

Dissertation 02/2007

***In vitro*-Modelle zur Untersuchung von immunmodulierenden
und inflammatorischen Effekten durch flüchtige organische
Verbindungen**

Gundula Fischäder

ISSN 1860-0387

***In vitro*-Modelle zur Untersuchung von
immunmodulierenden und
inflammatorischen Effekten durch
flüchtige organische Verbindungen**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Apothekerin Gundula Fischäder

Diplom-Pharmazeutin

geboren am 19. April 1978 in Grimma

Dekan:	Professorin Dr. Annette Beck-Sickinger
Gutachter:	Professorin Dr. Sunna Hauschildt
	Professor Dr. Egon Marth
	Professor Dr. Ulrich Sack
Tag der Verteidigung:	26. Januar 2007

BIBLIOGRAFISCHE BESCHREIBUNG

Fischäder, Gundula

***In vitro*-Modelle zur Untersuchung von immunmodulierenden und inflammatorischen Effekten durch flüchtige organische Verbindungen**

Universität Leipzig, Dissertation

S. 133 , Lit. 207, Abb. 38, Tab. 13

Referat

Die Belastung der Innenraumluft mit flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) stellt aufgrund der langen Aufenthaltszeit in Räumen eine Gefährdung der Gesundheit des Menschen dar. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine VOC-Belastung im Innenraum zur Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Antwort sowie zu einem erhöhten Allergierisiko beitragen kann. Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte VOC hinsichtlich ihrer immunmodulierenden und inflammatorischen Eigenschaften zu untersuchen. Dabei wurden aromatische (Chlorbenzol, Styrol, m-Xylol) und aliphatische VOC (Methylcyclopentan, C₉-C₁₃-Alkane) sowie verschiedene VOC-Mischungen ausgewählt. Untersuchungen zum Einfluss dieser Verbindungen auf periphere Blutlymphozyten, insbesondere auf eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes, zeigten, dass VOC primär nicht auf Blutlymphozyten wirken. Weiterhin wurde untersucht, ob VOC inflammatorische Reaktionen auf Lungenepithelzellen induzieren. Dabei konnte unter Styrol-, m-Xylol- und Chlorbenzol-Exposition humaner Lungenepithelzellen sowie unter Exposition mit VOC-Mischungen, die diese Verbindungen enthielten, im innenraumrelevanten Bereich eine verstärkte Freisetzung des Chemokins MCP-1 beobachtet werden, welches mit entzündlichen und allergischen Prozessen im Zusammenhang steht. Im Gegensatz dazu induzierten hohe Konzentrationen dieser VOC eine verstärkte Freisetzung des Chemokins IL-8, welches an entzündlichen Reaktionen beteiligt ist. Sekundär konnte durch die unter Styrol- bzw. Chlorbenzol-Exposition von Lungenepithelzellen ausgeschütteten Mediatoren auf peripheren Blutzellen eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Antwort induziert werden.

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Juli 2003 bis September 2006 am Umweltforschungszentrum Leipzig, Department Umweltimmunologie unter der Leitung von Frau Dr. Irina Lehmann angefertigt. Die Arbeit entstand in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazie, Pharmakologie für Naturwissenschaftler unter der Leitung von Frau Professorin Dr. Karen Nieber und dem Institut für Biologie II, Immunbiologie unter der Leitung von Frau Professorin Dr. Sunna Hauschildt an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig.

Die Arbeit wurde vom Stipendienprogramm der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	XIV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Flüchtige organische Verbindungen im Innenraum.....	2
1.2 Regelungen zur Bewertung der Innenraumluft.....	5
1.3 Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf die Gesundheit	9
1.3.1 Rolle der Th1/Th2-Regulation bei allergischen Erkrankungen	12
1.4 Zielstellung	14
2 METHODEN	16
2.1 Zellkulturarbeiten.....	16
2.1.1 Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen	16
2.1.2 Kultivierung der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549.....	16
2.2 Exposition humaner Zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen im Zellkulturröhrchen-Modell.....	18
2.2.1 VOC-Exposition peripherer mononukleärer Blutzellen	18
2.2.2 VOC-Exposition humaner Lungenepithelzellen.....	19
2.3 Exposition humaner Zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen im Transwell-Modell.....	21
2.3.1 VOC-Exposition peripherer mononukleärer Blutzellen	21

2.3.2	VOC-Exposition humaner Lungenepithelzellen.....	22
2.3.3	VOC-Exposition von kokultivierten Lungenepithelzellen und PBMC	23
2.4	Herstellung der Verdünnungsreihen der flüchtigen organischen Verbindungen.....	24
2.5	Inkubation von PBMC mit Zellkulturüberständen VOC-exponierter Lungenepithelzellen.....	26
2.6	Untersuchung der Zellvitalität	27
2.6.1	MTT-Test.....	27
2.6.2	Ethidiumbromid-Färbung.....	28
2.6.3	Zellvitalitätsmessung mittels alamarBlue™ und CFDA, AM	29
2.7	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA.....	30
2.8	Untersuchung der MCP-1 mRNA-Expression mittels <i>Real Time</i> <i>Detection</i> PCR	32
2.8.1	Isolierung der mRNA und Synthese der cDNA	32
2.8.2	<i>Real Time Detection</i> PCR	34
2.9	Statistische Auswertung	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf periphere mononukleäre Blutzellen im Zellkulturröhrchen-Modell	36
3.1.1	Einfluss von VOC auf die Zellvitalität von PBMC	37
3.1.2	Einfluss von VOC auf die Zytokinfreisetzung von PBMC.....	40
3.2	Etablierung eines Modells zur Exposition von humanen Lungenepithel- zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen	46

3.3	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf humane Lungenepithelzellen im Zellkulturröhrchen-Modell.....	50
3.3.1	Einfluss von VOC auf die Zellvitalität humaner Lungenepithelzellen	50
3.3.2	Einfluss von VOC auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen.....	54
3.4	Untersuchung von Sekundäreffekten VOC-exponierter Lungenepithelzellen auf PBMC.....	60
3.5	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf PBMC im Transwell-Modell.....	62
3.6	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf humane Lungenepithelzellen im Transwell-Modell.....	65
3.6.1	Einfluss von VOC auf die Zellvitalität humaner Lungenepithelzellen	66
3.6.2	Einfluss von VOC auf die Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen	69
3.6.3	Einfluss von Chlorbenzol auf die MCP-1 mRNA-Expression humaner Lungenepithelzellen.....	73
3.7	Untersuchung von Sekundäreffekten VOC-exponierter Lungenepithelzellen aus dem Transwell-Modell auf PBMC	74
3.8	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf gemeinsam kultivierte Lungenepithelzellen und PBMC im Transwell-Modell am Beispiel von Chlorbenzol.....	78
3.9	Einfluss von MCP-1 auf PBMC	80
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Auswahl eines geeigneten <i>In vitro</i> -Modells zur Exposition von humanen Zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen.....	81

4.2	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf die Freisetzung Th1/Th2-relevanter Zytokine.....	87
4.3	Einfluss einer VOC-Exposition auf Lungenepithelzellen im Zellkultur-röhrchen-Modell.....	90
4.4	Untersuchung von Sekundäreffekten auf das Th1/Th2-Gleichgewicht am Beispiel von Chlorbenzol.....	96
4.5	Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf humane Zellen im Transwell-Modell.....	97
4.6	Untersuchung von Sekundäreffekten durch Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen aus dem Transwell-Modell auf PBMC.....	102
4.7	VOC-Exposition kokultivierter PBMC und Lungenepithelzellen.....	104
4.8	Strukturbedingte Unterschiede in der Wirkung flüchtiger organischer Verbindungen.....	106
4.9	Bewertung von Richt- und Orientierungswerten der Innenraumluft.	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
	DANKSAGUNG	131
	ERKLÄRUNG	132

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	<i>In vitro</i> -Modell zur Exposition von PBMC mit flüchtigen organischen Verbindungen.	19
Abbildung 2:	<i>In vitro</i> -Modell zur Exposition von Lungenepithelzellen (A549) mit flüchtigen organischen Verbindungen.	20
Abbildung 3:	Schematischer Ablauf der VOC-Exposition von PBMC im Transwell-Modell.	22
Abbildung 4:	Schematischer Ablauf des Transfers der Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen auf PBMC.	27
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Durchführung des ELISA.	31
Abbildung 6:	Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test.	37
Abbildung 7:	Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test.	38
Abbildung 8:	Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test.	39
Abbildung 9:	Einfluss der Aromatenmischung (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im	

	Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels Ethidiumbromid-, alamarBlue™- und CFDA, AM-Fluoreszenz.....	40
Abbildung 10:	Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.....	42
Abbildung 11:	Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.....	43
Abbildung 12:	Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.....	45
Abbildung 13:	Einfluss unterschiedlicher TNF- α -Konzentrationen (unstimuliert bis 100 ng/ml) auf die MCP-1-Freisetzung humaner Lungenepithelzellen (A549) nach Exposition mit Chlorbenzol (100 μ g/m ³ und 1000 μ g/m ³), gemessen im ELISA.....	47
Abbildung 14:	Einfluss der Expositionsdauer (1 h, 8 h, 20 h und 30 h) auf die MCP-1-Freisetzung Chlorbenzol-exponierter und TNF- α -stimulierter Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA.....	49
Abbildung 15:	Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test.....	51

Abbildung 16:	Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test.....	52
Abbildung 17:	Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test.....	53
Abbildung 18:	Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.....	55
Abbildung 19:	Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.	57
Abbildung 20:	Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Zytokin-/ Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.....	59
Abbildung 21:	Einfluss der Zellkulturüberstände Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Zellkulturröhrchen-Modell), auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA.....	61

Abbildung 22:	Einfluss der Zellkulturüberstände von mit der Alkanmischung (C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan) exponierten Lungenepithelzellen (aus dem Zellkulturröhrchen-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA.	62
Abbildung 23:	Einfluss von Chlorbenzol auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Transwell-Modell, untersucht mittels MTT-Test.	63
Abbildung 24:	Einfluss von Chlorbenzol auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 20 h (A) bzw. 72 h (B) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA.	65
Abbildung 25:	Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol, Chlorbenzol) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen im MTT-Test.	66
Abbildung 26:	Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen im MTT-Test.	67
Abbildung 27:	Einfluss der Gesamtmischung (C ₉ -C ₁₃ -Alkane, Methylcyclopentan, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, untersucht mittels alamarBlue™-, CFDA, AM- und MTT-Vitalitätstest.	68
Abbildung 28:	Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Chemokinfreisetzung TNF- α -	

	stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA.	71
Abbildung 29:	Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA.	72
Abbildung 30:	Einfluss von Chlorbenzol auf die MCP-1 mRNA-Expression humaner Lungenepithelzellen (A549) bezogen auf das <i>Housekeeping</i> -Gen β -Actin.	74
Abbildung 31:	Einfluss der Zellkulturüberstände Styrol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA.	75
Abbildung 32:	Einfluss der Zellkulturüberstände m-Xylol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA.	76
Abbildung 33:	Einfluss der Zellkulturüberstände Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA.	76
Abbildung 34:	Einfluss der Zellkulturüberstände von mit der Alkanmischung (C ₉ -C ₁₃ -Alkane und Methylcyclopentan) exponierten Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA.	77

Abbildung 35:	Einfluss von Chlorbenzol auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung kokultivierter humaner Lungenepithelzellen (A549) und PBMC nach 20 h (A) bzw. 72 h (B) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA.	79
Abbildung 36:	Einfluss von humanem, rekombinantem MCP-1 auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger bzw. 72-stündiger Inkubation, gemessen im ELISA.	80
Abbildung 37:	Zeitlicher Verlauf der Toluol-Konzentration im Zellkulturmedium nach Applikation von 5 µl Toluol (7,25 g/m ³) im geschlossenen System (Glasflasche mit einem Volumen von 600 ml) (aus: Wichmann et al. 2005).	85
Abbildung 38:	Strukturformeln der untersuchten flüchtigen organischen Verbindungen.	107

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Flüchtige organische Verbindungen im Innenraum (gekürzt aus: Herbarth und Rehwagen 1998).	4
Tabelle 2:	Orientierungswerte für die Bewertung der Innenraumluft.....	7
Tabelle 3:	Pipettierschritte für die Exposition von humanen Zellen mit einzelnen flüchtigen organischen Verbindungen.	25
Tabelle 4:	Pipettierschritte für die Exposition von humanen Zellen mit Mischungen flüchtiger organischer Verbindungen.	25
Tabelle 5:	Pipettiermengen für die Durchführung des ELISA im 96-Well-Format.....	32
Tabelle 6:	Bestandteile des cDNA-Mix zur Synthese der cDNA.	33
Tabelle 7:	Volumina für die Reagenzien zur Durchführung der β -Actin- und MCP-1-PCR.	34
Tabelle 8:	Amplifikationsprotokolle für die Durchführung der β -Actin- und MCP-1-PCR.	34
Tabelle 9:	Einfluss der Lösungsmittel Methanol, Methylcyclopentan und Methylenchlorid auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA.	41
Tabelle 10:	Einfluss der TNF- α -Stimulation auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen (A549).....	47
Tabelle 11:	Einfluss der Lösungsmittel Methanol, Methylcyclopentan und Methylenchlorid auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell.....	54

Tabelle 12:	Einfluss der Methanol-Exposition auf die Zytokin-/Chemokin-freisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA.....	64
Tabelle 13:	Einfluss der Lösungsmittel Methanol und Methylcyclopentan auf die Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell.....	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

*	signifikante Stimulation gegenüber der Kontrolle
#	signifikante Hemmung gegenüber der Kontrolle
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A549	humane Lungenepithel-Zelllinie
AIM-V	serumfreies Zellkulturmedium
AMV-RT	Reverse Transkriptase (RT) aus dem Avian Myoblastosis Virus (AMV)
CD	Klassifizierung von Oberflächen-Antigenen (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary DNA</i>)
CFDA, AM	5-Carboxyfluoresceindiacetat, Acetoxymethylester
CO ₂	Kohlendioxid
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Enzym-Immunoassay (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Durchflusszytometer (engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LARS	Leipziger-Allergie-Risikokinder-Studie
LISA	Lebensstil-Immunsystem-Allergie-Studie
LISS	Leipziger Infekt-, Atemwegserkrankungs- und Allergie-Studie mit Schulanfängern
m ³	Kubikmeter

MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MCP-1	engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
M	Molar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PBMC	periphere mononukleäre Zellen im Blut (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
RTD-PCR	<i>Real Time Detection</i> Polymerasekettenreaktion (engl. <i>real time detection polymerase chain reaction</i>)
pg	Pikogramm
RPMI 1640	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Th	T-Helferzellen (CD4+ T-Lymphozyten)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TVOC	Summe der flüchtigen organischen Verbindungen (engl. <i>total volatile organic compounds</i>)
VOC	flüchtige organische Verbindung (engl. <i>volatile organic compound</i>)

1 EINLEITUNG

Der Innenraum ist für Menschen in einem hoch industrialisierten Land wie Deutschland der bestimmende Lebensraum. Nach Erhebungen des Umweltbundesamtes verbringen Menschen in Deutschland etwa 90% der Lebenszeit in Innenräumen. Davon entfallen etwa zwei Drittel auf Wohnräume, insbesondere Schlafräume (Körner und Stroh 2003). Bereits geringe Belastungen der Innenraumluft können zu erheblichen Mengen inhalativ aufgenommener Schadstoffkonzentrationen führen. Eine weitere wichtige Tatsache ist, dass sich in Wohnräumen auch besonders empfindliche Personengruppen wie Kinder, alte und kranke Menschen aufhalten. Die Schadstoffbelastung der Innenraumluft und die Komplexität der Zusammensetzung haben in den letzten Jahren stetig zugenommen. Hersteller setzen Handelsprodukten (Bauprodukte, Farben, Lacke usw.) vermehrt Chemikalien zu, um die Lagerdauer zu erhöhen. Auch werden Räume aufgrund von Maßnahmen zur Einsparung von Heizenergie (bessere Bauprodukte, dicht schließende Fenster) besser isoliert und damit weniger durchlüftet (BUND Arbeitskreis Umweltchemikalien Toxikologie 1995). Das Lüftungsverhalten der Bewohner ist dieser Tatsache noch nicht angepasst, was einen verminderten Luftwechsel in der Wohnung und damit verbunden einen verminderten Abtransport von Schadstoffen zur Folge hat.

Viele Menschen klagen nach langem Aufenthalt in Innenräumen über gesundheitliche Beschwerden, die auf Bauprodukte oder schlechtes Raumklima zurückgeführt werden. Da es sich in den meisten Fällen um unspezifische Symptome handelt, können diese nicht direkt zugeordnet werden. Seit Mitte der 70er Jahre gibt es den Begriff des „Sick-Building-Syndroms“, unter dem ein breites Spektrum von Befindlichkeitsstörungen beschrieben wird, die nach dem Aufenthalt in Räumen auftreten. Solche Symptome sind z.B. Reizerscheinungen an Auge (Brennen der Augen), Nase (Trockenheit der Schleimhäute) oder Rachen (Heiserkeit), Hautreizungen (Rötungen, Juckreiz), unspezifische Überempfindlich-

keiten (laufende Nase, tränende Augen, asthmaähnliche Symptome), neurologische oder neurotoxische Symptome (Konzentrationsstörungen, Schwindel, Kopfschmerzen) oder auch Geruchs- und Geschmacksstörungen. Nach heutigem Wissen können verschiedene Faktoren zur Entstehung des „Sick-Building-Syndroms“ beitragen. Solche sind z.B. physikalischer (Temperatur, Luftfeuchte, Lärm, Beleuchtung, Lüftungsrate), stofflicher (Tabakrauch, Schwebstaub, flüchtige organische Verbindungen) oder biologischer (Bakterien, Pilze) Natur (BUND Arbeitskreis Umweltchemikalien Toxikologie 1995).

1.1 Flüchtige organische Verbindungen im Innenraum

Wichtige Schadstoffe im Innenraum sind die flüchtigen organischen Verbindungen (VOC, *volatile organic compounds*), welche bei Raumtemperatur in die Innenraumluft gelangen (Samet et al. 1988). Es sind Chemikalien, deren Siedebereich zwischen 50°C und 260°C liegt. Zu den VOC gehören z.B. aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde, Ketone, Ester und Terpene. Mögliche Emissionsquellen für VOC sind Farben, Klebstoffe, Baumaterialien, Möbel, trockengereinigte Kleidungsstücke, Reinigungsmittel, Teppiche und Tabakrauch (Samet et al. 1987, Samet et al. 1988, Cooke 1991).

Inhaltsstoffe aus Farben und Lacken, die durch Renovierungstätigkeiten in die Innenraumluft gelangen, stellen eine der häufigsten Schadstoffquellen in Räumen dar. Die enthaltenen Lösungsmittel verflüchtigen sich nach dem Auftragen der Farben schnell, wodurch ein (Lack-) Film entsteht. Während der Auftragung der Farben und Lacke treten demnach hohe Schadstoffkonzentrationen im Innenraum auf. Ein Teil der Lösungsmittel tritt in den Untergrund ein oder verbleibt im Farbfilm und wird verzögert an die Umgebung freigesetzt. Das führt dazu, dass nach Wochen und Monaten noch eine Schadstoffbelastung im Innenraum vorhanden ist.

Lösungsmittelhaltige Kleber, die für die Verlegung von textilen Fußbodenbelägen verwendet werden, sind eine weitere Schadstoffquelle im Innenraum. Es kommt auch hier zu einer zunächst hohen und später niedrigeren und lang anhaltenden Freisetzung von Schadstoffen und damit zu einer Belastung der Innenraumluft. Besonders betroffen sind in beiden Fällen Personen, die den Schadstoffen direkt

ausgesetzt sind, wie z.B. Maler oder Teppichverleger. Aber auch Personen, die sich nach Renovierungsmaßnahmen lange in den betroffenen Räumen aufhalten, sind einer Dauerbelastung ausgesetzt.

Menschliche Aktivitäten wie Renovierung der Wohnung (Wieslander et al. 1997a) oder Rauchen (Wallace et al. 1987) erhöhen die Konzentrationen von VOC in der Innenraumluft. Wieslander und Mitarbeiter (1997a) konnten zeigen, dass Wohnungen ein Jahr nach der Renovierung ein um durchschnittlich $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ erhöhten Total-VOC-Wert (Summe der VOC, TVOC, *total volatile organic compounds*) hatten.

Wichtige VOC, die bei Renovierungsarbeiten freigesetzt werden, sind aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe (aus Lacken, Farben und Klebstoffen).

Zu den häufig im Innenraum nachgewiesenen aliphatischen Verbindungen gehören die C₉-C₁₃-Alkane (Nonan, Dekan, Undekan, Dodekan und Tridekan) und Methylcyclopentan. Diese Verbindungen gelangen hauptsächlich durch Inhalation in den Organismus, aber auch über Nahrung, Haut- und Augenkontakt (Hazardous Substances Data Bank – HSDB 2005, National Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH 1983, Sitting 1985). Sie haben hautreizende Eigenschaften, führen zu Irritationen von Schleimhäuten (Cheminfo 1997, Kjaergaard et al. 1989, U.S. Coast Guard 1984) und zu Reizungen des Respirationstraktes (Lewis 1996).

Wichtige flüchtige aromatische Verbindungen im Innenraum sind u.a. Chlorbenzol, Styrol, m-Xylol, Toluol und Benzol. Diese Verbindungen kommen in Bauprodukten, Klebstoffe, Farben, Reinigungsmitteln oder im Tabakrauch vor (Environmental Protection Agency – EPA 2006, World Health Organisation – WHO 2003a, b, c, d, WHO 2004). Eine Aufnahme dieser Verbindungen in den Organismus kann über Inhalation, Trinkwasser, Nahrung oder Haut erfolgen. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass es unter Chlorbenzol-Exposition zu Leber- und Nierenschäden kommen kann. Auch kam es nach Chlorbenzol-Inhalation zu Störungen des Zentralen Nervensystems, die zu Bewusstlosigkeit, Tremor, Unruhe und bis zum Tod führten (ATSDR 1999). Hohe m-Xylol-Belastungen führen zu Kopfschmerzen, mangelhafter Muskelkoordination, Schwindel und Verwirrung. Außerdem sind Haut-, Augen-, Nasen- und Rachen-

reizungen, Atemprobleme, verzögerte Reaktionszeiten, Gedächtnisprobleme, Magenbeschwerden und Veränderungen an Leber und Nieren möglich (ATSDR 2005). Hohe Styrol-, Toluol- oder Benzol-Konzentrationen bewirken hauptsächlich Veränderungen des Zentralen Nervensystems wie Depressionen, Konzentrationsprobleme, Muskelschwäche, Müdigkeit, Übelkeit und Irritationen an Augen, Nase und Rachen (ATSDR 1995, WHO 2003a, WHO 2004). Benzol hat zusätzlich toxische Effekte auf das blutbildende System (WHO 2004).

Im Rahmen einer epidemiologischen Studie in Leipzig wurden Konzentrationsmessungen flüchtiger Verbindungen in Wohnungen mit Neugeborenen (n=313) bzw. Vorschulkindern (n=88) durchgeführt. Tabelle 1 zeigt für ausgewählte VOC die im Innenraum nachgewiesenen Konzentrationen im Vergleich zur Außenluft (Herbarth und Rehwagen 1998).

Tabelle 1: Flüchtige organische Verbindungen im Innenraum (gekürzt aus: Herbarth und Rehwagen 1998).

flüchtige Verbindung	Wohnung mit Neugeborenen	Wohnung mit Vorschulkindern	Außenluft
m+p-Xylol	12,9 µg/m ³	5,2 µg/m ³	3,3 µg/m ³
Styrol	1,8 µg/m ³	1,3 µg/m ³	0,1 µg/m ³
Chlorbenzol	3,5 µg/m ³	1,0 µg/m ³	0,1 µg/m ³
Toluol	59,9 µg/m ³	61,0 µg/m ³	9,5 µg/m ³
Benzol	5,0 µg/m ³	5,9 µg/m ³	3,9 µg/m ³
Nonan	6,9 µg/m ³	8,5 µg/m ³	0,4 µg/m ³
Dekan	20,2 µg/m ³	19,9 µg/m ³	2,0 µg/m ³
Undekan	19,7 µg/m ³	18,9 µg/m ³	0,8 µg/m ³
Dodekan	16,4 µg/m ³	12,2 µg/m ³	1,1 µg/m ³
Tridekan	1,7 µg/m ³	3,8 µg/m ³	0,9 µg/m ³
Methylcyclopentan	2,0 µg/m ³	1,6 µg/m ³	3,3 µg/m ³

Die höchsten Belastungen mit diesen Chemikalien treten im Innenraum auf, wobei es insbesondere bei den aromatischen Verbindungen Unterschiede zwischen Wohnungen, in denen Neugeborene leben und Wohnungen mit Vorschulkindern gibt, was mit einer höheren Renovierungsfrequenz während der Schwangerschaft zu erklären ist (Diez et al. 2003). Die beobachtete Anreicherung flüchtiger Verbindungen im Innenraum könnte zu gesundheitlichen Schäden führen.

1.2 *Regelungen zur Bewertung der Innenraumluft*

Um die Schadstoffbelastung im Innenraum einschätzen zu können, muss die Qualität der Innenraumluft bewertet werden.

Zur Bewertung von Einzelverbindungen in der Innenraumluft existieren zwei verschiedene Bewertungskonzepte (Arbeitsgemeinschaft Ökologischer Forschungsinstitute e.V. - AGÖF 2005): die toxikologisch abgeleitete und die statistisch abgeleitete Bewertung.

Die toxikologische Bewertung beruht auf tierexperimentellen Untersuchungen. Dabei werden Tiere unterschiedlichen Konzentrationen einer einzelnen flüchtigen Verbindung ausgesetzt. Es wird die Konzentration ermittelt, bei der am Tier erkennbare gesundheitliche Schäden (Organveränderungen, Stoffwechselstörungen) auftreten. Nachteil dieser Methode ist, dass nur am Tier sichtbare Beeinträchtigungen der Gesundheit berücksichtigt werden können. Gesundheitliche Probleme wie Kopfschmerzen oder Konzentrationsstörungen, die einen Großteil der Befindlichkeitsstörungen unter VOC-Belastung ausmachen, bleiben unberücksichtigt. Auch werden keine Expositionen mit VOC-Mischungen, die unter natürlichen Bedingungen im Innenraum vorliegen, einbezogen.

Statistisch abgeleitete Bewertungskonzepte stützen sich auf Berechnungen von Ergebnissen einer Vielzahl repräsentativer Raumluftmessungen. Hier wird die im Durchschnitt vorliegende VOC-Belastung im Innenraum ermittelt und als „normal“ definiert. Ein Gesundheitsrisiko kann hier allerdings nicht erfasst werden.

Verschiedene Institutionen haben sich mit der Erstellung von Orientierungswerten und Richtwerten beschäftigt, die allerdings keinen rechtsverbindlichen Charakter haben.

Die AGÖF (2005) hat Orientierungswerte herausgegeben, die statistisch abgeleitet sind. Sie umfassen „Hintergrund-, Normal- und Auffälligkeitswerte“, die wie folgt definiert sind:

- „Der ‘Hintergrundwert’ beschreibt einen Zustand, der durch konsequente Vermeidung von Emissionsquellen erreichbar und deshalb anzustreben ist. (...)“ Dieser Wert ist das 10-Perzentil der Messwerteverteilung.
- „Der ‘Normalwert’ stellt die durchschnittliche Belastungssituation des betrachteten Kollektivs dar, die im Allgemeinen auf Quellen im Innenraum zurückgeht. (...)“ Der ‚Normalwert’ ist das 50-Perzentil der Messwerteverteilung.
- „Der ‘Auffälligkeitswert’ beschreibt eine Überschreitung von in Innenräumen üblichen Konzentrationen und legt das Vorhandensein einer Schadstoffquelle nahe. (...)“ Dieser Wert ist das 90-Perzentil der Messwerteverteilung.

Körner und Mitarbeiter (2003) verwenden für die Einschätzung der Innenraumbelastung Vergleichswerte. Diese werden als Hintergrundwerte definiert oder sind auf die Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) bezogen. Die Definition der Hintergrundwerte weicht hier im Vergleich zur Definition der AGÖF ab:

- ‚Hintergrundwerte’ sind ein Maß für die übliche Belastung der Innenraumluft in Deutschland. Sie wurden vom Umweltbundesamt durch Untersuchungen der Innenraumluft in fast 500 Wohnungen erhoben. Durch den Vergleich mit den Werten dieser Studie kann festgestellt werden, ob eine zu hohe oder eine „übliche“ Belastung im Innenraum vorliegt. Als erhöht wird ein Wert angesehen, der höher als 95% aller beobachteten Werte liegt (95-Perzentil).

- Die Maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen können ebenfalls als Anhaltspunkte verwendet werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass diese Werte für gesunde Arbeitnehmer mit einer Wochenarbeitszeit von max. 40 Stunden gelten. Auch sind keine Risikogruppen wie Kinder oder Kranke berücksichtigt. In erster Näherung gilt, dass mit Gesundheitsrisiken nicht gerechnet wird, wenn die Konzentration einer Chemikalie unter 1% des MAK-Wertes liegt.

Tabelle 2 stellt die einzelnen Daten gegenüber.

Tabelle 2: Orientierungswerte für die Bewertung der Innenraumluft.

	Hintergrundwert*	Normalwert*	Auffälligkeitswert*	Hintergrundwert#	95-Perzentil#	MAK-Wert	1% des MAK-Wertes
n-Nonan	< 1 µg/m ³	1 µg/m ³	20 µg/m ³	5,0 µg/m ³	31 µg/m ³	-	-
n-Dekan	< 1 µg/m ³	3 µg/m ³	30 µg/m ³	8,3 µg/m ³	52 µg/m ³	-	-
n-Undekan	< 1 µg/m ³	4 µg/m ³	30 µg/m ³	6,0 µg/m ³	28 µg/m ³	-	-
n-Dodekan	< 1 µg/m ³	3 µg/m ³	20 µg/m ³	4,0 µg/m ³	17 µg/m ³	-	-
n-Tridekan	< 1 µg/m ³	2 µg/m ³	10 µg/m ³	4,9 µg/m ³	22 µg/m ³	-	-
Methylcyclopentan	< 1 µg/m ³	< 1 µg/m ³	10 µg/m ³	2,4 µg/m ³	7,4 µg/m ³	-	-
Chlorbenzol	-	-	-	-	-	46 000 µg/m ³	460 µg/m ³
Styrol	< 1 µg/m ³	2 µg/m ³	10 µg/m ³	0,7 µg/m ³	6 µg/m ³	85 000 µg/m ³	850 µg/m ³
m-Xylol	3 µg/m ³	10 µg/m ³	30 µg/m ³	16,3 µg/m ³	57 µg/m ³	440 000 µg/m ³	4 400 µg/m ³

* nach AGÖF 2005

nach Krause et al. 1991

- kein Wert vorhanden

Für die flüchtige Verbindung Styrol gibt es toxikologisch abgeleitete Richtwerte, die ebenfalls keinen rechtsverbindlichen Charakter haben. Die Innenraumluftthygiene-Kommission des Umweltbundesamtes definiert zwei Arten von Richtwerten (Ad-hoc-Arbeitsgruppe 1996):

- „Der Richtwert I ist die Konzentration eines Stoffes in der Innenraumluft, bei der (...) auch bei lebenslanger Exposition keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen zu erwarten sind. (...). Aus Vorsorgegründen besteht im Konzentrationsbereich zwischen Richtwert I und Richtwert II Handlungsbedarf. (...). Der Richtwert I kann als Sanierungszielwert dienen. Er soll nicht „ausgeschöpft“, sondern nach Möglichkeit unterschritten werden.“

- „Der Richtwert II (...) stellt die Konzentration dar, bei deren Erreichen bzw. Überschreiten unverzüglich Handlungsbedarf besteht, da diese Konzentration geeignet ist, insbesondere für empfindliche Personen bei Daueraufenthalt in den Räumen eine gesundheitliche Gefährdung darzustellen.“

Der Richtwert I beträgt für Styrol $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und Richtwert II $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

In einer weiteren Studie wurden für die Verbindungen Styrol und Xylol (alle Isomere) toxikologisch begründete Richtwerte für die Luft von Büroräumen festgelegt. Diese Werte stellen 90-Perzentilwerte der Häufigkeitsverteilung der Messergebnisse dar und liegen für Styrol bei $7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und für Xylol bei $34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Schlechter et al. 2004).

Für die Beurteilung der Qualität der Innenraumluft wird auch der TVOC-Wert herangezogen. Im Gegensatz zur Luft an industriellen Arbeitsplätzen, die in ihrer Zusammensetzung annähernd bekannt ist, ist die Luft in privaten Räumen wesentlich komplexer zusammengesetzt. Dies gilt besonders für die in großer Vielzahl in der Innenraumluft vorkommenden Chemikalien. Aufgrund von unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und Wirkungen der Verbindungen ist die Angabe von Richtwerten für die Summe aller VOC schwierig. Auch ist zu beachten, dass die Effekte von unterschiedlich zusammengesetzten VOC-Mischungen unterschiedlich stark sind. Für die Innenraumluft wird ein TVOC-Zielwert von $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ angegeben (Seifert 1999). Dieser Wert ist weniger zur gesundheitlichen Bewertung gedacht, gibt aber bei Überschreitung Hinweise auf das Vorhandensein von Schadstoffquellen im Innenraum. Für Räume, die für einen längerfristigen Aufenthalt bestimmt sind, sollte ein TVOC-Wert von $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $3000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nicht überschritten werden (Seifert 1999). TVOC-Werte zwischen $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ und $25 \text{ mg}/\text{m}^3$ sind allenfalls vorübergehend täglich zumutbar (Seifert 1999). Solche Konzentrationen können beispielsweise nach Renovierungen auftreten.

1.3 *Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf die Gesundheit*

Bisher existieren nur wenige experimentelle Studien zum Einfluss von Innenraum-schadstoffen auf die Entstehung von Atemwegserkrankungen und Allergien.

Ashley und Mitarbeiter (1996) konnten zeigen, dass flüchtige Verbindungen nach dauerhafter Exposition durch Inhalation im Organismus angereichert werden. Geringe Konzentrationen dieser VOC konnten resorbiert und damit im Blut nachgewiesen werden (Ashley et al. 1996).

Die Belastung der Innenraumluft mit flüchtigen Verbindungen steht im Zusammenhang mit Asthma und Atemwegserkrankungen bei Kindern (Ware et al. 1993, Diez et al. 2000) und Erwachsenen (Wieslander et al. 1997a). Eine Studie, in der Probanden mit VOC-Mischungen exponiert wurden (Koren et al. 1992) und eine Studie mit Malern (Wieslander et al. 1997b) zeigten, dass geringere VOC-Konzentrationen von 25 mg/m^3 zu entzündlichen Reaktionen der Atemwege führen. In einer weiteren Studie (Wieslander et al. 1997a) konnte ein Zusammenhang zwischen renovierten Innenräumen und dem Auftreten von Asthma bereits bei niedrigeren VOC-Konzentrationen von 300 µg/m^3 bis 400 µg/m^3 gezeigt werden. Diez und Mitarbeiter (2000) konnten weiterhin zeigen, dass Renovierungsarbeiten in der Schwangerschaft später beim 6-wöchigen Kind zu Symptomen einer Atemwegsinfektion führen. Auch trugen Styrol-Konzentrationen von über 2 µg/m^3 zur Entstehung von Atemwegsinfektionen bei 6 Wochen alten Kindern bei. Renovierungsmaßnahmen in der gesamten Wohnung während des zweiten Lebensjahres des Kindes führten zu einem verstärkten Auftreten von obstruktiver Bronchitis und pfeifender, keuchender Atmung (*Wheezing*) (Diez et al. 2003). Auch führten Renovierungstätigkeiten in der Wohnung zu einem erhöhten Risiko von obstruktiver Bronchitis in der Zeit bis zum ersten Geburtstag des Kindes (Diez et al. 2003).

Wie flüchtige Verbindungen diese Atemwegssymptome auslösen, ist weitestgehend unbekannt. Die Schadstoffe der Innenraumluft können dabei auf verschiedenen Wegen in den menschlichen Organismus gelangen. Eine Aufnahme ist über Hautkontakt, Nahrung, Trinkwasser oder durch Inhalation möglich. Für

flüchtige Verbindungen stellt die Inhalation den wichtigsten Weg dar. Die Schadstoffe kommen dabei in den Bronchien und Alveolen (Ort des Gasaustausches) mit Epithelzellen und Alveolarmakrophagen in Kontakt. Die verschiedenen Zellen des Lungenepithels stellen zum einen eine physikalische Barriere dar (zilientragende Epithelzellen, Schleimproduktion durch Becherzellen), haben aber zum anderen durch ihre spezifischen Funktionen (Produktion von Zytokinen, Chemokinen und proteinhaltigen Sekreten) gemeinsam mit Immunzellen eine zusätzliche Abwehrfunktion.

Durch eingeatmete Schadstoffe können Entzündungsprozesse in den Atemwegen induziert werden. Dabei spielen inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle. Stimulierte Alveolarmakrophagen setzen Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) frei. Diese Zytokine stehen am Anfang der inflammatorischen Kaskade. Sie führen zur Freisetzung weiterer Zytokine und Chemokine durch Makrophagen und mesenchymale Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten. So werden nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α Chemokine wie IL-8 (Bazzoni et al. 1991), RANTES (*Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted*) (Schall et al. 1990), Eotaxin (Ponath et al. 1996), MIP-1 α und -1 β (*macrophage inflammatory protein*) (Sherry et al. 1988) und MCP-1 bis -4 (*monocyte chemoattractant protein*) (Leonard und Yoshimura 1990) produziert. Diese freigesetzten Chemokine bewirken das Einwandern von Leukozyten aus dem Blut an den Ort der Entzündung. Es werden verschiedene Gruppen von Chemokinen unterschieden. Die CXC-Chemokine, deren Hauptvertreter das Chemokin IL-8 ist, bewirken die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und sind demnach für entzündliche Prozesse verantwortlich. CC-Chemokine, zu denen MIP, MCP, RANTES und Eotaxin gehören, bewirken die Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten, Lymphozyten sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten. Sie sind damit z.B. an allergischen und entzündlichen Prozessen beteiligt.

In weiteren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen VOC-Belastung und der Entstehung allergischer Reaktionen gezeigt werden. Ergebnisse der Leipziger Infekt-, Atemwegserkrankungs- und Allergie-Studie mit Schulanfängern (LISS-

Studie) zeigten, dass Renovierungstätigkeiten vor der Geburt und im ersten Lebensjahr mit einem Risiko für die Ausbildung von Ekzemen und allergischen Symptomen bei 6-jährigen Kindern verbunden sind (Herbarth et al. 2006). Auch die Ergebnisse der Leipziger Allergie-Risikokinder-Studie (LARS-Studie) konnten belegen, dass bei Allergie-Risikokindern eine Exposition mit chemischen Schadstoffen der Innenraumluft mit einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergenen im Zusammenhang steht. Eine dosisabhängige Beziehung zwischen VOC-Exposition und Sensibilisierung gegen Milchproteine wurde z.B. für Chlorbenzol, Nonan, Dekan sowie o- und m-p-Xylol gezeigt (Lehmann et al. 2001). Für Chlorbenzol wurde zusätzlich eine erhöhte Prävalenz für eine Sensibilisierung gegen Eiweiß nachgewiesen (Lehmann et al. 2001). Auch korrelierte die VOC-Exposition mit einer reduzierten Anzahl von IFN- γ -produzierenden T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) (für Chlorbenzol und die C₉-C₁₃-Alkane) und einer erhöhten Anzahl von IL-4-produzierenden T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen) (für Chlorbenzol), was für allergisches Geschehen kennzeichnend ist (im Kapitel 1.3.1 beschrieben). Signifikante Zusammenhänge konnten für Nonan, Dekan und Dodekan gefunden werden. Somit ist dies der erste Beweis, dass flüchtige Verbindungen zu einer Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung des allergischen Geschehens (Überwiegen der Th2-Antwort) führen können. Es wird vermutet, dass ein gleichzeitiger Anstieg der Typ-2-Immunität und das Vorhandensein von Allergenen zu einer allergischen Sensibilisierung beitragen können (Lehmann et al. 2001). Ergebnisse der LARS-Studie zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen VOC-Exposition und Manifestation von Allergien (Diez et al. 1999, Herbarth et al. 2000). Lehmann und Mitarbeiter (2002) konnten weiterhin zeigen, dass Renovierungstätigkeiten während der Schwangerschaft mit einer reduzierten Anzahl Typ 1-Zytokine-produzierender T-Lymphozyten beim Neugeborenen einhergehen. Von besonderem Interesse ist die Frage, wie flüchtige Verbindungen die beobachteten Effekte auslösen und auf welchem Weg es zu der Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes kommt. Möglich wäre, dass es zu einer direkten Interaktion mit T-Lymphozyten kommt. Diese Fragestellung kann in epidemiologischen Studien nicht geklärt werden.

1.3.1 Rolle der Th1/Th2-Regulation bei allergischen Erkrankungen

Ein Zusammenhang zwischen VOC-Belastung im Innenraum und dem Auftreten allergischer Erkrankungen (Sofortreaktion, Allergie Typ I) konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden.

Bei einer allergischen Reaktion handelt es sich um eine pathologische Dysregulation des Immunsystems nach Kontakt mit einem Allergen. Dabei kommt es nach Erstkontakt mit dem Allergen zur Bildung von Antikörpern (Sensibilisierung). Nach erneutem Kontakt mit dem Allergen werden allergische Symptome hervorgerufen. Diese können sich in Form von Asthma, Heuschnupfen, atopischen Hauterkrankungen oder auch Nahrungsmittel-Unverträglichkeiten äußern.

Wichtige Zellen bei allergischen Reaktionen sind T- und B-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten werden in zwei Klassen unterteilt: T-Zellen, die den Korezeptor CD8 tragen (zytotoxischen T-Zellen, Abtöten virusinfizierter Zellen) und T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche das Korezeptorprotein CD4 exprimieren (T-Helferzellen). CD4⁺-T-Zellen können je nach ihren sezernierten Zytokinen in naive T-Zellen (Th0-Zellen), Th1- und Th2-Zellen sowie regulatorische T-Zellen unterschieden werden. Diese haben verschiedene Eigenschaften und beeinflussen die Immunreaktion in unterschiedliche Richtungen.

Das Allergen wird nach Aufnahme in den Organismus von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), z.B. dendritischen Zellen oder Makrophagen aufgenommen und in Peptide abgebaut. Diese werden über den MHC-II-Komplex den T-Helferzellen präsentiert und vom entsprechenden T-Zell-Rezeptor (TZR) erkannt. Naive CD4⁺-T-Zellen, die auf diese Weise aktiviert werden, entwickeln sich in Gegenwart des Zytokins IL-4, das von anderen Th2-Zellen, aber auch von Mastzellen, Basophilen oder Eosinophilen (Nelms et al. 1999) stammen kann, zu Th2-Zellen. IL-4 ist damit nicht nur ein Effektor-Zytokin sondern auch ein Stimulus für die Th2-Zelldifferenzierung.

Einige lösliche Faktoren können andererseits auch eine Th1-Differenzierung bewirken. Im Vordergrund steht hier das Zytokin IL-12. Es kann von dendritischen

Zellen, B-Zellen und Makrophagen sezerniert werden und führt zu einer Th1-Antwort (zelluläre Immunantwort, Abwehr intrazellulärer Erreger), entweder durch direkte Wirkung auf T-Helferzellen oder indirekt über Natürliche Killerzellen, die zu einer Induktion der Interferon- γ - (IFN- γ -) Produktion führen (Seder et al. 1993, Hsieh et al. 1993, Nabors et al. 1995). IFN- γ selbst hat einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Th2-Zellen (Romagnani 1994a).

Regulatorische T-Zellen sind CD4⁺-T-Zellen, die vermutlich die Entstehung von Allergien und Asthma aber auch Autoimmunerkrankungen kontrollieren können. Wichtige regulatorische T-Zellen sind z.B. Th3-Zellen, regulatorische T-Zellen vom Typ 1 (Tr1-Zellen) und CD4⁺-CD25⁺-Zellen (Akbari et al. 2003). Diese Zellen produzieren die Mediatoren *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) und/oder IL-10, welche regulierende oder suppressive Eigenschaften haben. Sie können unerwünschte Th2-Antworten auf Allergene aus der Umwelt verhindern. Möglicherweise entstehen demnach atopische Sensibilisierungen durch Mangel oder Fehlen dieser Zellen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass IL-10-produzierende regulatorische T-Zellen Allergen-aktivierte IL-4-produzierende T-Zellen hemmen können (Akdis et al. 2004). Der Mechanismus dieser Wirkungen ist noch unbekannt. Diese Zellen könnten zukünftig z.B. bei der Therapie allergischer Erkrankungen eine große Rolle spielen (Robinson et al. 2004, Jang et al. 2006).

Neben der Interaktion des TZR mit dem MHC-II-Komplex sind für die Aktivierung entsprechender Zielzellen kostimulatorische Signale (Interaktionen mit Zelloberflächenmolekülen auf der APZ) oder auch sezernierte Zytokine notwendig. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , TNF- α , TNF- β und IL-2 und unterstützen damit die zelluläre Abwehr (z.B. Aktivierung von Makrophagen). Im Gegensatz dazu sezernieren Th2-Zellen IL-4, IL-5 sowie IL-13 und spielen beim allergischen Geschehen eine große Rolle. Sie tragen zur Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen bei. Weiterhin kommt es zum Klassenwechsel der von den B-Lymphozyten produzierten Antikörper zum Isotyp Immunglobulin E (IgE) (Bonney et al. 1996). Diese IgE-Antikörper binden nun an ihre Rezeptoren (Fc ϵ -Rezeptoren), die auf Mastzellen, aber auch auf basophilen

und eosinophilen Granulozyten exprimiert werden. Die allergische Sensibilisierung ist mit diesem Schritt abgeschlossen. Zu den typischen Symptomen kommt es bei erneutem Kontakt mit dem Allergen. Das Allergen wird dann an die IgE-Antikörper auf den Oberflächen von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen gebunden. Da sich mehrere IgE-Moleküle an ein Allergen anlagern können, kommt es zur Quervernetzung und somit zur Aktivierung der Effektorzellen, zur Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxan A₂) und damit zu dem typischen klinischen Bild, das z.B. aus allergischem Asthma, allergischer Konjunktivitis oder Rhinitis sowie atopischem Ekzem besteht.

Bisher gibt es nur wenige Daten aus experimentellen oder epidemiologischen Studien, die Hinweise geben, welche Art von inflammatorischen Reaktionen durch VOC ausgelöst oder welche Mediatoren unter VOC-Belastung freigesetzt werden. Auch sind Mechanismen der VOC-Wirkungen unbekannt.

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten *In vitro*-Modelle etabliert werden, die eine Exposition von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und humanen Lungenepithelzellen mit VOC ermöglichen. Dabei sollten Verbindungen untersucht werden, für die bekannt ist, dass sie durch Renovierungstätigkeiten im Innenraum nicht nur in erhöhten Konzentrationen vorkommen, sondern auch mit gesundheitsschädigenden Effekten, insbesondere Effekten auf den Respirations-trakt im Zusammenhang stehen. Ausgewählt wurden die flüchtigen aromatischen Verbindungen Chlorbenzol, Styrol und m-Xylol sowie die aliphatischen Verbindungen n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan (C₉-C₁₃-Alkane) und Methylcyclopentan. Neben Effekten der einzelnen Chemikalien sollten auch Mischungseffekte betrachtet werden, um reale Expositionsbedingungen nachzubilden.

Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

- Gibt es einen direkten Einfluss der flüchtigen Verbindungen auf die Zytokinfreisetzung peripherer mononukleärer Blutzellen, insbesondere auf die Th1/Th2-Regulation?
- Welche Einzelverbindungen oder Mischungen sind in welchen Konzentrationsbereichen für diese Effekte verantwortlich?
- In welchen Konzentrationsbereichen bewirken diese Verbindungen Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden ein bereits existierendes *In vitro*-Modell zur Exposition von peripheren mononukleären Blutzellen mit flüchtigen Verbindungen modifiziert und neue *In vitro*-Modelle zur Exposition von humanen Lungenepithelzellen mit VOC etabliert. Weiterhin wurden Untersuchungen zum Einfluss von VOC auf das Zusammenwirken von verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Dazu wurde ein *In vitro*-Modell zur Exposition von kokultivierten PBMC und Lungenepithelzellen mit VOC im Transwell-System etabliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen Hinweise geben, von welchen VOC die stärksten gesundheitlichen Belastungen in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen ausgehen.

2 METHODEN

2.1 Zellkulturarbeiten

2.1.1 Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen

Die Isolierung der PBMC aus dem *Buffy Coat* von gesunden Spendern erfolgte unter sterilen Bedingungen. Der *Buffy Coat* wurde zu gleichen Teilen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden je 12 ml des Dichtegradienten Ficoll Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) verteilt und anschließend mit 25 ml des verdünnten *Buffy Coat* überschichtet. Nachfolgend wurden die Röhrchen 20 min bei 670 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Dabei wurden hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten von den übrigen Blutbestandteilen abgetrennt. Es bildete sich ein heller Interphasenring, der mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in neue Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 340 x g und RT). Nach Zellkernzählung mittels Türk's Reagenz (Serva, Heidelberg, Deutschland) und Einstellung auf die benötigte Zellzahl wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min bei 340 x g und RT) und in Zellkulturmedium aufgenommen.

2.1.2 Kultivierung der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549

Für ausgewählte *In vitro*-Experimente wurde die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 (ATCC Nr. CCL-185) eingesetzt.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium (Biochrom AG), welches mit 8% fetalem Kälberserum (FKS, Biochrom AG) angereichert war, kultiviert. Nach ca. 2-3 Tagen Wachstum bei 37°C, 5% v/v Kohlendioxid (CO₂) und wasserdampf-gesättigter Atmosphäre wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium der in einer 550 ml Gewebekulturflasche mit Filterdeckel (175 cm² Wachstums-

fläche, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) vorliegenden Lungenepithelzellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in RPMI 1640 Medium mit 8% FKS und Zellkernzählung mittels Türk's Reagenz standen die Zellen dann für *In vitro*-Experimente zur Verfügung. Für die Weiterkultivierung der Zelllinie wurden 3×10^6 Lungenepithelzellen in 30 ml RPMI 1640 Medium mit 8% FKS in eine neue 550 ml Gewebekulturflasche ausgesät. Diese Zellen wurden wiederum 2-3 Tage bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

Um Zellen für eine längere Aufbewahrung einzufrieren, wurden diese nach Ablösung von der Wachstumsfläche 10 min bei 340 x g und RT zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium [90% FKS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt, Deutschland)] in einer Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml in Kryoröhrchen (TPP®, Trasadingen, Schweiz) überführt. Die Röhrchen wurden in einen mit Isopropanol (Merck) gefüllten Einfrierbehälter gestellt und bei -80°C über Nacht aufbewahrt. Das Isopropanol bewirkte eine konstante Abkühlung von 1°C pro Minute. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen und Revitalisieren der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 8% FKS aufgenommen und 10 min bei 340 x g und RT zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 8% FKS aufgenommen und in eine 550 ml Gewebekulturflasche zur weiteren Kultivierung überführt.

Für die Experimente wurden Zellen der 2. bis 20. Passage eingesetzt.

2.2 *Exposition humaner Zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen im Zellkulturröhrchen-Modell*

2.2.1 VOC-Exposition peripherer mononukleärer Blutzellen

Alle Experimente erfolgten als Dreifachbestimmungen. Als Zellkulturmedium wurde eine Mischung aus $\frac{1}{3}$ RPMI 1640 Medium und $\frac{2}{3}$ CO₂-unabhängigem Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), welchem 1% essentielle Aminosäuren (BME-Aminosäuren, 100x), 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM) (beide Reagenzien von Biochrom AG) und 5% FKS zugesetzt wurden, verwendet. Die bei der Zellpräparation aus dem *Buffy Coat* erhaltenen PBMC wurden mit Medium resuspendiert und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Stimulation erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (Klon OKT3, NatuTec, Frankfurt, Deutschland) und anti-CD28 (Klon CD28.2, Immunotech, Marseille, Frankreich) in einer Konzentration von je 100 ng/ml.

Für die VOC-Exposition der PBMC wurden Glasflaschen mit einem Volumen von 600 ml verwendet. Die Zellsuspension wurde zu je 1 ml in 14 ml Zellkulturröhrchen mit locker aufsitzender Kappe (TPP®), die einen Gasaustausch in das Zellkulturröhrchen und das Medium ermöglicht, verteilt. Anschließend wurden die Zellkulturröhrchen in kleinen Bechergläsern in die auf 37°C vorgewärmten Flaschen gestellt (um einen direkten Kontakt mit den Chemikalien zu vermeiden).

Die zu testenden Chemikalien wurden in einem Konzentrationsbereich von $0,001 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \text{ g}/\text{m}^3$ untersucht. Dafür wurden die jeweiligen Chemikalienkonzentrationen, wie unter Absatz 2.4 beschrieben, hergestellt und die entsprechende Chemikalien-Lösungsmittelmenge in die Flasche pipettiert. Anschließend wurden die Flaschen, um ein Entweichen der Chemikalie zu verhindern, zügig verschlossen. Nach dem Einstellen der Flaschen in den Brutschrank (37°C) kam es zu einer schnellen Verflüchtigung der Chemikalien im geschlossenen System, so dass sich in den Glasflaschen innerhalb kurzer Zeit eine chemikalienhaltige Gasphase einstellte. Jeder Versuchsansatz beinhaltete eine

Anfangs- und eine Endkontrolle. Bei diesen Kontrollen wurden die PBMC mit dem reinen Lösungsmittel anstelle der Chemikalien-Lösungsmittelmischung exponiert.

Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

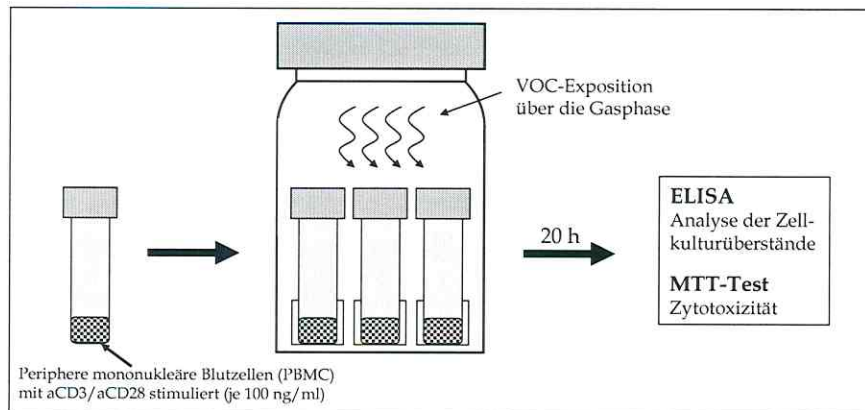


Abbildung 1: *In vitro*-Modell zur Exposition von PBMC mit flüchtigen organischen Verbindungen.

Nach einer Expositionsdauer von 20 h wurden die Zellkulturröhrchen aus den Flaschen entnommen und 10 min bei 340 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl zellfreier Kulturüberstand abgenommen und bei -20°C für die Analyse mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) aufbewahrt. Die verbleibenden Zellen wurden im MTT-Test auf zytotoxische Effekte untersucht.

2.2.2 VOC-Exposition humaner Lungenepithelzellen

Alle Experimente erfolgten als Zweifachbestimmungen. Die Kultivierung der Lungenepithel-Zelllinie A549 erfolgte wie unter Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Nach Ablösen der Lungenepithelzellen von der Gewebekulturflasche und Zellzählung wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen in 3 ml RPMI 1640 Medium mit 8% FKS eingestellt. Die Zellsuspension wurde zu je 3 ml in flache Zellkulturröhrchen mit Filterschraubkappe (TPP®, 10 cm² Wachstumsfläche) verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre, in der sich die Zellen an die Wachstumsfläche anheften, wurde das Medium abgesaugt und durch 3 ml Medium ersetzt, welches zu gleichen Teilen aus RPMI 1640 Medium und CO₂-unabhängigem Medium [mit 1% BME-

Aminosäuren (100x) und 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM)] bestand. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 1 ng/ml rekombinantem humanem TNF- α (rh-TNF- α , AL-ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland).

Für die VOC-Exposition wurden eckige Glasflaschen mit einem Volumen von 600 ml verwendet. Die Filterschraubkappen der Zellkulturröhrchen wurden in eine halboffene Position gebracht, so dass ein Gasaustausch möglich war. Anschließend wurden die Röhrchen auf kleinen Glasbänkchen (um einen direkten Kontakt der Chemikalien mit den Zellkulturröhrchen zu vermeiden) in die auf 37°C vorgewärmten Flaschen gelegt. Die offenen Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre eine halbe Stunde vorinkubiert. Die VOC-Exposition der Lungenepithelzellen erfolgte nach der unter Kapitel 2.4 beschriebenen Vorgehensweise. Jeder Versuchsansatz beinhaltete eine Anfangs- und eine Endkontrolle. Bei diesen Kontrollen wurden die Lungenepithelzellen mit dem reinen Lösungsmittel anstelle der Chemikalien-Lösungsmittelmischung exponiert.

Abbildung 2 gibt den experimentellen Ablauf schematisch wieder.

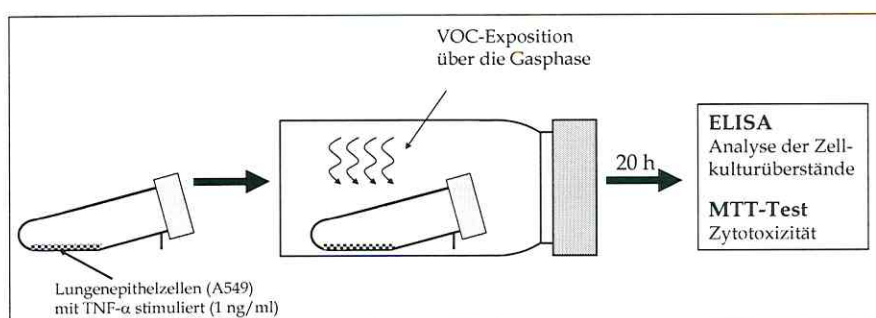


Abbildung 2: *In vitro*-Modell zur Exposition von Lungenepithelzellen (A549) mit flüchtigen organischen Verbindungen.

Nach einer Expositionszeit von 20 h wurden die Zellkulturröhrchen aus den Flaschen entnommen und der gesamte Zellkulturüberstand eines jeden Zellkulturröhrchens in 5 ml Röhrchen überführt. Diese wurden 5 min bei 340 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände erneut in 5 ml Röhrchen überführt und bei -20°C eingefroren. Die Überstände konnten dann

für weitere Experimente und die Analyse mittels ELISA verwendet werden. Die Lungenepithelzellen wurden im MTT-Test auf zytotoxische Effekte untersucht.

2.3 Exposition humaner Zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen im Transwell-Modell

Für die Experimente wurden Transwell-Einsätze mit einem Porendurchmesser von 0,4 μm (Maxicell 24w, TPP®) und SonicSeal Slide™ Wells (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 4 Kavitäten und einer Wachstumsfläche von 1,54 cm^2 /Well verwendet.

2.3.1 VOC-Exposition peripherer mononukleärer Blutzellen

Nach Präparation der PBMC wie unter Absatz 2.1.1 beschrieben, wurden die Zellen in Medium, welches aus $\frac{1}{3}$ RPMI 1640 Medium und $\frac{2}{3}$ CO_2 -unabhängigem Medium mit 1% BME-Aminosäuren (100x) und 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM) bestand und 5% FKS enthielt, aufgenommen und die Zellzahl auf $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Entsprechend der Anzahl der benötigten Ansätze wurden 24-Well-Platten (TPP®) mit 400 μl /Well Medium vorbereitet. Die Transwell-Einsätze wurden in die 24-Well-Platten gestellt und je 200 μl Zellsuspension hinzu pipettiert. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5% v/v CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit setzten sich die Zellen auf der Membran ab. Zur Vorbereitung der Slide-Wells wurden je 500 μl Medium in die Kavitäten verteilt. Das Medium in den Transwell-Einsätzen wurde entfernt und die Einsätze in die Kavitäten der Slide-Wells gestellt. Die PBMC wurden mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (Klon OKT3) und anti-CD28 (Klon CD28.2) in einer Konzentration von je 100 ng/ml stimuliert.

Für die VOC-Exposition wurden eckige Glasflaschen mit einem Volumen von 600 ml verwendet. Die Slide-Wells wurden auf kleinen Glasbänkchen (um einen direkten Kontakt mit den Chemikalien zu vermeiden) in die auf 37°C vorgewärmten Flaschen gestellt. Der weitere Verlauf der VOC-Exposition erfolgte wie unter Kapitel 2.2.2 beschrieben. Abbildung 3 stellt den Ablauf schematisch dar.

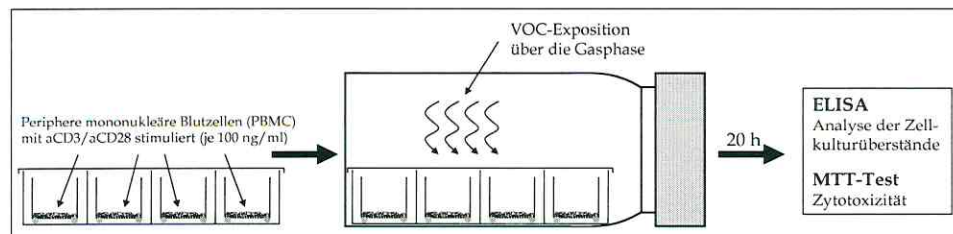


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der VOC-Exposition von PBMC im Transwell-Modell.

Nach einer Expositionszeit von 20 h wurden die Slide-Wells aus den Flaschen entnommen und je 100 μ l/Well Zellkulturmedium für die Zytokin-/Chemokinmessungen mittels ELISA bei -20°C eingefroren. Weiterhin wurden 100 μ l Medium in die Transwell-Einsätze mit den PBMC pipettiert, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden bei 37°C , 5% v/v CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre weiterinkubiert. Nach 72 h Inkubation wurde das restliche Medium entnommen und für die Analyse mittels ELISA bei -20°C aufbewahrt. Die Untersuchung der Zellvitalität erfolgte in einem gesonderten Ansatz nach 20-stündiger VOC-Exposition.

2.3.2 VOC-Exposition humaner Lungenepithelzellen

Nach dem Ablösen der Lungenepithelzellen von der Wachstumsfläche und Zellzählung (wie unter Abschnitt 2.1.2 beschrieben) wurden die Zellen in AIM-V Medium (Invitrogen) aufgenommen und auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Es wurden entsprechend der Anzahl der benötigten Ansätze 24-Well-Platten mit 400 μ l/Well AIM-V Medium vorbereitet und die Transwell-Einsätze in die Kavitäten gestellt. Anschließend wurden je 200 μ l der Zellsuspension in die Transwell-Einsätze verteilt und die Zellen für 24 h im Brutschrank bei 37°C , 5% v/v CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit hefteten sich die Zellen auf der Membran der Transwell-Einsätze an. Nach der Inkubationszeit wurden die Slide-Wells vorbereitet. Dazu wurden in jede Kavität 500 μ l Medium pipettiert, das zu gleichen Teilen aus AIM-V Medium und CO_2 -unabhängigem Medium [mit 1% BME-Aminosäuren (100x) und 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM)] bestand. Anschließend wurde das Medium aus den Transwell-Einsätzen mit den Lungenepithelzellen entfernt und die Einsätze in

die Kavitäten der Slide-Wells gestellt. Die Zellen wurden mit rh-TNF- α in einer Konzentration von 1 ng/ml stimuliert.

Der Ablauf der VOC-Exposition erfolgte wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

Nach einer Expositionszeit von 20 h wurden die Slide-Wells aus den Flaschen entnommen und die Lungenepithelzellen in den Transwell-Einsätzen mittels MTT-Test auf zytotoxische Effekte untersucht. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und bei -20°C für die Zytokin-/Chemokinmessungen mittels ELISA aufbewahrt.

2.3.3 VOC-Exposition von kokultivierten Lungenepithelzellen und PBMC

Die Präparation der PBMC und das Aussäen der Lungenepithelzellen in die Transwell-Einsätze erfolgten am gleichen Tag. Die PBMC wurden in Medium, das zu gleichen Teilen aus AIM-V Medium und CO₂-unabhängigem Medium [mit 1% BME-Aminosäuren (100x) und 1% N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM)] bestand, aufgenommen und auf eine Zellzahl von 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde zu je 500 μ l in die Kavitäten der Slide-Wells verteilt und 24 h bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Lungenepithelzellen wurden wie unter Kapitel 2.3.2 beschrieben in die Transwell-Einsätze ausgesät und ebenfalls 24 h bei 37°C, 5% v/v Kohlendioxid und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium aus den Transwell-Einsätzen entfernt und diese in die Kavitäten der Slide-Wells gestellt. Die Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (Klon OKT3) und anti-CD28 (Klon CD28.2) in einer Konzentration von je 100 ng/ml sowie mit rh-TNF- α in einer Konzentration von 1 ng/ml stimuliert.

Der Verlauf der VOC-Exposition erfolgte wie unter Absatz 2.3.1 beschrieben.

Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurden die Slide-Wells aus den Flaschen entnommen und 100 μ l/Well Zellkulturüberstand für die Zytokin-/Chemokinanalyse mittels ELISA bei -20°C aufbewahrt. Die Transwell-Einsätze wurden entfernt und die Slide-Wells bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmos-

phäre weiterinkubiert. Nach 72 h wurden die restlichen Zellkulturüberstände entnommen und bei -20°C für die Analyse der Zytokine/Chemokine eingefroren.

2.4 Herstellung der Verdünnungsreihen der flüchtigen organischen Verbindungen

Die flüchtigen Verbindungen Chlorbenzol, Styrol, m-Xylol, n-Nonan, n-Dekan, n-Undecan, n-Dodekan, n-Tridekan (alle Reagenzien von Merck) und Methylcyclopentan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden untersucht. Weiterhin wurden die Experimente mit verschiedenen VOC-Mischungen (Alkanmischung, Aromatenmischung und Gesamtmischung) durchgeführt. Die Alkanmischung bestand dabei aus den gesättigten Verbindungen Methylcyclopentan, n-Nonan, n-Dekan, n-Undecan, n-Dodekan und n-Tridekan, die Aromatenmischung aus den ungesättigten Verbindungen Chlorbenzol, Styrol und m-Xylol und die Gesamtmischung aus allen zu untersuchenden Verbindungen (Chlorbenzol, Styrol, m-Xylol, Methylcyclopentan, n-Nonan, n-Dekan, n-Undecan, n-Dodekan und n-Tridekan).

Zur Exposition mit der höchsten Konzentration der Einzelverbindungen (100 g/m³) bzw. den beiden höchsten Konzentrationen der Mischungen (100 g/m³ und 10 g/m³) wurden die jeweiligen Verbindungen unverdünnt appliziert. Für niedrigere Konzentrationen wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet. Es wurde zunächst eine Mischung aus Lösungsmittel und zu untersuchender Substanz hergestellt, welche dann seriell 1:10 verdünnt wurde. Um in jeder Flasche die gleiche Lösungsmittelmenge zu haben, wurde bei den höchsten Konzentrationen das jeweilige Lösungsmittel zusätzlich hinzu pipettiert.

Die Pipettierschritte für die einzelnen flüchtigen Verbindungen und die Chemikalienmischungen sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Pipettierschritte für die Exposition von humanen Zellen mit einzelnen flüchtigen organischen Verbindungen.

VOC	Stammlösung	1x10 ⁸ µg/m ³	1x10 ⁷ µg/m ³	1x10 ⁶ bis 0,001 µg/m ³
Chlorbenzol	544 µl Chlorbenzol + 456 µl Methanol	54,4 µl Chlorbenzol + 10 µl Methanol	10 µl Stammlösung + 5,4 µl Methanol	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
Styrol	662 µl Styrol + 338 µl Methanol	66,2 µl Styrol + 10 µl Methanol	10 µl Stammlösung + 6,6 µl Methanol	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
m-Xylol	694 µl m-Xylol + 306 µl Methanol	69,4 µl m-Xylol + 10 µl Methanol	10 µl Stammlösung + 6,9 µl Methanol	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
n-Nonan	836 µl n-Nonan + 164 µl Methylcyclopentan	83,6 µl n-Nonan + 10 µl Methylcyclopentan	10 µl Stammlösung + 8,4 µl Methylcyclopentan	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
n-Dekan	822 µl n-Dekan + 178 µl Methylcyclopentan	82,2 µl n-Dekan + 10 µl Methylcyclopentan	10 µl Stammlösung + 8,2 µl Methylcyclopentan	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
n-Undekan	811 µl n-Undekan + 189 µl Methylcyclopentan	81,1 µl n-Undekan + 10 µl Methylcyclopentan	10 µl Stammlösung + 8,1 µl Methylcyclopentan	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
n-Dodekan	802 µl n-Dodekan + 198 µl Methylcyclopentan	80,2 µl n-Dodekan + 10 µl Methylcyclopentan	10 µl Stammlösung + 8,0 µl Methylcyclopentan	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
n-Tridekan	794 µl n-Tridekan + 178 µl Methylcyclopentan	79,4 µl n-Tridekan + 10 µl Methylcyclopentan	10 µl Stammlösung + 7,9 µl Methylcyclopentan	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
Methylcyclopentan	811 µl Methylcyclopentan + 189 µl Methylenchlorid	81,1 µl Methylcyclopentan + 10 µl Methylenchlorid	10 µl Stammlösung + 8,1 µl Methylenchlorid	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung

Tabelle 4: Pipettierschritte für die Exposition von humanen Zellen mit Mischungen flüchtiger organischer Verbindungen.

VOC	Stammlösungen	1x10 ⁸ µg/m ³	1x10 ⁷ µg/m ³	1x10 ⁶ µg/m ³	1x10 ⁵ bis 0,001 µg/m ³
Alkanmischung	<u>Stammlösung I:</u> 167,2 µl n-Nonan 164,4 µl n-Dekan 162,2 µl n-Undekan 160,4 µl n-Dodekan 158,8 µl n-Tridekan 162,2 µl Methylcyclopentan <u>Stammlösung II:</u> 48,8 µl Stammlösung I + 51,2 µl Methylcyclopentan	487,6 µl der Stammlösung I + 10 µl Methylcyclopentan	48,8 µl der Stammlösung I + 10 µl Methylcyclopentan	10 µl der Stammlösung II + 4,9 µl Methylcyclopentan	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung II
Aromatenmischung	<u>Stammlösung I:</u> 108,8 µl Chlorbenzol 132,4 µl Styrol 138,8 µl m-Xylol <u>Stammlösung II:</u> 19 µl Stammlösung I + 81 µl Methanol	190,0 µl der Stammlösung I + 10 µl Methanol	19,0 µl der Stammlösung I + 10 µl Methanol	10 µl der Stammlösung II + 1,9 µl Methanol	je 10 µl seriell 1:10 verdünnte Stammlösung
Gesamtmischung	die Verdünnungsreihen der Alkanmischung und der Aromatenmischung werden parallel in die Flaschen pipettiert				

2.5 Inkubation von PBMC mit Zellkulturüberständen VOC-exponierter Lungenepithelzellen

Die Vorgehensweise der VOC-Exposition der Lungenepithelzellen im Zellkultur-röhrchen-Modell entsprach der unter Kapitel 2.2.2 beschriebenen. Die Exposition der Lungenepithelzellen im Transwell-Modell erfolgte in Zellkulturmedium, das zu gleichen Teilen aus RPMI 1640 Medium und CO₂-unabhängigem Medium bestand (Ablauf wie unter Absatz 2.3.2 beschrieben). Die Kulturüberstände aus dem Zellkultur-röhrchen-Modell wurden als Dreifachbestimmungen für die Inkubationszeiten von 24 h und 72 h auf die PBMC gegeben. Im Gegensatz dazu wurde die Inkubation der PBMC mit Zellkulturüberständen aus dem Transwell-Modell als Einfachbestimmung für 24 h/72 h (beide Zeitpunkte in einer Kavität) durchgeführt, da nur geringe Mengen an Zellkulturüberstand zur Verfügung standen. Dabei wurden je 250 µl Zellkulturüberstand in die Kavitäten der 48-Well-Platte (Greiner Bio-One) verteilt. Anschließend wurden je 50 µl RPMI 1640 Medium mit den Antikörpern anti-CD3 (Klon OKT3) und anti-CD28 (Klon 28.2) in einer Konzentration von je 100 ng/ml Endvolumen hinzugegeben. Die aus dem *Buffy Coat* präparierten PBMC wurden mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ /ml in RPMI 1640 Medium mit 12,5% FKS (ergibt eine Endkonzentration in der Zellkultur von 5% FKS) aufgenommen und zu je 200 µl in die Kavitäten der 48-Well-Platte verteilt. Die Inkubationsdauer betrug 24 h und 72 h im Brutschrank bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellkulturplatten bei 80 x g und RT für 5 min zentrifugiert und je 350 µl (Kulturüberstände aus Zellkultur-röhrchen-Modell) bzw. 100 µl (Kulturüberstände aus Transwell-Modell) Zellkulturüberstand abgenommen. Diese wurden bei -20°C für die Analyse mittels ELISA aufbewahrt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Platten wiederum bei 80 x g und RT für 5 min zentrifugiert und je 350 µl (Kulturüberstände aus Zellkultur-röhrchen-Modell) bzw. 250 µl (Kulturüberstände aus Transwell-Modell) Zellkulturüberstand abgenommen und bei -20°C für die Analyse mittels ELISA eingefroren.

Abbildung 4 gibt den schematischen Ablauf der Untersuchungen wieder.

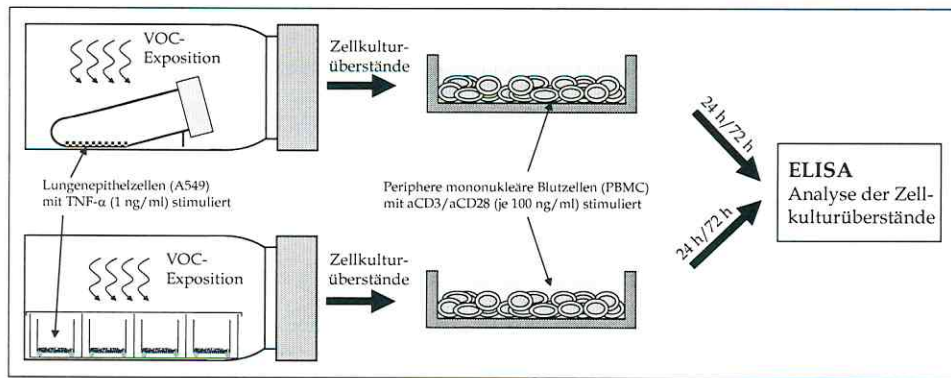


Abbildung 4: Schematischer Ablauf des Transfers der Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen auf PBMC.

2.6 Untersuchung der Zellvitalität

2.6.1 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zellvitalitätstest. Mit diesem Test werden Effekte der untersuchten Chemikalien auf die Vitalität/Proliferation der humanen Zellen ermittelt. Der gelbe Tetrazolfarbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) wird enzymatisch durch Dehydrogenasen, die nur in der lebenden Zelle aktiv sind, in ein wasserunlösliches Formazan gespalten, welches violett gefärbt ist. Nach dem Lysieren der Zellen entsteht eine violett gefärbte Lösung, die spektralphotometrisch vermessen wird.

Der MTT-Test wurde nach dem Protokoll von Mosmann (Mosmann 1983) durchgeführt.

Nach der VOC-Exposition von PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell und Abnahme von je 700 µl Zellkulturüberstand (wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben) wurde in jedes Zellkulturröhrchen 10 µl einer MTT-Lösung [5 g MTT (Sigma-Aldrich) pro Liter PBS] pipettiert und kurz geschüttelt.

Die Zellvitalitätsmessung der Lungenepithelzellen im Zellkulturröhrchen-Modell erfolgte in der Weise, dass nach Abnahme der gesamten Zellkulturüberstände (wie unter Absatz 2.2.2 beschrieben) zunächst in jedes Zellkulturröhrchen 500 µl RPMI 1640 Medium und anschließend je 10 µl MTT-Lösung pipettiert wurde.

Für die Vitalitätsuntersuchung der **PBMC** bzw. der **Lungenepithelzellen** im **Transwell-Modell** wurden die Transwell-Einsätze nach der VOC-Exposition, wie unter Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben, in eine 24-Well-Platte mit 400 µl RPMI 1640 Medium/Well gestellt und je 50 µl RPMI 1640 Medium und 10 µl MTT-Lösung auf die Zellen pipettiert.

Die mit MTT versetzten Zellen wurden für 4 h bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Durch Zugabe von 300 µl (Zellkultur-röhrchen-Modell) bzw. 100 µl (Transwell-Modell) MTT-Stopp-Reagenz [10% m/v Natriumdodecylsulfat (SDS, Merck) in 50%iger v/v wässriger N,N'-Dimethylformamid-Lösung (DMF, Serva, Heidelberg, Deutschland)] wurde die Farbreaktion abgestoppt und die Zellen lysiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, so dass sich der Farbstoff vollständig auflösen konnte.

Die Absorptionsmessungen erfolgten in 96-Well-Platten (TPP®). Es wurden je 300 µl Farbstoff-Lösung in die Kavitäten übertragen und photometrisch vermessen. Die Messung der Extinktion erfolgte im Microplattenphotometer (Photometer Spectra Image, Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 570 nm gegenüber dem Leerwert (Medium mit MTT und SDS/DMF-Lösung, ohne Zellen). Ausgewertet wurden die Daten mittels *Easy Win Kinetics 32* (Easy-Win-Software, Tecan) und Excel XP (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland).

Die Absorption ist der Zellvitalität direkt proportional. Die Ergebnisse wurden als Prozent der Vitalität/Proliferation im Vergleich zur Kontrolle mit dem jeweiligen Lösungsmittel dargestellt [% Vitalität/Proliferation = 100% x Mittelwert-OD (optische Dichte) des VOC-Ansatzes/Mittelwert-OD der Kontrolle].

2.6.2 Ethidiumbromid-Färbung

Die Vitalitätsmessung mittels Ethidiumbromid (1,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium-bromid) erfolgte am Durchflusszytometer. Ethidiumbromid ist ein Interkalator, der sich in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Zellen einlagert. Da Ethidiumbromid nur in beschädigte oder tote Zellen eindringen kann, ist mit diesem Test die Messung der Vitalität einer Zellpopulation möglich.

Für die Untersuchung der Zellvitalität wurden nach Exposition von PBMC mit der Aromatenmischung (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) und Abnahme von je 700 µl Zellkulturüberstand (wie unter Absatz 2.2.1 beschrieben) die Zellen in 12x75 Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt. In jedes Röhrchen wurden 3 ml PBS hinzupipettiert und anschließend 5 min bei 340 x g und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die PBMC mit je 300 µl PBS versetzt und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Serva) versetzt und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson). Die Auswertung erfolgte mittels *CellQuest* (Becton Dickinson) und Excel XP.

Die Ergebnisse wurden als Anteil vitaler Zellen in Prozent im Vergleich zur Kontrolle mit dem jeweiligen Lösungsmittel dargestellt [% Vitalität = 100% x Mittelwert-Fluoreszenz des VOC-Ansatzes/Mittelwert-Fluoreszenz der Kontrolle].

2.6.3 Zellvitalitätsmessung mittels alamarBlue™ und CFDA, AM

Die Zellvitalitätsmessung mittels alamarBlue™ beruht auf der Umsetzung des nicht fluoreszierenden Resazurin in ein fluoreszierendes Endprodukt durch die metabolische Aktivität von lebenden Zellen. CFDA, AM (5-Carboxyfluoresceindiacetat, Acetoxymethylester) ist ein nicht fluoreszierender Farbstoff, der schnell in die Zellen hineindiffundiert und dort von Esterasen der lebenden Zelle in einen fluoreszierenden Farbstoff (5-Carboxyfluorescein) umgewandelt wird.

Nach Abnahme von jeweils 700 µl zellfreien Kulturüberstandes der mit der Aromatenmischung im Zellkulturröhrchen-Modell exponierten PBMC (Versuchsablauf wie unter Kapitel 2.2.1 beschrieben) wurde der restliche Zellkulturüberstand verworfen. Anschließend wurden 300 µl einer Lösung von 5% v/v alamarBlue™ (Invitrogen) und 4 µM CFDA, AM (Biosource, Solingen, Deutschland) in PBS auf die Zellen pipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Alternativ wurden die Transwell-Einsätze der mit der Gesamtmischung (wie unter Kapitel 2.3.2 beschrieben) exponierten Lungenepithelzellen in eine 24-Well-Platte gestellt und je 200 µl der alamarBlue™- und CFDA, AM-haltigen Lösung auf die Zellen pipettiert. Die Inkubationsdauer betrug auch hier 30 min bei 37°C. Für die Messung der

Fluoreszenz wurden je 300 µl Medium aus jedem Zellkulturröhrchen bzw. 200 µl Medium aus den Transwell-Einsätzen in eine 96-Well-Platte überführt. Die Messung der alamarBlue™-Fluoreszenz erfolgte am Fluoreszenz-Messgerät (GENios Plus, Tecan) bei einer Anregungs-Wellenlänge von 530 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 595 nm. Die CFDA, AM-Fluoreszenz-Messung erfolgte anschließend bei einer Anregungs-Wellenlänge von 485 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 530 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *XFluor 4.5 für Excel* (Tecan) und Excel XP.

Die Fluoreszenz ist der Letalität der Zellen direkt proportional. Die Ergebnisse wurden als Prozent der Vitalität/Proliferation im Vergleich zur Kontrolle mit dem jeweiligen Lösungsmittel dargestellt [% Vitalität/Proliferation = 100% x Mittelwert-Fluoreszenz des VOC-Ansatzes/Mittelwert-Fluoreszenz der Kontrolle].

2.7 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Während der Inkubationszeit der humanen Zellen mit den zu untersuchenden Chemikalien werden Zytokine/Chemokine von den Zellen produziert und in das Zellkulturmedium freigesetzt. Diese Mediatoren können mittels ELISA nachgewiesen werden. Zur Bestimmung wurde ein indirekter Sandwich-ELISA, bei dem zwei verschiedene Antikörpermoleküle hochspezifisch an das zu detektierende Zytokin/Chemokin binden, verwendet.

Es wurden die Zytokine IL-4, IL-6, IL-13, IFN-γ und TNF-α sowie die Chemokine MCP-1 und IL-8 in Triplikaten unter Verwendung der entsprechenden OptEIA™-ELISA-Kits (Becton Dickinson) nachgewiesen. Dazu wurden 384-Well-Platten (MaxiSorp, Nunc) verwendet. Alle Waschschrte erfolgten im Microplatten-Washer (Columbus, Tecan) mit 150 µl/Well PBS, welches 0,1% Tween®20 (Merck) enthielt. Der Ablauf des ELISA ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

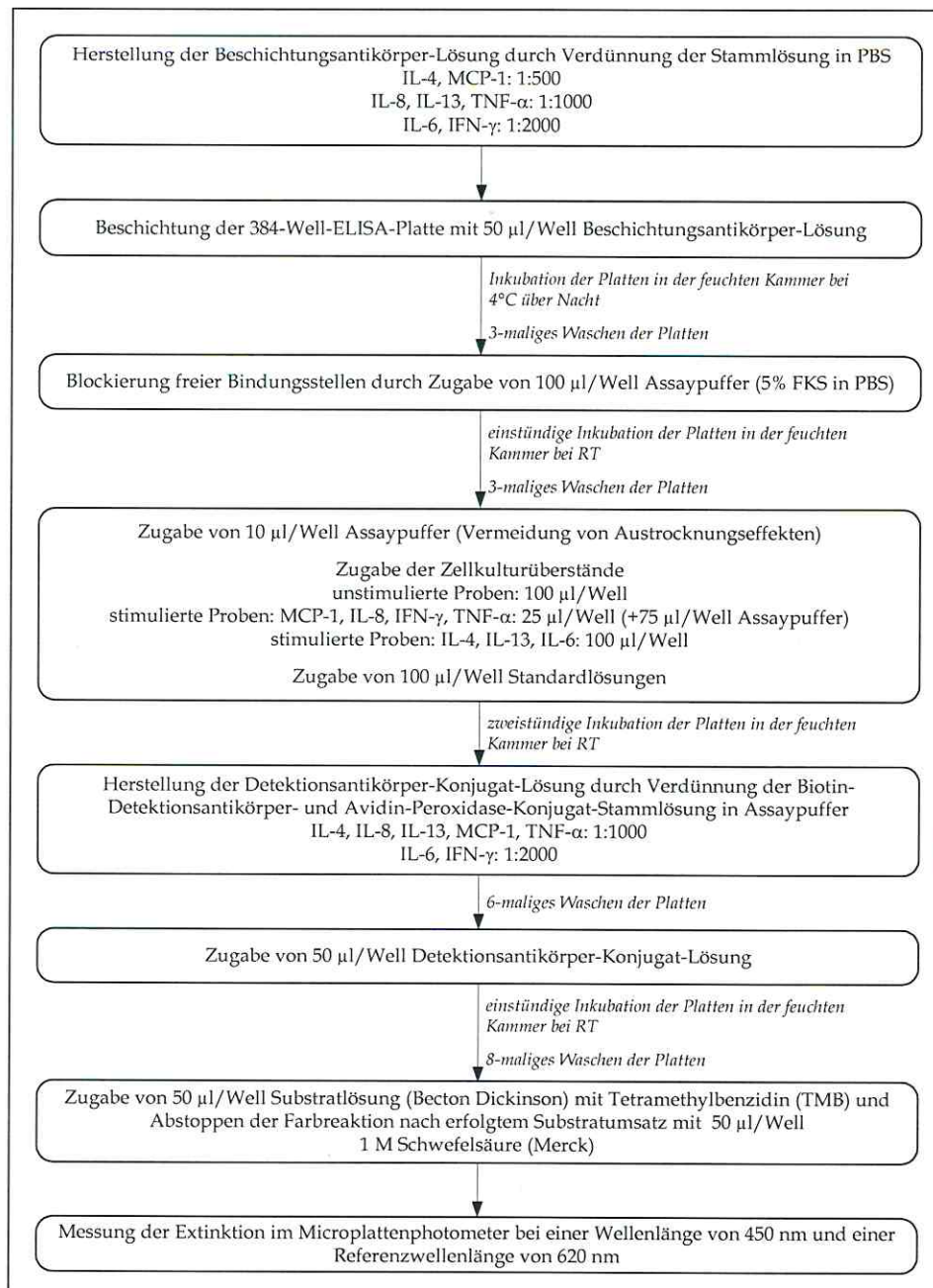


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Durchführung des ELISA.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *Easy Win Kinetics 32* und *Excel XP*.

Abweichend von diesem Schema wurden aufgrund geringerer Mengen an Zellkulturüberständen aus den VOC-Expositions-Experimenten im Transwell-Modell (mit PBMC allein bzw. mit PBMC und Lungenepithelzellen) Einpunktmessungen in 96-Well-ELISA-Platten (MaxiSorp, Nunc) durchgeführt. Dazu wurden die aus dem Experiment stammenden 100 µl Zellkulturüberstand je Ansatz (wie unter 2.3.1 und 2.3.3 beschrieben) mit Assaypuffer auf 200 µl verdünnt und je 25 µl mittels ELISA auf die Chemokine/Zytokine MCP-1, IL-13, TNF- α und IFN- γ untersucht. Tabelle 5 zeigt die im Vergleich zum ELISA im 384-Well-Format abweichenden Pipettiermengen.

Tabelle 5: Pipettiermengen für die Durchführung des ELISA im 96-Well-Format.

Beschichtung der 96-Well-Platte	100 µl/Well Beschichtungsantikörper-Lösung
Blockierung freier Bindungsstellen	300 µl/Well Assaypuffer
Proben-Auftragung	100 µl/Well Assaypuffer und 25 µl Probe
Standard-Auftragung	25 µl/Well Assaypuffer und 100 µl Standardlösung
Auftragung des Detektionsantikörper-Konjugats	100 µl/Well Detektionsantikörper-Konjugat-Lösung
Farbreaktion	100 µl/Well Substrat-Lösung Abstoppen mit 100 µl/Well 1 M Schwefelsäure

Das Ausmaß der Extinktion ist der Zytokin-/Chemokinkonzentration direkt proportional. Die Ergebnisse wurden als Prozent der Zytokin-/Chemokinfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle mit dem jeweiligen Lösungsmittel dargestellt [% Zytokin-/Chemokinfreisetzung = 100% x Mittelwert-OD (optische Dichte) des VOC-Ansatzes/Mittelwert-OD der Kontrolle].

2.8 Untersuchung der MCP-1 mRNA-Expression mittels Real Time Detection PCR

2.8.1 Isolierung der mRNA und Synthese der cDNA

Die Extraktion der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA, *messenger RNA*) wurde mit Hilfe des MagNA Pure LC Systems und dem MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die zu isolierenden Nukleinsäuren an die Ober-

fläche von magnetischen Glasparkeln gebunden werden. Nach einem DNase-Verdau werden ungebundene Substanzen durch mehrere Waschschrirte entfernt und die gereinigte mRNA mit einem salzhaltigen Puffer eluiert.

Für die Untersuchungen wurden Lungenepithelzellen im Transwell-Modell (wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben) mit Chlorbenzol exponiert. Nach einer Expositionsdauer von 20 h wurden die Transwell-Einsätze mit den Lungenepithelzellen in eine 24-Well-Platte gestellt und mit 300 µl Guanidinthiozyanat-Lysepuffer aus dem Isolations-Kit, welchem zusätzlich 1% Dithiothreitol (DTT, Roche) zugesetzt wurde, lysiert und bei -80°C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt. Die Isolierung wurde mit 300 µl lysierter Probe durchgeführt. Es wurden 50 µl Eluat erhalten.

Die Synthese der cDNA erfolgte auf Eis. Die Transkription wurde entsprechend den Herstellervorschriften bei 42°C und 60 min Inkubationszeit durchgeführt. Das Umschreiben der mRNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA, *complementary DNA*) erfolgte mittels AMV Reverser Transkriptase (AMV-RT, Promega, Mannheim, Deutschland) sowie einem dNTP-Set und oligo-dT (5'-pd(T)₁₂₋₁₈-3') als Primer (beide Reagenzien von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Zunächst wurde ein cDNA-Mix hergestellt, der die in Tabelle 6 aufgeführten Bestandteile enthält.

Tabelle 6: Bestandteile des cDNA-Mix zur Synthese der cDNA.

Reagenz	Menge der Stammlösung	Konzentration der Stammlösung
5 x Puffer	4 µl	
dNTP's	2 µl	(2 mM)
oligo-dT	0,2 µl	(19,6 U/µl)
DEPC-Wasser	3,3 µl	
AMV-RT	0,5 µl	(10 U/µl)

In einem RNase-freien 1,5 ml Eppendorf Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 10 µl dieser Mischung vorgelegt und mit 10 µl mRNA-Probe versetzt. Die Proben wurden 1 h bei 42°C inkubiert. Die erhaltenen cDNA-Proben wurden 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei -20°C eingefroren.

2.8.2 Real Time Detection PCR

Die *Real Time Detection* Polymerasekettenreaktion (RTD-PCR, *polymerase chain reaction*) wurde am LightCycler® (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können DNA-Abschnitte amplifiziert und in Echtzeit quantifiziert werden. Die RTD-PCR wurde für β -Actin (*Housekeeping-Gen*) und MCP-1 nach den Herstellerangaben zum LightCycler® FastStart DNA Master Sybr®Green Kit I (Roche) durchgeführt.

Für die β -Actin- und MCP-1-PCR wurden die entsprechenden LightCycler®-Primer Sets für humanes β -Actin bzw. humanes MCP-1 (LCsearch, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Tabelle 7 gibt die eingesetzten Reagenzien mit den entsprechenden Pipettiermengen wieder.

Tabelle 7: Volumina für die Reagenzien zur Durchführung der β -Actin- und MCP-1-PCR.

β -Actin- und MCP-1-PCR	
DEPC-Wasser	6 μ l
LightCycler® Primer Set	2 μ l
LightCycler® FastStart DNA Master Sybr®Green I	2 μ l
cDNA-Probe	10 μ l

Zur Durchführung der PCR wurden 10 μ l Reagenzienmischung ohne cDNA-Probe in die LightCycler® Kapillaren pipettiert und 10 μ l cDNA-Probe hinzugegeben.

Jede PCR wurde mit einem 10-minütigen Denaturierungsschritt gestartet und mit 40 Zyklen durchgeführt. Die für die β -Actin- und MCP-1-PCR verwendeten Amplifikationsprotokolle sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Amplifikationsprotokolle für die Durchführung der β -Actin- und MCP-1-PCR.

PCR-Phase	β -Actin- und MCP-1-PCR
Denaturierungsphase	95°C, 10 s
Hybridisierungsphase	68°C, 10 s Annealingtemperatur sinkt um 0,5°C pro Zyklus bis zur End-Annealingtemperatur von 58°C
Synthesephase	72°C, 16 s

Nach der Amplifikation erfolgte eine schrittweise Denaturierung der DNA in einem Bereich von 58°C bis 95°C (Schmelzkurve). Mit der Kühlungsphase, in der

innerhalb von 30 s eine Abkühlung auf 40°C erreicht wird, endete die PCR. Die Quantifizierung der cDNA-Proben erfolgte über externe β -Actin- und MCP-1-Standards (im LightCycler®-Primer Set enthalten). Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anhand der Schmelzkurven kontrolliert. Die Ergebnisse der MCP-1-PCR wurden auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin korrigiert und als Prozent der MCP-1-Expression im Bezug auf die Kontrolle (mit Lösungsmittel exponierte Lungenepithelzellen) dargestellt ($\% \text{ Chemokinexpression} = 100\% \times \text{Anzahl der Kopien der VOC-exponierten Proben} / \text{Anzahl der Kopien der Kontrolle}$).

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Absicherung der Ergebnisse erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test bzw. Student's t-Test für unabhängige Stichproben. Der Mann-Whitney U-Test wurde für Experimente mit verschiedenen Blutspendern und der t-Test für Experimente mit der Lungenepithel-Zelllinie A549 verwendet. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms STATISTICA 5.5 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Eine statistische Sicherheit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen und mit einem Stern (*, signifikante Stimulation im Vergleich zur Kontrolle) bzw. mit einer Raute (#, signifikante Hemmung im Vergleich zur Kontrolle) gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf periphere mononukleäre Blutzellen im Zellkultur-röhrchen-Modell*

Die zu untersuchenden Einzelverbindungen n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan, Methylcyclopentan, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol wurden hinsichtlich zytotoxischer und immunmodulierender Effekte auf PBMC zunächst im Zellkultur-röhrchen-Modell untersucht. Da die Innenraumluft durch das gleichzeitige Auftreten vieler flüchtiger Verbindungen gekennzeichnet ist, sollten, um natürliche Expositionsbedingungen nachzuempfinden, auch verschiedene VOC-Mischungen (Alkanmischung, Aromatenmischung und Gesamtmischung) untersucht werden. Die Alkanmischung bestand aus den aliphatischen Verbindungen n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan und Methylcyclopentan. Die Aromatenmischung enthielt die Verbindungen Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol und die Gesamtmischung alle zu untersuchenden Chemikalien (C₉-C₁₃-Alkane, Methylcyclopentan, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol). Es sollte geprüft werden, ob Veränderungen im innenraum-relevanten Konzentrationsbereich auftreten. Dieser Bereich liegt für die untersuchten Verbindungen zwischen 1 µg/m³ und 25 mg/m³.

Die PBMC wurden mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3/CD28 stimuliert und mit VOC über einen Konzentrationsbereich von 0,001 µg/m³ bis 100 g/m³ exponiert. Nach einer Expositionsdauer von 20 h wurden die Zellvitalität mittels MTT-Test und Veränderungen der Zytokinfreisetzung mittels ELISA (IL-4, IL-13, IFN-γ und TNF-α) analysiert.

3.1.1 Einfluss von VOC auf die Zellvitalität von PBMC

Nach 20-stündiger Exposition von PBMC mit n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan und Methylcyclopentan konnten im MTT-Test keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden (Abbildung 6).

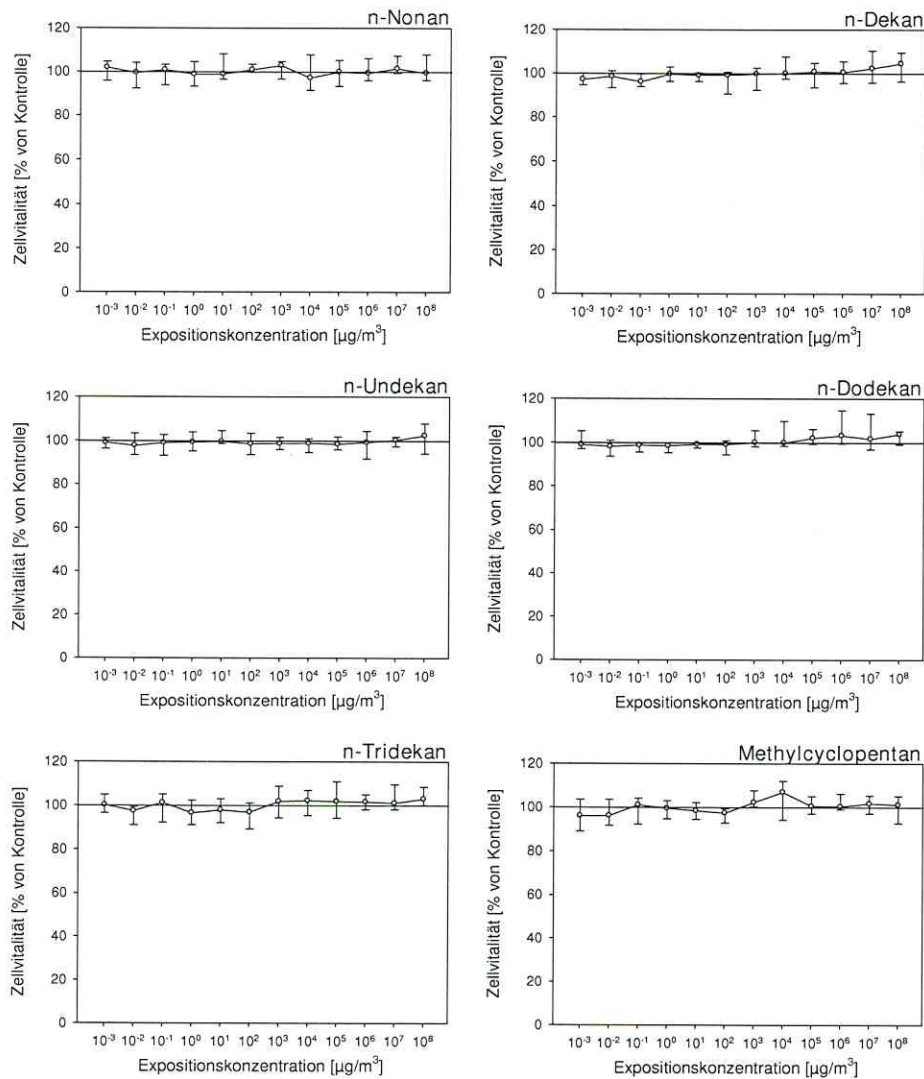


Abbildung 6: Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C_9 - C_{13} -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkultur-röhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von jeweils 6 untersuchten Spendern.

Auch die Exposition von PBMC mit den aromatischen Verbindungen Styrol, m-Xylol bzw. Chlorbenzol zeigte im MTT-Test keine zytotoxischen Effekte (Abbildung 7).

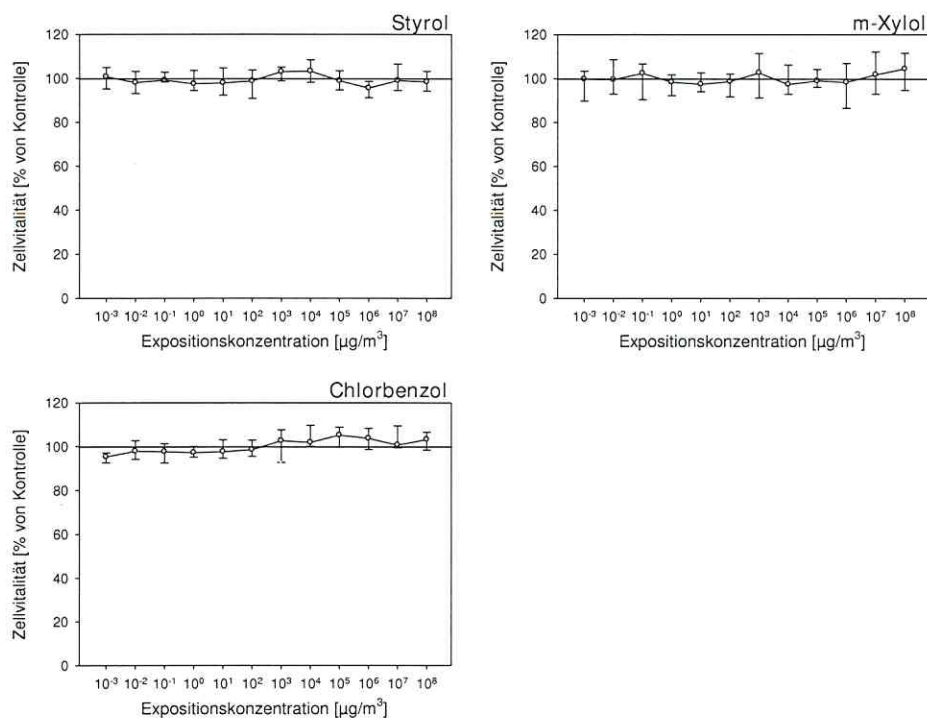


Abbildung 7: Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkultur-röhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von jeweils 6 untersuchten Spendern.

Fehlende Zytotoxizität wurde auch für alle untersuchten VOC-Mischungen (Alkanmischung, Aromatenmischung und Gesamtmischung) festgestellt (Abbildung 8).

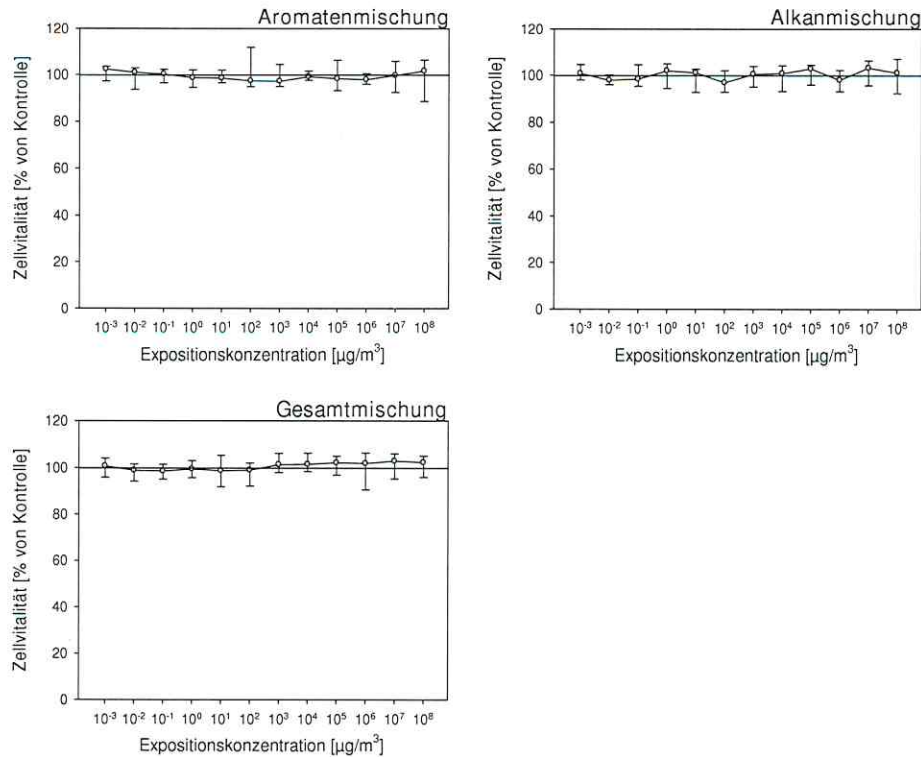


Abbildung 8: Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von jeweils 6 untersuchten Spendern.

Die Ergebnisse zeigten, dass im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keine der getesteten Verbindungen weder einzeln noch als Mischung die Zellviitalität von PBMC beeinflussen.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden neben dem MTT-Test Untersuchungen der Zellviitalität mittels Ethidiumbromid, alamarBlue™ und CFDA, AM durchgeführt.

Für diese Untersuchungen wurden CD3/CD28-stimulierte PBMC mit der Aromatenmischung exponiert und die Ethidiumbromid-, alamarBlue™- bzw. CFDA, AM-Fluoreszenz untersucht.

Abbildung 9 zeigt, dass es unter VOC-Exposition bei keiner der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu einer signifikanten Beeinflussung der Vitalität von PBMC kam.

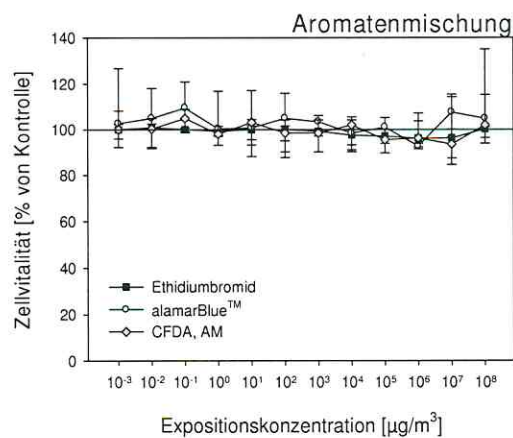


Abbildung 9: Einfluss der Aromatenmischung (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels Ethidiumbromid-, alamarBlue™- und CFDA, AM-Fluoreszenz. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse des MTT-Tests.

3.1.2 Einfluss von VOC auf die Zytokinfreisetzung von PBMC

Die zu untersuchenden VOC wurden in einem Konzentrationsbereich von $0,001 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \text{ g}/\text{m}^3$ getestet. Dafür mussten die Chemikalien in Lösungsmitteln verdünnt werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss der verwendeten Lösungsmittel Methanol, Methylcyclopentan und Methylenchlorid auf die Zytokinfreisetzung von PBMC untersucht, welche für 20 h mit dem Lösungsmittel exponiert wurden.

Tabelle 9: Einfluss der Lösungsmittel Methanol, Methylcyclopentan und Methylenchlorid auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkultur-röhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane (Minimum und Maximum) von 6 Spendern. Eine signifikante Stimulation ($p < 0,05$) der Zytokinfreisetzung ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Ansatz	Zytokin-Konzentration [pg/ml] Median (Minimum – Maximum)			
	IL-4	IL-13	IFN- γ	TNF- α
ohne Stimulation	1,4 (1,2-1,9)	2,1 (1,8-2,1)	3,6 (1,2-7,1)	21,6 (1,9-54,8)
CD3/CD28-Stimulation (je 100 ng/ml)	57,0* (15,3-93,3)	151,1* (76,9-308,4)	1965,1* (634,7-5403,2)	2322,0* (959,2-3598,9)
CD3/CD28-Stimulation und Methanol (13,2 g/m ³)	64,5 (19,3-84,9)	145,9 (98,9-281,3)	1916,3 (618,9-5393,1)	998,42# (546,7-2564,9)
CD3/CD28-Stimulation und Methylcyclopentan (12,3 g/m ³)	52,8 (42,6-86,1)	145,8 (105,4-230,8)	1936,9 (499,5-4113,8)	2194,3 (1246,1-3884,1)
CD3/CD28-Stimulation und Methylenchlorid (22,2 g/m ³)	58,3 (42,6-83,9)	136,8 (102,8-228,1)	2129,1 (514,5-5341,2)	2092,9 (1584,1-2320,1)

Tabelle 9 zeigt, dass die CD3/CD28-Stimulation zu einer starken Induktion der Zytokinfreisetzung von PBMC ($p=0,002$ für IL-4, IL-13, IFN- γ und TNF- α) führte. Methanol beeinflusste die IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Freisetzung nicht, führte aber im Vergleich zur CD3/CD28-Stimulation zu einer Verringerung der TNF- α -Freisetzung auf bis zu 43% ($p=0,018$). Methylcyclopentan und Methylenchlorid zeigten keine signifikante Beeinflussung der IL-4-, IL-13-, IFN- γ - und TNF- α -Freisetzung.

Die 20-stündige Exposition mit n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan und n-Dodekan führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Zytokinfreisetzung von PBMC (Abbildung 10). N-Undekan und n-Dodekan zeigten in der höchsten getesteten Expositionskonzentration tendenziell erhöhte TNF- α -Konzentrationen, ohne dass Signifikanzen erreicht wurden.

Die Exposition von PBMC mit n-Tridekan bzw. Methylcyclopentan zeigte auf Ebene der Zytokinfreisetzung in der höchsten Expositionskonzentration von 100 g/m³ immuntoxische Effekte. Die IFN- γ -Freisetzung der PBMC war unter dem Einfluss von n-Tridekan auf 80% ($p=0,002$) und unter Methylcyclopentan auf 88% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle (Exposition stimulierter PBMC mit dem

reinen Lösungsmittel) verringert (Abbildung 10). Die Freisetzung von IL-4, IL-13 und TNF- α wurde durch n-Tridekan und Methylcyclopentan nicht beeinflusst.

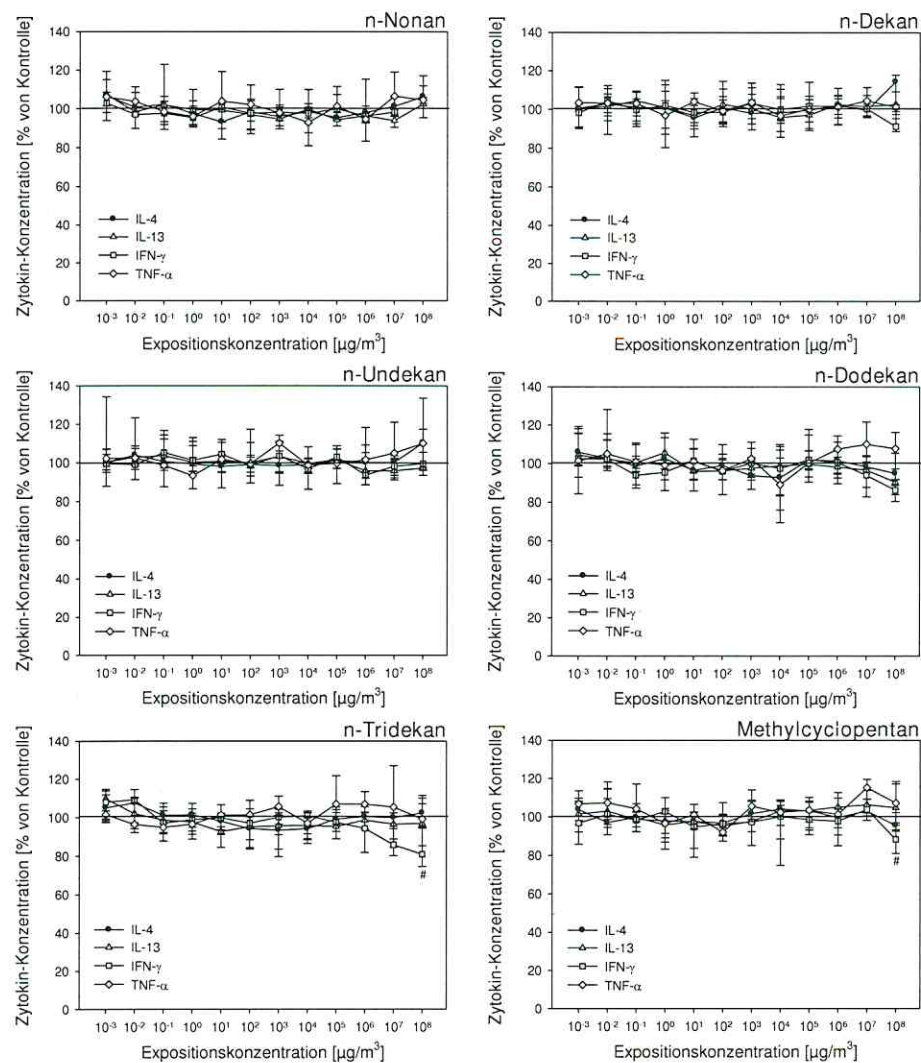


Abbildung 10: Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C_9 - C_{13} -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturrohrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Hemmung der Zytokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Nach Exposition von PBMC mit Chlorbenzol wurde in der höchsten Expositionskonzentration von 100 g/m³ eine Hemmung der IL-4-Freisetzung um 17% ($p=0,002$) beobachtet. Die Freisetzung von IL-13 und IFN- γ war tendenziell ebenfalls verringert, wobei hier jedoch keine signifikanten Effekte auftraten. Veränderungen der TNF- α -Freisetzung konnten unter Chlorbenzol-Exposition nicht gefunden werden (Abbildung 11).

Styrol und m-Xylol führten in Expositionskonzentrationen von 10 g/m³ bis 100 g/m³ zu einer tendenziell erhöhten TNF- α -Freisetzung. Die Effekte waren jedoch nicht signifikant. Auf die IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Freisetzung hatte die Styrol- bzw. m-Xylol-Exposition keinen Einfluss (Abbildung 11).

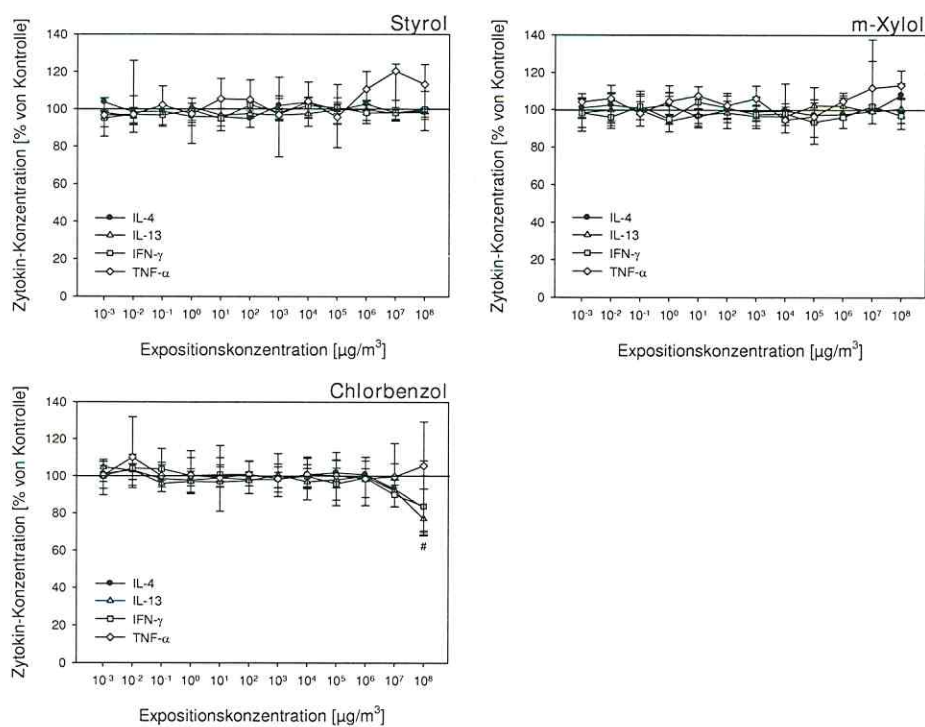


Abbildung 11: Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Hemmung der Zytokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die Exposition von PBMC mit der Aromatenmischung (Styrol, Chlorbenzol und m-Xylol) führte in einer Expositionskonzentration von 100 g/m^3 zu einer signifikanten Hemmung der IL-4- und IL-13-Freisetzung. Die Verminderung betrug für IL-4 25% ($p=0,002$) und für IL-13 34% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Sekretion von IFN- γ war ab einer Expositionskonzentration von 10 g/m^3 auf bis zu 50% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle verringert. Die TNF- α -Freisetzung wurde durch die Aromatenmischung nicht beeinflusst (Abbildung 12).

Unter dem Einfluss der Gesamtmischung wurde die IFN- γ -Freisetzung im Vergleich zur Aromatenmischung stärker gehemmt. Bereits ab einer Expositionskonzentration von 1 g/m^3 traten signifikante Hemmeffekte auf. Die IFN- γ -Freisetzung wurde in diesem Konzentrationsbereich auf bis zu 51% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle verringert. In der höchsten Konzentration (100 g/m^3) wurde zusätzlich auch eine Hemmung der IL-13-Freisetzung um 17% gefunden ($p=0,002$). IL-4 zeigte tendenziell die gleiche Hemmung wie IL-13, ohne dass hier signifikante Werte erreicht wurden (Abbildung 12).

Im Gegensatz zur Aromaten- und Gesamtmischung wurden unter dem Einfluss der Alkanmischung keine Veränderungen der Zytokinfreisetzung von PBMC gefunden (Abbildung 12).

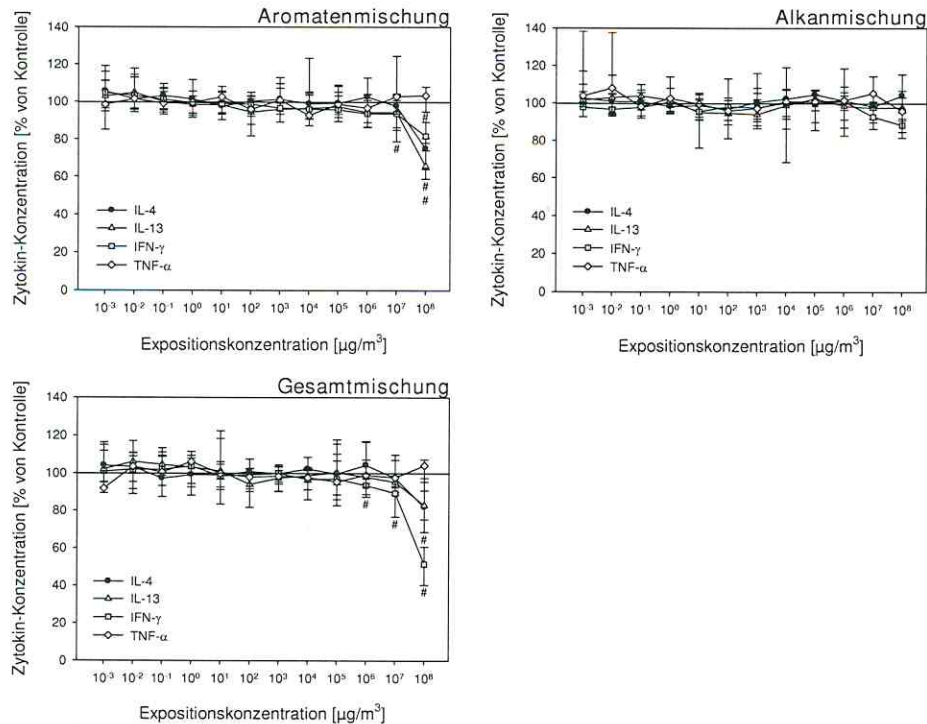


Abbildung 12: Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Hemmung der Zytokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die Exposition von PBMC mit innenraumrelevanten Konzentrationen aliphatischer und aromatischer Verbindungen führte zu keinen Veränderungen der Zytokinfreisetzung. In der höchsten Konzentration (100 g/m^3) konnten unter *n*-Tridekan-, Methylcyclopentan- und Chlorbenzol-Exposition schwache immuntoxische Effekte beobachtet werden.

Auch die Exposition mit verschiedenen VOC-Mischungen führte im innenraum-relevanten Konzentrationsbereich zu keiner Beeinflussung der Zytokinfreisetzung von PBMC. Lediglich in sehr hohen Konzentrationen von 1 g/m^3 bis 100 g/m^3 konnten unter Exposition mit der Aromaten- und Gesamtmischung leichte immuntoxische Effekte beobachtet werden.

3.2 Etablierung eines Modells zur Exposition von humanen Lungenepithelzellen mit flüchtigen organischen Verbindungen

Im menschlichen Organismus erfolgt die Exposition mit flüchtigen Verbindungen natürlicherweise über die Atemluft. Dabei sind Epithelzellen im Respirationstrakt die primär im Organismus exponierten Zellen. Um den Einfluss flüchtiger Verbindungen auf Lungenepithelzellen zu untersuchen, wurde ein neues VOC-Expositions-Modell entwickelt.

Für die Etablierung der VOC-Expositionsmodelle für Lungenepithelzellen in Zellkulturröhrchen bzw. Transwells war es notwendig, eine geeignete TNF- α -Konzentration zur Stimulation der humanen Lungenepithelzellen und die optimale Expositionszeit zu bestimmen. Diese Untersuchungen wurden hier am Beispiel des Transwell-Modells dargestellt.

Die Lungenepithelzellen wurden zunächst unstimuliert bzw. mit TNF- α -Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml stimuliert mit zwei verschiedenen Chlorbenzol-Konzentrationen (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) exponiert. Mit dieser Vorgehensweise sollten Unterschiede in der MCP-1-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (Exposition der Lungenepithelzellen mit dem Lösungsmittel) bewertet werden.

Abbildung 13 zeigt, dass es bei unstimulierten Lungenepithelzellen und bei einer TNF- α -Stimulation mit 0,1 ng/ml bzw. 1 ng/ml unter Chlorbenzol-Exposition zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle kam. Diese MCP-1-Induktion war bei Stimulation mit TNF- α in einer Konzentration von 1 ng/ml am stärksten ausgeprägt. Ab einer TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml konnte eine MCP-1-Induktion unter Chlorbenzol-Exposition nicht mehr festgestellt werden.

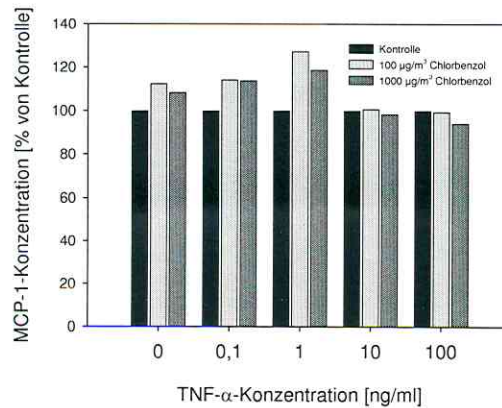


Abbildung 13: Einfluss unterschiedlicher TNF- α -Konzentrationen (unstimuliert bis 100 ng/ml) auf die MCP-1-Freisetzung humaner Lungenepithelzellen (A549) nach Exposition mit Chlorbenzol (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Beispiels.

Aufgrund dieses Vorversuches wurde eine TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml gewählt. Als Messparameter wurden die Chemokine MCP-1 und IL-8 sowie das Zytokin IL-6 gewählt. Tabelle 10 zeigt die entsprechenden Konzentrationen im Zellkulturüberstand humaner Lungenepithelzellen nach TNF- α -Stimulation (1 ng/ml) im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Tabelle 10: Einfluss der TNF- α -Stimulation auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen (A549). Dargestellt sind die Mittelwerte (Minimum und Maximum) aus 6 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der Zytokin-/Chemokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol * gekennzeichnet.

Ansatz	Zytokin-/Chemokinkonzentration [pg/ml] Mittelwert (Minimum – Maximum)		
	IL-6	IL-8	MCP-1
ohne Stimulation	nicht messbar	25,1 (12,8-39,2)	246,3 (208,4-288,8)
TNF- α (1 ng/ml)	18,8 (7,5-28,8)	1064,6* (618,8-1531,4)	3902,9* (2140,7-5616,6)

Die Daten zeigten, dass es durch TNF- α zu einer signifikanten Stimulation der IL-6-, IL-8- und MCP-1-Freisetzung ($p < 0,001$ für IL-8 und MCP-1) kommt. In unstimulierten Zellen konnte IL-6 mittels ELISA nicht gemessen werden, da die Messwerte unter der Nachweisgrenze lagen.

In einem weiteren Vorversuch wurde die Zeitabhängigkeit der VOC-Exposition humaner Lungenepithelzellen mit flüchtigen Verbindungen ermittelt. Dafür wurden TNF- α -stimulierte Lungenepithelzellen (1 ng/ml) mit Chlorbenzol in einem Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 100 g/m^3 exponiert. Nach 1 h, 8 h, 20 h und 30 h wurde die MCP-1-Freisetzung mittels ELISA gemessen.

Nach einstündiger Exposition humaner Lungenepithelzellen mit Chlorbenzol konnte in der höchsten Konzentration von 100 g/m^3 eine Hemmung der MCP-1-Freisetzung um 54% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. In einem Konzentrationsbereich von 10 mg/m^3 bis 1 g/m^3 trat eine MCP-1-Induktion von bis zu 36% (10 mg/m^3 : $p = 0,003$; 100 mg/m^3 : $p = 0,049$; 1 g/m^3 : $p = 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 14).

Auch eine Expositionsdauer von 8 h führte in der höchsten Expositionskonzentration (100 g/m^3) zu einer Hemmung der MCP-1-Freisetzung um 54% ($p < 0,001$) bezogen auf die Kontrolle. Eine MCP-1-Induktion von bis zu 22% im Vergleich zur Kontrolle trat in einem Konzentrationsbereich von 1 mg/m^3 bis 1 g/m^3 (1 mg/m^3 : $p = 0,01$; 10 mg/m^3 : $p = 0,03$; 100 mg/m^3 : $p = 0,04$; 1 g/m^3 : $p = 0,008$) auf (Abbildung 14).

Die Chlorbenzol-Exposition über einen Zeitraum von 20 h zeigte in der höchsten Expositionskonzentration (100 g/m^3) eine Hemmung der MCP-1-Freisetzung um 66% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. In einem breiten Konzentrationsbereich von 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 1 g/m^3 konnte eine Erhöhung der MCP-1-Freisetzung um bis zu 42% (10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$: $p = 0,004$; 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$: $p = 0,04$; 1 mg/m^3 : $p = 0,02$; 10 mg/m^3 : $p = 0,003$; 100 mg/m^3 : $p = 0,01$; 1 g/m^3 : $p = 0,02$) bezogen auf die Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 14).

Die 30-stündige Chlorbenzol-Exposition führte in der höchsten Konzentration von 100 g/m^3 zu einer Verminderung der MCP-1-Freisetzung auf 49% ($p = 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Eine MCP-1-Induktion trat hier in einem Konzentrationsbereich von 10 mg/m^3 bis 1 g/m^3 auf und betrug bis zu 18% (10 mg/m^3 : $p = 0,03$; 100 mg/m^3 : $p = 0,02$; 1 g/m^3 : $p = 0,008$) bezogen auf die Kontrolle (Abbildung 14).

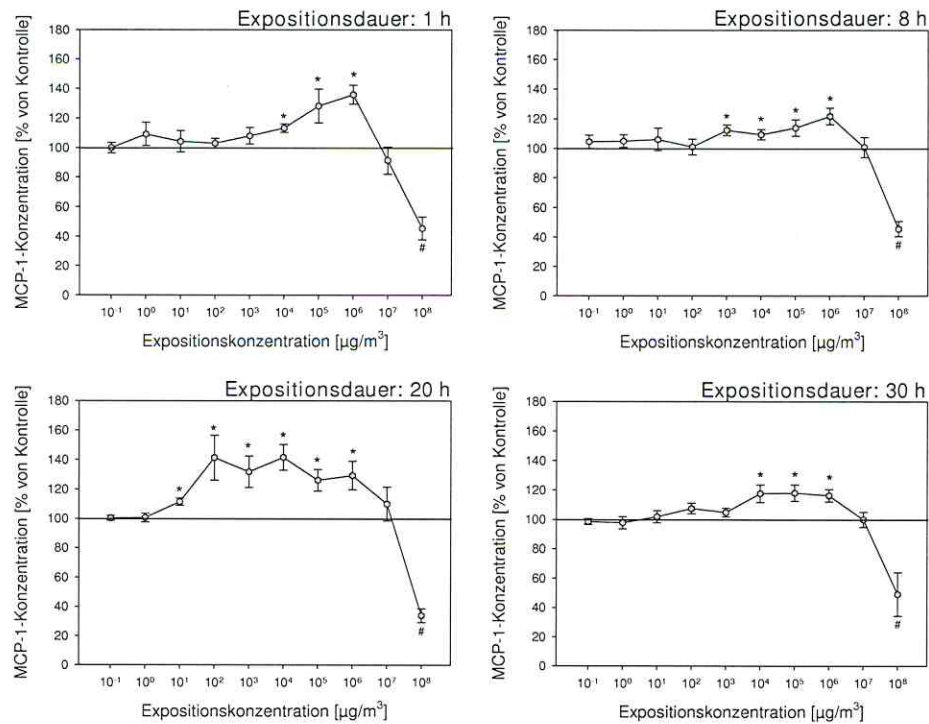


Abbildung 14: Einfluss der Expositionsdauer (1 h, 8 h, 20 h und 30 h) auf die MCP-1-Freisetzung Chlorbenzol-exponierter und TNF- α -stimulierter Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 4 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der MCP-1-Freisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Diese Kinetik-Untersuchungen zeigten, dass die 20-stündige Chlorbenzol-Exposition die stärkste MCP-1-Induktion (bis zu 41% im Vergleich zur Kontrolle) bewirkt. Diese trat zu diesem Zeitpunkt auch über den größten Konzentrationsbereich ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $1 \text{ g}/\text{m}^3$) auf. Aus diesem Grund wurden die VOC-Expositionsexperimente mit humanen Lungenepithelzellen über einen Zeitraum von 20 h durchgeführt.

3.3 *Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf humane Lungenepithelzellen im Zellkulturröhrchen-Modell*

TNF- α stimulierte Lungenepithelzellen wurden mit den C₉-C₁₃-Alkanen, Methylcyclopentan, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol sowie mit den verschiedenen VOC-Mischungen (Aromatenmischung, Alkanmischung, Gesamtmischung) im Zellkulturröhrchen-Modell in einem Konzentrationsbereich von 0,001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 100 g/m^3 exponiert. Nach einer Expositionszeit von 20 h wurden die Zellvitalität mittels MTT-Test und Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung mittels ELISA (IL-6, IL-8 und MCP-1) analysiert.

3.3.1 Einfluss von VOC auf die Zellvitalität humaner Lungenepithelzellen

Nach 20-stündiger Exposition von Lungenepithelzellen mit den flüchtigen aliphatischen Verbindungen n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan und Methylcyclopentan kam es im MTT-Test zu keinen Veränderungen der Zellvitalität (Abbildung 15).

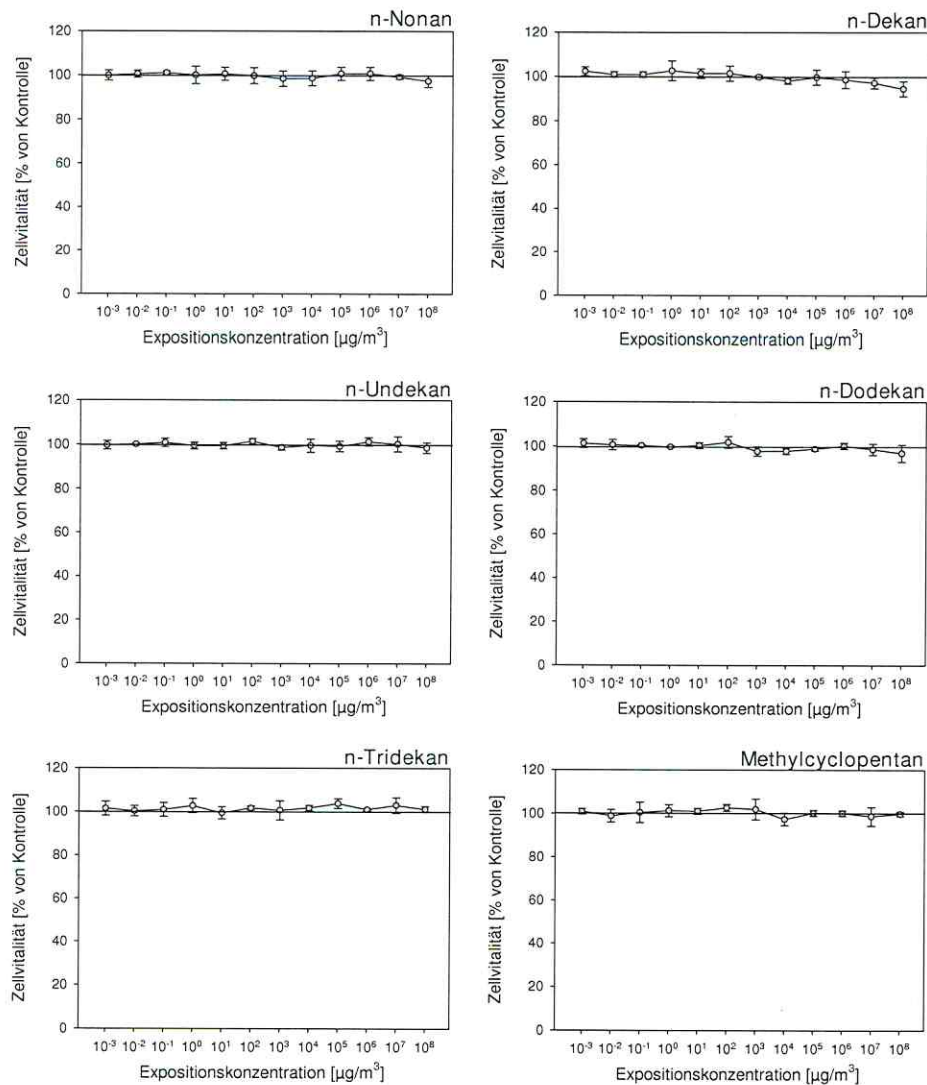


Abbildung 15: Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 Versuchsansätzen.

Fehlende Zytotoxizität wurde auch für die aromatischen Verbindungen Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol festgestellt (Abbildung 16).

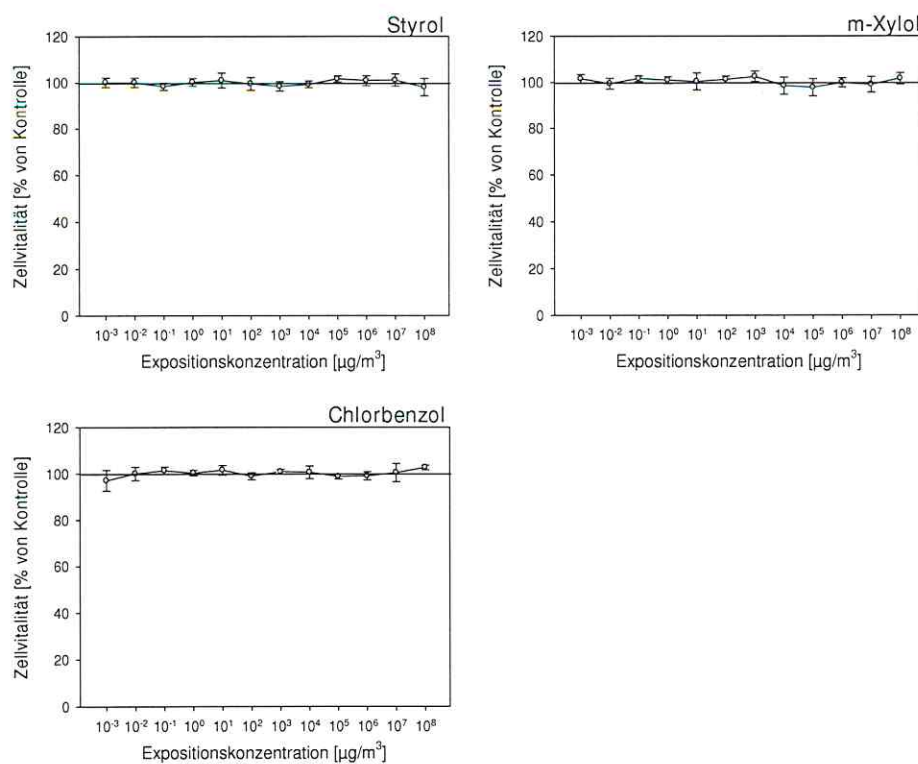


Abbildung 16: Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 Versuchsansätzen.

Auch die Exposition humaner Lungenepithelzellen mit verschiedenen VOC-Mischungen (Alkanmischung, Aromatenmischung und Gesamtmischung) führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellvitalität (Abbildung 17).

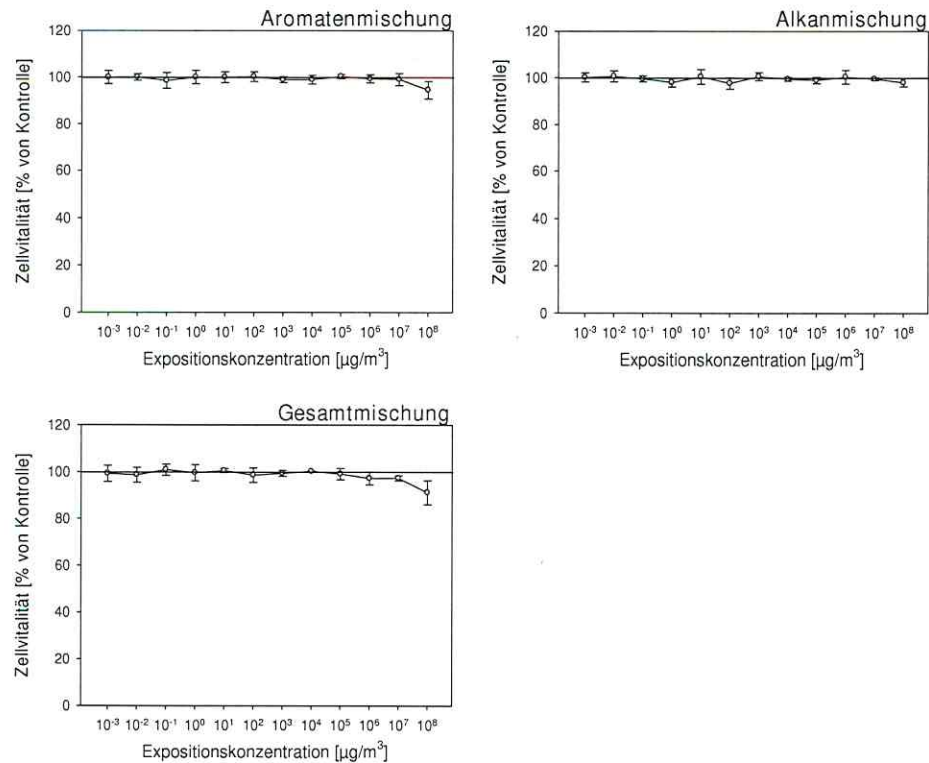


Abbildung 17: Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkultur-röhrchen-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 Versuchsansätzen.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich durch keine der aliphatischen oder aromatischen Verbindungen zu zytotoxischen Effekten auf Lungenepithelzellen (A549) kommt. Auch die VOC-Mischungen führten zu keiner signifikanten Beeinflussung der Zellviitalität.

3.3.2 Einfluss von VOC auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen

Es wurde zunächst der Einfluss der verwendeten Lösungsmittel Methanol, Methylcyclopentan und Methylenchlorid untersucht. Dafür wurden TNF- α -stimulierte Lungenepithelzellen mit dem Lösungsmittel für 20 h exponiert. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Einfluss der Lösungsmittel Methanol, Methylcyclopentan und Methylenchlorid auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell. Dargestellt sind die Mittelwerte (Minimum und Maximum) von 6 Versuchsansätzen.

Ansatz	Zytokin-/Chemokinkonzentration [pg/ml] Mittelwert (Minimum – Maximum)		
	IL-6	IL-8	MCP-1
TNF- α -Stimulation (1 ng/ml)	18,8 (7,5-28,8)	1064,6 (618,8-1531,4)	3902,9 (2140,7-5616,6)
TNF- α -Stimulation und Methanol (13,2 g/m ³)	17,5 (7,1-28,6)	799,1 (499,7-1128,4)	3703,9 (2108,5-4633,3)
TNF- α -Stimulation und Methylcyclopentan (12,3 g/m ³)	17,1 (10,3-26,0)	1062,7 (746,9-1389,1)	3599,6 (2366,3-5589,4)
TNF- α -Stimulation und Methylenchlorid (22,2 g/m ³)	19,5 (9,5-27,0)	1133,4 (800,9-1587,2)	3464,8 (2532,6-4454,6)

Die Tabelle zeigt, dass es unter Methanol-, Methylcyclopentan- und Methylenchlorid-Exposition zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-6-, IL-8- und MCP-1-Freisetzung kam.

Die Exposition der Lungenepithelzellen mit den flüchtigen aliphatischen Verbindungen n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan und Methylcyclopentan führte zu keiner signifikanten Veränderung der IL-6-, IL-8- und MCP-1-Freisetzung (Abbildung 18).

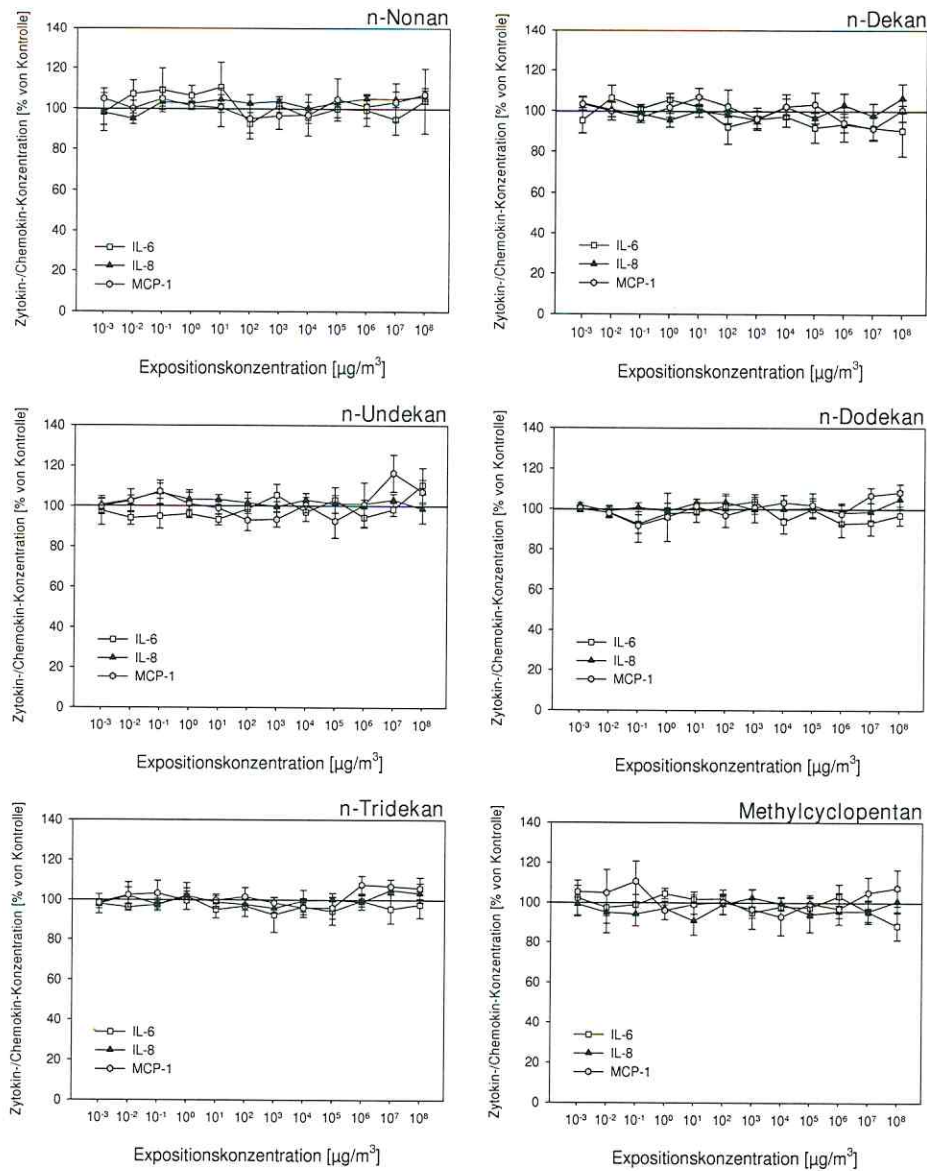


Abbildung 18: Einfluss flüchtiger aliphatischer Verbindungen (C_9 - C_{13} -Alkane und Methylcyclopentan) auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungeneithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 4 Versuchsansätzen.

Nach Exposition humaner Lungenepithelzellen mit der aromatischen Verbindung Styrol konnte ab einer Expositionskonzentration von 10 g/m^3 eine signifikante Hemmung der IL-6-Freisetzung um bis zu 25% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (Exposition von TNF- α -stimulierten Lungenepithelzellen mit dem Lösungsmittel) beobachtet werden. Weiterhin führte eine Expositionskonzentration von 100 g/m^3 zu einer Verminderung der MCP-1-Freisetzung auf 47% ($p = 0,001$) und zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung um 18% ($p < 0,001$) bezogen auf die Kontrolle. In einem Konzentrationsbereich von 1 mg/m^3 bis 1 g/m^3 Styrol kam es zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 36% (1 mg/m^3 und 10 mg/m^3 : $p < 0,001$; 100 mg/m^3 : $p = 0,02$; 1 g/m^3 : $p = 0,007$) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19).

Die m-Xylol-Exposition humaner Lungenepithelzellen führte in einer Konzentration von 100 g/m^3 zu einer Hemmung der IL-6-Freisetzung um 11% ($p = 0,008$) und der MCP-1-Freisetzung um 44% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Die gleiche Expositionskonzentration führte zu einer IL-8-Induktion um 28% ($p = 0,025$) bezogen auf die Kontrolle. In einem Konzentrationsbereich von 1 mg/m^3 bis 10 g/m^3 kam es zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung von bis zu 24% (1 mg/m^3 : $p = 0,04$; 10 mg/m^3 : $p = 0,01$; 100 mg/m^3 : $p = 0,004$; 1 g/m^3 : $p = 0,002$; 10 g/m^3 : $p = 0,003$) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19).

Chlorbenzol führte ab einer Konzentration von 10 g/m^3 zu einer Verminderung der IL-6-Freisetzung humaner Lungenepithelzellen auf 51% ($p = 0,001$) bezogen auf die Kontrolle. Eine Expositionskonzentration von 100 g/m^3 führte weiterhin zu einer verminderten MCP-1-Freisetzung, die dann noch 62% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle betrug. In einem Konzentrationsbereich von 1 g/m^3 bis 10 g/m^3 konnte eine Induktion der IL-8-Freisetzung um bis zu 38% (1 g/m^3 : $p = 0,005$; 10 g/m^3 : $p = 0,002$) bezogen auf die Kontrolle beobachtet werden. Niedrigere Chlorbenzol-Konzentrationen ($10 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ bis $100 \text{ }\mu\text{g/m}^3$) bewirkten eine Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 31% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19).

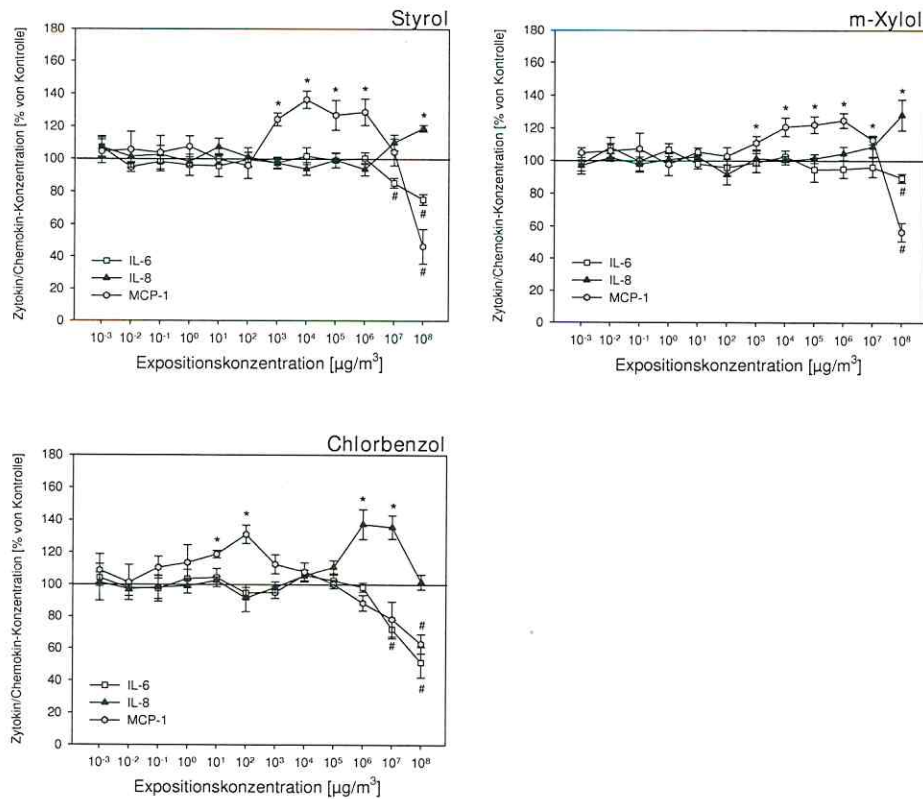


Abbildung 19: Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungeneithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 4 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der Zytokin-/Chemokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Untersuchungen zum Einfluss der Aromatenmischung auf Lungeneithelzellen zeigten, dass es ab einer Expositions-konzentration von $10 \text{ g}/\text{m}^3$ zu einer signifikanten Hemmung der IL-6- und MCP-1-Freisetzung um bis zu 35% (IL-6, $10 \text{ g}/\text{m}^3$: $p=0,03$; $100 \text{ g}/\text{m}^3$: $p < 0,001$) bzw. 64% (MCP-1, $10 \text{ g}/\text{m}^3$: $p=0,006$; $100 \text{ g}/\text{m}^3$: $p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle kam. Weiterhin konnte ab einer Expositions-konzentration von $1 \text{ g}/\text{m}^3$ eine Induktion der IL-8-Freisetzung auf bis zu 12% ($1 \text{ g}/\text{m}^3$: $p=0,01$; $10 \text{ g}/\text{m}^3$: $p=0,03$; $100 \text{ g}/\text{m}^3$: $p=0,002$) bezogen auf die Kontrolle beobachtet werden. In einem Konzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ kam es zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 34%

(0,1 µg/m³: p=0,008; 1 µg/m³: p<0,001; 10 µg/m³: p=0,01; 100 µg/m³: p=0,04; 1 mg/m³: p=0,04; 10 mg/m³: p=0,002) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20).

Unter dem Einfluss der Gesamtmischung wurde wie auch bei der Aromatenmischung ab einer Expositionskonzentration von 10 g/m³ eine signifikante Verminderung der IL-6-Freisetzung auf bis zu 59% (p<0,001) und der MCP-1-Freisetzung auf bis zu 64% (10 g/m³: p<0,001; 100 g/m³: p=0,004) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die IL-8-Freisetzung war im Vergleich zur Kontrolle in der höchsten Konzentration (100 g/m³) um 14% (p=0,04) erhöht. In einem Konzentrationsbereich von 0,1 µg/m³ bis 100 µg/m³ konnte eine Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 34% (0,1 µg/m³: p=0,02; 1 µg/m³: p=0,002; 10 µg/m³: p=0,004; 100 µg/m³: p=0,005) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 20).

Die Alkanmischung führte im Gegensatz zur Aromaten- und Gesamtmischung bei humanen Lungenepithelzellen zu keinen signifikanten Veränderungen der MCP-1-, IL-6- und IL-8-Freisetzung (Abbildung 20).

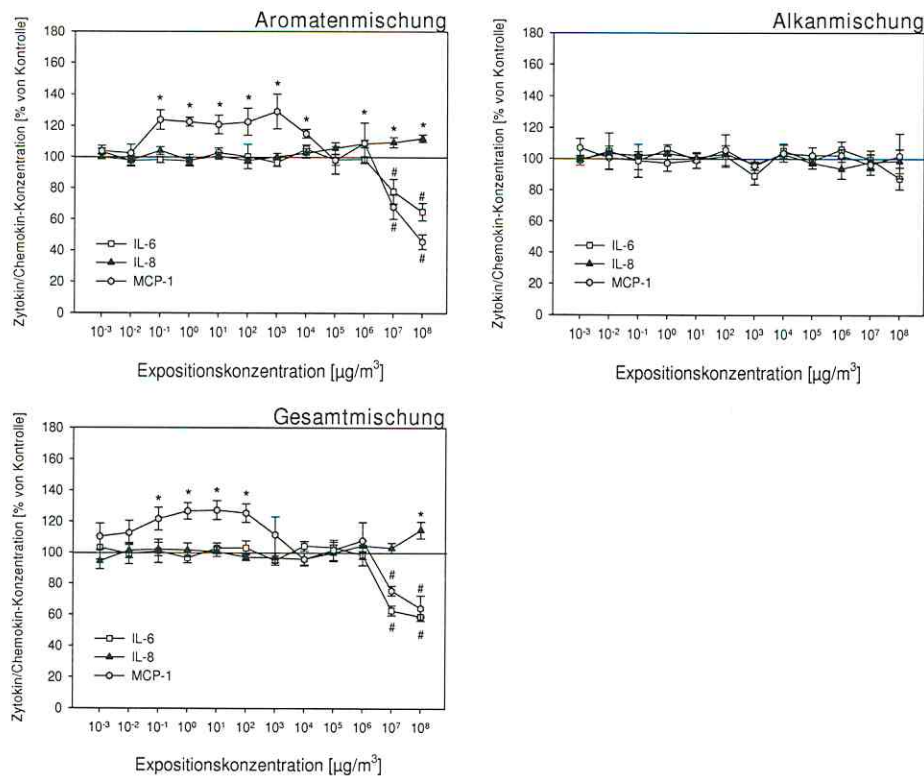


Abbildung 20: Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamt Mischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Zellkulturröhrchen-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 4 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der Zytokin-/Chemokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die erhobenen Daten zeigten, dass es durch Exposition der Lungenepithelzellen (A549) mit flüchtigen aliphatischen Verbindungen zu keinen Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung kommt.

Unter Chlorbenzol-Exposition humaner Lungenepithelzellen kam es im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich (10 µg/m³ bis 100 µg/m³) zu einer Erhöhung der MCP-1-Konzentration. Auch konnte nach Exposition mit Styrol und m-Xylol eine MCP-1-Induktion beobachtet werden, die an der Grenze des innenraumrelevanten Bereiches lag (1 mg/m³ bis 1 g/m³ für Styrol bzw. 1 mg/m³ bis 10 g/m³ für m-Xylol). Die Intensität der MCP-1-Induktion war unter Styrol-

Exposition am größten (36%) und unter m-Xylol-Exposition am geringsten (24%) ausgeprägt. Höhere Konzentrationen der flüchtigen Verbindungen (1 g/m^3 bis 100 g/m^3) führten zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung und zu einer Hemmung der MCP-1- und IL-6-Freisetzung.

Die Aromaten- und Gesamtmischung führten in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen ($0,1 \text{ µg/m}^3$ bis 100 µg/m^3 für die Gesamtmischung bzw. $0,1 \text{ µg/m}^3$ bis 10 mg/m^3 für die Aromatenmischung) zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung. Dabei war der Konzentrationsbereich dieser MCP-1-Induktion bei der Aromatenmischung im Vergleich zur Gesamtmischung größer. Die Intensität der MCP-1-Erhöhung war bei beiden Mischungen gleich. Hohe Expositionskonzentrationen von 1 g/m^3 bis 100 g/m^3 führten bei beiden VOC-Mischungen zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung und hemmenden Effekten auf die IL-6- und MCP-1-Freisetzung.

3.4 Untersuchung von Sekundäreffekten VOC-exponierter Lungenepithelzellen auf PBMC

Ziel dieser Experimente war es, zu untersuchen, ob von Lungenepithelzellen unter VOC-Exposition produzierte Mediatoren Sekundäreffekte auf PBMC auslösen. Da die untersuchten VOC in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen bei PBMC zu keinen Veränderungen der Zytokinfreisetzung führten, sollte nun untersucht werden, ob es durch Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen zu Sekundäreffekten auf PBMC kommt.

Die konditionierten Medien der VOC-exponierten Lungenepithelzellen wurden mit CD3/CD28-stimulierten PBMC für 24 h bzw. 72 h inkubiert. Anschließend wurden Veränderungen der Zytokinfreisetzung mittels ELISA (IL-13, IFN- γ und IL-4) analysiert.

Als Modell-VOC wurde Chlorbenzol gewählt, da es bei Lungenepithelzellen in innenraumrelevanten Konzentrationen zur stärksten MCP-1-Induktion führte. Verglichen wurden die Ergebnisse dieser Experimente mit der Alkanmischung, die nach Exposition mit Lungenepithelzellen keine Induktion der MCP-1-Freisetzung zeigte. Der untersuchte Konzentrationsbereich reichte von $0,001 \text{ µg/m}^3$ bis 10 mg/m^3 .

Die 24-stündige Inkubation der PBMC mit dem konditionierten Medium Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen führte zu keinen Veränderungen der IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Freisetzung (Abbildung 21 A). Nach 72 h konnte in einem Konzentrationsbereich von $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ eine Induktion der IL-13-Freisetzung um bis zu 38% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle (Inkubation von stimulierten PBMC mit Zellkulturüberständen Lösungsmittel-exponierter Lungenepithelzellen) beobachtet werden (Abbildung 21 B). Veränderungen der IFN- γ -Freisetzung traten nicht auf. Eine Messung der IL-4-Konzentration war aufgrund der Kinetik der IL-4-Stimulation (maximale IL-4-Produktion nach 24 h, dann rascher Abfall der IL-4-Konzentration) nach 72 h nicht mehr möglich.

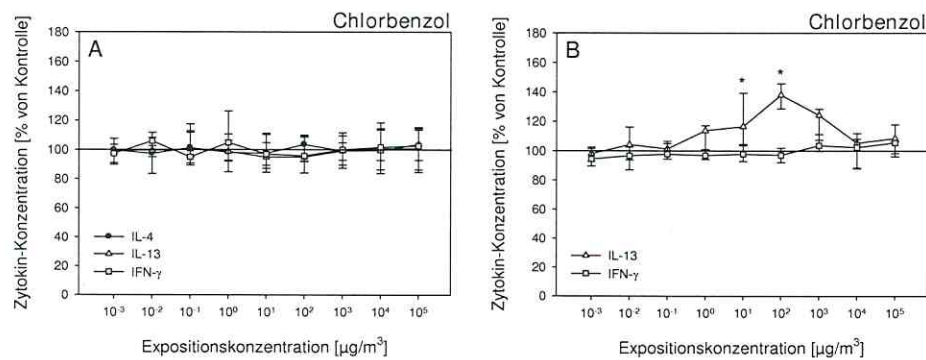
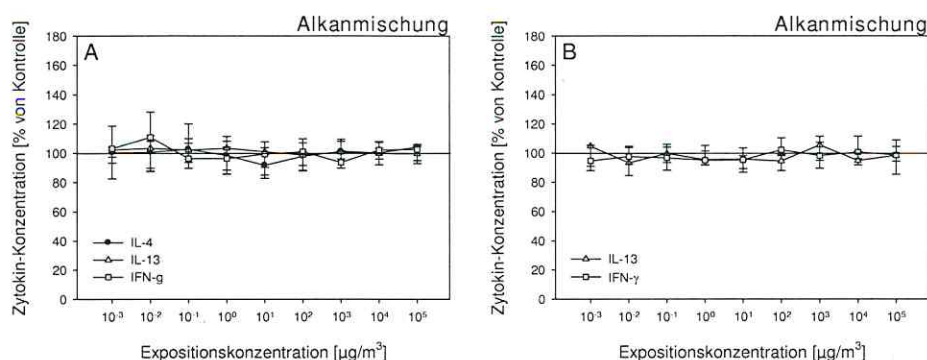


Abbildung 21: Einfluss der Zellkulturüberstände Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Zellkulturröhrchen-Modell), auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Stimulation der Zytokinfreisetzung ($p<0,05$) ist mit dem Symbol * gekennzeichnet.

Die Zellkulturüberstände von Lungenepithelzellen, die mit der Alkanmischung exponiert wurden, führten bei PBMC nach 24 h und nach 72 h zu keinen Veränderungen der IL-13-, IL-4- und IFN- γ -Freisetzung (Abbildung 22 A und B).



Abbildungung 22: Einfluss der Zellkulturüberstände von mit der Alkanmischung (C_9 - C_{13} -Alkane und Methylcyclopentan) exponierten Lungenepithelzellen (aus dem Zellkulturröhrchen-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es durch Inkubation von PBMC mit dem konditionierten Medium Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) zu einer Stimulation der IL-13-Freisetzung bei PBMC kam. Obwohl eine Chlorbenzol-Exposition von PBMC zu keinen Veränderungen der Zytokinfreisetzung führte, konnte durch die Zellkulturüberstände Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen eine erhöhte IL-13-Freisetzung bei PBMC induziert werden.

3.5 Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf PBMC im Transwell-Modell

In einem weiteren Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob durch Reduktion der Mediumsschicht, die eine Barriere zwischen VOC und Zielzellen darstellt, eine Verstärkung des Einflusses flüchtiger Verbindungen auf PBMC und Lungenepithelzellen erreicht werden kann. Dazu erfolgte die Exposition mit flüchtigen Verbindungen im Transwell-Modell.

Die PBMC befanden sich dabei auf der Membran der Transwell-Einsätze. Während der Exposition mit VOC wurden die Zellen nur von der Unterseite durch die Membran mit Medium versorgt. Auf der Oberseite der Membran lagen die Zellen

weitestgehend ohne Medium vor und konnten demnach von flüchtigen Verbindungen besser erreicht werden.

Stimulation, Expositionskonzentrationen und -dauer erfolgten analog dem zuvor beschriebenen Zellkulturröhrchen-Modell. Neben den im Zellkulturröhrchen-Modell untersuchten Zytokinen IL-13, IFN- γ und TNF- α wurde aufgrund der Ergebnisse der VOC-Exposition von Lungenepithelzellen (MCP-1-Induktion in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen) zusätzlich die Freisetzung des Chemokins MCP-1 untersucht. Zytokin-/Chemokinmessungen wurden nach 20 h und 72 h durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten vergleichbare Ergebnisse wie im Zellkulturröhrchen-Modell, die hier am Beispiel von Chlorbenzol dargestellt werden.

Die Vitalitätsmessung zeigte, dass die Exposition von PBMC mit Chlorbenzol zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellvitalität führte (Abbildung 23).

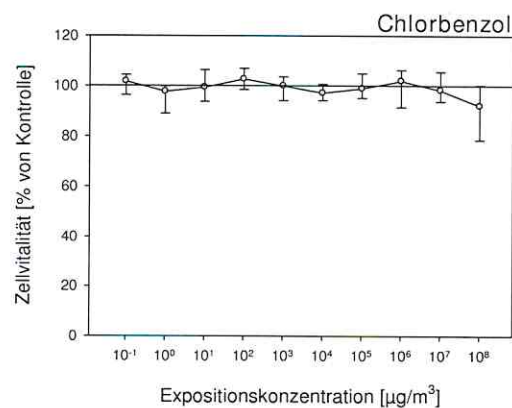


Abbildung 23: Einfluss von Chlorbenzol auf die Vitalität CD3/CD28-stimulierter PBMC im Transwell-Modell, untersucht mittels MTT-Test. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern.

Für die Zytokin-/Chemokinuntersuchungen wurde zunächst der Einfluss des Lösungsmittels Methanol auf PBMC im Transwell-Modell untersucht.

Tabelle 12: Einfluss der Methanol-Exposition auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane (Minimum und Maximum) von 6 Spendern. Eine signifikante Hemmung der Zytokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Ansatz	Zytokin-/Chemokinkonzentration [pg/ml]			
	Median (Minimum - Maximum)			
	MCP-1	IL-13	IFN- γ	TNF- α
CD3/CD28-Stimulation	4508,3 (3431,4-5429,4)	103,5 (40,6-196,4)	1466,8 (779,4-2724,3)	2927,5 (1912,5-4901,5)
CD3/CD28-Stimulation und Methanol (13,2 g/m ³)	4269,6 (3238,9-5470,8)	93,9 (23,5-116,8)	1483,5 (846,5-2806,1)	959,7# (504,8-1714,4)

Wie Tabelle 12 zeigt, führte Methanol bei PBMC zu keinen signifikanten Veränderungen der MCP-1-, IL-13- und IFN- γ -Freisetzung. Im Gegensatz dazu war die TNF- α -Freisetzung auf 33% ($p=0,03$) im Vergleich zu den Werten der CD3/CD28-Stimulation vermindert.

Die Chlorbenzol-Exposition von PBMC führte auch im Transwell-Experiment in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen weder nach 20-stündiger Exposition, noch nach 72 h zu signifikanten Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung (Abbildung 24 A und B). Sehr hohe Expositionskonzentrationen von 100 g/m³ führten wiederum zu immuntoxischen Effekten auf die IL-13-, IFN- γ - und TNF- α -Freisetzung. Dabei konnte nach 20-stündiger Exposition eine Hemmung der IL-13-Freisetzung um 67% ($p=0,002$), der IFN- γ -Freisetzung um 59% ($p=0,02$) und der TNF- α -Freisetzung um 52% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 24 A). Nach 72 h verstärkten sich die inhibitorischen Effekte auf die Zytokinfreisetzung. Die IL-13-Freisetzung betrug dann noch 24% ($p=0,002$), die IFN- γ -Freisetzung noch 6% ($p=0,02$) und die TNF- α -Freisetzung noch 32% ($p=0,002$) bezogen auf die Kontrolle (Abbildung 24 B). Die MCP-1-Freisetzung war nach 20 h bzw. 72 h in der höchsten Expositionskonzentration ebenfalls vermindert, jedoch waren die Effekte nicht signifikant.

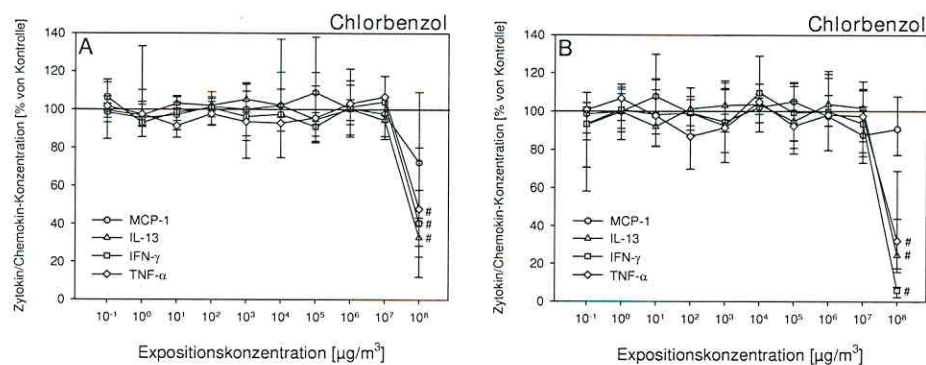


Abbildung 24: Einfluss von Chlorbenzol auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 20 h (A) bzw. 72 h (B) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Hemmung der Zytokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Mediumsschicht bei der Chlorbenzol-Exposition von PBMC im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung hat. In der höchsten Konzentration (100 g/m^3) wurden im Vergleich zu den Ergebnissen im Zellkulturröhrchen-Modell stärkere immuntoxische Effekte beobachtet, die mit zunehmender Inkubationszeit stärker wurden.

3.6 Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf humane Lungenepithelzellen im Transwell-Modell

Diese Untersuchungen waren Teil der Etablierung eines Modells, welches eine gleichzeitige VOC-Exposition von Lungenepithelzellen und PBMC erlauben sollte. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Lungenepithelzellen empfindlicher reagieren, wenn sich keine Mediumsschicht auf den Zellen befindet und die flüchtigen Verbindungen somit besser auf die Zellen wirken können.

Der untersuchte Konzentrationsbereich lag bei den Einzelverbindungen zwischen $0,1 \text{ µg/m}^3$ und 100 g/m^3 und bei den VOC-Mischungen zwischen $0,001 \text{ µg/m}^3$ und 100 g/m^3 . Aufgrund der Ergebnisse der Expositionsexperimente mit aliphatischen Verbindungen im Zellkulturröhrchen-Modell (keine Beeinflussung der Zytokin-/Chemokinfreisetzung) wurde die Alkanmischung anstelle der einzelnen

aliphatischen Verbindungen untersucht. Da die IL-6-Freisetzung im Zellkultur-röhrchen-Modell durch innenraumrelevante VOC-Konzentrationen nicht beeinflusst wurde und aufgrund geringer Mengen an Kulturüberständen wurden die Untersuchungen auf die Chemokine IL-8 und MCP-1 beschränkt.

Stimulation und Exposition der Lungenepithelzellen erfolgten analog zur VOC-Exposition im Zellkultur-röhrchen-Modell. Zytotoxische Effekte wurden mittels MTT-Test und Veränderungen der Zytokinfreisetzung mittels ELISA untersucht.

3.6.1 Einfluss von VOC auf die Zellvitalität humaner Lungenepithelzellen

Die aromatischen Verbindungen Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol zeigten auf Lungenepithelzellen keine Veränderungen der Zellvitalität (Abbildung 25).

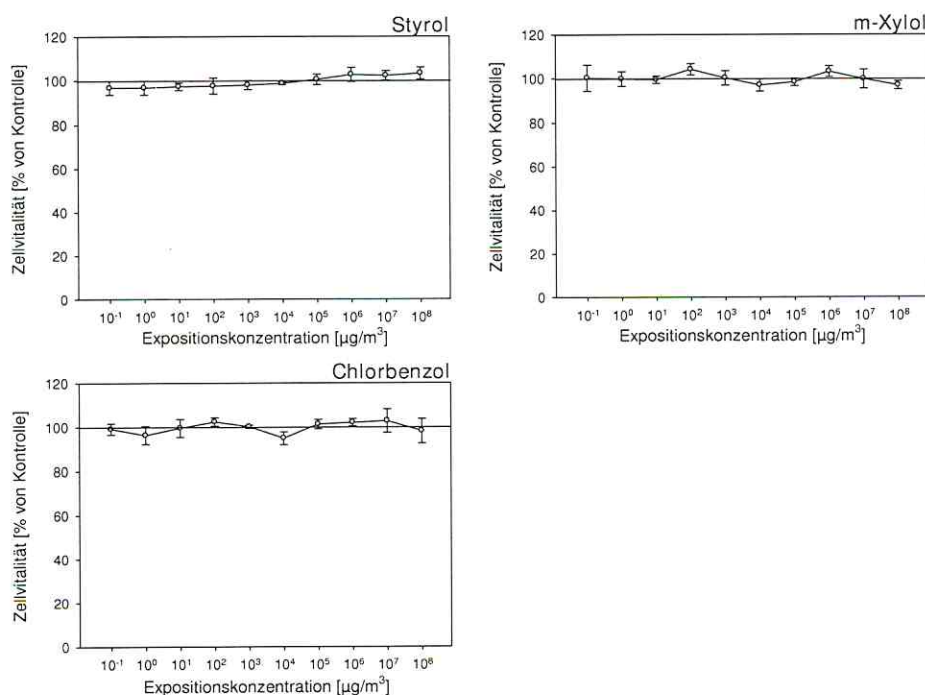


Abbildung 25: Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol, Chlorbenzol) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen im MTT-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 4 Versuchsansätzen.

Auch führte die Exposition humaner Lungenepithelzellen mit der Aromaten- bzw. Alkanmischung zu keinen Veränderungen der Zellvitalität (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu konnte nach Exposition der Lungenepithelzellen mit der Gesamtmischung in einer Konzentration von 100 g/m³ eine Verminderung der Zellvitalität auf 79% ($p=0,001$) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 26).

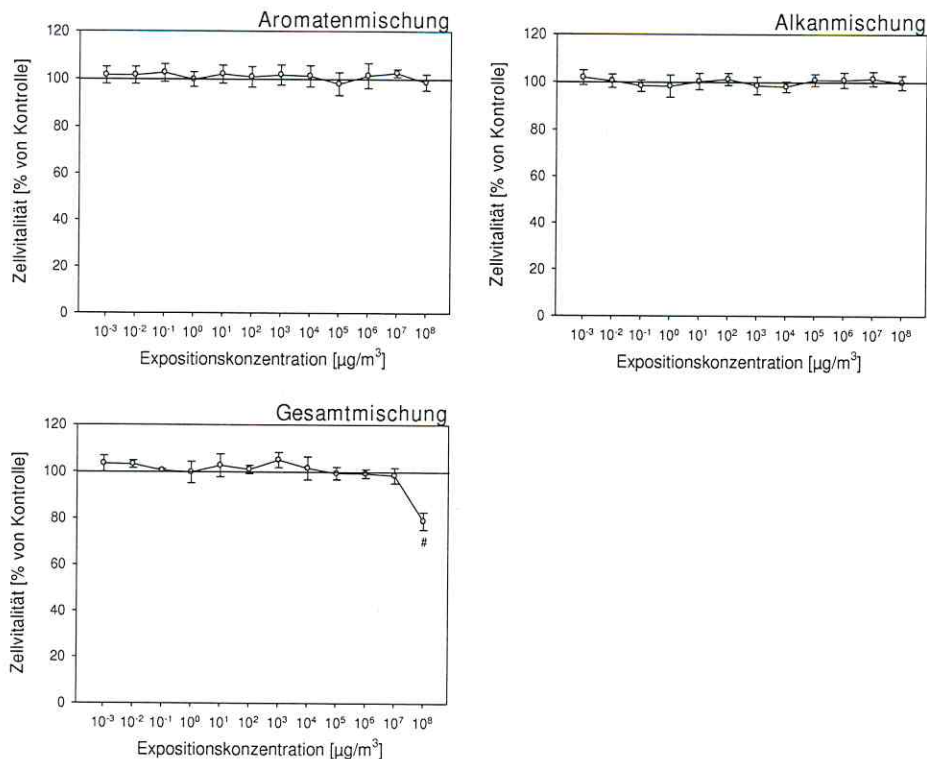


Abbildung 26: Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamtmischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen im MTT-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 4 Versuchsansätzen. Eine signifikante Hemmung ($p<0,05$) wurde mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Mit den Vitalitätstests mittels alamarBlue™ und CFDA, AM sollten die zytotoxischen Effekte der Gesamtmischung auf die Lungenepithelzellen bestätigt werden. Dafür wurden Lungenepithelzellen mit der Gesamtmischung in einem

Konzentrationsbereich von 1 g/m³ bis 100 g/m³ exponiert und auf Veränderungen der Zellvitalität untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass es in der höchsten Expositionskonzentration von 100 g/m³ zu einer Verminderung der alamarBlue™- und CFDA, AM-Fluoreszenz auf bis zu 81% im Vergleich zur Kontrolle kam, die nur bei der Untersuchung mittels CFDA, AM signifikant ($p=0,002$) war (Abbildung 27). Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten des MTT-Tests.

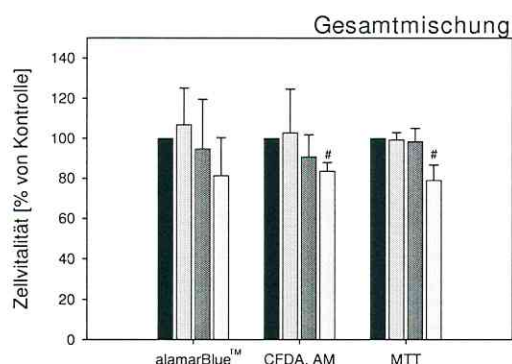


Abbildung 27: Einfluss der Gesamtmischung (C₉-C₁₃-Alkane, Methylcyclopentan, Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Vitalität TNF- α -stimulierter humaner Lungeneithelzellen (A549) im Transwell-Modell, untersucht mittels alamarBlue™-, CFDA, AM- und MTT-Vitalitätstest. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 Experimenten. Eine signifikante Hemmung der Zellvitalität ($p<0,05$) wurde mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die zu untersuchenden Einzelverbindungen sowie die Alkan- und Aromatenmischung die Zellvitalität humaner Lungeneithelzellen auch im Transwell-Modell nicht beeinflussen. Im Gegensatz dazu konnte nach Exposition mit der Gesamtmischung in einer Konzentration von 100 g/m³ eine Hemmung der Zellvitalität beobachtet werden. Die Vitalitätsmessungen mittels CFDA, AM und alamarBlue™ bestätigten dieses Ergebnis.

3.6.2 Einfluss von VOC auf die Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen

Für die Untersuchungen der flüchtigen Verbindungen über einen breiten Konzentrationsbereich wurden auch hier Lösungsmittel (Methanol und Methylcyclopentan) verwendet. Deren Einfluss auf die Lungenepithelzellen wurde zunächst im Transwell-Modell untersucht. Tabelle 13 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 13: Einfluss der Lösungsmittel Methanol und Methylcyclopentan auf die Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell. Dargestellt sind die Mittelwerte (Minimum und Maximum) von 3 Versuchsansätzen. Eine signifikante Hemmung der Chemokinfreisetzung ($p < 0,05$) wurde mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Ansatz	Chemokinkonzentration in [pg/ml] Mittelwert (Minimum – Maximum)	
	MCP-1	IL-8
TNF- α -Stimulation (1 ng/ml)	4071,6 (3319,0-4262,2)	1613,6 (1444,5-1782,6)
TNF- α -Stimulation und Methanol (13,2 g/m ³)	4203,5 (3936,9-4298,4)	848,1 [#] (695,0-938,4)
TNF- α -Stimulation und Methylcyclopentan (12,3 g/m ³)	4011,9 (3748,8-4383,7)	1570,5 (1368,5-1772,4)

Die Ergebnisse zeigten, dass es unter Methanol und Methylcyclopentan zu keiner Beeinflussung der MCP-1-Freisetzung kam. Die IL-8-Freisetzung war dagegen unter Methanol-Exposition auf 53% ($p=0,01$) vermindert. Durch Methylcyclopentan wurde die IL-8-Freisetzung nicht beeinflusst.

Nach Exposition von Lungenepithelzellen mit der aromatischen Verbindung Styrol konnte in der höchsten Konzentration von 100 g/m³ eine Hemmung der MCP-1-Freisetzung auf 33% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (Exposition von TNF- α -stimulierten Lungenepithelzellen mit dem Lösungsmittel) beobachtet werden. Ab einer Expositionskonzentration von 1 g/m³ kam es zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung um bis zu 29% (1 g/m³: $p=0,005$; 10 g/m³: $p=0,02$; 100 g/m³: $p=0,03$) bezogen auf die Kontrolle. In einem innenraumrelevanten Konzentrationsbereich von 100 μ g/m³ bis 1 g/m³ wurde eine Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 28% (100 μ g/m³: $p=0,003$; 1 mg/m³: $p=0,005$; 10 mg/m³: $p=0,02$; 100 mg/m³: $p=0,007$; 1 g/m³: $p=0,005$) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abbildung 28).

Die m-Xylol-Exposition zeigte in einer Konzentration von 100 g/m³ ebenfalls eine Hemmung der MCP-1-Freisetzung, die hier auf 61% (p=0,01) im Vergleich zur Kontrolle vermindert war. Weiterhin kam es ab einer Expositionskonzentration von 10 g/m³ zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung um bis zu 25% (p≤0,001) bezogen auf die Kontrolle. In innenraumrelevanten Konzentrationen von 100 µg/m³ bis 1 g/m³ wurde eine Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 19% (100 µg/m³: p=0,02; 1 mg/m³: p=0,04; 10 mg/m³: p=0,002; 100 mg/m³: p<0,001; 1 g/m³: p=0,01) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abbildung 28).

Chlorbenzol führte in einer Konzentration von 100 g/m³ zu einer Hemmung der MCP-1-Freisetzung um 66% (p<0,001) und einer Induktion der IL-8-Freisetzung um 29% (p=0,008) im Vergleich zur Kontrolle. Weiterhin kam es in einem innenraumrelevanten Konzentrationsbereich von 10 µg/m³ bis 1 g/m³ zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 38% (10 µg/m³: p<0,001; 100 µg/m³: p=0,03; 1 mg/m³: p=0,007; 10 mg/m³: p<0,001; 100 mg/m³: p=0,002; 1 g/m³: p=0,004) bezogen auf die Kontrolle (Abbildung 28).

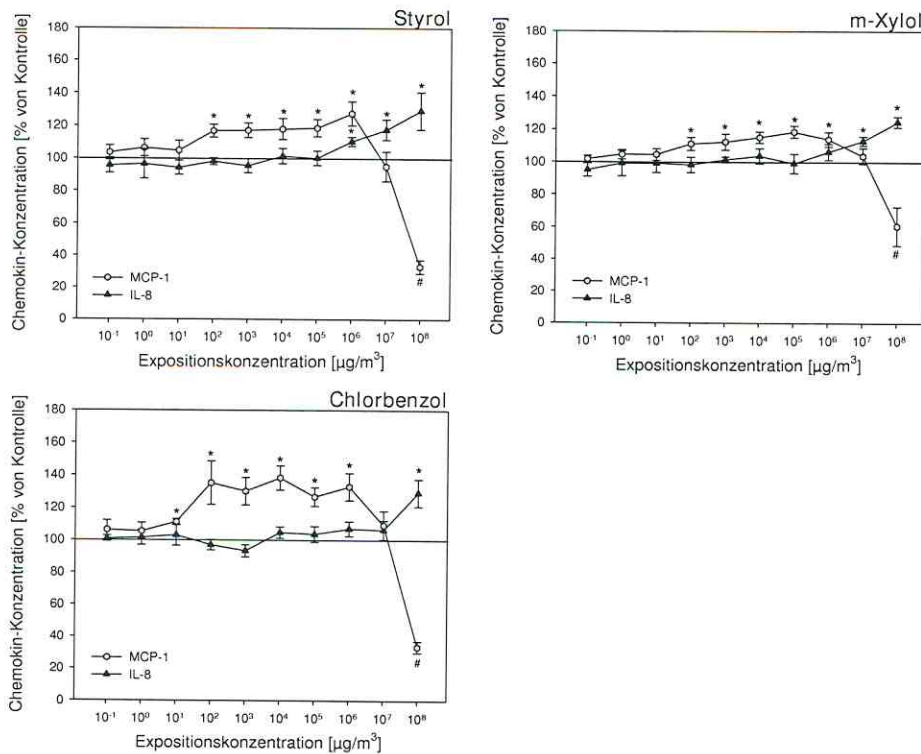


Abbildung 28: Einfluss flüchtiger aromatischer Verbindungen (Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol) auf die Chemokinfreisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 5 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der Chemokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die Aromatenmischung führte bei Lungenepithelzellen in einer Konzentration von $100 \text{ g}/\text{m}^3$ zu einer Hemmung der MCP-1-Freisetzung um 84% ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Ab einer Expositionskonzentration von $10 \text{ g}/\text{m}^3$ wurde eine Induktion der IL-8-Freisetzung um bis zu 46% ($10 \text{ g}/\text{m}^3$: $p = 0,01$; $100 \text{ g}/\text{m}^3$: $p = 0,02$) bezogen auf die Kontrolle beobachtet. Innenraumrelevante Konzentrationen von $0,1 \text{ µg}/\text{m}^3$ bis $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ zeigten eine Induktion der MCP-1-Freisetzung um bis zu 28% ($0,1 \text{ µg}/\text{m}^3$: $p = 0,02$; $1 \text{ µg}/\text{m}^3$: $p = 0,04$; $10 \text{ µg}/\text{m}^3$: $p = 0,01$; $100 \text{ µg}/\text{m}^3$: $p = 0,004$; $1 \text{ mg}/\text{m}^3$: $p = 0,01$; $10 \text{ mg}/\text{m}^3$: $p = 0,04$) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 29).

Auch die Gesamtmischung führte in der höchsten Expositionskonzentration ($100 \text{ g}/\text{m}^3$) zu einer Hemmung der MCP-1-Freisetzung (Hemmung um 68%,

$p < 0,001$). Auch kam es in dieser Konzentration zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung um 25% ($p = 0,03$) im Vergleich zur Kontrolle. Im Konzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \text{ mg}/\text{m}^3$ (innenraumrelevanter Bereich) wurde eine Erhöhung der MCP-1-Freisetzung um bis zu 18% ($0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$: $p = 0,04$; $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$: $p < 0,001$; $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$: $p < 0,001$; $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$: $p = 0,004$; $1 \text{ mg}/\text{m}^3$: $p = 0,004$; $10 \text{ mg}/\text{m}^3$: $p < 0,001$; $100 \text{ mg}/\text{m}^3$: $p = 0,02$) bezogen auf die Kontrolle beobachtet (Abbildung 29).

Die Alkanmischung führte in der höchsten Konzentration von $100 \text{ g}/\text{m}^3$ zu einer Hemmung der MCP-1-Freisetzung um 11% ($p = 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Veränderungen der IL-8-Freisetzung traten nicht auf (Abbildung 29).

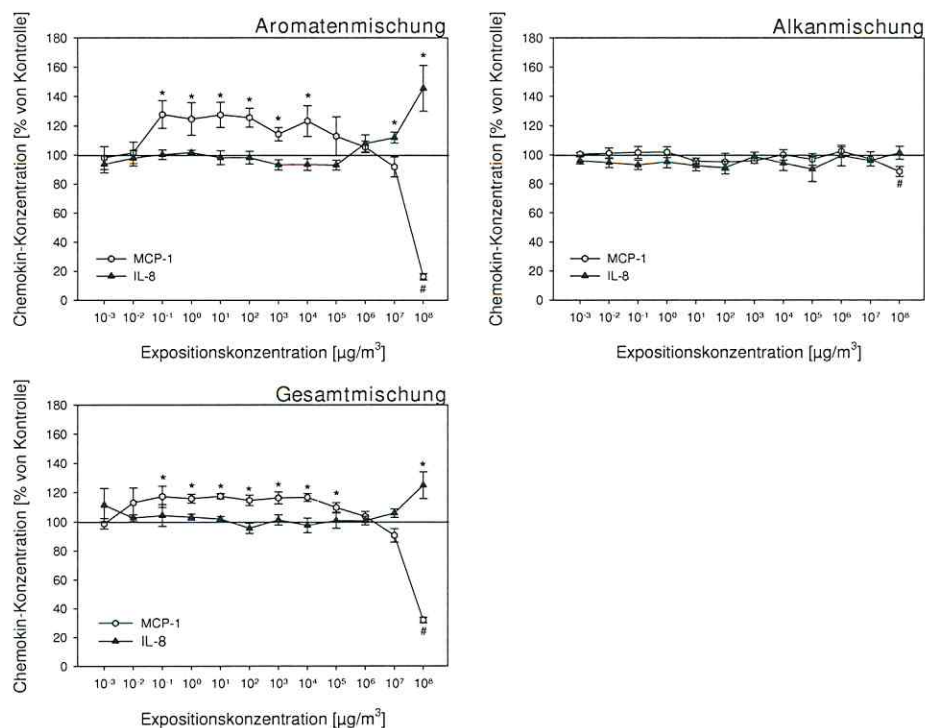


Abbildung 29: Einfluss verschiedener VOC-Mischungen (Alkanmischung: C_9 - C_{13} -Alkane und Methylcyclopentan; Aromatenmischung: Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol; Gesamt-mischung: Alkanmischung und Aromatenmischung) auf die Chemokin-freisetzung TNF- α -stimulierter humaner Lungenepithelzellen (A549) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 5 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der Chemokin-freisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die Exposition humaner Lungenepithelzellen mit flüchtigen aromatischen Verbindungen führte im Transwell-Modell zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung, die bei allen getesteten Verbindungen in hohen, aber auch in innenraumrelevanten Konzentrationen auftrat. Die MCP-1-Induktion war bei Chlorbenzol im Vergleich zu Styrol und m-Xylol am stärksten ausgeprägt und trat im größten Konzentrationsbereich auf (von 10 µg/m³ bis 1 g/m³). In sehr hohen Expositionskonzentrationen (ab 10 g/m³) konnte bei allen aromatischen Verbindungen eine Induktion der IL-8-Freisetzung bzw. inhibitorische Effekte auf die MCP-1-Freisetzung beobachtet werden.

Auch die Exposition mit der Aromaten- bzw. Gesamtmischung führte zu einer MCP-1-Induktion, die im innenraumrelevanten Bereich lag. Der Konzentrationsbereich der MCP-1-Induktion war bei der Gesamtmischung größer als bei der Aromatenmischung, wobei die Intensität der MCP-1-Induktion bei der Aromatenmischung größer war. Hohe Expositionskonzentrationen (ab 10 g/m³) führten bei der Aromaten- bzw. Gesamtmischung zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung. Bei allen untersuchten VOC-Mischungen trat in der höchsten Konzentration (100 g/m³) eine Hemmung der MCP-1-Freisetzung auf, die bei Aromaten- und Gesamtmischung stärker als bei der Alkanmischung war.

3.6.3 Einfluss von Chlorbenzol auf die MCP-1 mRNA-Expression humaner Lungenepithelzellen

Chlorbenzol verursachte im Transwell-Modell die stärksten Veränderungen der Chemokinfreisetzung (MCP-1-Induktion um bis zu 38% in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/m³ bis 1 g/m³). Aus diesem Grund wurde für diese Verbindung nach der Exposition von Lungenepithelzellen im Transwell-Modell mRNA isoliert und nach Synthese der cDNA die MCP-1 mRNA-Expression mittels PCR untersucht. Als *Housekeeping*-Gen wurde β-Actin verwendet. Es sollten damit die Ergebnisse auf Proteinebene zusätzlich auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Der untersuchte Konzentrationsbereich lag zwischen 10 µg/m³ und 100 g/m³.

Chlorbenzol führte in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/m³ bis 100 mg/m³ zu einer signifikanten Erhöhung der MCP-1 mRNA-Expression (Abbildung 30).

Verglichen mit der MCP-1-Induktion auf Proteinebene trat die Erhöhung der MCP-1 mRNA-Expression in einem ähnlichen Konzentrationsbereich auf (Proteinebene: 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 1 g/m^3 , mRNA-Ebene: 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 100 mg/m^3) und umfasste damit wiederum den innenraumrelevanten Bereich. Auch zeigte sich, dass die Erhöhung der MCP-1 mRNA-Expression stärker ausgeprägt war als die MCP-1-Induktion auf Proteinebene.

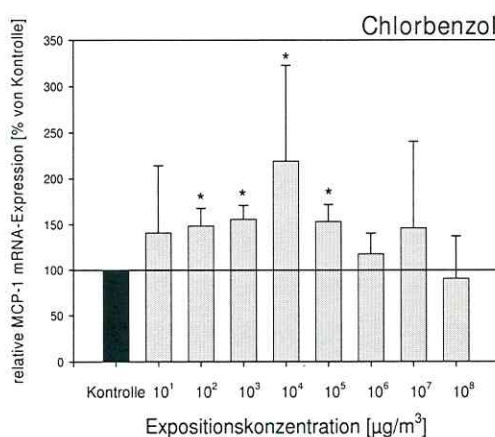


Abbildung 30: Einfluss von Chlorbenzol auf die MCP-1 mRNA-Expression humaner Lungenepithelzellen (A549) bezogen auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 Versuchsansätzen. Eine signifikante Stimulation der mRNA-Expression ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol * gekennzeichnet.

3.7 Untersuchung von Sekundäreffekten VOC-exponierter Lungenepithelzellen aus dem Transwell-Modell auf PBMC

Die flüchtigen Verbindungen, die im Transwell-Modell in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen zu Veränderungen der Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen führten (MCP-1-Induktion unter Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol), sollten nun hinsichtlich ihrer Sekundäreffekte auf PBMC untersucht werden. Verglichen wurden die Ergebnisse dieser Experimente mit den Ergebnissen der Sekundäruntersuchungen der Alkanmischung, die im

innenraumrelevanten Bereich auch im Transwell-Modell zu keinen Veränderungen der MCP-1-Freisetzung humaner Lungenepithelzellen führte.

Die konditionierten Medien der VOC-exponierten Lungenepithelzellen wurden auf stimulierte PBMC (Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28) gegeben und für 24 h bzw. 72 h inkubiert. Anschließend wurden Veränderungen der Zytokinfreisetzung der PBMC mittels ELISA (IL-13, IFN- γ) analysiert.

Die 24-stündige Inkubation von Zellkulturüberständen Styrol-exponierter Lungenepithelzellen mit PBMC zeigte keine Veränderungen der IL-13- und IFN- γ -Freisetzung (Abbildung 31 A). Im Gegensatz dazu konnte nach 72 h in einem Konzentrationsbereich von 10 mg/m³ bis 100 mg/m³ eine Induktion der IL-13-Freisetzung von PBMC um bis zu 24% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Veränderungen der IFN- γ -Freisetzung traten nicht auf (Abbildung 31 B).

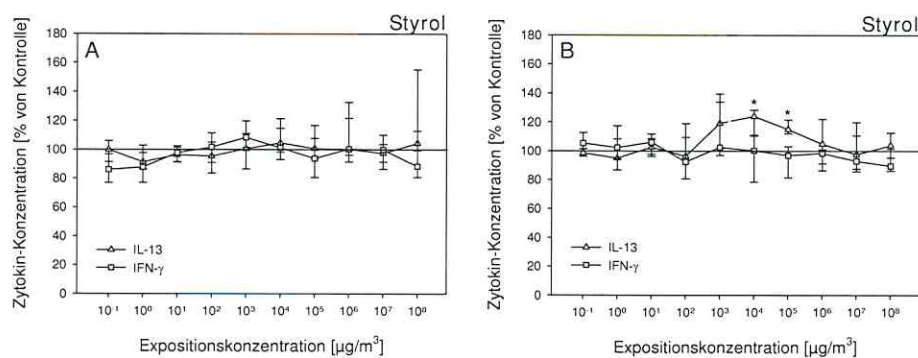


Abbildung 31: Einfluss der Zellkulturüberstände Styrol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Stimulation der Zytokinfreisetzung ($p<0,05$) ist mit dem Symbol * gekennzeichnet.

Demgegenüber führten die Zellkulturüberstände m-Xylol-exponierter Lungenepithelzellen weder nach 24 h (Abbildung 32 A) noch nach 72 h (Abbildung 32 B) zu Veränderungen auf Ebene der IL-13- und IFN- γ -Freisetzung.

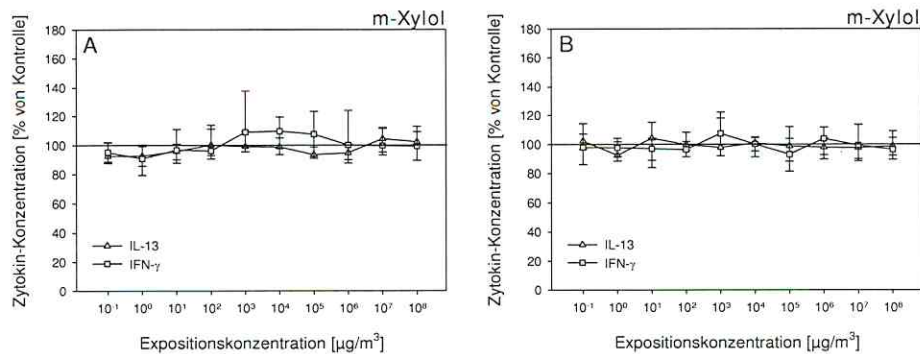


Abbildung 32: Einfluss der Zellkulturüberstände m-Xylol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern.

Die konditionierten Medien Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit PBMC keine Veränderungen der IL-13- bzw. IFN- γ -Freisetzung (Abbildung 33 A). Nach 72 h konnte im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich von $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ eine Induktion der IL-13-Freisetzung um bis zu 23% ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Veränderungen der IFN- γ -Freisetzung traten nicht auf (Abbildung 33 B).

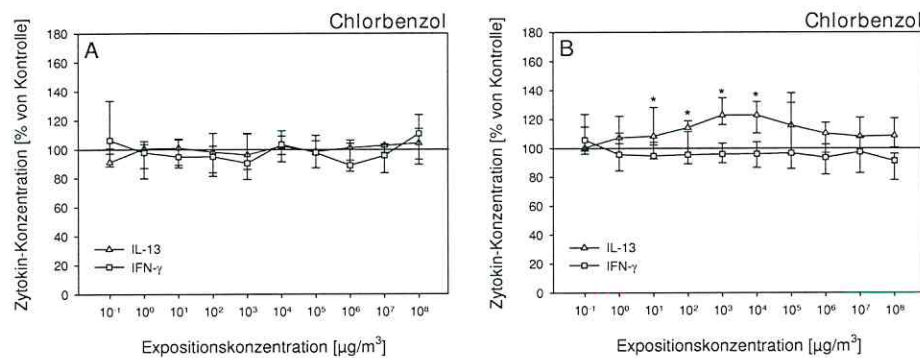


Abbildung 33: Einfluss der Zellkulturüberstände Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern. Eine signifikante Stimulation der Zytokinfreisetzung ($p < 0,05$) ist mit dem Symbol * gekennzeichnet.

Die Inkubation von PBMC mit Zellkulturüberständen der mit der Alkanmischung exponierten Lungenepithelzellen führte weder nach 24 h noch nach 72 h zu Veränderungen der IL-13- und IFN- γ -Freisetzung (Abbildung 34).

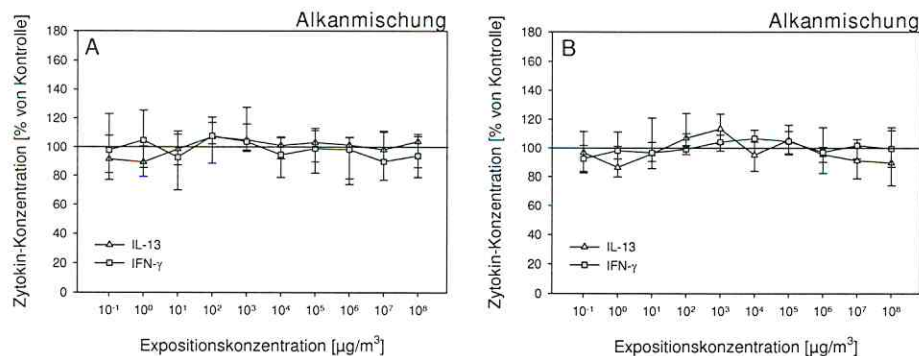


Abbildung 34: Einfluss der Zellkulturüberstände von mit der Alkanmischung (C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan) exponierten Lungenepithelzellen (aus dem Transwell-Modell) auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger (A) bzw. 72-stündiger (B) Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass bei keiner der untersuchten Verbindungen nach 24-stündiger Inkubation der konditionierten Medien VOC-exponierter Lungenepithelzellen mit PBMC Veränderungen der Zytokinfreisetzung auftreten. Eine Inkubationsdauer von 72 h führte bei Zellkulturüberständen Chlorbenzol- bzw. Styrol-exponierter Lungenepithelzellen zu einer Induktion der IL-13-Freisetzung. Dabei lag die durch Chlorbenzol-Kulturiüberstände hervorgerufene IL-13-Induktion im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich. Der Konzentrationsbereich der IL-13-Induktion war bei Styrol im Vergleich zu Chlorbenzol kleiner und lag an der Grenze der Innenraumrelevanz. Die Exposition von Lungenepithelzellen mit *m*-Xylol bzw. der Alkanmischung führte auf PBMC zu keinen Sekundäreffekten. Die im Transwell-Modell erhaltenen Ergebnisse bestätigten demnach die beobachteten Effekte im Zellkulturröhrchen-Modell.

3.8 Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf gemeinsam kultivierte Lungenepithelzellen und PBMC im Transwell-Modell am Beispiel von Chlorbenzol

Da durch die Inkubation von PBMC mit Zellkulturüberständen Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen eine Beeinflussung der Zytokinfreisetzung von PBMC beobachtet werden konnte, sollte nun in einem weiteren Ansatz eine Kokultur von Lungenepithelzellen und PBMC im Transwell-Modell versucht werden. Als Modell-VOC wurde wiederum Chlorbenzol verwendet, da durch diese Verbindung (im Vergleich zu Styrol und m-Xylol) die stärksten Veränderungen der Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen erzielt wurden.

Humane Lungenepithelzellen und PBMC wurden mit TNF- α und Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3/CD28 stimuliert und mit Chlorbenzol in einem Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 100 g/m^3 exponiert. Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung wurden mittels ELISA (MCP-1, IL-13, IFN- γ) untersucht. Die Ansätze wurden 20 h mit VOC exponiert und anschließend in VOC-freier Atmosphäre bis 72 h weiterinkubiert. Zellkulturüberstände wurden nach 20 h und 72 h gewonnen und mittels ELISA analysiert. Die Exposition der gemeinsam kultivierten Lungenepithelzellen und PBMC führte in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen weder nach 20 h noch nach 72 h zu Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung (Abbildung 35 A und B). In sehr hohen Expositionskonzentrationen (ab 1 g/m^3) kam es nach 20 h zu einer Hemmung der IL-13-Freisetzung um bis zu 52% (1 g/m^3 : $p=0,01$; 10 g/m^3 : $p<0,001$; 100 g/m^3 : $p<0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Weiterhin war die IFN- γ -Freisetzung ab einer Konzentration von 10 g/m^3 auf bis zu 69% ($p<0,001$) und die MCP-1-Freisetzung in der höchsten Konzentration (100 g/m^3) auf 70% ($p=0,04$) bezogen auf die Kontrolle vermindert (Abbildung 35 A). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 72 h in der höchsten Expositionskonzentration von 100 g/m^3 eine Induktion der MCP-1-Freisetzung um 30% ($p=0,04$) im Vergleich zur Kontrolle. Eine Hemmung der IL-13- bzw. IFN- γ -Freisetzung trat nur noch in der höchsten

Konzentration von 100 g/m³ auf und betrug 24% (IL-13, $p=0,004$) bzw. 62% (IFN- γ , $p=0,04$) bezogen auf die Kontrolle (Abbildung 35 B).

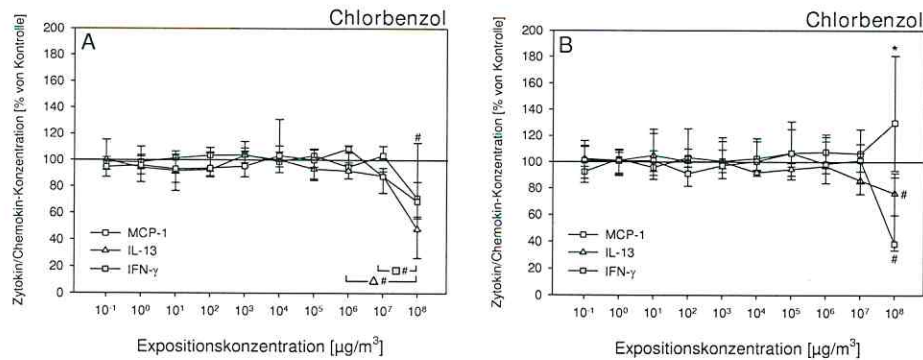


Abbildung 35: Einfluss von Chlorbenzol auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung kokultivierter humaner Lungenepithelzellen (A549) und PBMC nach 20 h (A) bzw. 72 h (B) im Transwell-Modell, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 12 untersuchten Spendern. Eine signifikante Stimulation der Zytokin-/Chemokinfreisetzung ($p<0,05$) ist mit dem Symbol *, eine signifikante Hemmung ($p<0,05$) mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Auffällig war, dass die Konzentration von MCP-1 in den Kontrollansätzen der Kokultur (PBMC und Lungenepithelzellen) drastisch höher war im Vergleich zur alleinigen Kultur von Lungenepithelzellen (Lungenepithelzellen allein: 4070 pg/ml MCP-1; Kokultur mit PBMC: 14800 pg/ml MCP-1). Eine Induktion der MCP-1-Freisetzung bei Chlorbenzol-exponierten Lungenepithelzellen von 38% (wie im Kapitel 3.6.2 beschrieben) entspricht ca. 1550 pg/ml und könnte im Kokultur-Ansatz aus messtechnischen Gründen nicht mehr nachweisbar sein.

Die bei der Chlorbenzol-Exposition von Lungenepithelzellen beobachtete Erhöhung der MCP-1-Freisetzung konnte bei der Exposition der Kokultur mit PBMC nicht beobachtet werden. Auch kam es in innenraumrelevanten Konzentrationen zu keinen Veränderungen der Zytokinfreisetzung der PBMC (IL-13, IFN- γ). Hohe Chlorbenzol-Konzentrationen (ab 1 g/m³) führten nach 20-stündiger Exposition zu immuntoxischen Effekten. Nach 72 h traten immuntoxische Effekte nur noch in der höchsten Konzentration von 100 g/m³ (IL-13 und IFN- γ) auf. Die MCP-1-Freisetzung war in dieser Konzentration erhöht.

3.9 Einfluss von MCP-1 auf PBMC

In Untersuchungen zu Sekundäreffekten auf PBMC konnte gezeigt werden, dass Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen zu einer Induktion der IL-13-Freisetzung bei PBMC führen. Außerdem kam es unter VOC-Einfluss zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung bei Lungenepithelzellen. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Inkubation von PBMC mit MCP-1 zu einer IL-13-Induktion führt.

Für diese Untersuchungen wurden PBMC mit verschiedenen Konzentrationen von humanem, rekombinantem MCP-1 (100 pg/ml bis 10.000 pg/ml) inkubiert und nach 24 h bzw. 72 h die Zytokine IL-13 und IFN- γ im Zellkulturüberstand analysiert (ELISA).

Dabei zeigte sich, dass MCP-1 allein weder nach 24- noch nach 72-stündiger Inkubation zu signifikanten Veränderungen der IL-13- und IFN- γ -Freisetzung von PBMC führt (Abbildung 36).

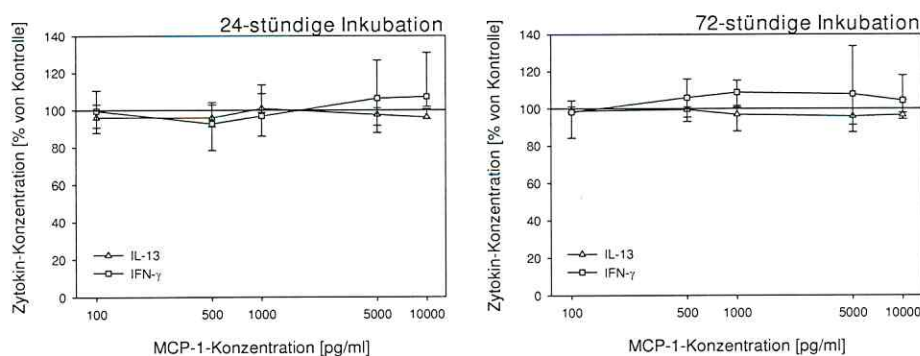


Abbildung 36: Einfluss von humanem, rekombinantem MCP-1 auf die Zytokinfreisetzung CD3/CD28-stimulierter PBMC nach 24-stündiger bzw. 72-stündiger Inkubation, gemessen im ELISA. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25. und 75. Perzentile von 6 untersuchten Spendern.

4 DISKUSSION

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen VOC-Belastung im Innenraum und der Manifestation von Atemwegserkrankungen und Allergien gibt. Wegen der Vielzahl der im Innenraum vorkommenden flüchtigen Verbindungen kann das Schadstoffpotenzial der einzelnen Verbindungen und zugrunde liegende Wirkungsmechanismen in epidemiologischen Studien nicht untersucht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, im Rahmen von *In vitro*-Untersuchungen das Schadstoffpotenzial einzelner flüchtiger Verbindungen zu bewerten. Besondere Beachtung fanden bei allen Untersuchungen innenraumrelevante Konzentrationsbereiche, die für die einzelnen aliphatischen Verbindungen nach Herbarth und Rehwagen (1998) zwischen $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und für die einzelnen aromatischen Verbindungen zwischen $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ liegen. Nach Seifert (1999) treten z.B. nach Renovierungsarbeiten auch wesentlich höhere Total-VOC-Konzentrationen (Summe der VOC, TVOC) von $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ bis $25 \text{ mg}/\text{m}^3$ auf, die ebenfalls als innenraumrelevant betrachtet wurden.

4.1 *Auswahl eines geeigneten In vitro-Modells zur Exposition von humanen Zellen mit flüchtigen organischen Verbindungen*

Bei der Entwicklung von *In vitro*-Modellen für die Untersuchung biologischer Effekte von flüchtigen organischen Verbindungen steht die Lösung verschiedener Probleme im Vordergrund (Rasmussen 1984):

- Kontrollierte Herstellung und Überwachung der zu analysierenden Gasphase, um dosisabhängige Effekte untersuchen zu können.
- Der Kontakt zwischen Zellen und Gasphase sollte so dicht wie möglich sein, um z.B. Interaktionen des Gases mit Mediums-Bestandteilen zu vermeiden

und einen gleichmäßigen Kontakt des Gases mit den Zellen zu gewährleisten.

- Das Modell sollte eine aussagekräftige Expositionszeit erlauben, aber eine Inaktivierung der Zellen durch Austrocknung vermeiden.

Um auf diese Problemstellungen eingehen zu können, wurden unterschiedliche Systeme entwickelt.

Bei einem sehr einfachen Expositionssystem für Alveolarmakrophagen mit Stickstoffdioxid oder Ozon strömt das Gas durch die Zellsuspension oder der Schadstoff wird durch die Zellkulturflasche geleitet (Voisin et al. 1974, Cardile et al. 1995). Der Nachteil dieser Methode ist, dass das Gas eine Diffusionsbarriere überwinden muss.

Weiterhin wurden Expositionsmodelle mit Hilfe von Rollflaschen oder Schüttlern entwickelt, um die Diffusionsbarriere zu verringern (Baker und Tumasonis 1971, Valentine 1985). Bei diesen Modellen ist die Diffusionsschicht durch periodische Bewegung wie Rollen oder Schütteln variabel. Diese Modelle erlauben die Exposition von z.B. humanen Lungenzellen mit Stickstoffdioxid, Ozon (Guerrero et al. 1979a, b, Pace et al. 1969) oder flüchtigen Verbindungen (Muckter et al. 1998).

Eine dritte Möglichkeit ist die Exposition von Zellen auf Kollagengelen oder mikroporösen Membranen (Rasmussen und Crocker 1981, Voisin et al. 1977a, b, Zamora et al. 1983, Zamora et al. 1986). Alveolarmakrophagen oder Lungenepithelzellen werden dabei ohne Mediumsschicht für eine Stunde mit den Gasen exponiert. Dabei kann das Gas statisch durch einmalige Gabe des Gases in eine dichte Kammer oder dynamisch durch einen kontinuierlichen Gasstrom appliziert werden. Mit diesen Modellen können Zellen z.B. mit Ozon, Stickstoffdioxid oder Schwefeldioxid exponiert werden (Gabridge und Gladd 1984, Alink et al. 1979).

Die Exposition an der Flüssigphasen/Gasphasen-Grenzschicht ist eine vierte Möglichkeit der Untersuchung von Schadstoffeffekten. Dabei werden z.B. Alveolarmakrophagen oder Lungenfibroblasten auf Zelluloseacetat-Filtern ausgesät. Durch Diffusion des Mediums durch den Filter werden die Zellen von der Unterseite mit Medium versorgt. Von der Oberseite liegen die Zellen frei vor.

In einer Expositions-kammer werden die Zellen dann z.B. mit Ozon oder Stickstoffdioxid exponiert (Rasmussen und Crocker 1981, Samuelsen et al. 1978, Voisin et al. 1974, Voisin et al. 1977a, b). Diese Untersuchungen zeigten, dass die meisten Zellen in diesen Modellen z.B. auf Ozon schon in geringen Konzentrationen sehr empfindlich reagieren. Auch Tarkington und Mitarbeiter entwickelten ein *In vitro*-Modell, welches eine biphasische Kammer verwendet (Whitcutt chamber, Whitcutt et al. 1988). In dieser Kammer werden differenzierte Epithelzellen des Respirationstraktes zwischen Luft- und Flüssigkeitsphase auf einer Polycarbonat- oder Nitrozellulose-Membran kultiviert und mit Ozon exponiert.

Vorteile solcher Modelle sind, dass die Zellen in direktem Kontakt zu dem Gas stehen und dass durch die Versorgung der Zellen mit Medium von der Unterseite der Membran eine Exposition über einen längeren Zeitraum möglich ist. Untersuchungen zum Einfluss der Mediumsschicht auf den Zellen in Bezug auf die Ozon-Toxizität zeigten, dass die Zellen ohne Medium wesentlich empfindlicher auf Ozon reagieren (Tarkington et al. 1994).

Eine entscheidende Weiterentwicklung auf diesem Gebiet wurde durch das CULTEX®-System (CULTEX®, Vitrocell, Germany) erreicht. In diesem Modell wird ein kontinuierlicher, vertikaler Gasstrom auf die biphasisch kultivierten Zellen geleitet. Aufderheide und Mitarbeiter (2000) konnten mit Hilfe des CULTEX®-Systems humane Zellen des Respirationstraktes mit Zigarettenrauch exponieren. Dieses Modell konnte auch erfolgreich für die Exposition von humanen Lungenzellen mit Ozon/Stickstoffdioxid (Ritter et al. 2001) und Autoabgasen (Knebel et al. 2002) eingesetzt werden. Nachteilig ist, dass das CULTEX®-System nur die Exposition eines Dreifachansatzes mit gleicher Verbindung und Konzentration erlaubt. Chemikalien-exponierte Zellen können damit in einem Ansatz nicht im Vergleich zur nicht exponierten Kontrolle untersucht werden, was eine erhebliche Limitierung darstellt.

Ein weiteres neuartiges Modell ist die Applikation von flüchtigen organischen Verbindungen auf immunkompetente Zellen in einem Zwei-Phasen-Bioreaktorsystem (Raabe et al. 1999, Raabe et al. 2000, Raabe et al. 2001, Klemm 2005).

Dabei werden die Zellen auf einer hydrophoben, gaspermeablen, porösen Membran ausgesät, die das Trennungselement in diesem Zweikammersystem ist. Die obere Kammer hat die Funktion einer Zellkulturkammer, in der unteren Kammer erfolgt die Gasdurchleitung. Auf der Oberseite der Membran befinden sich die Zellen in Medium. Von der Unterseite der Membran strömt ein Gasstrom durch die Membran auf die Zellen. Durch kontinuierliches Zu- und Abführen von Zellkulturmedium werden die Zellen mit Medium versorgt und metabolisierte Produkte entfernt. Das Problem hier liegt in der Beschaffenheit der Membran. Diese muss ausreichend inert und permeabel für die VOC sein. Auch kann in diesem System nur eine Konzentration oder eine Kontrolle untersucht werden.

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Modelle haben verschiedene Nachteile. Sie sind z.T. sehr kompliziert zu handhaben, beinhalten viele mögliche Fehlerquellen und/oder erlauben keine gleichzeitige Exposition von Zellen mit Gasen über einen weiten Konzentrationsbereich unter standardisierten Bedingungen. Weiterhin konnte meist nur über eine kurze Zeit von 1 h oder 3 h exponiert werden, da Austrocknungseffekte zu befürchten waren.

Aufgrund der verschiedenen Probleme wurde in dieser Arbeit auf ein Modell zurückgegriffen, das von Wichmann und Mitarbeitern (2005) entwickelt wurde. Dieses Modell erlaubt eine Exposition von frisch präparierten Primärzellen wie PBMC oder von Zelllinien wie der Lungenepithel-Zelllinie A549 mit flüchtigen organischen Verbindungen über einen breiten Konzentrationsbereich. Damit können dosisabhängige Effekte untersucht werden, ohne dass eine aufwendige Expositionsapparatur mit konstantem Gasstrom notwendig ist. In diesem Modell werden die flüchtigen Verbindungen über die Gasphase in dicht schließenden Glasflaschen und somit im geschlossenen System appliziert. Das Modell ist leicht zu handhaben und erlaubt Mehrfachbestimmungen für jede einzelne Konzentration und die entsprechenden Kontrollen. Es ist demnach eine preiswerte und schnelle Voruntersuchung von flüchtigen Verbindungen (*Screening*) möglich. Zur Etablierung des Modells wurde Toluol als Modell-VOC verwendet. Toluol ist eine flüchtige Verbindung, die hauptsächlich im Zusammenhang mit Verkehrsbelastungen in erhöhten Konzentrationen im Innenraum auftritt. Mittels gaschromato-

grafischer Untersuchungen wurde zunächst analysiert, ob Toluol bei der Applikation über die Gasphase ins Zellkulturmedium und somit an die Zellen gelangt. Weiterhin wurde das Verhältnis zwischen Toluol-Konzentration in der Glasflasche und der resultierenden Toluol-Konzentration im Zellkulturmedium untersucht.

Wichmann und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass mit diesem Modell eine reproduzierbare Toluol-Konzentration in der Zellkultur erreicht wird (Abbildung 37). In Abhängigkeit von der applizierten Toluol-Menge stellte sich die Toluolkonzentration im Zellkulturmedium mit differenter Kinetik ein. Toluol gelangte nach einem zeitlichen Verzug, der mit zunehmender Toluol-Konzentration größer wird, ins Zellkulturmedium und akkumulierte dort bis zum Erreichen eines Maximums nach 60 min bis 5 h. Danach nahm die Toluol-Konzentration ab und erreichte nach 6-12 h eine relativ konstante Konzentration im Zellkulturmedium, die dann bis zu 24 h stabil bleibt (Abbildung 37).

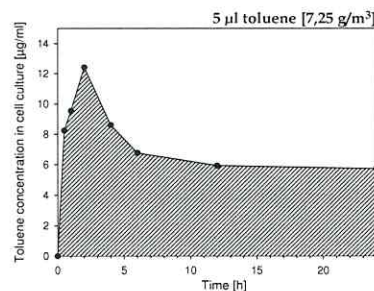


Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der Toluol-Konzentration im Zellkulturmedium nach Applikation von 5 µl Toluol (7,25 g/m³) im geschlossenen System (Glasflasche mit einem Volumen von 600 ml) (aus: Wichmann et al. 2005).

Es wurde demnach allein durch Konvektion und Diffusion über einen breiten Konzentrationsbereich eine reproduzierbare Exposition der kultivierten Zellen mit Toluol erreicht, ohne die Notwendigkeit einer direkten Toluol-Applikation ins Zellkulturmedium bzw. eines aktiven Transfers der Toluol-angereicherten Luft ins Zellkulturmedium. Auch wurde eine gute Korrelation zwischen den applizierten Toluolkonzentrationen in der Flasche und den Toluol-Konzentrationen im Zellkulturmedium beobachtet. Durch die Verwendung von CO₂-unabhängigem

Medium konnten die Experimente in dicht schließenden Flaschen ohne die Notwendigkeit einer kontinuierlichen CO₂-Anwesenheit durchgeführt werden.

Eine Studie bezüglich der Toluol-Exposition am Arbeitsplatz zeigte, dass Toluol-Konzentrationen in Arbeitsräumen zwischen 48,9 mg/m³ und 568,0 mg/m³ (im Mittel 237,0 mg/m³) auftreten können (Angerer et al. 1998). Im peripheren Blut dieser exponierten Arbeiter wurde eine durchschnittliche Toluol-Konzentration von 804 µg/l gemessen. In dem hier verwendeten Modell führte eine Toluol-Expositions-konzentration von 237 mg/m³ im Zellkulturmedium zu einer Toluol-Konzentration von 363 µg/l. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass das hier verwendete Modell die realen Expositionsbedingungen gut widerspiegelt.

Es muss jedoch kritisch diskutiert werden, dass auch das hier gewählte Modell Grenzen besitzt. Die untersuchten flüchtigen Verbindungen haben die Eigenschaft, sich an das Zellkulturröhrchen-Material Polystyrol zu adsorbieren und damit eine Verringerung der VOC-Konzentration zu bewirken. Weiterhin kommt es zu Löslichkeitsproblemen im Medium, da alle untersuchten Verbindungen lipophil sind. Nachteilig ist auch, dass sich die VOC während der Expositionszeit im Medium nicht gleichmäßig anreichern, sondern erst nach Erreichen eines Maximums sich ein stabiles Gleichgewicht einstellt. Diese Nachteile sprechen aber unter Berücksichtigung der schon beschriebenen Vorteile wie der Untersuchung eines weiten Konzentrationsbereiches, der Möglichkeit einer Expositionsdauer von 24 h, der einfachen Handhabung, der Möglichkeit von Mehrfachbestimmungen und der schnellen Voruntersuchung vieler Verbindungen nicht gegen dieses Modell. Es schien demnach für die hier zu untersuchenden Fragestellungen prinzipiell geeignet zu sein und wurde im Verlauf der Dissertation weiter modifiziert. Ein wesentlicher Optimierungsschritt bestand in der Etablierung eines Transwell-Modells, das eine VOC-Exposition über die Gasphase auf die Zellen ohne Mediumsschicht erlaubt. Damit entfiel das Problem der VOC-Löslichkeit im Medium.

4.2 *Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf die Freisetzung Th1/Th2-relevanter Zytokine*

Die im Kapitel 1.3 beschriebenen Ergebnisse aus epidemiologischen Studien zeigten einen Einfluss von VOC auf das Th1/Th2-Gleichgewicht, insbesondere eine Verschiebung in Richtung Th2-Antwort. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass flüchtige Verbindungen direkt auf die T-Helferzellen wirken und dadurch in das Immunsystem eingreifen. Dies könnte durch Stimulation der zur Entwicklung allergischer Reaktionen beitragenden Th2-Zellen und/oder durch Hemmung der vor allergischen Reaktionen schützenden Th1-Zellen geschehen.

Die Untersuchung von immunmodulierenden Effekten ausgewählter VOC erfolgte an PBMC. Wegen ihrer guten Verfügbarkeit und der Tatsache, dass Primärzellen keine Zellkultur-induzierten Veränderungen haben, waren sie gut für die Untersuchungen geeignet. Um Veränderungen auf Ebene der Th1/Th2-Zellen untersuchen zu können, wurden die Zytokine IL-4 und IL-13 in den Zellkulturüberständen als Marker für eine Th2-Antwort und IFN- γ für die Th1-Reaktivität untersucht. Zusätzlich wurde das proinflammatorische Zytokin TNF- α analysiert, welches von Monozyten, aber auch von Typ 1-T-Zellen produziert wird. Vorversuche zeigten, dass, um Veränderungen auf Ebene der Th1/Th2-Zellen untersuchen zu können, eine Stimulation der Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3/CD28 notwendig war, da die freigesetzten Konzentrationen der Zytokine im unstimulierten Zustand unterhalb der ELISA-Nachweisgrenze von 4 pg/ml lagen. Mit der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern wurde eine natürliche T-Zell-Aktivierung über den TZR und kostimulatorische Signale simuliert.

Für die Untersuchungen der VOC im verwendeten Konzentrationsbereich von 0,001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ bis 100 g/m^3 war die Verwendung von Lösungsmitteln notwendig, um pipettierbare VOC-Volumina zu erhalten. Untersuchungen zum Einfluss der Lösungsmittel auf die Zytokinfreisetzung von PBMC zeigten, dass die verwendeten Lösungsmittel Methylcyclopentan und Methylenchlorid keine Effekte auf PBMC hatten. Demgegenüber führte Methanol zu einer signifikanten

Hemmung der TNF- α -Freisetzung. Da alle experimentellen Ansätze einschließlich der Kontrollen mit identischen Methanol-Konzentrationen behandelt wurden, war der Hemmeffekt in allen Ansätzen gleich, so dass dennoch VOC-Effekte auf die TNF- α -Freisetzung untersucht werden konnten.

Lehmann und Mitarbeiter (2001) konnten erstmals zeigen, dass die Exposition mit innenraumrelevanten Konzentrationen von Chlorbenzol bzw. C₉-C₁₃-Alkanen bei Kindern mit einer reduzierten Anzahl von IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen und unter Chlorbenzol-Exposition auch mit einer erhöhten Anzahl von IL-4-produzierenden Th2-Zellen korreliert. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten jedoch bei keiner der untersuchten VOC Veränderungen der Zytokinfreisetzung von PBMC im innenraumrelevanten Bereich und somit auch keinen Einfluss auf die Th1/Th2-Balance. Eine direkte Wirkung dieser VOC auf die Th1/Th2-Zellen ist demnach eher unwahrscheinlich.

Wichmann und Mitarbeiter (2005) untersuchten den Einfluss von höheren Toluol-Konzentrationen (21,75 mg/m³ bis 725 g/m³) auf PBMC. Sie konnten zeigen, dass Toluol die Zytokinfreisetzung von PBMC verändert. Toluol-Konzentrationen von 21,75 g/m³ bis 725 g/m³ führten zu einer Erhöhung der TNF- α - und zu einer Verringerung der IFN- γ -, IL-4- und IL-13-Freisetzung. Das bedeutet, dass in hohen Toluol-Konzentrationen die Lymphozyten in ihrer Aktivität vermindert waren. Die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α war erhöht, was für entzündliche Prozesse kennzeichnend ist. Diese Veränderungen traten in Konzentrationsbereichen auf, in denen die Zellvitalität nicht beeinflusst wurde. Bei einigen der hier untersuchten aromatischen VOC konnten in hohen Expositionskonzentrationen ebenfalls immuntoxische Effekte beobachtet werden. In einer Konzentration von 10 g/m³ bis 100 g/m³ wurden durch Chlorbenzol immuntoxische Effekte auf die Zytokinfreisetzung, durch Styrol- und m-Xylol-Exposition eine leichte, jedoch nicht signifikante, Erhöhung der TNF- α -Freisetzung beobachtet. Verglichen mit der Toluol-Exposition, die von Wichmann und Mitarbeitern durchgeführt wurde, zeigte sich, dass die Effekte in hohen Konzentrationen ähnlich waren. Die Veränderungen der Zytokinfreisetzung traten

auch hier in Konzentrationen auf, die zu keinen zytotoxischen Effekten führten. Unter Tridekan- und Methylcyclopentan-Exposition mit 100 g/m^3 kam es ebenfalls zu leichten immuntoxischen Effekten.

Da im Innenraum eine Vielzahl flüchtiger Verbindungen vorkommt (Herbarth und Rehwagen 1998), wurden verschiedene VOC-Mischungen hinsichtlich ihrer Effekte auf PBMC untersucht. Es wurde vermutet, dass die Kombination verschiedener VOC zur Verstärkung der Effekte führt oder dass Veränderungen der Zytokinfreisetzung in Konzentrationen auftreten, die bei der Exposition einzelner VOC zu keinen Effekten führt. Auch bei diesen Untersuchungen kam es aber lediglich in sehr hohen Expositionskonzentrationen ab 1 g/m^3 und nur unter Einfluss der Aromaten- und Gesamtmischung zu immuntoxischen Effekten. Die unter Styrol- und m-Xylol-Exposition beobachtete Erhöhung der TNF- α -Freisetzung trat bei den Mischungen nicht mehr auf. Vermutlich kommt es hier bei der Aromatenmischung zu einer Überlagerung mit Chlorbenzol bzw. bei der Gesamtmischung zu einer Überlagerung mit den aliphatischen Verbindungen, die zu keiner TNF- α -Induktion führten. Demnach kam es bei den VOC-Mischungen lediglich zu einer Verstärkung der immuntoxischen Effekte.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die flüchtigen organischen Verbindungen in innenraumrelevanten Bereichen keine direkten Effekte auf PBMC haben. Das heißt auch, dass sie das Th1/Th2-Gleichgewicht nicht direkt beeinflussen. In innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen kam es weder zu einer Verminderung der IFN- γ -Freisetzung und demnach zu einer verminderten Th1-Antwort, noch zu einer Induktion der IL-4- oder IL-13-Freisetzung verbunden mit einer erhöhten Th2-Antwort. Lediglich in sehr hohen Expositionskonzentrationen waren die PBMC durch einige VOC in ihrer Funktion eingeschränkt. Es wird deshalb vermutet, dass periphere Blutzellen nicht das primäre Target der VOC sind und es demnach einen anderen Angriffspunkt geben muss.

4.3 Einfluss einer VOC-Exposition auf Lungenepithelzellen im Zellkulturröhrchen-Modell

Aufgrund der Erkenntnis, dass flüchtige Verbindungen nicht auf Ebene der T-Lymphozyten angreifen, wurden Untersuchungen durchgeführt, die sich einem weiteren Angriffspunkt von VOC, den Atemwegen, widmen. Es ist bekannt, dass eine VOC-Belastung im Innenraum mit Irritationen der Atemwege und Atemwegserkrankungen bei Kindern und Erwachsenen einhergehen kann (Ware et al. 1993, Diez et al. 2000, Wieslander et al. 1997a). Auch konnten unter VOC-Belastung entzündliche Reaktionen (Koren et al. 1992, Wieslander et al. 1997b) und Atemwegsobstruktionen (Harving et al. 1991) nachgewiesen werden. Nicht bekannt ist, wie VOC diese Wirkungen hervorrufen und welche Entzündungsmediatoren beteiligt sind.

Das von Wichmann und Mitarbeitern (2005) für Blutlymphozyten entwickelte VOC-Expositionsmodell wurde so modifiziert, dass eine Exposition von humanen Lungenepithelzellen möglich ist. Durch Verwendung von Zellkulturröhrchen, die eine relativ große Wachstumsfläche von 10 cm² haben, wurde die Diffusionsschicht für die VOC verringert, da weniger Medium über eine größere Fläche verteilt werden konnte.

Als Parameter zur Beurteilung der funktionellen Aktivität der Lungenepithelzellen wurden das Zytokin IL-6 und die Chemokine IL-8 und MCP-1 analysiert, da bekannt war, dass diese von Lungenepithelzellen produziert werden (Diehl und Rincón 2002, Pechkovsky et al. 2005). Das Zytokin IL-6 regt B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion an und unterstützt die Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Antwort. Es ist damit am allergischen Geschehen beteiligt (Diehl und Rincón 2002). IL-8 ist ein wichtiger Indikator für inflammatorische Prozesse (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). Durch MCP-1 wird die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren gefördert (Kuna et al. 1992a, b, Alam et al. 1992, Alam et al. 1994, Stellato et al. 1997, Reale et al. 1996). Es spielt weiterhin eine große Rolle bei entzündlichen Erkrankungen der Lunge und fördert die Entstehung einer Th2-Antwort (Lu et al. 1998). Diese Marker schienen demnach

aufgrund ihrer Eigenschaften gut für die Untersuchung entzündlicher und allergischer Reaktionen von Lungenepithelzellen geeignet zu sein. Bezüglich der Stimulation humaner Lungenepithelzellen konnten Standiford und Mitarbeiter (1991) zeigen, dass diese mittels rh-TNF- α zur Produktion des Chemokins MCP-1 angeregt werden können. Durch rh-TNF- α kann eine natürliche, aus inflammatorischen Prozessen resultierende TNF- α -Ausschüttung durch stimulierte Alveolarmakrophagen simuliert werden (Geiser 1999). Standiford und Mitarbeiter verwendeten für die Stimulation eine Konzentration von 20 ng/ml. Ein Vorversuch zur Ermittlung einer geeigneten TNF- α -Konzentration zeigte, dass es unter Chlorbenzol-Exposition ohne TNF- α -Stimulation bzw. mit einer TNF- α -Konzentration von 0,1 ng/ml oder 1 ng/ml zu einer verstärkten MCP-1-Freisetzung der Lungenepithelzellen kommt, wobei die Unterschiede zwischen nicht exponierten und exponierten Lungenepithelzellen bei einer TNF- α -Stimulation mit 1 ng/ml am stärksten ausgeprägt waren. Ab einer TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml konnten unter Chlorbenzol-Exposition keine Unterschiede in der MCP-1-Freisetzung im Vergleich zur Lösungsmittel-exponierten Kontrolle festgestellt werden. Vermutlich wurden die Zellen hier so stark stimuliert, dass eine weitere Aufregulierung durch flüchtige Verbindungen nicht mehr möglich war. Aufgrund dieses Vorversuches wurde eine TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml für die Durchführung der Expositionsexperimente gewählt. Neben MCP-1 wurden auch IL-6 und IL-8 untersucht. Da IL-6 ohne TNF- α -Stimulation im ELISA nicht nachweisbar war und IL-8 nur in sehr geringen Konzentrationen freigesetzt wurde, bestätigte sich auch hier die Notwendigkeit einer TNF- α -Stimulation, die in einer Konzentration von 1 ng/ml zu gut messbaren IL-6- und IL-8-Konzentrationen führte.

In einem weiteren Vorversuch wurde durch Exposition von Lungenepithelzellen mit Chlorbenzol über unterschiedliche Zeiträume ein geeigneter Expositionszeitraum ermittelt. Dabei zeigte sich, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten in der höchsten Konzentration von 100 g/m³ toxische Effekte auf die MCP-1-Freisetzung auftreten, die in ihrem Ausmaß jeweils ähnlich sind. Die inhibitorischen Effekte auf die MCP-1-Freisetzung scheinen demnach nicht zeitabhängig zu sein. Demgegenüber kam es durch Chlorbenzol in niedrigeren

Konzentrationen zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung, die abhängig von der Expositionszeit unterschiedlich ausgeprägt war. Mit zunehmender Expositionszeit (1 h, 8 h und 20 h) konnte eine Ausdehnung der MCP-1-Induktion in kleinere Chlorbenzol-Konzentrationen beobachtet werden, wobei die Intensität der MCP-1-Induktion nach 20 h am stärksten ausgeprägt war. Somit bewirkten mit zunehmender Expositionszeit kleinere VOC-Konzentrationen eine MCP-1-Induktion. Eine Expositionszeit von 30 h führte demgegenüber zu einer Intensitätsabnahme und einer Verkleinerung des Konzentrationsbereiches der MCP-1-Induktion. Es ist anzunehmen, dass sich hierbei die Zellkulturbedingungen in den dicht verschlossenen Flaschen verschlechtern und die Zellen in ihrer Funktion zunehmend beeinflusst werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Expositionsdauer von 20 h für die Untersuchungen gewählt, da nach dieser Expositionszeit die stärksten Effekte der VOC an Lungenepithelzellen beobachtet werden konnten.

Untersuchungen zur Zytotoxizität von VOC auf Lungenepithelzellen zeigten, dass substituierte Benzole stärker schädigende Eigenschaften haben als Benzol selbst (Croute et al. 2001, Ait-Aissa et al. 2000). Die Toxizität stieg dabei mit zunehmender Anzahl von Methylgruppen bzw. Chloratomen. Auch scheint die Zytotoxizität von VOC von deren Lipophilie abhängig zu sein (Connell et al. 1993, Poulin und Krishnan 1996). Der Angriffspunkt für lipophile Substanzen ist die Zellmembran. Sikkema und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, dass sich solche VOC in der Bilayermembran entsprechend ihres Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten anreichern. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen induzierte in dem hier verwendeten Modell keine der untersuchten Verbindungen zytotoxische Effekte auf Lungenepithelzellen. Offensichtlich werden auch Lungenepithelzellen durch die hier untersuchten VOC nicht in ihrer Vitalität eingeschränkt.

Weiterhin zeigte sich, dass die C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan zu keinen Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung von Lungenepithelzellen führen. Im Gegensatz dazu kam es bei Untersuchungen zum Einfluss der aromatischen Verbindungen Chlorbenzol, Styrol und m-Xylol auf die Zytokin-/Chemokinfreisetzung in hohen Expositions-Konzentrationen von 10 g/m³ bis 100 g/m³ zu toxischen Effekten auf die IL-6- und MCP-1-Freisetzung. Auch konnte in hohen

Konzentrationen ab 1 g/m^3 eine Induktion der IL-8-Freisetzung beobachtet werden. Bei der höchsten Chlorbenzol-Konzentration (100 g/m^3) sank die IL-8-Freisetzung wieder auf Kontrollniveau ab, was für eine beginnende Toxizität bezüglich dieses Chemokins sprechen könnte.

IL-8 wird in erhöhten Konzentrationen z.B. nach Allergen-Kontakt ausgeschüttet (Tillie-Leblond et al. 2005) und ist an entzündlichen Prozessen in den Atemwegen beteiligt (Baggiolini und Clark-Lewis 1992, Drost et al. 2005). Es gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine und ist ein für neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkendes Chemokin. Diese Zellen sind neben der Beteiligung an akuten, nichtinfektiösen und bakteriellen Entzündungen auch an der Phagozytose von Mikroorganismen und anderen körperfremden Antigenen beteiligt. Die verminderte Freisetzung von IL-6 und MCP-1 gibt einen Hinweis auf toxische Einflüsse auf die Zellfunktion.

In niedrigeren Expositionskonzentrationen führten Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol zu einer Induktion der MCP-1-Freisetzung. Bei Chlorbenzol trat diese MCP-1-Induktion in innenraumrelevanten, bei Styrol und m-Xylol dagegen in höheren, aber auch in innenraumrelevanten Konzentrationen auf. Die Lungenepithelzellen reagierten somit auf Chlorbenzol am empfindlichsten und auf m-Xylol am schwächsten (Chlorbenzol > Styrol > m-Xylol).

MCP-1 gehört neben Eotaxin, RANTES, MCP-2 bis -4 und MIP-1 α zur Gruppe der CC-Chemokine. Diese bewirken allgemein die Aktivierung von Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen (Oppenheim et al. 1991). Auch kommt es durch diese Chemokine zur Aktivierung von eosinophilen und mit Ausnahme von Eotaxin, welches selektiv nur auf Eosinophile wirkt, auch von basophilen Granulozyten. MCP-1 wird bei allergischen Erkrankungen und Asthma verstärkt von Lungenzellen gebildet (Yao et al. 2004). Es bewirkt die Chemotaxis von T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen. Die besondere Rolle bei entzündlichen und allergischen Erkrankungen zeigt sich in der Induktion von bronchialer Hyperreaktivität, Infiltration von Leukozyten (besonders Monozyten und Lymphozyten) in die Lunge und an der Chemotaxis von

Eosinophilen und Basophilen bei der Pathogenese von Asthma. Chemokine fördern die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus diesen Granulozyten (z.B. Histaminfreisetzung aus Basophilen durch MCP-1, MCP-3, MCP-4, RANTES und MIP-1 α) (Kuna et al. 1992a, b, Alam et al. 1992, Alam et al. 1994, Stellato et al. 1997, Reale et al. 1996). Basophile setzen nach Aktivierung auch Leukotriene und IL-4 frei, wohingegen Eosinophile Proteine, Sauerstoffmetaboliten, Leukotriene, verschiedene Zytokine/Chemokine und Wachstumsfaktoren ausschütten (Kita und Gleich 1997). Diese Mediatoren bewirken z.B. in den Atemwegen die Kontraktion der glatten Muskulatur, erhöhte Gefäßpermeabilität, erhöhte Schleimsekretion und eine Hyperreaktivität der Atemwege. Sowohl eosinophile als auch basophile Granulozyten sind an IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen aber auch an der Immunabwehr parasitärer Infektionen beteiligt. Auch konnten erhöhte Chemokinkonzentrationen bei Erwachsenen mit atopischer Dermatitis gefunden werden (Lueng et al. 2003).

Diese Zusammenhänge sprechen dafür, dass durch die Exposition von Lungenepithelzellen mit aromatischen VOC chemotaktisch wirksame Mediatoren ausgeschüttet werden, die in niedrigeren Expositionskonzentrationen eher eine Rekrutierung von Monozyten, T-Lymphozyten sowie basophilen und eosinophilen Granulozyten (MCP-1-Wirkungen) bewirken. Dies könnte zu einer allergischen Reaktionslage führen. In hohen Expositionskonzentrationen kommt es eher zu einer verstärkten Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (IL-8-Wirkung), was vorrangig für entzündliche Prozesse spricht.

Bei den Expositionsexperimenten wurde auch das Zytokin IL-6 untersucht. Es bewirkt die Differenzierung von B-Lymphozyten in Antikörper-produzierende Plasmazellen, die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen (Hirano 1998). Weiterhin kann IL-6 das Gleichgewicht von Th1/Th2-Lymphozyten in Richtung Th2-Lymphozyten verschieben. Dies geschieht über eine Verstärkung der IL-4-Produktion und der Th2-Differenzierung bzw. über eine Hemmung der IFN- γ -Produktion und der Th1-Differenzierung. Möglicherweise ist die IL-6-Produktion von Lungenepithelzellen ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Th2-Antworten bei Asthma und

anderen Lungenerkrankungen (Diehl und Rincón 2002). In den hier durchgeführten Experimenten konnten jedoch in innenraumrelevanten Konzentrationen keine Veränderungen der IL-6-Freisetzung gefunden werden. Demnach wird die Freisetzung des Zytokins in diesen Konzentrationen durch VOC nicht beeinflusst.

Um natürliche Expositionssituationen nachzuempfinden, wurden verschiedene VOC-Mischungen hinsichtlich ihrer Effekte auf Lungenepithelzellen untersucht. Croute und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass sich die zytotoxischen Effekte von VOC-Mischungen im Vergleich zu den Einzelkomponenten additiv verhalten. Bei den hier durchgeführten Mischungs-Experimenten konnten jedoch keine zytotoxischen Effekte auf den Lungenepithelzellen beobachtet werden. Auch hier wurde demnach die Vitalität der Lungenepithelzellen selbst in hohen Expositionskonzentrationen nicht beeinflusst.

Die Exposition der Lungenepithelzellen mit der Alkanmischung führte wie auch die Exposition mit den einzelnen aliphatischen Verbindungen zu keinen Veränderungen der MCP-1-, IL-8- und IL-6-Freisetzung humaner Lungenepithelzellen. Die Aromatenmischung und die Gesamtmischung hingegen zeigten in hohen Expositionskonzentrationen toxische Effekte auf die MCP-1- und IL-6-Freisetzung. Diese toxischen Effekte traten im Vergleich zu den einzelnen aromatischen Verbindungen im gleichen Konzentrationsbereich auf und waren nicht stärker ausgeprägt. Eine Induktion der IL-8-Freisetzung konnte sowohl bei der Aromaten-, als auch bei der Gesamtmischung beobachtet werden, wobei die Aromatenmischung in einer Konzentration ab 1 g/m^3 , die Gesamtmischung erst in der höchsten Konzentration diese IL-8-Induktion bewirkte. Die schwächer ausgeprägte IL-8-Induktion bei der Aromatenmischung kann aus einer Überlagerung der Chlorbenzol-, Styrol- und m-Xylol-Effekte resultieren, bei der Gesamtmischung können zusätzlich überlagernde Effekte durch die aliphatischen Verbindungen eine Rolle spielen. Im Bezug auf die toxischen Effekte konnte demnach durch die Aromaten- und Gesamtmischung keine Verstärkung festgestellt werden.

Weiterhin trat in niedrigeren und damit innenraumrelevanten Expositionskonzentrationen der Aromaten- bzw. Gesamtmischung eine erhöhte MCP-1-Freisetzung

auf. Im Vergleich zu den Einzelverbindungen konnte dabei eine Verschiebung der MCP-1-Induktion in kleinere Konzentrationsbereiche, jedoch keine Addition der MCP-1-Induktionen der einzelnen Verbindungen beobachtet werden. Das verzögerte Auftreten der MCP-1-Induktion in hohen Konzentrationen der Gesamtmischung im Vergleich zur Aromatenmischung kommt möglicherweise durch Überlagerung mit den fehlenden Effekten der aliphatischen VOC zustande.

Unter Exposition von Lungenepithelzellen mit VOC-Mischungen, die aromatische Verbindungen enthielten, wurden wie bei den Einzelverbindungen Chemokine ausgeschüttet, die in hohen Konzentrationen eher entzündliche Reaktionen, in niedrigeren, innenraumrelevanten Konzentrationen neben entzündlichen auch allergische Prozesse fördern. Veränderungen der IL-6-Freisetzung konnten nicht beobachtet werden.

Diese Untersuchungen geben einen ersten Hinweis, dass die beobachteten Veränderungen der Zytokin-/Chemokinfreisetzung humaner Lungenepithelzellen für Aromaten spezifisch sein können, was an späterer Stelle noch diskutiert wird.

4.4 Untersuchung von Sekundäreffekten auf das Th1/Th2-Gleichgewicht am Beispiel von Chlorbenzol

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die primär an Lungenepithelzellen beobachteten Effekte sekundär einen Einfluss auf periphere Blutzellen, insbesondere auf das Th1/Th2-Gleichgewicht haben. Dabei zeigte sich, dass die 72-stündige Inkubation von PBMC mit Zellkulturüberständen Chlorbenzol-exponierter Lungenepithelzellen aus dem Zellkulturröhrchen-Modell zu einer verstärkten IL-13-Freisetzung führt. Diese Erhöhung trat in einem Konzentrationsbereich von $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, tendenziell bis $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ auf und damit im gleichen Konzentrationsbereich, in dem auch die MCP-1-Induktion bei Chlorbenzol-exponierten Lungenepithelzellen beobachtet wurde. Veränderungen der IFN- γ -Freisetzung traten nicht auf. Im Vergleich zu Chlorbenzol induzierte die 72-stündige Inkubation der PBMC mit Zellkulturüberständen von mit der Alkanmischung exponierten Lungenepithelzellen keine Veränderungen der IL-13- und IFN- γ -Freisetzung.

Die MCP-1-Expression steht mit der Entwicklung einer Th2-Antwort im Zusammenhang (Lu et al. 1998) und verstärkt die IL-4-Produktion von T-Lymphozyten (Karpus et al. 1997, Karpus et al. 1998). Da durch die Kinetik der IL-4-Produktion, die ein Maximum nach 24 h und danach einen raschen Abfall zeigt, eine Messung nach 72 h nicht mehr möglich war, wurde hier IL-13 als Th2-Zytokin untersucht. Die Entwicklung der Th2-Antwort durch MCP-1 kann durch direkten Einfluss dieses Chemokins auf T-Lymphozyten erfolgen oder aber indirekt durch Anlocken von Vorläuferzellen in eine Umgebung, in der sich verschiedene Zellen und Zytokine befinden, die für eine Th2-Polarisierung verantwortlich sind (Gu et al. 2000). Ein weiterer Mechanismus ist eine Verstärkung der Th2-Aktivität. Eine vermehrte Bildung von Th2-Zytokinen führt zur Anreicherung inflammatorischer Zellen in der Lunge und trägt zur Ausbildung von Entzündungen und Hyperreaktivität der Atemwege bei allergischem Asthma bei (Rose et al. 2003).

Eine Vermutung ist, dass MCP-1 an der Induktion der IL-13-Freisetzung durch Übertragung konditionierter Zellkulturüberstände auf PBMC beteiligt ist. Die Beteiligung weiterer von Lungenepithelzellen produzierter Mediatoren ist ebenso möglich. Somit könnte die in epidemiologischen Studien beobachtete Verschiebung der Th1/Th2-Balance sowie die verstärkte allergische Reaktionslage nach VOC-Exposition nicht über direkte Interaktion der VOC mit T-Lymphozyten erfolgen, sondern sekundär über Mediatoren, die von Lungenepithelzellen ausgeschüttet werden.

Auch diese Experimente bestätigen mögliche gruppenspezifische Reaktionen von aromatischen bzw. aliphatischen VOC. Die Untersuchung der Sekundäreffekte führte bei Chlorbenzol, nicht aber bei der Alkanmischung zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Antwort.

4.5 Einfluss von flüchtigen organischen Verbindungen auf humane Zellen im Transwell-Modell

Die Mediumsschicht hat einen Einfluss auf die Exposition von Zellen mit Gasen wie Ozon (Tarkington et al. 1994). Jedoch sind die bisher in der Literatur

beschriebenen Modelle zur Reduzierung der Mediumsschicht sehr kompliziert und aufwendig zu handhaben (wie im Kapitel 4.1 beschrieben). Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Zellkulturröhrchen Modell weiterentwickelt und eine Möglichkeit gefunden, auf relativ einfache Weise Zellen weitestgehend ohne Mediumsschicht mit flüchtigen Verbindungen zu exponieren. Dafür wurden Lungenepithelzellen auf der Membran von Transwell-Einsätzen kultiviert und nur von der Unterseite der Membran mit Medium versorgt. Auf der Membran lagen die Zellen weitestgehend ohne Medium vor. In diesem Zustand wurden die Zellen im geschlossenen System mit den flüchtigen Verbindungen exponiert.

Zunächst wurde am Beispiel von Chlorbenzol untersucht, ob sich die im Zellkulturröhrchen-Modell erzielten Ergebnisse zum Einfluss von VOC auf PBMC bestätigen lassen. Da sich in vorherigen Untersuchungen mit Lungenepithelzellen gezeigt hat, dass MCP-1 ein wichtiges, VOC-sensitives Chemokin ist, wurde neben IFN- γ , IL-13 und TNF- α auch MCP-1 untersucht. Aufgrund der Untersuchungen zu den Sekundäreffekten (IL-13-Induktion nach 72-stündiger Inkubation) wurden die Zellen nach 20-stündiger Expositionsdauer bis 72 h weiterinkubiert, um eventuelle spätere Reaktionen zu analysieren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass Chlorbenzol auch im Transwell-Modell zu keinen zytotoxischen Effekten auf PBMC führt. Veränderungen der Zytokinfreisetzung wurden im innenraumrelevanten Bereich weder nach 20 h noch nach 72 h beobachtet. Die höchste Expositionskonzentration von 100 g/m³ führte bei allen untersuchten Zytokinen/Chemokinen sowohl nach 20 h als auch nach 72 h zu immuntoxischen Effekten, die nach 72 h stärker ausgeprägt waren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Chlorbenzol-Exposition von PBMC im Transwell-Modell in der höchsten Expositionskonzentration zu einer Verstärkung der immuntoxischen Effekte führt. Im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich wurde die Chemokin-/Zytokinfreisetzung von PBMC ohne Mediumsschicht nicht beeinflusst. Das bestätigt die Annahme, dass VOC im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich primär nicht auf T-Lymphozyten

wirken. Die fehlende Beeinflussung der PBMC durch flüchtige Verbindungen kann deshalb nicht auf experimentelle Probleme wie schlechte Löslichkeit der VOC im Medium zurückgeführt werden.

Für die Untersuchungen der VOC-Effekte an Lungenepithelzellen wurden diese im Transwell-Modell mit den aromatischen Verbindungen Chlorbenzol, Styrol und m-Xylol sowie die Aromaten-, Alkan- und Gesamtmischung exponiert. Da die Transwell-Experimente relativ aufwendig sind, wurde aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen im Zellkulturröhrchen-Modell auf die Untersuchung der einzelnen aliphatischen Verbindungen verzichtet. Weiterhin wurden die Analysen auf die Chemokine MCP-1 und IL-8 beschränkt, da für die Messung der IL-6-Konzentration relativ große Mengen an Zellkulturüberstand nötig sind und im Transwell-Experiment nur wenig Zellkulturüberstand verfügbar ist.

Die Vitalitäts-Untersuchungen der einzelnen aromatischen Verbindungen zeigten, dass es auch im Transwell-Modell zu keinen direkt zytotoxischen Effekten an Lungenepithelzellen kommt. Die Mediumsschicht hat demnach hier keinen Einfluss auf die Zytotoxizität. Bezüglich der Veränderungen der Chemokinfreisetzung führte die Exposition humaner Lungenepithelzellen mit Styrol, m-Xylol oder Chlorbenzol in der höchsten Konzentration zu inhibitorischen Effekten auf die MCP-1-Freisetzung. Verglichen mit dem Zellkulturröhrchen-Modell war die MCP-1-Hemmung im Transwell-Modell bei allen aromatischen VOC stärker ausgeprägt. Das lässt auf eine stärkere Beeinträchtigung der funktionellen Aktivität der Lungenzellen durch die fehlende Mediumsschicht und damit möglicherweise höhere wirksame VOC-Konzentrationen schließen. Weiterhin kam es in hohen Expositionskonzentrationen zu einer verstärkten IL-8-Freisetzung, die bei Styrol und m-Xylol verglichen mit dem Zellkulturröhrchen-Modell in niedrigeren Expositionskonzentrationen auftrat, was auf eine Verstärkung der entzündlichen Reaktion auf den Lungenepithelzellen schließen lässt. Im Gegensatz dazu trat unter Chlorbenzol-Exposition die IL-8-Induktion im Transwell-Modell in einer höheren Expositionskonzentration verglichen mit dem Zellkulturröhrchen-Modell auf, was mit einer fehlenden Mediumsschicht nicht erklärt werden kann. Vermutlich spielen hier andere Faktoren eine Rolle.

Im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich und darüber hinaus ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $1 \text{ g}/\text{m}^3$) trat unter Styrol- und m-Xylol-Exposition eine MCP-1-Induktion auf. Im Vergleich zum Zellkulturröhrchen-Modell war der Bereich der MCP-1-Induktion in kleinere Konzentrationen ausgeweitet. Allerdings kam es zu keiner Verstärkung der Intensität der MCP-1-Induktion. Möglicherweise ist die Freisetzung dieses Chemokins nur begrenzt möglich bzw. durch Bindung an Rezeptoren oder durch Abbauprozesse nur beschränkt nachweisbar. Im Gegensatz zu dem ähnlichen Verhalten von Styrol und m-Xylol wich Chlorbenzol in seiner Wirkung etwas ab. Hier kam es im Vergleich zum Zellkulturröhrchen-Modell zu einer Ausdehnung der MCP-1-Induktion in höhere Konzentrationsbereiche. Die Intensität der MCP-1-Induktion war ähnlich wie die im Zellkulturröhrchen-Modell beobachtete.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es einen Einfluss der Mediumsschicht gibt. Es kam unter Styrol- und m-Xylol-Exposition zu einer Verschiebung der MCP-1- und IL-8-Induktion in kleinere Konzentrationsbereiche. Demgegenüber zeigte Chlorbenzol neben der Verschiebung der IL-8-Induktion in höhere Konzentrationen auch eine Ausdehnung der MCP-1-Induktion in höhere Expositionskonzentrationen. Bei allen Verbindungen trat die MCP-1-Induktion im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich auf. Auch im Transwell-Modell konnten die inflammatorischen Einflüsse der aromatischen Verbindungen bestätigt werden, wobei auch hier die Lungenepithelzellen auf Chlorbenzol empfindlicher reagierten als auf Styrol und m-Xylol (Chlorbenzol > Styrol > m-Xylol).

Im Zellkulturröhrchen-Modell konnte mittels gaschromatografischen Untersuchungen gezeigt werden (Wichmann et al. 2005), dass sich das Verhältnis der VOC-Konzentration im Medium zur VOC-Konzentration in der Gasphase für Toluol ungefähr wie 1:400 verhält (andere aromatische VOC verhalten sich ähnlich). Demgegenüber lassen die Ergebnisse der VOC-Exposition humaner Lungenepithelzellen ohne Mediumsschicht vermuten, dass höhere VOC-Konzentrationen an den Lungenepithelzellen einwirken.

Da die aromatischen Verbindungen zu einer reproduzierbaren, jedoch nur schwachen Induktion der MCP-1-Freisetzung führten, erfolgte am Beispiel von Chlorbenzol zusätzlich ein Nachweis der MCP-1 mRNA. Dabei konnte in einem Konzentrationsbereich von $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $100 \text{ mg}/\text{m}^3$ eine verstärkte MCP-1 mRNA-Expression beobachtet werden. Diese Induktion trat in einem Bereich auf, indem auch auf Proteinebene eine Erhöhung der MCP-1-Freisetzung zu beobachten war. Allerdings war die MCP-1-Freisetzung auf Proteinebene auch in höheren Konzentrationen noch verstärkt ($100 \text{ mg}/\text{m}^3$ bis $1 \text{ g}/\text{m}^3$). Möglich wäre, dass durch die lange Expositionszeit eine Funktionseinschränkung der Zellen auf Ebene der mRNA-Expression auftritt, die auf Proteinebene noch nicht sichtbar ist. Eine weitere Ursache könnte die Tatsache sein, dass die Untersuchungen auf Proteinebene einen Zeitraum von 20 h umfassen und somit alles, was in 20 h produziert wurde, in der Summe gemessen wird. Die Untersuchung mittels PCR ist demgegenüber eine Momentaufnahme von dem Zustand, in dem sich die Zellen nach 20 h befinden.

Es konnte somit der MCP-1-induzierende Einfluss von Chlorbenzol in innenraumrelevanten Konzentrationen auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden.

Die Untersuchungen der verschiedenen Mischungen zeigten, dass es unter Exposition mit der Alkanmischung und der Aromatenmischung auf Lungenepithelzellen zu keinen zytotoxischen Effekten kommt. Im Gegensatz dazu konnte bei Exposition mit der Gesamtmischung in der höchsten Expositionskonzentration von $100 \text{ g}/\text{m}^3$ eine deutliche Hemmung der Vitalität beobachtet werden. Es zeigte sich hier erstmals eine direkte Beeinflussung der Vitalität humaner Lungenepithelzellen. Vermutlich kommt diese durch die fehlende Mediumsschicht und die gleichzeitige starke VOC-Belastung der Zellen in dieser Expositionskonzentration zustande.

Bezüglich der Veränderungen der Chemokinfreisetzung von Lungenepithelzellen zeigte sich, dass die Alkanmischung in der höchsten Konzentration zu einer Hemmung der MCP-1-Freisetzung führt, die im Zellkulturröhrchen-Modell nicht

beobachtet werden konnte. Dies spricht wiederum für einen Einfluss der Mediumsschicht.

Sowohl die Aromatenmischung als auch die Gesamtmischung führten in einer Expositionskonzentration von 100 g/m^3 zu einer starken Hemmung der MCP-1-Freisetzung. Auch konnte bei beiden Mischungen in hohen Expositionskonzentrationen eine Induktion der IL-8-Freisetzung beobachtet werden. Dabei trat die IL-8-Induktion durch die Aromatenmischung im Vergleich zur Gesamtmischung in etwas niedrigeren Konzentrationen auf und war etwas stärker ausgeprägt, was für überlagernde Effekte durch die aliphatischen Verbindungen spricht. In innenraum-relevanten Konzentrationen kam es zu einer Erhöhung der MCP-1-Freisetzung, die im Vergleich zur Gesamtmischung bei der Aromatenmischung etwas stärker ausgeprägt war. Auch hier konnte wie im Zellkulturröhrchen-Modell keine Addition der Effekte der Einzelverbindungen, sondern eine Ausweitung der MCP-1-Induktion in kleinere Konzentrationsbereiche beobachtet werden. Die geringere Intensität der MCP-1-Induktion bei der Gesamtmischung kann dabei wieder durch eine Überlagerung mit den fehlenden Effekten der aliphatischen Verbindungen zustande kommen. Insgesamt reagierten Aromaten- und Gesamtmischung sehr ähnlich. Die Intensitäten der toxischen und MCP-1-induzierenden Effekte waren aber bei der Gesamtmischung geringer ausgeprägt.

Die Exposition von Lungenepithelzellen mit der Aromaten- bzw. Gesamtmischung führte auch im Transwell-Modell zu inflammatorischen und potenziell allergiefördernden Reaktionen, die im Vergleich zu den Einzelsubstanzen in geringeren Expositionskonzentrationen auftraten, aber nicht stärker ausgeprägt waren.

4.6 Untersuchung von Sekundäreffekten durch Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen aus dem Transwell-Modell auf PBMC

Die im Transwell-Modell erhaltenen Zellkulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen wurden ebenfalls auf ihr Potenzial zur Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes bei PBMC untersucht. Die Experimente wurden für

Styrol, m-Xylol und Chlorbenzol durchgeführt, da diese in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen auf Lungenepithelzellen zu einer MCP-1-Induktion führen. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der Alkanmischung, die diese Effekte nicht zeigt.

Nach 72-stündiger Inkubation mit den Zellkulturüberständen Styrol-exponierter Lungenepithelzellen konnte in einem Konzentrationsbereich von 10 mg/m³ bis 100 mg/m³, tendenziell bereits ab 1 mg/m³ eine Induktion der IL-13-Freisetzung beobachtet werden. Auch bei Chlorbenzol kam es nach 72 h zu einer IL-13-Induktion, die in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/m³ bis 10 mg/m³ auftrat. Die Intensitäten der IL-13-Induktion waren bei Styrol und Chlorbenzol gleich. M-Xylol und die Alkanmischung führten zu keinen Veränderungen der IL-13-Freisetzung. Auch traten bei keinen der getesteten Verbindungen Veränderungen der IFN-γ-Freisetzung auf.

Es zeigte sich, dass die von den Lungenepithelzellen unter Styrol- und Chlorbenzol-, nicht aber unter m-Xylol-Exposition ausgeschütteten Mediatoren zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung einer Th2-Antwort führen. Für beide Verbindungen lag dabei die IL-13-Induktion in dem Bereich der jeweiligen MCP-1-Induktion.

Dass m-Xylol keine Sekundäreffekte auf Blutlymphozyten zeigte, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen war die MCP-1-Induktion unter m-Xylol-Exposition verglichen mit Styrol und Chlorbenzol schwächer ausgeprägt und könnte demnach für eine sekundäre IL-13-Induktion nicht ausreichen. Andererseits können neben MCP-1 auch noch andere Mediatoren für die IL-13-Induktion verantwortlich sein, die im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht wurden.

Um zu überprüfen, ob MCP-1 der entscheidende Mediator für die beobachtete IL-13-Induktion ist, wurde der Effekt von humanem rekombinantem MCP-1 auf PBMC untersucht. Dabei konnten weder nach 24 h noch nach 72 h Veränderungen der IL-13- und IFN-γ-Freisetzung beobachtet werden. MCP-1 allein scheint demnach nicht zu einer IL-13-Induktion auf peripheren Blutzellen zu führen. Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass MCP-1 an der Induktion der IL-13-Antwort

beteiligt ist, deutet jedoch darauf hin, dass an den Sekundäreffekten auch andere Mediatoren beteiligt sein müssen.

Beispiele für solche Mediatoren sind die Chemokine RANTES oder Eotaxin. Beides sind Chemokine, die von Lungenepithelzellen produziert werden und an der Chemotaxis und Aktivierung verschiedener Immunzellen wie z.B. Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen beteiligt sind. Für beide Chemokine ist bekannt, dass sie bei allergischen Erkrankungen in verstärktem Maß gebildet werden (Reale et al. 2001, Conroy et al. 2001). Chemokine wirken über Chemokin-Rezeptoren. Ein wichtiger Chemokin-Rezeptor auf Th2-Zellen ist der Chemokin-Rezeptor 3 (CCR3) (Kaplan et al. 2001, Sallusto et al. 2000), an den Eotaxin oder RANTES binden können (Romagnani 2001). Demnach könnten auch Eotaxin oder RANTES an der sekundären Aktivierung von Th2-Zellen beteiligt sein. Zur Klärung dieser Hypothese werden derzeit in weiterführenden Experimenten Proteom-Untersuchungen von Zellkulturüberständen VOC-exponierter Lungenepithelzellen durchgeführt.

4.7 VOC-Exposition kokultivierter PBMC und Lungenepithelzellen

Aufgrund der beobachteten Sekundäreffekte durch die Übertragung der Kulturüberstände VOC-exponierter Lungenepithelzellen sollte nun versucht werden, in einem neuen experimentellen Ansatz Lungenepithelzellen und PBMC gleichzeitig mit VOC im Transwell-Modell zu exponieren. Die Etablierung dieses Modells wurde mit Chlorbenzol durchgeführt, da auf den Lungenepithelzellen unter Chlorbenzol-Exposition die stärksten Effekte beobachtet werden konnten. Die PBMC waren dabei durch die Membran der Transwell-Einsätze von den Lungenepithelzellen getrennt. Durch die Membran konnte ein Austausch von Zytokinen/Chemokinen erfolgen.

Entgegen den Erwartungen kam es dabei im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich zu keinem Zeitpunkt zu Veränderungen der IL-13-, IFN- γ - und MCP-1-

Freisetzung. Durch hohe Chlorbenzol-Konzentrationen konnten inhibitorische Effekte auf die IL-13-, IFN- γ - und MCP-1-Freisetzung induziert werden.

Im Vergleich mit der Exposition von Lungenepithelzellen allein konnte nach 20 h keine Induktion der MCP-1-Freisetzung beobachtet werden. Auch trat die im Transferexperiment von Zellkulturüberständen VOC-exponierter Lungenepithelzellen auf PBMC beobachtete sekundäre IL-13-Induktion nach 72 h nicht auf. Für diese fehlenden Effekte können mehrere Faktoren verantwortlich sein. Zum einen war auffällig, dass die MCP-1-Konzentration bei Kokultivierung von PBMC und Lungenepithelzellen, die im Mittel 14800 pg/ml betrug, wesentlich höher war als bei der Exposition von Lungenepithelzellen allein (im Mittel 4070 pg/ml). Dies kann durch eine zusätzliche MCP-1-Produktion der PBMC erklärt werden, da auch für Lymphozyten eine MCP-1-Freisetzung beschrieben wurde (Leonard et al. 1991). Weiterhin lassen sich Monozyten durch TNF- α zur MCP-1-Freisetzung stimulieren (Yoshida et al. 2001), produzieren aber selbst auch TNF- α sowohl unstimuliert, als auch nach IFN- γ -Stimulation (Braun et al. 2000). In vorherigen Experimenten konnte beobachtet werden, dass innenraumrelevante Chlorbenzol-Konzentrationen bei PBMC keine veränderte MCP-1-Freisetzung zeigen. Es wird deshalb vermutet, dass durch die von PBMC freigesetzte hohe MCP-1-Konzentration die bei den Lungenepithelzellen hervorgerufene MCP-1-Induktion messtechnisch nicht mehr nachweisbar war. Eine Lösung für dieses Problem kann die Verwendung von isolierten Lymphozyten oder T-Zellen für die Kokultur-Experimente sein. Eine weitere Erklärung für die fehlende MCP-1-Induktion wäre, dass Monozyten und Lymphozyten TNF- α produzieren, welches wiederum die Lungenepithelzellen zur MCP-1-Freisetzung anregt. Es wäre demnach möglich, dass die TNF- α -Konzentration in Bereiche ansteigt, in denen eine zu starke Stimulation der Lungenepithelzellen bewirkt wird, so dass eine weitere Aufregulierung der MCP-1-Produktion durch zusätzliche Noxen nicht mehr möglich ist. Um dieses Problem zu umgehen, kann man einerseits auf eine zusätzliche Stimulation mit TNF- α verzichten, andererseits die PBMC weniger stimulieren und demnach die Antikörper gegen CD3/CD28 in geringeren Konzentrationen einsetzen.

Den beschriebenen Untersuchungen zufolge war die VOC-Exposition von kokulti-vierten Lungenepithelzellen und PBMC in der hier beschriebenen Weise zwar möglich, jedoch ließen sich VOC-Effekte möglicherweise wegen der gewählten experimentellen Bedingungen nicht nachweisen. Weitere Modifikationen des Modells sind notwendig.

4.8 Strukturbedingte Unterschiede in der Wirkung flüchtiger organischer Verbindungen

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten, dass es deutliche Gruppenzugehörigkeiten in den Wirkungen der untersuchten VOC gibt. Keine der aliphatischen Verbindungen zeigte in innenraumrelevanten Konzentrations-bereichen Effekte, weder auf PBMC noch auf Lungenepithelzellen. Lediglich einige der Alkane führten in der höchsten Expositionskonzentration im Vergleich zu den aromatischen Verbindungen zu schwachen immuntoxischen Effekten.

Demgegenüber konnten bei allen untersuchten aromatischen Verbindungen und Mischungen, die diese Verbindungen enthielten, in innenraumrelevanten Konzentrationsbereichen verschiedene Effekte auf Lungenepithelzellen und sekundär auch auf PBMC beobachtet werden. Diese Untersuchungen legen nahe, dass es sich um strukturbedingte Effekte handelt. Abbildung 38 stellt die Strukturformeln der untersuchten Verbindungen dar.

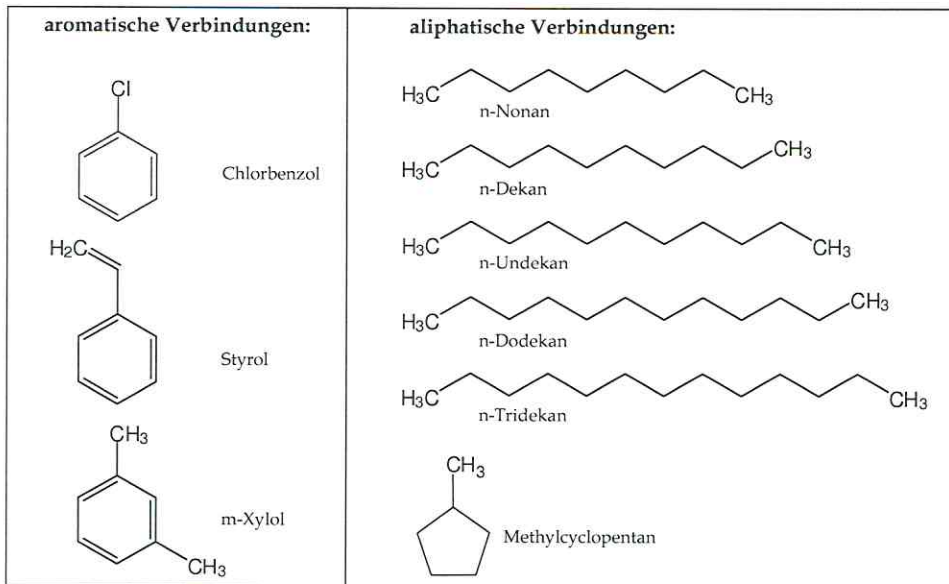


Abbildung 38: Strukturformeln der untersuchten flüchtigen organischen Verbindungen.

Die Abbildung zeigt, dass alle Verbindungen, die zu Effekten auf Lungenepithelzellen führten, ungesättigte Strukturen enthalten. Möglich wäre, dass diese Verbindungen aufgrund des Vorhandenseins von Benzolringen ihre Wirkung über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) entfalten. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen cytosolischen Transkriptionsfaktor, der an der Aktivierung von Genen, die z.B. für Metabolisierungsenzyme wie Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) kodieren, und somit an der Entgiftung von Xenobiotika beteiligt ist (Sutter und Greenlee 1992). Der AhR kann aber auch als Inhibitor für die Expression von Genen wirken (Kharat und Saatcioglu 1996). Fahy und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass periphere Blutzellen, die mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen aus Dieselruß inkubiert wurden, auf Transkriptionsebene Veränderungen der IL-8-, MCP-1- und RANTES-mRNA-Bildung zeigten. Diese Effekte wurden von Fahy und Mitarbeitern im Zusammenhang mit dem AhR, insbesondere einer Aktivierung oder Inhibierung von Genen, diskutiert. Wichtige und gut untersuchte Liganden dieses Rezeptors sind polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. Die Metabolisierung dieser lipophilen Substanzen erfolgt u.a. über CYP1A1-Enzyme. Diese Enzyme kommen in der Leber, aber auch in der

Lunge und anderen Organen vor (McLemore et al. 1990, McKinnon et al. 1991, Shimada et al. 1996). Es ist gut untersucht, dass polycyclische aromatische Verbindungen diese Enzyme über den AhR-vermittelten Mechanismus induzieren können (Whitlock und Denison 1995). Die Lunge ist ebenfalls ein Target-Organ für AhR-Liganden (Martinez et al. 2002). Von Hukkanen und Mitarbeitern (2000) wurde die AhR-vermittelte Wirkung von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), einem weiteren AhR-Liganden, auf die Lungenepithel-Zelllinie A549 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass AhR-vermittelte Genaktivierungen (z.B. CYP1A1) durch TCDD in den Lungenepithelzellen auftraten. Zhao und Mitarbeiter (2006) konnten weiterhin zeigen, dass auch Verbindungen mit nur einem Benzolring, z.B. N-(3,4-Dichlorophenyl)-N',N'-dimethylharnstoff (Diuron) an den AhR binden und den AhR-vermittelten Signalweg aktivieren bzw. hemmen.

Somit ist es möglich, dass auch die in dieser Arbeit untersuchten aromatischen Verbindungen über den AhR wirken, was z.B. durch Untersuchungen der CYP1A1 mRNA-Expression analysiert werden kann. Allerdings würde dies nicht erklären, warum die beobachteten Effekte auf Lungenepithelzellen, nicht jedoch auf PBMC zu finden waren, da für beide Zelltypen AhR-vermittelte Reaktionen beschrieben sind.

Eine weitere Möglichkeit ist die Wirkung über eine Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors κ B (NF κ B). Es ist bekannt, dass polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe über diesen Weg eine IL-8 Expression in Lungenepithelzellen induzieren können (Pei et al. 2002). Weiterhin enthalten die Transkriptionspromotoren von MCP-1 und RANTES Bindungsstellen für NF κ B (Ueda et al. 1997, Rovin et al. 1995, Thomas et al. 1998, Garofalo et al. 1996).

Eine weitere Tatsache, die zu den gruppenspezifischen Unterschieden beiträgt, ist, dass das Lösungsverhalten der Alkane bzw. Aromaten im Medium unterschiedlich ist. Gaschromatografische Analysen zeigten, dass die hier untersuchten aromatischen Verbindungen in ähnlichen Verhältnissen wie auch Toluol im Medium angereichert werden (Mühlenberg 2002). Demgegenüber zeigten die

Alkane eine Anreicherung, die etwa einem Zwanzigstel der Konzentrationen der Aromaten entsprach. Die verringerte Aufnahme der Alkane ins Medium erklärt aber nicht, warum es zu keinen Veränderungen der Zytokin-/Chemokin-freisetzung von Lungenepithelzellen kam, mögliche Effekte hätten vielmehr in höheren Expositionskonzentrationen auftreten müssen. Außerdem konnte in Versuchen, wo die Zellen weitestgehend ohne Medium vorlagen, ebenfalls keine Veränderung der funktionellen Aktivität der Lungenepithelzellen durch aliphatische Verbindungen gefunden werden. Das lässt eher auf funktionelle Unterschiede dieser Gruppen in der Wirkung auf Zellen, weniger auf methodische Probleme schließen.

4.9 Bewertung von Richt- und Orientierungswerten der Innenraumluft

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass von den flüchtigen Verbindungen Chlorbenzol, Styrol und m-Xylol sowie von Mischungen, die diese Verbindungen enthalten, Gesundheitsrisiken ausgehen können. Effekte konnten sowohl auf Lungenepithelzellen, als auch sekundär auf PBMC nachgewiesen werden. Bezüglich der im Kapitel 1.2 beschriebenen Regelungen zur Qualitätsbewertung der Innenraumluft können verschiedene Schlussfolgerungen gezogen werden.

Die Richt- und Orientierungswerte für die Bewertung von Styrol und m-Xylol in der Innenraumluft liegen zwischen $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und $57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (AGÖF 2005, Krause et al. 1991, Ad-hoc-Arbeitsgruppe 1996, Schlechter et al. 2004). Es sind Werte, die im Innenraum als „normal“ gelten bzw. bei Überschreitung auf eine Schadstoffquelle hinweisen. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass bereits nach 20-stündiger Exposition Styrol- bzw. m-Xylol-Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ die Freisetzung von Entzündungsmediatoren induzieren. Diese Konzentration liegt nur wenig über dem Orientierungswert für die Innenraumbelastung. Da die Aufenthaltszeit im Innenraum wesentlich länger ist und es somit zu Dauerbelastungen kommt, könnten gesundheitsschädigende Effekte auch in Konzentrationen unterhalb der Orientierungswerte auftreten.

Für Chlorbenzol existieren solche Orientierungswerte nicht. Hier bezieht man zur Bewertung der Innenraumluft die MAK-Werte ein. Man geht davon aus, dass mit Gesundheitsrisiken nicht gerechnet wird, wenn die Konzentration von Chlorbenzol unter $460 \mu\text{g}/\text{m}^3$ und damit 1% des MAK-Wertes liegt (Körner et al. 2003). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass bereits ab einer Chlorbenzol-Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ inflammatorische Effekte auftreten, was gegen dieses Bewertungskonzept spricht. Für Styrol und m-Xylol liegen die Orientierungswerte unter Einbeziehung der MAK bei $850 \mu\text{g}/\text{m}^3$ für Styrol bzw. $4400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ für m-Xylol und sind demnach für die Bewertung der Innenraumluft ebenfalls nicht geeignet.

Da im Innenraum eine Vielzahl von flüchtigen Verbindungen vorliegen, können im Allgemeinen die Einzelverbindungen nicht separat betrachtet werden. Die Untersuchungen verschiedener VOC-Mischungen zeigten, dass es verglichen mit den Einzelverbindungen in kleineren Expositionskonzentrationen (ab $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) zu Effekten kam. Die Orientierungswerte für TVOC besagen, dass ein Zielwert von $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bis $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ angestrebt werden sollte (Seifert 1999). Diese Werte beinhalten die gesamte VOC-Belastung im Innenraum und demnach auch einige VOC, von denen vermutlich kein gesundheitliches Risiko ausgeht. Außerdem sind diese Werte weniger für eine gesundheitliche Bewertung geeignet, sondern sprechen bei Überschreitung für das Vorhandensein einer Schadstoffquelle. Dementsprechend sind diese Werte als Zielwerte ebenfalls nicht zweckmäßig, da eine gesundheitliche Gefährdung nicht ausgeschlossen werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In einem hoch industrialisierten Land wie Deutschland verbringen Menschen die meiste Zeit in Räumen. Somit kann die Qualität der Innenraumluft, insbesondere eine Schadstoffbelastung, die Gesundheit des Menschen beeinflussen. Epidemiologische Studien zeigten, dass die Schadstoffbelastung der Innenraumluft im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen und Allergien steht. Wichtige Schadstoffe im Innenraum sind flüchtige organische Verbindungen (VOC), die z.B. durch Renovierungsarbeiten und Verlegung von Fußbodenbelägen in die Innenraumluft gelangen.

Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss von ausgewählten VOC hinsichtlich der Induktion von immunmodulierenden und inflammatorischen Prozessen zu untersuchen. Dafür wurden die aromatischen Verbindungen Chlorbenzol, Styrol, m-Xylol, die aliphatischen Verbindungen n-Nonan, n-Dekan, n-Undekan, n-Dodekan, n-Tridekan und Methylcyclopentan sowie verschiedene VOC-Mischungen ausgewählt. Schwerpunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen zum Einfluss von VOC auf periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC), insbesondere auf die Th1/Th2-Balance zur Abklärung möglicher adjuvanter allergiefördernder Effekte sowie Untersuchungen von VOC-Effekten auf Lungenepithelzellen (Zelllinie A549). Dafür wurden ein bestehendes *In vitro*-Modell modifiziert und neue experimentelle Modelle etabliert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die ausgewählten VOC auf die Zytokinfreisetzung von PBMC keinen Einfluss hatten, der auf ein erhöhtes Allergierisiko durch diese Chemikalien hinweist. Es ist daher zu vermuten, dass PBMC nicht die primären Targetzellen für VOC sind.

Da flüchtige Chemikalien mit der Atemluft in die Lunge gelangen und dort primär Kontakt mit Epithelzellen haben, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eingeatmete VOC inflammatorische Reaktionen in Lungenepithelzellen auslösen. Durch Freisetzung von reaktiven Mediatoren durch die Lungenepithelzellen

könnten sekundär Blutzellen in ihrer Zytokinfreisetzung verändert werden. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden experimentelle Modelle entwickelt, die eine VOC-Exposition adhärenter Lungenepithelzellen ermöglichen sowie die Untersuchung von Sekundäreffekten auf PBMC erlauben.

Die Exposition von Lungenepithelzellen mit Chlorbenzol, Styrol und m-Xylol sowie mit Mischungen, die diese Verbindungen enthalten, führte in innenraumrelevanten Konzentrationen zu einer verstärkten Freisetzung des Chemokins MCP-1, welches an entzündlichen und allergischen Prozessen beteiligt ist. Hohe Konzentrationen dieser VOC führten zu einer Induktion der IL-8-Freisetzung. Dieses Chemokin ist an entzündlichen Reaktionen beteiligt. Die untersuchten Alkane (C₉-C₁₃-Alkane und Methylcyclopentan) zeigten keinen Einfluss auf die MCP-1- und IL-8-Freisetzung. Zellkulturüberstände Chlorbenzol- und Styrol-exponierter Lungenepithelzellen führten bei Inkubation mit peripheren Blutzellen zu einer verstärkten IL-13-Freisetzung. Das weist auf eine verstärkte Th2-Antwort hin, die für allergisches Geschehen kennzeichnend ist. Für m-Xylol konnte dieser Sekundäreffekt nicht beobachtet werden.

Für die hier untersuchten aliphatischen Verbindungen (C₉-C₁₃-Alkane, Methylcyclopentan) konnten im innenraumrelevanten Konzentrationsbereich mittels der hier angewandten Modelle keine Effekte beobachtet werden, die für ein Gesundheitsrisiko sprechen. Demgegenüber waren unter Styrol-, Chlorbenzol- und m-Xylol-Exposition potenziell gesundheitsgefährdende Effekte nachweisbar (Freisetzung von entzündungsauslösenden und allergiefördernden Mediatoren), die im Fall von Chlorbenzol und Styrol nicht auf Lungenepithelzellen beschränkt, sondern sekundär auch auf PBMC übertragbar waren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass entzündliche Reaktionen der Atemwege eher durch aromatische VOC ausgelöst werden. Von Farben, Lacken und Klebstoffen mit höherem Anteil aromatischer Verbindungen könnte somit ein Risiko für entzündliche Atemwegserkrankungen ausgehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aas, K., Aberg, N., Bachert, C. et al. (1997). European Allergy White Paper. Allergic diseases as a public health problem. Brussels: UCB Institute of Allergy.
- Ad-hoc-Arbeitsgruppe aus Mitgliedern der Innenraumlufthygiene-Kommission (IRK) des Umweltbundesamtes und des Ausschusses für Umwelthygiene der AGLMB (1996). Richtwerte für die Innenraumluft: Basisschema. Bundesgesundheitsblatt 11, 422-426.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR (2005). ToxFAQs™ Xylene. Internetseite: www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR (2005). ToxFAQs™ Chlorobenzene. Internetseite: www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR (2005). ToxFAQs™ Styrene. Internetseite: www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html.
- AGÖF – Arbeitsgemeinschaft ökologischer Forschungsinstitute e.V. (2005). AGÖF-Orientierungswerte für Inhaltsstoffe von Raumluft und Hausstaub. Internetseite: www.agoef.de.
- Ait-Aissa, S., Porcher, A., Arriga, C., and Lambre, C. (2000). Activation of the Hsp promotor by environmental inorganic and organic chemicals: relationship between cytotoxicity and lipophilicity. Toxicology 145: 147-157.
- Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2003). Role of regulatory T cells in allergy and asthma. Curr. Opin. Immunol. 15: 627-633.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Crameri, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., and Akdis C. A. (2004). Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. J. Exp. Med. 199 (11): 1567-1575.
- Alam, R., Forsythe, P., Stafford, S., Heinrich, J., Bravo, R., Proost, P., and Van Damme, J. (1994). Monocyte chemotactic protein 2, monocyte chemotactic protein 3, and fibroblast induced cytokine: Three new chemokines induce chemotaxis and activation of basophils. J. Immunol. 153: 3155-3159.

- Alam, R., Forsythe, P., Stafford, S., Lett-Brown, M. A., and Grant, J. A. (1992). Macrophage inflammatory protein-1 α activates basophils and mast cells. *J. Exp. Med.* 176: 781-786.
- Alam, R., Lett-Brown, M. A., Forsythe, P. A., Anderson-Walters, D. J., Kenamore, C., Kormos, C., and Grant, J. A. (1992). Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils. *J. Clin. Invest.* 89: 723.
- Alink, G. M., van der Hoeven, J. M. C., Debets, F. M. H., van der Ven, W. S. M., and Koeman, J. H. (1979). A new exposure model for in vitro testing of effects of gaseous pollutants on mammalian cells by means of gas diffusion through plastic films. *Chemosphere* 2: 63-73.
- Angerer, J., Schildbach, M., Kramer, A. (1998). S-p-toluyllmercapturic acid in the urin of workers exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure. *Arch. Toxikol.* 72: 119-123.
- Ashley, D. L., Bonin, M. A., Cardinali, F. L., McCraw, J. M., and Wooten, J. V. (1996). Measurement of volatile organic compounds in human blood. *Environ. Health. Perspect.* 104 (5): 871-877.
- Aufderheide, M. (2005). Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57: 213-226.
- Aufderheide, M. and Mohr, U. (1999). CULTEX® - a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface. *Exp. Toxic. Pathol.* 51: 489-490.
- Aufderheide, M., and Mohr, U. (2000). CULTEX® - an alternative technique for the cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Exp. Toxic. Pathol.* 52: 265-270.
- Baggiolini, M. (1993). Chemotaktik and inflammatory cytolines: CXC and CC proteins. In: *The Chemokines: Biology of the Inflammatory Peptide Supergene Family*. Lindley, I. J. D., Westwick, J., and Kunkel, S. (Hrsg.). Adv.-Exp.-Med. Biol. Plenum Press, New York: 1-11.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* Vol. 392: 565-568.
- Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters* 307 (1): 97-101.
- Baggiolini, M. and Dahinden, C. A. (1994). CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today* 15: 127-130.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55: 97-179.
- Baker, F. D. and Tumasonis, C. F. (1971). Modified roller drum apparatus for analysing effects of pollutant gases on tissue culture systems. *Atmos. Environ.* 5: 891-893.

- Bals, R., Weiner, D. J., and Wilson, J. M. (1999). The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* 103: 303-307.
- Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F., and Kopf, M. (1998). Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr. Biol.* 8: 669-672.
- Bazzoni, F., Cassatella, M. A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., and Baggiolini, M. (1991). Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J. Exp. Med.* 173: 771-774.
- Beißwenger, C. (2005). Inaugural-Dissertation: Modulation der angeborenen Immunität der Lunge durch Umwelteinflüsse und allergische Entzündung. an der Philipps-Universität Marburg.
- Berndt, J. (2002). Diplomarbeit: Immunmodulation durch flüchtige organische Verbindungen. Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig.
- Bischoff, S. C., Krieger, M., Brunner, T., and Dahinden, C. A. (1992). Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J. Exp. Med.* 125: 1271.
- Bluestone, J. A. (1995). New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 2: 555-559.
- Bommel, H., Li-Weber, M., Serfling, E., and Duschl, A. (2000). The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 105: 796-802.
- Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., and Aubry, J. P. (1996). Regulation of human IgE synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 796: 59-71.
- Boring, L., Gosling, J., Chensue, S. W., Kunkel, S. L., Farese, R. V. J., Broxmeyer, H. E., and Charo, I. F. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type I (Th I) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100: 2552-2561.
- Braun, M. C., Lahey, E., Kelsall, B. L. (2000). Selective Suppression of IL-12 Production by Chemoattractants. *J. Immunol.* 164 (6): 3009-3017.
- BUND Arbeitskreis Umweltchemikalien Toxikologie (1995). Dicke Luft in der guten Stube. Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland e.V., BUNDpositionen 29, Berlin, 1. Auflage.
- Campbell, E. M., Charo, I. F., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Boring, L., and Gosling, J. et al. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced

- bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2^{-/-} mice: the role of mast cells. *J. Immunol.* 163: 2160-2167.
- Cardile, V., Jiang, X., Russo, A., Casella, F., Renis, M., and Bindoni, M. (1995). Effects of ozone on some biological activities of cells in vitro. *Cell. Biol. Toxicol.* 11 (1): 11-21.
- Carneiro, J., Stewart, J., Coutinho, A., and Coutinho, G. (1995). The ontogeny of class-regulation of CD4⁺ T lymphocyte populations. *Int. Immunol.* 7 (8): 1265-1277.
- Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., and Springer, T. A. (1994). Monocyte chemoattractant protein I acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 3652-3656.
- Casolaro, V., Steindler, C., Ono, S. J., and Georas, S. N. (1997). Molecular mechanisms of interleukin-4 production. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 10: 1-7.
- Ceuppens, J. L., Van Gool, S. W., Bullens, Rafiq, K., and Kasran, A. (1999). Regulation of Th2 Cytokine Production by Human Peripheral Blood T Lymphocytes. *ACI International* 11(4): 118-125.
- Cheminfo – Chemical Profiles Created by CCOHS (Canadian Centre for Occupational Health and Safety). Internetseite: www.ccohs.ca.
- Connell, D. W., Braddock, R. D., and Mani, S. V. (1993). Prediction of the partition coefficient of lipophilic compounds in the air – mammal tissue system. *Sci. Total Environ.*: 1383-1396.
- Conroy, M.D., Williams, T.J. (2001). Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir. Res.* 2: 150-156.
- Conti, P. and DiGioacchino, M. (2001). MCP-1 and RANTES Are Mediators of Acute and Chronic Inflammation. *Allergy and Asthma Vol. 2* (3): 133-137.
- Cooke, T. F. (1991). Indoor air pollutants. A literature review. *Rev. Environ. Health* 9, 137-160.
- Croute, F., Poinot, J., Gaubin, Y., Beau, B., Simon, V., Murat, J. C., Soleilhavoup, J. P. (2001). Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. *Biochimia et Biophysica Acta* 1591: 147-155.
- D'Amato, G., Liccardi, G., and Cazzola, M. (1994). Environment and development of respiratory allergy. I. Outdoors. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 49: 406-411.
- D'Amato, G., Liccardi, G., and D'Amato, M. (1994). Environment and development of respiratory allergy. II. Indoors. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 49: 412-420.

- Daser, A., Meissner, N., Herz, U., and Renz, H. (1995). Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Current Opinion in Immunology* 7: 762-770.
- Dayeh, V.R., Bols, N.C., Schirmer, K., and Lee, L.E.J. (2003). The Use of Fish-Derived Cell Lines for Investigation of Environmental Contaminants. *Current Protocols in Toxicology*, Supplement 15: 1.5.1.-1.5.17.
- Diehl, S. and Rincón, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* 39: 531-536.
- Diez, U., Kroeßner, T., Rehwagen, M., Richter, M., Schlink, U., Krumbiegel, P., Fritz, G., Schulz, R., Wetzig, H., Metzner, G., Herbarth, O., und Borte, M. (1999). Einfluss von Innenraumchemikalien auf die Häufigkeit von Infektionen der oberen Luftwege und die Atopie-Entwicklung in den ersten Lebenswochen. *Pädiatr. Grenzgeb.* 37: 469-485.
- Diez, U., Kroeßner, T., Rehwagen, M., Richter, M., Wetzig, H., Schulz, R., Borte, M., Metzner, G., Krummbiegel, P., and Herbarth, O. (2000). Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life – results of the LARS-study. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 203: 23-28.
- Diez, U., Rehwagen, M., Rolle-Kampczyk, U., Wetzig, H., Schulz, R., Richter, M., Lehmann, I., Borte, M., Herbarth, O. (2003). Redecoration of apartments promotes obstructive bronchitis in atopy risk infants – Results of the LARS study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 173-179.
- DiPaolo, R. J., Glass, D. D., Brijwaard, K. E., Shevach, E. M. (2005). CD4+CD25+T cells prevent the development of organ specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector cells. *J. Immunol.* 175 (11): 7135-7142.
- Drost, E.M., Skwarski, K.M., Sauleda, J., Soler, N., Roca, J., Agusti, A., MacNee, W. (2005). Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 60: 293-300.
- Emberlin, J. (1998). The effect of air pollution on allergenic pollen. *Eur. Respir. Rev.* 8: 164-167.
- Environmental Protection Agency – EPA 2006. Consumer Factsheet on: Chlorobenzene. Internetseite: <http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-voc/chlorobe.html>
- Fahy, O., Tsicopoulos, A., Hammad, H., Pestel, J., Tonnel, A. B., and Wallaert, B. (1999). Effects of diesel organic extracts on chemokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (3): 1115-1124.

- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., and Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Exp. Cell Res.* 243: 359-366.
- Freeman, G. J., Boussiotis, V. A., Anumanthan, A., Bernstein, G. M., Ke, X. Y., Rennert, P. D., Gray, G. S., Gribben, J. G., and Nadler, L. M. (1995). B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*. 2: 523-532.
- Gabridge, M. G. and Gladd, M. F. (1984). Gaseous oxide toxicity evaluated with cell monolayers on collagen-coated, gas permeable Teflon membranes. *Environ. Health Perspect.* 54: 347-352.
- Garofalo, R., Sabry, M., Jamaluddin, M., Yu, R. K., Casola, A., Ogra, P. L., and Brasier, A. R. (1996). Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation. *J. Virol.* 70: 8773-8781.
- Geiser, T. (1999). Inflammatorische Zytokine und Chemokine bei akuter, entzündlicher Lungenerkrankung. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 129: 540-546.
- Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Kremer, L., Finger, E., Martinez-A., C., Siegelmann M. H., Cybulsky, M., and Gutierrez-Ramos, J. C. 1996. Eosinophil recruitment of the Lung in a Murine Model of Allergic Inflammation. *J. Clin. Invest.* 98 (10): 2332-2345.
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., and Rollins, B. J. (2000). Control of T_H2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404: 407-411.
- Guerrero, R. R., Rounds, D. E., Booher, J., Olson, R. S., and Hackney, J. D. (1979a). Ozone sensitivity in aging WI-38 cells based on acid phosphatase content. *Arch. Environ. Health* 34: 407-412.
- Guerrero, R. R., Rounds, D. E., Booher, J., Olson, R. S., and Hackney, J. D. (1979b). Mutagenic effects of ozone on human cells exposed in vivo and in vitro based on sister chromatid exchange analysis. *Environ. Res.* 18: 336-346.
- Gunn, M. D., Nelken, N. A., Liao, X., and Williams, L. T. (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J. Immunol.* 158: 376-383.
- Harving, H., Dahl, R., and Molhave, L. (1991). Lung function and bronchial reactivity during exposure to volatile organic compounds. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 751-754.

- Hazardous Substances Data Bank - HSDB (2002). U.S. National Library of Medicine/Toxicology data network (TOXNET). Internetseite: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Dodecane.
- Hazardous Substances Data Bank - HSDB (2002). U.S. National Library of Medicine/Toxicology data network (TOXNET). Internetseite: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Tridecane.
- Hazardous Substances Data Bank - HSDB (2002). U.S. National Library of Medicine/Toxicology data network (TOXNET). Internetseite: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Methylcyclopentane.
- Hazardous Substances Data Bank - HSDB (2003). U.S. National Library of Medicine/Toxicology data network (TOXNET). Internetseite: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Decane.
- Hazardous Substances Data Bank - HSDB (2003). U.S. National Library of Medicine/Toxicology data network (TOXNET). Internetseite: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Undecane.
- Hazardous Substances Data Bank - HSDB (2006). U.S. National Library of Medicine/Toxicology data network (TOXNET). Internetseite: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>. Nonane.
- Herbarth, O. und Rehwagen, M. (1998). VOC – Untersuchungen zur Indoor- und Outdoor-Exposition. Präsentation erster Ergebnisse einer umweltepidemiologischen Studie in Leipzig 1994-1997. Umweltmed. Forsch. Prax. 3 (5): 281-286.
- Herbarth, O., Diez, U., Fritz, G., Rehwagen, M., Kroessner, T., Borte, M., Wetzig, H., Lehmann, I., Müller, A., Metzner, G., Richter, M., and Schulz, R. (2000). Effect of indoor chemical exposure on the development of allergies in newborns – LARS-study. Proceeding of Healthy Buildings. 1: 281-286.
- Herbarth, O., Fritz, G. J., Rehwagen, M., Richter, M., Röder, S., and Schlink, U. (2006). Association between indoor renovation activities and eczema in early childhood. Int. J. Hyg. Environ. Health 209 (3): 241-247.
- Herbarth, O., Fritz, G. J., Wildführ, W., and Behler, C. (1997). Microscaled intracity epidemiological risk analysis of traffic- and domestik-heating-attributed immission effects on airway diseases and allergies among children. Air Pollution 5: 1023-1032.
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: 10 years later. Int. Rev. Immunol. 16: 249-284.

- Horejs-Höck, J. und Duschl, A. (2003). Die Rolle von Zytokinen bei Allergien und Asthma. Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 46: 211-216.
- Horuk, R. (1994). Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trend Pharmacol. Sci.* 15: 159-165.
- Horuk, R. (2001). Chemokines. *Encyclopedia of life sciences*, Nature publishing group (www.els.net).
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260: 547-549.
- Hukkanen, J., Lassila, A., Päiväranta, K., Valanne, S., Sarpo, S., Hakkola, J., Pelkonen, O., and Raunio, H. (2000). Induction and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in the Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22(3): 360-366.
- Jahnz-Rozyk, K., Chcialowski, A., Pirozynska, E., Rogalewska, A. (2000). [Expression of adhesion molecules LFA-1 (CD11a and ICAM-1 (CD54) on lymphocytes and chemokines IL-8 and MCP-1 concentrations in bronchoalveolar lavage of patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease]. *Pol. Merkuriusz Lek.* 9 (52): 649-652.
- Jang, A. S., Park, S. W., Ahn, M. H., Park, J. S., Kim, S. J., Lee, J. H., and Park, C. S. (2006). Impact of circulating TGF-Beta and IL-10 on T cell cytokines in patients with asthma and tuberculosis. *J. Korean. Med. Sci.* 21 (1): 30-34.
- Jones, A. P. (2000). Asthma and the home environment. *Journal of Asthma* 37 (2): 103-124.
- Kaplan, A. P. (2001). Chemokines, Chemokine Receptors and Allergy. *Int. Arch. Immunol.* 124: 423-431.
- Karpus, W. J., Kennedy, K. J., Kunkel, S. L., and Lukacs, N. W. (1998). Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. *J. Exp. Med.* 187: 733-741.
- Karpus, W. J., Lukacs, N. W., Kennedy, K. J., Smith, W. S., Hurst, S. D., and Barrett, T. A. (1997). Differential CC Chemokine-Induced Enhancement of T Helper Cell Cytokine Production. *J. Immunol.* 158: 4129-4136.
- Kharat, I., Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-

- talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 271 (18): 10533-10537.
- Kita, H. and Gleich, E. J. (1997). The eosinophil: Structure and function. In: Kaplan, A. P. (ed.): *Allergy*, ed. 2, Philadelphia, W. B. Saunders: 148-178.
- Kjaergaard, S., Molhave, L., Pederson, O. F. (1989). Human reactions to indoor air pollutants: N-decane. *Environ. Int.* 15: 473-482.
- Klemm, K. (2005). Dissertation: Immunmodulierende Wirkungen von flüchtigen Kohlenwasserstoffen (VOC) auf immunologisch relevante Zellen und Zellsysteme. Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig.
- Knebel, J. R., Ritter, D., and Aufderheide, M. (2002). Exposure of human lung cells to native diesel exhaust – development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicol. In Vitro* 16: 185-192.
- Koren, H. S., Graham, D. E., and Devlin, R. B. (1992). Exposure of humans to a volatile organic mixture. III. Inflammatory response. *Arch. Environ. Health.* 47: 39-44.
- Körner, W. und Stroh, K. (2003). Organische Luftschadstoffe in Innenräumen – ein Überblick. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, BayLfU 2003-PS1/Umweltberatung Bayern, Augsburg.
- Körner, W., Wegenke, M. und Stroh, K. (2003). Organische Luftschadstoffe in Innenräumen – Probenahme, Messung und Bewertung. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, BayLfU 2003-PS1/Umweltberatung Bayern, Augsburg.
- Krause, C., Chutsch, M., Henke, M., Kliem, C., Leiske, M., Schulz, C. und Schwarz, E. (1991). Umwelt-Survey. Messung und Analyse von Umweltbelastungsfaktoren in der Bundesrepublik Deutschland – Umwelt und Gesundheit. Band IIIc – Wohn-Innenraum: Raumluft, WaBoLu-Hefte 4/1991.
- Kuna, P., Reddigari, S. R., Rucinski, D., Oppenheim, and J. J., Kaplan, A. P. (1992a). Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J. Exp. Med.* 175: 484-493.
- Kuna, P., Reddigari, S. R., Schall, T. J., Viksman, M. Y., Kaplan, A. P. (1992b). RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine release histamine from human basophils. *J. Immunol.* 149: 636-642.
- Lehmann, I., Rehwagen, M., Diez, U., Seiffart, A., Rolle-Kampczyk, U., Richter, M., Wetzig, H., Borte M., and Herbarth, O. (2001). Enhanced in vivo IgE production and T cell polarization

- toward the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204: 211-221.
- Lehmann, I., Thielke, A., Weiss, M., Schlink, U., Schulz, R., Diez, U., Siegrig, G., Emmrich, F., Jacob, B., Belcredi, P., Bolte, G., Heinrich, J., Herbarth, O., Wichmann, H. E., and Borte, M. (2002). T cell reactivity in neonates from an East and a West German city – results of the LISA study. *Allergy* 57: 129-136.
- Leonard, E. J., Skeel, A., Yoshimura, T. (1991). Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv. Exp. Med. Biol.* 305: 57-64.
- Leonard, E. J., Yoshimura, T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* 11: 97-101.
- Lewis, R. J. (1996). *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials of Industrial Materials*. 9th ed. Volumes 1-3, New York: 2497.
- Liccardi, G., Custovic, A., Cazzola, M., Russo, M., D'Amato, M., D'Amato, G. (2001). Avoidance of allergens and air pollutants in respiratory allergy. *Allergy* 56: 705-722.
- Lu, B., Rutledge, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C., and Rollins, B. J. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 187: 601-608.
- Lueng, T. F., Ma, K. C., Hon, K. L., Lam, C. W. K., Wan, H., Li, C. Y., and Chan, I. H. S. (2003). Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 14 (4): 296-301.
- Martinez, J. M., Afshari, C. A., Bushel, P. R., Masuda, A., Takahashi, T., and Walker, J. (2002). Differential Toxicogenomic Responses to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Malignant and Nonmalignant Human Airway Epithelial Cells. *Tox. Sci.* 69: 409-423.
- Mason, R. J. and Williams M. C. (1991). Alveolar Type II Cells. In: *The Lung, scientific foundations*. Crystal, R. G. and West, J. B. (ed.), Raven Press, New York: 235-246.
- Maus, U., Herold, S., Muth, R., Ermert, L., Ermert, M., Weissmann, N., Rosseau, S., Seeger, W., Grimminger, F., and Lohmeyer, J. (2001). Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocyte phenotype but upregulate CD14. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 280: L58-68.

- McKinnon, R. A., Hall, P. D., Quattrochi, L. C., Tukey, R. H., and McManus, M. E. (1991). Localization of CYP1A1 and CYP1A2 messenger RNA in normal human liver and in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Hepatology* 14: 848-856.
- McLemore, T. L., Adelberg, S., Liu, M. C., McMahon, N. A., Yu, S.J., Hubbard, W. C., Czerwinski, M., Wood, T. G., Storeng, R., Lubet, R. A., Eggleston, J. C., Boyd, M. R., and Hines R. N. (1990). Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1333-1339.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Muckter, H., Zwing, M., Bader, S., Marx, T., Doklea, E., Liebl, B., Fichtl, B., and Georgieff, M. (1998). A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 40 (2): 63-69.
- Mühlenberg, J. (2002). Diplomarbeit: Erfassung von Konzentrationen ausgewählter Xenobiotika in *In vitro*-Modellen. Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig.
- Nabors, G. S., Afonso, L. C. C., Farrell, J. P., and Scott, P. (1995). Switch from type 2 to type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with IL-12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3142-3146.
- National Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH (2005). Centers for Disease, Control and Prevention. NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. Internetseite: <http://www.cdc.gov/niosh/srhp.html>. Nonane.
- Okudaira, H. (1998). Why atopic diseases prevail in developed countries. *ACI Int.* 10: 110-115.
- Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O. C., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 617-648.
- Pace, D. M., Landolt, P. A., and Aftonomos, B. T. (1969). Effects of ozone on cells in vitro. *Arch. Environ. Health* 18 (2): 165-170.
- Peat, J. K., Gray, S., and Woolcock, A. J. (1995). The epidemiology of asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 1: 9-15.
- Pechkovsky, D. V., Goldmann, T., Ludwig, C., Prasse, A., Vollmer, E., Müller-Quernheim, J., and Zissel, G. (2005). CCR2 and CXCR3 agonistic chemokines are differently expressed and regulated in human alveolar epithelial cells type II. *Resp. Res.* 6: 75.

- Pechkovsky, D. V., Zissel, G., Ziegenhagen, M. W., Einhaus, M., Taube, C., Rabe, K. F., Magnussen, H., Papadopoulos, T., Schlaak, M., and Muller-Querheim, J. (2000). Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur. Cytokine Netw.* 11 (4): 618-625.
- Pei, X.-H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., and Hara, N. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor κ B activation in A549 cell line. *Cytokine* 19 (5): 236-241.
- Ponath, P. D., Qin, S., Ringler, D. J., Clark-Lewis, I., Wang, J., Kassam, N., Smith, H., Shi, X., Gonzola, J.-A., Newman, W., Gutierrez-Ramos, J.-C., and Mackay C. R. (1996). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin: expression, receptor binding and functional properties provide a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* 97: 607-612.
- Poulin, P. and Krishnan, K. (1996). A tissue composition-based algorithm for prediction tissue: air partition coefficients of organic chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136: 126-130.
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage 1994. Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg.
- Raabe, F., Klemm, K., Herbarth, O., Metzner, G. (2000). Influence of gas permeable porous artificial membranes on cytokine secretion of PBMCs in *in vitro* cultures. *Immunobiology* 203 (1-3): 574.
- Raabe, F., Klemm, K., Herbarth, O., Metzner, G. (2001). Are volatile organic compounds (VOCs) involves in the triggering of allergic disorders? – A new bioreactor system to measure immunomodulating effects of VOCs. *Immunobiology* 204 (1-2): 208
- Raabe, F., Klemm, K., Metzner, G. (1999). Immunmodulierende Wirkungen von VOCs auf immunologisch relevante Zellen und Zellsysteme. Projekt BMBF, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.
- Rasmussen, R. E. and Crocker, T. T. (1981). A culture system for the direct exposure of mammalian cells to airborne pollutants. In: Waters, M. D., Sandhu, S. S., Huisingh, J. L., Claxton, L., and Nesnow, S. (ed.). *Short-term bioassay in the analysis of complex environmental mixtures II*. New York: Plenum: 119-131.
- Rasmussen, R. E. (1984). In vitro system for exposure of lung cells to NO₂ and O₃. *J. Toxicol. Environ. Health* 13: 397-411.

- Reale, M., Barbacane, R.C., DiGiacchino, M., Felaco, M., Croce, A., Ferro, F.M., Lotti, T.M., Conti, P. (2001). Differential expression and secretion of RANTES and MCP-1 in activated peripheral blood mononuclear cell cultures of atopic subjects. *Immunology Letters* 76: 7-14.
- Reale, M., Frydas, S., Barbacane, R. C., et al. (1996). Generation of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) by rat peritoneal mast cells after LPS or TNF-alpha activation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 9: 109-112.
- Ring, J., Kramer, U., Schafer, T., Abeck, D., Vieluf, D., and Behrendt, H. (1999). Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118 (2-4): 403-407.
- Ritter, D., Knebel, J. W., and Aufderheide, M. (2001). In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds – development and validation of an optimized system for human lung cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53: 373-386.
- Robinson, D. S., Larché, M., and Durham, S. R. (2004). Tregs and allergic disease. *J. Clin. Invest.* 114: 1389-1397.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood* 90 (3): 909-928.
- Romagnani, S. (1994a). Human T_H1 and T_H2 subsets: "Eppur si muove!". *Eur. Cyt. Netw.* 5: 7-12.
- Romagnani, S. (1994b). Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 838-846.
- Romagnani, S. (1995). Biology of Human T_H1 and T_H2 Cells. *J. Clin. Immunol.* 15 (3): 121-129.
- Romagnani, S. (2001). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol. Immunol.* 38: 881-885.
- Romagnani, S., Maggi, E., Del, P. G., Parronchi, P., Macchia, D., Tiri, A., and Ricci, M. (1989). Role of interleukin 4 and gamma interferon in the regulation of human IgE synthesis: possible alterations in atopic patients. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88: 111-113.
- Rose Jr., C. E., Sung, S. S. J., and Fu, S. M. (2003). Significant Involvement of CCL2 (MCP-1) in Inflammatory Disorders of the Lung. *Micorcirculation* 10: 273-288.
- Rovin, B. H., Dickerson, J. A., Tan, L. C., Hebert, C. A. (1995). Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney. Int.* 48:1263-1271.
- Rusznak, C., Devalia, J. L., and Davies, R. J. (1994). The impact of pollution on allergic disease. *Allergy* 49: 21-27.

- Ryan, R. M., Mineo-Kuhn, M. M., Kramer, C. M., and Finkelstein, J. N. (1994). Growth factors alter neonatal type II alveolar epithelial cell proliferation. *Am. J. Physiol.* 266: L17-L22.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187: 875-883.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (2000). The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 593-620.
- Samet, J. M., Marbury, M. C., and Spengler J. D. (1987). Health effects and sources of indoor air pollution. Part I. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (6): 1486-1508.
- Samet, J. M., Marbury, M. C., and Spengler J. D. (1988). Health effects and sources of indoor air pollution. Part II. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 (1): 221-242.
- Samuelson, G. S., Rasmussen, R. E., Nair, B. K., Crocker, T. T. (1978). Novel culture and exposure system for measurement of effects of airborne pollutants on mammalian cells. *Environ. Sci. Technol.* 12: 426-430.
- Schall, T. (1994). The chemokines. In: Thompson, A. (ed.) *The Cytokine Handbook*. San Diego: Academic Press: 419-460.
- Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., Goeddel D. V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* Vol. 347: 669-671.
- Schlechter, N., Pohl, K., Barig, A., Kupka, S., Kleine, H., Gabriel, S., Van Gelder, R., Lichtenstein, N. und Henning, M. (2004). Beurteilung der Raumluftqualität an Büroarbeitsplätzen. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft* 64 Nr. 3: 95-99.
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W. E. (1993). IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN- γ production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10188-10192.
- Seifert, B. (1999). Richtwerte für die Innenraumluft. Die Beurteilung der Innenraumluftqualität mit Hilfe der Summe der flüchtigen organischen Verbindungen (TVOC-Wert). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 42: 270-278.
- Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelis, G., Wolpe, S. D., Masiarz, F., Coit, D., and Cerami, A. (1988). Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J. Exp. Med.* 168: 2251-2259.

- Shimada, T., Hayes C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P., and Sutter; T. R. (1996). Activation of cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 56: 2979-2984.
- Sikkema, J., de Bon, J., and Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 169: 8022-8028.
- Sitting, M. (1985). *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. 2nd ed. Park Ride, NJ: Noyes Data Corporation: 672
- Smith, B. J., Nitschke, M., Pilotto, L. S., Ruffin, R. E., Pisaniello, D. L., and Willson, K. J. (2000). Health effects of daily indoor nitrogen dioxide exposure in people with asthma. *European Respiratory Journal* 16 (5): 879-885.
- Sousa, A. R., Lane, S. J., Nakhosteen, J. A., Yoshimura, T., Lee, T. H., and Poston, R. N. (1994). Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10: 142-147.
- Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Phan, S. H., Rollins, B. J., and Strieter, R. M. (1991). Alveolar Macrophage-derived Cytokines Induce Monocyte Chemoattractant Protein- 1 Expression from Human Pulmonary Type II-like Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 266 (15): 9912-9918.
- Stellato, C., Collins, P., Ponath, P. D., Soler, D., Newman, W., LaRosa, G., Li, H., White, J., Schwiebert, L. M., Bickel, C., Liu, M., Bochner, B. S., Williams, T., and Schleimer, R. P. (1997). Production of the C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines. *J. Clin. Invest.* 99: 926-936.
- Strachan, D., Sibbald, B., Weiland, S et al. (1997). Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children – The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr. Allergy Immunol.* 8: 161-176.
- Sutter, T. R. and Greenlee, W. F. (1992). Classification of members of the Ah gene battery. *Chemosphere* 25: 223-226.
- Tarkington, B. K., Wu, R., Sun, W.-M., Nikula, K. J., Wilson, D. W., and Last, J. A. (1994). In vitro exposure of tracheobronchial epithelial cells and of tracheal explants to ozone. *Toxicology* 88: 51-68.
- Taub, D. D., and Oppenheim, J. J. (1994). Chemokines, inflammation, and the immune system. *Ther. Immunol.* 1: 229-242.
- Taub, D. D., Anver, M., Oppenheim, J. J., Longo, D. L., and Murphy, W. J. (1996). T Lymphocyte Recruitment by Interleukin-8 (IL-8). *J. Clin. Invest.* 97 (8): 1931-1941.

- Thomas, L. H., Friedland, J. S., Sharland, M., and Becker, S. (1998). Respiratory syncytial virus-induced RANTES production from human bronchial epithelial cells is dependent on nuclear factor-kappa B nuclear binding and is inhibited by adenovirus-mediated expression of inhibitor of kappa B alpha. *J. Immunol.* 161: 1007-1016.
- Thompson, C. B. (1995). Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T-helper cell differentiation? *Cell.* 81: 979-982.
- Tillie-Leblond, I., Gosset, P., Tonnel, A.-B. (2005). Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*-60: 23-29
- Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T., and Yoshimura, T. (1997). Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J. Biol. Chem.* 272: 31092-31099.
- U.S. Coast Guard, Department of Transportation (1984). CHRIS – Hazardous Chemical Data. Volume II. Washington, D. C.: U.S. Government Printing Office: 1984-1985.
- Valentine, R. (1985). An in vitro system for exposure of lung cells to gases: effects of ozone on rat macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health* 16: 115-126.
- Voisin, C., Aerts, C., Houdret, J. L., Tonnel, A. B. (1974). Effect of NO₂ on alveolar macrophages. In: Voisin, C. (ed.). Réactions bronchopulmonaires aux polluants atmosphériques. Paris: INSERM: 273-288.
- Voisin, C., Aerts, C., Jakubsczak, E., Houdret, J. L., Tonnel, A. B. (1977b). Effects du bioxyde d'azote sur les macrophages alvéolaires en survie en phase gazeuse: un nouveau modèle experimental pour l'étude in vitro de la cytotoxicité des gaz nocifs. *Bull. Eur. Physiopath. Respir.* 13: 137-144.
- Voisin, C., Aerts, C., Jakubsczak, E., Tonnel, A. B. (1977a). La culture cellulaire en phase gazeuse. Un nouveau modèle experimental d'étude in vitro des activités des macrophages. *Bull. Eur. Physiopath. Respir.* 13: 69-82.
- Wallace, L. A., Pellizzari, E., Leaderer, B., Zelon, H., and Sheldon, L. (1987). Emission of volatile organic compounds from building materials and consumer products. *Atmospheric Environ.* 21 (2): 385-393.
- Wallace, L., Pellizzari, E., Hartwell, T. D., Perrit, R., and Ziegenfus, R. (1987). Exposure to benzene and other volatile organic compounds from active and passive smoking. *Arch. Environ. Health.* 42/5: 272-279.

- Ware, J. H., Spengler, J. D., Neas, L. M., Samet, J. M., Wagner, G. R., Coultas, D., Ozkaynak, H., and Schwab, M. (1993). Respiratory and irritant health effects of ambient volatile organic compounds. The Kanawha County Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 137: 1287-1301.
- Whitcutt, M. J., Adler, K. B., Wu, R. A. (1988). A bihasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Develop. Biol.* 24: 420-428.
- Whitlock, J. P., Denison, M. S., (1995). Induction of cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics. In Ortiz de Montellano, P. R. (ed). *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Plenum Press, New York, 367-391.
- Whitsett, J. A. (2002). Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J. Clin. Invest.* 109: 565-569.
- Wichmann, G. (1999). Dissertation: Modulation antigenspezifischer *In vitro*-Immunantworten humaner Zellpopulationen durch Xenobiotika. Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig.
- Wichmann, G., Herbarth, O., and Lehmann, I. (2002). The mycotoxins citrinin, gliotoxin and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ. Toxicol.* 17: 211-218.
- Wichmann, G., Mühlenberg, J., Fischäder, G., Kulla, C., Rehwagen, M., Herbarth, O., and Lehmann, I. (2005). An experimental model for the determination of immunomodulating effects by volatile compounds. *Toxicology in Vitro* 19: 685-693.
- Wieslander, G., Norback, D., and Edling, C. (1997b). Airway symptoms among house painters in relation to exposure to volatile organic compounds (VOCS)-a longitudinal study. *Ann. Occup. Hyg.* 41: 155-166.
- Wieslander, G., Norback, D., Bjornsson, E., Janson, C., and Boman, G. (1997a). Asthma and the indoor environment: the significance of emission of formaldehyde and volatile organic compounds from newly painted indoor surfaces. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 69: 115-124.
- World Health Organisation - WHO (2003a). Benzene in Drinking-water. Internetseite: [www.who.int \(WHO/SDE/WSH/03.04/24\)](http://www.who.int/WHO/SDE/WSH/03.04/24).
- World Health Organisation - WHO (2003b). Styrene in Drinking-water. Internetseite: [www.who.int \(WHO/SDE/WSH/03.04/27\)](http://www.who.int/WHO/SDE/WSH/03.04/27).

- World Health Organisation – WHO (2003c). Toluene in Drinking-water. Internetseite: www.who.int/WHO/SDE/WSH/03.04/116.
- World Health Organisation – WHO (2003d). Xylene in Drinking-water. Internetseite: www.who.int/WHO/SDE/WSH/03.04/25.
- World Health Organisation – WHO (2004). Monochlorobenzene in Drinking-water. Internetseite: www.who.int/WHO/SDE/WSH/03.04/107.
- Wynn, T. A., Jankovic, D., Hieny, S., Zioncheck, K., Jardieu, P., Cheever, A. W., and Sher, A. (1995). IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- γ . *J. Immunol.* 154: 3999-4009.
- Yao, T.-C., Wu, K.-C., Chung, H.-T., Shaw, C.-K., Kuo, M.-L., Wu, C.-J., Huang, J.-L. (2004). MCP-1 gene regulatory region polymorphism in Chinese children with mild, moderate and near-fatal asthma. *Allergy* 59: 436-441.
- Yoshida, A., Elner, S. G., Bian, Z.-M., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W., and Elner, V. M. (2001). Differential Chemokine Regulation by Th2 Cytokines during Human RPE-Monocyte Coculture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (7): 1631-1638.
- Zacharasiewicz, A., Zidek, T., Haidinger, G., Waldhör, T., and Vutuc, C. (2000). Symptoms suggestive of atopic rhinitis in children aged 6-9 years and the indoor environment. *Allergy* 55: 945-950.
- Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., and Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an exposure system using cell grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HPGRT mutation assay. *Environ. Mutagen.* 5: 795-801.
- Zamora, P. O., Gregory, R. E., Li, A. P., and Brooks, A. L. (1986). An in vitro model for the exposure of lung alveolar epithelial cells to toxic gases. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 7 (1-2): 159-168.
- Zhao, B., Baston, D. S., Hammock, B., and Denison, M. S. (2006). Interaction of Diuron and Related Substituted Phenylureas with the Ah Receptor Pathway. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20 (3): 103-113.

DANKSAGUNG

Folgenden Personen, die mich im Verlauf der Dissertation unterstützt haben, möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung bei der Beantragung des Stipendiums der Deutschen Bundesstiftung Umwelt sowie die sehr gute Betreuung der Arbeit und die vielen wertvollen Diskussionen und Anregungen danke ich recht herzlich Frau Prof. K. Nieber und Frau Dr. I. Lehmann.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, insbesondere bei Herrn Dr. M. Hempel, für die finanzielle Förderung und die gute Betreuung durch die Stiftung.

Frau Dr. K. Schirmer und Peggy Wellner danke ich für die Möglichkeit, ergänzende Zellvitalitäts-Messmethoden zu erlernen und durchführen zu können.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor möchte ich Anke Rose meinen Dank aussprechen.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Departments Umweltimmunologie, insbesondere Carmen Röder-Stolinski, Gunda Herberth, Doreen Österreich, Beate Tammer und Clarissa Dägelmann für fachliche Ratschläge, experimentelle Hilfestellungen, freundschaftliche Unterstützung und viele lustige Zeiten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Verständnis und Unterstützung durch Wort und Tat die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

ERKLÄRUNG

Die Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig ist mir bekannt und wurde bei der Erstellung der Dissertation berücksichtigt.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde und dass die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken in der Arbeit als solche kenntlich gemacht worden sind.

Alle Personen, von denen ich bei praktischen Arbeiten sowie bei der Anfertigung des Manuskriptes Unterstützung erhalten habe, wurden namentlich erwähnt.

Weiterhin versichere ich, dass außer den genannten Personen keine weiteren bei der geistigen Erstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren, auch haben Dritte von mir weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht. Auch wurden zuvor keine Promotionsversuche unternommen.

Leipzig, den 26.09.2006

Gundula Fischäder

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Gundula Fischäder
Geburtsdatum: 19. April 1978
Geburtsort: Grimma

Schulbildung

1984 bis 1992 Polytechnische Oberschule „Otto Buchwitz“ in Mutzschen
1992 bis 1996 Gymnasium „St. Augustin zu Grimma“ in Grimma
Abschluss: Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1997 bis 2002 Pharmazie-Studium an der Martin-Luther-Universität in Halle
1999 Erstes Staatsexamen
2001 Zweites Staatsexamen
2002 Drittes Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
2002 bis 2003 Diplomarbeit: „Einfluss von Adenosinrezeptorliganden auf die Methylglyoxal-induzierte mitochondriale Dysfunktion und Verringerung der ATP-Konzentration in HEK-Zellen“
Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Pharmazie, Pharmakologie für Naturwissenschaftler
Abschluss: Diplom-Pharmazeutin
2003 bis 2006 Dissertation: „In vitro-Modelle zur Untersuchung von immunmodulierenden und inflammatorischen Effekten durch flüchtige organische Verbindungen“
Stipendiatin der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) am Umweltforschungszentrum Leipzig, Department Umweltimmunologie, in Zusammenarbeit mit der Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Pharmazie, Pharmakologie für Naturwissenschaftler

