

Nr.	G.	Alter (y)	Gr. (cm)	Gew. (kg)	FEV ₁ L (ist)	FEV ₁ (% soll)	PC ₂₀ FEV ₁ mg/mL*	IgE IU/mL*	gewähltes Allergen	RK	RK (U)	PD ₁₅ FEV ₁ E/mL*
asymptomatische Atopie												
1	w	30	177	75	3,79	104,08	8,34	n.a.	Milbe	4	24,8	0,2
2	w	35	168	68	4,34	137,30	32	99	Katze	0	0	0,5
3	w	28	160	50	2,77	91,72	3,03	37	Lieschgras	1	0,5	0,5
4	w	20	172	65	3,62	101,43	32	167	Gräser	2	1,2	0,5
5	w	32	158	52	3,40	119,68	32	30	Katze	0	0	0,5
Mittelwert		29	167	62	3,6	110,8	15,3	65,5		1,4	5,3	0,42
SD		6	8	11	0,6	17,9	2,9	2,3		1,67	10,9	1,51
Rhinitis												
1	w	24	168	53	3,31	97,04	16	341	Lieschgras	4	19,9	0,0997
2	m	39	180	74	3,49	84,73	24,57	36	Erle	3	11,7	0,024
3	m	41	184	84	5,56	131,35	32	452	Erle	5	93,6	0,2
4	m	33	175	68	4,98	122,12	32	8,1	Birke	2	2,8	0,5
5	m	31	182	72	4,77	107,51	16	47	Erle	3	8,2	0,1
6	m	27	186	91	5,46	115,56	32	75	Roggen	4	11,4	0,2
7	m	20	182	74	5,46	118,41	32	335	Lieschgras	4	40,1	0,0586
8	w	33	165	59	3,73	120,61	3,45	474	Roggen	4	33,9	0,0456
9	w	21	170	56	3,18	91,12	1,57	154	Lieschgras	3	13,8	0,5
10	m	48	168	80	3,97	118,79	32	31	Lieschgras	2	3,2	0,2
11	m	19	186	65	4,62	96,59	32	63	Milbe	4	17,9	0,156
12	w	32	169	60	3,16	96,47	32	130	Lieschgras	4	36,3	0,912
13	m	32	183	73	4,60	98,84	18,07	155	Lieschgras	5	55	0,024
14	m	32	188	80	5,03	103,31	0,765	313	Lieschgras	5	63,7	0,0043
15	m	33	184	75	5,24	118,90	32	75	Roggen	3	10,2	0,0287
16	w	32	173	63	3,39	94,60	10,21		Birke	3	16,9	0,0856
17	m	33	185	90	5,36	115,92	32	114	Lieschgras	3	4,7	0,1
18	m	32	180	75	4,86	107,40	32	164	Erle	4	30,1	0,1
19	m	32	180	73	4,71	107,53	32	57	Birke	4	26,2	0,5
20	m	32	174	63	4,47	104,76	1,28	35	Lieschgras	2	0,9	0,5
21	m	33	186	80	5,11	106,84	32	155	Lieschgras	4	35	0,0896
22	w	32	168	52	3,09	98,53	32	75	Roggen	3	9	0,1
Mittelwert		29	178	71	4,4	107,1	15,8	102,1		3,5	24,8	0,10
SD		7	7	11	0,9	11,8	3,3	2,8		0,9	22,9	3,20
Asthma bronchiale												
1	m	20	178	74	3,63	81,8	0,096	113	Milbe	4	29,3	0,0066
2	m	33	169	61	3,76	98,4	2,03	78	Katze	3	7,1	0,0114
3	m	28	182	93	5,00	110,5	0,087	224	Milbe	5	77,5	0,0073
4	m	28	178	65	4,26	97,9	2,39	87	Milbe	3	8,5	0,154
5	m	36	172	73	3,97	102,8	0,377	59	Lieschgras	3	15,3	0,052
6	w	20	165	56	2,95	89,6	0,124	230	Roggen	4	34	0,00123
7	w	40	164	70	3,45	119,9	3,08	59	Lieschgras	3	15,5	0,0111
8	w	22	180	77	4,47	115,1	1,04	486	Roggen	5	100	0,00516
9	w	53	157	50	2,16	94,9	0,61	326	Lieschgras	4	30,4	0,0058
10	w	28	168	77	3,34	100,1	1,09	268	Birke	3	5	0,133
11	m	24	190	76	4,54	91,6	0,799	185	Birke	4	44,1	0,044
Mittelwert		30	173	70	3,8	100,2	0,6	153,1		3,7	33,3	0,02
SD		10	10	12	0,8	11,3	3,6	2,1		0,8	30,5	4,49

Abkürzungen: G = Geschlecht, Gr. = Körpergröße, Gew. = Körpergewicht, RK = Rastklasse, RK (U) = Rastklasse (Units spezifisches IgE)

Das Luftvolumen der forcierten Ausatmung wurde über 1 s gemessen (forciertes expiratorisches Volumen, FEV₁) und das gesamte exhalierte Volumen bis zur nächsten Einatmung wurde bestimmt (forciertes expiratorisches Volumen, FVC). Es wurden in der Regel (ausgenommen Einzeltestungen während der Sputuminduktion) 3 Messungen durchgeführt (max. 5 % Abweichung) und die Messung mit dem höchsten Wert wurde als gültiger Wert ausgewählt und dokumentiert. Außerhalb des Labors wurde das FEV₁ mit Hilfe einer mobilen Messeinheit (AMOS, Jaeger/Viasys, Würzburg) erfasst [RICHTER 1998], deren Daten über eine Schnittstelle am Computer ausgelesen werden konnten.

3.3.2. Messung der Hyperreagibilität

Die Messung der unspezifischen Empfindlichkeit der Atemwege wurde mit Hilfe der Methacholinprovokation nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt [CHAI 1975]. Zu Beginn von fünf langsamen Einatemmanövern, die vom Residualvolumen zur totalen Lungkapazität erfolgten, wurde jeweils ein Aerosolbolus von 0,6 Sekunden Dauer mit Hilfe eines Verneblers (DeVillbiss 646) und medizinischem Sauerstoff (2 bar, Linde, Hamburg) erzeugt. Zwischen den einzelnen tiefen Inspirationen lagen 1-3 normale Atemzüge, um die Wiederherstellung der endexpiratorischen Atemruhelage sicherzustellen. Die Auslösung des Bolus war semiautomatisch per Atemzug gesteuert. Insgesamt wurden in den fünf Verneblungen 75 µL Flüssigkeit vernebelt. Diese Menge wurde durch regelmäßiges Auswiegen der Verneblertöpfchen im Laufe der Studie sichergestellt. Nach jeder Befüllung mit einer Konzentration wurde der Vernebler mit Aqua dest. gespült, danach mit 2 mL der nächsten Konzentrationsstufe befüllt und 2x ohne Inhalation ausgelöst (um die Befüllung des Kapillarsystems sicherzustellen). Die Methacholinlösungen zum Inhalieren wurden vor jeder Testung durch Verdünnung einer Stammlösung von Methacholinchlorid in Phosphatpuffer (pH 7,6 Neuansatz alle 2-4 Wochen; Synopharm, Barsbüttel) frisch hergestellt. Nach Messung der Ausgangslungenfunktion inhalierten die Probanden zunächst Phosphatpuffer und dann Methacholinchlorid in sich verdoppelnden Konzentrationen (maximal 16-32 mg/mL). Die Anfangskonzentration richtete sich nach der bekannten oder

aufgrund der Anamnese vermuteten Atemwegsempfindlichkeit. 3 und 6 Minuten nach jeder Inhalationsstufe wurde die Lungenfunktion gemessen. Die Provokation wurde beendet, wenn das FEV₁ um mindestens 20 % gegenüber dem Ausgangswert abgenommen hatte oder die maximale Methacholin-Konzentration erreicht war. Eine normale Provokationstestung dauerte ca. 30 – 60 min. Aus der Auftragung des FEV₁ gegen den Logarithmus der Konzentration wurde durch lineare Interpolation zwischen benachbarten Konzentrationen diejenige Provokationskonzentration von Methacholin (in mg/mL) ermittelt, die zu einem Abfall von genau 20 % im FEV₁ führte (PC₂₀FEV₁). Bei der in dieser Studie eingesetzten Methode lag die Grenze zwischen normaler und gesteigerter Atemwegsempfindlichkeit bei 8 mg/mL [JÖRRES 1997].

Der PC₂₀FEV₁ wurde in den Voruntersuchungen bestimmt, während in den Haupttestungen nur bis zum 15%-igen Abfall von FEV₁ entsprechend PC₁₅FEV₁ provoziert wurde, um die Probanden so wenig wie möglich zu belasten und den Einfluss dieser ein gewisses Maß von Intervention beinhaltenden Untersuchung auf den Gesamttablauf möglichst gering zu halten. Die Methacholinprovokationen wurden ausschließlich von speziell geschulten medizinisch-technischen Assistentinnen durchgeführt.

3.3.3. Allergietest und Allergenprovokation

Die Sensibilisierung gegenüber Allergenen wurde bei allen Probanden zunächst mit Hilfe des Hautpricktests gemessen. Hierbei wurde ein Satz von verbreiteten Allergenen (ALK Scherax, Hamburg) teilweise als Allergenmischung (Gräser / Getreide, Gräser, Kräuter, Bäume I (Frühblüher), Bäume II (Mittelblüher), Federn, Pilze I (Alternaria und andere), und Pilze II (Aspergillus und andere)), teilweise als Einzelallergene (Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides farinae* und *D. pteronyssinus*), Hausstaub, Hamster, Hund, Kaninchen, Katze, Meerschweinchen, Pferd, Rind, Schaf, Sittich, Kanarienvogel, Küchenschabe, Speisemilbe, Seide) eingesetzt. Gegebenenfalls wurden auch weitere Einzelallergene getestet (z.B. Birke, einzelne Gräser), um die stärkste spezifische Sensibilisierung des jeweiligen Probanden zu bestimmen. Der Hauttest wurde gemäß einer standardisierten Vorgehensweise an der Innenseite des Unterarms durchgeführt (entsprechend der im Rahmen der klinischen Diagnostik am

KH Großhansdorf üblichen Methode). Dabei wurden zunächst die Allergenlösungen an mit einem Stift markierten Stellen des Unterarms aufgetragen und dann wurde die Haut innerhalb des Tropfens, jeweils mit einer frischen Lanzette, eingeritzt, so dass das Allergen in die oberste Hautschicht eindringen konnte. Nach einer Wartezeit von 15 min wurde der Durchmesser der entstandenen Hautquaddel gemessen und dokumentiert. Wenn die mitgeführten Negativkontrollen (Kochsalz) und Positivkontrollen (Histamin) eindeutig waren, galt eine Sensibilisierung als positiv, wenn die erzeugte Quaddel > 4 mm Durchmesser hatte. Basierend auf dem Ergebnis der Hauttestung wurde das spezifische IgE des entsprechenden Allergens im Serum überprüft (CAP-Test, Pharmacia, Freiburg, Durchführung des Tests durch das klinische Labor des KH Großhansdorf) und für die Testungen zur bronchialen Provokation ausgewählt.

Während eine Methacholinprovokation unspezifisch bei allen Probanden mit überempfindlichen Atemwegen zu einer Bronchokonstriktion führt, bewirkt die Inhalation eines Allergens nur bei einer vorliegenden Sensibilisierung der Atemwege eine Verengung und Atembeschwerden. Für die bronchiale Allergenprovokation wurde dieselbe Verneblereinheit benutzt wie für die Methacholinprovokation. Auch hier wurde zunächst der Ausgangswert der Lungenfunktion ermittelt, sodann wurde physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle und anschließend das Allergen in sich verdoppelnden Konzentrationen inhaliert. Die Allergenlösungen wurden vor jedem Test frisch aus kommerziell erhältlichen standardisierten Stammlösungen hergestellt (ALK Scherax, Hamburg), und es wurde versucht, möglichst für jeden einzelnen Probanden dieselbe Charge während der fünf Visiten zu gebrauchen, um die intraindividuelle Variabilität gering zu halten. Die Provokation wurde beendet, wenn es zu einem Abfall im FEV_1 von $\geq 20\%$ kam oder wenn eine maximale Konzentration von 50 % der vom Hersteller der Allergene empfohlenen inhalativen Menge erreicht war. Die Lungenfunktion wurde analog zur Methacholinprovokation 3 und 6 min nach jeder Inhalationstufe gemessen. Nach Beendigung der Provokation wurde darüber hinaus die Lungenfunktion alle 15 min über mindestens 1 h regelmäßig gemessen, um das Ende der Sofortreaktion zu erfassen, die als der maximale Abfall der Lungenfunktion innerhalb der ersten Stunde definiert war. Der weitere Verlauf der

Lungenfunktion wurde stündlich mittels einer mobilen Spirometrieinheit (AMOS, Jaeger, Würzburg) aufgezeichnet. Die Probanden wurden gebeten, auch außerhalb der Klinik bis möglichst spät in den Abend die Aufzeichnungen fortzusetzen, um gegebenenfalls sehr späte Reaktionen auf das Allergen erfassen zu können. Der gesamte Verlauf des FEV₁ nach der Allergenprovokation wurde gegen die Zeit aufgetragen und die Fläche unter der Kurve berechnet. Je kleiner diese Fläche war, desto stärker war das FEV₁ eingeschränkt. Darüber hinaus wurde der maximale Abfall des FEV₁ 3-14 h nach Allergeninhalation bestimmt und dieser Wert als Spätreaktion definiert.

Aus der Auftragung der Lungenfunktion gegen den Logarithmus der kumulierten Allergenkonzentrationen wurde durch lineare Interpolation die Dosis ermittelt, bei der es zu einem Abfall des FEV₁ um genau 20 % kam (PD₂₀FEV₁). Um einer möglichen Verstärkung der Allergenreaktion nach Ozonexposition Raum zu gewähren, wurde während der Haupttestungen nur eine Einmaldosis verabreicht, die der errechneten PD₁₅FEV₁ (analog PC₁₅FEV₁ von Methacholin) entsprach. Die Allergenprovokationen wurden ausschließlich von speziell geschulten medizinisch-technischen Assistentinnen durchgeführt, und es musste aus Sicherheitsgründen immer ein Arzt in der Nähe sein.

3.3.4. Ozonexposition

Die Expositionsapparatur wurde speziell für die Ozon-Untersuchungen [JÖRRES 1996] am Krankenhaus Großhansdorf hergestellt [LABS 1992] und beinhaltete ein Mischsystem zur Erzeugung ozonhaltiger Luft (0 – 400 ppb). Medizinische Pressluft aus der Krankenhausversorgung wurde dazu durch ein Filtersystem geleitet und sodann in einem Edelstahlbehälter mit einem temperaturregulierten Wasserbad befeuchtet. Anschließend wurde in einer aus Teflon gefertigten Mischstrecke mit Hilfe eines computergesteuerten Massendurchflussreglers (Sierra Instruments, Monterey, USA) Ozon beigemischt; die Regelung war auf einem Computer in Form eines PID-Regelalgorithmus realisiert [LABS 1992]. Das Ozon wurde durch einen Ozongenerator (Sorbios, Berlin) nach dem Prinzip der stillen Entladung aus medizinischem Sauerstoff (Linde, Hamburg) erzeugt und der Istwert der Konzentration mit Hilfe eines UV-Analysators (Thermo Electron Cooperation, Franklin, USA) ermittelt. Der Analysator wurde regelmäßig durch die Umweltbehörde der Stadt Hamburg

überprüft und kalibriert. Die Mischluft strömte in einen Verteiler, in dem sie drei Wege nehmen konnte. Erstens in einen Pufferballon, an dessen Einlass die Messung der Istwerte von Ozonkonzentration, relativer Feuchte und Temperatur erfolgte. Der Ballon diente als Reservoir für die Probanden, um durch die durch die stoßweise Atmung entstehenden Strömungsspitzen abzufangen. Zweitens konnte die Luft in eine durch ein Ventil abgesicherte Nebenstrecke fließen, um die nicht vom Probanden benötigte Luft dem Abluftkanal zuzuführen. Drittens strömte die Luft über einen Teflon-Wellschlauch zu einem aus Plexiglas gefertigten Zweiwegeventil (Jaeger, Würzburg) mit geringem Strömungswiderstand und einem Mundstück, durch das die Probanden das Ozon-Luft-Gemisch einatmeten. Um die Bewegungsfreiheit des Probanden auf dem Fahrrad zu ermöglichen, war die Ventil-Mundstückeinheit an einem verstellbaren Arm befestigt. Während der Untersuchung saß der Proband in den Belastungsperioden auf einem Fahrradergometer (Tunturi, Turku, Finnland) oder in der Ruhephase auf einem Stuhl neben der Expositionseinheit und atmete die Luft mit der voreingestellten Ozonkonzentration ein. Der Proband trug dabei eine Nasenklammer und atmete durch das Zweiwegeventil ein und aus. Die ausgeatmete Luft wurde durch einen beheizten Pneumotachographen (Jaeger/Viasys, Würzburg) geführt und die jeweilige Atemfrequenz und das Atemzugvolumen aufgezeichnet. Der bei langdauernder Mundstückatmung unvermeidliche Speichel wurde direkt am Mundstück entsprechend abgeführt. Alle mit Ozon in Berührung kommenden Teile und Schläuche waren aus Teflon oder Edelstahl gefertigt. Die während der Exposition erhobenen Messdaten der Temperatur, Feuchte, Ozonkonzentration, Atemzugvolumen, Atemfrequenz und Sauerstoffsättigung des Blutes sowie Pulsfrequenz (mittels Pulsoximeter und Ohrsensor gemessen) wurden an einem Computer aufgezeichnet und dokumentiert. Dadurch, dass gefilterte Luft im Mischsystem Verwendung fand, war auch an Tagen mit erhöhter Ozonkonzentration bzw. generell erhöhten Schadstoffmengen in der Außenluft sichergestellt, dass bei Bedarf nur Ozon-freie Luft geatmet wurde bzw. dass keine anderen Luftschadstoffe eingeatmet wurden. Die Exposition folgte an allen Untersuchungstagen immer dem gleichen Protokoll. Die Probanden wurden für insgesamt 3 h in alternierenden Intervallen von jeweils 15 min fahrradergometrischer Belastung und 15 min in Ruhe exponiert. Nach jedem Zyklus von 30 min Dauer konnte der Proband bei Bedarf kurz vom

Mundstück abgehen, etwas trinken oder kurz etwas essen (< 5 min). Nach jeder Stunde wurde aus Sicherheitsgründen die Lungenfunktion überprüft. Die Ergometerbelastung war im Vortest bereits so eingestellt worden, dass der Proband die 3-stündige Exposition ohne Erschöpfungserscheinungen durchhalten konnte. Dabei wurde versucht, eine durchschnittliche Pulsfrequenz von ca. 110 Schlägen/min und ein Atemzugvolumen von 25-30 L/min einzustellen.

3.3.5. Sputuminduktion

Die Sputuminduktion erfolgte nach einem im Forschungslabor Großhandorf etablierten Verfahren [HOLZ 1998b] analog zu internationalen Empfehlungen [DJUKANOVIC 2002]. Zu Beginn der Induktion wurde die Ausgangslungenfunktion gemessen und dann ein β -Sympatikomimetikum (Salbutamol) inhaliert und 10 min bis zum Wirken des Medikamentes gewartet. Dann wurde die Lungenfunktion erneut gemessen, um einen Ausgangs- bzw. Bezugswert für die Kontrolle der Veränderung während der Induktion zu erhalten. Eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion durch das Medikament (d.h. eine Broncholyse) war ein Zeichen dafür, dass bereits eine Einschränkung der Lungenfunktion vorlag und es gegebenenfalls zu einer Lungenfunktionsreaktion auf die Kochsalzinhalation kommen konnte.

Die ersten 5 min der Induktion wurden 3 % Kochsalzlösung aus einem Ultraschallvernebler (MMD: 4,9 μ m, mittlere inhalierte Menge: 1,72 mL/min; Omron, Tokyo, Japan) inhaliert. Dann wurde erstmals die Lungenfunktion überprüft und der Proband versuchte, Sputum abzuhusten. Dieser Schritt wurde zunächst mit 3 % für weitere 5 min wiederholt, dann wurde für 2 x 5 min 4 % und für 2 x 5 min 5 % Kochsalzlösung inhaliert. Zwischen allen Schritten wurde jeweils versucht abzuhusten und entsprechend die Lungenfunktion überprüft. Ein Abfall des FEV₁ um mehr als 20 % gegenüber dem Ausgangswert führte zu einem Abbruch der Induktion.

Alle Probanden wurden bei der ersten Induktion ausführlich über den Ablauf informiert und instruiert, wie man Sputum gewinnt. Dabei wurde ein sogenanntes „Huffing“, d.h. eine forcierte, stossartige Ausatmung in leicht vorgebeugter Haltung empfohlen, um das Sputum soweit in den Rachenraum zu befördern, dass es bereits durch ein leichtes Husten in den Mund befördert werden konnte. Das Sputum wurde vom Probanden in eine Petrischale gege-

ben. Noch während der Proband weiter inhalierte, wurde versucht, das Sputum soweit wie möglich vom Speichel zu trennen. Die Sputumproben der drei aufeinanderfolgenden Inhalationsperioden von 10 min Dauer wurden jeweils getrennt gesammelt, aufgearbeitet und analysiert. Die Induktion und Aufarbeitung wurden innerhalb eines Excel-Spreadsheets protokolliert. Sämtliche nötigen Berechnungsschritte wurden dabei automatisch durchgeführt.

3.3.6. Sputumaufarbeitung und Sputumanalyse

Das Sputum wurde innerhalb von 2 h nach Produktion aufgearbeitet und in der Zwischenzeit kühl gelagert [DJUKANOVIC 2002]. Zunächst wurde das Sputum nach Zugabe von Sputolysin[®] (Calbiochem, Bad Soden) für 15 min bei 37°C homogenisiert und dann mit Phosphatpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) auf eine 20-fache Endverdünnung eingestellt. Nach der Trennung von Zellen und Überstand durch Zentrifugation (600 x g, 10 min, RT) wurde der Überstand vorsichtig entfernt, erneut zentrifugiert (1000 x g, 5 min, RT), um möglichst alle Restzellen zu entfernen, aliquotiert, und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. In einem Aliquot wurde sofort die Konzentration von Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Die Zellen wurden in Phosphatpuffer (1 % Rinderserum-Albumin, Sigma, München) resuspendiert und gezählt. Mit Hilfe einer Zytozentrifuge (Shandon, Astmoor, UK) wurden 20.000 - 40.000 Zellen auf eine Fläche mit ca. 0,5 cm Durchmesser auf einem Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden für 5 min in Methanol/Aceton (1:1, Merck, Darmstadt) fixiert und dann mit Giemsa-Lösung (Merck) für 10 min gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgte durch Zählung von 400 nicht-plattenepithelialen Zellen durch mindestens zwei unabhängige, gegenüber der Exposition verblindete Auswerter. Die Werte der beiden Auswerter wurden gemittelt. Bei Abweichungen von > 10 % wurde ein dritter Auswerter hinzugezogen und die Analyse wiederholt. Beide Auswerter bewerteten die Güte der Präparate auf einer 5-Punkt-Skala von 0-2 (0 = nicht auswertbar, 2 = sehr gut). Die Bewertungen wurden gemittelt; Präparate, die von beiden Auswertern mit 0 bewertet wurden, wurden nicht in die Analyse genommen. Für die Qualitäts- und Plausibilitätsbewertung wurden die Sputumdaten der 3 Induktionsperioden getrennt betrachtet. Es wurde anhand dieser Daten auch überprüft, ob die getrennte Auswertung zusätzliche Informationen gegenüber den gewichteten Mittelwerten lieferte. Für die Auswertung

der Expositionseffekte auf die Atemwegsentzündung nach Allergeninhalation wurde die gepoolte Sputumzusammensetzung herangezogen. Dazu erfolgte eine nach der Sputummenge pro Induktionsperiode gewichtete Mittelwertbildung der Daten, die pro Periode erhalten wurden [HOLZ 1998b, HOLZ 1999]. In den Sputumüberständen wurde die Aktivität von LDH, sowie die Konzentrationen von Histamin, Tryptase und Nerve-growth-factor (NGF) gemessen. Die Messung von LDH musste im Gegensatz zu den anderen Nachweisverfahren sofort nach Gewinnung des Sputums durchgeführt werden, da die Aktivität nach Lagerung bei -80°C deutlich vermindert ist (Photometer Cobas Mira, Roche). Die Analyse der Parameter im Sputumüberstand wurde an gepoolten Sputumproben aus den 3 aufeinanderfolgenden Inhalationsperioden vorgenommen, um die Kosten der Analyse in Grenzen zu halten. Dazu wurden die Überstände entsprechend nach Produktionsmenge gewichtet, zusammengeführt und vermischt. Für die Analyse der Tryptase wurde ein Aliquot schonend durch Gefriergetrocknung um den Faktor 4 aufkonzentriert. Der Nachweis von Histamin erfolgte mittels ELISA (IBL, Hamburg), Tryptase wurde mittels FEIA (Pharmacia&Upjohn, Freiburg) und NGF mittels ELISA (Roche, Mannheim) gemessen.

3.3.7. Nachweis von Stickstoffmonoxid in der Ausatemluft

Für die Untersuchung wurde ein Chemilumineszenz-Analysator (NOA 280 Nitric Oxide Analyser, Sievers Instruments, Boulder, Colorado, USA) eingesetzt, der kontinuierlich die NO-Konzentration in der über einen Teflonschlauch und einen Gegenstromtrockner eingesaugten Luft ermittelte. Das Messprinzip basiert auf der spezifischen Reaktion von NO mit einem Überschuss von Ozon, das in dem Analysator hergestellt wird. Bei dieser Reaktion werden proportional zur vorhandenen NO-Menge Photonen erzeugt, die sensitiv über einen Photomultiplier detektiert werden. Der Analysator war an einen PC angeschlossen. Über ein im Labor entwickeltes Programm wurden zum einen die Daten der Messung online gespeichert, zum anderen die Daten eines Drucksensors (GDH 12 A, Greisinger electronic, Regenstauf) eingelesen und in Form einer Linie am Bildschirm dargestellt, um dem Probanden bei der Messung ein visuelles Feedback zu geben [MIDANI 1998]. So konnte dieser den Druck bei der Ausatmung mit sehr hoher Präzision bei 20 mbar entsprechend der Zielflussrate halten.

Der Proband atmete bei der Messung zunächst NO-freie Luft (Krankenhausversorgung, < 1 ppb) über einen Schenkel eines Ventils (Jaeger/Viasys, Würzburg) ein und dann über den anderen Schenkel wieder aus. An der Ausatemseite des Ventils war über einen Adapter ein Widerstand eingebaut, der die Flussrate bestimmte. An diesem Ventil waren auch die Anschlüsse für den Teflonschlauch, der zum NO-Analysator führte, sowie für den Drucksensor angebracht. Es wurden in dieser Untersuchung bei bis zu 5 verschiedenen Flussraten die eNO-Konzentration bestimmt. Bei den Widerständen handelte es sich um handelsübliche Schweißdüsen mit unterschiedlichen Bohrungsdurchmessern und vorher bestimmten Fluss-Druck-Kennlinien. Bei einem Druck von 20 mbar konnten so die Flussraten 33, 48, 69, 140 und 207 mL/s eingestellt werden [LOHMANN 1998, SONNEMANN 1997]. Der NO-Analysator wurde mit zertifizierten Eichgasen (Messer Griesheim, Krefeld) geeicht und die Drift über den Tag durch regelmäßige Messungen korrigiert.

Die eNO-Messung wurde immer vor der Sputuminduktion durchgeführt, um eine Beeinflussung der Messung durch die Kochsalzinhalation zu vermeiden [BEIER 2003]. Der Proband wurde instruiert, zunächst tief auszuatmen, dann an das Mundstück zu gehen und bei zugehaltener Nase durch den Mund tief einzuatmen. Am Ende der Einatmung wurde die Nase geöffnet und versucht, entsprechend dem Feedback auf dem Bildschirm einen Druck von 20 mbar schnell aufzubauen und möglichst lange exakt einzuhalten. Nach der ebenfalls auf dem Bildschirm sichtbaren Einstellung eines Plateauwertes wurde die Messung durch den Operator beendet.

Das Auswerteprogramm ermittelte über zwei verschiedene mathematische Modelle den eNO-Wert beim exakten Ausatemfluss 50 mL/sec (das 2-Parameter-Modell setzte die alveoläre NO-Konzentration automatisch auf 0, das 3-Parameter-Modell berechnete aus den Messungen auch eine alveoläre Konzentration, allerdings um den Preis einer eventuellen Instabilität der Abschätzung [JÖRRES 2000a, JÖRRES 2002]) Für die eNO-Auswertung wurden nur die Werte des 2-Parameter-Modells herangezogen.

3.3.8. Atemkondensat

Das Atemkondensat wurde nach der NO-Messung gesammelt. Dazu atmete der Proband im Sitzen für 15 min über ein Ventil Raumluft ein und durch

gekühlte Teflonschläuche (10 mm Durchmesser, 40 cm Länge) aus. Der Proband trug dabei eine Nasenklammer, so dass stets auch durch den Mund eingeatmet werden musste. Die Schläuche wurden durch einen Kühler während der Sammlung im Mittel auf -13°C gehalten. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schläuche entnommen, das gefrorene Exhalat mittels eines Stößels aus den Schläuchen in sterile Plastikröhrchen geschoben und dort sofort aufgetaut und weiterverarbeitet. Zunächst erfolgte eine Volumenbestimmung des Exhalats (2 – 3 mL, abhängig von der Atemfrequenz und dem Ventilationsvolumen), dann wurde ein Aliquot von 200 μL für die sofortige Amylasebestimmung (Laborautomat COBAS, Roche, Basel) und ein weiteres Aliquot von 300 μL für die H_2O_2 -Bestimmung abgefüllt. Zu letzterem Aliquot wurden 6 μL eines vorbereiteten Meerrettich-Peroxidase-Ansatzes (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Boehringer, Mannheim) und 5 μL PHPA (Endkonzentration 0,04 mM, Sigma, München) gegeben, vermischt und die Probe sofort bei -20°C eingefroren. Die Messung der H_2O_2 -Konzentration erfolgte am Fluorometer (LS-50, Perkin Elmer, Norwalk, USA). Die Proben wurden mit 295 nm angeregt, die Emission bei 405 nm gemessen und über eine Eichgerade (0,015 - 2 μM) in die entsprechende Konzentration umgerechnet.

3.3.9. Statistik

Arithmetische Mittelwerte sowie die Standardfehler (SEM) wurden für die Messgrößen berechnet, die eine Normalverteilung zeigten. Lag keine Normalverteilung vor, wurden geometrische Mittelwerte und SEM (ausgedrückt als Faktor) berechnet, falls die Annahmen einer log-Normalverteilung erfüllt waren. Anderenfalls wurden die Daten entsprechend mittels Median und Quartilenabstand beschrieben. Für die statistischen Vergleiche wurden die Daten, wenn nötig, logarithmisch transformiert und mittels einfaktorieller ANOVA oder ANOVA mit Messwiederholung untersucht. *Post-hoc*-Vergleiche erfolgten mittels der Newman-Keuls-Methode oder mit Duncan's Test. Für einzelne Vergleiche wurde ggf. der paarige Rangtest nach Wilcoxon herangezogen. Fisher's Exakter Test wurde zur Analyse von Kontingenztafeln verwandt und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zur Quantifikation von Korrelationen. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Statistika 5.1 (Statsoft, Tulsa, USA).

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der Gruppen in den Voruntersuchungen

Die im Rahmen der Voruntersuchung ermittelten Ausgangswerte sind in Tabelle 1 dargestellt. Das mittlere Alter der Gruppen war vergleichbar, jedoch fanden sich Unterschiede in der Geschlechtsverteilung; dadurch zeigte sich bei der Größe ein leichter Unterschied zwischen den Gruppen (ANOVA $p < 0,01$). Bei der Lungenfunktion lagen alle Gruppen im Mittel über 100 % vom Sollwert und waren nicht signifikant verschieden; tendenziell lagen die Werte der Asthmatiker am niedrigsten. Wie zu erwarten, zeigten die Probanden mit Rhinitis oder asymptomatischer Atopie im Vergleich zu den Patienten mit Asthma bronchiale eine geringere unspezifische Überempfindlichkeit ($PC_{20}FEV_1$) der Atemwege ($p < 0,001$). Beide Gruppen reagierten auch erst auf eine ca. 10-fach höhere Dosis von Allergen ($PD_{20}FEV_1$) ($p = 0,0004$). Bei vier Probanden mit allergischer Rhinitis und bei einem asyptomatischen Atopiker wurde eine leichtgradige Überempfindlichkeit der Atemwege beobachtet ($PC_{20}FEV_1 < 8 \text{ mg/mL}$), ohne dass diese Probanden anamnestisch jemals asthmatische Beschwerden angaben.

Auch beim IgE-Spiegel im Blut und bei der Rastklasse waren die Werte erwartungsgemäß bei den Asthmatikern im Mittel am höchsten. Nach der Allergenprovokation im Vortest fiel die Spätreaktion bei den Asthmatikern am stärksten aus. Der Median (IQR) lag bei 16,1 (11,2; 30,2) % Abfall im FEV_1 , während bei den asyptomatischen Atopikern 5,2 (0,0; 8,4) % und bei den Rhinitikern 9,3 (1,4; 14,1) % gemessen wurden (ANOVA $p = 0,013$). Rhinitiker und Asthmatiker unterschieden sich auch im mittleren (\pm SEM) Integral der Fläche unter der Kurve (AUC) des FEV_1 -Verlaufes nach Allergeninhalation ($4,1 \pm 1,1$ vs. $9,7 \pm 1,9 \text{ L}\cdot\text{h}$, $p = 0,009$).

Bei den Asthmatikern wurden 1,72 (0,65; 2,76) % eosinophile Granulozyten im induzierten Sputum gemessen. Dieser Wert war signifikant gegenüber beiden anderen Gruppen erhöht ($p = 0,009$). Auch beim eNO lag die Konzentration mit 50,8 (28,5; 53,8) ppb deutlich über den Werten der Rhinitiker mit 23,2 (18,2; 29,7) ppb und denjenigen der asymptomatischen Atopiker mit 15,6 (14,1; 16,4) ppb (ANOVA $p = 0,003$).

Tabelle 2: Belastungsparameter

	Ozon ppb	Ventilation		Watt W	Puls		Sättigung O ₂ %	Temperatur rel. Feuchte °C %		
		Ruhe L/min	Belastung L/min		Ruhe n	Belastung n				
FA	0	Asympt.	6,2 ± 1,2	21,6 ± 3,0	57,0 ± 6,7	85,0 ± 4,5	115,8 ± 9,1	93,3 ± 0,8	26,8 ± 0,5	69,8 ± 11,4
N	125		6,5 ± 1,7	22,6 ± 3,1	55,0 ± 5,0	84,9 ± 10,0	113,1 ± 9,4	94,2 ± 2,4	27,2 ± 1,9	64,0 ± 9,4
H	250		6,2 ± 1,9	19,7 ± 3,6	55,0 ± 7,1	84,2 ± 9,7	111,0 ± 14,3	92,4 ± 5,2	27,0 ± 1,4	60,8 ± 9,5
W1	125		7,0 ± 2,3	22,3 ± 3,5	56,0 ± 5,5	83,0 ± 4,8	111,0 ± 8,5	94,0 ± 1,2	27,4 ± 1,5	66,4 ± 14,0
W2	125		8,5 ± 3,1	24,7 ± 1,4	59,0 ± 7,4	79,6 ± 6,4	113,6 ± 6,9	93,4 ± 2,1	27,4 ± 1,1	65,8 ± 13,3
W3	125		7,1 ± 2,1	22,7 ± 2,6	57,0 ± 6,7	82,1 ± 3,7	114,6 ± 7,2	94,8 ± 1,3	26,5 ± 2,1	72,3 ± 15,6
W4	125		6,2 ± 2,6	21,7 ± 3,5	58,0 ± 5,7	81,4 ± 4,3	113,0 ± 6,2	92,6 ± 0,5	26,3 ± 1,0	78,0 ± 8,3
FA	0	Rhinitis	9,1 ± 2,9	29,4 ± 5,6	89,5 ± 19,6	83,1 ± 10,2	116,7 ± 9,3	94,3 ± 3,0	26,8 ± 1,4	59,0 ± 17,4
N	125		9,1 ± 3,5	28,6 ± 4,6	88,1 ± 19,1	81,7 ± 9,1	118,1 ± 9,4	95,5 ± 2,0	26,8 ± 2,0	57,8 ± 13,9
H	250		9,3 ± 2,7	29,1 ± 5,2	87,3 ± 19,6	85,9 ± 8,8	122,9 ± 10,3	96,0 ± 1,8	26,9 ± 1,3	58,3 ± 13,3
W1	125		8,6 ± 2,1	29,6 ± 4,9	86,6 ± 18,9	85,2 ± 8,3	119,7 ± 9,5	95,5 ± 1,6	26,2 ± 0,9	66,2 ± 11,9
W2	125		8,7 ± 2,3	29,1 ± 7,3	87,3 ± 19,8	82,0 ± 8,6	116,3 ± 8,4	95,3 ± 2,4	26,7 ± 1,1	67,1 ± 13,9
W3	125		8,7 ± 1,8	29,5 ± 5,3	87,2 ± 19,8	81,8 ± 9,7	119,3 ± 8,8	95,3 ± 2,2	26,7 ± 1,2	68,6 ± 11,7
W4	125		8,4 ± 2,0	29,1 ± 5,1	86,7 ± 18,8	79,3 ± 10,2	117,7 ± 9,6	95,4 ± 2,0	26,9 ± 1,2	62,4 ± 11,0
FA	0	Asthma	7,7 ± 2,2	27,4 ± 6,9	85,8 ± 24,9	81,9 ± 8,7	118,3 ± 8,5	95,5 ± 2,4	26,8 ± 1,3	64,5 ± 10,7
N	125		7,5 ± 2,1	26,3 ± 6,9	84,2 ± 22,8	85,0 ± 14,2	122,0 ± 12,2	95,5 ± 1,7	26,7 ± 1,3	56,2 ± 15,9
H	250		8,1 ± 2,3	27,8 ± 10,0	86,4 ± 30,0	82,9 ± 9,0	118,9 ± 6,7	96,1 ± 1,9	26,9 ± 1,6	63,5 ± 16,8
W1	125		7,6 ± 1,8	28,2 ± 6,5	85,2 ± 27,5	84,2 ± 8,6	122,7 ± 9,4	94,4 ± 2,0	26,4 ± 1,8	68,8 ± 12,3
W2	125		7,2 ± 3,4	25,8 ± 5,6	83,2 ± 27,0	82,9 ± 7,8	122,5 ± 7,8	95,9 ± 1,8	27,0 ± 1,1	69,2 ± 14,8
W3	125		7,7 ± 2,0	27,8 ± 8,1	84,5 ± 30,5	80,5 ± 8,7	121,3 ± 8,8	95,0 ± 2,1	27,4 ± 1,2	62,5 ± 8,7
W4	125		7,3 ± 1,9	29,4 ± 9,4	84,8 ± 30,3	80,6 ± 10,0	120,3 ± 9,0	95,5 ± 2,1	27,2 ± 1,4	62,9 ± 12,5
Mittelwert		Asympt.	6,8 ± 0,8	22,2 ± 1,5	56,7 ± 1,5	82,9 ± 2,0	113,2 ± 1,8	93,5 ± 0,9	26,9 ± 0,4	68,1 ± 5,7
		Rhinitis	8,8 ± 0,3	29,2 ± 0,3	87,5 ± 1,0	82,7 ± 2,2	118,7 ± 2,3	95,3 ± 0,5	26,7 ± 0,3	62,8 ± 4,5
		Asthma	7,6 ± 0,3	27,5 ± 1,2	84,9 ± 1,0	82,6 ± 1,7	120,9 ± 1,7	95,4 ± 0,6	26,9 ± 0,3	64,0 ± 4,4
ANOVA			#	#	#	#	#	#	#	#

4.2. Expositionsbedingungen und Untersuchungsdauer

Die Mittelwerte für Ventilation, Puls, eingestellte Wattzahl am Ergometer, Sauerstoffsättigung des Probanden, sowie Temperatur und relative Feuchte der eingeatmeten Luft sind in Tabelle 2 aufgelistet. Wichtig für die Fragestellung war es, dass es keine Unterschiede in den Expositionsbedingungen zwischen den Haupttestungen eines Probanden gab; die sehr ähnlichen Werte innerhalb der Gruppen belegen dies. Dagegen fanden sich im Vergleich zwischen den Gruppen (über die Expositionen gemittelt) deutliche Unterschiede bei der mittleren Ventilationsrate und der mittleren Wattzahl. Diese waren insbesondere auf niedrigere Werte bei den asymptomatischen Atopikern zurückzuführen, denn in dieser Gruppe waren ausschließlich Frauen mit durchschnittlich geringer Körpergröße (Tabelle 1). Insgesamt lag die mittlere (\pm SD) körperliche Belastung auf dem Ergometer ($\text{Workload} = \text{Ventilation} / \text{BSA}$) über alle Expositionen gemittelt bei $15 \pm 3 \text{ L}/(\text{min} \cdot \text{m}^2)$.

Tabelle 3 zeigt die Reihenfolge und die Abstände zwischen den der Expositionen. Der Median (Quartile) der Studiendauer lag bei 327 (220; 449) Tagen und das Intervall zwischen den Visiten bei 42 (31; 75) Tagen. In 6 Fällen wurde der eigentlich geforderte Abstand zwischen den Untersuchungen um einen Tag, in 4 Fällen um bis zu 3 Tagen unterschritten, um Terminbedürfnissen der Probanden gerecht zu werden und extreme Verzögerungen zwischen den Haupttestungen zu vermeiden. Die Reihenfolge der Expositionen wurde für jeden Probanden zufällig ausgewählt. Die Analyse der tatsächlichen Expositionsreihenfolge zeigte aber, dass tendenziell eher die Expositionen mit gefilterter Luft und der niedrigen Ozonkonzentration (125 ppb) am Anfang der Untersuchung lagen und die hohe bzw. die wiederholte Exposition häufiger am Ende der Studie durchgeführt wurde. Jedoch gaben Korrelationsanalysen keinen Hinweis darauf, dass dies das Ergebnis der Untersuchung beeinflusst hätte.

4.3. Lungenfunktionsantwort auf Ozon

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die durch die verschiedenen Expositionen hervorgerufenen Änderungen von FEV_1 und VC nach Gruppen getrennt. Zwischen den Gruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA), innerhalb der Gruppe der Rhinitiker und der Asthmatiker war der

Abfall des FEV₁ und der VC nach Exposition gegenüber 250 ppb Ozon signifikant ($p < 0,05$ in beiden Gruppen; ANOVA, *post-hoc* Analyse mittels Newman-Keuls-Test). Die Auswertung der FVC war vergleichbar mit derjenigen der VC. Nach Exposition gegenüber gefilterter Luft, 125 ppb, 250 ppb oder 4x125 ppb

NR	Diagnose	1.HT	2.HT	3.HT	4.HT	Intervall (Tage) zwischen						
						1	2	3	4	Gesamt		
1	Rhinitis	F	N	W	H	47	31	281	41	400		
2	Rhinitis	W	F	N	H	109	48	33	28	218		
3	Asthma	F	W	N	H	50	27	176	28	281		
4	Rhinitis	F	N	W		371	30	77		478		
5	Rhinitis	N	F	H	W	128	27	42	31	228		
6	asympt. Atopie	H	F	W	N	436	35	37	39	547		
7	Rhinitis	W	F	H	N	51	35	28	55	169		
8	Rhinitis	F	N	H	W	83	31	615	29	758		
9	Asthma	F	N	W	H	34	76	31	124	265		
10	Rhinitis	W	H	N	F	42	155	161	28	386		
11	Rhinitis	N	F	H	W	49	56	70	352	527		
12	Rhinitis	N	F	H	W	56	96	262	154	568		
13	Rhinitis	N	W	F	H	477	45	42	49	613		
14	Rhinitis	N	F	W	H	273	117	101	27	518		
15	Rhinitis	F	H	N	W	107	41	46	74	268		
16	Asthma	N	F	W	H	196	36	43	42	317		
17	Asthma	F	N	H	W	42	69	37	36	184		
18	Asthma	N	W	F	H	49	31	27	32	139		
20	Asthma	F	H	N	W	123	199	82	121	525		
21	Rhinitis	W	F	N	H	109	46	26	149	330		
22	Rhinitis	N	H	F	W	49	28	29	49	155		
23	Asthma	N	F	H	W	92	247	63	28	430		
24	Asthma	N	H	F	W	40	27	72	316	455		
26	Rhinitis	W	H	F	N	120	34	27	28	209		
27	Rhinitis	N	F	H	W	234	34	40	90	398		
28	Asthma	N	F	H	W	57	70	77	77	281		
29	asympt. Atopie	F	H	W	N	85	36	29	46	196		
30	Rhinitis	H	W	N	F	85	37	26	29	177		
31	Rhinitis	H	F	N	W	242	28	39	53	362		
33	Rhinitis	H	N	F	W	211	28	56	29	324		
34	Rhinitis	W	H	N	F	165	124	69	42	400		
36	asympt. Atopie	N	H	W	F	36	49	52	88	225		
37	Asthma	H	N	F	W	71	28	40	191	330		
40	Rhinitis	N	W	H	F	53	52	217	42	364		
41	asympt. Atopie	N	W	F	H	358	49	56	25	488		
42	Asthma	W	H	F	N	80	34	75	50	239		
44	Rhinitis	H	F	W	N	107	26	31	34	198		
45	asympt. Atopie	N	F	W	H	69	29	37	39	174		
	Anzahl	F	9	15	9	5	Median	85	36	45	42	327
		N	16	7	9	6	Min	34	26	26	25	139
		H	6	10	10	11	Max	477	247	615	352	758
		W	7	6	10	15						

Ozon (letzter Tag der 4 Expositionen) lag die über alle Probanden gemittelte (\pm SEM) Änderung des FEV₁ bei $2,8 \pm 0,6$, $1,8 \pm 0,8$, $-3,1 \pm 1,5$ und $2,8 \pm 0,6$ % ($p = 0,0001$; ANOVA). Bei der VC wurden Änderungen von $0,1 \pm 0,5$, $-0,9 \pm 0,8$, $-3,3 \pm 1,5$ und $2,8 \pm 0,7$ % gemessen ($p = 0,0007$; ANOVA). In der *Post-hoc*-Analyse zeigte sich, dass für die Signifikanz die deutliche Einschränkung der Lungenfunktion nach 250 ppb gegenüber allen anderen Expositionen ausschlaggebend war (Newman-Keuls-Test).

Trotz der relativ niedrigen Ozondosis konnte während der wiederholten Exposition gegenüber 125 ppb in der Gruppe der Rhinitiker eine leichtgradige Adaptation der Lungenfunktionsantwort beobachtet werden. Die mittleren (\pm SEM) Änderungen des FEV₁ lagen bei $-0,2 \pm 1,5$, $1,8 \pm 0,7$, $1,2 \pm 1,0$ und $2,9 \pm 0,6$ % von Tag 1 bis Tag 4 (Tag 1 vs. Tag 4, $p = 0,04$; Newman-Keuls-Test). Der Verlauf der VC war in dieser Gruppe ähnlich, erreichte aber keine statistische Signifikanz.

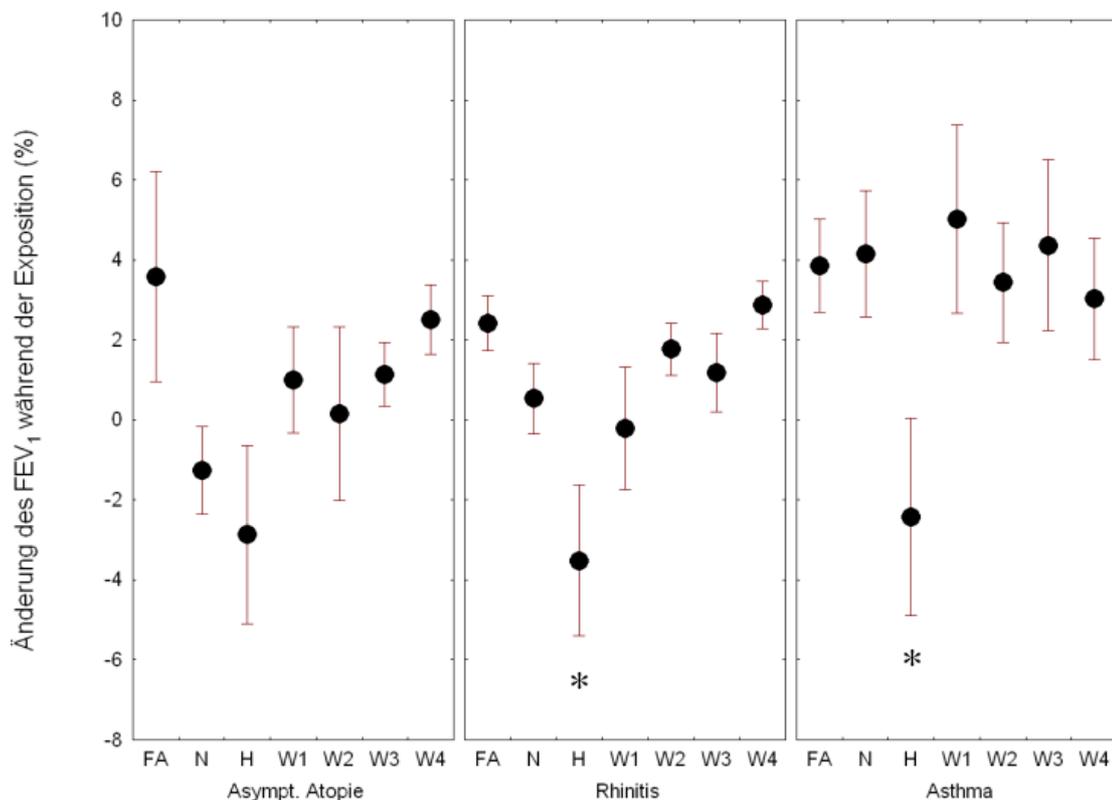


Abbildung 7: Änderung des Einsekundenvolumens während der Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb (N), 250 ppb (H) oder nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (W1-W4 = Tag 1 - Tag 4). Dargestellt sind die Mittelwerte (SEM) der prozentualen Veränderung zwischen der Messung vor der dreistündigen Exposition und unmittelbar nach der Exposition. * $p < 0,05$ im Vergleich zu FA.

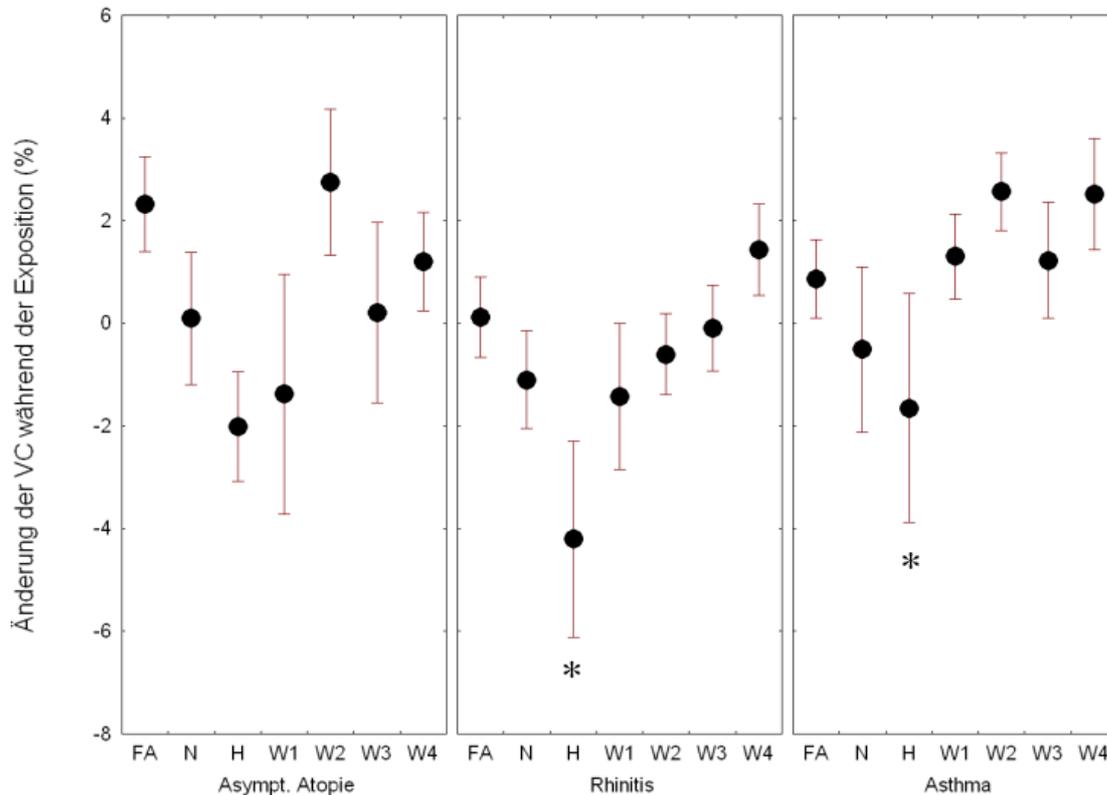


Abbildung 8: Änderung der inspiratorischen Vitalkapazität während der Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb (N), 250 ppb (H) oder nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (W1-W4 = Tag 1 - Tag 4). Dargestellt sind die Mittelwerte (SEM) der prozentualen Veränderung zwischen der Messung vor der dreistündigen Exposition und unmittelbar nach der Exposition. * $p < 0,05$ im Vergleich zu FA.

4.4. Methacholin-Empfindlichkeit nach Ozonexposition

Erwartungsgemäß war die unspezifische Atemwegsempfindlichkeit bei der Gruppe der Asthmatiker am größten, d.h. diese Probanden reagierten im Mittel bei einer signifikant niedrigeren Dosis Methacholin mit einer Einschränkung des FEV_1 um 15 % (Abb. 9). Leichtgradige Veränderungen der Methacholin-Empfindlichkeit nach Ozon konnten nur in der Gruppe der Rhinitiker gemessen werden. Der geometrische Mittelwert (\pm SEM) des $PC_{15}FEV_1$ lag nach Exposition gegenüber gefilterter Luft, 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon (letzter Tag) bei $14,4 \div 1,3$, $11,1 \div 1,3$, $6,8 \div 1,5$ und $15,0 \div 1,3$ mg/mL ($p = 0,0003$; ANOVA). Der in der ANOVA gefundene signifikante Effekt beruhte auf einer Verminderung der Provokationsdosis nach 250 ppb Ozon im Vergleich zu gefilterter Luft ($p = 0,0007$; Newman-Keuls-Test). Bei den Rhinitikern konnte auch ein geringfügiger, aber signifikanter Anstieg während der wiederholten Exposition festgestellt werden ($p = 0,04$; ANOVA). Die geometrischen Mittelwerte der

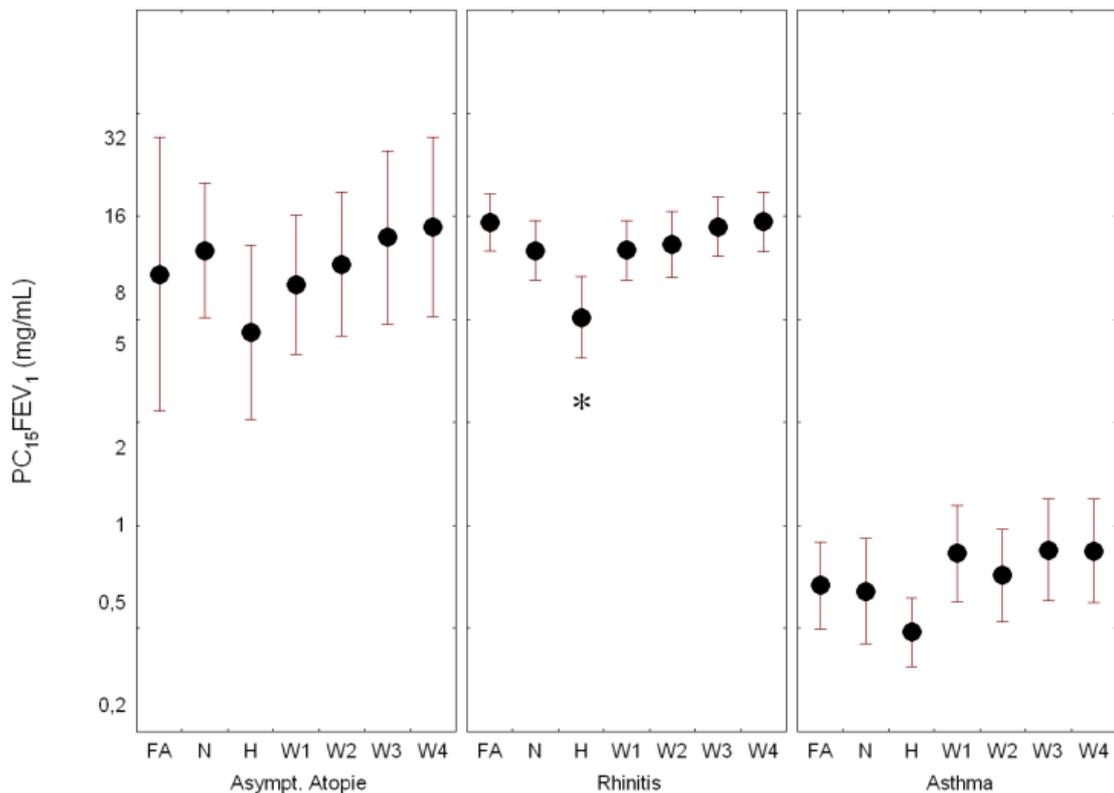


Abbildung 9: Änderung der unspezifischen Atemwegsüberempfindlichkeit gegenüber Methacholin während der Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb (N), 250 ppb (H) oder nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (W1-W4 = Tag 1 - Tag 4). Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte (SEM) des PC₂₀FEV₁ nach der Exposition. * p < 0,05 im Vergleich zu FA.

vier Expositionstage lagen bei $11,2 \div 1,3$, $12,6 \div 1,4$, $14,4 \div 1,3$ und $15,0 \div 1,3$ mg/mL (Tag 1 vs. Tag 4, p = 0,05, Newman-Keuls-Test). In der Gruppe der Asthmatiker konnten diese Effekte nicht beobachtet werden.

4.5. Lungenfunktionsantwort während der Frühreaktion auf Allergen

In der Gruppe der Rhinitiker war nach den verschiedenen Expositionen ein signifikanter Unterschied in der Sofortreaktion auf Allergen zu beobachten (p = 0,002; ANOVA). Im Vergleich zur Kontrollexposition gegenüber Luft fand sich dabei ein signifikanter Abfall des FEV₁ nach 250 ppb (p = 0,002; Newman-Keuls-Test) und 4x125 ppb Ozon (p = 0,04) (Abb. 10). In der Gruppe der Asthmatiker war dagegen keine signifikant größere Sofortreaktion nach Ozonexposition zu beobachten (Abb. 10). Bei den asymptomatischen Atopikern fiel die Sofortreaktion auf Allergen insgesamt am niedrigsten aus. Aufgrund der begrenzten Fallzahlen waren hier keine signifikanten Änderungen nach Expo-

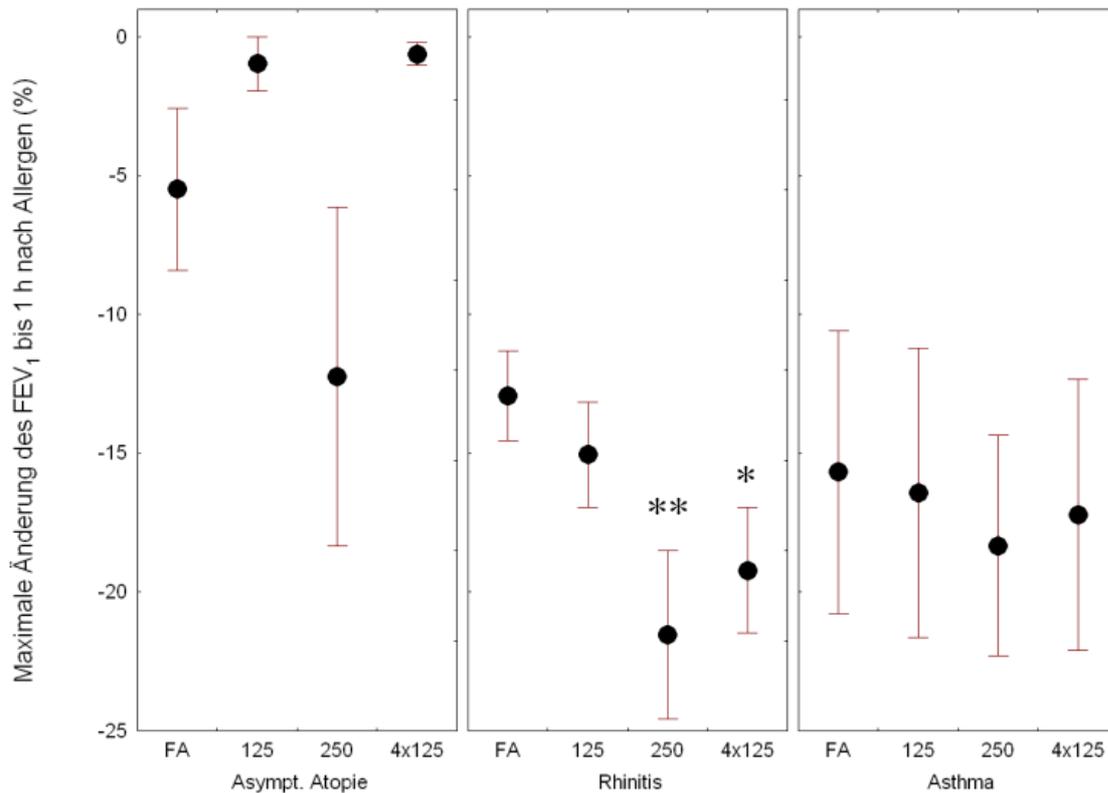


Abbildung 10: Abfall des FEV₁ während der Frühreaktion auf Allergen nach Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb oder nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (4x125). Mittelwerte (SEM). * p < 0,05. ** p < 0,01 im Vergleich zu FA.

sition zu beobachten. Ein klinisch bedeutsamer Abfall des FEV₁ von $\geq 20\%$ trat bei 13 Probanden mit Rhinitis (bei insgesamt 29 Testungen) und bei 4 Probanden mit Asthma (in 11 Testungen) auf. Bei den Rhinitikern traten n = 4, 5, 10 bzw. 10 derartige Fälle nach Exposition gegenüber gefilterter Luft, 125 ppb, 250 ppb bzw. 4x125 ppb Ozon auf (Abb. 11). Die Anzahl der Fälle war nach 250 ppb und 4x125 ppb Ozon gegenüber gefilterter Luft tendenziell erhöht; dieser Unterschied lag jeweils nur knapp oberhalb der Signifikanzgrenze (jeweils p = 0,052; Fisher's Exakter Test). Die analogen Daten der Gruppe der Asthmatiker zeigten nach Ozon keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollexposition gegenüber gefilterter Luft (Abb. 12). Bei der Auswertung von beiden Gruppen zusammen blieb der Unterschied in der Anzahl der deutlichen Sofortreaktionen zwischen 250 ppb und 4x125 ppb Ozon im Vergleich zu gefilterter Luft erhalten (jeweils p = 0,051).

In einem einzelnen Test nach 250 ppb Ozon fiel bei einem Patienten mit Asthma das FEV₁ nach Allergeninhalation um mehr als 50 % (eine genauere

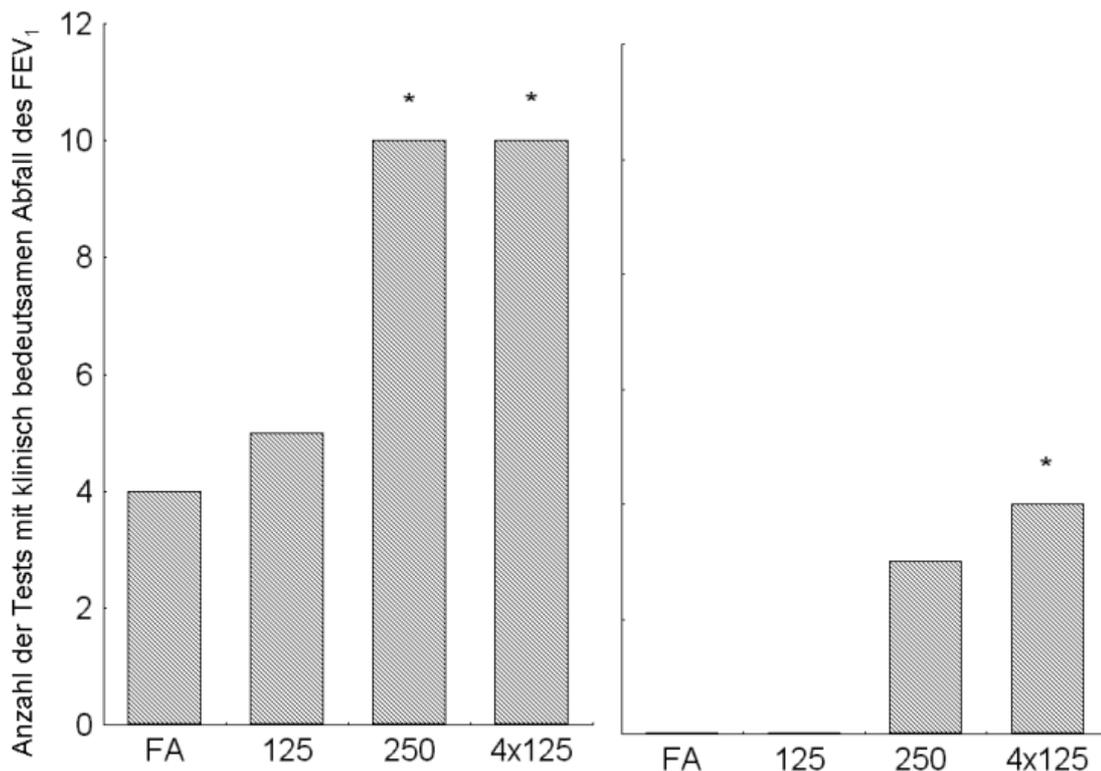


Abbildung 11: Anzahl der klinisch bedeutsamen Änderungen des FEV₁ während der Frühreaktion (links) und Spätreaktion (rechts) auf Allergen in der Gruppe der Rhinitiker. FA = gefilterte Luft. * p < 0,05 im Vergleich zu gefilterter Luft.

Messung war bei dieser starken akuten Reaktion nicht mehr möglich). Hier musste durch sofortige systemische Gabe von Kortison ärztlich interveniert werden. Eine zweite starke Reaktion trat bei einem Probanden mit Rhinitis auf, der nach 4x125 ppb Ozon mit einem FEV₁-Abfall von 29 % auf die Allergeninhalation reagierte und zusätzlich über körperliche Symptome klagte. Eine medikamentöse Behandlung war in diesem Fall aber nicht erforderlich. Dieser Proband wurde von der Testung mit 250 ppb Ozon ausgeschlossen, um weitere starke Reaktionen zu vermeiden.

4.6. Lungenfunktionsantwort während der Spätreaktion auf Allergen

In keiner der Gruppen konnte ein signifikanter Effekt der Exposition auf die mittlere Änderung des FEV₁ zum Zeitpunkt der Spätreaktion beobachtet werden (ANOVA; Abb. 13). Analyierte man jedoch nur die Probanden, die bereits in der Vortestung eine deutliche Spätreaktion aufwiesen (AUC oberhalb der 80er-Perzentile (n = 6; Rhinitis: Nr. 18, Asthma: Nr. 1, 3, 5, 7, 11; Tabelle 1), dann unterschieden sich die Spätreaktionen (mittlere AUC (±SEM)) nach gefilterter

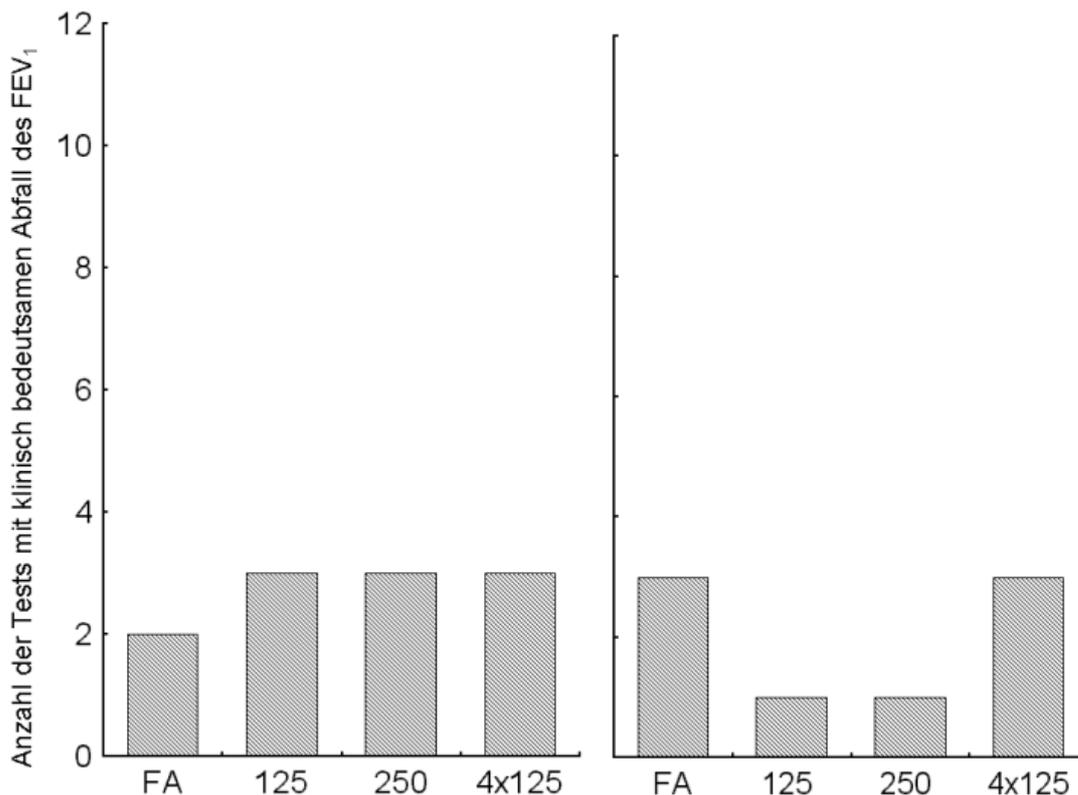


Abbildung 12: Anzahl der klinisch bedeutsamen Änderungen des FEV₁ während der Frühreaktion (links) und Spätreaktion (rechts) auf Allergen in der Gruppe der Asthmatiker. FA = gefilterte Luft.

Luft, 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon ($2,9 \pm 1,4$, $0,4 \pm 1,6$, $4,0 \pm 1,8$ und $5,2 \pm 0,5$ %; ANOVA, $p = 0,05$). Die Korrelation zwischen den individuellen AUC und dem maximalen Abfall des FEV₁ waren für die 4 verschiedenen Expositionen signifikant (Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten für gefilterte Luft, 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon: 0,69, 0,50, 0,75 und 0,74 (jeweils $p < 0,01$)).

Ein klinisch bedeutsamer Abfall des FEV₁ von ≥ 15 % wurde bei 5 Probanden mit Rhinitis (7 Testungen) und 4 Probanden mit Asthma (8 Testungen) beobachtet. Bei den Rhinitikern fanden sich diese deutlichen Reaktionen in 3 Testungen nach 250 ppb Ozon und in 4 Testungen nach 4x125 ppb Ozon. Dies war signifikant von gefilterter Luft unterschiedlich ($p=0,05$) (Abb. 11). Bei den Asthmatikern dagegen wurde die Anzahl der signifikanten Spätreaktionen nicht durch vorausgegangene Expositionen beeinflusst.

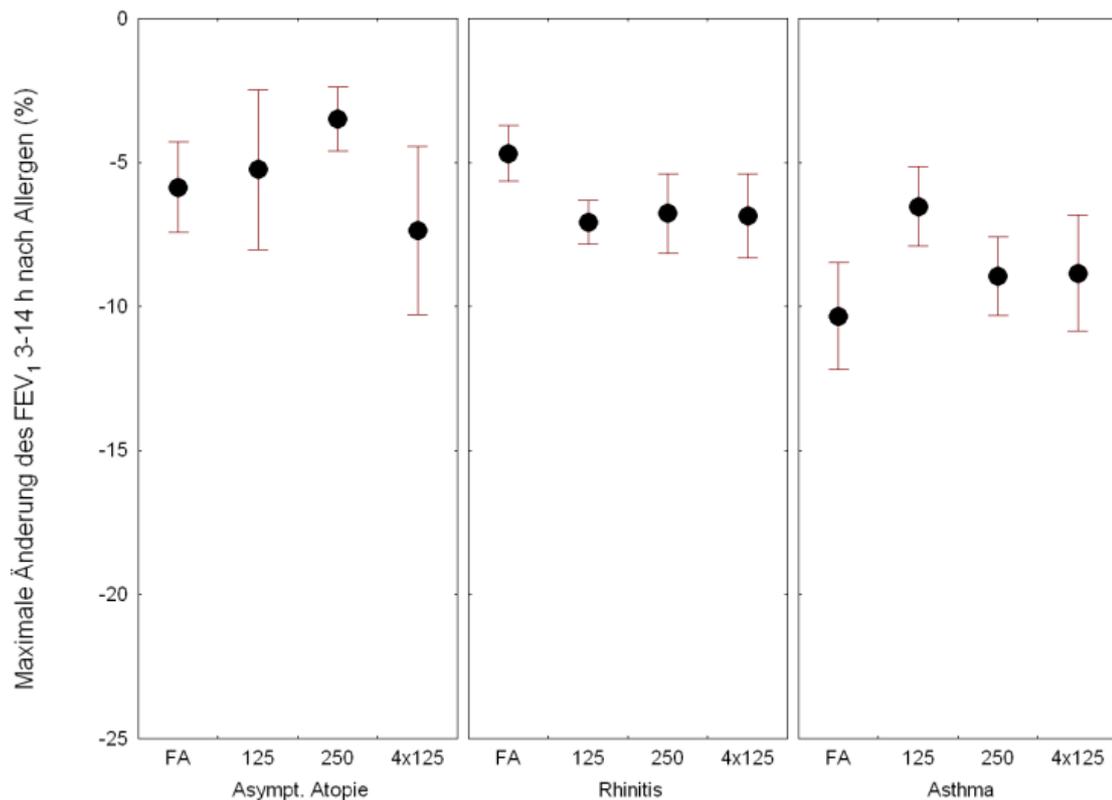


Abbildung 13: Abfall des FEV₁ während der Spätreaktion auf Allergen nach Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb oder nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (4x125). Mittelwerte (SEM).

4.7. Messung der Atemwegsentzündung im induzierten Sputum

Von den insgesamt 570 Sputumproben, die während der 3 aufeinanderfolgenden Induktionsperioden gesammelt wurden (38 Probanden x 5 Induktionen x 3 Inhalationsperioden), waren 19 Proben aufgrund mangelnder Qualität nicht auswertbar (3,3 %). Bei nur einer Sputuminduktion konnte in allen drei Induktionsperioden keine auswertbare Probe gewonnen werden (Proband mit Asthma nach 125 ppb Ozon). Über alle Proben berechnet lag der Median (Quartile) der Plattenepithel-Kontamination der Proben mit 2,6 (1,2; 7,0) % sehr niedrig. Daher war die Qualität der Zytospinpräparate sehr gut, mit einem Median für die Bewertung von 2,0 (1,5; 2,0). Die Sputumproben der ersten Induktionsperiode waren von etwas schlechterer Qualität, so dass häufiger Präparate mit < 1 bewertet wurden.

Für die Vitalität der Zellen wurde ein Median über alle Proben von 86 (76; 92) % gemessen. Die Sputumproben der drei aufeinanderfolgenden Induktionsperioden hatten eine Vitalität von 87 (78; 93), 86 (79;93) und 84 (72; 91) %. Dies war signifikant unterschiedlich, bedingt durch den etwas niedrigeren Wert

in der letzten Probe (ANOVA; $p = 0,034$). Die Exposition hatte jedoch keinen Einfluss auf die Vitalität. Ferner fanden sich in der Vitalität keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Sputumdichte nahm erwartungsgemäß signifikant von der ersten zur letzten Induktionsperiode ab. Die Werte lagen bei 12,2 (2,9; 17,6), 8,4 (2,5; 11,3) und 4,2 (1,3; 5,0) $\times 10^6$ Zellen/mL Sputum (ANOVA; $p < 0,0001$). Tendenziell zeigte das Sputum der Rhinitiker die höchste Dichte, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Die Sputumzusammensetzung änderte sich während der Sputuminduktion. Die Abbildungen 14 - 16 zeigen diese Veränderungen für die prozentualen Anteile der Makrophagen, der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der Vortestung und während der Haupttestungen. Die Änderung der Sputumzusammensetzung war in allen Gruppen zu beobachten und unabhängig von der Art der Exposition.

Die Auswertung der Ozoneffekte auf die Atemwegsentzündung nach Allergeninhalation erfolgte zunächst getrennt für die Sputumproben der aufeinanderfolgenden Induktionsperioden. Dabei ergaben sich gegenüber den gewichtet

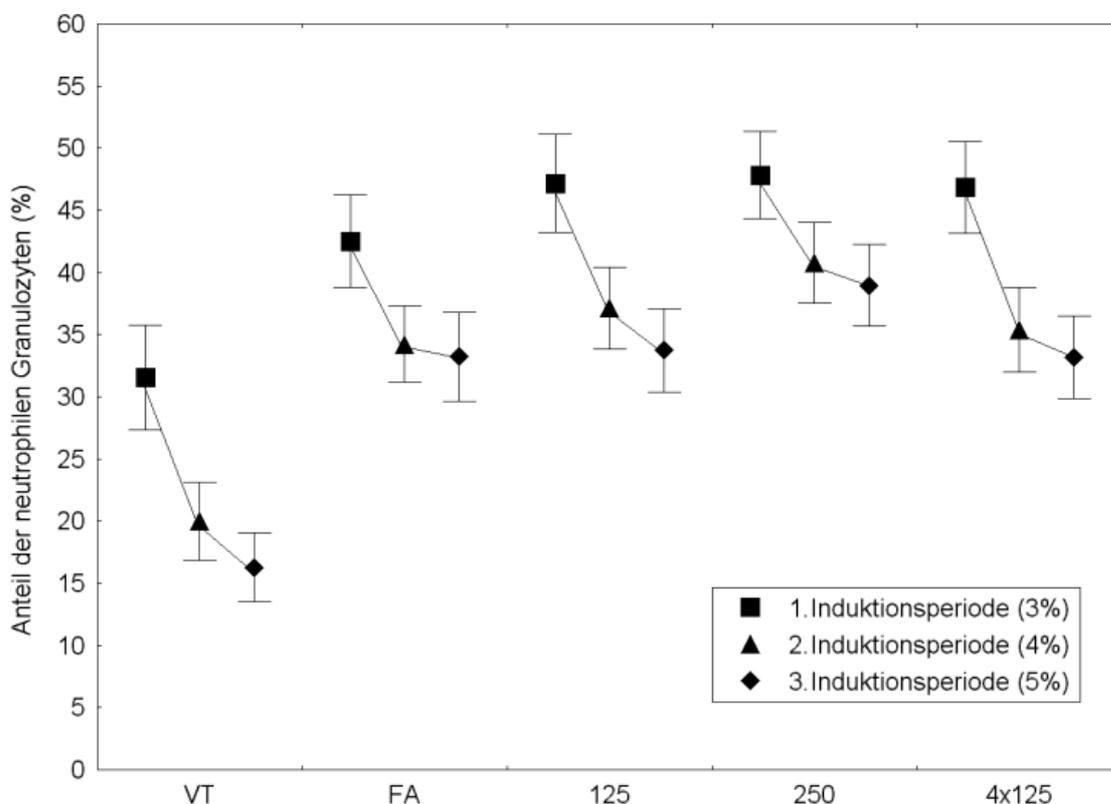


Abbildung 14: Änderung der prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten während der Sputuminduktion. Die Dauer der jeweiligen Induktionsperioden mit hypertoner Kochsalzlösung (3 – 5 %) betrug jeweils 10 min. Mittelwerte (SEM). VT = Vortest, FA = gefilterte Luft.

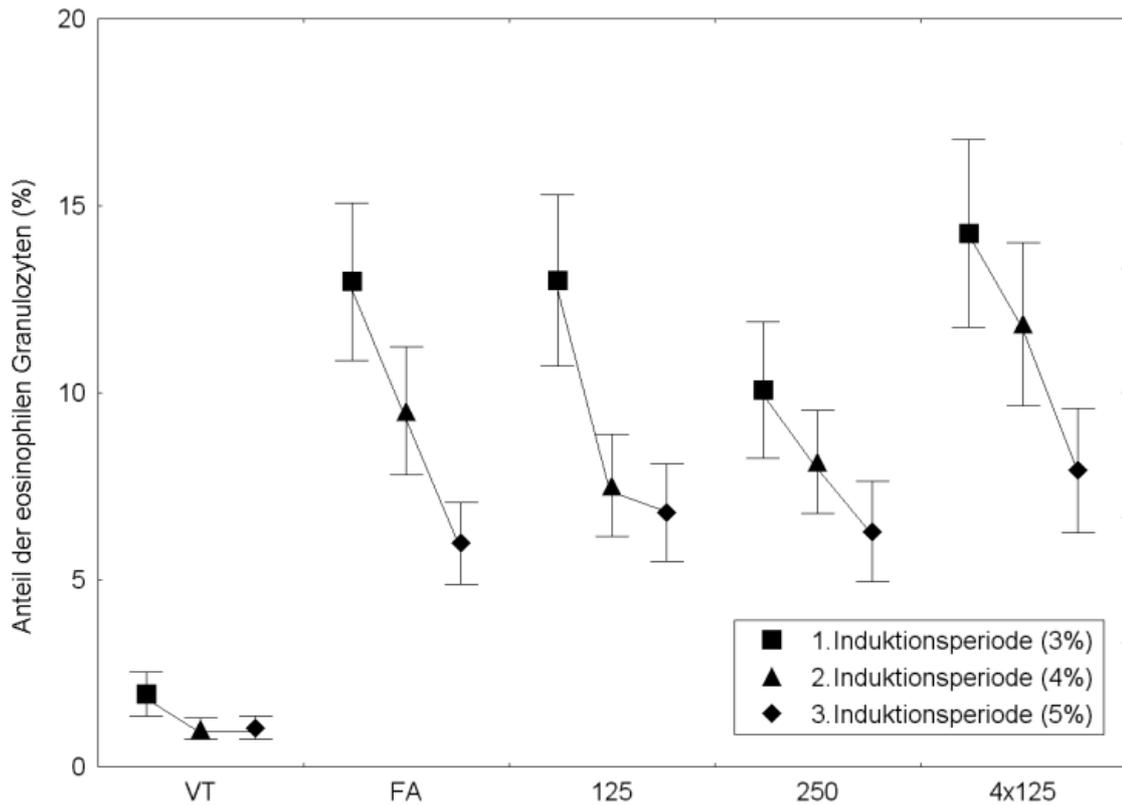


Abbildung 15: Änderung der prozentualen Anteile der eosinophilen Granulozyten während der Sputuminduktion. Die Dauer der jeweiligen Induktionsperioden mit hypertoner Kochsalzlösung (3 – 5 %) betrug jeweils 10 min. Mittelwerte (SEM). VT = Vortest, FA = gefilterte Luft.

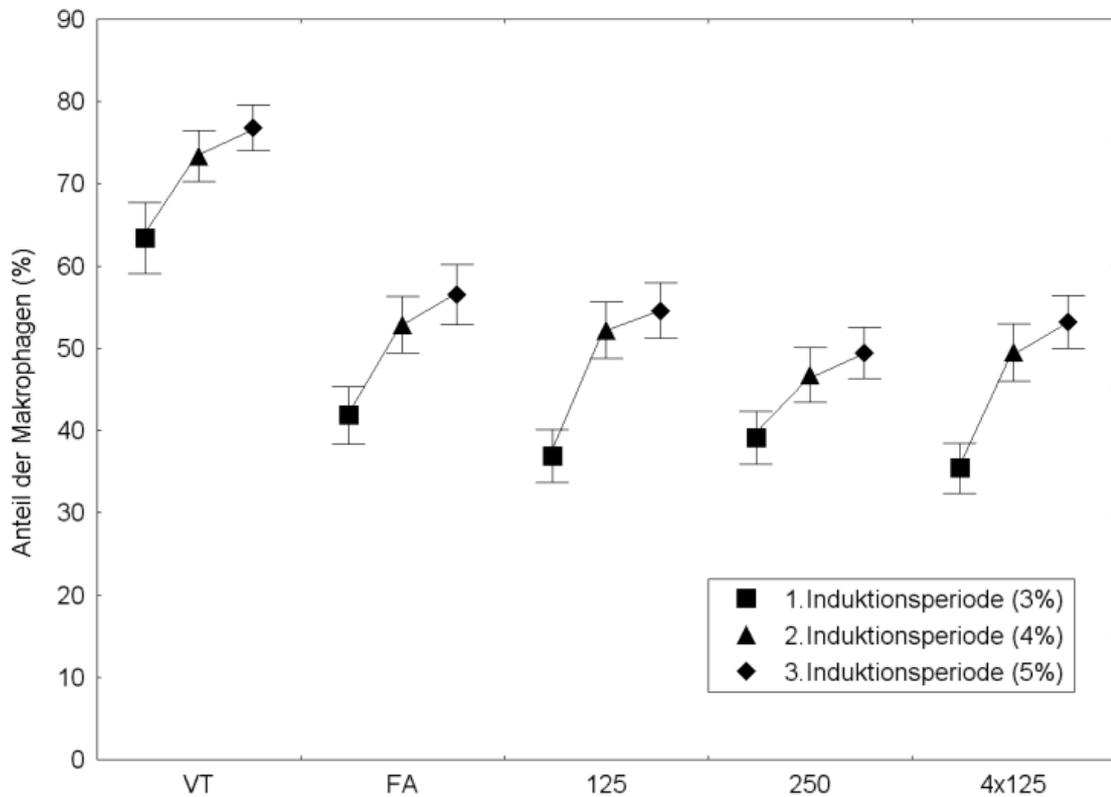


Abbildung 16: Änderung der prozentualen Anteile der Makrophagen während der Sputuminduktion. Die Dauer der jeweiligen Induktionsperioden mit hypertoner Kochsalzlösung (3 – 5 %) betrug jeweils 10 min. Mittelwerte (SEM). VT = Vortest, FA = gefilterte Luft.

gemittelten (gepoolten) Sputumdaten keine zusätzlichen Informationen oder ein Gewinn an statistischer Teststärke. Die Darstellung der Ergebnisse der zellulären und biochemischen Sputumzusammensetzung erfolgt daher nur für die gepoolten Daten. Die Anteile der Flimmerepithelien und der Monozyten lagen im Mittel deutlich unter 1 Prozent, hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis und wurden für die Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

In der Vortestung wurde die basale Sputumzusammensetzung ohne vorherige Exposition oder Allergeninhalation gemessen. In den Haupttestungen erfolgte die Sputuminduktion immer 6 h nach einer Allergeninhalation sowie nach unterschiedlichen Expositionen am Vortag bzw. den Vortagen. Die Allergeninhalation hatte einen deutlichen Einfluss auf die Sputumzusammensetzung, wie man am Vergleich zwischen Vortest und Haupttest nach gefilterter Luft erkennt (Tabelle 4). Es kam in allen Gruppen zu einem Abfall der Anteile der Makrophagen, sowie zu einem Anstieg der Anteile der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Diese Effekte waren in der Gruppe der asymptomatischen Atopiker aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant. In der Gruppe der Rhinitiker stieg auch die Zellzahl pro mL Sputum nach Allergen deutlich an. Ferner fanden sich signifikante Veränderungen bei den Konzentrationen von Histamin und Tryptase im Sputumüberstand.

Der Einfluss von Ozon auf die Änderungen der Sputumzusammensetzung im Vergleich zu gefilterter Luft war ähnlich in den drei Gruppen (Tabelle 4). Aufgrund der geringen Fallzahl war jedoch die Variabilität innerhalb der Gruppe der asymptomatischen Atopiker relativ hoch. Aus diesem Grund, und weil sich bei den asymptomatischen Atopikern signifikant niedrigere Anteile eosinophiler Granulozyten in allen Haupttestungen fanden ($p = 0,001$; ANOVA mit Messwiederholung für Exposition, getrennt nach Gruppen), wurde diese Gruppe bei der Analyse und Darstellung der Ozoneffekte nicht weiter berücksichtigt. Interessanterweise fand sich nach Allergeninhalation während aller Haupttestungen immer die gleiche Rangfolge bei den Anteilen der Eosinophilen im Sputum. Die asymptomatischen Atopiker hatten die niedrigsten Werte, gefolgt von den Rhinitikern; am höchsten lagen immer die Asthmatiker. Der prozentuale Anstieg nach Allergen im Vergleich zu den Basalwerten war dagegen bei den Rhinitikern am deutlichsten, vermutlich weil die niedrigeren Ausgangswerte mehr Spielraum für eine Erhöhung ließen.

Tabelle 4: Sputumzellendifferenzierung und Analyse der Mediatoren im Überstand

		VT	FA	125 ppb	250 ppb	4x125 ppb
Probanden mit asymptomatischer Atopie (n = 5)						
Makrophagen	%	76,5 ± 7,1	65,8 ± 7,7	60,6 ± 6,2	54,6 ± 3,2	56,5 ± 6,8 #
Neutrophile	%	19,9 ± 7,9	28,0 ± 8,0	34,3 ± 5,9	39,4 ± 3,4	39,0 ± 7,0 #
Eosinophile	%	0,5 ± 0,3	1,6 ± 1,0	0,9 ± 0,6	2,2 ± 1,1	1,8 ± 0,7
Lymphozyten	%	1,7 ± 0,4	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,8	2,7 ± 0,9	2,3 ± 0,7
Granulozyten	%	15,2 ÷ (1,46)	26,8 ÷ (1,22)	33,2 ÷ (1,17)	40,9 ÷ (1,09)	38,9 ÷ (1,16)
ZZ	10 ⁶ /ml	4,47 ÷ (1,53)	4,23 ÷ (1,37)	3,65 ÷ (1,31)	4,25 ÷ (1,56)	5,62 ÷ (1,54)
Makrophagen	10 ⁶ /ml	3,37 ÷ (1,59)	2,69 ÷ (1,38)	2,18 ÷ (1,40)	2,32 ÷ (1,56)	3,06 ÷ (1,43)
Neutrophile	10 ⁶ /ml	0,67 ÷ (1,79)	1,07 ÷ (1,50)	1,20 ÷ (1,27)	1,66 ÷ (1,59)	2,02 ÷ (1,75)
Eosinophile	10 ⁶ /ml	0,02 ÷ (1,44)	0,04 ÷ (1,53)	0,03 ÷ (1,35)	0,07 ÷ (1,81)	0,07 ÷ (1,67)
Lymphozyten	10 ⁶ /ml	0,08 ÷ (1,66)	0,12 ÷ (1,29)	0,09 ÷ (1,65)	0,10 ÷ (1,33)	0,12 ÷ (1,64)
Granulozyten	10 ⁶ /ml	0,68 ÷ (1,77)	1,14 ÷ (1,48)	1,21 ÷ (1,26)	1,74 ÷ (1,59)	2,12 ÷ (1,73)
LDH	U/l	702 ÷ (1,11)	550 ÷ (1,22)	416 ÷ (1,26)	510 ÷ (1,54)	687 ÷ (1,28)
Histamin	ng/ml	23,8 ÷ (1,62)	10,3 ÷ (2,46)	12,2 ÷ (2,11)	12,4 ÷ (1,55)	11,6 ÷ (1,33)
Tryptase	µg/l	1,4 ÷ (1,65)	1,4 ÷ (1,50)	0,8 ÷ (1,00)	1,0 ÷ (1,20)	1,3 ÷ (1,57)
NGF	pg/ml	6143 ÷ (1,51)	9626 ÷ (1,47)	4833 ÷ (1,42)	8357 ÷ (1,95)	5739 ÷ (1,49)
Probanden mit Rhinitis (n = 22)						
Makrophagen	%	64,4 ± 4,2 ##	41,6 ± 4,7	40,3 ± 3,9	36,7 ± 3,9	34,8 ± 3,6 #
Neutrophile	%	28,9 ± 4,3 ##	45,9 ± 4,6	48,8 ± 4,2	50,7 ± 4,7	48,4 ± 4,4
Eosinophile	%	1,0 ± 0,4 ##	9,7 ± 1,9	7,6 ± 1,4	8,5 ± 1,8	13,2 ± 2,6 &
Lymphozyten	%	1,7 ± 0,3	1,2 ± 0,13	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Granulozyten	%	21,9 ÷ (1,20) ##	47,5 ÷ (1,20)	52,4 ÷ (1,10)	52,0 ÷ (1,20)	57,5 ÷ (1,10)
ZZ	10 ⁶ /ml	4,96 ÷ (1,17) #	7,64 ÷ (1,22)	7,18 ÷ (1,23)	8,39 ÷ (1,19)	9,29 ÷ (1,20)
Makrophagen	10 ⁶ /ml	3,06 ÷ (1,17)	2,80 ÷ (1,14)	2,60 ÷ (1,15)	2,77 ÷ (1,14)	2,93 ÷ (1,19)
Neutrophile	10 ⁶ /ml	1,06 ÷ (1,32) #	2,97 ÷ (1,37)	3,21 ÷ (1,33)	3,69 ÷ (1,31)	4,06 ÷ (1,28)
Eosinophile	10 ⁶ /ml	0,04 ÷ (1,23) ##	0,44 ÷ (1,45)	0,36 ÷ (1,35)	0,40 ÷ (1,44)	0,69 ÷ (1,37) # &
Lymphozyten	10 ⁶ /ml	0,09 ÷ (1,19)	0,10 ÷ (1,18)	0,10 ÷ (1,17)	0,13 ÷ (1,22)	0,10 ÷ (1,21)
Granulozyten	10 ⁶ /ml	1,09 ÷ (1,32) ##	3,63 ÷ (1,37)	3,53 ÷ (1,3)	4,37 ÷ (1,32)	5,28 ÷ (1,27)
LDH	U/l	526 ÷ (1,19) #	625 ÷ (1,33)	796 ÷ (1,16)	935 ÷ (1,21)	1012 ÷ (1,13)
Histamin	ng/ml	16,5 ÷ (1,28) ##	133,8 ÷ (1,38)	97,5 ÷ (1,28)	96,8 ÷ (1,40)	138,4 ÷ (1,36)
Tryptase	µg/l	2,3 ÷ (1,28) ##	10,7 ÷ (1,41)	10,5 ÷ (1,36)	9,8 ÷ (1,39)	11,2 ÷ (1,40)
NGF	pg/ml	5421 ÷ (1,23)	4755 ÷ (1,23)	5061 ÷ (1,20)	4498 ÷ (1,21)	5157 ÷ (1,28)
Probanden mit Asthma bronchiale (n = 11)						
Makrophagen	%	74,5 ± 5,7 ##	52,6 ± 5,4	47,4 ± 4,9	50,1 ± 4,8	44,9 ± 3,8
Neutrophile	%	19,7 ± 5,1 #	31,8 ± 5,0	31,9 ± 5,0	34,7 ± 3,8	35,1 ± 4,6
Eosinophile	%	2,7 ± 1,1 ##	12,4 ± 3,4	17,2 ± 4,0	11,2 ± 3,0	16,2 ± 5,3
Lymphozyten	%	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,19	1,8 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2 #
Granulozyten	%	15,4 ÷ (1,30) ##	39,8 ÷ (1,17)	46,7 ÷ (1,11)	43,3 ÷ (1,11)	49,6 ÷ (1,09)
ZZ	10 ⁶ /ml	4,19 ÷ (1,18)	3,37 ÷ (1,40)	4,13 ÷ (1,35)	3,98 ÷ (1,36)	6,47 ÷ (1,27) #
Makrophagen	10 ⁶ /ml	3,08 ÷ (1,17) #	1,69 ÷ (1,42)	2,32 ÷ (1,15)	1,89 ÷ (1,33)	2,82 ÷ (1,27) #
Neutrophile	10 ⁶ /ml	0,58 ÷ (1,49)	0,95 ÷ (1,42)	1,53 ÷ (1,35)	1,33 ÷ (1,40)	2,01 ÷ (1,31)
Eosinophile	10 ⁶ /ml	0,08 ÷ (1,38) #	0,28 ÷ (1,59)	0,69 ÷ (1,41)	0,34 ÷ (1,57)	0,59 ÷ (1,60) #
Lymphozyten	10 ⁶ /ml	0,07 ÷ (1,19)	0,05 ÷ (1,21)	0,09 ÷ (1,22) #	0,07 ÷ (1,26)	0,12 ÷ (1,26) ##
Granulozyten	10 ⁶ /ml	0,66 ÷ (1,47)	1,33 ÷ (1,44)	2,41 ÷ (1,35)	1,72 ÷ (1,42)	3,21 ÷ (1,29) #
LDH	U/l	597 ÷ (1,22)	488 ÷ (1,42)	665 ÷ (1,24)	714 ÷ (1,29)	755 ÷ (1,26) #
Histamin	ng/ml	21,1 ÷ (1,22) #	43,1 ÷ (1,38)	99,5 ÷ (1,35) #	49,0 ÷ (1,32)	89,7 ÷ (1,44) #
Tryptase	µg/l	5,7 ÷ (1,66)	8,9 ÷ (1,80)	16,0 ÷ (1,54)	13,1 ÷ (1,80)	21,3 ÷ (1,55) ##
NGF	pg/ml	4897 ÷ (1,29)	4665 ÷ (1,29)	5837 ÷ (1,44)	5072 ÷ (1,34)	5249 ÷ (1,40)

p < 0,05, ## p < 0,01 vs. gefilterte Luft (FA), paariger Rangtest nach Wilcoxon, & p < 0,05 Friedmans ANOVA inkl. FA, 125, 250 und 4x125 ppb Ozon, Probanden mit Asthma nach 125 ppb nur n = 10

Im Vergleich zum Sputum, das nach Einatmung von gefilterter Luft und Allergen gewonnen wurde, zeigte sich nach 4x125 ppb Ozon und nachfolgender Allergeninhalation eine erhöhte Sputumzelldichte, ein niedrigerer Anteil an Makrophagen, ein erhöhter Anteil und eine erhöhte Anzahl der Gesamtgranulozyten, sowie höhere Anzahlen von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten im Sputum der Rhinitiker und Asthmatiker (Tabelle 4). Bei den Asthmatikern wurden zusätzlich auch signifikante Anstiege im prozentualen Anteil und der Zahl der Lymphozyten beobachtet. In dieser Gruppe waren ferner erhöhte Konzentrationen von Histamin, Tryptase und LDH nachweisbar. Für die meisten Parameter lagen die Veränderungen, die nach 250 ppb Ozon beobachtet wurden, ähnlich wie diejenigen nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon, während die Veränderungen nach einmaliger Exposition gegenüber 125 ppb deutlich geringer ausfielen (Tabelle 4). Die Abbildungen 17 - 23 zeigen in zusammenfassender Darstellung die Änderung der Sputumzusammensetzung für die 33 Probanden mit Rhinitis und Asthma bronchiale.

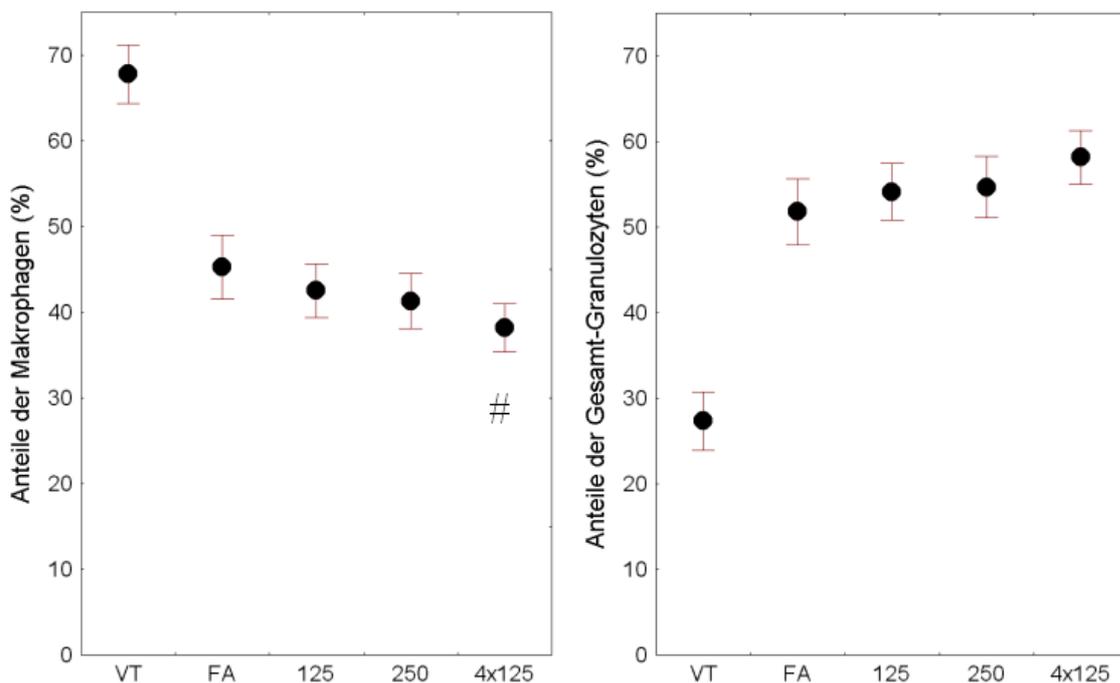


Abbildung 17: Mittelwerte (SEM) der prozentualen Anteile der Makrophagen (links) und der Gesamt-Granulozyten (rechts) im Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma. # p < 0.05 Vergleich FA vs. 4x125ppb (paariger Rangtest nach Wilcoxon)

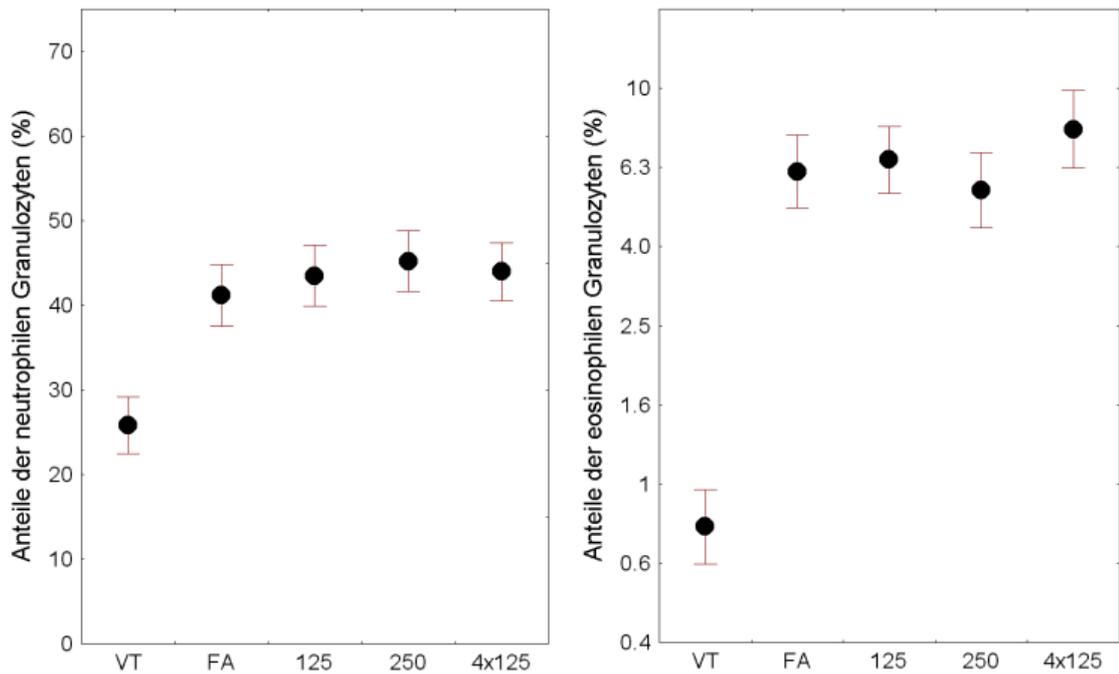


Abbildung 18: Mittelwerte (SEM) der prozentualen Anteile der neutrophilen (links) und geometrische Mittelwerte der Anteile der eosinophilen Granulozyten (rechts) im Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma.

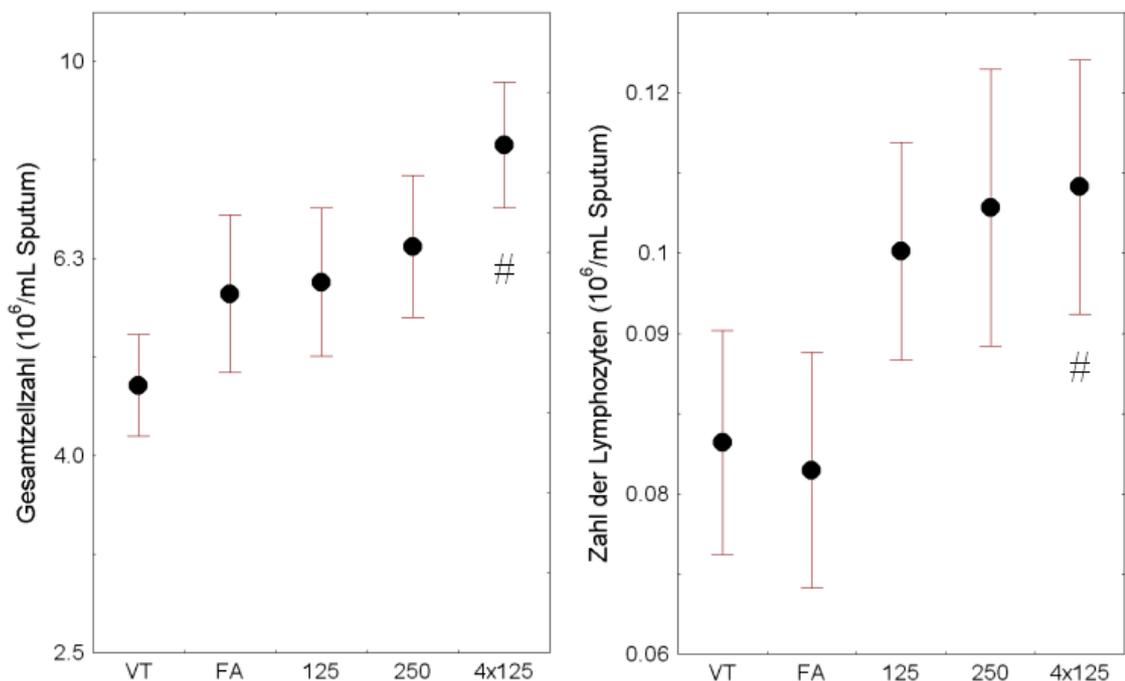


Abbildung 19: Gesamtzellzahl pro mL Sputum (links) und Zahl der Lymphozyten pro mL Sputum (rechts) im Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. Geometrische Mittelwerte (SEM) für n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma. # p < 0,05 Vergleich FA vs. 4x125ppb (paariger Rangtest nach Wilcoxon).

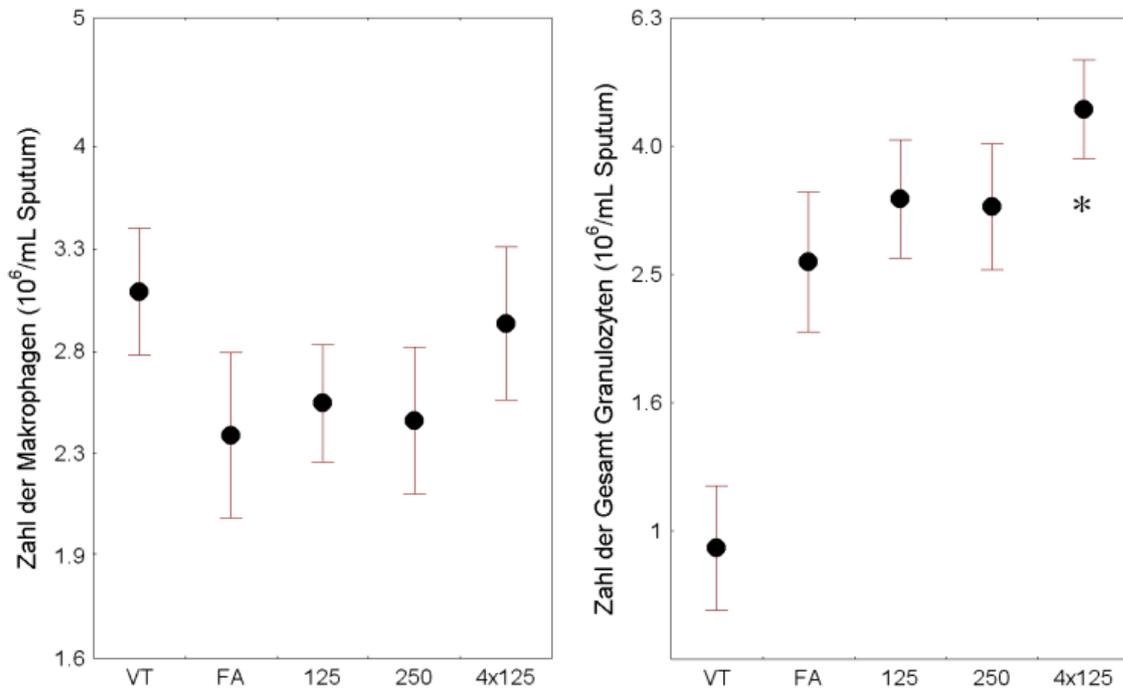


Abbildung 20: Zahl der Makrophagen (links) und Gesamt-Granulozyten pro mL Sputum (rechts) im Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. Mittelwerte (SEM) für n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma. * $p < 0,05$ (ANOVA).

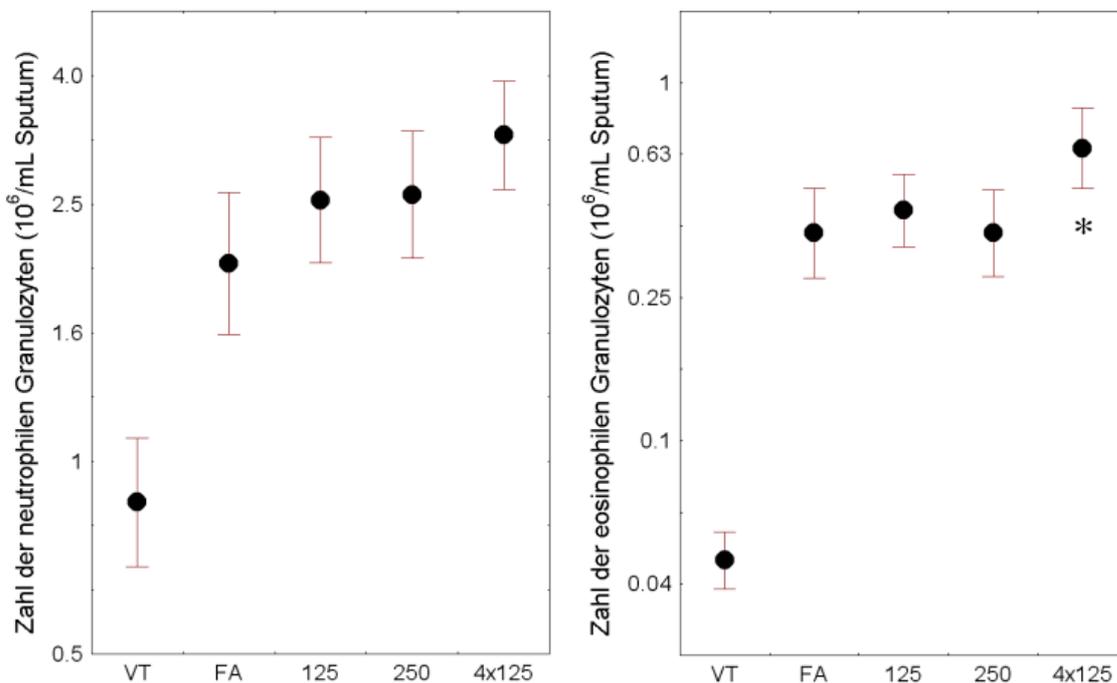


Abbildung 21: Zahl der neutrophilen (links) und eosinophilen Granulozyten pro mL Sputum (rechts) im Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. Geometrische Mittelwerte (SEM) für n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma. * $p < 0,05$ (ANOVA).

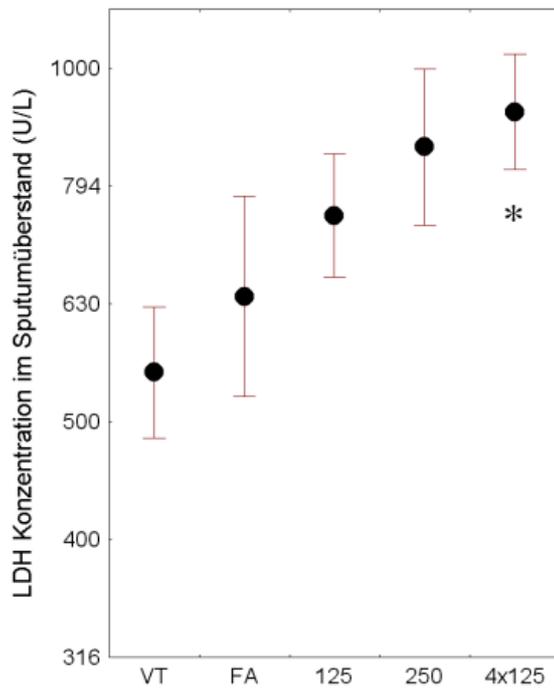


Abbildung 22: Geometrische Mittelwerte (SEM) der Konzentration von LDH im Sputumüberstand. Daten aus dem Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma. * $p < 0,05$ (ANOVA).

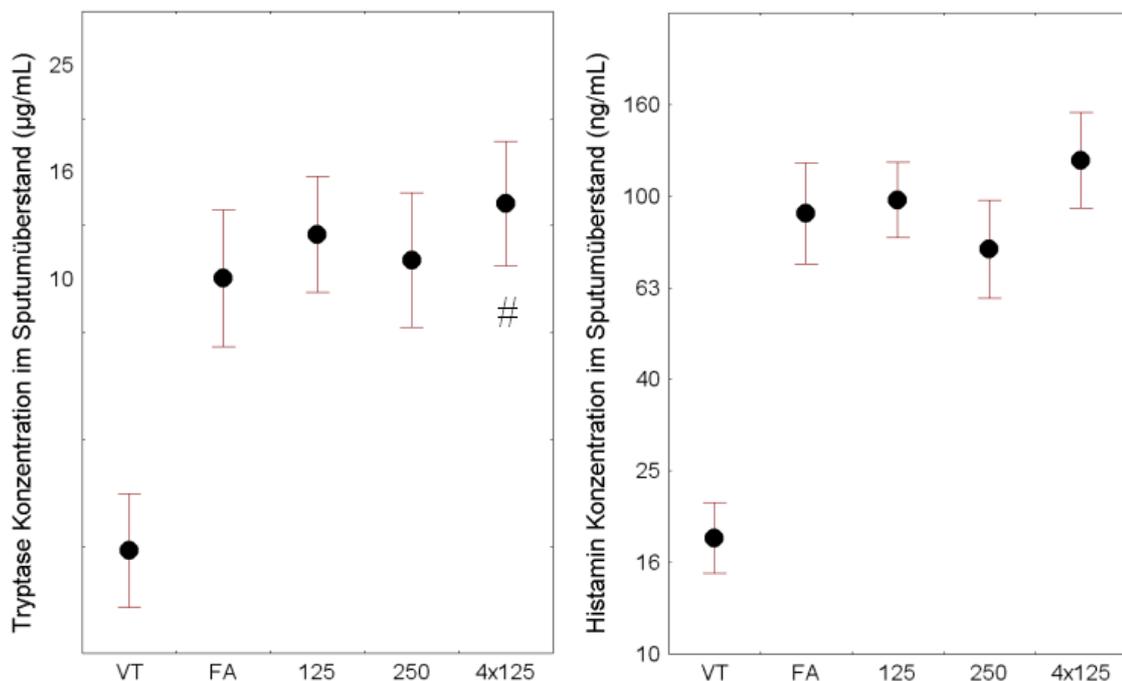


Abbildung 23: Geometrische Mittelwerte (SEM) der Konzentration von Tryptase (links) und Histamin (rechts) im Sputumüberstand. Daten aus dem Vortest (VT) sowie 6 h nach Allergenprovokation und vorausgegangener Exposition gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon. n = 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma. # $p < 0,05$ Vergleich FA vs. 4x125ppb (paariger Rangtest nach Wilcoxon).

Wie auch innerhalb der einzelnen Gruppen, ergaben sich die deutlichsten Unterschiede der Sputumzusammensetzung zwischen den im Vortest ermittelten Ausgangswerten und den Werten nach Allergeninhalation in den Haupttestungen. Der Vergleich zwischen den Haupttestungen mit Hilfe einer

ANOVA mit Messwiederholung ergab für die Anzahl der eosinophilen Granulozyten, die Anzahl der Gesamtgranulozyten, sowie für die Konzentration von LDH einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollexposition gegenüber gefilterter Luft und der wiederholten Ozonexposition (*Post-hoc*-Analyse nach Newman-Keuls bzw. Duncan). Vergleich man die Testung nach gefilterter Luft gegenüber 4x125 ppb Ozon direkt mit einem nicht-parametrischen Test (Wilcoxon's Paartest), dann waren auch die Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Anteile der Makrophagen, der Gesamtzellzahl, sowie der Anzahl der Lymphozyten pro mL Sputum signifikant.

Die prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten nach Allergeninhalation und gefilterter Luft korrelierten signifikant mit den entsprechenden Werten nach Inhalation von 125 ppb ($r = 0,65$), 250 ppb ($r = 0,71$) und 4x125 ppb Ozon ($r = 0,55$; jeweils $p < 0,01$). Die entsprechenden Werte für die eosinophilen Granulozyten lagen bei 0,85, 0,77 und 0,79 (jeweils $p < 0,001$) und dies zeigte, dass es starke Responder und weniger starke Responder auf Allergen gab. Deutlicher wurde dieser Effekt, wenn man die Änderungen der eosinophilen Granulozyten im Vergleich zu den Sputumausgangswerten untereinander verglich. Alle Korrelationskoeffizienten waren $> 0,82$ (jeweils $p < 0,001$) und belegten somit, dass sich die Sputumzusammensetzung reproduzierbar nach diesen Expositionen und nachfolgender Allergeninhalation veränderte.

Die Konzentrationen der Mediatoren im Sputumüberstand waren teilweise innerhalb einer Testung signifikant miteinander korreliert. Die stärkste Beziehung fand sich dabei zwischen Histamin und Tryptase nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (4x125 ppb) ($r=0,67$, $p<0,001$; beide Gruppen). Außerdem fand sich eine signifikante Korrelation (jeweils $p<0,05$) zwischen dem Anstieg der prozentualen Anteile der eosinophilen Granulozyten und den Histaminkonzentrationen nach Exposition gegenüber 250 ppb und 4x125 ppb ($r=0,62$ und $0,56$).

4.8. Messung von NO in der Ausatemluft

Abbildung 24 zeigt die Mittelwerte für die Konzentration des eNO, getrennt nach Gruppen, für die jeweiligen Haupttestungen und die 3 Messzeitpunkte (1 h nach Exposition, 20 h nach Exposition / 1 h nach Allergen, 25 h nach Exposition / 6 h nach Allergen). Deutlich erkennbar ist der Unterschied im eNO-Niveau zwischen den Gruppen sowohl in den Vortestungen, als auch in den Haupt-

testungen (ANOVA, $p < 0,0001$). Der Einfluss der Exposition und der Verlauf über die 3 Messzeitpunkte war dabei in allen Gruppen sehr ähnlich. Aufgrund der geringen Fallzahl und der insgesamt niedrigen eNO-Werte waren diese Effekte in der Gruppe der asymptotischen Atopiker weniger deutlich sichtbar. Für die weitere Analyse wurden daher nur die Gruppen der Rhinitiker und Asth-

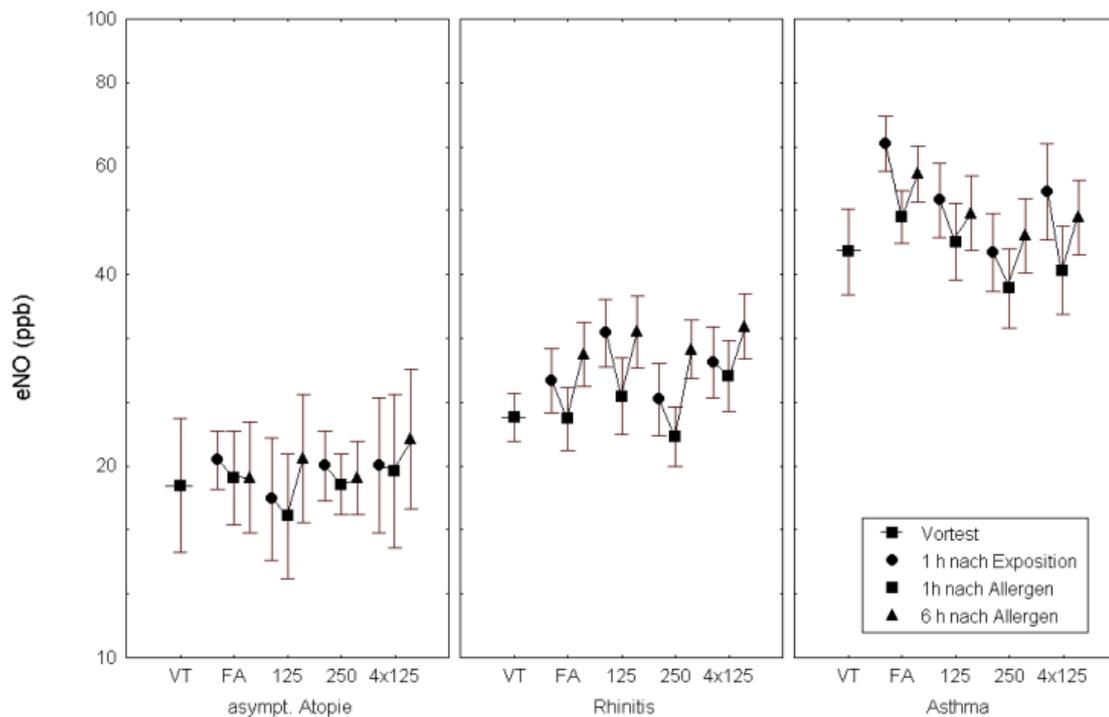


Abbildung 24: Konzentration von NO in der ausgeatmeten Luft. Geometrische Mittelwerte (SEM) der Konzentration im Vortest (VT), 1 h nach Exposition, 1 h nach Allergenprovokation und 6 h nach Allergenprovokation. Werte nach gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon.

matiker betrachtet. Verglichen mit den Daten des Vortests fanden sich erhöhte eNO-Werte 1 h nach Exposition gegenüber gefilterter Luft ($p = 0,04$), 125 ppb ($p = 0,01$) und der letzten der wiederholten Expositionen (4x125 ppb, $p = 0,03$; Newman-Keuls-Test). Dagegen waren die eNO-Werte 1 h nach Allergeninhalation nicht signifikant gegenüber dem Ausgangswert verändert. Sechs Stunden nach der Allergeninhalation stiegen die NO-Werte wieder an, und es fanden sich erneut erhöhte Werte nach Einatmung von gefilterter Luft, 125 ppb oder 4x125 ppb Ozon (jeweils $p \leq 0,003$) (Abb. 24). Auch im direkten Vergleich zwischen Früh- und Spätreaktion in der Konzentration des eNO zeigten sich in allen Haupttestungen hochsignifikante Anstiege (jeweils $p < 0,001$). Das eNO konnte mit dem gewählten Verfahren mit hoher Reproduzierbarkeit gemessen werden. So war nicht nur der Unterschied zwischen den Gruppen

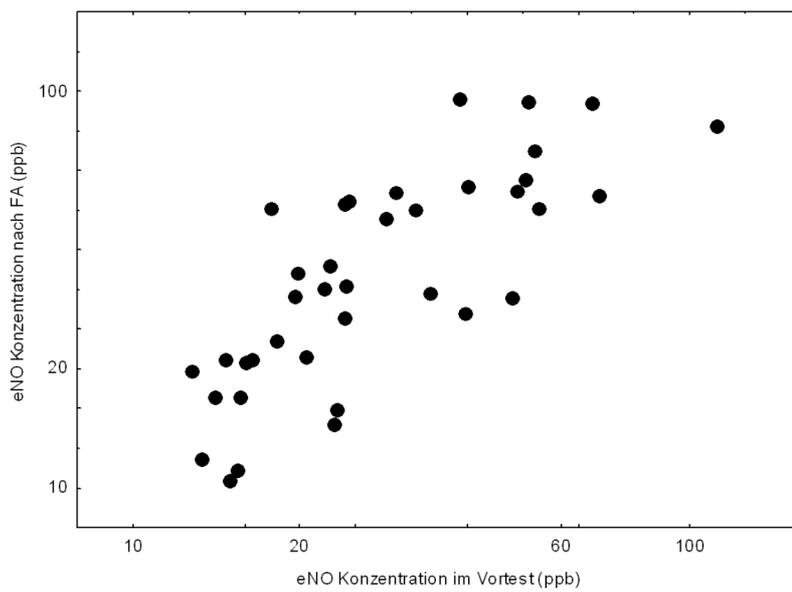
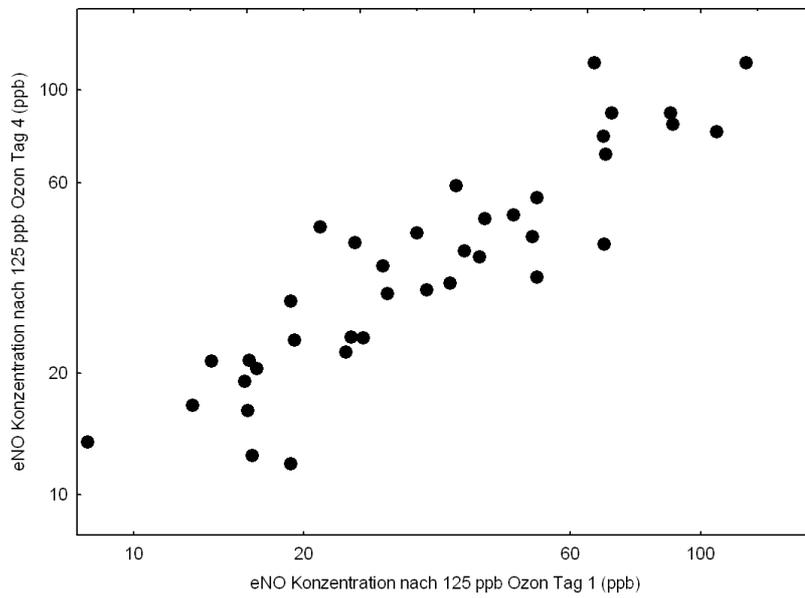
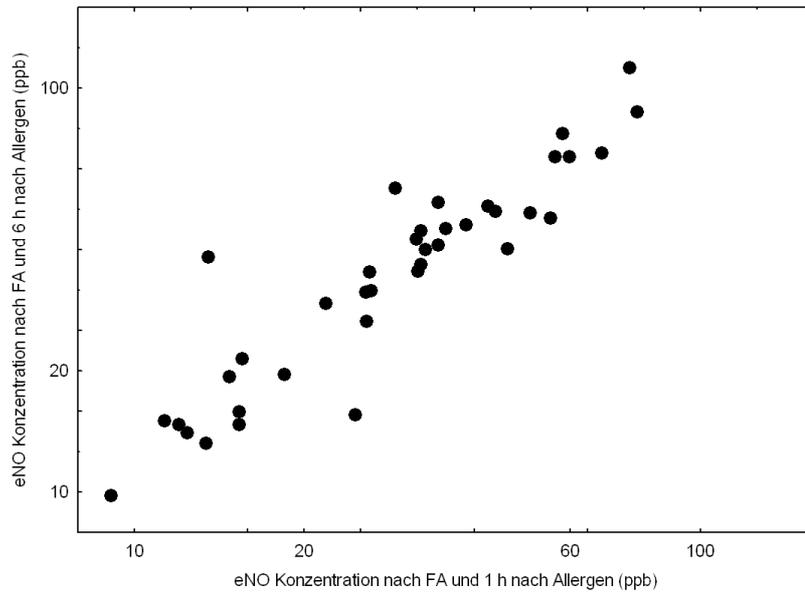


Abbildung 25: Korrelation der eNO-Konzentrationen zwischen verschiedenen Messzeitpunkten

über die gesamte Studiendauer sichtbar, es zeigten sich auch signifikante Korrelationen zwischen den Messzeitpunkten. Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Korrelation für die Messungen nach gefilterter Luft zum Zeitpunkt der Früh- und Spätreaktion (Zeitraum 5 h; $r = 0,90$, $p < 0,001$), für die Messung nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (3 Tage; $r = 0,91$, $p < 0,001$) und zwischen Vortest und der Messung nach Exposition gegenüber gefilterter Luft (3 Wochen – mehrere Monate; $r = 0,70$, $p < 0,001$).

4.9. Messung von H_2O_2 im Atemkondensat

Die Messung von H_2O_2 im Atemkondensat unterlag wesentlich stärkeren Streuungen im Vergleich zur eNO-Messung (Abb. 26). Weder in der Vortestung noch in den Haupttestungen konnte ein Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden. Nur in der Gruppe der Asthmatiker waren nach Exposition gegenüber gefilterter Luft leicht erhöhte Werte im Vergleich zum Vortest zu beobachten,

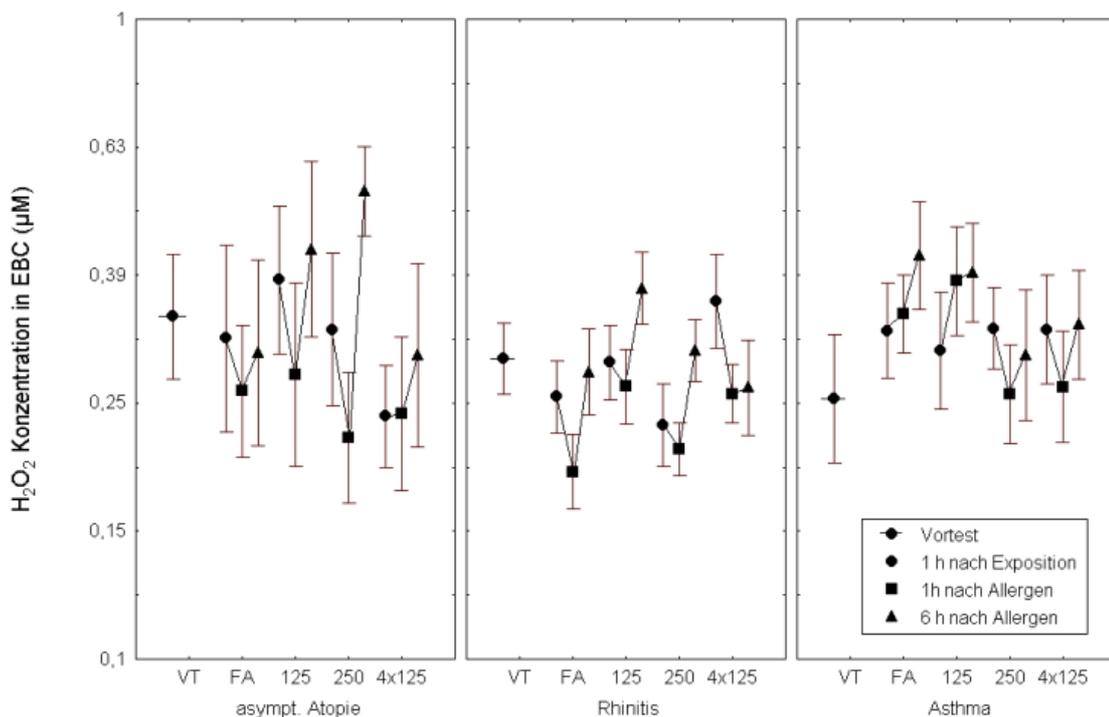


Abbildung 26: Konzentration von H_2O_2 in der ausgeatmeten Luft. Geometrische Mittelwerte (SEM) der Konzentration im Vortest (VT), 1 h nach Exposition, 1 h nach Allergenprovokation und 6 h nach Allergenprovokation. Werte nach gefilterter Luft (FA), 125 ppb, 250 ppb und 4x125 ppb Ozon.

die allerdings nicht statistisch signifikant waren. Der Anstieg in der H_2O_2 -Konzentration von der Früh- zur Spätreaktion war nach Exposition gegenüber gefilterter Luft (Wilcoxon's Paartest; $p < 0,001$), nach 125 ppb ($p = 0,01$) und 250

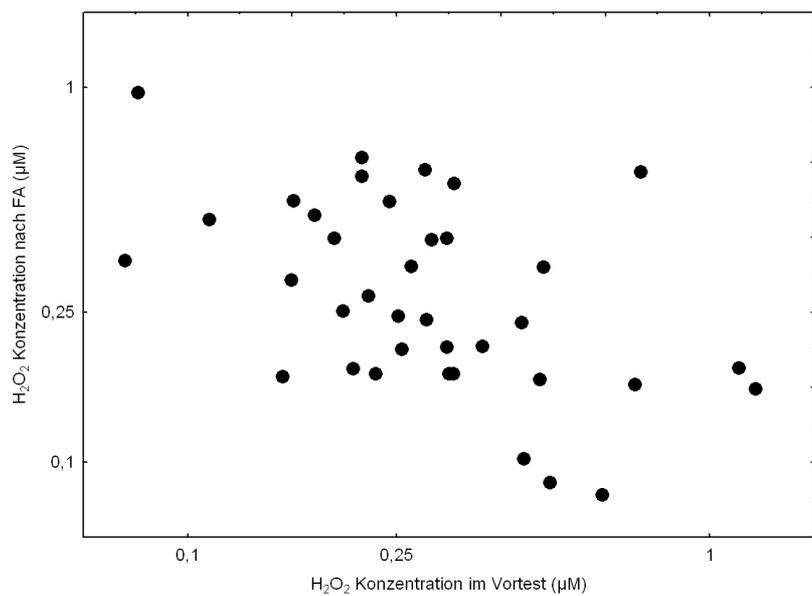
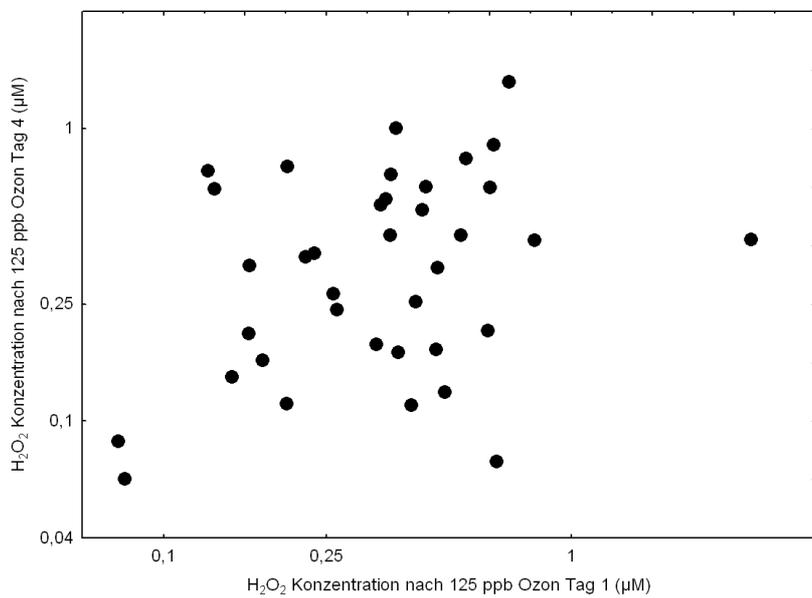
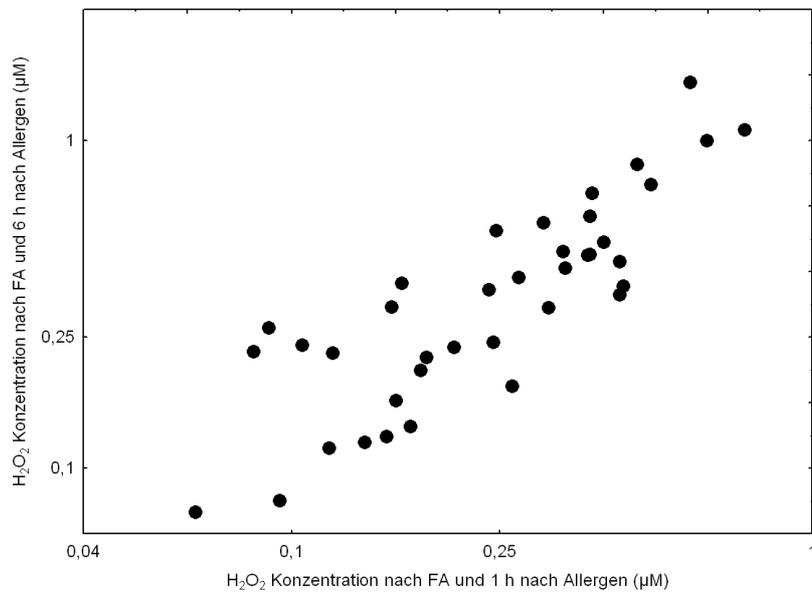


Abbildung 27: Korrelation der H_2O_2 -Konzentrationen zwischen verschiedenen Messzeitpunkten

ppb Ozon ($p < 0,001$) signifikant, sofern Rhinitiker und Asthmatiker gemeinsam ausgewertet wurden. Abb. 27 zeigt analog zum eNO die Korrelation für die H_2O_2 -Messungen nach gefilterter Luft zum Zeitpunkt der Früh- und Spätreaktion (Zeitraum 5 h; $r = 0,84$, $p < 0,001$), für die Messung nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon (3 Tage; $r = 0,32$, $p = 0,05$) und zwischen Vor-test und der Messung nach Exposition gegenüber gefilterter Luft (3 Wochen – mehrere Monate; $r = -0,36$, $p = 0,03$).

5. Diskussion

Ausgangspunkt für die Durchführung dieser Untersuchung waren epidemiologische Studien, die zeigen, dass Ozon die Symptomatik eines Asthma bronchiale verschlechtern kann und es nach Perioden mit erhöhten Ozonkonzentrationen in der Umwelt zeitverzögert zu vermehrten Krankenhauseinweisungen aufgrund von Atemwegsbeschwerden, einschließlich Asthmasymptomen, kommt [ANDERSON 1998, BURNETT 1994, BURNETT 1997, CODY 1992, STIEB 1996]. Obwohl nach experimenteller Ozonexposition Asthmatiker keine stärkere Einschränkung der Lungenfunktion im Vergleich zu Gesunden aufweisen [HORSTMAN 1995, KREIT 1989, LINN 1978, SCANNELL 1996], konnte gezeigt werden, dass Ozon die Bereitschaft der Atemwege, auf einen nachfolgenden Stimulus wie beispielsweise eine Allergeninhalation zu reagieren, sowohl bei Patienten mit Asthma als auch bei Probanden mit allergischer Rhinitis verstärken kann [JENKINS 1999, JÖRRES 1996]. In beiden Studien wurde die Lungenfunktionsreaktion während der allergischen Sofortreaktion unmittelbar [JENKINS 1999] bzw. maximal 3 h nach Ozonexposition gemessen [JÖRRES 1996]. Die Fragen, ob Ozon auch eine allergische Spätreaktion sowie eine zeitlich verzögerte Allergenantwort am folgenden Tag verstärken kann und ob insbesondere die als klinisch relevant erachtete allergische Spätreaktion deutlicher ausfällt, war dagegen vor Durchführung der vorliegenden Untersuchung nicht bzw. nicht in ausreichendem Maße geklärt. Neben den funktionellen Veränderungen verursacht Ozon eine Atemwegsentzündung (Übersicht in [BASCOM 1996]), die im Gegensatz zur Lungenfunktion keiner Adaptation nach wiederholten Expositionen unterliegt [JÖRRES 2000b]. Das Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege [GINA 2002], und das Ausmaß der Entzündung eng mit dem Schwere-

grad eines Asthma assoziiert [BUSSE 1993]. Auch bei der allergischen Rhinitis sind die durch Allergen hervorgerufenen Entzündungsprozesse für die Symptome verantwortlich [HOWARTH 2006]. Daher war eine zentrale Frage dieser Untersuchung, ob die die einmalige oder wiederholte Exposition gegenüber Ozon die durch Allergen ausgelöste Atemwegsentzündung verstärken kann. Hinweise auf eine mögliche Verstärkung der Entzündung lagen vor dieser Untersuchung nur aus einer Studie mit einmaliger Ozonexposition und nasaler Allergenprovokation vor [PEDEN 1995].

5.1. Versuchsdesign

Zur Beantwortung unserer Fragen wurde, anders als in vorrausgegangenen Untersuchungen [JENKINS 1999, JÖRRES 1996], die Allergenprovokation erst 20 h nach Ozonexposition, am Morgen des darauffolgenden Tages durchgeführt. Es war bekannt, dass zu dieser Zeit die durch Ozon induzierte Atemwegsentzündung noch andauert [HOLZ 1999] und damit die Bereitschaft, auf Allergen zu reagieren, nach wie vor verändert sein könnte. Durch den Ansatz, die Allergenprovokation am Morgen durchzuführen, konnte die Lungenfunktion über den gesamten Tag kontrolliert erfasst werden und eine Messung der Atemwegsentzündung 6 h nach Allergenprovokation zum Zeitpunkt der allergischen Spätreaktion erfolgen. Obgleich der Zeitpunkt der Spätreaktion individuell schwanken kann, wurde für diese Messung ein fester Zeitpunkt gewählt, um den Tag für Probanden und Personal besser planbar zu machen. Die maximalen Einschränkungen der Lungenfunktion fanden sich in einer Zeitspanne von 3-10 h nach Allergenprovokation, somit lag die Sputuminduktion bis zu 4 h vom individuell optimalen Zeitpunkt entfernt, sofern man die Lungenfunktionsreaktion zugrundelegt. Sputuminduktionen, die 1 und 24 h nach Ozonexposition erfolgten [HOLZ 1999], zeigten jedoch nur geringgradige Änderungen der ozoninduzierten zellulären Zusammensetzung über diesen Zeitraum und deuten darauf hin, dass diese Entscheidung keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Neben der vorliegenden Untersuchung gibt es bislang keine Studie, die den Einfluss einer wiederholten Ozonexposition auf die Allergenantwort geprüft hat. Basierend auf den Erfahrungen vorangegangener Studien mit wiederholten Ozonexpositionen [CHRISTIAN 1998, DEVLIN 1997, JÖRRES 2000b], erschien

die Kombination einer hohen Ozonkonzentration (> 200 ppb) mit einer Allergenprovokation als unrealistisch und darüber hinaus als ein zu großes Risiko für überschießende Allergenreaktionen, da als Grundhypothese von einer Verstärkung der Allergenreaktion durch Ozon ausgegangen wurde. Obwohl nach einer einmaligen Exposition von 6 h gegenüber 100 ppb noch kein Effekt auf die Allergenreaktion gemessen werden konnte [JENKINS 1999], waren in einer vorangegangenen Untersuchung in Großhansdorf nach einmaliger Exposition (3 h) gegenüber 125 ppb Ozon bereits leichtgradige entzündliche Veränderungen bei Asthmatikern nachweisbar [HOLZ 1999]. Aus diesem Grund, und weil eine möglichst umweltrelevante Ozonkonzentration auf die Allergenantwort getestet werden sollte, wurden 125 ppb für die wiederholte Ozonexposition eingesetzt. Entsprechend wurde zur Kontrolle eine einmalige Exposition gegenüber 125 ppb Ozon in das Versuchsdesign aufgenommen. Als Positivkontrolle wurden Probanden einmalig gegenüber 250 ppb Ozon exponiert, da hier trotz des hier gewählten späteren Zeitpunktes der Allergenprovokation eine verstärkte Allergenreaktion zu erwarten war [JÖRRES 1996]. Zur Kontrolle, ob die körperliche Anstrengung bei der Exposition allein schon einen Einfluss auf die allergische Reaktion hatte, wurden alle Probanden an einem einzelnen Versuchstag gegenüber gefilterter Luft exponiert.

Bei Betrachtung des Designs könnte argumentiert werden, dass auch die wiederholte Exposition gegenüber gefilterter Luft als Kontrolle hätte berücksichtigt werden sollen. Jedoch war bereits das durchgeführte Studiendesign mit 4 Haupttestungen, die jeweils über 2 Tage und bei wiederholter Exposition über 5 Tage liefen, schwierig zu realisieren. Entsprechend lag der Median der Versuchsdauer bei 327 Tagen; bei einigen Probanden wurden sogar 2 Jahre überschritten. Probanden über diesen Zeitraum in der Studie zu halten und zur Teilnahme anzuhalten, erwies sich als nicht einfach. Innerhalb solcher Zeiträume kann auch eine Veränderung der allergischen Grunderkrankung nicht ganz ausgeschlossen werden, obgleich keine konkreten Anhaltspunkte dafür vorlagen. Die Hauptgründe für diese lange Dauer lagen in der Notwendigkeit, die jeweilige Allergensaison des Probanden zu vermeiden, einen Zeitabstand von mindestens 4 Wochen zwischen den jeweiligen Haupttestungen einzuhalten, um „Übertragseffekte“ zu vermeiden, sowie nach den unvermeidbaren Atemwegsinfekten 3 Wochen lang keine Testung durchzuführen. Letzteres sorgte

insbesondere im allergenarmen Herbst und Winter für Verzögerungen. Da jedoch eine Infektion der Atemwege zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft gegenüber anderen Stimuli führen kann [GRÜNBERG 1997], war diese Maßnahme unbedingt erforderlich.

Die Analyse der Reihenfolge der Untersuchungen zeigte einen Trend zu einer erhöhten Anzahl von Expositionen gegenüber 250 ppb sowie wiederholten Expositionen (4x125 ppb) jeweils am Ende der Untersuchungssequenz bzw. von Expositionen gegenüber gefilterter Luft und einmaliger Gabe von 125 ppb Ozon am Anfang der Sequenz der Haupttestungen. Dies war zum Teil dadurch bedingt, dass bereits bei den ersten Probanden teilweise deutlich sichtbare verstärkte Reaktionen nach hohen und wiederholten Ozonexpositionen auftraten und deshalb „aus Vorsicht“, allerdings ohne explizite Absprache, zunächst bei einigen Probanden die Haupttestungen mit den „niedrigeren“ Expositionen begonnen wurden. Mit einem Abstand von 4 Wochen war aber die Zeitspanne zwischen den Testungen lang genug, um Übertragseffekte zu vermeiden. Der Zeitabstand war vergleichbar zu dem in anderen Studien gewählten Abstand [BALL 1996, CHEN 2004, GAUVREAU 1999b, JENKINS 1999, VAGAGGINI 2002]. Daher gehen wir davon aus, dass die ungleiche Verteilung der Reihenfolgen keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Ein Vergleich der funktionellen und inflammatorischen Änderungen zwischen Probanden, die sich innerhalb der ersten 2 Haupttestungen der wiederholten Exposition unterzogen, und denen, die diesen Test erst in den beiden letzten Haupttestungen durchführten, ergab ebenfalls keine erkennbaren Unterschiede.

Bedingt durch das aufwendige Versuchsdesign mit insgesamt 5 Messzeitpunkten (1x Vortest, 4x Haupttest) wurden ausschließlich nicht-invasive Verfahren wie die Sputuminduktion, der Nachweis von NO in der Ausatemluft und die Messung von H₂O₂ im Exhalat zur Erfassung der Atemwegsentzündung eingesetzt. Hauptauswerteparameter im Sputum war die zelluläre Zusammensetzung, insbesondere die Zahl der Eosinophilen. Darüber hinaus konnten bei den verfügbaren Probenmengen insgesamt vier Parameter in der Flüssigphase des Sputums gemessen werden. Für weitere Messungen lag nicht ausreichend Material bei allen Probanden vor, so dass nur punktuelle Vergleiche möglich gewesen wären. Als repräsentative und potentiell wichtige Parameter wurden ausgewählt LDH, ein Marker für Zellschädigung, sodann Histamin und Tryptase

als Marker für Mastzellaktivität, sowie NGF, ein Neutrophin, welches im Prinzip das Überleben von eosinophilen Granulozyten verlängern kann.

Eine Sputuminduktion selbst stellt einen Reiz für die Atemwege dar, daher kann diese Methode nicht wiederholt innerhalb von 48 h eingesetzt werden [HOLZ 1998b, NIGHTINGALE 1998]. Außerdem liegt der Zeitaufwand einer Induktion mit anschließender Aufarbeitung bei ca. 2 h. Aus diesen Gründen konnte dieses Verfahren nur einmal innerhalb des Protokolls eingesetzt werden und wurde gezielt zur Erfassung der Atemwegsentzündung zum Zeitpunkt der Spätreaktion genutzt (6 h nach Allergenprovokation). Somit war es ohne Verdopplung der Anzahl der Versuche nicht möglich, die Ozonreaktion selbst mit dieser Methode zu erfassen. Die Messungen in der Ausatemluft und im Exhalat stellen dagegen keinen zusätzlichen Reiz dar und sind weniger aufwendig. Daher wurde versucht, mit diesen Methoden auch Informationen über das Ausmaß der Inflammation unmittelbar nach der Exposition sowie nach der Allergenprovokation zu erhalten. Dies gilt um so mehr, als vielfach Korrelationen zwischen der Konzentration des ausgeatmeten NO und der Zahl der Eosinophilen in den Atemwegen nachgewiesen wurden. Die Änderung der unspezifischen Atemwegsüberempfindlichkeit wurde 3 h nach Ozonexposition bestimmt, um zu prüfen, inwieweit dieser Parameter mit der nachfolgenden Reaktion auf das spezifische Allergen bzw. der Atemwegsentzündung zum Zeitpunkt der Spätreaktion zusammenhängt.

In diese Untersuchung wurden drei Gruppen mit unterschiedlicher Ausprägung der allergischen Grunderkrankung eingeschlossen. Dazu gehörten Personen mit mittel- bis leichtgradigem allergischem Asthma bronchiale mit bekanntermaßen deutlicher bronchialer Reaktion auf Allergen. Darüber hinaus wurden Personen mit allergischer Rhinitis, aber ohne asthmatische Beschwerden, untersucht, bei denen nach eigenen Angaben Allergene keine Symptome in den unteren Atemwegen verursachten. In Übereinstimmung damit erreichte die funktionelle Allergenantwort im Vortest nicht die kritische Schwelle für eine positive Allergenreaktion. Interessanterweise hatten Patienten mit Rhinitis ohne Asthma in einer Voruntersuchung, ähnlich den Patienten mit Asthma, eine verstärkte bronchiale Reaktion auf Allergen zum Zeitpunkt der Frühreaktion gezeigt bzw. trat nach Ozonexposition (einmalig 250 ppb) diese bronchiale Allergenreaktion erst zutage [JÖRRES 1996]. Um in dieser Richtung noch einen

Schritt weiter zu gehen, sollte in der vorliegenden Untersuchung geprüft werden, ob sich bei Probanden mit bislang asymptomatischer Atopie die Reaktionsschwelle auf Allergen auch bei verzögerter Allergengabe durch vorherige Ozonexposition herabsetzen lässt. Bei 2 Probanden dieser Gruppe kam es tatsächlich zu einer verstärkten Allergenreaktion (Sofortreaktion) nach Inhalation von 250 ppb Ozon. Einer dieser Probanden sowie ein weiterer aus dieser Gruppe zeigten eine deutliche Spätreaktion nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon. Hinsichtlich der entzündlichen Reaktion war eine leichtgradig erhöhte neutrophile Entzündung nach 4x125 ppb Ozon im Vergleich zu gefilterter Luft zu erkennen, so dass trotz der geringen Fallzahl sich Hinweise darauf ergaben, dass Ozon selbst bei asymptomatischen Atopikern zu einer verstärkten Reaktion auf Allergen führte, auch wenn das Allergen erst 20 h nach Ende der Ozonexposition appliziert wurde.

Die meisten Allergenprovokationen wurden mit einer Provokationsdosis durchgeführt, die im Vortest zu einem Abfall von 15 % im FEV₁ geführt hatte (PD₁₅FEV₁). Nur bei solchen Probanden, bei denen PD₁₅FEV₁ in der Vortestung nicht ermittelt werden konnte, weil sie auch mit der maximalen inhalierbaren Allergendosis keinen entsprechenden Abfall im FEV₁ aufwiesen, wurde in den Haupttestungen mit einer Dosis provoziert, die 50 % der vom Allergenhersteller für Provokationstestungen maximalen empfohlenen Dosis entsprach. Bei solchen Probanden, die mit der Lungenfunktionsreaktion in der Nähe eines 20%-igen Abfalls lagen, und bei solchen Probanden, die zwar keine ausgewiesene Lungenfunktionsreaktion auf Allergen zeigten, aber deutliche Symptome angaben, wurde aus Sicherheitsgründen und nach ärztlicher Rücksprache die Provokationsdosis in den Haupttestungen auf 10 % dieser maximalen Dosis (n = 4) bzw. auf 20 % (n = 3) herabgesetzt. Wiederum aus Gründen, das Studiendesign nicht noch aufwendiger zu gestalten, wurde in dieser Untersuchung eine einmalige Gabe von Allergen benutzt. Unter Umweltbedingungen wäre zwar eine wiederholte, niedriger dosierte Allergeninhalation realistischer gewesen [STERK 1998, SULAKVELIDZE 1998], jedoch gibt es Literaturhinweise, dass sich die Art der inflammatorischen Antwort zwischen diesen beiden Inhalationsarten nicht wesentlich unterscheidet [GAUVREAU 1999a, GAUVREAU 1999b].

5.2. Probanden

Alle für diese Studie rekrutierten Probanden mit Asthma zeigten eine erhöhte unspezifische Atemwegsempfindlichkeit ($PC_{20}FEV_1 < 8 \text{ mg/mL}$), erhöhte prozentuale Anteile von eosinophilen Granulozyten im Sputum sowie erhöhte eNO-Werte und reagierten im Mittel bei einer etwa 10-fach niedrigeren Allergendosis mit einem Abfall des FEV_1 um 15 % ($PD_{15}FEV_1$) im Vergleich zu den Probanden mit Rhinitis. Diese Daten stimmen mit Beobachtungen überein, die zeigten, dass das Muster der bronchialen inflammatorischen Antwort auf Allergen bei Asthmatikern und Rhinitikern sehr ähnlich ist und sich nur im Ausmaß unterscheidet [ALVAREZ 2000, KELLY 2003]. Wie die Lungenfunktion in der Gruppe der Asthmatiker zeigte, handelte es sich um leicht- bis mittelgradig Erkrankte, deren Asthma zumindest für die Dauer der Studie durch die Gabe von β -Sympatikomimetika bei Bedarf kontrollierbar war. Diese Medikamente wurden mindestens 8 h vor jeder Testung abgesetzt, um die Lungenfunktionsantwort nicht zu beeinflussen. Es ist ohnedies bekannt, dass sie die inflammatorische Antwort nur unwesentlich verändern [CIANCHETTI 1999]. Keiner der Probanden benutzte Steroide zur Kontrolle der Asthmasymptome. Aus diesen Gründen können medikamentöse Einflüsse auf die Ergebnisse der Studie ausgeschlossen werden.

5.3. Lungenfunktion nach Ozon

Der Einfluss von Ozon auf die Lungenfunktion war vergleichbar zu anderen Untersuchungen [BASCUM 1996, BLOMBERG 1999, HOLZ 1999, JÖRRES 2000b] und zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die deutlichsten Einschränkungen wurden nach Inhalation von 250 ppb Ozon beobachtet. In der Gruppe der Rhinitiker zeigte sich eine statistisch signifikante Adaptation der Lungenfunktion nach wiederholter Exposition gegenüber 125 ppb Ozon. Dieser Effekt wurde bislang nur bei gesunden Probanden nach Exposition gegenüber höheren Ozondosen beschrieben [CHRISTIAN 1998, DEVLIN 1997, JÖRRES 2000b].

Insgesamt war die Variabilität der Werte innerhalb der Gruppe der Asthmatiker höher; ferner gab es einen Trend hin zu einer Verbesserung der Lungenfunktion nach den Expositionen gegenüber gefilterter Luft, 125 ppb und der wiederholten Ozonexposition. Dies ist vermutlich zum Teil durch die zirkadiane Rhythmik zu

erklären, die bei vielen Patienten mit Asthma zu beobachten ist [BONNET 1991, SILKOFF 1998] und für eine Verbesserung der Lungenfunktion im Tagesverlauf verantwortlich ist. Dadurch fallen die relativ kleinen Änderungen während Exposition über 3 h in dieser Gruppe geringer aus.

5.4. Änderung der unspezifischen Atemwegempfindlichkeit nach Ozon

In allen drei Gruppen reagierten die Probanden am stärksten nach Einatmung von 250 ppb Ozon auf Methacholin, allerdings war dieser Effekt nur in der Gruppe der Rhinitiker statistisch signifikant. In dieser Gruppe war auch eine Adaption der Methacholinempfindlichkeit zu beobachten, d.h. die unspezifische Atemwegempfindlichkeit nahm im Laufe der wiederholten Ozonexpositionen ab. Ein solcher Effekt wurde nach 5 Tagen Exposition gegenüber 120 ppb über jeweils 6,6 h nicht beobachtet [FOLINSBEE 1994], jedoch nach 3 Tagen Exposition gegenüber 400 ppb über jeweils 2 h [DIMEO 1981]. Es liegen auch Daten aus Tierversuchen vor, bei denen bei Ratten nach wiederholten Ozonexpositionen eine verminderte Reaktion auf Acetylcholin gemessen wurde [SUN 1997]. Auch bei zwei Probanden mit asymptomatischer Atopie war dieser Effekt deutlich; ein vergleichbarer Trend war somit auch in dieser Gruppe zu erkennen. Die Abnahme der unspezifischen Atemwegempfindlichkeit stand im Gegensatz zur Zunahme der Reaktionsbereitschaft auf ein inhaliertes Allergen sowie zu der beobachteten verstärkten Atemwegsentszündung nach wiederholten Ozonexpositionen. Ferner bestätigten die vorliegenden Daten frühere Ergebnisse, die nach einmaliger Exposition gegenüber 250 ppb Ozon gewonnen wurden, indem kein Zusammenhang zwischen der Veränderung der unspezifischen Methacholinempfindlichkeit und der Veränderung der Reaktion auf Allergene festgestellt werden konnte [JÖRRES 1996, MULLER 1993].

In der Gruppe der Asthmatiker ließ sich keine Adaptation erkennen. Die unspezifische Atemwegempfindlichkeit lag um mehr als den Faktor 10 höher im Vergleich zu den anderen Probanden, d.h. die Werte von $PC_{20}FEV_1$ waren um den Faktor 10 kleiner. Dies war zu erwarten, da eine Atemwegsüberempfindlichkeit ein wesentliches Merkmal des Asthma bronchiale darstellt [GINA 2002]. Es fand sich innerhalb dieser Gruppe auch eine größere interindividuelle Variabilität, die möglicherweise einen eventuellen, relativ kleinen Adaptationseffekt maskiert hat.

5.5. Einfluss von Ozon auf die funktionelle Allergenantwort

Die Lungenfunktionsanalytischen Veränderungen der Allergenantwort nach Ozoninhalation in der vorliegenden Untersuchung sind kompatibel mit den in anderen Studien beobachteten Effekten, in denen der Einfluss von Ozon auf die Allergenantwort untersucht wurde. In einer vorangegangenen Studie aus Großhansdorf führte eine einmalige dreistündige Exposition gegenüber 250 ppb Ozon ebenfalls zu einer verstärkten Lungenfunktionseinschränkung während der Frühreaktion auf Allergen [JÖRRES 1996]. Dieser Effekt wurde in vergleichbarer Größenordnung bei Probanden mit Rhinitis, aber noch deutlicher bei Probanden mit leichtgradigem Asthma beobachtet. Letzteres war wahrscheinlich bedingt durch die Tatsache, dass im Unterschied zur vorliegenden Untersuchung in der seinerzeitigen Studie die Allergenprovokation bereits 3 h nach der Ozonexposition stattfand. Die verstärkte Antwort auf Allergen nach einer dreistündigen Exposition gegenüber 200 ppb Ozon wurde bei Probanden mit Asthma auch von einer englischen Arbeitsgruppe beschrieben [JENKINS 1999]. Eine Untersuchung aus dem Jahre 1991, bei der bereits nach einstündiger Ozonexposition (120 ppb) während Ruheatmung eine verstärkte Reaktion auf Allergen berichtet wurde [MOLFINO 1991], konnte von der gleichen Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden [HANANIA 1998] und wurde *de facto* aufgrund methodologischer Fehler zurückgezogen. Die Ursache für die Fehlmessungen in dieser Studie war vermutlich ein Designfehler, denn die Expositionen gegenüber Ozon und gefilterter Luft wurden nicht in zufälliger Reihenfolge und nur in einem Abstand von 2 Wochen durchgeführt. Auch andere Untersucher konnten nach Ruheatmung und bei niedriger Ozonkonzentration und Einatemdauer (1 h, 120 ppb) keine verstärkte Allergenreaktion feststellen [BALL 1996]. Ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung nach einmaliger dreistündiger Exposition gegenüber 125 ppb Ozon unter Belastung konnten Jenkins und Mitarbeiter auch nach 6 h Exposition gegenüber der umweltrelevanten Konzentration von 100 ppb Ozon keinen Effekt auf die allergische Reaktion beobachten [JENKINS 1999]. Erst eine weitere Dosiserhöhung (7,6 h Exposition gegenüber 160 ppb Ozon unter moderater Belastung) löste auch eine erhöhte Lungenfunktionsantwort auf Allergen aus [KEHRL 1999]. Eine verstärkte Lungenfunktionsantwort auf Allergen wurde interessanterweise auch nach

experimenteller Exposition gegenüber dem oxidativen Stimulus Stickstoffdioxid (NO₂) beschrieben [STRAND 1997]. Die Inhalation von bakteriellem Endotoxin, wie es z.B. in erhöhten Konzentrationen in Stallstäuben vorkommt [BERGER 2005, VON MUTIUS 2000], führt ähnlich wie Ozon zu einer neutrophilen Atemwegsentzündung [MICHEL 1997]. Es liegt sogar eine Untersuchung vor, die zeigt, dass 4 h nach Inhalation von Endotoxin die Lungenfunktionsreaktion auf Allergen verstärkt war [BOEHLECKE 2003].

Die Frage der Wirkung von wiederholten Ozonexpositionen auf die allergische Sofort- und Spätreaktion wurde bislang von keiner anderen Arbeitsgruppe am Menschen untersucht. Es konnte in der vorliegenden Untersuchung erstmals gezeigt werden, dass bereits eine umweltrelevante Konzentration von 125 ppb Ozon ausreichte, um bei Probanden mit allergischer Rhinitis die Reaktion auf Allergen zu steigern, sofern das Ozon am mehreren aufeinanderfolgenden Tagen eingeatmet wurde. In dieser Gruppe war sowohl der mittlere Lungenfunktionsabfall zum Zeitpunkt der Frühreaktion als auch die Zahl der klinisch signifikanten Lungenfunktionseinschränkungen zu diesem Zeitpunkt erhöht. Vergleichbare Daten liegen nur nach wiederholter Expositionen gegenüber NO₂ (500 µg/m³) bei leichtgradigen Asthmatikern vor, bei denen eine geringgradige Verstärkung der Reaktion auf Allergen zum Zeitpunkt der Früh- und Spätreaktion beobachtet wurde [STRAND 1998].

Ein Abfall der Lungenfunktion um 20 % ist zwar nicht lebensbedrohlich, aber auch bei Personen mit ansonsten normaler Lungenfunktion deutlich spürbar und könnte sich außerhalb der ärztlichen Aufsicht im Labor durch Angstzustände über ein unerwartetes Auftreten derartiger Symptome sogar noch verstärken. In der vorliegenden kontrollierten Untersuchung traten nur zweimal so starke Reaktionen auf, dass ein Arzt eingreifen musste. Betroffen waren ein Patient mit Asthma und ein Proband mit Rhinitis, die nach Allergeninhalation und vorausgegangener wiederholter oder hochdosierter Ozonexposition einen massiven Abfall der Lungenfunktion erlitten. Bei dem Patienten mit Asthma musste durch Kortisongabe interveniert werden. Die Messungen wurden dennoch fortgesetzt, auch wenn sowohl die funktionellen wie auch die inflammatorischen Parameter sehr wahrscheinlich durch das Kortison beeinflusst wurden. Bedingt durch diese Erfahrung wurde bei dem Patienten mit Rhinitis ganz auf die Testung mit der hohen Ozonkonzentration verzichtet, um

eine unnötige Belastung zu vermeiden.

Die allergischen Spätreaktionen waren am deutlichsten in der Gruppe der Asthmatiker, blieben aber in der Regel unter einem 15%-igen Abfall von FEV₁. Dennoch gab es einen Trend zu verstärkten Reaktionen nach Exposition gegenüber 250 ppb und 4x125 ppb Ozon bei solchen Probanden, die die deutlichsten Spätreaktionen im Vortest aufwiesen. In der Gruppe der Rhinitiker waren nach 250 ppb und 4x125 ppb Ozon eine erhöhte Anzahl deutlicher FEV₁-Abfälle ($\geq 15\%$) zu beobachten, und die Effekte auf die Spätreaktion waren insgesamt einheitlicher als bei den Asthmatikern. Dies könnte eventuell durch die höhere Provokationsdosis bedingt sein, die in dieser Gruppe den Einfluss unkontrollierbarer umweltbedingter Allergenexpositionen unwahrscheinlicher gemacht hat. Außerdem muss die bei einem bestehenden Asthma bekannte Variabilität der Erkrankung mit berücksichtigt werden, insbesondere angesichts der sehr langen Zeitspanne, in der die Testungen stattfanden. Alle Probanden wurden außerhalb ihrer jeweiligen Allergensaison getestet, um möglichst eine Beeinflussung durch die natürliche Allergenexposition auszuschließen. Ausnahme waren 3 Probanden mit Asthma und ein Proband mit Rhinitis, deren Hauptallergen die Hausstaubmilbe war. Damit war eine Testung außerhalb der Saison effektiv nicht möglich. Verglich man die Zahl und Änderungen der eosinophilen Granulozyten zwischen den Probanden gruppiert nach dem individuellen Allergen, zeigte sich ein leichter Trend zu höheren Anteilen von Eosinophilen im Vortest, ähnlich wie bei einem Probanden mit Katzenallergie. Die Verstärkung der eosinophilen Entzündung nach den Allergenprovokationen fiel in allen Gruppen allerdings vergleichbar aus und lag nur bei Probanden mit Roggenpollenallergie deutlich niedriger. Weder im Ausmaß der funktionellen Sofortreaktion noch in demjenigen der Spätreaktion war ein Unterschied zu den anderen Allergien zu erkennen. Somit kann ein wesentlicher Einfluss der Probanden mit Hausstaubmilbenallergie auf das Gesamtergebnis der Studie mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Insgesamt gab es 9 Probanden, bei denen weder ein Effekt auf die Sofort- noch auf die Spätreaktion messbar war (Reaktionsgruppe 0). Bei 15 Probanden ergab sich nur eine Verstärkung der Sofortreaktion (Reaktionsgruppe 1), und bei 14 Probanden waren sowohl die Sofort- als auch die Spätreaktion nach 250 ppb und 4x125 ppb Ozon deutlicher (Reaktionsgruppe 2). Betrachtete man

diese drei Reaktionsgruppen, dann fiel auf, dass Gruppe 2 signifikant höhere IgE-Spiegel im Blut aufwies im Vergleich zur Gruppe 0. Vergleichbare Unterschiede konnten auch für das spezifische IgE gemessen werden. Diese Daten sprechen dafür, dass eine erhöhte Reaktionsbereitschaft auf Allergen nach Ozonexposition vom Grad der Ausprägung der allergischen Erkrankung beeinflusst wurde.

5.6. Einfluss von Ozon auf die allergische Atemwegsentzündung

Veränderungen durch Ozon in der durch Allergen ausgelösten Entzündungsreaktion wurden bisher in zwei Studien mittels nasaler Allergenprovokationen untersucht. Dabei zeigten sich nach Exposition gegenüber 400 ppb Ozon und darauffolgender Allergenprovokation erhöhte Anteile neutrophiler und eosinophiler Granulozyten in der nasalen Spülflüssigkeit [PEDEN 1995]. Die Art der Änderung ist damit kompatibel zu den Änderungen, die nach hoher Ozonkonzentration in der vorliegenden Untersuchung beobachtet wurden. In einer im Jahre 2004 veröffentlichten Studie wurden Asthmatiker für 1 h gegenüber 200 ppb Ozon exponiert und 6 h später mit Allergen provoziert [CHEN 2004]. Durch die relativ kurze Ozonexposition und damit niedrige Dosis konnten weder Effekte auf die Lungenfunktionsantwort noch solche auf die Atemwegsentzündung ausgelöst werden. In dieser Arbeit wurde neben der BAL auch eine Spülung der oberen Atemwege vorgenommen; es zeigten sich trotz der Unterschiede in den Untersuchungsprotokollen zum Sputum vergleichbare Anteile neutrophiler und eosinophiler Granulozyten nach Allergeninhalation. Auch nach NO₂-Exposition (500 µg/m³) konnte eine gesteigerte allergeninduzierte Atemwegsentzündung gemessen werden. Hier wurden erhöhte Anteile neutrophiler Granulozyten in der BALF und im BW gefunden [BARCK 2002].

Daten zum Einfluss von wiederholten Ozonexpositionen auf die entzündliche Allergenantwort sind neben der vorliegenden Untersuchung nur aus Tierexperimenten bekannt. Hier zeigten sich bei experimentell sensibilisierten Rhesusaffen nach wiederholten Ozon- und wiederholten Allergenexpositionen deutlich höhere Anteile eosinophiler Granulozyten in der BALF im Vergleich zur Allergenexposition ohne Ozonexposition. Diese Untersuchungen, die an der Universität von Kalifornien erfolgten, konzentrierten sich auf die Frage, inwieweit Ozonexpositionen während der körperlichen Entwicklung von Kindern

und Jugendlichen die Lunge und das Immunsystem beeinflussen und somit möglicherweise Ozon für die erhöhte Asthmainzidenz bei Kindern mitverantwortlich ist [SCHELEGLE 2003]. Bei den sehr deutlichen Effekten auf die eosinophile Entzündung muss berücksichtigt werden, dass die Expositionen über 5 Tage mit 500 ppb über jeweils 8 h / Tag, extrem hoch waren. Auch ist die Frage der Begünstigung einer allergischen Sensibilisierung von der Frage nach der Verstärkung der Allergenantwort bei bereits bestehender Sensibilisierung verschieden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Atemwegsentszündung erfolgreich im induzierten Sputum gemessen; nur in einem einzigen Fall war dies nicht möglich. Es ist bekannt, dass trotz Induktion einige Personen kein Sputum ausreichender Quantität und Qualität produzieren können. Daher wurden alle Probanden in den Vortestungen daraufhin getestet und nur dann in die Studie eingeschlossen, wenn es gelang, bereits hier eine gute auswertbare Probe zu produzieren. Neben dieser Vorauswahl gab es noch einige weitere Punkte, die nach eigenen Erfahrungen aus vorausgegangenen Untersuchungen zu der geringen Ausfallrate beigetragen haben. Die Probanden wurden sehr genau über den Ablauf einer Induktion und deren Ziele im Rahmen der Untersuchung aufgeklärt und gebeten, vor einer Sputuminduktion möglichst große Mengen an Flüssigkeit (Mineralwasser) zu trinken, da dies die Lockerung des Schleimes in den Atemwegen fördert. Weiterhin war es wichtig, dass die Probanden bei der eigentlichen Produktion des Sputums, d.h. dem Husten und stoßhaften Ausatmen, möglichst allein in einem Raum waren. Die hohe Vitalität der Sputumzellen sowie der sehr niedrige Anteil der Plattenepithelien [DJUKANOVIC 2002] belegen, dass die Aufarbeitung des Sputums, insbesondere die Trennung von Sputum und Speichel, sowie die Herstellung der mikroskopischen Präparate zügig und mit hoher Präzision durchgeführt wurden.

Das Sputum wurde analog der von uns etablierten und bereits in anderen Studien eingesetzten Methode induziert und aufgearbeitet [HOLZ 1998b, HOLZ 1998a, HOLZ 1999]. Dazu gehört, dass zunächst die 3 einzelnen Fraktionen des Sputums, die während der jeweils aufeinanderfolgenden 3 x 10 min andauernden Inhalationszeit produziert wurden, getrennt gesammelt und analysiert wurden. Bei dieser Analyse zeigte sich wie bereits in unseren anderen Untersuchungen, dass sich die Zusammensetzung des Sputums im Verlauf der

Induktion veränderte [HOLZ 1998c, HOLZ 1998a]. Dieser Effekt wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [GERSHMAN 1999] und wird dahingehend interpretiert, dass das Sputum mit zunehmender Inhalationsdauer aus tieferen Atemwegen stammt [ALEXIS 2001, HOLZ 1998a]. Es kommt dabei zu einem Anstieg des Prozentsatzes der Alveolarmakrophagen, die sich in größeren Anteilen in den tiefen Atemwegen aufhalten, und einem Abfall des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten, die eher in den zentralen Bronchien zu finden sind. Da die Anteile der eosinophilen Granulozyten nach Allergeninhalation deutlich erhöht waren, konnte ebenfalls der Abfall des Anteils dieses Zelltyps beobachtet werden, der zuvor bereits von anderen beschrieben wurde [GERSHMAN 1999]. Zusätzliche Informationen hinsichtlich der durch Ozon beeinflussten Atemwegsentzündung wurden durch die getrennte Aufarbeitung nicht gewonnen. Diese Maßnahme hat aber zur Qualitätskontrolle beigetragen, und die konsistenten Veränderungen der drei aufeinanderfolgenden Sputumproben in den Probandengruppen sowie nach Ozonexposition und Allergenprovokation (Abb. 14 - 16) sprechen für die Güte der vorliegenden Sputumdaten. Neben der Veränderung der zellulären Zusammensetzung kam es während der Induktion durch die Inhalation relativ großer Mengen an Flüssigkeit auch zu einer Verdünnung der Proben. Diese führte zu einer Abnahme der Sputumdichte der aufeinanderfolgenden Proben [HOLZ 1998a]. Als wichtige Konsequenz der bekannten Änderungen der Probenzusammensetzung während einer Sputuminduktion wurde auch in der vorliegenden Untersuchung, entsprechend den internationalen Empfehlungen [PAGGIARO 2002], die Dauer der Induktionen immer konstant gehalten.

Zur Vergleichbarkeit unserer Daten mit anderen Untersuchungen und zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse wurde die Zellzusammensetzung der Sputumproben rechnerisch gemittelt. Hierbei erfolgte, wie auch schon in vorausgegangenen Untersuchungen [HOLZ 1999], eine Gewichtung entsprechend der produzierten Menge der drei aufeinanderfolgenden Sputumproben.

Die Muster der Veränderungen im induzierten Sputum waren in beiden Gruppen ähnlich, obwohl sich die Gruppen in der statistischen Signifikanz bei den Veränderungen der einzelnen Parameter unterschieden. Im Vergleich zur basalen Sputumzusammensetzung, die im Vortest ermittelt wurde, zeigte sich in allen Haupttestungen jeweils 6 h nach Allergeninhalation eine deutliche eosino-

phile und neutrophile Entzündungsreaktion. Im Vergleich dazu fiel die Modulation des Allergeneffektes durch Ozon eher moderat aus, war aber nachweisbar.

Betrachtet man die Änderungen der Sputumzusammensetzung jeweils im Vergleich zum Vortest, so wird deutlich, dass es Probanden gab, die reproduzierbar auf Allergen reagierten, und solche, die weniger stark auf das Allergen reagierten. Die statistisch signifikanten Korrelationen bezüglich der Änderungen der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten belegen auch, dass diese Effekte mit hoher Reproduzierbarkeit durch die Analyse des Sputums zu erfassen waren. Diese hohe Reproduzierbarkeit steht mit den Literaturbefunden in Übereinstimmung [GAUVREAU 1999b, HOLZ 1999]. Nach Allergeninhalation werden eosinophile Granulozyten regelhaft im Sputum und in der BALF sowohl bei Asthmatikern als auch bei Rhinitikern gefunden [ALVAREZ 2000] und erhöhte Werte sind bereits 3 h nach der Provokation messbar [AALBERS 1993]. Daten über das Ausmaß des Einstroms neutrophiler Granulozyten nach Allergenprovokation sind weniger einheitlich. Die Ergebnisse scheinen vom Zeitpunkt der Untersuchung nach Inhalation, der Dosis und von den Probandencharakteristika abzuhängen [GAUVREAU 1999a]. Wie oben bereits erwähnt, waren die Effekte auf die Neutrophilen reproduzierbar in allen Haupttestungen sichtbar.

Im Vergleich zur Exposition mit gefilterter Luft führte die Exposition gegenüber Ozon zu einer geradezu dosisabhängigen Verschiebung der Sputumzusammensetzung. Die Anteile der Makrophagen waren nach gefilterter Luft am größten, und die niedrigsten Werte wurden nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon gemessen (Abb. 17). Dies führte zu einem spiegelbildlichen Anstieg des Anteils der Gesamt-Granulozyten, denn hier fanden sich die höchsten Anteile nach 4x125 ppb (Abb. 17). Die Anteile der neutrophilen Granulozyten waren nach der einmaligen hochdosierten (250 ppb) Ozonexposition am größten (Abb. 18), während die höchsten Anteile der eosinophilen Granulozyten nach wiederholter Ozonexposition auftraten (Abb. 18). Bei der Betrachtung der prozentualen Anteile der einzelnen Zelltypen wird die Interpretation allerdings durch die Tatsache erschwert, dass sich die Anteile gegenseitig beeinflussen, da sie sich zu 100 % aufaddieren müssen. Andererseits sind die Absolutzahlen der Zellen in vielen Fällen variabler als die Prozentsätze und daher weniger aussagekräftig. Erschwerend kommt hinzu, dass an der allergischen Ent-

zündungsreaktion nicht nur eosinophile Granulozyten beteiligt sind, sondern, wie in dieser und anderen Studien gezeigt [NOCKER 1999], auch neutrophile Granulozyten. Die alleinige Inhalation von Ozon führt zu einer neutrophilen Entzündung, die noch 24 h nach Exposition messbar ist [HOLZ 1999] und somit für die geringgradige Verschiebung der prozentualen Anteile innerhalb der Granulozyten nach Inhalation von 250 ppb Ozon verantwortlich zu sein scheint. Da nach wiederholter Exposition mit Ozon weniger neutrophile Granulozyten in der BALF als nach einmaliger Exposition gefunden wurden [JÖRRES 2000b], erscheint es wenig wahrscheinlich, dass sich diese Zellen noch 24 h nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon im Sputum vermehrt nachweisen lassen. Zwar ist zu beachten, dass die im Sputum gefundenen Änderungen der Neutrophilenzahlen keineswegs zwingend mit den der BALF konkordant sein müssen. Andererseits waren in der Studie, die eine Exposition gegenüber 4x200 ppb Ozon beinhaltete [JÖRRES 2000b], die Toleranzeffekte im BW noch stärker als in der BALF ausgeprägt (unveröffentlichte Daten). Daher ist zu vermuten, dass die erhöhte Gesamtgranulozytenzahl nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon auf eine Verstärkung der Allergenreaktion durch Ozon zurückzuführen ist.

Wie Abbildung 19 zeigt, nahm die Zellzahl pro mL Sputum in den Haupttestungen nach Allergeninhalation zu. Durch die einmalige Exposition gegenüber 125 ppb Ozon wurde diese im Vergleich zu gefilterter Luft nicht beeinflusst, stieg aber nach 250 ppb Ozon und sogar statistisch signifikant nach 4x125 ppb Ozon im Vergleich zu gefilterter Luft an. Die Zellzahl pro mL Sputum ist ein Maß für die Sputumdichte und wird dahingehend interpretiert, dass ein Anstieg mit einer absoluten Vermehrung der Zellzahl bzw. einem Zelleinstrom in den Atemwegen einhergeht [DJUKANOVIC 2002]. Daher deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf insgesamt erhöhte Zahlen neutrophiler und eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon hin. Dies ist starke Evidenz für eine Verstärkung der allergischen Entzündungsreaktion, die nicht nur durch eine Verschiebung der Anteile z.T. vorgetäuscht wird. Interessanterweise ergaben sich bei den Asthmatikern auch hinsichtlich der Anzahl der Lymphozyten erhöhte Werte. Dies ist von Interesse, weil diese Zellen an immunologischen, allergischen Reaktionen wesentlich beteiligt sind.

Die LDH-Spiegel im induzierten Sputum zeigten nach Einatmung von gefilterter Luft und nachfolgender Allergeninhalation nur einen geringfügigen Anstieg im Vergleich zu den im Vortest gemessenen Ausgangswerten. Die Spiegel stiegen aber dosisabhängig mit zunehmender inhalierter Ozonmenge an und waren im Mittel nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon am höchsten. Daher ist es wahrscheinlich, dass die LDH-Werte persistierende, kumulierende Ozoneffekte anzeigen, insbesondere da LDH als Marker der Zellschädigung angesehen wird und erhöhte Werte in der BALF nach wiederholter Ozonexposition bereits berichtet wurden [DEVLIN 1997]. Diese Interpretation würde auch zu den nach wiederholter Ozonexposition in der Literatur beschriebenen erhöhten Proteinkonzentrationen in der BALF passen [CHRISTIAN 1998, JÖRRES 2000b].

Histamin und Tryptase werden als Marker einer Mastzellaktivierung angesehen [CASTELLS 1988, SCHWARTZ 1987] und werden aus präformierten Granula innerhalb von Minuten nach Aktivierung der Mastzellen freigesetzt [PLATTSMILLS 2001]. Hier fand sich ein Anstieg in den Haupttestungen nach Allergeninhalation im Vergleich zu den im Vortest erhobenen Ausgangswerten. Die gemeinsame Herkunft dieser Marker zeigte sich auch daran, dass ihre Konzentrationen im Sputumüberstand insbesondere nach wiederholter Ozonexposition in hohem Maße korrelierten. Allerdings muss bei der Interpretation von Mediatorkonzentrationen im Sputumüberstand immer berücksichtigt werden, dass auch durch unterschiedlich ausgeprägte Verdünnungseffekte bei der Kochsalzinhalation sowie durch Speichel Korrelationen zwischen Markern entstehen können, da beide die Sputumdichte beeinflussen. Gegen einen deutlichen Einfluss von Verdünnungsartefakten sprechen hier allerdings die wesentlich schwächeren Beziehungen beider Marker zur Konzentration von LDH, NGF sowie zur Sputumzellzahl pro mL. Bei aller interpretatorischen Vorsicht spricht die Tatsache, dass die Verläufe der Konzentrationen von Histamin und Tryptase parallel zu denen der Anteile und Absolutzahlen der eosinophilen Granulozyten waren, für eine tatsächliche Verstärkung der allergischen Entzündungsreaktion durch Ozon.

5.7. Nachweis von NO in der ausgeatmeten Luft

Zahlreiche Publikationen zeigen erhöhte eNO-Werte bei Patienten mit Asthma im Vergleich zu Gesunden [ALVING 1993, KHARITONOV 2003, OLIN 2004].

Dagegen finden sich nur wenige Arbeiten, die erhöhte eNO-Werte bei Probanden mit Rhinitis beschreiben [GRATZIOU 1999, GRATZIOU 2001]. In der vorliegenden Studie wurden konsistent sowohl in den Vortestungen als auch den Haupttestungen Unterschiede des eNO zwischen den Gruppen beobachtet (Abb. 24). Stets lagen die Werte bei den asymptomatischen Atopikern am niedrigsten und bei den Asthmatikern am höchsten. Es zeigte sich auch in der vorliegenden Untersuchung, dass die eNO-Messung sehr gut reproduzierbar war und auch über lange Zeiträume innerhalb eines Individuums vergleichbare eNO-Werte gemessen werden konnten (Abb. 25).

Die in dieser Studie beobachteten Änderungen, die nach Ozonexpositionen und zu zwei Zeitpunkten nach Allergeninhalation beobachtet wurden, sind allerdings relativ schwer interpretierbar. Auffällig war der vergleichbare Verlauf der eNO-Werte in den drei Gruppen und innerhalb aller Haupttestungen. Im Vergleich zum Vortest kam es stets zu einem Anstieg der eNO-Werte nach Exposition, außer nach einmaliger Inhalation von 250 ppb Ozon. Die niedrigsten Werte fanden sich jeweils unmittelbar nach Allergeninhalation, hingegen konsistente Anstiege bei der Messung 6 h nach Allergengabe.

Eine Reihe bekannter Einflussfaktoren auf die eNO-Werte sind bei der Interpretation der Befunde zu berücksichtigen [JÖRRES 2002]. Bei Patienten mit nächtlichen Asthmasymptomen ist eine leichtgradige zirkadiane Rhythmik beschrieben [GEORGES 1999]. Ferner wurden niedrige eNO-Werte am Morgen und erhöhte Werte am Abend bei asthmatischen und gesunden Kindern beobachtet [MATTES 2002]. Eine Einschränkung der Lungenfunktion bzw. eine damit einhergehende Verengung der Atemwege oder aber eine vermehrte Mukusproduktion bzw. Ödembildung können den Übertritt von NO aus der bronchialen Schleimhaut in das Atemwegslumen beeinträchtigen und dadurch zu einer Verminderung des eNO führen [JÖRRES 2000a]. Nach Allergenkontakt ist ein Anstieg der eNO-Werte während allergischer Spätreaktion bekannt [DE KLUIJVER 2003, KHARITONOV 1995]. Zusätzlich müssen auch Vorgänge in Betracht gezogen werden, bei denen NO durch chemische Reaktionen z.B. mit reaktiven Sauerstoffverbindungen abgefangen wird und sich damit dem Übertritt ins Lumen der Atemwege und Nachweis in der Ausatemluft entzieht. So reagiert NO mit dem Superoxid-Anion zu Peroxynitrit ($\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^-$) und kann bei eingeschränkter antioxidativer Kapazität oder vermehrter Oxidantien-

produktion in der Lunge abgefangen werden.

Der Anstieg von eNO, der 1 h nach der Exposition gegenüber gefilterter Luft oder Ozon beobachtet wurde, könnte durch die körperliche Anstrengung während der Exposition verursacht worden sein, da diese zu einer Erhöhung der eNO-Werte führen kann [SHEEL 1999]. Eine mögliche Erklärung wäre auch, dass die erhöhte Ventilation während der Fahrradbelastung zu einer Austrocknung und damit Dickenabnahme der die Bronchien auskleidenden Mukusschicht führte und es damit zu einem vermehrten NO-Transfer von der Bronchialwand in das Lumen kam. Die durch Exposition gegenüber 250 ppb Ozon hervorgerufene leichtgradige Einschränkung der Lungenfunktion könnte diesem Anstieg entgegengewirkt haben. Allerdings ist zu beachten, dass die durch Ozon bewirkte Verschlechterung der Lungenfunktion keine wesentliche Obstruktion beinhaltet, sondern primär eine neuronal vermittelte Hemmung der tiefen Einatmung. Sechs Stunden nach Allergengabe wurden im Vergleich zur Ausgangsmessung und zu den 1 h nach Allergeninhalation gemessenen Werten konsistent erhöhte eNO-Konzentrationen beobachtet. Ein solcher Anstieg nach Allergengabe ist auch in der Literatur beschrieben [DE KLUIJVER 2003, KHARITONOV 1995]. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass durch das Allergen auch die Lungenfunktion während der Früh- und Spätreaktion eingeschränkt war, und zwar geringfügig stärker während der Frühreaktion. Das Ausmaß der Unterschiede erscheint aber zu gering, um einen Effekt auf eNO in der vorliegenden Größenordnung zu bewirken. Darüber hinaus fand sich keinerlei Korrelation zwischen den Lungenfunktionswerten und den Werten von eNO. Die Tatsache, dass eNO und eosinophile Atemwegsentszündung, wie sie nach Allergengabe zum Zeitpunkt der Spätreaktion zu beobachten sind, in einem engen Zusammenhang stehen [JATAKANON 1998, PIACENTINI 1999], spricht zusätzlich für einen Allergeneffekt auf das eNO. Warum die eNO-Werte unmittelbar nach Allergeninhalation trotz der beobachteten Einschränkung der Lungenfunktion nicht unterhalb des Niveau der Ausgangswerte fielen, zumindest nach Exposition gegenüber gefilterter Luft, lässt sich nicht weiter eruieren. Da alle eNO-Werte nach den Expositionen und Provokationen immer zu den gleichen Zeitpunkten während des Tages erhoben wurden, wäre der Einfluss einer zirkadianen Rhythmik denkbar. Eine derartige Rhythmik von eNO wurde jedoch in der beobachteten Ausprägung bislang nicht beschrieben. Ferner litt

keiner der an der Studie beteiligten Asthmatiker unter nächtlichen Symptomen, die einen klinisch signifikanten Tagesgang wahrscheinlich machen könnten.

5.8. Nachweis von H₂O₂ im Atemkondensat

Es gibt eine Arbeit, die erhöhte H₂O₂-Werte im Atemkondensat bei erwachsenen Patienten mit Asthma beobachtet hat [ANTCZAK 1997], und zwei Studien fanden erhöhte Werte bei asthmatischen Kindern [DOHLMAN 1993, JÖBSIS 1997]. Bei den H₂O₂-Messungen im Atemkondensat (EBC) in der vorliegenden Studie wurden dagegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet. Zugleich zeigte die Messung eine wesentlich größere Streuung als die eNO-Messung. Dies wurde auch von anderen beschrieben [VAN BEURDEN 2002, VAN HOYDONCK 2004]. Nur zwischen H₂O₂-Messungen im Abstand von 6 h konnte eine gute Korrelation und Reproduzierbarkeit beobachtet werden. Interessanterweise fanden sich trotz der größeren Variabilität ganz ähnliche Verläufe der H₂O₂-Werte im Vergleich zum eNO. Jeweils die niedrigsten Werte wurden 1 h nach Allergeninhalation beobachtet, und in allen Haupttestungen wurde im Mittel in allen Gruppen ein Anstieg zum Zeitpunkt der Spätreaktion gemessen. In den meisten Fällen waren, ähnlich wie beim eNO, die H₂O₂-Konzentrationen unmittelbar nach Exposition gegenüber gefilterter Luft oder Ozon höher als 20 h später nach Allergenprovokation. Für H₂O₂ ist ebenfalls eine Flussabhängigkeit beschrieben [SCHLEISS 2000] und damit die Herkunft aus den Bronchien wahrscheinlich. Daher gelten im Prinzip auch die gleichen Argumente wie für das eNO, d.h. eine Lungenfunktionseinschränkung, die zu einer verminderten Oberfläche der Bronchien führt, könnte auch den Übertritt des H₂O₂ in das Lumen vermindern. Die Ähnlichkeit zwischen den Verläufen der Werte von eNO und H₂O₂ könnte aber auch zufällig sein, denn mittlerweile wurde für das H₂O₂ eine ausgeprägte zirkadiane Rhythmik beschrieben [NOWAK 2001], der Art, dass vormittags die Werte im EBC deutlich höher liegen als am Nachmittag. Ähnliche Befunde wurden im eigenen Labor erhoben [JÖRRES 2002]. Da sowohl die Messungen nach Exposition als auch die Messungen zum Zeitpunkt der allergischen Spätreaktion am Nachmittag erfolgten, die Messung unmittelbar nach Allergeninhalation hingegen am Morgen, könnten die Änderungen der H₂O₂-Konzentrationen auch auf diesem Wege erklärt werden. Das Fehlen einer

echten Positivkontrolle für die Messung, wie sie beim eNO z.B. durch den Unterschied zwischen Gesunden und Asthmatikern gegeben war, erschwert die Interpretation der Daten, zumal die Unterschiede des exhalieren H_2O_2 zwischen verschiedenen Krankheitsgruppen sehr viel größere Überlappung und keineswegs konsistente Befunde zeigen im Vergleich zu eNO.

5.9. Mechanismen

Tierexperimentelle Untersuchungen und einige wenige experimentelle Expositionsstudien am Menschen belegen, dass Ozon grundsätzlich in der Lage ist, die Atemwegsantwort auf ein inhaliertes Allergen zu steigern. Die epidemiologischen Daten gehen mit diesem Ergebnis grundsätzlich konform, auch wenn die Differenzierung zwischen Ozon- und Allergeneffekten viel schwieriger als in experimentellen Studien oder aus methodologischen Gründen nicht zu leisten ist. In der vorliegenden Untersuchung konnte erstmals gezeigt werden, dass eine wiederholte Exposition gegenüber Ozon in umweltrelevanter Konzentration eine Verstärkung der Lungenfunktionsantwort zum Zeitpunkt der allergischen Frühreaktion bewirken konnte. Diese Verstärkung trat auch bei Patienten mit alleiniger allergischer Rhinitis auf und konnte ein als klinisch relevant erachtetes Ausmaß annehmen. Als klinisch noch bedeutsamer erscheint, dass sowohl die Lungenfunktionsantwort als auch die entzündliche Atemwegsantwort während der allergischen Spätreaktion gesteigert werden konnten und die Lungenfunktionsantwort wiederum bei einigen Individuen die Kriterien einer klinisch relevanten Antwort erfüllte. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind weitestgehend ungeklärt. Prinzipiell könnten sie auf verschiedenen Ebenen eingreifen.

Erhöhte Konzentrationen von Plasmaproteine in der BALF [JÖRRES 2000b] und erhöhte Konzentrationen von LDH in der BALF [DEVLIN 1997] nach wiederholten Ozonexpositionen lassen auf eine erhöhte Permeabilität bzw. Schädigung [KRISHNA 1997b] der Epithelschicht schließen. Dies könnte dafür verantwortlich sein, dass Allergene die in der Mukosa befindlichen Mastzellen leichter erreichen und es somit zu einer Verstärkung der Allergenantwort kommt. Auch erscheint es interessant, dass nach Ozonexposition die Anzahl der Mastzellen in der Schleimhaut erhöht sein kann [BLOMBERG 1999].

Eine wesentliche Rolle bei der durch Allergen induzierten entzündlichen Reaktion scheinen Protease-aktivierte-Rezeptoren (PAR) zu spielen. PARs

werden auf vielen Zelltypen, die an der allergischen Reaktion beteiligt sind, exprimiert, unter anderem auch auf Epithelzellen [COCKS 2001]. Die Aktivierung von PAR-2 stimuliert die Epithelzellen zur Produktion und Sekretion einer Vielfalt von Chemokinen und Zytokinen sowie zur Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen, die für die Zerstörung der Tight-junctions zwischen den Epithelzellen verantwortlich gemacht werden [REED 2004]. Diese Prozesse erleichtern den Durchtritt der Leukozyten von der Blutbahn in die Lunge und könnten mitverantwortlich sein bei der Erhöhung der Permeabilität des Epithels nach Ozon. PARs werden durch Serin-Proteasen aktiviert, indem diese den Rezeptor an spezifischen Aminosäuresequenzen schneiden und die freigelegte Region an eine zweite Sequenz des Rezeptors bindet [REED 2004]. Eine der wichtigsten Serin-Proteasen ist die Neutrophilen-Elastase [LEIKAUF 1995], die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. Diese Elastase wurde auch nach Ozonexposition erhöht im Sputum [HILTERMANN 1999] und in der BALF gefunden [DEVLIN 1997]. Sie könnte über die Aktivierung der PARs indirekt zu einer verstärkten Zugänglichkeit der Mukosa für Allergene führen.

Wiederholte Ozonexpositionen allergisch sensibilisierter Mäuse haben gezeigt, dass Ozon zumindest beim Tier in der Lage ist, die Immunitätslage hin zu einem mehr allergischen Phänotyp mit TH2-artigen Reaktionen zu verschieben [NEUHAUS-STEINMETZ 2000]. In bestimmten genetisch sensiblen Mäusestämmen wurde in dieser Studie durch Ozon ein Anstieg der Konzentrationen von IgE, IL-4 und IL-5 in der BALF induziert. Über IL-4 werden B-Lymphozyten zur Produktion der IgE-Antikörper stimuliert, und IL-5 ist ein wichtiger chemotaktischer Stimulus und Überlebensfaktor für eosinophile Granulozyten [BUSSE 2001]. Beispiele für eine vergleichbare Immunmodulation am Menschen liegen nur nach experimenteller Exposition gegenüber Dieselpartikeln vor. Nach nasaler Provokation mit diesen Partikeln wurden in der nasalen Lavage erhöhte Konzentrationen von IL-4 sowie eine vermehrte Expression von IL-5 beobachtet [DIAZ-SANCHEZ 1996]. Auch wurde eine vermehrte lokale IgE-Produktion nach nasaler Provokation beim Menschen gemessen [DIAZ-SANCHEZ 1994]. Eigene Daten zeigten Effekte wiederholter Ozonexpositionen auf die Lymphozytensubpopulationen [HOLZ 2001], die mit einem derartigen Verstärkungsmechanismus kompatibel waren, wenngleich ihn nicht eindeutig bestimmten. Veränderungen der Spiegel des Gesamt-IgE, des spezifischen IgE oder des

Blutbildes nach Exposition wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht erfasst, u.a. um Blutabnahmen zu vermeiden. IL-5 ist im Sputum nicht messbar, da es nachgewiesenermaßen bei der Aufarbeitung des Sputums zerstört wird [KELLY 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden deutlich erhöhte Anteile und Zahlen von eosinophilen Granulozyten im Sputum nach Allergengabe sowie eine Steigerung nach Exposition gegenüber 4x125 ppb Ozon gemessen. Beide Effekte wären durch eine vermehrte Freisetzung von IL-5 erklärbar. Erhöhte lokale Konzentrationen von IL-5 in der Lunge werden über das Blut bis an das Knochenmark weitergeleitet [BUSSE 2001]. Dort wird durch IL-5 die Ausdifferenzierung von eosinophilen Granulozyten induziert. Diese werden in die Gefäße abgegeben und konzentrieren sich mittels chemotaktischer Faktoren in entzündlich veränderten Regionen, z.B. im vaskulären Gefäßbett der Lunge [BUSSE 2001]. Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und ICAM-1 an den Wänden der Gefäße binden an die Eosinophilen und ermöglichen den Durchtritt durch das interstitielle Gewebe in die Lunge. Die Beteiligung von ICAM-1 bei der Allergeninduzierten Entzündung zeigt sich z.B. durch die Aufregulation während der Allergensaison bei Patienten mit Rhinitis [MONTEFORT 1992]. Damit wäre eine weitere Möglichkeit für einen Verstärkungsmechanismus durch Ozon gegeben, denn es ist bekannt, dass Ozon die Expression von Adhäsionsmolekülen beim Menschen beeinflusst. So wurden 2 h nach Exposition gegenüber 120 ppb Ozon vermehrt Blutgefäße in Biopsien gefunden, an die sich Antikörper gegen P-Selektin anlagerten [BLOMBERG 1999, KRISHNA 1997a]. Auch ICAM-1 war in Biopsien von gesunden Probanden nach Inhalation von 200 ppb Ozon aufreguliert [BLOMBERG 1999].

Im Vergleich zum Vortest waren in allen Haupttestungen nach Allergenprovokation die Werte für Histamin und Tryptase im Sputumüberstand erhöht. Bei den Asthmatikern fanden sich auch signifikante Unterschiede zwischen gefilterter Luft und 4x125 ppb Ozon. Histamin ist ein biogenes Amin, das wie Tryptase (eine tetramerische neutrale Protease [CASTELLS 1988]), nach Vernetzung von Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzt wird. Die Vernetzung erfolgt durch Bindung von Allergen an allergenspezifische IgE-Moleküle, mit denen die Fc-Rezeptoren, insbesondere hochaffine Fc-Rezeptoren, besetzt sind [ABBAS 1994]. Bei

der Vernetzung werden Signale in die Zelle übertragen, die über eine Aktivierung der Phospholipase C zu einer erhöhten Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum führen, das wiederum über Bindung an Calmodulin und Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase zu einer Exozytose von Granula führt, die Histamin und/oder Tryptase enthalten [ABBAS 1994]. Die erhöhten Werte sowohl von Histamin als auch von Tryptase im Sputumüberstand nach Allergeninhalation sprechen für eine Beteiligung von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Während die Tryptasefreisetzung von Basophilen weniger als 1 % der Freisetzung aus Mastzellen entspricht, liegt dieser Wert für Histamin bei ca. 50 % [CASTELLS 1987]. Beide Zellen kommen im induzierten Sputum nur in sehr geringen Anteilen (< 0,5 %) vor [GAUVREAU 1999a]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die im Sputum gemessenen Werte von gewebeständigen Zellen freigesetzt wurden. Direkte Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Freisetzungskaskade durch Ozon gibt es zur Zeit nicht. Die gesteigerten IgE-Spiegel nach Ozonexposition, die bei Rhesusaffen [SCHELEGLE 2003] und Mäusen [NEUHAUS-STEINMETZ 2000] beobachtet wurden, sprechen eher für eine zusätzliche Freisetzung aufgrund einer vermehrten Beladung der Fc-Rezeptoren mit IgE. Dies käme einem Priming-Effekt durch Ozon gleich. Allerdings ist fraglich, ob innerhalb der in der vorliegenden Studie verwandten Expositionszeiträume von maximal einer Woche eine signifikante Steigerung der IgE-Produktion stattfinden konnte.

Histamin wirkt u.a. direkt auf die glatte Muskulatur [RABE 2001]; somit könnte die erhöhte Freisetzung von Histamin auch direkt mit der gesteigerten Lungenfunktionsantwort auf Allergen in Zusammenhang stehen. Interessanterweise wurden bei den Rhinitikern, die eine deutlichere Lungenfunktionsreaktion auf Allergen zeigten als die Asthmatiker, auch höhere Histaminkonzentrationen im Sputum gemessen. Tryptase kann unter anderem auch PARs aktivieren [REED 2004] und damit durch einen positiven Feedbackmechanismus für eine weiter gesteigerte Durchlässigkeit des Epithels verantwortlich sein.

Ferner wurden auch IgE-unabhängige Mechanismen der Histaminfreisetzung beschrieben. So kann IL-8 zur Freisetzung von Histamin aus Gewebemastzellen führen [YAKABI 2002]. IL-8 ist ein Zytokin, das bereits 1 h nach Ende einer Ozonexposition vermehrt im induzierten Sputum gemessen werden kann und noch 24 h nach Exposition nachweisbar ist [HOLZ 1999]. *In vitro*-Beob-

achtungen an kultivierten nasalen Schleimhautzellen zeigten, dass Ozon bei Zellen atopischer Patienten im Vergleich zu nichtatopischen Patienten zu einem höheren Anstieg der Konzentration von IL-8 im Überstand führte und dass parallel dazu die Histamin-Freisetzung erhöht war [SCHIERHORN 1999]. Weiterhin zeigten sich auch bei Rhesusaffen die höchsten Histamin-Werte im Serum nach wiederholten Ozon- und Allergenprovokationen [SCHELEGLE 2003].

5.10. Ausblick

Basierend auf den Daten dieser Untersuchung wäre es wünschenswert, die experimentelle Allergenprovokation stärker der realen Umweltsituation anzupassen. Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass wiederholte niedrig-dosierte Allergenprovokationen ebenfalls zu einer Eosinophilie in den Atemwegen führen [STERK 1998, SULAKVELIDZE 1998]. Derartige niedrig-dosierte Allergenkontakte könnten durch Veränderungen der Immunitätslage für ein „Priming“ sorgen [GABRIELSSON 1997, KOH 1994], d.h. für eine verdeckte Steigerung der Reaktionsbereitschaft der Atemwege, die sich erst bei Kontakt zu einer höheren Allergendosis oder nach Verstärkung durch Umweltschadstoffe wie Ozon bemerkbar macht. In dieser Hinsicht wären auch Informationen über Veränderungen der IgE-Spiegel und zirkulierenden Blutzellen einschließlich Lymphozyten nach wiederholten Ozonexpositionen wichtig. Offen bleibt auch die Frage nach der Persistenz der durch Ozon gesteigerten Reaktionsbereitschaft gegenüber Allergenen. Sollte es z.B. zu einer länger andauernden Steigerung der IgE-Produktion kommen, könnte dies zur Verstärkung eines allergischen Asthma beitragen oder einen sogenannten „Etagenwechsel“ begünstigen, d.h. den Übergang von einer Rhinitis mit Symptomen allein in den oberen Atemwegen hin zu einem Asthma bronchiale mit chronischer Entzündung der unteren Atemwege.

5.11. Schlussfolgerungen

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine wiederholte Ozonexposition in umweltrelevanter Konzentration die funktionelle und entzündliche Antwort auf ein inhaliertes Allergen bei Personen mit vorbestehenden allergischen Atemwegserkrankungen zu steigern vermag. Die beobachteten Effekte auf die Lun-

genfunktion betrafen sowohl die allergische Früh- als auch die Spätreaktion und erreichten teilweise klinisch relevante Ausmaße. Am stärksten betroffen waren Personen mit allergischer Rhinitis. Innerhalb der Gruppe der Asthmatiker war die Lungenfunktionsantwort nicht signifikant beeinflusst, es fand sich aber eine deutlichere Verstärkung der entzündlichen Antwort auf Allergen. Diese war geprägt durch eine erhöhte Zahl eosinophiler Granulozyten, eine vermehrte Ausschüttung Mastzell-spezifischer Mediatoren und eine gesteigerte Zahl von Lymphozyten im induzierten Sputum.

Methodisch konnte die Eignung des induzierten Sputums als sensibles, experimentell handhabbares, nicht-invasives Untersuchungsverfahren auch für den Zweck der Analyse kombinierter Luftschadstoffeffekte gezeigt werden. Die Ergebnisse des exhalieren NO waren schwer zu interpretieren, und die Analyse von H₂O₂ im Atemkondensat erschien in ihrer gegenwärtigen Form für die indirekte Erfassung einer neutrophilen und eosinophilen Entzündung wenig geeignet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung tragen dazu bei, die epidemiologische Beobachtung vermehrter Krankenhauseinweisungen sowie vermehrter Symptome und vermehrten Medikamentengebrauchs bei Patienten mit Asthma nach Perioden hoher Ozonbelastung besser zu verstehen. Insbesondere die hier erstmalig aufgewiesene Wirkung einer wiederholten Ozonbelastung belegt, dass Ozon für Menschen mit bestehender Sensibilisierung das Risiko erhöhen kann, unerwartet deutlich auf Allergen zu reagieren. Dieses Risiko besteht ungeachtet der Tatsache, dass nur eine Minderheit der Patienten als klinisch relevant erachtete Reaktionen zeigte. Es wird unterstrichen durch den Befund, dass auch die große Gruppe der Patienten mit allergischer Rhinitis ohne zusätzliches Asthma bronchiale zu den Personen gehörte, die deutliche und unerwartete Atemwegsreaktionen zeigen konnte. Die praktische Bedeutung der Ergebnisse wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die in dieser Studie gewählte Ozonbelastung durchaus in der Umwelt erfahren werden kann, z.B. bei einer mehrtägigen Fahrradtour während der Hochsommermonate im Süddeutschen Raum.

6. Zusammenfassung

Ausgehend von epidemiologischen Daten, die häufigere Krankenhausesweisungen aufgrund von Atemwegsbeschwerden sowie Symptome und Medikamentengebrauch bei Patienten mit Asthma nach Perioden erhöhter Ozonbelastung in der Umwelt zeigen, sollte diese Untersuchung die Frage klären, ob Ozon in umweltrelevanter Konzentration die bronchiale Allergenempfindlichkeit am Tage nach der Exposition zu steigern vermag. Es sollte darüber hinaus geklärt werden, ob dieser Effekt auch die als klinisch relevante allergische Spätreaktion betrifft und ob eine wiederholte Exposition gegenüber Ozon diese Effekte verstärkt oder eine Toleranz induziert. Wesentlich war, dass neben der Lungenfunktionsreaktion die Atemwegsentszündung zum Zeitpunkt der Spätreaktion mittels verschiedener, moderner, nichtinvasiver Verfahren erfasst werden sollte.

Zu diesem Zweck wurden 11 Probanden mit allergischem Asthma bronchiale, 22 Probanden mit allergischer Rhinitis und 5 Probanden mit asymptomatischer Atopie jeweils einmalig gegenüber gefilterter Luft (FA), 125 ppb oder 250 ppb Ozon sowie an vier aufeinanderfolgenden Tagen gegenüber 125 ppb Ozon exponiert. Hierbei atmeten die Probanden die Testatmosphäre jeweils für 3 h während intermittierender Fahrradbelastung. Am Morgen nach den einmaligen oder der letzten der mehrmaligen Expositionen erfolgte eine einmalige Allergenprovokation. Neben der Lungenfunktion wurde die unspezifische Atemwegsempfindlichkeit auf inhaliertes Methacholin, die spezifische Atemwegsantwort auf inhaliertes Allergen sowie 6 h nach Allergeninhalation die zelluläre und biochemische Zusammensetzung des induzierten Sputums gemessen. Darüber hinaus wurde nach Ozonexposition sowie zu zwei Zeitpunkten nach Allergengabe die Konzentrationen von Stickstoffmonoxid in der Ausatemluft (eNO) und von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) im Atemkondensat bestimmt.

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 einmaliger, hoher (250 ppb) sowie wiederholter, niedriger (4x125 ppb) Ozonexposition zu beobachten. Diese Effekte erreichten bei einzelnen Probanden ein klinisch relevantes Ausmaß. Ferner waren nach diesen Expositionen im

Sputum die Zahlen der eosinophilen Granulozyten und die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) sowie diejenigen von Histamin und Tryptase als Marker einer allergischen Reaktion am höchsten. Erhöhte Werte für eNO wurden nach den Expositionen gegenüber FA und 125 ppb Ozon beobachtet, sowie zum Zeitpunkt der Spätreaktion. Das exhalierte H_2O_2 lieferte keine konklusiven Ergebnisse. Am deutlichsten waren die Einschränkungen der Lungenfunktion in der Regel bei den Patienten mit allergischer Rhinitis. Hingegen war bei den Patienten mit Asthma eine deutlichere Verstärkung der allergischen Atemwegsentszündung durch Ozon zu beobachten. Darüber hinaus fand sich auch ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des Gesamt- und spezifischen IgE im Blut und dem Ausmaß der Verstärkung der Allergenantwort durch Ozon.

Die Daten der vorliegenden experimentellen Untersuchung zeigen, dass die wiederholte Inhalation von Ozon in einer Konzentration von 125 ppb sowohl die Lungenfunktionsantwort als auch die Entzündungsreaktion auf ein inhaliertes Allergen bei Personen mit vorbestehenden allergischen Atemwegserkrankungen verstärken kann. Die in der Untersuchung verwendete Ozonkonzentration kann als umweltrelevant gelten, da sie die regelhaft gefundenen Spitzenwerte in Gegenden hoher Ozonbelastung repräsentiert. Diese Daten tragen dazu bei, die epidemiologische beobachteten Assoziationen zwischen Ozon und Asthma kausal zu verstehen.

7. Summary

Epidemiological studies have demonstrated associations between elevated levels of ambient ozone and an increased frequency of emergency room visits due to worsening of asthma symptoms. Therefore, it was the aim of this study to reveal whether ambient air levels of ozone exert an effect on bronchial allergen responsiveness the day after exposure, whether this would also affect the clinically relevant late phase reaction, and whether a repeated ozone exposure would worsen the effect or induce an adaptation. Besides assessing the effects on lung function, modern non-invasive methods were used to evaluate the inflammatory responses during early and late phase reaction to allergen.

Eleven 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 were included into the study. Subjects underwent either a single exposure to filtered air (FA), 125 ppb or 250 ppb ozone, as well as four repeated exposures to 125 ppb ozone. During each exposure, FA or ozone was inhaled for 3 h while performing intermittent exercise. Three hours after the exposure the unspecific responsiveness to methacholine was tested. The morning after (the last) exposure an allergen challenge was performed and the effect on lung function was evaluated for at least 10 h after the challenge. The extend of airway inflammation was assessed by analysing the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) in exhaled breath condensate (EBC) and nitric oxide (NO) in exhaled air at three different time points. In addition, a sputum induction was performed 6 h after the allergen challenge, during the peak of the late phase reaction, to analyse the cellular and biochemical composition of mucus directly derived from the airways.

Both the functional and the inflammatory response to allergen and ozone 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 also during late phase response. These effects reached a clinical significant extent in some individuals. Corresponding changes in induced sputum were characterised by increases in the proportions of eosinophils and sputum fluid-phase parameters such as LDH. In addition, the largest concentrations of histamine and tryptase, both markers of allergic airway inflammation, were detected after these

exposures. Increased levels of NO in exhaled air could be detected during the late phase response. The analysis of H₂O₂ did not lead to conclusive results. The effects on lung function were most pronounced in subjects with rhinitis, while in subjects with asthma a stronger increase in allergic airway inflammation by ozone was observed. 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 exposure to ozone, which correspond to that experienced during regular exercise at peak ozone levels occurring in Southern Germany, is capable of enhancing the lung function and inflammatory response to allergen in subjects with pre-existing allergic airway diseases. The results of this study will contribute to the understanding of epidemiological findings showing a relationship between asthma and ozone.

8. Literatur

Aerocrine AB (Ed.) . 2005. Exhaled nitric oxide - a noninvasive marker for inflammation. Solna, Sweden.

Aalbers R, de Monchy JG, Kauffman HF, Smith M, Hoekstra Y, Vrugt B, Timens W. 1993. Dynamics of eosinophil infiltration in the bronchial mucosa before and after the late asthmatic reaction. *Eur Respir J*, 6(6): 840-847.

Abbas, A. K., Pober, J. S., & Lichtman, A. 1994. Effector Mechanisms of immunoglobulin E - initiated immune responses. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Alexis NE, Hu SC, Zeman K, Alter T, Bennett WD. 2001. Induced sputum derives from the central airways: confirmation using a radiolabeled aerosol bolus delivery technique. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(10 Pt 1): 1964-1970.

Alvarez MJ, Olaguibel JM, Garcia BE, Tabar AI, Urbiola I. 2000. Comparison of allergen-induced changes in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation between mildly allergic asthma patients and allergic rhinitis patients. *Allergy*, 55: 531-539.

Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. 1993. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*, 6(9): 1368-1370.

Anderson HR, Ponce dL, Bland JM, Bower JS, Emberlin J, Strachan DP. 1998. Air pollution, pollens, and daily admissions for asthma in London 1987-92. *Thorax*, 1998 Oct; 53(10): 842-848.

Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. 1997. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J*, 10(6): 1235-1241.

Aris RM, Christian D, Hearne PQ, Kerr K, Finkbeiner WE, Balmes JR. 1993. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am Rev Respir Dis*, 148(5): 1363-1372.

Arshad, S. H., Babu, K. S., & Holgate, S. T. 2001. Anti-IgE Therapy in Asthma and Allergy. London: Martin Dunitz.

ATS. 2005. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 912-930.

Ball BA, Folinsbee LJ, Peden DB, Kehrl HR. 1996. Allergen bronchoprovocation of patients with mild allergic asthma after ozone exposure. *J Allergy Clin Immunol*, 98(3): 563-572.

Balmes JR, Aris RM, Chen LL, Scannell C, Tager IB, Finkbeiner W, Christian D, Kelly T, Hearne PQ, Ferrando R, Welch B. 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.

Balmes JR, Chen LL, Scannell C, Tager I, Christian D, Hearne PQ, Kelly T, Aris RM. 1996. Ozone-induced decrements in FEV1 and FVC do not correlate with measures of inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 153(3): 904-909.

Barck C, Sandstrom T, Lundahl J, Hallden G, Svartengren M, Strand V, Rak S, Bylin G. 2002. Ambient level of NO₂ augments the inflammatory response to inhaled allergen in asthmatics. *Respir Med*, 96(11): 907-917.

Bascom R, Bromberg PA, Costa DA, Devlin R, Dockery DW, Frampton MW, Lambert W, Samet J, Speizer FE, Utell MJ. 1996. State of the art: health effects of outdoor air pollution. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 3-50.

Basha MA, Gross KB, Gwizdala CJ, Haidar AH, Popovich J, Jr. 1994. Bronchoalveolar lavage neutrophilia in asthmatic and healthy volunteers after controlled exposure to ozone and filtered purified air. *Chest*, 106(6): 1757-1765.

Beier J, Beeh KM, Kornmann O, Buhl R. 2003. Sputum induction leads to a decrease of exhaled nitric oxide unrelated to airflow. *Eur Respir J*, 22(2): 354-357.

Berger I, Schierl R, Ochmann U, Egger U, Scharrer E, Nowak D. 2005. Concentrations of dust, allergens and endotoxin in stables, living rooms and mattresses from cattle farmers in southern Bavaria. *Ann Agric Environ Med*, 12(1): 101-107.

Bickerman HA, Sproul EE, Barach AL. 1958. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technique for the detection of lung cancer. *Dis Chest*, 33: 347-362.

Blomberg A, Mudway IS, Nordenhall C, Hedenstrom H, Kelly FJ, Frew AJ, Holgate ST, Sandstrom T. 1999. Ozone-induced lung function decrements do not correlate with early airway inflammatory or antioxidant responses. *Eur Respir J*, 13(6): 1418-1428.

Boehlecke B, Hazucha M, Alexis NE, Jacobs R, Reist P, Bromberg PA, Peden DB. 2003. Low-dose airborne endotoxin exposure enhances bronchial responsiveness to inhaled allergen in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*, 112(6): 1241-1243.

Bonnet R, Jörres R, Heitmann U, Magnussen H. 1991. Circadian rhythm in airway responsiveness and airway tone in patients with mild asthma. *J Appl Physiol*, 71(4): 1598-1605.

Boulet LP. 2003. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a curiosity or an opportunity to prevent asthma? *Am J Respir Crit Care Med*, 167(3): 371-378.

Braun-Fahrländer C, Künzli N, Domenighetti G, Carell CF, Ackermann-Liebrich U. 1994. Acute effects of ambient ozone on respiratory function of Swiss schoolchildren after a 10-minute heavy exercise. *Pediatr Pulmonol*, 17(3): 169-177.

- Brunekreef B & Holgate S. 2002. Air pollution and health. *Lancet*, 360: 1233-1242.
- Burnett RT, Brook JR, Yung WT, Dales RE, Krewski D. 1997. Association between ozone and hospitalization for respiratory diseases in 16 Canadian cities. *Environ Res*, 72(1): 24-31.
- Burnett RT, Dales RE, Raizenne ME, Krewski D, Summers PW, Roberts GR, Raad-Young M, Dann T, Brook J. 1994. Effects of low ambient levels of ozone and sulfates on the frequency of respiratory admissions to Ontario hospitals. *Environ Res*, 65(2): 172-194.
- Busse WW, Calhoun WF, Sedgwick JD. 1993. Mechanism of airway inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*, 147(6 Pt 2): S20-S24.
- Busse WW & Lemanske RF. 2001. Asthma. *N Engl J Med*, 344(5): 350-362.
- Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. 1987. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol*, 63(1): 152-157.
- Castells M & Schwartz LB. 1988. Tryptase levels in nasal-lavage fluid as an indicator of the immediate allergic response. *J Allergy Clin Immunol*, 82(3 Pt 1): 348-355.
- Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. 1987. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol*, 138(7): 2184-2189.
- Castillejos M, Gold DR, Dockery D, Tosteson T, Baum T, Speizer FE. 1992. Effects of ambient ozone on respiratory function and symptoms in Mexico City schoolchildren. *Am Rev Respir Dis*, 145(2 Pt 1): 276-282.
- Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, Sheffer AL, Spector SL, Townley RG. 1975. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol*, 56(4): 323-327.
- Chen LL, Tager IB, Peden DB, Christian DL, Ferrando RE, Welch BS, Balmes JR. 2004. Effect of ozone exposure on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Chest*, 125(6): 2328-2335.
- Christian DL, Chen LL, Scannell CH, Ferrando RE, Welch BS, Balmes JR. 1998. Ozone-induced inflammation is attenuated with multiday exposure. *Am J Respir Crit Care Med*, 158(2): 532-537.
- Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Bartoli ML, Carnevali S, Dente FL, Di Franco A, Giannini D, Scuotri L, Vagaggini B, Paggiaro PL. 1999. Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypertonic saline-induced sputum in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 29(5): 712-718.
- Cocks TM & Moffatt JD. 2001. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. *Pulm Pharmacol Ther*, 14(3): 183-191.

- Cody RP, Weisel CP, Birnbaum G, Liroy PJ. 1992. The effect of ozone associated with summertime photochemical smog on the frequency of asthma visits to hospital emergency departments. *Environ Res*, 1992 Aug; 58(2): 184-194.
- Coleridge JC, Coleridge HM, Schelegle ES, Green JF. 1993. Acute inhalation of ozone stimulates bronchial C-fibers and rapidly adapting receptors in dogs. *J Appl Physiol*, 74(5): 2345-2352.
- Costabel U, Teschler H, Guzman J. 1992. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP): the cytological and immunocytological profile of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J*, 5(7): 791-797.
- de Kluijver J, Evertse CE, Sont JK, Schrupf JA, van Zeijl-van der Ham CJ, Dick CR, Rabe KF, Hiemstra PS, Sterk PJ. 2003. Are rhinovirus-induced airway responses in asthma aggravated by chronic allergen exposure? *Am J Respir Crit Care Med*, 168(10): 1174-1180.
- Devlin R, Folinsbee LJ, Biscardi F, Hatch G, Becker S, Madden MC, Robbins M, Koren HS. 1997. Inflammation and cell damage induced by repeated exposures of humans to ozone. *Inhal Toxicol*, 9: 211-235.
- Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, Koren HS. 1991. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 4(1): 72-81.
- Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. 1994. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest*, 1994 Oct; 94(4): 1417-1425.
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A. 1996. Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol*, 1996 Jul; 98(1): 114-123.
- Dickerson, R. E. & Geis, I. Dickerson, R. E. & Geis, I. (Eds.) . 1986. Chemie - eine lebendige und anschauliche Einführung. Dearfield Beach, Florida: VCH.
- Dimeo MJ, Glenn MG, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA, Boushey HA. 1981. Threshold concentration of ozone causing an increase in bronchial reactivity in humans and adaptation with repeated exposures. *Am Rev Respir Dis*, 124(3): 245-248.
- Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. 2002. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J*, 20: 1S-55S.
- Dohlman AW, Black HR, Royall JA. 1993. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*, 148(4 Pt 1): 955-960.
- Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, Gare M, Lin W, Sun F. 2002. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med*, 165(5): 663-669.

Evans MJ, Fanucchi MV, Baker GL, Van Winkle LS, Pantle LM, Nishio SJ, Schelegle ES, Gershwin LJ, Miller LA, Hyde DM, Plopper CG. 2004. The remodelled tracheal basement membrane zone of infant rhesus monkeys after 6 months of recovery. *Clin Exp Allergy*, 34(7): 1131-1136.

Evans MJ, Fanucchi MV, Baker GL, Van Winkle LS, Pantle LM, Nishio SJ, Schelegle ES, Gershwin LJ, Miller LA, Hyde DM, Sannes PL, Plopper CG. 2003. Atypical development of the tracheal basement membrane zone of infant rhesus monkeys exposed to ozone and allergen. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 285(4): L931-L939.

Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. 1993. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*, 147(5): 1126-1131.

Fairchild CI & Stampfer JF. 1987. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J*, 48(11): 948-949.

Folinsbee LJ, Horstman DH, Kehrl HR, Harder S, Abdul-Salaam S, Ives PJ. 1994. Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone. *Am J Respir Crit Care Med*, 149(1): 98-105.

Frischer TM, Kuehr J, Pullwitt A, Meinert R, Forster J, Studnicka M, Koren H. 1993. Ambient ozone causes upper airways inflammation in children. *Am Rev Respir Dis*, 148(4 Pt 1): 961-964.

Gabrielsson S, Paulie S, Roquet A, Ihre E, Lagging E, Hage-Hamsten M, Harfast B, Troye-Blomberg M. 1997. Increased allergen-specific Th2 responses in vitro in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge. *Allergy*, 1997 Aug; 52(8): 860-865.

Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. 1999a. Kinetics of allergen-induced airway eosinophilic cytokine production and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(2): 640-647.

Gauvreau GM, Watson RM, Rerecich TJ, Baswick E, Inman MD, O'Byrne PM. 1999b. Repeatability of allergen-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 104(1): 66-71.

Georges G, Bartelson BB, Martin RJ, Silkoff PE. 1999. Circadian variation in exhaled nitric oxide in nocturnal asthma. *J Asthma*, 36(5): 467-473.

Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. 1999. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: Evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 322-328.

GINA. 2002. Revised GINA guidelines 2002: Global initiative for asthma, National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute. *NIH Publication No 02-3659*.

Golden JA, Nadel JA, Boushey HA. 1978. Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. *Am Rev Respir Dis*, 118(2): 287-294.

- Gollash F. 1889. Zur Kenntnis des asthmatischen Sputums. *Fortschr Med*, 7: 361.
- Gratziou C, Lignos M, Dassiou M, Roussos C. 1999. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J*, 14(4): 897-901.
- Gratziou C, Rovina N, Lignos M, Vogiatzis I, Roussos C. 2001. Exhaled nitric oxide in seasonal allergic rhinitis: influence of pollen season and therapy. *Clin Exp Allergy*, 31(3): 409-416.
- Grünberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EP, Dolhain RJ, Dick EC, Hiemstra PS, Sterk PJ. 1997. Experimental rhinovirus 16 infection. Effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(2 Pt 1): 609-616.
- Hanania NA, Tarlo SM, Silverman F, Urch B, Senathirajah N, Zamel N, Corey P. 1998. Effect of exposure to low levels of ozone on the response to inhaled allergen in allergic asthmatic patients. *Chest*, 114(3): 752-756.
- Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini M. 1998. Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol*, 101(4 Pt 1): 569-570.
- Hazbun ME, Hamilton R, Holian A, Eschenbacher WL. 1993. Ozone-induced increases in substance P and 8-epi-prostaglandin F2 alpha in the airways of human subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9(5): 568-572.
- Hazucha MJ. 1987. Relationship between ozone exposure and pulmonary function changes. *J Appl Physiol*, 62(4): 1671-1680.
- Hazucha MJ, Bates DV, Bromberg PA. 1989. Mechanism of action of ozone on the human lung. *J Appl Physiol*, 67(4): 1535-1541.
- Hiltermann JT, Lapperre TS, van Bree L, Steerenberg PA, Brahim JJ, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, Stolk J. 1999. Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new noninvasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. *Free Radic Biol Med*, 1999 Dec; 27(11-12): 1448-1454.
- Hiltermann TJ, de Bruijne CR, Stolk J, Zwinderman AH, Spijksma FT, Roemer W, Steerenberg PA, Fischer PH, van Bree L, Hiemstra PS. 1997. Effects of photochemical air pollution and allergen exposure on upper respiratory tract inflammation in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(6): 1765-1772.
- Holgate ST. 1999. The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402(6760 Suppl): B2-B4.
- Holz O, Böttcher M, Timm P, Koschyk S, Abel G, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. 2001. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid after repeated ozone exposure. *Int Arch Occup Environ Health*, 74(4): 242-248.

- Holz O, Jörres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. 1998a. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 28(3): 284-292.
- Holz O, Jörres RA, Timm P, Mücke M, Richter K, Koschyk S, Magnussen H. 1999. Ozone-induced airway inflammatory changes differ between individuals and are reproducible. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 776-784.
- Holz O, Nolte O, Krug N, Richter K, Magnussen H, Jörres RA, Koch W. 2003. Partikelgrößenverteilung von Ultraschallverneblern - Einfluß verschiedener Betriebsbedingungen. *Pneumologie*, 57: S61.
- Holz O, Richter K, Jörres RA, Speckin P, Mücke M, Magnussen H. 1998b. Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days. *Thorax*, 53(2): 83-86.
- Horstman DH, Ball BA, Brown J, Gerrity T, Folinsbee LJ. 1995. Comparison of pulmonary responses of asthmatic and nonasthmatic subjects performing light exercise while exposed to a low level of ozone. *Toxicol Ind Health*, 11(4): 369-385.
- Horstman DH, Folinsbee LJ, Ives PJ, Abdul-Salaam S, McDonnell WF. 1990. Ozone concentration and pulmonary response relationships for 6.6-hour exposures with five hours of moderate exercise to 0.08, 0.10, and 0.12 ppm. *Am Rev Respir Dis*, 142(5): 1158-1163.
- Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. 2005. Exhaled breath condensate: report of the ERS/ATS Taskforce: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*, 26: 523-548.
- Horvath SM, Gliner JA, Folinsbee LJ. 1981. Adaptation to ozone: duration of effect. *Am Rev Respir Dis*, 123(5): 496-499.
- Howarth, P. H. 2006. Seasonal and perennial allergic rhinitis. In Kay, A. B. (Ed.), Asthma and allergic rhinitis - evolving concepts in management: Oxford: Blackwell Science.
- Hu SC, Ben Jebria A, Ultman JS. 1992. Longitudinal distribution of ozone absorption in the lung: quiet respiration in healthy subjects. *J Appl Physiol*, 73(4): 1655-1661.
- Hunt J. 2002. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol*, 110(1): 28-34.
- Hyslop PA & Sklar LA. 1984. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem*, 141(1): 280-286.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *PNAS*, 84(24): 9265-9269.

in't Veen JC, de Gouw HW, Smits HH, Sont JK, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. 1996. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J*, 9(12): 2441-2447.

ISAAC. 1998. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. *Lancet*, 351(9111): 1225-1232.

Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. 1998. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax*, 53(2): 91-95.

Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. 2000. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*, 16(1): 150-158.

Jenkins HS, Devalia JL, Mister RL, Bevan AM, Rusznak C, Davies RJ. 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(1): 33-39.

Jöbsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. 1997. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J*, 10(3): 519-521.

Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. 2000. Role of tachykinins in asthma. *Allergy*, 55(4): 321-337.

Jörres RA. 2000a. Modelling the production of nitric oxide within human airways. *Eur Respir J*, 16: 555-560.

Jörres, R. A. 2002. Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid in der Ausatemluft als marker entzündlicher Aktivität. Dissertation. Universität Hamburg, Fachbereich Chemie.

Jörres RA, Holz O, Zachgo W, Timm P, Koschyk S, Müller B, Grimminger F, Seeger W, Kelly FJ, Dunster C, Frischer T, Lubec G, Waschewski M, Niendorf A, Magnussen H. 2000b. The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(6): 1855-1861.

Jörres RA, Nowak D, Kirsten D, Grönke L, Magnussen H. 1997. A short protocol for methacholine provocation testing adapted to the Rosenthal-Chai dosimeter technique. *Chest*, 111(4): 866-869.

Jörres RA, Nowak D, Magnussen H. 1996. The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 153(1): 56-64.

Keatings VM & Barnes PJ. 1997. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(2): 449-453.

- Kehrl HR, Peden DB, Ball B, Folinsbee LJ, Horstman D. 1999. Increased specific airway reactivity of persons with mild allergic asthma after 7.6 hours of exposure to 0.16 ppm ozone. *J Allergy Clin Immunol*, 104(6): 1198-1204.
- Kelly BEA, Busse WW, Jarjour NN. 2003. A comparison of the airway response to segmental antigen bronchoprovocation in atopic asthma and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 111(1): 79-86.
- Kelly MM, Keatings V, Leigh R, Peterson C, Shute J, Venge P, Djukanovic R. 2002. Analysis of fluid-phase mediators. *Eur Respir J Suppl*, 37: 24s-39s.
- Kharitonov SA & Barnes PJ. 2000. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*, 16(4): 781-792.
- Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. 2003. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J*, 21(3): 433-438.
- Kharitonov SA, O'Connor BJ, Evans DJ, Barnes PJ. 1995. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 151(6): 1894-1899.
- Kinney PL, Ware JH, Spengler JD. 1988. A critical evaluation of acute ozone epidemiology results. *Arch Environ Health*, 43(2): 168-173.
- Kleeberger SR, Levitt RC, Zhang LY, Longphre M, Harkema J, Jedlicka A, Eleff SM, DiSilvestre D, Holroyd KJ. 1997. Linkage analysis of susceptibility to ozone-induced lung inflammation in inbred mice. *Nat Genet*, 17(4): 475-478.
- Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. 1993. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9(4): 371-377.
- Koh YY, Lim HS, Min KU, Min YG. 1994. Airways of allergic rhinitics are 'primed' to repeated allergen inhalation challenge. *Clin Exp Allergy*, 1994 Apr; 24(4): 337-346.
- Koren HS, Devlin RB, Graham DE, Mann R, McGee MP, Horstman DH, Kozumbo WJ, Becker S, House DE, McDonnell WF, . 1989. Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am Rev Respir Dis*, 139(2): 407-415.
- Kreit JW, Gross KB, Moore TB, Lorenzen TJ, D'Arcy J, Eschenbacher WL. 1989a. Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. *J Appl Physiol*, 66(1): 217-222.
- Krishna MT, Blomberg A, Biscione GL, Kelly F, Sandström T, Frew A, Holgate S. 1997a. Short-term ozone exposure upregulates P-selectin in normal human airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(5): 1798-1803.
- Krishna MT, Springall D, Meng QH, Withers N, MacLeod D, Biscione G, Frew A, Polak J, Holgate S. 1997b. Effects of ozone on epithelium and sensory nerves

in the bronchial mucosa of healthy humans. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(3 Pt 1): 943-950.

Labs, P. 1992. Entwicklung und Aufbau einer Ablage zur Exposition von Menschen gegenüber Ozon. Diplomarbeit. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bioingenieurwesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.

Lam S, Leriche JC, Kijek K, Phillips D. 1985. Effect of bronchial lavage volume on cellular and protein recovery. *Chest*, 88(6): 856-859.

Leikauf GD, Simpson LG, Santrock J, Zhao Q, Abbinante-Nissen J, Zhou S, Driscoll KE. 1995. Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 2: 91-95.

Linn WS, Buckley RD, Spier CE, Blessey RL, Jones MP, Fischer DA, Hackney JD. 1978. Health effects of ozone exposure in asthmatics. *Am Rev Respir Dis*, 117(5): 835-843.

Lohmann, L. 1998. Untersuchungen zur Parameterabschätzung und Verifizierung eines Modells der Stickstoffmonoxid-Produktion in der menschlichen Lunge. Diplomarbeit. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bioingenieurwesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.

Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggaard A, Hokfelt T, Lundberg JM, Alving K. 1995. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med*, 1(4): 370-373.

Macnee W. 2005. Treatment of stable COPD: antioxidants. *Eur Respir Rev*, 14(94): 12-22.

Madden M, Hanley N, Harder S, Devlin R. 1996. Increased hydrogen peroxide in the breath of ozone-exposed subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: A614.

Mattes J, Storm Van's GK, Moeller C, Moseler M, Brandis M, Kuehr J. 2002. Circadian variation of exhaled nitric oxide and urinary eosinophil protein X in asthmatic and healthy children. *Pediatr Res*, 51(2): 190-194.

McDonnell WF, Horstman DH, Abdul-Salaam S, House DE. 1985. Reproducibility of individual responses to ozone exposure. *Am Rev Respir Dis*, 131(1): 36-40.

McDonnell WF, Muller KE, Bromberg PA, Shy CM. 1993. Predictors of individual differences in acute response to ozone exposure. *Am Rev Respir Dis*, 147(4): 818-825.

McDonnell WF, Stewart PW, Andreoni S, Seal E Jr, Kehrl HR, Horstman DH, Folinsbee LJ, Smith MV. 1997. Prediction of ozone-induced FEV1 changes. Effects of concentration, duration, and ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(3 Pt 1): 715-722.

- Michel O, Nagy AM, Schroeven M, Duchateau J, Neve J, Fondu P, Sergysels R. 1997. Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(4 Pt 1): 1157-1164.
- Midani, A. 1998. Implementierung eines Programms zur Messung der Volumina menschlicher Atemwege anhand des ausgeatmeten Stickstoffmonoxids und Kohlenmonoxids. Diplomarbeit. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bioingenieurwesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.
- Molfino NA, Wright SC, Katz I, Tarlo S, Silverman F, McClean PA, Szalai JP, Raizenne M, Slutsky AS, Zamel N. 1991. Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *Lancet*, 338(8761): 199-203.
- Montefort S, Feather IH, Wilson SJ, Haskard DO, Lee TH, Holgate ST, Howarth PH. 1992. The expression of leukocyte-endothelial adhesion molecules is increased in perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7(4): 393-398.
- Moodley YP, Krishnan V, Laloo UG. 2000. Neutrophils in induced sputum arise from central airways. *Eur Respir J*, 15(1): 36-40.
- Morris SM, Jr. & Billiar TR. 1994. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*, 266(6 Pt 1): E829-E839.
- Mudway IS, Blomberg A, Frew AJ, Holgate ST, Sandstrom T, Kelly FJ. 1999a. Antioxidant consumption and repletion kinetics in nasal lavage fluid following exposure of healthy human volunteers to ozone. *Eur Respir J*, 13(6): 1429-1438.
- Mudway IS, Krishna MT, Frew AJ, MacLeod D, Sandstrom T, Holgate ST, Kelly FJ. 1999b. Compromised concentrations of ascorbate in fluid lining the respiratory tract in human subjects after exposure to ozone. *Occup Environ Med*, 56(7): 473-481.
- Mudway IS, Stenfors N, Blomberg A, Helleday R, Dunster C, Marklund SL, Frew AJ, Sandstrom T, Kelly FJ. 2001. Differences in basal airway antioxidant concentrations are not predictive of individual responsiveness to ozone: a comparison of healthy and mild asthmatic subjects. *Free Radic Biol Med*, 31(8): 962-974.
- Muller BA, Leick CA, Smith RM, Suelzer MT, Richerson HB. 1993. Comparisons of specific and nonspecific bronchoprovocation in subjects with asthma, rhinitis, and healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 91(3): 758-772.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6(12): 3051-3064.
- Neuhaus-Steinmetz U, Uffhausen F, Herz U, Renz H. 2000. Priming of allergic immune responses by repeated ozone exposure in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(2): 228-233.
- Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. 1998. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax*, 53(2): 87-90.

- Nocker RE, Out TA, Weller FR, Mul EP, Jansen HM, van der Zee JS. 1999. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 119(1): 45-53.
- Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Krol M. 2001. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med*, 30(2): 178-186.
- O'Byrne PM, Dolovich J, Hargreave FE. 1987. Late asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis*, 136(3): 740-751.
- Olin AC, Andersson E, Andersson M, Granung G, Hagberg S, Toren K. 2004. Prevalence of asthma and exhaled nitric oxide are increased in bleachery workers exposed to ozone. *Eur Respir J*, 23(1): 87-92.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, Sterk PJ. 2002. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*, 37: 3s-8s.
- Peden DB, Setzer RWJ, Devlin RB. 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 Respir Crit Care Med*, 151(5): 1336-1345.
- Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, Boner AL. 1999. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J*, 13(6): 1386-1390.
- Pin I, Freitag AP, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Dolovich J, Denburg JA, Hargreave FE. 1992a. Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis*, 145(6): 1265-1269.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. 1992b. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 47(1): 25-29.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. 1996a. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*, 154(2 Pt 1): 308-317.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. 1996b. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*, 9(6): 1174-1180.
- Platts-Mills TA. 2001. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(8 Pt 2): S1-S5.
- Plopper CG, Hatch GE, Wong V, Duan X, Weir AJ, Tarkington BK, Devlin RB, Becker S, Buckpitt AR. 1998. Relationship of inhaled ozone concentration to acute tracheobronchial epithelial injury, site-specific ozone dose, and glutathione depletion in rhesus monkeys. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19(3): 387-399.

- Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. 1993. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*, 16: 5-40.
- Rabe KF. 2001. The central role of Immunoglobulin-E in allergic disease. *Eur Respir Rev*, 11(81): 147-151.
- Reed CE & Kita H. 2004. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 114(5): 997-1008.
- Richter K, Holz O, Jörres RA, Mücke M, Magnussen H. 1999. Sequentially induced sputum in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 14(3): 697-701.
- Richter K, Kannies F, Mark B, Jörres RA, Magnussen H. 1998. Assessment of accuracy and applicability of a new electronic peak flow meter and asthma monitor. *Eur Respir J*, 12(2): 457-462.
- Ring, J. 1995. Angewandte Allergologie. München: MMV Medizin Verlag.
- Sandström T. 1995. Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans. *Eur Respir J*, 8(6): 976-995.
- Scannell C, Chen L, Aris RM, Tager I, Christian D, Ferrando R, Welch B, Kelly T, Balmes JR. 1996. Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 154(1): 24-29.
- Schelegle ES, Miller LA, Gershwin LJ, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Gerriets JE, Walby WF, Mitchell V, Tarkington BK, Wong VJ, Baker GL, Pantle LM, Joad JP, Pinkerton KE, Wu R, Evans MJ, Hyde DM, Plopper CG. 2003. Repeated episodes of ozone inhalation amplifies the effects of allergen sensitization and inhalation on airway immune and structural development in Rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*, 191(1): 74-85.
- Schierhorn K, Hanf G, Fischer A, Umland B, Olze H, Kunkel G. 2002. Ozone-induced release of neuropeptides from human nasal mucosa cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 129(2): 145-151.
- Schierhorn K, Zhang M, Matthias C, Kunkel G. 1999. Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20(5): 1013-1019.
- Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jörres RA. 2000. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J*, 16: 1115-1118.
- Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. 1987. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol*, 138(8): 2611-2615.

- Sheel AW, Road J, McKenzie DC. 1999. Exhaled nitric oxide during exercise. *Sports Med*, 28(2): 83-90.
- Silkoff PE & Martin RJ. 1998. Pathophysiology of nocturnal asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 81(5 Pt 1): 378-383.
- Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Furlott HG, Hoffstein E, Wakita S, Chapman KR, Szalai JP, Zamel N. 1997. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(1): 260-267.
- Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Herbison GP, Taylor DR. 2005a. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med*, 172(4): 453-459.
- Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. 2005b. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med*, 352(21): 2163-2173.
- Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor DR. 2004. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(4): 473-478.
- Solway J & Fredberg JJ. 1997. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17(2): 144-146.
- Sonnemann, H. 1997. Untersuchungen zur atmungsbedingten Stickstoffmonoxidproduktion bei Gesunden und Patienten mit Atemwegserkrankungen. Diplomarbeit. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bioingenieurwesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.
- Staines, N., Brostoff, J., & James, K. 1999. Immunologisches Grundwissen. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Sterk PJ. 1998. Repeated low dose allergen exposure: a new investigational model of asthma as a persistent disease? *Eur Respir J*, 11(4): 798-800.
- Stieb DM, Burnett RT, Beveridge RC, Brook JR. 1996. Association between ozone and asthma emergency department visits in Saint John, New Brunswick, Canada. *Environ Health Perspect*, 104(12): 1354-1360.
- Strand V, Rak S, Svartengren M, Bylin G. 1997. Nitrogen dioxide exposure enhances asthmatic reaction to inhaled allergen in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(3): 881-887.
- Strand V, Svartengren M, Rak S, Barck C, Bylin G. 1998. Repeated exposure to an ambient level of NO₂ enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *Eur Respir J*, 12(1): 6-12.

Sulakvelidze I, Inman MD, Rerecich T, O'Byrne PM. 1998. Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics. *Eur Respir J*, 11(4): 821-827.

Sun J & Chung KF. 1997. Airway inflammation despite loss of bronchial hyper-responsiveness after multiple ozone exposures. *Respir Med*, 91(1): 47-55.

Taube C, Holz O, Mücke M, Jörres RA, Magnussen H. 2001. Airway response to inhaled hypertonic saline in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(10 Pt 1): 1810-1815.

Tsai WC, Strieter RM, Zisman DA, Wilkowski JM, Bucknell KA, Chen GH, Standiford TJ. 1997. Nitric oxide is required for effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 65(5): 1870-1875.

Umweltbundesamt 2003. Kurzbericht Ozonsituation 2003 in der Bundesrepublik Deutschland.

Vagaggini B, Taccola M, Cianchetti S, Carnevali S, Bartoli ML, Bacci E, Dente FL, Di Franco A, Giannini D, Paggiaro PL. 2002. Ozone exposure increases eosinophilic airway response induced by previous allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*, 166(8): 1073-1077.

van Beurden, W. J. & Dekhuijzen, P. N. 2005. Hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. In Paolo Montusci (Ed.), New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of exhaled breath condensate: 67-72. Boca Raton, London, New York Washington DC: CRC Press.

van Beurden WJ, Dekhuijzen PN, Harff GA, Smeenk FW. 2002. Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. *Respiration*, 69(3): 211-216.

Van Hoydonck PG, Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Schouten EG, Dupont LJ, Temme EH. 2004. Quantitative analysis of 8-isoprostane and hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Eur Respir J*, 23(2): 189-192.

Van Vyve T, Chanez P, Lacoste JY, Bousquet J, Michel FB, Godard P. 1992. Comparison between bronchial and alveolar samples of bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Chest*, 102(2): 356-361.

von Mutius E, Braun-Fahrländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy*, 30(9): 1230-1234.

Weinmann GG, Liu MC, Proud D, Weidenbach-Gerbase M, Hubbard W, Frank R. 1995. Ozone exposure in humans: inflammatory, small and peripheral airway responses. *Am J Respir Crit Care Med*, 152(4 Pt 1): 1175-1182.

Wewel RA, Crusius AMJ, Gatzemeier U, Heckmayr M, Becher G, Magnussen H, Jörres RA, Holz O. 2006. Time course of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide during chemotherapy. *Eur Respir J*, in press.

Yakabi K, Arimura T, Koyanagi M, Uehigashi Y, Ro S, Minagawa Y, Nakamura T. 2002. Effects of interleukin-8 and *Helicobacter pylori* on histamine release from isolated canine gastric mucosal mast cells. *J Gastroenterol*, 37(1): 10-16.

Yang IA, Holz O, Jörres RA, Magnussen H, Barton SJ, Rodriguez S, Cakebread JA, Holloway JW, Holgate ST. 2005. Association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and ozone-induced change in lung function. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(2): 171-176.

Danksagung

Herrn Professor Dr. W. Ruck danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Anerkennung dieses Promotionsvorhabens und für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Dr. D. Nowak für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. Magnussen danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchführen zu können und für die dauerhafte und umfassende Unterstützung bei der Arbeit im Forschungslabor des Krankenhauses Großhansdorf.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. R.A. Jörres für die einzigartige Zusammenarbeit seit 1993, den Rückhalt und die Förderung, die eine wesentliche Grundlage für das Zustandekommen dieser Arbeit waren. Vielen Dank auch für das beispiellose Engagement, die förderlichen Diskussionen, großartigen Ideen und nicht zuletzt für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr H.W. Rüdiger und Herrn Dipl. Ing. Dr. med. T. Krause für die Unterstützung während meiner ersten Jahre in der Forschung.

Für die Bereitstellung der Fördermittel (Fördernummer PUG L96010) für diese Studie bin ich dem „Projekt Umwelt und Gesundheit“ des Bundeslandes Baden-Württemberg in Karlsruhe sowie für die laufende Unterstützung der Landesversicherungsanstalt der Freien und Hansestadt Hamburg zu Dank verpflichtet.

Ich möchte außerdem allen Probanden für die engagierte Mitarbeit in diesem Projekt, der Umweltbehörde Hamburg für die regelmäßige Kalibration des Ozonanalysators, und den Drs. K. Richter, L. Grönke, M. Behnke, C. Taube und F. Kanniess für die notwendige ärztliche Begleitung in diesem Projekt danken.

Darüberhinaus danke ich P. Timm, M. Mücke, S. Janicki, K. Paasch, S. Koschyk und S. Böhme für die ausgezeichnete technische Assistenz im Rahmen dieser Studie.

Neben der Hilfe bei der Analyse schwieriger Sputumpräparate im Rahmen dieser Untersuchung möchte ich Herrn Dr. L. Welker auch für die jahrelange hervorragende Zusammenarbeit danken.

Mein Dank auch an Dr. B. Feindt und K. Paasch für die engagierte Zusammenarbeit bei den laufenden Projekten.

Für die Anregung zur Einreichung dieses Promotionsvorhabens bei der Universität Lüneburg sowie für die Diskussion dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Dipl. Umweltwiss. K.-C. Müller.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Frau für den Rückhalt, die Unterstützung meiner Arbeit und die Geduld, insbesondere in den letzten Wochen der Fertigstellung, meinem Sohn für die „Freistellung“ von größeren Lego-Projekten sowie meinen Eltern für die Unterstützung, Motivation und die Freiheit bei der Wahl meiner Ausbildung.

Lebenslauf

17.02.1962	geboren in Hamburg
1968	Grundschule Marienthaler Strasse, Hamburg
1972	Kirchenpauer Gymnasium, Hamburg
1978 – 1979	Ellensburg Highschool, Ellensburg, USA
1982	Abitur
1982 – 1984	Zivildienst: Offene Altenhilfe, Hamburg Barmbek
1984-1989	Studium Fachhochschule Hamburg-Bergedorf: Bioingenieurwesen, Fachrichtung Umwelttechnik
1988-1989	Diplomarbeit: <i>³²P-Postlabeling ein hochsensitives Verfahren zum Nachweis von kovalent an DNA gebundenen Schadstoffen-Standardisierung und Anwendungsbeispiele</i> Universität Hamburg, Ordinariat für Arbeitsmedizin, Arbeitsgruppe Toxikogenetik, Prof. Dr. HW Rüdiger
1989 - 1992	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Toxikogenetik, Ordinariat für Arbeitsmedizin, Universität Hamburg
1992 - 1993	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Arbeitsmedizin, Prof. Dr. HW Rüdiger, AKH, Universität Wien
seit 9.1993	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungslabor, Krankenhaus Grosshansdorf

Hiermit erkläre ich, Olaf Holz, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst zu haben. Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Ferner hat diese Arbeit weder in der gegenwärtigen, noch in einer anderen Fassung einem anderen Fachbereich vorgelegen.

Hamburg, den 19.01.06