

# **Die biologische Wirkung von Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) bei Gesunden**

*Antrag auf Förderung einer experimentellen Studie bei der EUGT*

**P.Brand und T.Kraus**

**Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin der RWTH-Aachen**

In Zusammenarbeit mit Dennis Nowak, Rudolf A. Jörres, Rudolf Schierl

Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin

Ludwig-Maximilians-Universität München

## Korrespondenzadresse

Prof. Dr. T. Kraus

Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin der RWTH-Aachen

Pauwelsstr. 30

52074 Aachen

[TKraus@UKaachen.de](mailto:TKraus@UKaachen.de)

Tel: 0241/8088880

## 1. Hintergrund

Die zur Zeit vorliegenden Daten ergeben kein einheitliches Bild der Wirkung von Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) beim Menschen [Latza et al. 2009]. Dies gilt sowohl für die epidemiologischen Daten, die häufig durch die Gegenwart konfundierender Variabler in ihrer Interpretation beeinträchtigt sind, als auch für experimentelle Expositionsstudien, in denen teils hohe Konzentrationen verwandt wurden, teils widersprüchliche oder nicht reproduzierbare Befunde auftraten. Auch die Tierversuchsdaten sind heterogen; allerdings legen einige Studien nahe, dass auch bei relativ niedrigen Konzentrationen funktionelle, entzündliche oder strukturelle Effekte auftreten können. Angesichts der bekannten Tatsache, dass die Übertragung derartiger Daten auf die Situation beim Menschen mit erheblicher Unsicherheit behaftet ist, lassen sich daher zur Zeit mit eindeutigen Daten abgesicherte Aussagen über das Gefahrenpotential, das von Stickstoffdioxid für den Menschen ausgeht, und die relevanten Konzentrationen nicht treffen.

Anhand kontrollierter Expositionen des Menschen wurde für Stickstoffdioxid ein Spektrum von Effekten gemessen und beschrieben. Im Folgenden sind wesentliche der für den gegenwärtigen Projektvorschlag relevanten Arbeiten beschrieben, vor allem solche, die sich auf experimentell gut fassbare Messgrößen beziehen.

### 1.1 Lungenfunktion, Gasaustausch und Gefäßfunktion

Gemäß den Ergebnissen experimenteller Studien sind die Wirkungen von Stickstoffdioxid auf die Lungenfunktion verglichen mit denen anderer Noxen wie Schwefeldioxid sehr gering ausgeprägt oder gar nicht messbar [z. B. Jörres & Magnussen 1990, 1991] und in der Regel nur bei hohen Konzentrationen [Linn et al. 1985] sowie bei Personen mit Vorerkrankungen der Atemwege zu finden [von Nieding & Wagner 1979, Morrow et al. 1992]. Die konventionelle Spirometrie ist offenbar wenig sensitiv in dieser Hinsicht. Bei 0,1 ppm wurden mit keiner Methode der Lungenfunktionsmessung bislang Effekte gemessen [Hazucha et al. 1983].

Aus diesem Grunde scheint es geboten, in einem neu geplanten Projekt die empfindlichsten verfügbaren und zugleich validierten und verlässlichen Verfahren wie beispielsweise die Ganzkörperplethysmographie einzusetzen, ferner auch Methoden, welche diskrete Veränderungen etwa des Gasaustauschs oder des Zustandes der kleinen Atemwege erfassen können, die sich nicht oder allenfalls sehr indirekt in der konventionellen Lungenfunktion bemerkbar machen [vgl. Devlin et al. 1999]. Auf-

grund seiner chemischen Assoziation mit Stickstoffmonoxid sollte Stickstoffdioxid im Prinzip auch das Potential haben, mittels Stickstoffmonoxid auch pulmonale Gefäßeffekte hervorzurufen. Allerdings ist diese Frage nicht hinreichend untersucht, obgleich frühe Arbeiten bei Atemwegserkrankten Hinweise auf eine Verschlechterung des Gasaustauschs ergaben [von Nieding et al. 1973]. Eine neuere Arbeit zur Frage der vaskulären Dysfunktion befasste sich mit peripheren, nicht pulmonalen Effekten und kam zu dem Ergebnis, dass solche Effekte bei Gesunden und einer kurzzeitigen Exposition gegenüber 4 ppm Stickstoffdioxid nicht auftraten [Langrish et al. 2010].

## 1.2 Unspezifische und spezifische Atemwegsempfindlichkeit

Verschiedentlich wurde berichtet, Stickstoffdioxid könne die unspezifische Empfindlichkeit der Atemwege gegenüber inhalierten Agonisten wie Histamin, Methacholin oder Carbachol erhöhen [z. B. Orehek et al. 1976]. Dies ist insofern ein interessanter Befund, als sich hier funktionelle Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Belastungen ergeben, die in der Folge im Prinzip zu verstärkten Reaktionen führen und auf diese Weise einen an sich geringen Effekt von Stickstoffdioxid amplifizieren könnten. Allerdings ist die Datenlage keineswegs einheitlich [z. B. Jörres & Magnussen 1991]. In einer zusammenfassenden Analyse der Literatur stellte sich heraus, dass die Erhöhung der Empfindlichkeit hauptsächlich, wenngleich nicht regelhaft, für Probanden mit Asthma gilt, während der Effekt bei Normoreaktiven keineswegs gesichert ist [Folinsbee 1992]. Auch kann der Effekt davon abhängen, ob einfache oder wiederholte Expositionen in verschiedenen Konzentrationen vorgenommen wurden [Frampton et al. 1991].

In ähnlicher Weise wurde verschiedentlich eine Verstärkung der bronchialen Allergenempfindlichkeit berichtet, sei es im Sinne einer verstärkten funktionellen Antwort bei einmaliger oder wiederholter Exposition [z. B. Strand et al. 1997, 1998], sei es im Sinne einer diskreten Erhöhung der Entzündungsantwort ohne funktionelle Korrelate [z. B. Barck et al. 2002, 2005]. Allerdings wurden auch hier gegenläufige Daten berichtet [z. B. Witten et al. 2005]. Ähnlich steht es mit dem Effekt von Stickstoffdioxid auf die Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung der Atemwege durch Hyperventilation (Anstrengungsasthma) [Bauer et al. 1986] oder gegenüber anderen inhalierten Schadstoffen, etwa Schwefeldioxid. Für letzteres wurden einmal eine diskrete und über die Probanden heterogene Verstärkung [Jörres & Magnussen

1990] und zum anderen die Abwesenheit eines solchen Effekts [Rubinstein et al. 1990] experimentell gezeigt.

### 1.3 Zelluläre, biochemische und entzündliche Atemwegsreaktionen

Eine Vielzahl von Arbeiten hat die Frage untersucht, welche zellulären und entzündlichen Veränderungen Stickstoffdioxid in den Atemwegen hervorruft. Hierbei wurde primär die Technik der bronchoalveolären Lavage (BAL) eingesetzt. Bei einer Konzentration von 4 ppm fand sich bei gesunden Probanden eine vermehrte Anzahl von Lymphozyten und Mastzellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) [Sandström et al. 1990], und diese Effekte traten in dosisabhängiger Weise auf [Sandström et al. 1991]. Wurden die Expositionen bei 4 oder 1,5 ppm Stickstoffdioxid jeden zweiten Tag insgesamt sechsmal wiederholt, so fanden sich auch Veränderungen innerhalb der Lymphozytenpopulation, darunter eine Veränderung des Verhältnisses von CD4- zu CD8-positiven Zellen [Sandström et al. 1992a, 1992b]. Als Ausdruck einer unspezifischen „injury response“ ähnlich wie bei Inhalation von Ozon wurde eine Zunahme der Zahl neutrophiler Granulozyten und damit in der Regel assoziierter Zytokine wie Interleukin(IL)-8 und IL-6 beobachtet [Blomberg et al. 1997, Devlin et al. 1999]. Da dieser Effekt in den Proben aus den zentralen Atemwegen auftrat, besteht Anlass, bei Anwendung der Methode des induzierten Sputums ebenfalls messbare Wirkungen zu erwarten. Die entzündliche Antwort im Sinne einer diskreten Neutrophilie scheint in gewissem Maße vom Bestehen anderer chronischer Belastungen abzuhängen, da sich – allerdings nicht leicht interpretierbare – Unterschiede der Reaktion zwischen Rauchern und Nichtrauchern ergaben [Helleday et al. 1994].

Die Wirkungen auf lösliche Verbindungen in der BALF waren über die Studien heterogen und offensichtlich vom gewählten Expositionsprotokoll sowie vom Messzeitpunkt nach Exposition abhängig, sowie der Art der Probanden [Jörres et al. 1995]. So fand sich neben der Änderung der Konzentration von Prostanoiden [Jörres et al. 1995] eine Abnahme der Konzentration von Alpha-2-Makroglobulin [Frampton et al. 1989a], hingegen kein Effekt auf den Alpha-1-Proteinase-Inhibitor [Johnson et al. 1990], entgegen anderer berichteter positiver Effekte [Mohsenin & Gee 1987]. Interessanterweise ergaben sich bei wiederholter Exposition Indizien dafür, dass die entzündliche Antwort verblieb, obgleich beispielsweise die anti-oxidative Abwehr aufgeregelt wurde [Blomberg et al. 1999]. Diese Ergebnisse weisen im Prinzip eine

Ähnlichkeit mit denjenigen auf, die bei wiederholter Ozonexposition erhalten wurden [Jörres et al. 2000]. Dies gilt auch für die Befunde bezüglich der bronchialen Schleimhaut, da sich keine Zeichen einer Adaptation bei wiederholter Exposition gegenüber Stickstoffdioxid fanden und die Veränderungen in Richtung einer pro-allergischen Antwort deuteten [Pathmanathan et al. 2003]; hier ist ebenfalls die Parallele zu Ozon auffällig [Jörres et al. 2000, Holz et al. 2001]. Die vorliegenden Daten lassen es keineswegs unrealistisch erscheinen, die Methode des induzierten Sputums zum Monitoring einer Antwort auf Stickstoffdioxid einzusetzen, ungeachtet der Tatsache, dass im Sputum in Studien der Vergangenheit beispielsweise keine Neutrophilenantwort beobachtet wurde [Barck et al. 2005, Witten et al. 2005], vermutlich aufgrund der Interaktion mit der gleichzeitigen Allergenantwort. Die Hinweise auf eine mögliche Störung der Infektabwehr wurden aus *in vitro*- bzw. *ex vivo*-Tests abgeleitet [Frampton et al. 1989, 2002], und es ist unklar, ob dieser Effekt funktionell in klinisch relevanter Weise zum Tragen kommt.

Die Methode der Atemgasanalyse auf Entzündungsmarker wurde bislang primär in epidemiologischen Studien bei gemischter Exposition eingesetzt [z. B. Liu et al. 2009]. Dennoch deuten einige vorliegende Daten unter solchen Bedingungen auf einen Effekt auf das exhalierete Stickstoffmonoxid (FeNO) hin [Flamant-Hulin et al. 2010]. Erfahrungen aus dem experimentellen Bereich bei kontrollierter Exposition sind kaum verfügbar; in einer Studie wurde bei kurzzeitiger Exposition gegenüber Stickstoffdioxid eine Abnahme von FeNO belegt, die als Ausdruck einer Diffusionsstörung aus der Schleimhaut interpretiert wurde [Chambers & Ayres 2001]. Dies lässt erwarten, dass mit subtileren Techniken, etwa der Analyse der Flussabhängigkeit des exhalierten NO, biochemische und physiologische Wirkungen von inhaliertem Stickstoffdioxid erkennbar sein sollten, die anderen Tests entgehen. Ähnliches gilt für eine gut standardisierte Analyse des Atemkondensats auf Marker des oxidativen Stress, wie Wasserstoffperoxid, oder eine Analyse der ausgeatmeten Kohlenwasserstoffe mittels elektronischer Nase, zumal sich auch darunter Oxidationsmarker befinden.

#### 1.4 Wirkungen auf die Zusammensetzung des Bluts

Inwieweit sich die entzündlichen Effekte auch im Blut bemerkbar machen, hängt offenbar von der Konzentration bzw. dem Expositionsmodus ab. Während die vierfach wiederholte Exposition gegenüber 0,6 ppm Stickstoffdioxid keine messbaren

Effekte auf die Zellpopulationen, insbesondere Lymphozytenpopulationen nach sich zog [Rubinstein et al. 1991], galt dies auch für die höhere Konzentration von 2 ppm, obgleich in der bronchoalveolären Lavage wiederum eine Neutrophilie in der bronchialen Fraktion auftrat, sowie eine Veränderung im Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Zellen [Solomon et al. 2000]. Andererseits wurden Effekte einer einmaligen Exposition gegenüber 1,5 ppm Stickstoffdioxid auf eben diese Messgröße beschrieben, die allerdings gegenläufig zwischen den Geschlechtern waren [Frampton et al. 2002]. Dies war mit einer Abnahme der Zahl zirkulierender Lymphozyten, insbesondere T-Lymphozyten, verbunden, sowie einer Abnahme des Hämatokrit-Wertes. Die Präsentation dieser Arbeit erlaubt es leider nicht, die Heterogenität der Antwort zwischen den Probanden zu beurteilen; auffällig ist, dass die Effekte in Blut und BALF von ähnlicher Stärke waren. Dennoch deuten insgesamt die vorliegenden Daten auf eher diskrete Effekte im Blut hin. Die Frage nach Expositionsmarkern gegenüber Stickstoffdioxid ist nicht hinreichend geklärt; allerdings wurde bei hoher Exposition in Zellpellets der BALF das Vorhandensein von NO-Hämoglobin-Komplexen nachgewiesen [Maples et al. 1991]. Dies lässt die Frage aufkommen, ob sich derartige Änderungen in einer Veränderung des alveolären Stickstoffmonoxids widerspiegeln, wie es mittels moderner Verfahren indirekt messbar ist und das im Prinzip im Gleichgewicht mit den entsprechenden Hämoglobin-Komplexen stehen sollte.

## **2. Überlegungen zu den Messgrößen einer experimentellen Studie**

Die Untersuchung beim Menschen kann weder alleine auf epidemiologischen Daten noch auf Kulturen menschlicher Zellen beruhen, sondern muss experimentelle Expositionen einbeziehen [siehe Latza et al. 2009]. Hierbei müssen verschiedene Faktoren gegeneinander abgewogen werden. So sollten die Konzentrationen nahe denjenigen sein, die für arbeits- und umweltmedizinische Belange von Bedeutung sind. Hohe Konzentrationen, wie sie in der Vergangenheit verschiedentlich verwendet wurden, erfüllen dieses Kriterium nicht, haben allerdings den Vorteil, mit größerer Wahrscheinlichkeit messbare Effekte hervorzurufen, die es erlauben, zum Tragen kommende Wirkungsmechanismen zu identifizieren. Ähnliches gilt für die Dauer und den Modus der Exposition, beispielsweise die Frage wiederholter Expositionen und möglicher kumulierender Effekte *versus* einer Toleranzentwicklung, wie für Stickstoffdioxid, aber auch für Ozon gezeigt wurde.

Darüber hinaus ist die Frage nach den Messgrößen von zentraler Bedeutung. Im allgemeinen gilt, dass konventionelle Messgrößen, die es erlauben, etwa eine Atemwegsentzündung zu detektieren, relativ invasiv sind, wie beispielsweise eine Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage und Entnahme von Schleimhautbiopsaten. Dies ist nicht notwendigerweise ein Problem, sofern es sich um eine einmalige Anwendung beim Probanden handelt. Einmalige Anwendungen implizieren allerdings in der Regel ein Parallelgruppen-Design. Da bekannt ist, dass die biologische Streuung zwischen Probanden relativ hoch ist, bedeutet dies enorme Gruppengrößen vor allem dann, wenn relativ kleine Effekte erkannt werden sollen. Diese Gruppengrößen nehmen aufgrund der Heterogenität der Probanden noch weiter zu, wenn nicht eine Kontroll- und eine Expositionsbronchoskopie bei ein-und-demselben Probanden erfolgen soll, sondern nur eine einzige Bronchoskopie.

Aus den genannten Gründen sind Verfahren besonders attraktiv, die mit geringer Belastung für den Probanden anwendbar sind, d.h. sogenannte nichtinvasive Verfahren. Diese erlauben ein Cross-over-Design, da ihre wiederholte Anwendung kein Problem darstellt. Somit wird das Design der Studie hauptsächlich von der Verfügbarkeit, Sensitivität und dem messtechnischen Aufwand dieser Verfahren bestimmt sowie der Praktikabilität und Akzeptanz der Expositionen. Offenbar sind extrem lange oder vielfach wiederholte Expositionen kaum praktikabel, da sie angesichts konkurrierender Expositionen aus der Umwelt verlangen, den Probanden über einen langen Zeitraum unter kontrollierte Bedingungen zu bringen. Die zunächst zu lösende, nicht befriedigend beantwortete Frage sollte die nach den Wirkungen einer einzelnen kurzzeitigen Exposition gegenüber Stickstoffdioxid sein.

Daher schlagen wir nachfolgend eine kontrollierte Studie mit kurzzeitiger, jedoch mehr als einstündiger, einmaliger Exposition gesunder Probanden gegenüber Stickstoffdioxid in verschiedenen Konzentrationen vor. Die Studie erfolgt aus den genannten Gründen im Cross-over-Design mit multiplen Messungen im gleichen Probanden. Die Probanden sollten gesund sein, um möglichst geringe Interferenzen mit möglichen Wirkungen unkontrollierter Belastungen aus der Umwelt zu haben; letztlich verbleiben somit nur Infekte als (per gewähltem Untersuchungszeitpunkt kontrollierbare) Störgrößen. Als Messgrößen fungieren moderne nichtinvasive Verfahren sowohl der Lungenfunktionsdiagnostik als auch des Entzündungsmonitoring, die sich in anderen Untersuchungen ähnlichen Typs als informativ erwiesen haben

oder anhand ihres aus der klinischen Forschung bekannten Potentials als erfolgversprechend gelten können.

### **3. Eigene Vorarbeiten**

Die Antragsteller haben langjährige, umfangreiche, durch eine Serie internationaler Publikationen belegte Erfahrung mit kontrollierten experimentellen Expositionen des Menschen gegenüber Luftschadstoffen. Dies betrifft Gesunde und Patienten mit Atemwegserkrankungen, sowie Schwefeldioxid [Magnussen et al. 1990, Wiebicke et al. 1990, Nowak et al. 1997], Stickstoffdioxid [Jörres & Magnussen 1990, 1991, 1995], Ozon [Jörres et al. 1996, 2000, Holz et al. 1999, 2001, 2002], Schweißrauche [Scharrer et al. 2007] und Duftstoffe [Schnuch et al. 2010] als Agenzien, ferner einmalige und wiederholte Expositionen. Hierbei wurden sowohl lungenfunktionsanalytische und nichtinvasive als auch invasive Messverfahren wie die Analyse von Lavageflüssigkeit und Biopsien in teils komplexen Designs durchgeführt.

### **4. Design der Studie**

Die Untersuchung ist geplant als experimentelle, randomisierte, einfach-blinde Studie im Cross-over-Design. Hierbei fungiert jeder Proband als seine eigene Kontrolle und wird drei verschiedenen Konzentrationen von Stickstoffdioxid sowie gefilterter Raumluft als Kontrolle ausgesetzt.

Um die statistische Aussagekraft zusätzlich zu erhöhen, erfolgen Messungen nicht nur nach, sondern auch vor Exposition. Dies erlaubt zu prüfen, ob die Probanden sich vor den Expositionen in einem vergleichbaren, stabilen Zustand befinden, sowie die Variabilität der Messgrößen festzustellen. Sodann können die Werte nach den Expositionen miteinander verglichen werden, insbesondere aber die eventuellen Änderungen über die Exposition. Die konkret möglichen Vergleiche hängen von der gewählten Messgröße ab, da einige Tests, beispielsweise die Sputuminduktion, nur nach den Expositionen, nicht jedoch vorher, stattfinden können.

Der Proband ist über die Art der Exposition an den einzelnen Untersuchungstagen nicht informiert, wohl aber der Untersucher. Es würde einen deutlich höheren (personellen) Aufwand bedeuten, ein doppel-blindes Design in glaubwürdiger Weise zu verwirklichen. Angesichts der Objektivität der weit überwiegenden Zahl der gewählten Messgrößen erachten wir diesen Zusatzaufwand als entbehrlich.



## 5. Probanden

Es sollen n=25 anamnestisch gesunde Probanden untersucht werden. Alle Probanden sollen Nieraucher oder langjährige Nichtraucher sein. Der Rauchstatus wird mittels Cotinin überprüft. Die Probanden sollen keine Allergie aufweisen, um alle Interferenzen mit einer letztlich unkontrollierbaren Exposition gegenüber Allergenen, welche die Atemwegsreaktionen beeinflussen könnte, zu vermeiden. Aus einem analogen Grund sollen die Probanden 3 Wochen vor jeder der Expositionen bzw. jedem der Tests keinen Infekt der Atemwege zeigen. Die Probanden erhalten für den beträchtlichen Zeitaufwand der Studie eine Aufwandsentschädigung.

Die Anzahl der Probanden reicht nach den Erfahrungen vergangener Studien aus, um sowohl eine relevante mittlere Reaktion in den einzelnen Messgrößen zu erkennen als auch den Bereich der Reaktionsbreite verlässlich abzuschätzen.

## 6. Expositionen

Die Expositionen erfolgen in einer Expositionskammer, deren klimatische Bedingungen mit hoher Genauigkeit eingestellt werden können und die mittels gefilterter Umgebungsluft belüftet wird. Diese Kammer hat sich in vorangegangenen Expositionsstudien sowie bei klinischen Expositionen bewährt und ist groß genug, um für den Probanden auch bei mehrstündiger Exposition akzeptabel zu sein sowie ein Ergometer und Messgeräte aufzunehmen. Die Kammer wird für den Zweck der Studie mit einer Vorrichtung versehen, die eine kontrollierte, über einen Analysator gesteuerte Beimengung von Stickstoffdioxid aus Gasflaschen erlaubt. Diese Beimengung erfolgt an den Lufteinlässen derart, dass eine gleichmäßige Exposition im Raum gewährleistet ist. Diese Gleichmäßigkeit wird mittels Messungen kontrolliert.

Die Probanden werden jeweils über 3 Stunden exponiert. Hierbei ist eine intermittierende leichtgradige körperliche Belastung vorgesehen. Diese besteht darin, alle 15 Minuten für 15 Minuten einer leichtgradigen Fahrradbelastung ausgesetzt zu sein. In zufälliger Reihenfolge werden folgende Konzentrationen eingesetzt:

- 0,0 ppm (gefilterte Luft, Kontrolle)
- 0,1 ppm (umweltrelevanter Wert)
- 0,5 ppm NO<sub>2</sub> (aktueller MAK-Wert)
- 1,5 ppm NO<sub>2</sub> (dreifacher MAK-Wert, 30 % des alten MAK-Wertes)

Die Konzentrationen sind so gewählt, dass sie einerseits den für die Entscheidungsfindung sowohl für Umweltbelange als auch MAK-Werte relevanten Bereich abdecken, andererseits bis in eine Größenordnung reichen, die als Positivkontrolle fungieren kann. Erst ab 1 ppm kann man gemäß den vorliegenden Daten mit einiger Sicherheit mit positiven Reaktionen bei einigen oder der Mehrzahl gesunder Probanden rechnen [vgl. Jörres et al. 1995]. Die Positivkontrolle erscheint wichtig, um die Adäquatheit der Expositions- und Messvorgänge zu beurteilen. Die Konzentration von 1,5 ppm ist u. a. auch aus dem Grunde gewählt, um bei einer hohen Belastung vergleichbare Bedingungen zu einer vorangegangenen Arbeit herzustellen, in der Änderungen in Blutparametern gemessen wurden [Frampton et al. 2002].

Als Dauer der Expositionen wird ein Zeitraum von 3 Stunden gewählt, um sich den Bedingungen realer Expositionssituationen möglichst anzunähern und zugleich den Aufwand für den Probanden und die Untersucher noch realisierbar zu halten. Diese Dauer hat sich in vergangenen Studien als praktikabel herausgestellt.

## **7. Messablauf gemäß Protokoll**

Die Probanden werden zunächst an einem Einschlusstag untersucht, bei dem sie auf ihre Eignung geprüft werden und zudem Gelegenheit haben, mit den Messverfahren vertraut zu werden. An diesem Tag wird der körperliche Allgemeinzustand des Patienten untersucht (körperliche Untersuchung, Lungenfunktion, EKG), eine Anamnese durchgeführt sowie die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft. Der Zeitaufwand beträgt ca. 1 Stunde.

Wenn die Probanden geeignet und bereit zur Teilnahme sind, erfolgen die vier Expositionen in zufälliger Reihenfolge im Abstand von mindestens einer Woche, um Übertragungseffekte zu vermeiden.

Vor jeder der Expositionen werden die folgenden Messungen durchgeführt:

- Ganzkörperplethysmographie
- Spirometrie
- NO-CO-Diffusionskapazität
- Exhaliertes NO
- Elektronische Nase
- Nasenproben
- Induziertes Sputum
- Vitalparameter
- Symptomfragebogen

Diese Messungen nehmen insgesamt ca. 2 Stunden in Anspruch.

Sodann betreten die Probanden den Expositionsraum und unterziehen sich über jeweils 3 Stunden einer intermittierenden leichtgradigen Fahrradbelastung bei 80 Watt. Nach 1,5 sowie 3 Stunden Exposition füllen die Probanden den Expositionsfragebogen aus.

Unmittelbar nach der Exposition erfolgen weitere Messungen:

- Ganzkörperplethysmographie
- Spirometrie
- NO-CO-Diffusionskapazität
- Exhaliertes NO
- Atemkondensat
- Elektronische Nase
- Vitalparameter
- Nasenproben
- Induziertes Sputum

Diese Messungen nehmen insgesamt ca. 2 Stunden in Anspruch.

## **8. Erläuterungen zu den Messgrößen**

### 8.1 Spirometrie

Zwecks Vergleichbarkeit und Vollständigkeit der Beschreibung ist eine Spirometrie unerlässlich. Der Nachteil, dass sie oft wenig sensitiv ist, wird dadurch kompensiert,

dass höchste Qualitätsstandards vor allem für die Fluss-Volumen-Kurve angelegt werden, die eine gewisse Information über den Zustand der kleinen Atemwege liefern kann. In vorangegangenen Arbeiten hatten sich diskrete Hinweise auf solche Effekte gezeigt.

## 8.2 Ganzkörperplethysmographie

Die Ganzkörperplethysmographie gilt als wesentlich sensitiver als die Spirometrie. Als Messgrößen fungieren neben den Lungenvolumina der spezifische Atemwegswiderstand und der Atemwegswiderstand. Durch strikte Qualitätskontrolle wird die Möglichkeit von Artefakten, denen gegenüber die Werte vor allem innerhalb des Normbereichs anfällig sind, minimiert. Die Messung erfolgt relativ früh nach Exposition, da die möglichen Effekte eher akuter Natur sein werden.

## 8.3 Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO)

Die gleichzeitige Bestimmung der Aufnahmefähigkeit der Lunge für CO und NO stellt ein einmaliges Verfahren dar, um nichtinvasiv sowohl über das aktuelle pulmonal-kapilläre Blutvolumen als auch über eventuelle Diffusionshindernisse Aussagen treffen zu können. Sie beruht auf den unterschiedlichen Affinitäten der beiden Verbindungen für Hämoglobin. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise Hinweise auf eine Ödembildung oder auf Änderungen pulmonaler Kapillarweiten gewinnen. Da die kapillären Effekte vermutlich relativ kurzlebig sind, sofern sie nicht auf einem chronischen Entzündungsvorgang basieren, erfolgt die Messung relativ früh nach Expositionsende.

Die Messung ist zur Zeit noch nicht als allgemeiner klinischer Standard, jedoch in der beantragenden Institution etabliert; wesentliche der Ergebnisse sind durch Publikationen belegt [Dressel et al. 2008b, 2009].

## 8.4 Exhalierendes Stickstoffmonoxid (NO)

Die Bestimmung des ausgeatmeten NO stellt inzwischen ein Standardverfahren vor allem bei der Diagnose allergischer Atemwegserkrankungen dar. Im gegenwärtigen Zusammenhang ist allerdings eher interessant, dass der Wert auch von anderen Faktoren als einer allergischen Entzündung abhängt, so beispielsweise dem Belag der Bronchien mit Mukus. Durch Messungen bei mehreren Ausatemraten lässt sich neben dem bronchialen NO (FeNO) das alveoläre NO bestimmen, das ebenfalls

sowohl wegen systemischer Effekte als auch wegen möglicher diskreter Ödem-bildung von Interesse ist. Somit soll NO weniger als Marker der Entzündung denn als indirekter Marker möglicher adverser Reaktionen der Schleimhaut und Alveolen dienen.

Die Messung bei verschiedenen Flussraten ist kein klinischer Standard, doch in der beantragenden Institution bestens etabliert, und es liegt reiche, durch Publikationen belegte methodologische Erfahrung zur NO-Messung vor [z. B. Dressel et al. 2008a]. Nach den vorliegenden Erfahrungen reichen jeweils 3 qualitativ gute Messungen bei 3 Ausatemraten (50, 140, 320 mL/s) aus, um verlässliche Werte des bronchialen Standard-FeNO sowie des alveolären NO zu gewinnen.

### 8.5 Atemkondensat

Durch kurzzeitige (5-10 Minuten) Sammlung des Kondensats der Ausatemluft können Proben gewonnen werden, die zur Bestimmung biochemischer Marker dienen können. Als primär zu analysierende Substanzen sollen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sowie 8-Isoprostan dienen. Sie markieren die oxidative Aktivität, beispielsweise von Entzündungszellen, sowie das Ausmaß oxidativer Schädigung.

Die Analyse ist kein klinisch etablierter Standard, doch liegen reichhaltige Erfahrungen der Antragsteller mit der diffizilen Analyse des Atemkondensats vor [z. B. Schleiss et al. 2000, Wewel et al. 2006].

### 8.6 Elektronische Nase

Mit Hilfe einer Ionen-Mobilitäts-Spektroskopie (SIONEX) sollen flüchtige Kohlenwasserstoffe in der Ausatemluft detektiert werden. Die vorliegenden, mit einem Chemoresistor-Array gewonnenen Daten sprechen dafür, dass hierbei Änderungen im alveolären Bereich bzw. systemische Änderungen erfasst werden können. So besteht Aussicht auf die Detektion von Kohlenwasserstoffen, die eine oxidative Schädigung signalisieren. Die Ionen-Mobilitäts-Spektroskopie stellt eine Verbesserung der Empfindlichkeit um mehrere Größenordnungen dar.

Es sei betont, dass dieses Verfahren zum gegenwärtigen Zeitpunkt primär experimenteller und explorativer Natur ist. Allerdings liegen bei den Antragstellern bereits reichhaltige methodologische Erfahrungen mit Verfahren der elektronischen Nase vor. Die Methode der Probensammlung wurde optimiert und ein Array-Gerät bereits erfolgreich in einer klinischen Studie eingesetzt, um systemische Effekte zu

detektieren. Mit dem Gerät SIONEX sammeln wir zur Zeit methodologische und klinische Erfahrung. Für die Studie ist ein separates Gerät erforderlich, da der Standort der Expositions-kammer Großhadern und nicht das Klinikum Innenstadt ist, an dem das Gerät anderweitig benötigt wird bzw. verplant ist.

### 8.7 Methacholin-Provokation

Die Einatmung von Methacholin mit Hilfe einer kontrollierten Dosimetergabe dient dazu, die sog. unspezifische Empfindlichkeit der Atemwege zu bestimmen. Hierbei wird Methacholin in steigenden Konzentrationen appliziert und der Effekt mittels Lungenfunktion nach jeder Gabe gemessen. Da die Atemwegempfindlichkeit von einer Vielzahl von Einflussfaktoren bestimmt wird, ist das Verfahren sensitiv, diskrete Änderungen der Integrität der Atemwege zu entdecken. In der Vergangenheit wurden sowohl nach Einatmung von Ozon [Jörres et al. 1996] als auch teils nach Einatmung von Stickstoffdioxid [Orehek et al. 1976] temporäre Erhöhungen der Methacholinempfindlichkeit beobachtet. Auch wenn die Effekte von Stickstoffdioxid auf die bronchiale Empfindlichkeit bei Gesunden umstritten sind [Folinsbee 1992], scheint es sinnvoll, eine derartige indirekte Messgröße von Entzündung und Funktion zu erfassen, um mögliche Reaktionen breitbandig abzudecken.

Das Verfahren der Methacholin-Provokation ist klinisch gebräuchlich, und die Antragsteller weisen reichhaltige methodologische Erfahrung in seiner Anwendung auf [Jörres et al. 1997, Praml et al. 2005, Merget et al. 2009]; dies betrifft auch den Einsatz in Expositionsstudien [Jörres et al. 1991, 1996]. Da die Messung eine Atemwegsobstruktion induziert, ist sie in der Regel von der Gabe eines Bronchodilatators gefolgt. Sie erfolgt am Tage nach der Exposition, da zu diesem Zeitpunkt die größten Effekte zu vermuten sind.

### 8.8 Nasenproben

Gemäß einem in Studien bewährten Verfahren werden kleine Baumwolltupfer auf die Nasenschleimhaut aufgelegt und nach ca. 10 Minuten entnommen. Das daraus abzentrifugierbare Material kann auf seinen Gehalt an Zytokinen und anderen Mediatoren bestimmt werden. Als Zytokine, die für eine zelluläre Reaktion sprechen, werden erfasst GM-CSF, IFN-gamma, IL-2, IL-1beta, IL-6, IL-8 und zur Kontrolle bei Nichtallergikern IL-5 und IL-13; ferner werden eosinophiles kationisches Protein (ECP) und Myeloperoxidase (MPO) bestimmt.

Das Verfahren wurde in vorangegangenen Studien von anderen sowie der eigenen Arbeitsgruppe eingesetzt [Schnuch et al. 2010], und wir haben die dabei identifizierten technischen Probleme inzwischen gelöst.

### 8.9 Induziertes Sputum

Die Induktion von Sputum durch Inhalation hypertoner Kochsalzlösung ist ein vielfach in klinischen Studien eingesetztes Verfahren, um eine Atemwegsentszündung nichtinvasiv bzw. semi-invasiv zu erfassen [Holz et al. 1998a]. Der Test muss am Ende einer Sequenz von Tests erfolgen, da die Probengewinnung nachfolgende Messungen stört [Holz et al. 1998b]. Als Analyseparameter dienen das Differentialzellbild sowie Zytokine (insbesondere IL-8, IL-1beta und IL-6) im Überstand. Vor allem das Differentialzellbild hat sich als sensitive und reproduzierbare Messgröße in Studien zur Wirkung von Schadstoffen wie Ozon erwiesen [Holz et al. 1999, 2002]. Ferner soll immunzytochemisch eine mögliche oxidative Schädigung von Sputumzellen [Comandini et al. 2009] anhand von 3-Nitrotyrosin überprüft werden [Ichinose et al. 2003], sowie der Gehalt an Myeloperoxidase (MPO) und 8-Isoprostan bestimmt werden. Die Analyse des Cathelicidins hCAP-18 bzw. LL-37 im Überstand soll eine Aussage darüber ermöglichen, ob Effekte auf die Infektabwehr durch Stickstoffdioxid plausibel sind.

Der Sputumtest ist zeitintensiv und verlangt in Durchführung, Aufarbeitung und Auswertung einen beträchtlichen Aufwand, wenn sein Potential ausgeschöpft werden soll. Es sollte beachtet werden, dass nicht in jedem einzelnen Fall gewährleistet werden kann, dass die gewonnenen Probenmengen für alle geplanten Analysen ausreichen; zumindest wird ein Differentialzellbild erstellt. In mehr als 90 % der Fälle ist jedoch mit ausreichender Quantität und Qualität zu rechnen, vor allem dann, wenn die zur Sputumproduktion eingesetzte inhalierte Kochsalzkonzentration hinreichend hoch (> 5 %) gewählt wird. Die Gefahr einer dadurch induzierten Bronchokonstriktion besteht bei Gesunden nicht.

Die Antragsteller weisen reichhaltige Erfahrung in der Durchführung von Sputuminduktionen auf und waren an der methodologischen Weiterentwicklung und Validierung dieser Tests sowie ihrer klinisch-wissenschaftlichen Einführung in Deutschland beteiligt.

### 8.10 Blutentnahme

Nach jeder Exposition erfolgt eine Blutentnahme, obgleich da die entsprechenden Messgrößen nach den Erfahrungen der Vergangenheit wenig sensitiv und der circadianen Rhythmik besonders stark ausgesetzt sind. Die Blutentnahme wird hauptsächlich eingeschlossen, um eine Parallele zu der Arbeit von Frampton et al. [2002] zu haben und die Zahl der Leukozyten, ihre Subpopulationen, insbesondere die Subtypen von Lymphozyten sowie das Verhältnis CD4- zu CD8-positiver Zellen zu erfassen. Darüber hinaus sollen neben Standardparametern wie Hämatokrit auch IL-8, IL-6 und IL-1beta als Entzündungsparameter sowie Endothelin-1 als gefäß-aktive Substanz [Scharrer et al. 2007] erfasst werden, ferner NO-Metabolite als Marker eines oxidativen Stress.

### 8.11 Vitalparameter

Es werden die üblichen Vitalparameter wie Blutdruck und Puls zur Kontrolle bestimmt. Entgegen ursprünglicher Erwägungen soll die Reaktion auf applizierte Pharmaka im Arm als Maß der Gefäß-Reaktivität nicht gemessen werden. Zwar wurden für diese in experimentellen Studien mit Partikeln beim Menschen Effekte gefunden, doch gilt dies nicht für eine neuere Studie zum inhalierten Stickstoffmonoxid [Langrish et al. 2010]. Daher glauben wir aufgrund des bedeutenden experimentellen Zusatzaufwandes und der umfangreichen anderen Tests auf diese Messgröße verzichten zu können. Als Marker von Gefäßeffekten ziehen wir die Analyse der Diffusionskapazität der Lunge vor (siehe 8.3).

### 8.12 Fragebogen zu Symptomen

Mittels standardisierter und in vorangegangenen experimentellen Expositionsstudien bewährter Fragebögen [Schnuch et al. 2009] werden allgemeine und respiratorische Symptome während und nach Exposition erfragt. Die Punktwerte der einzelnen Items reichen von 0 bis 10; es hat sich in der Auswertung bewährt, Summenscores für die Bereiche „respiratorisch“ und „allgemein“ zu berechnen.

## **9. Literatur**

- Barck C, Sandström T, Lundahl J, Halldén G, Svartengren M, Strand V, Rak S, Bylin G (2002). Ambient level of NO<sub>2</sub> augments the inflammatory response to inhaled allergen in asthmatics. *Respir Med* 96:907-17.
- Barck C, Lundahl J, Halldén G, Bylin G (2005). Brief exposures to NO<sub>2</sub> augment the allergic inflammation in asthmatics. *Environ Res* 97:58-66.



- Bauer MA, Utell MJ, Morrow PE, Speers DM, Gibb FR (1986). Inhalation of 0.30 ppm nitrogen dioxide potentiates exercise-induced bronchospasm in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 134:1203-8.
- Blomberg A, Krishna MT, Bocchino V, Biscione GL, Shute JK, Kelly FJ, Frew AJ, Holgate ST, Sandström T. The inflammatory effects of 2 ppm NO<sub>2</sub> on the airways of healthy subjects (1997). *Am J Respir Crit Care Med* 156:418-24. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 156:2028.
- Blomberg A, Krishna MT, Helleday R, Söderberg M, Ledin MC, Kelly FJ, Frew AJ, Holgate ST, Sandström T (1999). Persistent airway inflammation but accommodated antioxidant and lung function responses after repeated daily exposure to nitrogen dioxide. *Am J Respir Crit Care Med* 159:536-43.
- Chambers DC, Ayres JG (2001). Effects of nitrogen dioxide exposure and ascorbic acid supplementation on exhaled nitric oxide in healthy human subjects. *Thorax* 56:774-8.
- Comandini A, Rogliani P, Nunziata A, Cazzola M, Curradi G, Saltini C (2009). Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum. *Respir Med* 103:1592-613.
- Devlin RB, Horstman DP, Gerrity TR, Becker S, Madden MC, Biscardi F, Hatch GE, Koren HS (1999). Inflammatory response in humans exposed to 2.0 ppm nitrogen dioxide. *Inhal Toxicol* 11:89-109.
- Dressel H, de la Motte D, Reichert J, Ochmann U, Petru R, Angerer P, Holz O, Nowak D, Jörres RA (2008a). Exhaled nitric oxide: independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med* 102:962-9.
- Dressel H, Filser L, Fischer R, de la Motte D, Steinhäusser W, Huber RM, Nowak D, Jörres RA (2008b). Lung diffusing capacity for nitric oxide and carbon monoxide: dependence on breath-hold time. *Chest* 133:1149-54.
- Dressel H, Filser L, Fischer R, Marten K, Müller-Lisse U, de la Motte D, Nowak D, Huber RM, Jörres RA (2009). Lung diffusing capacity for nitric oxide and carbon monoxide in relation to morphological changes as assessed by computed tomography in patients with cystic fibrosis. *BMC Pulm Med* 16:9:30.
- Flamant-Hulin M, Caillaud D, Sacco P, Penard-Morand C, Annesi-Maesano I (2010). Air pollution and increased levels of fractional exhaled nitric oxide in children with no history of airway damage. *J Toxicol Environ Health A* 73:272-83.
- Folinsbee LJ (1992). Does nitrogen dioxide exposure increase airways responsiveness? *Toxicol Ind Health* 8:273-83.
- Frampton MW, Smeglin AM, Roberts NJ Jr, Finkelstein JN, Morrow PE, Utell MJ (1989a). Nitrogen dioxide exposure in vivo and human alveolar macrophage inactivation of influenza virus in vitro. *Environ Res* 48:179-92.
- Frampton MW, Finkelstein JN, Roberts NJ Jr, Smeglin AM, Morrow PE, Utell MJ (1989b). Effects of nitrogen dioxide exposure on bronchoalveolar lavage proteins in humans. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1:499-505.
- Frampton MW, Morrow PE, Cox C, Gibb FR, Speers DM, Utell MJ (1991). Effects of nitrogen dioxide exposure on pulmonary function and airway reactivity in normal humans. *Am Rev Respir Dis* 143:522-7.
- Frampton MW, Boscia J, Roberts NJ Jr, Azadniv M, Torres A, Cox C, Morrow PE, Nichols J, Chalupa D, Frasier LM, Gibb FR, Speers DM, Tsai Y, Utell MJ (2002). Nitrogen dioxide exposure: effects on airway and blood cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L155-65.
- Hazucha MJ, Ginsberg JF, McDonnell WF, Haak ED Jr, Pimmel RL, Salaam SA, House DE, Bromberg PA (1983). Effects of 0.1 ppm nitrogen dioxide on airways of normal and asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 54:730-9.
- Helleday R, Sandström T, Stjernberg N (1994). Differences in bronchoalveolar cell response to nitrogen dioxide exposure between smokers and nonsmokers. *Eur Respir J* 7:1213-20.
- Holz O, Jörres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H (1998a). Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 28:284-92.
- Holz O, Richter K, Jörres RA, Speckin P, Mücke M, Magnussen H (1998b). Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days. *Thorax* 53:83-6.

- Holz O, Jörres RA, Timm P, Mücke M, Richter K, Koschyk S, Magnussen H (1999). Ozone-induced airway inflammatory changes differ between individuals and are reproducible. *Am J Respir Crit Care Med* 159:776-84.
- Holz O, Böttcher M, Timm P, Koschyk S, Abel G, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA (2001). Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid after repeated ozone exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 74:242-8.
- Holz O, Mücke M, Paasch K, Böhme S, Timm P, Richter K, Magnussen H, Jörres RA (2002). Repeated ozone exposures enhance bronchial allergen responses in subjects with rhinitis or asthma. *Clin Exp Allergy* 32:681-9.
- Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Komaki Y, Barnes PJ, Shirato K, Hattori T (2003). Xanthine oxidase inhibition reduces reactive nitrogen species production in COPD airways. *Eur Respir J* 22:457-61. Erratum in: *Eur Respir J* 23:496.
- Johnson DA, Frampton MW, Winters RS, Morrow PE, Utell MJ (1990). Inhalation of nitrogen dioxide fails to reduce the activity of human lung alpha-1-proteinase inhibitor. *Am Rev Respir Dis* 142:758-62.
- Jörres R, Magnussen H (1990). Airways response of asthmatics after a 30 min exposure, at resting ventilation, to 0.25 ppm NO<sub>2</sub> or 0.5 ppm SO<sub>2</sub>. *Eur Respir J* 3:132-7.
- Jörres R, Magnussen H (1991). Effect of 0.25 ppm nitrogen dioxide on the airway response to methacholine in asymptomatic asthmatic patients. *Lung* 169:77-85.
- Jörres R, Nowak D, Grimminger F, Seeger W, Oldigs M, Magnussen H (1995). The effect of 1 ppm nitrogen dioxide on bronchoalveolar lavage cells and inflammatory mediators in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 8:416-24.
- Jörres R, Nowak D, Magnussen H (1996). The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 153:56-64.
- Jörres RA, Nowak D, Kirsten D, Grönke L, Magnussen H (1997). A short protocol for methacholine provocation testing adapted to the Rosenthal-Chai dosimeter technique. *Chest* 111:866-9.
- Jörres RA, Holz O, Zachgo W, Timm P, Koschyk S, Müller B, Grimminger F, Seeger W, Kelly FJ, Dunster C, Frischer T, Lubec G, Waschewski M, Niendorf A, Magnussen H (2000). The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1855-61.
- Langrish JP, Lundbäck M, Barath S, Söderberg S, Mills NL, Newby DE, Sandström T, Blomberg A (2010). Exposure to nitrogen dioxide is not associated with vascular dysfunction in man. *Inhal Toxicol* 22:192-8.
- Latza U, Gerdes S, Baur X (2009). Effects of nitrogen dioxide on human health: systematic review of experimental and epidemiological studies conducted between 2002 and 2006. *Int J Hyg Environ Health* 212:271-87.
- Linn WS, Solomon JC, Trim SC, Spier CE, Shamoo DA, Venet TG, Avol EL, Hackney JD (1985). Effects of exposure to 4 ppm nitrogen dioxide in healthy and asthmatic volunteers. *Arch Environ Health* 40:234-9.
- Liu L, Poon R, Chen L, Frescura AM, Montuschi P, Ciabattini G, Wheeler A, Dales R (2009). Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect* 117:668-74.
- Magnussen H, Jörres R, Wagner HM, von Nieding G (1990). Relationship between the airway response to inhaled sulfur dioxide, isocapnic hyperventilation, and histamine in asthmatic subjects. *Int Arch Occup Environ Health* 62:485-91.
- Maples KR, Sandström T, Su YF, Henderson RF (1991). The nitric oxide/heme protein complex as a biologic marker of exposure to nitrogen dioxide in humans, rats, and in vitro models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:538-43.
- Merget R, Jörres RA, Heinze E, Haufs MG, Taeger D, Brüning T (2009). Development of a 1-concentration-4-step dosimeter protocol for methacholine testing. *Respir Med* 103:607-13.

- Mohsenin V, Gee JB (1987). Acute effect of nitrogen dioxide exposure on the functional activity of alpha-1-protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid of normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 136:646-50.
- Morrow PE, Utell MJ, Bauer MA, Smeglin AM, Frampton MW, Cox C, Speers DM, Gibb FR (1992). Pulmonary performance of elderly normal subjects and subjects with chronic obstructive pulmonary disease exposed to 0.3 ppm nitrogen dioxide. *Am Rev Respir Dis* 145:291-300.
- Nowak D, Jörres R, Berger J, Claussen M, Magnussen H (1997). Airway responsiveness to sulfur dioxide in an adult population sample. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1151-6.
- Orehek J, Massari JP, Gayraud P, Grimaud C, Charpin J (1976). Effect of short-term, low-level nitrogen dioxide exposure on bronchial sensitivity of asthmatic patients. *J Clin Invest* 57:301-7.
- Pathmanathan S, Krishna MT, Blomberg A, Helleday R, Kelly FJ, Sandström T, Holgate ST, Wilson SJ, Frew AJ (2003). Repeated daily exposure to 2 ppm nitrogen dioxide upregulates the expression of IL-5, IL-10, IL-13, and ICAM-1 in the bronchial epithelium of healthy human airways. *Occup Environ Med* 60:892-6.
- Praml G, Scharrer E, de la Motte D, Nowak D, Scheuch G, Sommerer K, Radon K (2005). The physical and biological doses of methacholine are different for Mefar MB3 and Jaeger APS sidestream nebulizers. *Chest* 128:3585-9.
- Rubinstein I, Bigby BG, Reiss TF, Boushey HA Jr (1990). Short-term exposure to 0.3 ppm nitrogen dioxide does not potentiate airway responsiveness to sulfur dioxide in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 141:381-5.
- Rubinstein I, Reiss TF, Bigby BG, Stites DP, Boushey HA Jr (1991). Effects of 0.60 PPM nitrogen dioxide on circulating and bronchoalveolar lavage lymphocyte phenotypes in healthy subjects. *Environ Res* 55:18-30.
- Sandström T, Andersson MC, Kolmodin-Hedman B, Stjernberg N, Angström T (1990). Bronchoalveolar mastocytosis and lymphocytosis after nitrogen dioxide exposure in man: a time-kinetic study. *Eur Respir J* 3:138-43.
- Sandström T, Stjernberg N, Eklund A, Ledin MC, Bjermer L, Kolmodin-Hedman B, Lindström K, Rosenhall L, Angström T (1991). Inflammatory cell response in bronchoalveolar lavage fluid after nitrogen dioxide exposure of healthy subjects: a dose-response study. *Eur Respir J* 4:332-9.
- Sandström T, Helleday R, Bjermer L, Stjernberg N (1992a). Effects of repeated exposure to 4 ppm nitrogen dioxide on bronchoalveolar lymphocyte subsets and macrophages in healthy men. *Eur Respir J* 5:1092-6.
- Sandström T, Ledin MC, Thomasson L, Helleday R, Stjernberg N (1992b). Reductions in lymphocyte subpopulations after repeated exposure to 1.5 ppm nitrogen dioxide. *Br J Ind Med* 49:850-4.
- Scharrer E, Hessel H, Kronseder A, Guth W, Rolinski B, Jörres RA, Radon K, Schierl R, Angerer P, Nowak D (2007). Heart rate variability, hemostatic and acute inflammatory blood parameters in healthy adults after short-term exposure to welding fume. *Int Arch Occup Environ Health* 80:265-72.
- Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jörres RA (2000). The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur Respir J* 16:1115-8.
- Schnuch A, Oppel E, Oppel T, Römmelt H, Kramer M, Riu E, Darsow U, Przybilla B, Nowak D, Jörres RA (2010). Experimental inhalation of fragrance allergens in predisposed subjects: effects on skin and airways. *Br J Dermatol* 162:598-606.
- Solomon C, Christian DL, Chen LL, Welch BS, Kleinman MT, Dunham E, Erle DJ, Balmes JR (2000). Effect of serial-day exposure to nitrogen dioxide on airway and blood leukocytes and lymphocyte subsets. *Eur Respir J* 15:922-8.
- Strand V, Rak S, Svartengren M, Bylin G (1997). Nitrogen dioxide exposure enhances asthmatic reaction to inhaled allergen in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 155:881-7.
- Strand V, Svartengren M, Rak S, Barck C, Bylin G (1998). Repeated exposure to an ambient level of NO<sub>2</sub> enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *Eur Respir J* 12:6-12.
- von Nieding G, Wagner HM (1979). Effects of NO<sub>2</sub> on chronic bronchitis. *Environ Health Perspect* 29:137-42.

- von Nieding G, Krekeler H, Fuchs R, Wagner M, Koppenhagen K (1973). Studies of the acute effects of NO<sub>2</sub> on lung function: influence on diffusion, perfusion and ventilation in the lungs. *Int Arch Arbeitsmed* 31:61-72.
- Wewel AR, Crusius JA, Gatzemeier U, Heckmayr M, Becher G, Magnussen H, Jörres RA, Holz O (2006). Time course of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide during chemotherapy. *Eur Respir J* 27:1033-9
- Wiebicke W, Jörres R, Magnussen H (1990). Comparison of the effects of inhaled corticosteroids on the airway response to histamine, methacholine, hyperventilation, and sulfur dioxide in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 86:915-23.
- Witten A, Solomon C, Abbritti E, Arjomandi M, Zhai W, Kleinman M, Balmes J (2005). Effects of nitrogen dioxide on allergic airway responses in subjects with asthma. *J Occup Environ Med* 47:1250-9.