

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

Toxizität von Stickstoffdioxid in realer Umweltkonzentration

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von Sebastian Thielen
aus Bingen am Rhein

Würzburg, Dezember
2012

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2013

Der Promovend ist Zahnarzt.

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Umweltbelastung durch Stickstoffdioxid	1
1.2	Wirkung von Stickstoffdioxid auf die Gesundheit	2
1.2.1	Epidemiologische Studien	2
1.2.2	Tierexperimentelle Studien	4
1.2.3	Human-experimentelle Studien	5
1.2.4	<i>In vitro</i> -Studien	6
1.3	Festlegung und Einhaltung von Grenzwerten	6
1.4	Fragestellung vorliegender Arbeit	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Patientenproben	10
2.2	Zellkultur	10
2.2.1	Isolierung humaner Nasenschleimhautzellen	10
2.2.2	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau	11
2.2.3	Kultivierung von Nasenschleimhautzellen	13
2.3	Exposition	16
2.3.1	Expositionskammer	16
2.3.2	Gasverdünnung von Stickstoffdioxid	18
2.4	Analyse	19
2.4.1	Durchführung des Caspase-3 ELISA	19
2.4.2	Durchführung des Comet Assays	22
2.4.3	Durchführung des Mikrokerntests	25
2.5	Statistik und graphische Darstellung	27

3	Ergebnisse	32
3.1	Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests	32
3.2	Ergebnisse des Caspase-3 ELISA	33
3.3	Ergebnisse des Comet Assays	35
3.4	Ergebnisse des Mikrokerntests	37
4	Diskussion	40
4.1	Auswahl der Patientenproben und der Kultivierungsmethode	40
4.2	In vitro-Testverfahren	41
4.2.1	Trypanblau-Ausschlusstest	41
4.2.2	Caspase-3 ELISA	42
4.2.3	Comet Assay	43
4.2.4	Mikrokerntest	45
4.3	Zytotoxizität	46
4.3.1	Vitalität	46
4.3.2	Apoptosen und Nekrosen	47
4.3.3	Zellzyklus	49
4.3.4	Zellproliferation	50
4.4	Genotoxizität	51
4.4.1	DNA-Strangbrüche	51
4.4.2	Mikrokerne	53
4.5	Erbgutveränderndes Potential von Stickstoffdioxid	55
4.6	Schwellenwerte und aktuelle Grenzwerte für Stickstoffdioxid	56
4.6.1	Aspekte zur Auswahl des untersuchten Konzentrationsbereichs	56
4.6.2	Festlegung von Schwellenwerten	56
4.6.3	Wertung aktueller Grenzwerte	57
4.7	Ausblick	59

5	Zusammenfassung	60
----------	------------------------	-----------

6	Anhang	61
----------	---------------	-----------

6.1	Materialien	61
6.1.1	Laborgeräte	61
6.1.2	Verbrauchsmaterialien	61
6.1.3	Lösungen, Medien und Reagenzien	62
6.2	Datenanhang	63
6.3	Abbildungsnachweis	68
6.4	Literaturverzeichnis	69
6.5	Kongressbeiträge und Publikation	83

Danksagung

Curriculum Vitae

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALI	Air-Liquid-Interface = Luft-Flüssigkeits-Grenze
BEGM	Bronchial Epithelial Growth Medium = Bronchienepithelzell-Wachstumsmedium
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
DT	DNA in Tail = DNA-Anteil im Schweif
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
EU	Europäische Union
FCS	Fetal Calf Serum = Fetales Kälberserum
h	hora = Stunde
MFC	Mass-Flow-Controller = Massenflusskontrollgeräte
µl	Mikroliter
mA	Milliampere
ml	Milliliter
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zoliumbromid
n	numerus = Anzahl
Nk	Negativkontrolle
nl/nm	Nanoliter/Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
OTM	Olive Tail Moment = Olive-Schweif-Moment
p	probability = Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
ppm	parts per million = Teile von einer Million
RNA	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

Stickstoffoxide setzen sich aus den Elementen Stickstoff (N) und Sauerstoff (O) zusammen. Wichtigste Vertreter sind Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid (NO₂).

Die Oxide gelangen natürlichen und künstlichen Ursprungs in unsere Umwelt, wobei Abgase aus Industrie und Kraftfahrzeugverkehr die Hauptquellen der heutigen Stickstoffoxidemissionen darstellen [BMU 2009]. Da das Auftreten von NO₂ mit dem Aufkommen des Kraftfahrzeugverkehrs korreliert, wird NO₂ auch als Verkehrsmarker bezeichnet [Rijnders et al. 2001].

Tiefgreifende Effekte von NO₂ auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt sind bekannt [Umweltbundesamt 2011 a]. Um diese Effekte zu begrenzen oder gar auszuschließen, wurden Grenzwerte für NO₂ auf nationaler, europäischer und internationaler Ebene vereinbart [WHO 2006; EU 2008; Bundesregierung Deutschland 2010]. Der Einstundengrenzwert limitiert mit 200 µg/m³ NO₂ die innerhalb einer Stunde auftretenden NO₂-Konzentrationen [WHO 2006; Bundesregierung Deutschland 2010]. Der Jahresgrenzwert begrenzt die im Verlauf eines Jahres durchschnittlich auftretenden NO₂-Konzentrationen auf 40 µg/m³ NO₂ [WHO 2006; Bundesregierung Deutschland 2010].

1.1 Umweltbelastung durch Stickstoffdioxid

Stickstoffoxide bilden sich endotherm unter Energiezufuhr. Somit entstehen sie insbesondere bei Verbrennungsprozessen in Kraftwerken und Automotoren [Umweltbundesamt 2011 a]. Neben NO₂ entsteht durch den Verbrennungsprozess NO, welches größtenteils mit Luftsauerstoff zu NO₂ reagiert [Umweltbundesamt 2011 a].

Der Kraftfahrzeugverkehr hatte im Jahr 2007 einen Anteil von 44 % an der Gesamtemission der Stickstoffoxide in der Bundesrepublik Deutschland [Umweltbundesamt 2009]. Hingegen hatten natürlich entstehende Stickstoffoxide, durch beispielsweise Freisetzung von NO aus den Böden, einen nur geringen Anteil an

der Gesamtemission der Stickstoffoxide [Umweltbundesamt 2011 b]. Da der Kraftfahrzeugverkehr eine der Hauptquellen der Stickstoffoxide darstellt, übertrifft der verkehrsnah gemessene NO_2 -Jahresmittelwert ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{NO}_2$) den im ländlichen Bereich auftretenden NO_2 -Jahresmittelwert (circa $10 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{NO}_2$) deutlich [Umweltbundesamt 2011 b].

1.2 Wirkung von Stickstoffdioxid auf die Gesundheit

In seiner Wirkung auf den menschlichen Organismus wird NO_2 zunächst als stechender Geruch in Konzentrationen von über $0,9 \text{ mg}/\text{m}^3$ wahrgenommen [Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie 2008]. Die Schleimhäute von Augen, Nase und Pharynx werden gereizt [Umweltbundesamt 2011 a]. Als weitere Symptome können Atembeschwerden und Hustenreiz auftreten [Umweltbundesamt 2011 a].

Um gesundheitsschädliche Wirkungen zu verhindern, wurden von Gesetzgebern und Weltgesundheitsorganisation (WHO) Grenzwerte für kurz- und langzeitige Expositionen gegenüber NO_2 vereinbart. Die innerhalb einer Stunde auftretende Menge an NO_2 pro m^3 Luft reguliert der Einstundengrenzwert, während der Jahresgrenzwert die durchschnittlich innerhalb eines Jahres pro m^3 Luft auftretende Menge an NO_2 limitiert [WHO 2006; EU 2008; Bundesregierung Deutschland 2010]. Ergänzend wurde eine sogenannte Alarmschwelle vereinbart, deren Erreichen sofortigen Handlungsbedarf erfordert [EU 2008; Bundesregierung Deutschland 2010].

Im Folgenden werden epidemiologische, tier- und human-experimentelle sowie *in vitro*-Studien vorgestellt, in denen jeweils in Kurz- oder Langzeitexpositionen die Toxizität von NO_2 untersucht wurde.

1.2.1 Epidemiologische Studien

Bei epidemiologischen Studien zur NO_2 -Exposition muss beachtet werden, dass NO_2 meist als Leitsubstanz für den Kraftfahrzeugverkehr fungiert [Rijnders et al. 2001]. Eine erhöhte NO_2 -Konzentration bedeutet somit im Regelfall auch eine erhöhte Konzentration anderer Luftschadstoffe [WHO 2006] wie zum Beispiel Dieselruß und Benzol.

Zu beobachtende Effekte einer NO₂-Belastung können Folge einer Außenluftbelastung beispielsweise durch Kraftfahrzeugverkehr [Hagenbjork-Gustafsson et al. 1996] oder einer Innenraumbelastung beispielsweise durch Zigarettenrauch sein [Halios et al. 2005]. Es können epidemiologische Studien voneinander unterschieden werden, die die Effekte einer Kurzzeit- und die die Effekte einer Langzeitexposition gegenüber NO₂ untersuchen.

In Kohortenstudien konnten vereinzelt Zusammenhänge zwischen erhöhter Mortalität und Langzeitexpositionen gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen nachgewiesen werden [Nafstad et al. 2004; Filleul et al. 2005; Beelen et al. 2008], während in anderen Studien ein solcher Zusammenhang nicht auftrat [Abbey et al. 1999; Pope et al. 2002]. Wenn sich ein Zusammenhang nachweisen ließ, stieg die Sterblichkeit mit Erhöhung der NO₂-Konzentration an. Die epidemiologische Untersuchung von Stickstoffdioxid und Luftschadstoffen auf ihre kanzerogene Wirkung ergab, dass die Gesamtheit an Luftschadstoffen in einem Zusammenhang mit einem Risiko für Lungenkrebs steht [Nafstad et al. 2003]. In weiteren Studien wurde der Einfluss einer NO₂-Exposition auf die Lungenfunktion untersucht. Hierbei ließ sich eine Abnahme der Vital- und der Sekundenkapazität bei Erhöhung der NO₂-Belastung nachweisen [Ackermann-Lieblich et al. 1997]. Eine eingeschränkte Lungenfunktion nach Exposition gegenüber einer erhöhten NO₂-Konzentration trat auch bei Kindern auf [Schwartz 1989; Rosenlund et al. 2009].

In einigen Studien zur Kurzzeitwirkung von NO₂ ließen sich Zusammenhänge zwischen einer verstärkten Mortalität und einer NO₂-Belastung nachweisen [Aga et al. 2003; Chen et al. 2008], während in der amerikanischen *National Morbidity, Mortality and Air Pollution*-Studie ein solcher Zusammenhang nicht auftrat [Samet et al. 2000]. Linn und Mitarbeiter stellten Zusammenhänge zwischen einem Anstieg von Krankenhausaufnahmen aufgrund pulmonaler und kardiovaskulärer Komplikationen und einem kurzzeitigen Anstieg von NO₂ dar [Linn et al. 2000]. Nach Hajat und Mitarbeitern kam es insbesondere in Wintermonaten bei Kindern vermehrt zu Konsultationen wegen Asthma und respiratorischen Komplikationen bei kurzzeitig erhöhten NO₂-Konzentrationen, während sich für Erwachsene nur für Feinstaub (PM10) eine jahresunabhängige Korrelation feststellen ließ [Hajat et al. 1999]. In der *Air Pollution and Health: a European Approach*-Studie konnten an der Pariser Stadtbevölkerung

saisonunabhängige Zusammenhänge zwischen NO₂-Belastung und Konsultationen wegen Asthma nachgewiesen werden [Dab et al. 1996]. Ein direkter Zusammenhang zwischen Lungenkrebsentstehung und Kurzzeitexpositionen gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen konnte epidemiologisch bisher nicht nachgewiesen werden.

1.2.2 Tierexperimentelle Studien

Auch bei tierexperimentellen Studien kann man unterscheiden zwischen Kurz- und Langzeitexpositionen. Im Unterschied zu epidemiologischen Studien können tierexperimentelle Studien als Kammerexperimente unter konstanten und regulierbaren NO₂-Konzentrationen durchgeführt werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass in Tierexperimenten wesentlich höhere Konzentrationen getestet wurden als in der Atmosphäre vorhanden [Kraft et al. 2005]. Die getesteten Konzentrationen sind somit auch deutlich höher als die in epidemiologischen Studien untersuchten Konzentrationen. Während Langzeitexpositionen von Ratten gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen wurden Veränderungen des Lungengewebes in Form von Ödemen und Fibrosen nachgewiesen [Kubota et al. 1987]. Eine fördernde Wirkung von NO₂ auf die Entstehung von Lungentumoren wurde in Studien nach Langzeitexposition gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen nachgewiesen [Ichinose et al. 1991; Ohyama et al. 1999]. Eine durch NO₂ begünstigte Bildung von Tumoren anderer Organe ließ sich nur an der Nasenhöhle finden [Ichinose et al. 1991]. Zusammenhänge zwischen der Entstehung von Tumormetastasen und der Langzeitexposition gegenüber NO₂ konnten von Richters und Mitarbeitern nachgewiesen werden [Richters 1981]. Hierbei kann NO₂ je nach experimenteller Versuchsanordnung sowohl tumorhemmende als auch tumorfördernde Wirkung entfalten [Witschi 1988].

Nach Kurzzeitexpositionen gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen konnten neben Entzündungen der Luftwege [Papi et al. 1999] auch mutagene Effekte nachgewiesen werden [Isomura et al. 1984]. Tierexperimentelle Mortalitätsstudien wurden in deutlich erhöhten Konzentrationen durchgeführt [Kraft et al. 2005]. So waren an Ratten bereits kurzzeitige Expositionen gegenüber deutlich erhöhten NO₂-Konzentrationen tödlich [Chitano et al. 1995; Smith et al. 1996].

1.2.3 Human-experimentelle Studien

In bisherigen human-experimentellen Studien wurden die Folgen von Kurzzeitexpositionen gegenüber NO_2 auf Asthmatiker und gesunde Probanden untersucht.

An Asthmatikern ließ sich nach Kurzzeitexposition gegenüber erhöhten NO_2 -Konzentrationen ein reduziertes thorakales Gasvolumen (TGV) sowie eine verstärkte bronchiale Reagibilität auf Histamin im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen [Strand et al. 1996]. Da bis zu einer Konzentration von 0,1 ppm NO_2 in Studien mit Asthmatikern keine Einschränkung der Einsekundenkapazität (FEV1) festgestellt wurde [Tunnicliffe et al. 1994], definierte die WHO diesen Wert auch als Stundengrenzwert [WHO 2006].

Bei Exposition gesunder Probanden gegenüber erhöhten NO_2 -Konzentrationen ließen sich Änderungen in der Anzahl menschlicher Abwehrzellen nachweisen [Sandstrom et al. 1992 a; Sandstrom et al. 1992 b]. Blomberg und Mitarbeiter konnten eine durch neutrophile Granulozyten hervorgerufene Entzündungsreaktion in den Atemwegen nachweisen [Blomberg et al. 1997]. Weiterhin wurden nach Exposition gesunder Probanden gegenüber erhöhten NO_2 -Konzentrationen Verminderungen der mukoziliären Aktivität nachgewiesen [Helleday et al. 1995]. Nach Helleday und Mitarbeitern könnte sich dies auf die mukoziliäre *Clearance* auswirken.

Magnussen und Mitarbeiter exponierten Asthmatiker und gesunde Probanden gegenüber erhöhten NO_2 -Konzentrationen und konnten dabei nur für Asthmatiker beständige Veränderungen im Mediatorprofil nachweisen [Magnussen et al. 1994]. Jorres und Mitarbeiter exponierten ebenfalls Asthmatiker und gesunde Probanden gegenüber erhöhten NO_2 -Konzentrationen [Jorres et al. 1995]. Sie wiesen für Asthmatiker eine leicht verminderte Einsekundenkapazität und Änderungen in der Anzahl mehrerer Mediatoren nach, während es bei gesunden Probanden nur zu einer Änderung in der Anzahl eines Mediators kam.

Pathmanathan und Mitarbeiter untersuchten erstmalig die Folgen wiederholter Exposition gesunder Probanden gegenüber erhöhten NO_2 -Konzentrationen [Pathmanathan et al. 2003]. In der Bronchoskopie fanden sie Anzeichen dafür, dass die Exposition gegenüber NO_2 virale Infektionen und Allergien der Atemwege begünstigen kann.

1.2.4 *In vitro*-Studien

Zur Toxizität von NO₂ liegen eine Vielzahl von *in vitro*-Studien vor. In unserem Kontext interessieren hierbei Studien, in denen mit gleichen Zellen wie in unserer Studie gearbeitet wurde. Es werden deswegen *in vitro*-Studien aufgeführt, die mit humanen nasalen Schleimhautzellen oder ihnen verwandten Zellen durchgeführt wurden.

Nach Exposition von Nasenschleimhautzellen gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen ließ sich eine Abnahme der Zilienschlagfrequenz, die im Rahmen der Reinigung der Bronchien von Bedeutung sein kann, nachweisen [Kienast et al. 1993].

In einer weiteren Studie mit Nasenschleimhautzellen konnten erhöhte Histaminwerte als Zeichen einer Entzündungsreaktion [Schierhorn et al. 1999] sowie erhöhte Zytokin- und Tumornekrosefaktorwerte nach Exposition gegenüber einer erhöhten NO₂-Konzentration nachgewiesen werden [Schierhorn et al. 1999; Ayyagari et al. 2004].

Wolz und Mitarbeiter exponierten humane bronchiale Epithelzellen unter den in unserer Studie vergleichbaren Bedingungen gegenüber einer erhöhten NO₂-Konzentration und deckten dabei genotoxische Effekte auf [Wolz et al. 2002].

In Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurden nach Exposition von Nasenschleimhautzellen gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen genotoxische, jedoch keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen [Koehler et al. 2010; Koehler et al. 2011]. Koehler und Mitarbeiter untersuchten 2010 zeit- und konzentrationsabhängige Auswirkungen des Konzentrationsbereichs von 0,01 bis 10 ppm NO₂ und 2011 zeitabhängige Effekte der Konzentration des Einstundengrenzwertes für NO₂.

1.3 Festlegung und Einhaltung von Grenzwerten

Die bestehenden Grenzwerte basieren insbesondere auf Erkenntnissen, die in Studien mit Asthmatikern gewonnen wurden. Die WHO hat 2006 ihre aktuellen Luftqualitätsrichtlinien veröffentlicht [WHO 2006]. In ihnen gibt sie einen jährlichen mittleren Grenzwert von 40 µg/m³ NO₂ und einen Einstundengrenzwert von 200 µg/m³ NO₂ vor.

Die WHO begründet die Grenzwerte mit dem Auftreten gesundheitlicher Begleiterscheinungen bei höheren Konzentrationen. Dabei beruft sie sich insbesondere auf die Folgen von Kurzzeitexpositionen für die Lungenentwicklung und die Funktion der Lunge bei Asthmatikern, aber auch auf negative Folgen für Kinder bei Langzeitexposition gegenüber erhöhten NO₂-Konzentrationen. Weiterhin geht die WHO in den Luftqualitätsrichtlinien auf die Problematik epidemiologischer Studien ein, die Wirkungen des NO₂ von Wirkungen anderer Luftschadstoffe abzugrenzen. Bezüglich ihres Jahresgrenzwertes für NO₂ sieht die WHO in den 2006 veröffentlichten Luftqualitätsrichtlinien Defizite in der Studiensachlage, da der aktuelle Jahresgrenzwert nicht auf unmittelbaren toxischen Schäden beruhe.

2008 wurde eine europäische Luftqualitätsrichtlinie beschlossen [EU 2008]. Die EU-Mitgliedsstaaten verpflichteten sich, die Richtlinie bis 2010 in nationales Recht umzuwandeln. Die 39. Bundesimmissionsschutzverordnung übernahm die Beschlüsse dieser Richtlinie [Bundesregierung Deutschland 2010]. Die Grenzwerte entsprechen der Vorgabe der WHO von 2006 [WHO 2006]. Laut §3 der Bundesimmissionsschutzverordnung von 2010 soll der Jahresgrenzwert zum Schutz der menschlichen Gesundheit dabei 40 µg/m³ NO₂ betragen, während der Einstundengrenzwert auf 200 µg/m³ NO₂ mit maximal 18-maliger Überschreitung pro Jahr vereinbart wurde [Bundesregierung Deutschland 2010].

Der Jahresmittelwert lag im Jahr 2010 an circa 56 % der verkehrsnahen Messstationen über dem vorgeschriebenen Jahresgrenzwert von 40 µg/m³ NO₂ [Umweltbundesamt 2011 b]. Der durchschnittliche Jahresmittelwert aller verkehrsnahen Messstationen lag 2010 bei ungefähr 40 µg/m³ NO₂ [Umweltbundesamt 2011 b]. Bei den Stunden-grenzwerten für NO₂ wurde an circa 5 % aller verkehrsnahen Standorte die maximal erlaubte 18-malige Überschreitung des Grenzwerts überschritten, was eine den Vorjahren vergleichbare Situation darstellt [Umweltbundesamt 2011 b].

Die Festlegung der Grenzwerte erscheint somit aus den tatsächlich gefundenen Werten heraus als realistisch. Doch spiegeln sie auch eine tatsächliche Gefährdungssituation wider?

1.4 Fragestellung vorliegender Arbeit

Der aktuelle Jahresgrenzwert für NO₂ zur Vermeidung gesundheitsschädigender Begleiterscheinungen beträgt 40 µg/m³ NO₂ [Bundesregierung Deutschland 2010]. Dies entspricht 0,02 ppm NO₂. Studienergebnisse, die die geltenden Grenzwerte rechtfertigen, stammen insbesondere aus human-experimentellen Studien an Asthmatikern [WHO 2006]. In bisherigen *in vitro*-Studien wurden NO₂-Konzentrationsbereiche untersucht, die wesentlich höher als die geltenden Grenzwerte sind. Bisher fehlen wissenschaftliche Erkenntnisse aus *in vitro*-Studien im Bereich realistischer Umweltkonzentrationen.

Die vorliegende Dissertation stellt sich deswegen folgende Fragen:

- Treten bereits im Bereich realer NO₂-Umweltkonzentrationen zyto- beziehungsweise genotoxische Effekte in humanen Nasenschleimhautzellen als dem ersten Kontaktorgan volatiler Fremdstoffe auf?
- Wird der natürliche Apoptosemechanismus dabei beeinflusst?
- Verändert sich die Zellproliferation oder der Zellzyklus?
- Existiert ein zeitlicher Schwellenwert für NO₂, ab welchem zyto- beziehungsweise genotoxische Effekte auftreten?
- Werden die aktuellen nationalen und europäischen Grenzwerte den Erkenntnissen aus dieser Studie gerecht?

2 Material und Methoden

In vorliegender *in vitro*-Versuchsreihe wurde in 10 Versuchen die Zyto- und Genotoxizität niedriger NO₂-Expositionen (0,01 ppm NO₂) an humanen nasalen Schleimhautzellen untersucht (Abb. 2.1).

Hierzu isolierte man Nasenschleimhautzellen aus Patientenproben. Nach Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest erfolgte die Kultivierung der Zellen im Air-Liquid-Interface-System (ALI). Die kultivierten Zellen wurden jeweils eine halbe, eine, zwei oder drei Stunden gegenüber 0,01 ppm NO₂ und synthetischer Luft exponiert. Die Testung auf entstandene geno- und zytotoxische Schäden erfolgte mit dem Caspase-3 ELISA, dem Mikrokerntest, dem Comet Assay und dem Trypanblau-Ausschlusstest. Der Trypanblau-Ausschlusstest wurde sowohl vor als auch nach den Expositionen durchgeführt.

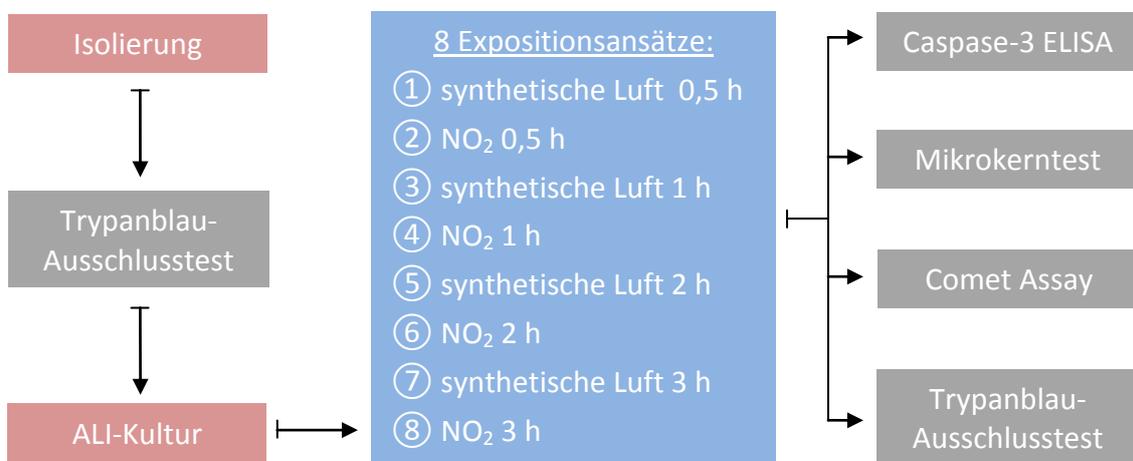


Abb. 2.1: Darstellung des Versuchsablaufs: Nach Isolierung, Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest und Kultivierung der Nasenschleimhautepithelzellen im Air-Liquid-Interface-System (ALI) wurden die Zellen jeweils 0,5 h, 1 h, 2 h sowie 3 h gegenüber 0,01 ppm NO₂ und synthetischer Luft exponiert. Die Analyse der exponierten Zellen erfolgte anschließend in den Testverfahren Caspase-3 ELISA, Mikrokerntest, Comet Assay und Trypanblau-Ausschlusstest.

2.1 Patientenproben

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Nasenschleimhautproben von Patienten des Klinikums für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg verwendet. Die Entfernung von Nasenschleimhaut erfolgte aus rein gesundheitlichen Gründen im Rahmen von Operationen an der inneren Nase oder den Nasennebenhöhlen, sodass für die Patienten keine Nachteile durch eine Studienteilnahme bestanden. Die Studienteilnehmer wurden über die Verwendung der Proben aufgeklärt und haben einer Verwendung schriftlich zugestimmt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg befürwortete das Projekt im Aktenzeichen 16/06. Innerhalb chirurgischer Eingriffe wurden für n=10 Versuche Proben von 10 verschiedenen Spendern im Alter von 30 bis 80 Jahren gewonnen. Die 10 Proben stammen von 6 Männern und 4 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 46 Jahren.

2.2 Zellkultur

In den folgenden Abschnitten erfolgt die ausführliche Beschreibung der ersten Versuchsphase. Diese Phase umfasst die Isolierung der Zellen, die Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl sowie die Kultivierung der Zellen.

2.2.1 Isolierung humaner Nasenschleimhautzellen

Im Operationssaal des Klinikums für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg gewonnenes Nasenschleimhautgewebe wurde in 0,9-prozentiger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung in das angeschlossene wissenschaftliche Labor transportiert. Anschließend überführte man das Gewebe in eine mit *Minimal Essential Medium* (MEM) gefüllte Petrischale und befreite es mit einem Skalpell von Blutkoageln und Knochenfragmenten.

In ein Falcon™-Röhrchen gab man 9 ml MEM und mischte es mit 100 µl Enzymmix (0,1 g Protease und 1 mg Desoxyribonuklease (DNase) in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)). Die von Knochen- und Blutbestandteilen gereinigte Nasenschleimhaut fügte man hinzu. Das Röhrchen wurde daraufhin 24 h lang bei 4°C unter Lichtausschluss auf einer Schüttelplatte bewegt.

Man stoppte die Enzymaktivität, indem man das Medium mit Enzymmix und Schleimhaut in eine Petrischale überführte und 2 ml fetales Kälberserum (FCS) hinzufügte. Mit einem Skalpell konnte die Gewebeoberfläche der Nasenschleimhaut bearbeitet werden. Die Nasenschleimhautzellen lösten sich dabei von dem Präparat und wurden in das Medium der Petrischale gespült. Anschließend überführte man das Medium über eine sterile Kompresse in ein Falcon™-Röhrchen, um größere Gewebstücke zu filtern. Das Röhrchen wurde bei 4°C und 500 g ($1 \text{ g} = 9,81 \text{ m/s}^2$) 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend mit einer Glaspipette abgesaugt. Zur Zellzahlbestimmung nahm man das so entstandene Zellpellet in 1 ml *Bronchial Epithelial Growth Medium* (BEGM) auf.

2.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest wurden Zellzahl und Vitalität vor den Expositionsversuchen bestimmt. Eine erneute Vitalitätsbestimmung fand nach den Expositionen statt.

Zur Durchführung des Trypanblau-Ausschlusstests wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Ihre beiden Zählraster sind in jeweils 4 Großquadrate unterteilt, von denen jedes wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt ist (Abb. 2.2 a-b). Zur Zählung wurden 50 µl Zellsuspension, 50 µl dreiprozentige Essigsäure und 100 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) in einem Reaktionsgefäß miteinander vermischt, und anschließend in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Dabei ermöglichte die Essigsäure durch Membranschädigung an Erythrozyten, dass der Farbstoff Trypanblau auch Erythrozyten anfärben konnte, was eine leichtere Erfassung vitaler Nasenschleimhautzellen ermöglichte. 4 Großquadrate wertete man pro Versuch aus. In vitale Nasenschleimhautzellen drang aufgrund intakter Membran der Farbstoff Trypanblau nicht ein. Bei Zellen mit geschädigter Membran kann das Trypanblau hingegen ungehindert ein-

dringen und die Zelle anfärben. Beim Auszählen muss beachtet werden, dass Zellen, die auf den Rändern benachbarter Kleinquadrate liegen, nicht doppelt ausgezählt werden.

Die ungefärbten und somit vitalen Nasenschleimhautzellen wurden jeweils unter dem Mikroskop zur Zellzahlbestimmung ausgezählt. Mit folgender Formel wurde die Zahl vitaler Zellen pro ml bestimmt:

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl ungefärbter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} \times 4 \times 2,5 \times 10^3$$

$$= \frac{\text{Anzahl ungefärbter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} \times 10^4$$

Um die Konzentration vitaler Zellen pro ml zu erhalten, wird in obenstehender Formel sowohl der Verdünnungsfaktor der Zellsuspension als auch das Volumen der Neubauer-Kammer berücksichtigt. Es wurden 50 µl Zellsuspension mit insgesamt 150 µl Zusätzen (50 µl Essigsäure + 100 µl Trypanblau-Lösung) verdünnt, sodass mit einem Verdünnungsfaktor von 4 multipliziert werden muss, um die unverdünnte Konzentration vitaler Zellen zu erhalten. Da das Volumen der 4 ausgewerteten Großquadrate beziehungsweise 64 Kleinquadrate 0,4 mm³ beträgt, muss zusätzlich mit 2,5 x 10³ multipliziert werden, um die Zahl vitaler Zellen pro ml zu erhalten.

Neben der Zellzahlbestimmung vitaler Zellen kann man mit dem Trypanblau-Ausschlusstest die Vitalität bestimmen. Hierzu wurden zusätzlich die abgestorbenen Zellen pro ml ausgezählt und mit der Anzahl vitaler Zellen pro ml prozentual verglichen. Durch die Bestimmung der Vitalität vor und nach Exposition gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise 0,01 ppm NO₂ konnte man die Auswirkungen der Expositionen auf die Vitalität bestimmen.

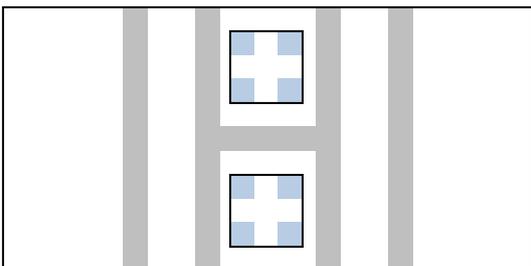


Abb. 2.2 a: Schematisierte Neubauer-Kammer mit 2 Zählrastern und jeweils 4 für die Zellzählung relevanten Großquadraten (hellblau markiert). Hellgrau markiert sind Quer- und Längsrinnen.

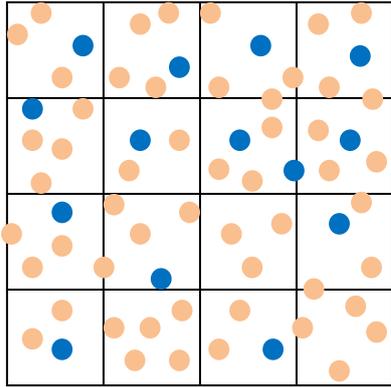


Abb. 2.2 b: Darstellung eines der in Abbildung 2.2 a hellblau dargestellten Quadrate der Neubauer-Kammer, das wiederum in 16 Kleinquadrate aufgeteilt ist. Mit Trypanblau angefärbte avitale Zellen sind dunkelblau dargestellt, hellorange hingegen vitale unangefärbte Zellen.

2.2.3 Kultivierung von Nasenschleimhautzellen

Nach Isolierung und Zellzählung wurden die Nasenschleimhautzellen im Air-Liquid-Interface (ALI) kultiviert. Im ALI-System wachsen Zellen auf einer permeablen Membran. Medium unterhalb der permeablen Membran versorgt Zellen auf der Membran mit Nährstoffen über Poren einer definierten Porengröße. Als Membranen wurden Transwell®-Membraneinsätze (Corning Incorporated-Life Sciences, NY, NY, USA) mit einem Durchmesser von jeweils 12 mm und einer Porengröße von 0,4 μm in eine 12-Well-Platte (Corning Incorporated-Life Sciences, NY, NY, USA) eingesetzt (Abb. 2.3). Die Einsätze beschichtete man mit Kollagen A, um den Nasenschleimhautzellen ein besseres Wachstum zu ermöglichen. Hierzu wurden 100 μl Kollagen A auf jeden Einsatz pipettiert. Das Kollagen A inkubierte anschließend bei 37°C 30 Minuten im Brutschrank.



Abb. 2.3: 12-Well-Platte mit 12 Transwell®-Membraneinsätzen (Durchmesser der Einsätze: 12 mm, Porengröße: 0,4 μm) zur Kultivierung der Nasenschleimhaut (Corning Incorporated-Life Sciences, NY, NY, USA).

Beim ALI-System unterscheidet man jeweils ein apikales und ein basales Kompartiment (Abb. 2.4 a-b). Das apikale Kompartiment umschließt die Fläche apikal des Membraneinsatzes, das basale die zwischen Boden der Vertiefung der Zellkulturplatte und Boden des Membraneinsatzes.

Die nach Isolierung der Nasenschleimhautzellen erhaltene Zellsuspension konnte mit Hilfe der Zellzahlbestimmung auf 10^5 Zellen/ml konzentriert werden. Davon wurden jeweils 500 μ l in das apikal gelegene Kompartiment pipettiert. In das basale Kompartiment füllte man hingegen jeweils 1,5 ml BEGM als Nährmedium. Ein Mediumwechsel erfolgte an 3 Tagen in der Woche, wobei in das apikale Segment zunächst 500 μ l BEGM und in das basale Segment 1,5 ml BEGM pipettiert wurden (Abb. 2.4 a).

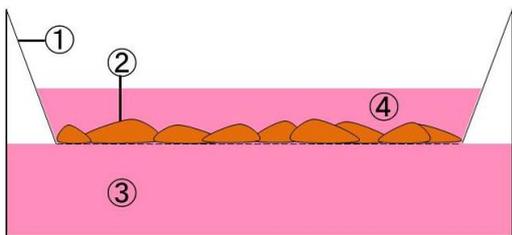


Abb. 2.4 a: Air-Liquid-Interface-System mit: ① Membraneinsatz, ② Nasenschleimhautzellen sowie ③ Medium im basalen Kompartiment und ④ Medium/Zellsuspension im apikalen Kompartiment.

Unter dem Lichtmikroskop (Zeiss 473028, Oberkochen) wurde die Konfluenz der kultivierten Nasenschleimhautzellen bestimmt. Wenn die Zellen nach circa 7-9 Tagen eine 70-prozentige Konfluenz erreichten, befüllte man nur noch das basale Kompartiment mit 1,3 ml BEGM + 39 nl Retinsäure als Nährmedium (Abb. 2.4 b). Die Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt apikal der Umgebungsluft exponiert und ausschließlich von basal mit Nährstoffen versorgt. Somit war ab diesem Zeitpunkt die ALI-Kondition gewährleistet. Die Retinsäure unterstützte als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor das Zellwachstum. Im weiteren Verlauf erfolgte der Mediumwechsel des basalen Kompartimentes an 3 Tagen in der Woche. Nach weiteren 7-9 Tagen im ALI wurden die Testungen an den kultivierten Zellen durchgeführt (Abb. 2.5 a-d).

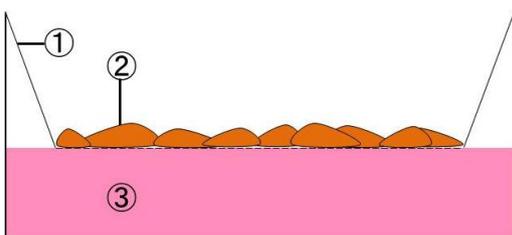


Abb. 2.4 b: Air-Liquid-Interface-System mit: ① Membraneinsatz, ② Nasenschleimhautzellen sowie ③ Medium im basalen Kompartiment.

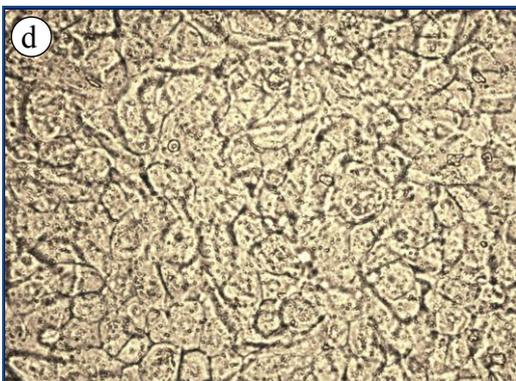
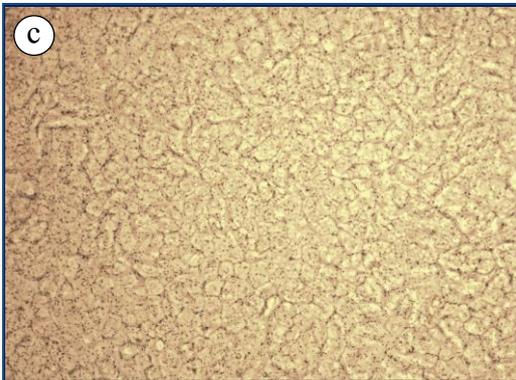


Abb. 2.5 a-d: Mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, DMI 4000 B, Heerbrugg, Schweiz) am Tag 10 der Kultur aufgenommene Nasenschleimhautzellen im Air-Liquid-Interface-System in: a) 50-facher b) 100-facher c) 200-facher d) 400-facher Vergrößerung.

2.3 Exposition

2.3.1 Expositions-kammer

Zur Testung der Zyto- und Genotoxizität niedriger Stickstoffdioxidkonzentrationen wurde die Vitrocell®-Expositions-kammer (Vitrocell® Systems, Waldkirch) verwendet (Abb. 2.6 a). In diese können in 3 einzeln abgetrennte Kammern die Membraneinsätze eingesetzt werden. Eine Außenhülle umgibt die 3 Kammern. In die Außenhülle wurde Wasser gegeben und auf 37°C erwärmt, um physiologische Bedingungen für die Schleimhautzellen zu garantieren. Ein an die Expositions-kammer angeschlossenes Temperatur regulierendes Wasserbad mit Wasserpumpe (Thermo Electron, Karlsruhe) hielt die Temperatur konstant bei 37°C.



Abb. 2.6 a: Vitrocell®-Kammer (Vitrocell® Systems, Waldkirch), bestehend aus Metalldeckel und mit Wasser gefüllter Kammer aus Glas. In der Glaskammer befinden sich 3 abgetrennte Räume zum Einsatz der Membraneinsätze.

Das jeweilige Gas strömt über die weißen Gaseinlässe im Deckel der Vitrocell®-Kammer ein. Darum gruppieren sich jeweils kreisförmig die kleinen Auslassöffnungen, die das Gas gleichmäßig abführen (Abb. 2.6 b).



Abb. 2.6 b: Innenansicht des Deckels der in Abb. 2.6 a abgebildeten Vitrocell®-Kammer (Vitrocell® Systems, Waldkirch) mit Gasein- und auslassöffnungen für die 3 voneinander abgetrennten Räume.

Die Expositionsgase strömen über Zuflüsse im Kammerdeckel in die 3 Kammern mit den Nasenschleimhautzellen. Über Abflüsse im Deckel konnten die Gase wieder entweichen und erneuert werden. An der Seite der Kammer strömte erwärmtes Wasser über einen Zulauf aus dem Wasserbad in die Außenhülle, über einen separaten Ablauf konnte es wieder entweichen (Abb. 2.7). Die gesamte Versuchsanordnung ist unter 2.3.2 dargestellt.

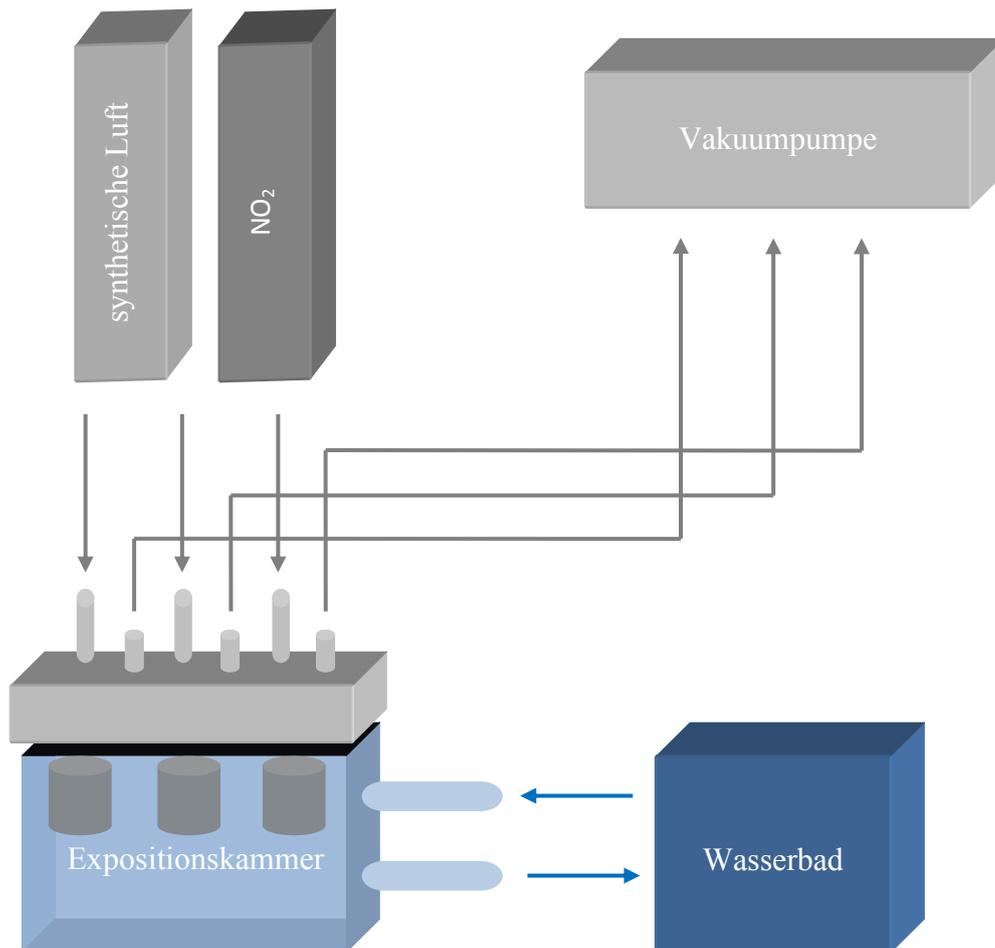


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Zu- und Abläufe der Expositionskammer: Blau dargestellt sind die Wasserzu- und -abläufe aus dem Wasserbad, schwarz die Zu- und Abflüsse der Expositionsgase. Synthetische Luft beziehungsweise 0,01 ppm NO₂ strömt über Einlässe im Kammerdeckel in die Kammer ein. Über Auslässe im Kammerdeckel werden die Gase nach Exposition in die Vakuumpumpe befördert.

2.3.2 Gasverdünnung von Stickstoffdioxid

Die gesamte Versuchsanlage befindet sich unter einem Abzug, der eine Anreicherung von NO_2 im Labor verhindert (Abb. 2.8).

Die untersuchte NO_2 -Konzentration von 0,01 ppm NO_2 entstand durch Verdünnung im Labor. Durch Mischung von 10 ppm NO_2 in synthetischer Luft mit reiner synthetischer Luft wurden 0,01 ppm NO_2 erzeugt. Die Massenflusskontrollgeräte (EL-FLOW select, Bronkhorst, Ruurlo, NL) regulierten die Gasflüsse der einzelnen Gasflaschen. Mit einem NO_2 -Analysator (AC31M, Ansyco, Karlsruhe) wurde die aktuelle Konzentration des NO_2 gemessen. 600 ml/min des durch Mischung von NO_2 und synthetischer Luft hergestellten Mischgases beförderte die Vakuumpumpe (Trivac, LH Leybold, Köln) in den Analysator. Der nach dem Prinzip der Chemilumineszenz arbeitende NO_2 -Analysator misst die chemisch entstandene Strahlung mit einer Genauigkeit von bis zu 0,001 ppm NO_2 . Das in den Analysator beförderte Gasvolumen wurde nach Messung wieder in die Expositionskammer gesaugt (Abb. 2.9).

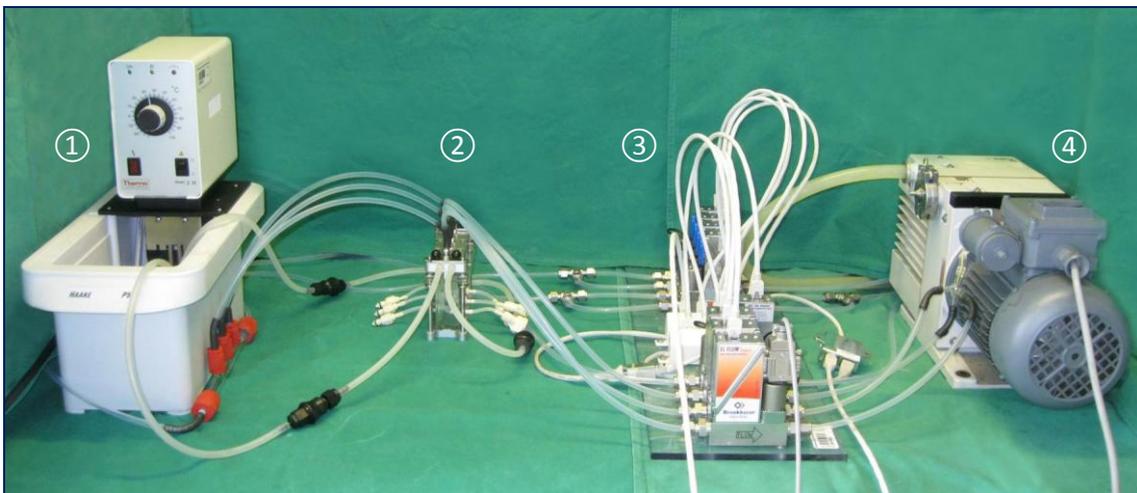


Abb. 2.8: Versuchsanordnung unter Abzug mit ① Wasserbecken Haake P 5 und Einhängethermostat Haake C 10 (Thermo Electron, Karlsruhe), ② Expositionskammer (Vitrocell® Systems, Waldkirch), ③ Massenflusskontrollgeräten EL FLOW select (Bronkhorst, Ruurlo, NL) sowie ④ Pumpanlage Trivac (LH Leybold, Köln).

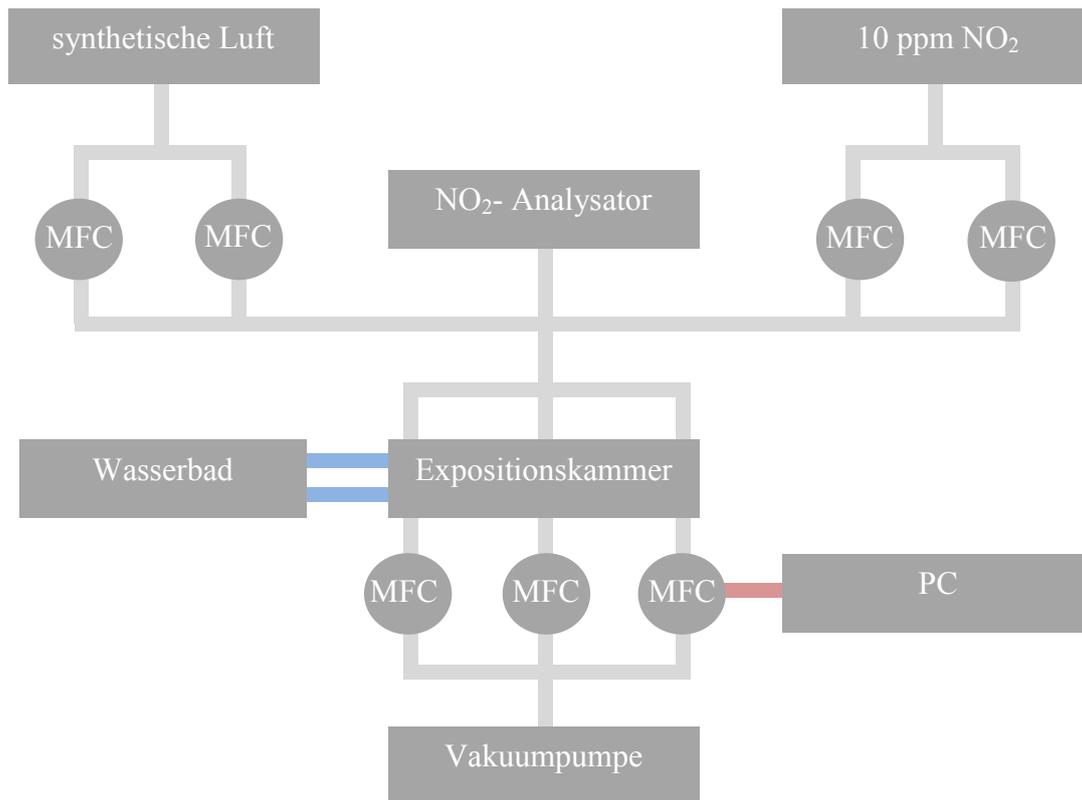


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Exposition von Nasenschleimhautzellen in einer Expositions-kammer gegenüber synthetischer Luft und 0,01 ppm NO₂. 0,01 ppm NO₂ entstanden durch Mischung synthetischer Luft mit 10 ppm NO₂. Hellgrau hinterlegt sind die Gasleitungen, hellblau die Wasserleitungen und hellrot die PC-Leitungen; MFC = Massenflusskontrollgeräte.

2.4 Analyse

2.4.1 Durchführung des Caspase-3 ELISA

Mit dem ELISA-Verfahren wird getestet, ob ein gesuchtes Antigen in einer Testsubstanz vorhanden ist und eine Reaktion auslöst. Beim Antigen kann es sich sowohl um Viren als auch um nieder- oder höhermolekulare Verbindungen handeln.

In vorliegender Studie wurde als ein Verfahren zur Testung der Toxizität des NO₂ der Caspase-3 ELISA angewendet. Caspasen sind Apoptoseenzyme, deren Aktivierung die menschliche Zellapoptose einleitet [Sakahira et al. 1998]. Ein Caspase ELISA

ermöglicht so die Messung der Raten abgestorbener Zellen. Zur Durchführung musste die 96-Well-Mikrotiterplatte (Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA, USA) zunächst mit dem Antikörper (Capture Antibody) beschichtet werden (Abb. 2.10). Die Testsubstanz mit dem Antigen beziehungsweise den geschädigten Zellen wurde sodann aufgetragen. Durch Auftragen eines zweiten Antikörpers (Detection Antibody) mit angebundem Enzym können sich Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, weshalb man diese Technik auch als Sandwich-ELISA bezeichnet. Ein zugegebenes Substrat, das an das Enzym bindet, löst eine Reaktion hervor. In vorliegender Studie kam es zu einem Farbumschlag, der photometrisch in optischer Dichte bestimmt werden konnte. Die Antigenkonzentration beziehungsweise die Caspase-3-Konzentration bestimmt dabei die Signalstärke. Um die erhaltenen Ergebnisse beurteilen zu können, wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Dies gelang mit sogenannten Standardlösungen bekannter Antigenkonzentrationen.

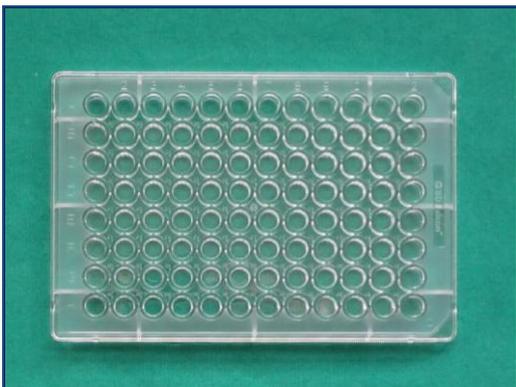


Abb. 2.10: 96-Well-Mikrotiterplatte (Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA, USA) zur Durchführung des Caspase-3 ELISA.

In unserer Versuchsreihe wurde das Human Active Caspase-3 ELISA Set von Becton Dickinson Biosciences (San Diego, CA, USA) verwendet. Es beinhaltet den Fängerantikörper (Capture Antibody), den Nachweisantikörper (Detection Antibody), das Enzym Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) sowie den Standard und das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Solution Kit).

In der Folge wird die Vorgehensweise zum Caspase-3 ELISA in unseren Versuchen nach dem Protokoll des ELISA-Kit-Herstellers Becton Dickinson Biosciences erläutert. Zur Versuchsdurchführung wurden Beschichtungspuffer (0,1-molares Natriumkarbonat; pH 9,5), Verdünnungslösung (PBS und 10 % FCS; pH 7,0), Waschpuffer (PBS und 0,05 % Tween-20), Arbeitsdetektor (1:250 Nachweisantikörper und 1:250 Enzym

Streptavidin-HRP, gelöst in Verdünnungslösung) und Substratlösung (TMB Substrate Solution Kit) frisch angesetzt.

Als Kalibrierungslösungen kamen der sogenannte *Blank* (reine Verdünnungslösung), der Topstandard (1000 Einheiten/ml) sowie die einzelnen Standardansätze (zu 500, 250, 125, 62,5, 31,3 sowie 15,6 Einheiten/ml) zum Einsatz.

Als Proben wurden die Ansätze der einzelnen Expositionen gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise 0,01 ppm NO₂ jeweils doppelt aufgetragen. Nach Exposition der Schleimhautzellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft überführte man den Überstand aus der Expositions-kammer (1,3 ml BEGM + 39 nl Retinsäure) in ein Well einer 12-Well-Platte und ließ ihn 24 h im Brutschrank einwirken. Anschließend wurde der Überstand aus der 12-Well-Platte in ein Eppendorfgefäß überführt, nach Protokoll aufbereitet und bei -80°C bis zur Durchführung des Caspase-3 ELISA tiefgefroren.

Als Positivkontrolle diente Methylmethansulfonat (MMS) in einer Konzentration von 100 Millimol. Hierzu wurden 100 µl einer 11,8-molaren MMS-Stammlösung durch Verdünnen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) auf eine Konzentration von 10 Mol gebracht. Aus dieser 10-molaren Suspension gab man 13 µl auf einen mit 1,3 ml BEGM + 39 nl Retinsäure befüllten Transwell®-Membraneinsatz. Bei 37°C konnte MMS 24 h im Brutschrank einwirken. Nach anschließender Erholungszeit von 24 h im Brutschrank wurde der Ansatz wie die restlichen Proben bei -80°C bis zur Durchführung eingefroren.

Am Vorabend der Versuchsdurchführung beschichtete man eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit verdünntem Fängerantikörper (1:250 in Beschichtungspuffer). Über Nacht konnte der Antikörper bei 4°C und bedeckter Mikrotiterplatte inkubieren.

Am folgenden Tag wurde die Platte mit Waschpuffer gewaschen (3x). Die Verdünnungslösung wurde aufgetragen und konnte 1 h einwirken. Es folgte das erneute Waschen mit Waschpuffer (3x). Der *Blank*, der Topstandard, die verschiedenen Standardansätze sowie die Proben wurden auf die einzelnen Wells jeweils doppelt (2 Wells je Ansatz) aufgetragen. Dann folgte erneutes Waschen mit Waschpuffer (3x) und das Auftragen des Arbeitsdetektors. Anschließend wurde 7x mit Waschpuffer gewaschen. Die Substratlösung wurde aufgetragen und inkubierte 30 Minuten unter Lichtausschluss. Es folgte die Zugabe von Schwefelsäure als Stopplösung. Innerhalb

einer halben Stunde wurde an einem ELISA-Reader (Multiskan Plus II, Labsystems, Helsinki, Finnland) die Absorption bei 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm abgelesen. Die Kalibrierungskurve (y-Achse: optische Dichte / x-Achse: Logarithmus der Konzentration) erstellte man anschließend anhand der Kalibrierungslösungen. Die Ergebnisse der Proben konnten an dieser Kurve in Einheiten/ml abgelesen werden.

2.4.2 Durchführung des Comet Assays

In unseren Testreihen wurde der Comet Assay nach der Methode von Singh und Mitarbeitern durchgeführt. [Singh et al. 1988].

Dabei werden die gegenüber NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft exponierten Zellen in eine Agaroselösung aufgenommen und auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger übertragen. Die Membranbestandteile werden lysiert, sodass freiliegende DNA auf den Objektträgern zurückbleibt. Alkalischer Puffer trennt unter anderem die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge auf. In der anschließenden Elektrophorese wandern die geschädigten Bruchstücke verstärkt in Richtung der positiven Anode [Klaude et al. 1996]. Durch die Wanderungen in der Elektrophorese entsteht die für den Comet Assay typische kometenartige Struktur der DNA aus den Kernen (Abb. 2.11). Anschließendes Färben der DNA-Strukturen mit Ethidiumbromid ermöglicht es, die Schädigung in Form von Kometenschweifen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu analysieren.



Abb. 2.11: Aufnahmen von Zellkernen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, DM 4000 B, Heerbrugg, Schweiz) mit typischer kometenartiger Struktur der DNA-Schädigung. Von links nach rechts mit ansteigender DNA-Schädigung.

Zur Versuchsdurchführung beschichtete man Objektträger mit Agarosegel. Hierzu kochte man 1,5 g *normal melting Agarose* (Typ I) mit 100 ml PBS in einer Mikrowelle auf bis die Agarose sichtbar gelöst war. Die Objektträger wurden zu $\frac{3}{4}$ in die heiße Agaroselösung eingetaucht, an der Rückseite abgewischt und anschließend getrocknet. Am folgenden Tag konnten die Objektträger in eine lichtdichte Box zur Lagerung gestellt oder direkt in Gebrauch genommen werden. Nach Exposition der Nasenschleimhautzellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft konnte man den Überstand verwerfen. Auf die Membraneinsätze wurden daraufhin 500 µl PBS gegeben und die Zellen wurden gewaschen. Das PBS mit den abgelösten Zellen wurde erneut abgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zum Auftrag auf die Objektträger auf Eis kaltgestellt. Das Auftragen erfolgte spätestens 20 Minuten nach dem Kaltstellen.

Als Positivkontrolle diente Methylmethansulfonat (MMS). Die Konzentration betrug 500 Mikromol. Zur Konzentrationsherstellung wurden 10 µl der 11,8-molaren MMS-Stammlösung durch Verdünnen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) auf eine Konzentration von 50 Millimol gebracht. 13 µl dieser 50-millimolaren Suspension gab man anschließend auf einen mit 1,3 ml BEGM + 39 nl Retinsäure befüllten Transwell®-Membraneinsatz. Das MMS inkubierte 4 h bei 37°C im Brutschrank. Die mit MMS behandelten Nasenschleimhautzellen wurden nach der Inkubationszeit wie nach Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ zu Pellets zentrifugiert.

Um eine objektive Auswertung zu garantieren, codierte man alle Präparate und wertete sie verkleidet aus. 20 µl der Zellsuspension mit dem jeweils gelösten Pellet wurden mit 180 µl der *low melting Agarose* (Typ II) in ein Eppendorfgefäß gegeben. Aus dieser Suspension wurden jeweils 60 µl auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger aufgetragen. Pro Ansatz setzte man jeweils 2 Objektträger an. Mit einem Deckglas (24 mm x 32 mm) deckte man die Suspension auf den Objektträgern ab. Nach 2-minütiger Lagerung im Kühlschrank löste man die Deckgläser von den Objektträgern. Die Objektträger wurden für mindestens 90 Minuten in mit Lyselösung gefüllte Küvetten gestellt, wobei sich die Lyselösung aus 0,75 ml Triton, 7,5 ml DMSO und 66,75 ml Lysepuffer (67 ml N-Lauroylsarcosin Na-Salz, 292,8 g NaCl und 2,4 g TRIS, pH 10) zusammensetzte. Die Küvetten lagerte man währenddessen lichtgeschützt bei 4°C. Während der Lyse bereitete man die Elektrophorese vor. Dazu wurden die

Elektrophoresekammern mit Eisstücken umgeben und die Kammern mit 1900 ml gekühltem Elektrophoresepuffer (120 ml 5-molares NaOH und 10 ml 0,2-molare EDTA-Lösung) befüllt (Abb. 2.12). Nach 90-minütiger Lyse wurden die Objektträger mit der Agaroseschicht nach oben horizontal in die Elektrophoresekammer gelegt und knapp vom Elektrophoresepuffer bedeckt. Die Objektträger konnten anschließend 20 Minuten zur Trennung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) lichtgeschützt im Elektrophoresepuffer inkubieren, bevor die eigentliche Elektrophorese stattfand.

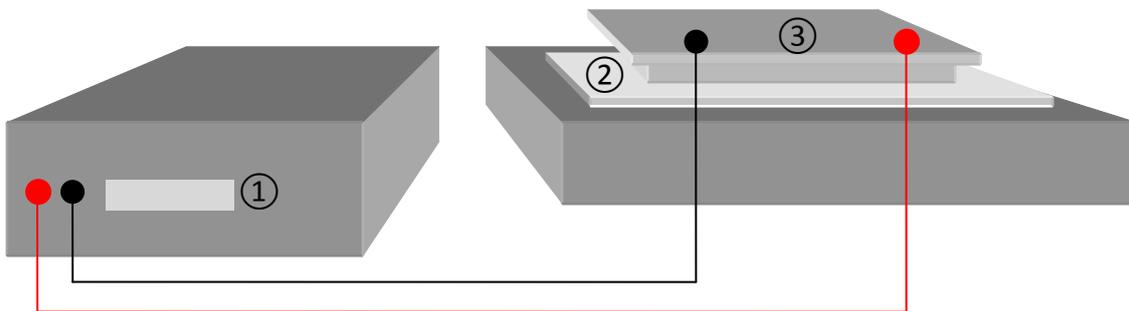


Abb. 2.12: Versuchsanordnung mit ① Elektrophoresegerät mit digitaler Anzeige der Volt- und Amperestärke (EV 202, Consort, Turnhout, B) und von ② Eis umgebener ③ Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt) mit Deckel. In der Elektrophoresekammer befinden sich die vom Elektrophoresepuffer bedeckten Objektträger mit den aufgetragenen Proben. Verbunden sind Elektrophoresekammer und Elektrophoresegerät über die Elektrodenkabeln (rot = positiv, schwarz = negativ).

Zur Elektrophorese wurde die Stromstärke von 300 mA über die Menge des Elektrophoresepuffers eingestellt. Die Spannung von 25 V entspricht der Entfernung der beiden Elektroden von 25 cm (Abb. 2.12). Die anschließende Elektrophorese bei 300 mA und 25 V erfolgte 20 Minuten weiterhin unter Lichtausschluss.

Nach der Elektrophorese erfolgte die 5-minütige Neutralisation der Zellen in einer Küvette mit TRIS-Neutralisationspuffer (pH = 7,5). Ethidiumbromid mit einer Konzentration von 20 µg/ml diente als DNA-Farbstoff und wurde zu jeweils 20 µl pro Objektträger unter einem Deckglas (24 mm x 32 mm) aufgetragen. Die Auswertung erfolgte innerhalb einer Woche nach feuchter und lichtdichter Lagerung der Präparate.

Zur Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit *Charge-Coupled Device* (CCD)-Kamera bei 400-facher Vergrößerung verwendet. Die Wellenlänge des Anregungsfilters betrug 515-560 nm, die des Sperrfilters 590 nm. Das Programm Komet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, UK) wurde am angeschlossenen PC zur Analyse eingesetzt.

Bei den ausgewerteten Zellen eines Objektträgers ist die Ausprägung des Kometen mit Schweif abhängig vom Schädigungsgrad der jeweiligen Zelle. Je stärker die Schädigung ist, desto weiter wandern die Fragmente der DNA in größerer Zahl in der Elektrophorese zur positiven Anode, und distanzieren sich damit vom ursprünglichen Kern. Mit der digitalen Analyse wurde die Schädigung der DNA anhand des Olive Tail Moments (OTM), des DNA-Anteils im Schweif (DNA in Tail, DT) sowie der Länge des Schweifes (Tail Length, TL) bestimmt. In unserer Studie wurde das Olive Tail Moment in der statistischen Auswertung des Comet Assays als Wert für die DNA-Schädigung verwendet. Das OTM ist nach Olive und Mitarbeitern dabei das Produkt aus dem prozentualen DNA-Anteil im Schweif (DT) und der mittleren Schweiflänge [Olive et al. 1990]. Die mittlere Schweiflänge ist definiert als Distanz von der Mitte des DNA-Kopfes bis zur Mitte des Schweifes.

2.4.3 Durchführung des Mikrokerntests

Der Mikrokerntest wurde zur Bestimmung durch NO₂ hervorgerufener Zellschäden angewendet. Mikrokerne werden bei der Zellkernteilung nicht von der Kernmembran umschlossen, sondern erhalten eine eigene Membran, weil ihre Chromosomenanteile während der Zellkernteilung nicht zu den Polen des Spindelapparats wandern beziehungsweise keine Zentromere beinhalten [Graw 2010].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellkerne mit dem DNA- und RNA-Farbstoff Acridinorange [Merck 2012] angefärbt. Hiernach erschien die doppelsträngige DNA grün, während die einzelsträngige RNA rot dargestellt wurde (Abb. 2.13 a-b) [Merck 2012]. Die Färbung ermöglichte das Auszählen von Mikrokerneln aus doppelkernigen Zellen. Umso mehr Mikrokerne in der Auswertung dabei auftreten, umso höher ist die eigentliche Schädigung einzustufen. Weiterhin wurde die Anzahl ein-, doppel- sowie mehrkerniger Zellen neben der Anzahl auftretender Mitosen, Apoptosen und Nekrosen bestimmt.

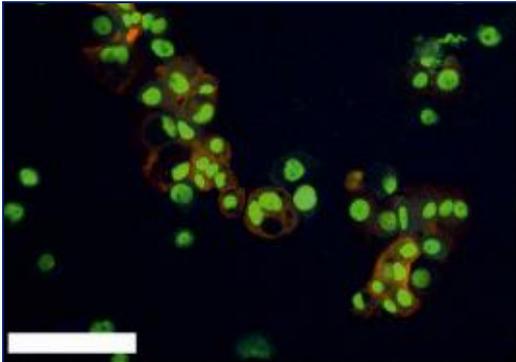


Abb. 2.13 a: Aufnahme von ein- und doppelkernigen Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, DMI 4000 B, Heerbrugg, Schweiz) nach Färbung mit Acridinorange. Der weiße Balken entspricht 100 μm .

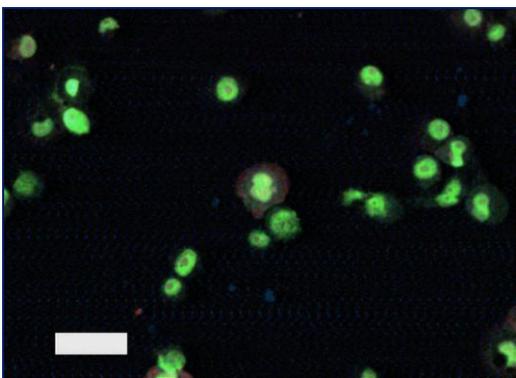


Abb. 2.13 b: Aufnahme von ein- und doppelkernigen Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, DMI 4000 B, Heerbrugg, Schweiz) nach Färbung mit Acridinorange. Der weiße Balken entspricht 50 μm . Zentral ist eine doppelkernige Zelle mit Mikrokern erkennbar.

Von Fenech und Mitarbeitern wurden im Jahr 2000 Kriterien für den Mikrokerntest festgelegt, nach denen die Versuche durchgeführt wurden [Fenech 2000]. Sie beschrieben darin die Technik des Zytokinese-Blocks (cbmn = cytokinesis-block micronucleus assay). Die Technik ermöglicht die Zellkernteilung, verhindert jedoch die Zellteilung. Durch Auszählung der Zellkerne in einer Zelle kann so bestimmt werden, wie häufig sich ein Zellkern geteilt hat.

Nach der Exposition der Nasenschleimhautzellen gegenüber 0,01 ppm NO_2 beziehungsweise synthetischer Luft inkubierte man diese zunächst 48 Stunden mit einer Cytochalasin B-Stammlösung (1 mg/ml: 2 mg Cytochalasin B in 2 ml DMSO) der Konzentration 4 $\mu\text{l/ml}$. 5,2 μl Cytochalasin B gab man auf 1,3 ml BEGM. Cytochalasin B inhibiert die Zellteilung, lässt eine Kernteilung jedoch zu, sodass doppel- oder mehrkernige Zellen entstehen können. Die Zellen wurden daraufhin mit 500 μl PBS gewaschen. Es folgte die 5-minütige Inkubation mit 200 μl einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) bei 37°C im Brutschrank. Mit 600 μl RPMI pro Well konnte unter Resuspendieren die Enzymreaktion gestoppt sowie das Ablösen der Zellen von

der Membran ermöglicht werden. Anschließend zentrifugierte man die Zellen im Cell-Spin-Gerät auf Objektträger. Die Objektträger wurden 2 Stunden bei -20°C in gekühltem Methanol fixiert. Es folgte die Färbung der Zellen mit einer Acridinorange-Färbelösung. Zur Herstellung dieser Färbelösung wurden 4,5 ml einer 0,1-prozentigen Acridinorange-Stammlösung mit 67,5 ml Soerensen-Puffer (2,92 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 2,3 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 1 l doppelt destilliertem Wasser) zusammengebracht. In 2 Küvetten mit Soerensen-Puffer entfärbte man jeweils 5 Minuten. Die gefärbten Objektträger wurden in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer bei 4°C gelagert.

Als Positivkontrolle wurde Mitomycin C (MMC) verwendet. Die Konzentration betrug 600 ng/ml. Hierzu wurden 6 μl der MMC-Stammlösung (1 mg/ml) mit 94 μl doppelt destilliertem Wasser zusammengegeben. Aus dieser Suspension wurden 13 μl auf einen mit 1,3 ml BEGM + 39 nl Retinsäure befüllten Transwell®-Membraneinsatz gegeben. MMC inkubierte 1 h bei 37°C im Brutschrank. Die weitere Behandlung der Zellen entsprach der oben beschriebenen Behandlung nach Exposition der Zellen gegenüber 0,01 ppm NO_2 beziehungsweise synthetischer Luft. Die Zellen behandelte man 48 h mit Cytochalasin B und wusch anschließend mit PBS. Es folgte die Inkubation der Trypsin/EDTA-Lösung, die Zugabe von RPMI und anschließende Zentrifugation. Die Zellen wurden in Methanol fixiert und zur Auswertung mit Acridinorange gefärbt.

Innerhalb 1 Woche wurden die Objektträger am LEICA-Fluoreszenzmikroskop DM 4000 B bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Wellenlänge des Anregungsfilters betrug 450-490 nm und die des Sperrfilters 515 nm. Es wurden zunächst 1000 Zellen pro Versuchsansatz ausgezählt und in 1-, 2- oder mehrkernige Zellen sowie in Apoptosen beziehungsweise Mitosen unterschieden. Weiterhin zählte man 500 doppelkernige Zellen mit den in ihnen vorhandenen Mikrokernen aus. Die jeweilige Anzahl von Mikrokernen waren das entscheidende Kriterium für den Schädigungsgrad.

2.5 Statistik und graphische Darstellung

In vorliegender Arbeit wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt mit Hilfe des Statistikprogramms Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Graphisch wurden die Ergebnisse in Boxplots nach John W. Tukey dargestellt [Tukey 1977] (Abb. 2.14). Ein Boxplot ist eine Kastengrafik. Der Kasten stellt den Bereich dar,

in dem 50 % der Werte liegen. Die untere Begrenzung des Kastens, die untere Quartil, stellt die 25. Perzentile dar, die obere Begrenzung die 75. Perzentile. Eine durchgehende Linie in der Mitte des Kastens stellt den Median dar und teilt das gesamte Diagramm in 2 Hälften mit jeweils 50 % der Werte. Die T-förmigen Whisker mit einer jeweils maximalen 1,5-fachen Seitenlänge des Kastens stellen ober- beziehungsweise unterhalb der Box liegende Werte dar. Die Ausdehnung des Whiskers erstreckt sich dabei jedoch nur bis zu dem Wert, der als jeweils letzter in der maximal 1,5-fachen Seitenlänge der Box auftritt. Werte, die zwischen der 1,5- bis 3-fachen Seitenlänge der Box von der Box entfernt zu liegen kommen, werden als Ausreißer bezeichnet während Werte, die den Abstand der 3-fachen Seitenlänge der Box überschreiten, Extremwerte sind.

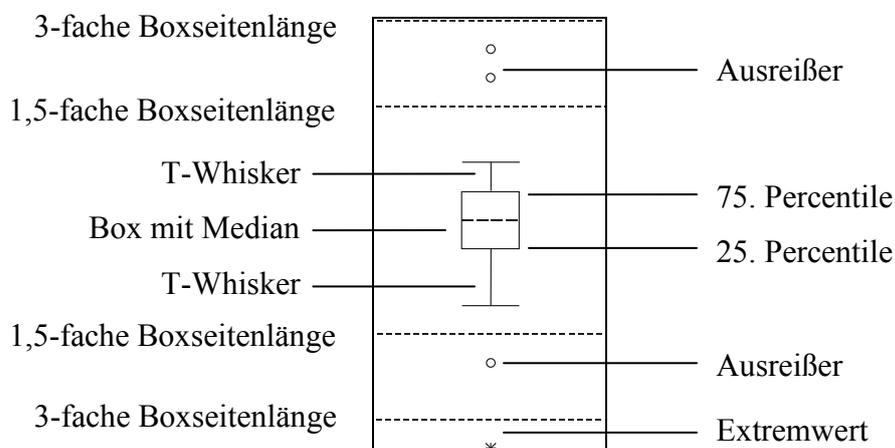


Abb. 2.14: Schema einer Boxplotgrafik mit Ausreißern und Extremwerten.

Die statistische Auswertung erfolgte mit den beiden nichtparametrischen Testverfahren Friedman-Test und Wilcoxon-Test. In der Statistik unterscheidet man parametrische von nichtparametrischen Tests. Parametrische Testverfahren setzen festgelegte Parameter voraus. Die auszuwertenden Ergebnisse müssen dabei im Sinne einer Normalverteilung auftreten. Nichtparametrische Verfahren sind flexibler und können statistische Ausreißer besser tolerieren.

Mit dem Friedman-Test ist der Vergleich von drei oder mehr miteinander verbundenen Stichproben möglich (Abb. 2.15 a) [Friedman 1937]. Den Messwerten der miteinander zu vergleichenden zeitabhängigen Ansätze ordnete man hierzu nach Größe entsprechende Ränge zu. Die Ränge der einzelnen Patienten jedes zeitabhängigen

Ansätze wurden summiert, um einen Vergleich der unterschiedlichen zeitlichen Ansätze zu ermöglichen. Die erhaltenen Rangsummen konnte man unter Berücksichtigung der Fallzahl miteinander auf Signifikanz vergleichen. In einem ersten Test wurden alle Ergebnisse der zeitlich unterschiedlichen Expositionen gegenüber synthetischer Luft verglichen. In einem zweiten Test erfolgte der Vergleich aller Ergebnisse der zeitlich unterschiedlichen Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂. Bei Vorliegen einer Signifikanz besteht zwischen mindestens einer und den restlichen der miteinander verglichenen zeitlich unterschiedlichen Ansätze ein signifikanter Unterschied. Das Signifikanzniveau im Friedman-Test betrug $p \leq 0,05$.

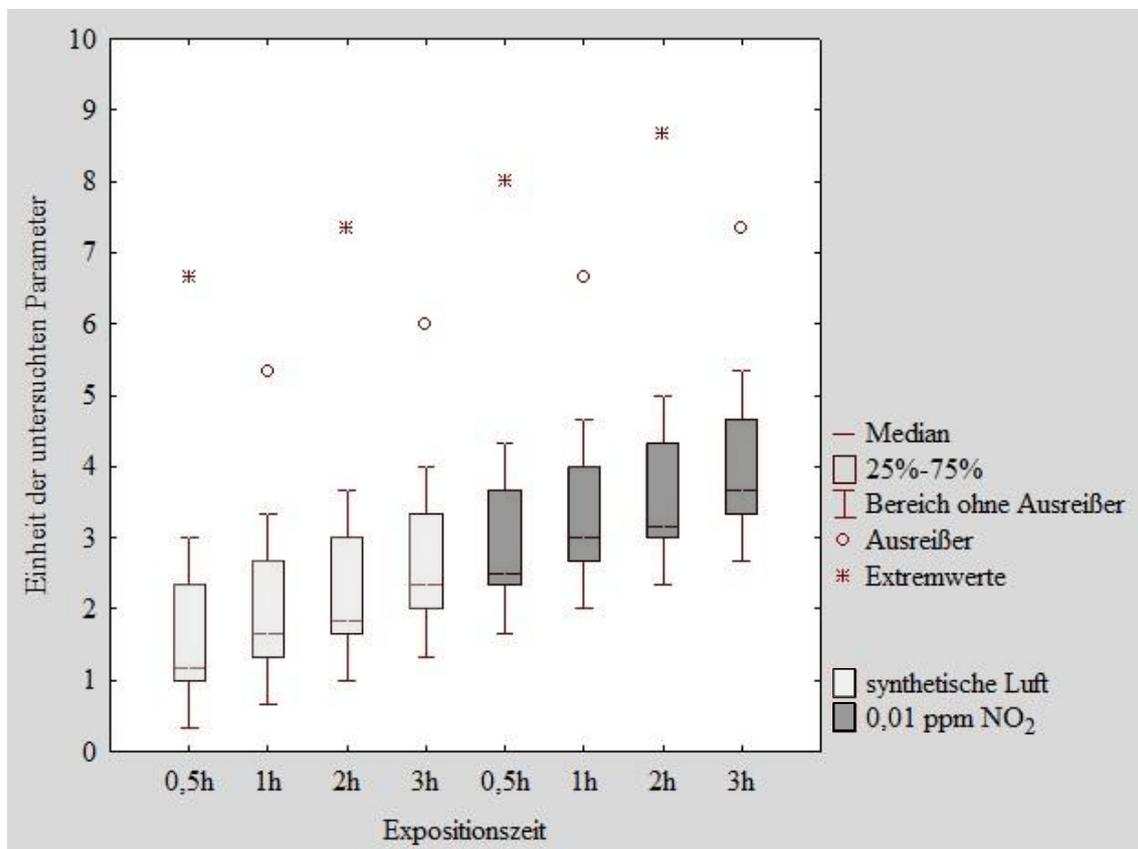


Abb. 2.15 a: Beispielhafte Darstellung der im Friedman-Test miteinander verglichenen Werte in Boxplots: Im Friedman-Test wurden zunächst die hier hellgrau markierten Ergebnisse der 4 zeitlich unterschiedlichen Expositionen gegenüber synthetischer Luft miteinander verglichen. In einer weiteren Analyse wurden die hier dunkelgrau markierten Ergebnisse der 4 zeitlich unterschiedlichen Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂ miteinander verglichen.

Mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test ist der Vergleich zweier miteinander gepaarter Proben möglich (Abb. 2.15 b) [Wilcoxon 1945]. Es wurden Proben gleicher Expositionszeit miteinander verglichen. Eine Probe stammte aus der Exposition gegenüber synthetischer Luft, die andere aus der Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂. Die Differenz zwischen dem Ergebnis der Exposition einer Patientenprobe gegenüber 0,01 ppm NO₂ und der Exposition gegenüber synthetischer Luft wurde bestimmt. Nach der Höhe der Differenz werden Rangsummen für negative und positive Differenzen erstellt, deren Verhältnis zueinander die Signifikanz bestimmt. Das Signifikanzniveau im Wilcoxon-Tests betrug $p \leq 0,05$.

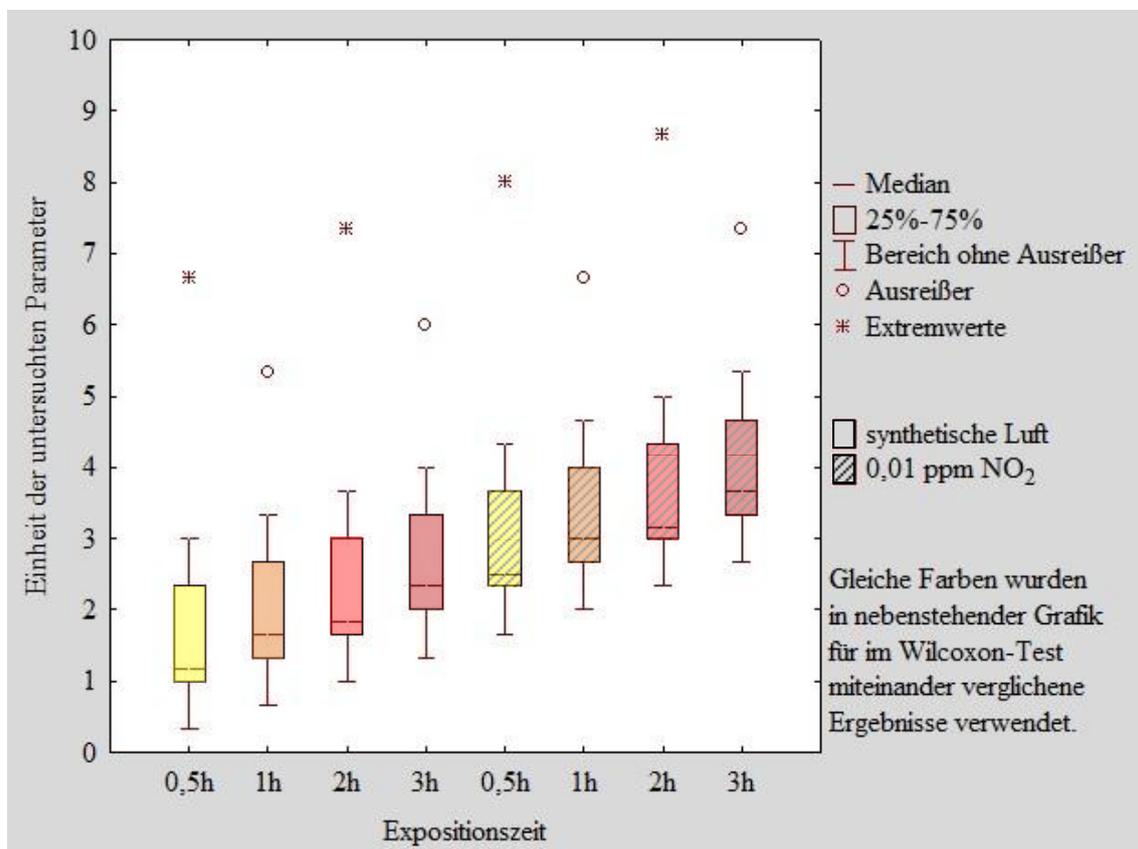


Abb. 2.15 b: Beispielhafte Darstellung der im Wilcoxon-Test miteinander verglichenen Werte in Boxplots: Im Wilcoxon-Test wurden die beiden Ergebnisse zeitlich entsprechender Expositionen gegenüber synthetischer Luft und gegenüber 0,01 ppm NO₂ miteinander verglichen. Miteinander verglichene Werte sind farblich entsprechend dargestellt. Schraffiert sind die Ergebnisse der Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂.

Friedman- und Wilcoxon-Test gemeinsam ist, dass sie die Gültigkeit der Nullhypothese überprüfen. Diese besagt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen miteinander verglichenen Ansätzen besteht. Der Sinn in dieser Überprüfung besteht darin zu vermeiden, dass fälschlicherweise die Nullhypothese ausgeschlossen wird. Die Nullhypothese im Friedman-Test besagt, dass zwischen den zeitlich unterschiedlichen Ansätzen beziehungsweise Rangsummen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Im Wilcoxon-Test besagt die Nullhypothese, dass die ermittelten positiven und negativen Differenzen symmetrisch verteilt sind. Wenn die Nullhypothese ausgeschlossen wird, gilt die Alternativhypothese. Diese besagt, dass Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen bestehen beziehungsweise dass die positiven und negativen Differenzen nicht symmetrisch verteilt sind.

Die beschriebenen statistischen Analysen nach Friedman beziehungsweise Wilcoxon erfolgten vollständig automatisiert mit dem Statistikprogramm Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Wenn im nachfolgenden Ergebnisteil (3.1-3.4) von *Unterschieden* gesprochen wird, handelt es sich jeweils um signifikante Unterschiede. Im Friedman-Test und im Wilcoxon-Test muss dazu jeweils $p \leq 0,05$ sein.

3 Ergebnisse

Humane Nasenschleimhautzellen wurden in n=10 Versuchen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft exponiert. Die Expositionsdauern betragen jeweils 0,5 h, 1 h, 2 h sowie 3 h.

Mit Friedman- und Wilcoxon-Test wurden die Ergebnisse analysiert. Zunächst verglich man bei einem Gas die Ergebnisse der 4 Expositionszeiträume miteinander im Friedman-Test (2.5). Darüber hinaus verglich man die Ergebnisse gleicher Expositionszeiträume beider Gase miteinander im Wilcoxon-Test (2.5). Friedman- und Wilcoxon-Test führte man jeweils für die Ergebnisse der Testverfahren Caspase-3 ELISA, Comet Assay und Mikrokerntest durch. Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest als Screeningtest wurde die prozentuale Vitalität der jeweiligen Nasenschleimhautkultur untersucht. Zellen mussten zum Einsatz in den Versuchen eine Vitalität von über 80 % zu Versuchsbeginn aufweisen.

Die Rohdaten der 4 Testverfahren sind im Anhang in Tabellen aufgeführt (Tab. 6.1, 6.2, 6.3, 6.4.1 und 6.4.2). Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Testverfahren dargestellt.

3.1 Ergebnisse des Trypanblau-Ausschlusstests

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest untersuchte man sowohl vor als auch nach Exposition gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise 0,01 ppm NO₂ die Vitalität der Nasenschleimhautzellen.

Es wurden nur Nasenschleimhautkulturen in den Versuchen verwendet, die eine Vitalität von über 80 % aufwiesen. Nach Exposition gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise 0,01 ppm NO₂ wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest erneut die Vitalität getestet. In unseren Versuchen betrug sie auch nach den Expositionen eine über 80-prozentige Vitalität (Abb. 3.1).

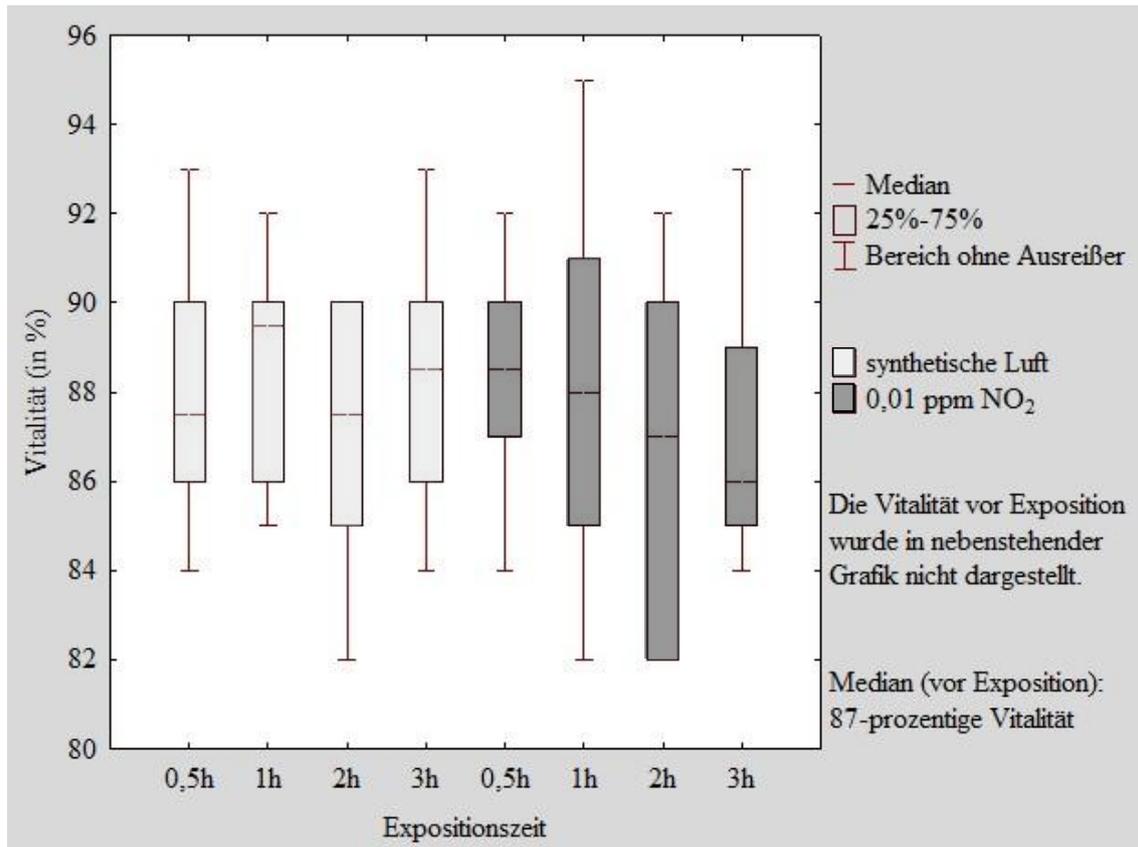


Abb. 3.1: Darstellung der Vitalität bei unterschiedlicher zeitlicher Exposition der Nasenschleimhautzellen in Boxplots. Hellgrau markiert sind die Vitalitäten der Expositionen gegenüber synthetischer Luft, dunkelgrau die Vitalitäten der Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂. Die Vitalität vor Exposition wurde in obiger Grafik nicht dargestellt (Median: 87 %).

3.2 Ergebnisse des Caspase-3 ELISA

Mit einem ELISA-Reader konnte man die Caspase-3-Aktivität als Maß für das Vorhandensein und Auftreten von Apoptosen ermitteln (Abb. 3.2). Die in optischer Dichte für die jeweiligen Expositionen angegebenen Werte wurden mit einer Kalibrierungskurve in die Einheit Einheiten/ml umgewandelt und miteinander verglichen. Als Positivkontrolle im Caspase-3 ELISA diente Methylmethansulfonat (MMS) in einer Konzentration von 100 mM.

Mit dem Friedman-Test ließ sich weder zwischen den Caspase-3-Aktivitäten der einzelnen Expositionsdauern gegenüber synthetischer Luft noch zwischen den Caspase-3-Aktivitäten der einzelnen Expositionsdauern gegenüber 0,01 ppm NO₂ ein Unterschied nachweisen (Tab. 3.1). Mit zunehmender Expositionsdauer nahm die Caspase-3-Aktivität somit weder bei Exposition der Zellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ noch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft zu.

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau
synthetische Luft	0,97488	0,05
0,01 ppm NO ₂	0,12581	0,05

Tab. 3.1: p-Wert des Friedman-Tests und zugrunde liegendes Signifikanzniveau. Verglichen wurden die Caspase-3-Aktivitäten der unterschiedlichen Expositionsdauern gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise die Caspase-3-Aktivitäten der unterschiedlichen Expositionsdauern gegenüber 0,01 ppm NO₂. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Mit dem Wilcoxon-Test ließen sich im Vergleich der Caspase-3-Aktivitäten der Expositionen gegenüber synthetischer Luft mit den Caspase-3-Aktivitäten zeitlich entsprechender Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂ bei keiner der untersuchten Expositionsdauern Unterschiede nachweisen (Tab. 3.2).

Wilcoxon-Test	p-Wert	Signifikanzniveau
synthetische Luft 0,5 h / 0,01 ppm NO ₂ 0,5 h	0,192519	0,05
synthetische Luft 1 h / 0,01 ppm NO ₂ 1 h	0,414824	0,05
synthetische Luft 2 h / 0,01 ppm NO ₂ 2 h	0,553617	0,05
synthetische Luft 3 h / 0,01 ppm NO ₂ 3 h	0,202623	0,05

Tab. 3.2: p-Wert des Wilcoxon-Tests und zugrunde liegendes Signifikanzniveau. Verglichen wurde jeweils die Caspase-3-Aktivität der Exposition gegenüber synthetischer Luft mit der Caspase-3-Aktivität der gleichen zeitlichen Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

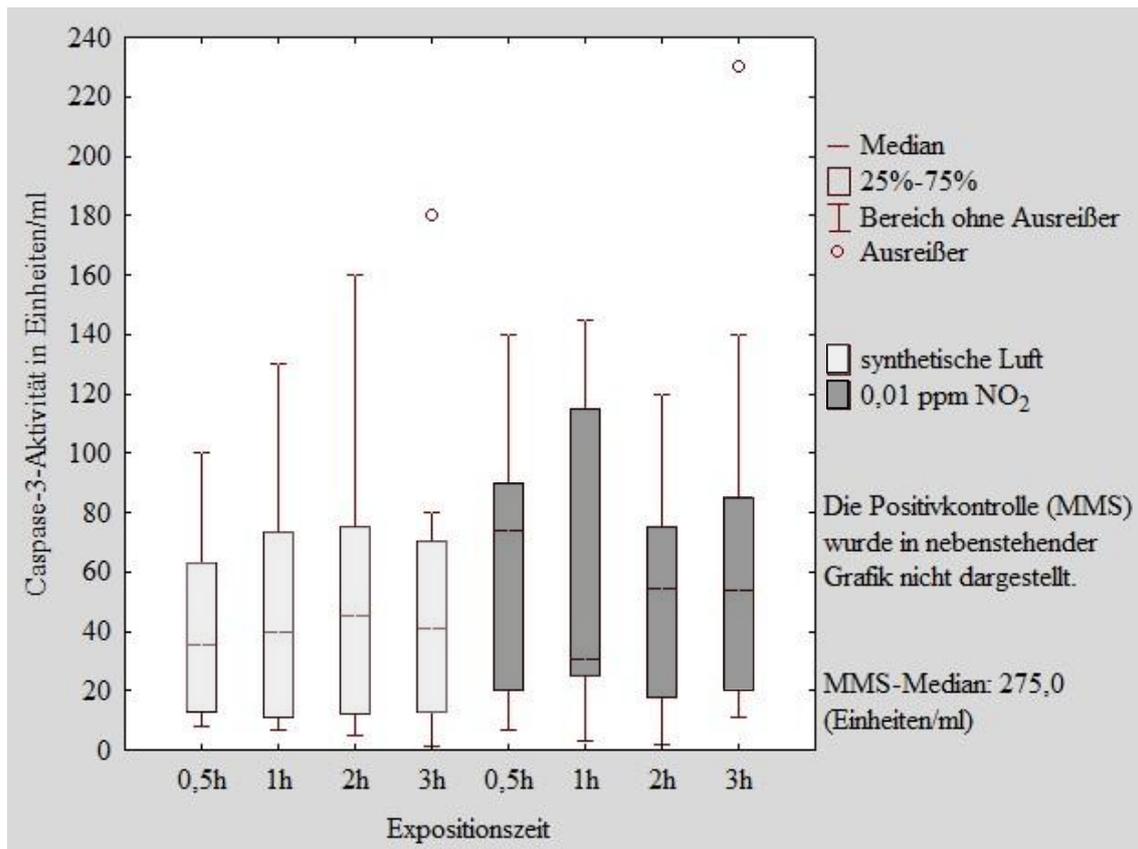


Abb. 3.2: Darstellung des Auftretens der Caspase-3-Aktivität bei unterschiedlicher zeitlicher Exposition der Nasenschleimhautzellen in Boxplots. Hellgrau markiert sind die Caspase-3-Aktivitäten der Expositionen gegenüber synthetischer Luft, dunkelgrau die Caspase-3-Aktivitäten der Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂. Die Positivkontrolle (MMS) wurde in obiger Grafik nicht dargestellt (Median: 275,0 Einheiten/ml).

3.3 Ergebnisse des Comet Assays

Im Comet Assay wurden die dimensionslosen Olive Tail Moment (OTM)-Werte, die ein Maß für die DNA-Schädigung darstellen, miteinander verglichen (Abb. 3.3). Als Positivkontrolle im Comet Assay diente Methylmethansulfonat (MMS) in einer Konzentration von 500 μ M.

Mit dem Friedman-Test ließ sich im Vergleich der OTM-Werte der einzelnen Expositionsdauern gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise der OTM-Werte der einzelnen Expositionsdauern gegenüber 0,01 ppm NO₂ jeweils ein Unterschied nach-

weisen (Tab. 3.3). Mit steigender Expositionsdauer nahm das OTM somit bei Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ als auch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft zu.

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau
synthetische Luft	0,00002	0,05
0,01 ppm NO ₂	0,00037	0,05

Tab. 3.3: p-Wert des Friedman-Tests und zugrunde liegendes Signifikanzniveau. Verglichen wurden die OTM-Werte der unterschiedlichen Expositionsauern gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise die OTM-Werte der unterschiedlichen Expositionsauern gegenüber 0,01 ppm NO₂. Hierbei traten jeweils signifikante Unterschiede auf, die in der Tabelle rot markiert sind.

Mit dem Wilcoxon-Test ließ sich ein Unterschied zwischen dem OTM-Wert der Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ und dem OTM-Wert gleicher zeitlicher Exposition gegenüber synthetischer Luft bei 0,5 h, 1 h sowie 2 h nachweisen. Bei 3-stündiger Exposition gab es keinen Unterschied zwischen dem OTM-Wert einer Exposition gegenüber synthetischer Luft und dem OTM-Wert einer Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ (Tab. 3.4). Auch nach Berücksichtigung eines Ausreißers bei 3-stündiger Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ und eines Extremwertes bei 3-stündiger Exposition gegenüber synthetischer Luft in Versuchsnummer 3 ließ sich hierbei kein Unterschied nachweisen.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Signifikanzniveau
synthetische Luft 0,5 h / 0,01 ppm NO ₂ 0,5 h	0,0069	0,05
synthetische Luft 1 h / 0,01 ppm NO ₂ 1 h	0,02	0,05
synthetische Luft 2 h / 0,01 ppm NO ₂ 2 h	0,005	0,05
synthetische Luft 3 h / 0,01 ppm NO ₂ 3 h	0,114	0,05

Tab. 3.4: p-Wert des Wilcoxon-Tests und zugrunde liegendes Signifikanzniveau. Verglichen wurde jeweils der OTM-Wert der Exposition gegenüber synthetischer Luft mit dem OTM-Wert der gleichen zeitlichen Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂. Hierbei traten bei 0,5-, 1- sowie 2-stündiger Exposition signifikante Unterschiede auf, die in der Tabelle rot markiert sind.

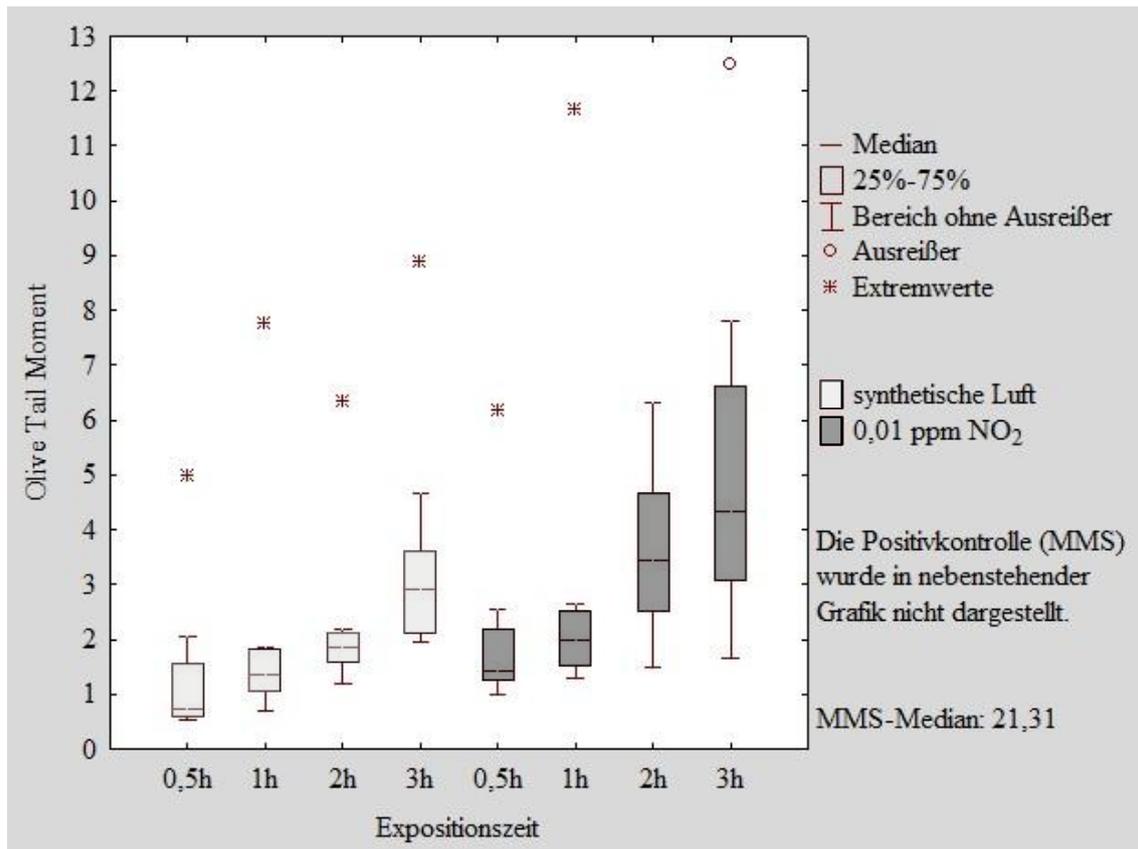


Abb. 3.3: Darstellung des Olive Tail Moments (OTM) bei unterschiedlicher zeitlicher Exposition der Nasenschleimhautzellen in Boxplots. Hellgrau markiert sind die OTM-Werte der Expositionen gegenüber synthetischer Luft, dunkelgrau die OTM-Werte der Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂. Die Positivkontrolle (MMS) wurde in obiger Grafik nicht dargestellt (Median: 21,31).

3.4 Ergebnisse des Mikrokerntests

Im Mikrokerntest konnten Mikrokerne als Zeichen genotoxischer Schäden ausgezählt werden (Abb. 3.4). Die jeweiligen Mikrokernanzahlen wurden miteinander verglichen. Als Positivkontrolle im Mikrokerntest diente Mitomycin C (MMC) in einer Konzentration von 600 ng/ml.

Mit dem Friedman-Test ließ sich im Vergleich der Mikrokernanzahlen der einzelnen Expositionsdauern gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise der Mikrokernanzahlen der einzelnen Expositionsdauern gegenüber 0,01 ppm NO₂ kein Unterschied

nachweisen (Tab. 3.5). Mit zunehmender Expositionsdauer nahm die Mikrokernanzahl somit weder bei Exposition der Zellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ noch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft zu.

Friedman-Test	p-Wert	Signifikanzniveau
synthetische Luft	0,93309	0,05
0,01 ppm NO ₂	0,13443	0,05

Tab. 3.5: p-Wert des Friedman-Tests und zugrunde liegendes Signifikanzniveau. Verglichen wurden die Mikrokernanzahlen der unterschiedlichen Expositionsdauern gegenüber synthetischer Luft beziehungsweise die Mikrokernanzahlen der unterschiedlichen Expositionsdauern gegenüber 0,01 ppm NO₂. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Mit dem Wilcoxon-Test ließ sich ein Unterschied zwischen der Mikrokernanzahl der Exposition gegenüber synthetischer Luft und der Mikrokernanzahl gleicher zeitlicher Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ bei 3-stündiger Exposition nachweisen. Bei den übrigen Expositionsdauern konnten keine Unterschiede zwischen den Mikrokernanzahlen gleicher Expositionsdauer im Wilcoxon-Test festgestellt werden (Tab. 3.6).

Wilcoxon-Test	p-Wert	Niveau
synthetische Luft 0,5 h / 0,01 ppm NO ₂ 0,5 h	0,059173	0,05
synthetische Luft 1 h / 0,01 ppm NO ₂ 1 h	0,141483	0,05
synthetische Luft 2 h / 0,01 ppm NO ₂ 2 h	0,554114	0,05
synthetische Luft 3 h / 0,01 ppm NO ₂ 3 h	0,007686	0,05

Tab. 3.6: p-Wert des Wilcoxon-Tests und zugrunde liegendes Signifikanzniveau. Verglichen wurde jeweils die Mikrokernanzahl der Exposition gegenüber synthetischer Luft mit der Mikrokernanzahl der gleichen zeitlichen Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂. Hierbei trat bei 3-stündiger Exposition ein signifikanter Unterschied auf, der in der Tabelle rot markiert ist.

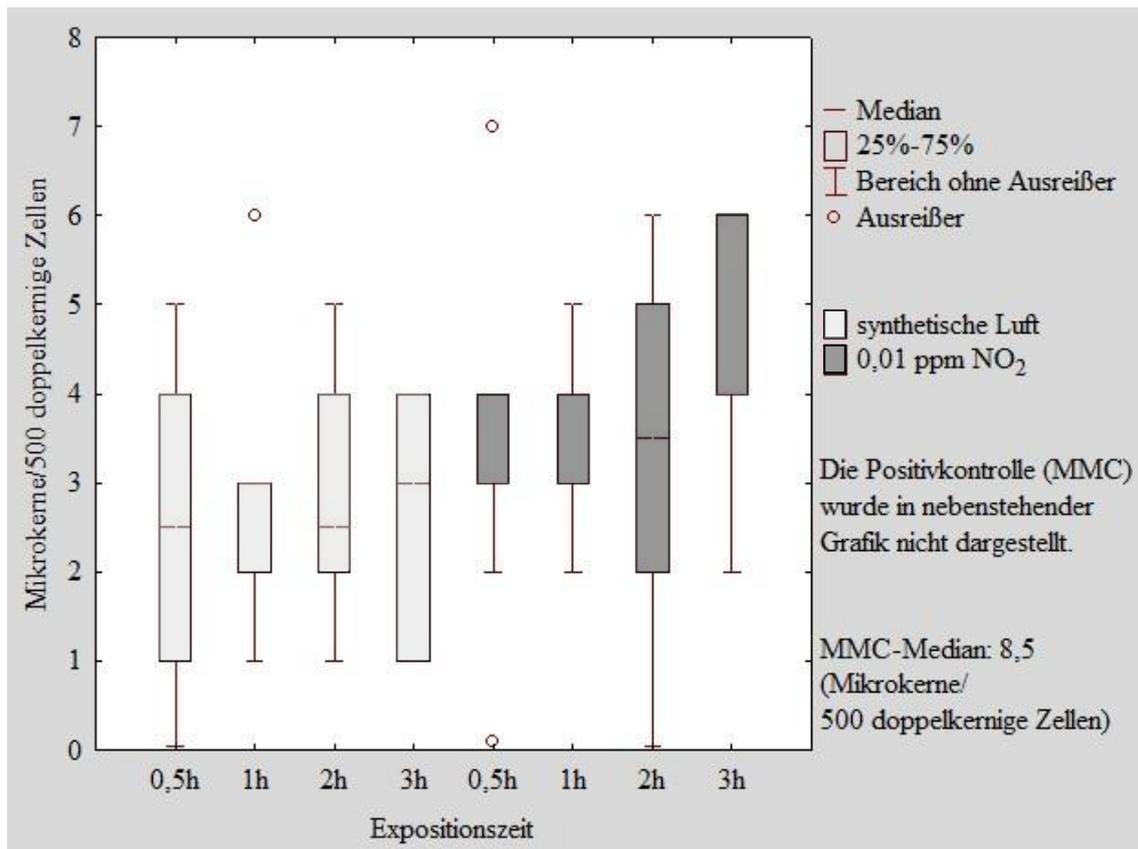


Abb. 3.4: Darstellung auftretender Mikrokernen bei jeweils 500 ausgewerteten doppelkernigen Zellen und unterschiedlicher zeitlicher Exposition der Nasenschleimhautzellen in Boxplots. Hellgrau markiert ist die Mikrokernanzahl der Expositionen gegenüber synthetischer Luft, dunkelgrau die Mikrokernanzahl der Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂. Die Positivkontrolle (MMC) wurde in obiger Grafik nicht dargestellt (Median: 8,5 Mikrokerne/500 doppelkernige Zellen).

Neben Mikrokernen wurden pro Expositionsansatz jeweils 1000 Zellen ausgezählt, und in ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen unterteilt. Weder bei den ein-, den doppel- noch den mehrkernigen Zellen ließen sich im Friedman- oder im Wilcoxon-Test Unterschiede nachweisen. Eine Übersicht über die Ergebnisse befindet sich im Anhang (Tab. 6.4.1). Ferner wurden Apoptosen, Nekrosen und Mitosen ausgezählt. Bei ihnen konnten weder im Friedman-Test noch im Wilcoxon-Test Unterschiede nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse befindet sich ebenfalls im Anhang (Tab. 6.4.2).

4 Diskussion

Luftschadstoffe sind essentieller Gegenstand der heutigen Umweltschutzdebatte. Bisher wurde NO₂ als Luftschadstoff und Reizgas in hohen Konzentrationsbereichen untersucht. Diese überschritten die geltenden Grenzwerte jedoch deutlich. Zum Gewinn weiterer Kenntnisse über NO₂ und seine Wirkung in einem in der Umwelt tatsächlich vorkommenden Konzentrationsbereich wurde in vorliegender Arbeit die geno- und zytotoxische Wirkung von 0,01 ppm NO₂ untersucht.

4.1 Auswahl der Patientenproben und der Kultivierungsmethode

Menschliche Nasenschleimhautzellen sind als Testsystem in Toxizitätsstudien mit Luftschadstoffen etabliert [Knasmueller et al. 2011]. Funktion und Topographie der Nase erklären, dass Luftschadstoffe hier ihren ersten Angriffspunkt finden [Harkema et al. 2006].

Die von uns verwendeten Nasenschleimhautproben wurden während Operationen an der inneren Nase gewonnen. Nach der in 2.2.1 bis 2.2.3 beschriebenen Vorgehensweise wurden die Zellen kultiviert. Die während des 24-stündigen Verdaus stattfindende unphysiologische Trennung der einzelnen Schleimhautzellen kann zu einer Entdifferenzierung und verstärkten Sensitivität gegenüber Schadstoffen führen. Eine Diskrepanz zwischen der *in vitro*- und *in vivo*-Situation wäre die Folge.

Kleinsasser und Mitarbeiter beschäftigten sich in einer Studie mit Miniorgankulturen aus menschlicher Nasenschleimhaut mit dieser Problematik [Kleinsasser et al. 2004]. Im Vergleich mit isolierten Einzelzellen erwiesen sich dabei Miniorgankulturen als unempfindlicher gegenüber Schadstoffen. Miniorgankulturen werden als dreidimensionale Kulturen aus Schleimhautproben gewonnen. Der in der Kultur vorhandene Verbund der Zellen untereinander bewirkt die beschriebene verstärkte Unempfindlichkeit. Miniorgankulturen simulieren durch Erhalt des anfänglichen Verbundes somit gut die *in vivo*-Situation [Wallner et al. 2005].

Da in vorliegender Studie die Nasenschleimhautzellen jedoch gegenüber volatilen Schadstoffen exponiert wurden, mussten die Zellen im Air-Liquid-Interface-System kultiviert werden. Hiermit ist es möglich, Schadstoffe apikal über Zellen zu führen, die von basal mit Nährstoffen versorgt werden. Miniorgankulturen erlauben lediglich die Testung in Flüssigkeit löslicher Schadstoffe. Die Zellen für das Air-Liquid-Interface-System mussten im Unterschied zu Miniorgankulturen zunächst zur Kultivierung eines Zellrasens beziehungsweise Monolayers aus dem Verband gelöst werden und könnten so empfindlicher sein auf den untersuchten Schadstoff. Geringere Schäden *in vivo* nach gleicher Belastung wären somit möglich.

An Zellen der Leber konnte nachgewiesen werden, dass Monolayerkulturen im Vergleich mit dreidimensionalen Kulturen reduzierte Proteinsynthese- und Entgiftungsfähigkeiten aufweisen [Khalil et al. 2001].

Für unsere Expositionsversuche wurden humane Patientenproben verwendet. Die entnommenen Proben können Eigenschaften haben, die von denen gesunden Gewebes abweichen. Wenn das operativ entfernte Gewebe beispielsweise tumorös ist, können anderes Wachstumsverhalten als auch veränderte Strukturen beziehungsweise Zusammensetzungen resultieren [Merkle et al. 1998].

4.2 *In vitro*-Testverfahren

In dem folgenden Abschnitt erfolgt die Diskussion der in vorliegender Studie angewandten *in vitro*-Testverfahren Trypanblau-Ausschlusstest, Caspase-3 ELISA, Comet Assay und Mikrokerntest.

4.2.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Auswirkungen auf die Vitalität der Nasenschleimhautzellen wurden in vorliegender Studie vor und nach Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt, um Schädigungen der Membranen durch Eindringen des Farbstoffs darstellen zu können.

Als klassischer Vitalitätstest hat sich der Trypanblau-Ausschlusstest bewährt. Von Vorteil ist die einfache Durchführbarkeit des Verfahrens [Roguet 1997]. Die Ergebnisse

können jedoch verfälscht werden, wenn apoptotische Zellen aufgrund unveränderter Membran als vital erkannt werden [Sarkar 2009]. Andererseits kann Trypanblau als toxischer Farbstoff vorgeschädigte Zellen abtöten und somit ebenfalls das Ergebnis verändern [Glauner 2006]. Wechselwirkungen mit Proteinen können zu weiteren Verfälschungen führen [Glauner 2006].

Der Trypanblau-Ausschlusstest diente in vorliegender Studie als Screeningtest. Die mit ihm gewonnenen Beobachtungen wurden in den Testverfahren Caspase-3 ELISA, Comet Assay und Mikrokerntest vertieft.

Als alternative Vitalitätstests mit Farbstoffen stehen der Neutralrot- und der MTT- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zoliumbromid) Test zur Verfügung. Mit beiden Verfahren werden im Unterschied zum Trypanblau-Ausschlusstest die vitalen Zellen angefärbt. Die Auswertung erfolgt in Neutralrot- und MTT-Test photometrisch.

Im Vergleich mit Neutralrot- und MTT-Test bot sich in vorliegender Studie der Trypanblau-Ausschlusstest an, weil mit ihm auch eine Zellzählung möglich war. Die entsprechend eingestellte Zellzahl konnte anschließend auf den Membraneinsätzen kultiviert werden. Photometrische Analysen erfolgten in vorliegender Studie mit dem Caspase-3 ELISA.

4.2.2 Caspase-3 ELISA

Der enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) geht auf die schwedische Arbeitsgruppe um Perlmann und Engvall zurück [Engvall et al. 1971]. Mit dem enzym-gekoppelten Testverfahren kann untersucht werden, ob ein bestimmtes Antigen in einer Lösung vorhanden ist. In unserer Studie kam der Caspase-3 ELISA zum Einsatz. Er dient der Analyse der Caspase-3-Aktivität. Da Caspasen Apoptoenzyme sind, können mit der Messung der Caspase-3-Aktivität Rückschlüsse über auftretende Zelluntergänge getroffen werden. Von den bekannten 14 humanen Caspasen ist Caspase-3 als Schlüsselenzym in der Apoptosekaskade von herausragender Bedeutung [Porter et al. 1999].

In vorliegender Studie wurde der Caspase-3 ELISA zur Messung der Caspase-3-Aktivität nach Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft eingesetzt.

Der Farbumschlag lieferte bereits während der Versuchsdurchführung erste Ergebnisse. Aufgrund der enzymatischen Kopplung ist das Testverfahren sehr sensitiv und ermöglicht zudem eine gute Quantifizierung [Crowther 2001]. Der Test lässt sich einfach und schnell auswerten [Crowther 2001].

Beim ELISA-Test ergibt sich die Möglichkeit unterschiedliche Parameter zu untersuchen. So können unterschiedliche Antigene oder Antikörper nachgewiesen werden. Problematisch ist daran, dass für jeden Parameter ein separater Test durchzuführen ist [Umweltbundesamt Österreich 2009].

Schwierigkeiten ergaben sich in vorliegender Studie beim Finden einer geeigneten Positivkontrolle. Hierzu wurde zunächst eine Vorversuchsreihe zur Findung einer wirkungsvollen Positivkontrolle durchgeführt. Es wurden Proben mit MMS und MMC unterschiedlicher Konzentrationen über verschiedenen Expositionszeiten behandelt. Die Caspase-3-Aktivität diente bei der Auswertung als Indikator für die Apoptosenbildung. Bei 100 Millimolar MMS wurde nach mehrfacher Durchführung die konstanteste und effektivste Caspase-3-Aktivität nachgewiesen.

Der ELISA-Reader wertet jeweils eine 96-Well-Platte aus. Um die Proben aller Versuche auswerten zu können, wurden mehrere Platten benötigt. Für jede Platte wurden separate Kalibrierungslösungen angesetzt. Die Notwendigkeit, mehrere Tests durchzuführen zu müssen, ist ein Nachteil des Testverfahrens.

4.2.3 Comet Assay

Der Comet Assay dient dem Aufdecken genotoxischer Schäden. Østling und Johanson führten das Verfahren 1984 erstmals unter neutralen Bedingungen durch, wobei sich DNA-Schäden anhand von Doppelstrangbrüchen nachweisen ließen [Østling et al. 1984]. Die beiden Forscher konnten hierbei bereits auf Erkenntnisse zur Zellyse von Cook und Mitarbeitern zurückgreifen [Cook et al. 1976]. 1988 entwickelten Singh und Mitarbeiter den Comet Assay von Østling und Johanson weiter und führten ihn unter alkalischen Bedingungen durch, was den Nachweis von Einzelsträngen ermöglichte [Singh et al. 1988].

Der Comet Assay untersucht die durch Schadstoffe hervorgerufenen genotoxischen Effekte. Insbesondere lassen sich Schäden nachweisen, die Luftschadstoffe an der Nasenschleimhaut hervorrufen [Koehler et al. 2010; Koehler et al. 2011].

In vorliegender Studie wurde der Comet Assay nach der Methode von Singh und Mitarbeitern durchgeführt [Singh et al. 1988]. Es ist dabei möglich, neben Einzelstrangbrüchen auch alkalilabile Stellen, Reparaturschnitte und DNA-Crosslinks nachzuweisen [Tice et al. 1995; Tice et al. 2000]. Diese 1988 eingeführte Version vereinbarte man auf einem Expertenausschuss 1999 in Washington als effektivste aller Comet Assay-Varianten [Tice et al. 2000].

Vorteile des Comet Assays sind sowohl die einfache Durchführbarkeit als auch der geringe Bedarf an Zellen [Tice et al. 1995; Tice et al. 2000]. Um eine möglichst objektive Auswertung zu garantieren wurden alle Präparate codiert und am Fluoreszenzmikroskop computerunterstützt ausgewertet. Das benutzte Computerprogramm bestimmte die DNA-Schädigung anhand des Olive Tail Moments (OTM), des DNA-Anteils im Schweif (DNA in Tail, DT) sowie der Länge des Schweifes (Tail Length, TL), wobei das Olive Tail Moment in der sich anschließenden statistischen Auswertung des Comet Assays als Wert für die DNA-Schädigung eingesetzt wurde. Eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Institute wird sowohl durch individuelle Einstellung der benutzten Mikroskope als auch der jeweiligen Auswertungssoftware erschwert. Faust und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie Unterschiede in der Methodik zwischen einzelnen Laboren nachweisen [Faust et al. 2004].

Es bleibt zu berücksichtigen, dass es nach entsprechender Regeneration *in vivo* auch zu einer Reparatur von Schäden kommen könnte, und somit zu einer geringeren Schädigung als *in vitro* dargestellt.

Der in vorliegender Studie durchgeführte Comet Assay erkennt sowohl Doppel- als auch Einzelstrangbrüche. Die häufig auftretenden Einzelstrangbrüche können gut über den komplementären Strang repariert werden. Die selteneren Doppelstrangbrüche sind problematischer und können zum Zelltod führen, können aber auch über die homologe Rekombination repariert werden. Durch Fehler während der DNA-Reparatur können Mutationen entstehen.

Als defekt erkannte Zellen, in denen aufgetretene Fehler nicht repariert werden konnten, können im menschlichen Körper in ihrem Zyklus angehalten oder durch Apoptose abgetötet werden. Der Mensch verfügt somit über ein solides Abwehrsystem, in dem Schädigungen durch entsprechende Reparaturen oder Zelltod aufgehoben werden können. Jedoch zeigt sich, dass auch Mutationen entstehen können und die Auswirkungen somit nicht immer voraussagbar sind. Sicherlich ist es am besten, das Gefahrenpotential für derartige Effekte möglichst gering zu halten.

4.2.4 Mikrokerntest

Mit dem Mikrokerntest können sowohl geno- als auch zytotoxische Schäden aufgedeckt werden. Der Test eignet sich dabei sowohl zur Bestimmung von Schäden der Chromosomen als auch von solchen des Spindelapparates [Heddle et al. 1983].

Bereits 1959 konnten Evans und Mitarbeiter eine Mikrokernvermehrung bei Pflanzenzellen nach deren Bestrahlung nachweisen [Evans et al. 1959]. Countryman und Heddle veröffentlichten 1976 Ergebnisse zu Mikrokernversuchen an menschlichen Lymphozyten [Countryman et al. 1976]. Schließlich zählten Fenech und Mitarbeiter Mikrokernkerne nur in doppelkernigen Zellen aus, wodurch das Fundament für den von uns verwendeten Mikrokerntest gelegt wurde [Fenech et al. 1986; Fenech 1993].

In einer Reihe von Studien wurden auch Auswirkungen von Fremdstoffen auf die nasale Schleimhaut mit dem Mikrokerntest untersucht [Knasmueller et al. 2011].

Durch Schädigung der Chromosomen können Mikrokernkerne als Chromosomenbruchstücke entstehen, die nicht mehr in die Tochterkerne eingebaut werden [Fenech 1993; Fenech 2000].

Mikrokernkerne können die Folge falscher Strangreparaturen oder irreparabler Doppelstrangbrüche sein [Graw 2010]. Die DNA-Schädigung im Mikrokerntest sollte damit als eine Schädigung ohne die Möglichkeit der Reparatur betrachtet werden. Es handelt sich somit um eine andere Qualität der Schädigung als im Comet Assay.

Neben dem Aufdecken von Mikrokernen besteht mit dem Mikrokerntest die Möglichkeit auftretende Apoptosen, Nekrosen, Mitosen als auch ein-, doppel- und mehrkernige Zellen auszuwerten [Fenech 2006]. Es können somit auch Effekte auf den Zelltod, den Zellzyklus und die Zellproliferation ausgewertet werden. Die von uns im

Mikrokerntest verwendete Positivkontrolle MMC führte jedoch ausschließlich zu einer Proliferation der Mikrokerne. Dies schränkt die Tragweite der übrigen untersuchten Parameter im Mikrokerntest ein.

Auch wenn der Mikrokerntest einfach durchzuführen ist, gestaltet sich die mikroskopunterstützte Auswertung als sehr zeitaufwendig. Eine gewisse Subjektivität lässt sich beim Auswerten nicht vermeiden. Dabei können beispielsweise Artefakte fehlinterpretiert werden. Abhilfe könnte hierbei die computerunterstützte maschinelle Auswertung schaffen [Szirmai et al. 1993].

4.3 Zytotoxizität

Zytotoxische Stoffe schädigen Gewebezellen. Ob zytotoxische Effekte durch Exposition von Nasenschleimhautepithelzellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ entstehen, wurde in vorliegender Studie mit dem Trypanblau-Ausschlusstest, dem Mikrokerntest und dem Caspase-3 ELISA untersucht.

Hierzu wurde nach Exposition der Zellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft die Vitalität, das Auftreten von Apoptosen und Nekrosen und die Beeinflussung des Zellzyklus und der Zellproliferation untersucht.

4.3.1 Vitalität

Die Vitalität wurde in vorliegender Studie mit dem Trypanblau-Ausschlusstest vor und nach Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ und synthetischer Luft untersucht. Sie wird dabei anhand der Unversehrtheit der Membran bestimmt. Vitale Zellen bleiben ungefärbt, avitale werden mit Trypanblau gefärbt.

In dieser Studie lag die Vitalität der untersuchten Zellen sowohl vor als auch nach Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft jeweils über 80 %. Es wurde somit kein zytotoxischer Effekt im Trypanblau-Ausschlusstest nachgewiesen. Vorausgehende Studien der eigenen Arbeitsgruppe mit höheren NO₂-Konzentrationen bestätigen diese Beobachtung [Koehler et al. 2010; Koehler et al. 2011].

Bakand und Mitarbeiter beschrieben 2006, dass die Vitalität von Zellen bei 2-stündiger Exposition gegenüber synthetischer Luft nicht beeinflusst würde, solange der Gasfluss nicht mehr als 25 ml/min beträgt [Bakand et al. 2006; Bakand et al. 2006]. In unserer Studie wurde der Gasfluss dementsprechend auf 5 ml/min eingestellt.

4.3.2 Apoptosen und Nekrosen

Apoptosen und Nekrosen sind unterschiedliche Formen des Zelltodes. Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der im menschlichen Organismus physiologisch als auch pathologisch auftreten kann. Die Nekrose basiert auf einer Verletzung mit nachfolgender Entzündungsreaktion. Die Nekrose ist somit ein pathologischer Prozess [Lang et al. 2007].

Das Auftreten von Apoptosen und Nekrosen wurde in vorliegender Studie mit Caspase-3 ELISA und Mikrokerntest untersucht. Mit dem Caspase-3 ELISA wurde die Caspase-3-Aktivität nach Exposition von Nasenschleimhautzellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft untersucht. In vorliegender Studie ließen sich bei keiner der untersuchten Expositionsdauern Unterschiede in der Caspase-3-Aktivität ausmachen.

Da Caspasen Enzyme der menschlichen Zellapoptose sind [Sakahira et al. 1998] und Caspase-3 das Schlüsselenzym der Apoptosekaskade darstellt, kann über die Caspase-3-Aktivität die apoptotische Aktivität beurteilt werden. Je stärker die Caspase-3-Aktivität dabei auftritt, desto mehr Apoptosen werden gebildet.

Vergleichen lässt sich unsere Versuchsanordnung hierbei nur bedingt mit ähnlichen Experimenten. Identische Versuchsanordnungen mit Caspase-3 existieren nicht. Fehrenbach und Mitarbeiter veröffentlichten 2007 eine Studie, nach der in Alveolarzellen von Ratten erhöhte Apoptoseraten nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ immunohistochemisch mit Caspase-3 nachgewiesen wurden [Fehrenbach et al. 2007]. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die von der Arbeitsgruppe um Fehrenbach untersuchte NO₂-Konzentration die von uns getestete NO₂-Konzentration um den Faktor 1000 überstieg.

Neben NO₂ selber könnten in unserer Studie auch reaktive Spezies als Umwandlungsprodukte des NO₂ zu Zellschädigungen führen. Werden solche reaktiven

Stickstoffspezies (RNS) überproduziert, entsteht nitrosativer Stress [Rutkowski et al. 2007], der in einem verstärkten Zelltod resultieren kann [Hirst et al. 2007]. Zahlreiche internationale Studien untersuchen die Zusammenhänge zwischen reaktiven Stickstoffspezies und Zelluntergängen.

Kim und Mitarbeiter schreiben, dass die reaktive Stickstoffspezies NO je nach Zellart eine Apoptosenentstehung fördern oder hemmen kann [Kim et al. 2001]. Nach Auffassung der Autoren scheinen niedrige Konzentrationen eher die Apoptosenentstehung zu hemmen, hohe Konzentrationen hingegen eher toxisch zu wirken. Diese Beobachtungen decken sich mit unseren Erkenntnissen. In dem von uns untersuchten niedrigen NO₂-Konzentrationsbereich konnte keine verstärkte Caspase-3-Aktivität festgestellt werden. Die Apoptosenentstehung wurde nicht gefördert.

Zytotoxische Zelluntergänge konnten anhand der Caspase-3-Aktivität im Caspase-3 ELISA und der Auszählung von Apoptosen und Nekrosen im Mikrokerntest untersucht werden.

Bei der von uns untersuchten Konzentration von 0,01 ppm NO₂ konnten bei keiner der untersuchten Expositionsdauern Unterschiede in der Zahl auftretender Apoptosen beziehungsweise Nekrosen im Mikrokerntest nachgewiesen werden. Auch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft wurden keine Effekte im Mikrokerntest nachgewiesen.

Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen der eigenen Arbeitsgruppe aus vorangegangenen Studien. Bei gleicher Versuchsanordnung und Exposition von Nasenschleimhautzellen gegenüber 0,1 ppm NO₂, also der im Vergleich zu unserer Studie zehnfach erhöhten Konzentration, wurden keine Unterschiede in der Anzahl der Apoptosen oder Nekrosen im Mikrokerntest festgestellt [Koehler et al. 2011]. Auch in einer weiteren Studie wies man bei jeweils halbstündiger Exposition von Nasenschleimhautzellen gegenüber Konzentrationen von 0,01 ppm bis 10 ppm NO₂ bei keiner der Expositionsansätze Veränderungen in der Apoptosen- oder Nekrosenanzahl im Mikrokerntest nach [Koehler et al. 2010].

Vergleichen lassen sich die Ergebnisse zur Apoptosen- und Nekroseninduktion im Mikrokerntest vorliegender Studie nur mit diesen Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe. Weitere Studien, die das Auftreten von Nekrosen und Apoptosen nach

NO₂-Exposition im Mikrokerntest untersuchen, konnten in der Datenbanksuche nicht ermittelt werden.

Jedoch sind aus der Literatur Studien bekannt, in denen in humanen Zellen auftretende Apoptosen und Nekrosen mit dem Mikrokerntest ausgewertet wurden. So ließen sich beispielsweise in humanen Lymphozyten nach sportlicher Höchstbelastung [Reichhold et al. 2009] oder aber in Lymphozyten rauchender Probanden Apoptosen und Nekrosen nachweisen [El-Zein et al. 2008].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus dem Mikrokerntest muss beachtet werden, dass MMC als die von uns verwendete Positivkontrolle für den Mikrokerntest nur zur Proliferation von Mikrokernen und nicht zur Induktion von Apoptosen oder Nekrosen führte.

4.3.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus umfasst die Zeitspanne einer Zellteilung bis zur folgenden Zellteilung und wird unterteilt in die Interphase und die Mitose. Die Interphase ist die längere der beiden Phasen und bereitet die Mitose vor. Während der Mitose findet die eigentliche Zellkernteilung statt.

Mit dem Mikrokerntest wurden auftretende Mitosen mit dem Mikroskop ausgezählt. Unterschiede in der Mitosenanzahl können Hinweise auf abnorm ablaufende Zellteilungen geben.

Weder im Friedman- noch im Wilcoxon-Test wurden in vorliegender Studie nach Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft Unterschiede in der Anzahl auftretender Mitosen festgestellt.

Im Zusammenhang mit der bereits erwähnten Problematik während der NO₂-Exposition entstehender reaktiver Stickstoffspezies (RNS) finden sich zahlreiche internationale Studien, die die Beeinflussung des Zellzyklus untersuchen. Yuan und Mitarbeiter exponierten Alveolarzellen von Mäusen 4 h gegenüber 5 ppm NO₂ und konnten dabei nachweisen, dass reaktive Stickstoffspezies den Zellzyklus einschränken können [Yuan et al. 2003]. Nach Thomas und Mitarbeitern kann die Stickstoffspezies NO in niedriger Konzentration einen fördernden und in hoher Konzentration einen limitierenden Einfluss auf den Zellzyklus ausüben [Thomas et al. 2008]. Ein fördernder Effekt auf den

Zellzyklus wurde in unserer Studie trotz Exposition der Nasenschleimhautzellen gegenüber einer niedrigen NO₂-Konzentration nicht nachgewiesen. Dies könnte daran liegen, dass die von uns untersuchte Konzentration sehr niedrig ist und bisher getestete Konzentrationen weitgehend unterschreitet. Ein weiterer Vergleich bietet sich mit einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe an, in der bei 0,1 ppm NO₂ ebenfalls keine Beeinträchtigung des Zellzyklus im Mikrokerntest festgestellt werden konnte [Koehler et al. 2011].

4.3.4 Zellproliferation

Zytotoxische Effekte auf die Zellproliferation untersuchte man mit dem Mikrokerntest. Hierzu wurden 1000 Zellen eines Expositionsansatzes mit dem Mikroskop ausgezählt und in ein-, doppel- und mehrkernige Zellen unterschieden.

Eine Substanz mit zytotoxischer Wirkung führt zu verminderter Proliferation und somit zu einem vermehrten Auftreten einkerniger Zellen und einem verringerten Auftreten doppel- und mehrkerniger Zellen [Stopper 2010].

Weder im Friedman- noch im Wilcoxon-Test wurden in vorliegender Studie jedoch Unterschiede in der Anzahl ein-, doppel- oder mehrkerniger Zellen bei einer der Expositionsansätze gegenüber 0,01 ppm NO₂ oder synthetischer Luft festgestellt.

Ein sinnvoller Vergleich bietet sich mit folgenden Studien an, in denen die durch NO₂ provozierte Proliferation jedoch mit anderen Testverfahren untersucht wurde.

Fehrenbach und Mitarbeiter untersuchten in der bereits unter 4.3.2 erwähnten Studie die Auswirkungen von NO₂ auf die Lungen von Versuchsratten [Fehrenbach et al. 2007]. Die Autoren konnten nach 3-tägiger Exposition gegenüber 10 ppm NO₂ mit dem Protein Ki-67 als Proliferationsmarker eine verstärkte Proliferation in der Lunge nachweisen.

Während in einer weiteren tierexperimentellen Studie mit Ratten immunohistochemisch nach einer Kurzzeitexposition von 3 Tagen gegenüber 5 ppm NO₂ eine deutliche epitheliale Proliferation des Bronchiolenepithels nachgewiesen wurde, wurde diese nach einer Langzeitexposition von 25 Tagen gegenüber 5 ppm NO₂ nicht mehr nachgewiesen [Barth et al. 1999]. Nach den Autoren lässt dies eine Anpassung an den oxidativen Stress vermuten

Der von uns untersuchte Konzentrationsbereich ist deutlich geringer als der in den voran vorgestellten tierexperimentellen Studien. Insofern reihen sich unsere Erkenntnisse zur Proliferation sinnvoll in den Kontext der bekannten tierexperimentellen Studien ein.

4.4 Genotoxizität

Genotoxische Effekte können das Erbgut schädigen. Ob genotoxische Effekte durch Exposition von Nasenschleimhautepithelzellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ entstehen, untersuchte man in vorliegender Studie mit dem Comet Assay und dem Mikrokerntest. Hierzu wurde nach Exposition der Zellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise synthetischer Luft das Auftreten von DNA-Strangbrüchen und das Auftreten von Mikrokernen untersucht.

4.4.1 DNA-Strangbrüche

Im Comet Assay wurde das Olive Tail Moment als Parameter für eine genotoxische Schädigung verwendet.

Mit dem Friedman-Test ließen sich im Comet Assay sowohl Effekte bei Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ als auch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft nachweisen. Da auch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft Schäden auftraten, muss ein unbekannter Faktor vorhanden sein, der unabhängig von der Exposition gegenüber den Gasen eine genotoxische Schädigung provoziert. Mit dem Wilcoxon-Test ließen sich Unterschiede zwischen den OTM-Werten zeitlich entsprechender Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂ und gegenüber synthetischer Luft bei 0,5 h, 1h sowie 2 h nachweisen. Bei 3-stündiger Exposition wurde zwischen der Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ und der Exposition gegenüber synthetischer Luft jedoch kein Unterschied festgestellt.

Die Ursache dieser Beobachtung könnte darin begründet sein, dass sich die OTM-Werte der Expositionen gegenüber 0,01 ppm NO₂ und der Expositionen gegenüber synthetischer Luft ab einer gewissen Expositionszeit einem gemeinsamen Endwert annähern, sich Unterschiede zwischen beiden Proben somit womöglich aufheben.

Hierfür könnten mit Anstieg der Expositionszeit und des Luftstroms vermehrt auftretende Austrocknungsartefakte der Proben verantwortlich sein. Dieser Umstand könnte auch erklären, warum bei den Expositionen gegenüber synthetischer Luft bereits genotoxische Schäden auftraten. Solche Austrocknungsartefakte wurden von uns mikroskopisch jedoch nicht festgestellt.

Wie bereits unter 4.3.1 erwähnt beschrieben Bakand und Mitarbeiter 2006, dass die Vitalität von Zellen bei 2-stündiger Exposition gegenüber synthetischer Luft nicht beeinflusst würde, solange der Gasfluss nicht mehr als 25 ml/min beträgt [Bakand et al. 2006; Bakand et al. 2006]. In unserer Studie wurde der Gasfluss dementsprechend auf 5 ml/min eingestellt und sollte somit eigentlich die Entstehung von Austrocknungsartefakten verhindern.

In zukünftigen Versuchsreihen könnten dennoch stetige Begasungsbedingungen ausgetestet werden, um mögliche Effekte auf die Zellen durch den Gasbeziehungweise Luftfluss auszuschließen. Jedoch stehen auch im menschlichen Organismus die nasalen Epithelzellen unter dem Einfluss des Luftbeziehungweise Gasflusses.

Dass mit dem Friedman-Test bei Exposition gegenüber synthetischer Luft in unserer Studie genotoxische Effekte nachgewiesen wurden, könnte neben etwaigen Austrocknungsartefakten auch weitere Ursachen haben. Sauerstoff (O_2) kann durch biologische Reaktionen in reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt werden [Thannickal et al. 2000]. Als wichtigste reaktive Sauerstoffspezies kann Hyperoxid-Anion (O_2^-) bezeichnet werden [Azad et al. 2008], welches Hydroxyl-Radikale (OH-Radikale) bilden und zusammen mit Stickstoffmonoxid (NO) Peroxynitrit ($ONOO^-$) erzeugen kann [Grisham et al. 2000]. $ONOO^-$ wiederum verursacht DNA-Schäden [Szabo et al. 1997]. Insofern könnte eine verstärkte Zufuhr von Sauerstoff durch einen verstärkten Luftfluss auch zur Entstehung von DNA-Schäden führen.

Im Hinblick auf NO_2 können die DNA-Schäden mit der bereits unter 4.3.2 erwähnten Bildung reaktiver Stickstoffspezies (RNS) erklärt werden. Schadstoffe wie NO_2 begünstigen die Entstehung reaktiver Spezies [Emmendoerffer et al. 2000]. Folglich besteht der einzige Unterschied bei der toxischen und genotoxischen Wirkung zwischen einer Exposition gegenüber synthetischer Luft und einer Exposition gegenüber NO_2 in dem Betrag der gebildeten RNS. ROS und RNS stehen sowohl in direkter

Wechselwirkung mit den beobachteten DNA-Schäden als auch der Inhibition der Zellapoptose, wobei jedoch unklar bleibt, ob RNS proapoptotische oder anti-apoptotische Funktion hat [Azad et al. 2008].

Ein Vergleich unserer Ergebnisse aus dem Comet Assay bietet sich mit Ergebnissen einer Studie von Wolz und Mitarbeitern an [Wolz et al. 2002]. Sie benutzten ebenfalls ein Air-Liquid-Interface-System für ihre Zellen und deckten genotoxische Effekte durch Zigarettenrauch mit dem Comet Assay auf. Die Zellen wurden jeweils 1 h gegenüber synthetischer Luft, NO₂ oder Zigarettenrauch exponiert. Als Positivkontrolle diente die 1-stündige Exposition gegenüber 0,3 ppm NO₂, wobei sich ebenfalls genotoxische Schäden zeigten.

Am besten lässt sich unsere Versuchsreihe mit vorausgegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe vergleichen [Koehler et al. 2011]. Bei gleicher Anordnung wurden hierbei Versuche mit 0,1 ppm NO₂ und synthetischer Luft durchgeführt. Die NO₂-Konzentration war also im Vergleich zu der in vorliegender Studie gewählten Konzentration um den Faktor 10 erhöht. Wie bereits bei der hier untersuchten Konzentration konnten dabei Unterschiede zwischen den OTM-Werten der unterschiedlichen zeitlichen Expositionen gefunden werden. Jedoch fand man in der vorliegenden Studie keinen Unterschied zwischen dem OTM-Wert der 3-stündigen Exposition gegenüber synthetischer Luft und dem OTM-Wert der 3-stündigen Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂.

Man sollte bei unseren Studienergebnissen aus dem Comet Assay berücksichtigen, dass es zu Reparaturvorgängen kommen kann und somit zu einer geringeren Schädigung als von uns dargestellt. Diese Vorgänge könnten jedoch nur nach entsprechender Regenerationszeit eintreten (4.2.3).

4.4.2 Mikrokerne

Im Mikrokerntest wurden zur Bestimmung spezifischer genotoxischer Effekte Mikrokerne ausgezählt. Als Mikrokerne bezeichnet man Chromosomenbruchstücke, die nicht mehr in die Tochterkerne eingebaut werden können [Fenech 1993; Fenech 2000]. Bei der Auswertung des Tests in vorliegender Studie ließen sich Unterschiede nur zwischen den Mikrokernanzahlen der 3-stündigen Exposition gegenüber synthetischer

Luft und den Mikrokernanzahlen der 3-stündigen Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ nachweisen.

In unserer *in vitro*-Studie konnten somit bei einer Konzentration von 0,01 ppm NO₂ Effekte erst ab einer Expositionszeitdauer von 3 h im Mikrokerntest festgestellt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen einer *in vitro*-Studie der eigenen Arbeitsgruppe, in der ebenso erst bei 3-stündiger Exposition gegenüber 0,1 ppm NO₂, also der zehnfach erhöhten Konzentration, ein Effekt im Mikrokerntest nachgewiesen wurde [Koehler et al. 2011].

Die Ergebnisse der beiden Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Zeit als kritischer Faktor bei der Entstehung genotoxischer Effekte auch schon bei niedriger NO₂-Konzentration wahrgenommen werden muss. Die Erkenntnisse gehen dabei mit denen epidemiologischer Studien einher.

In epidemiologischen und tierexperimentellen Studien zur Wirkung von NO₂ auf die Induktion von Mikrokernen wurde jeweils die Wirkung mehrerer Schadstoffe untersucht. In diesen Studien ist die Wirkung nicht eindeutig und alleine dem NO₂ zuzuordnen. Weiterhin fehlen Angaben über die NO₂-Konzentrationen, wobei in Regionen mit erhöhter Verkehrsbelastung auch von einer erhöhten Belastung mit NO₂ auszugehen ist.

Villarini und Mitarbeiter untersuchten in ihrer epidemiologischen Studie aus dem Jahre 2008 die Auswirkungen einer Innenraumbelastung mit NO₂, Staub und anderen Schadstoffen auf die Gesundheit von Konstrukteuren bei Tunnelbauten [Villarini et al. 2008]. Die Versuche wurden an Zellen des peripheren Blutsystems durchgeführt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Im Mikrokerntest zeigte sich ein Anstieg der Mikrokernrate bei exponierten Arbeitern. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass der Anstieg auch auf andere Schadstoffe als NO₂ zurückzuführen sein kann. Pedersen und Mitarbeiter veröffentlichten 2009 eine epidemiologische Studie, die die Zusammenhänge zwischen Schwangerschaft und Luftverschmutzung beleuchtet [Pedersen et al. 2009]. Darin diente unter anderem NO₂ als Parameter für die Luftverschmutzung. Im Blut der Kinder von Müttern, die in verkehrsreichen Bereichen lebten, wurden erhöhte Mikrokernraten gefunden. Tierexperimentell führte eine Exposition gegenüber NO₂ nicht zu einer erhöhten Mikrokernrate im Knochenmark von Mäusen [Victorin et al. 1990].

Schließlich führten Ballarin und Mitarbeiter bereits 1992 Mikrokernversuche mit Nasenschleimhautzellen von Formaldehyd exponierten Arbeitern durch, wobei sie erhöhte Mikrokernraten nachweisen konnten [Ballarin et al. 1992].

Die in unserer Studie beobachtete DNA-Schädigung im Mikrokerntest sollte als eine bleibende Schädigung ohne die Möglichkeit der Reparatur betrachtet werden.

4.5 Erbgutveränderndes Potential von Stickstoffdioxid

In vorliegender Studie ließen sich nach Exposition von Nasenschleimhautzellen gegenüber 0,01 ppm NO₂ und synthetischer Luft genotoxische, jedoch keine zytotoxischen Effekte nachweisen. Da sich genotoxische DNA-Schäden auch bei Exposition gegenüber synthetischer Luft nachweisen ließen, könnten die Schäden auf die Entstehung sogenannter reaktiver Spezies zurückgeführt werden. Schadstoffe wie NO₂ begünstigen die Entstehung reaktiver Spezies [Emmendoerffer et al. 2000]. Vermutlich sind die reaktiven Spezies an der Entstehung chronischer Entzündungen beteiligt, welche in der Folge wiederum das Mutationsrisiko steigern können [Ferguson 2010]. Die Auswirkungen der reaktiven Spezies auf die Zell-DNA erhöhen dabei das Entartungsrisiko [Azad et al. 2008]. Es gibt weitere Mechanismen, die die Entstehung und Entwicklung von Entzündungen und Entartungen beeinflussen können. Beispiele hierfür sind die Apoptose oder die Tumorsuppression durch p 53, die wiederum durch die reaktiven Spezies beeinflusst werden [Azad et al. 2008]. Dementsprechend konnten Nafstad und Mitarbeiter in einer epidemiologischen Studie Zusammenhänge zwischen einer Exposition gegenüber erhöhten Stickstoffoxidkonzentrationen und der Entstehung von Lungenkrebs nachweisen [Nafstad et al. 2003]. In der norwegischen Studie wurden 16000 Männer über einen Zeitraum von 25 Jahren beobachtet. Höhere Luftverschmutzungsniveaus standen dabei im Zusammenhang mit einer angestiegenen Zahl von Lungenkrebsfällen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass in verschmutzter Luft eine Vielzahl von Schadstoffen auftritt und somit auftretende Effekte und Krankheiten nicht per se auf NO₂ zurückgeführt werden können.

4.6 Schwellenwerte und aktuelle Grenzwerte für Stickstoffdioxid

Schwellenwerte kennzeichnen Werte, die bei Überschreitung mit möglichen gesundheitlichen Folgen im Zusammenhang stehen.

4.6.1 Aspekte zur Auswahl des untersuchten Konzentrationsbereichs

NO₂-Expositionen werden über den Einstunden- und den Jahresgrenzwert reguliert. Hierbei begrenzt der Einstundengrenzwert die während einer Stunde und der Jahresgrenzwert die in einem Jahr durchschnittlich exponierte Menge an NO₂ pro m³ Luft.

Da in vorhergehenden Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe [Koehler et al. 2011] bereits Untersuchungen zu dem aktuellen Einstundengrenzwert von 0,1 ppm NO₂ unternommen wurden, interessiert insbesondere der Bereich noch niedrigerer NO₂-Konzentrationen.

Hierbei wählte man 0,01 ppm NO₂, um eine Konzentration zu untersuchen, die ubiquitär vorkommt. Sie entspricht der Hälfte des aktuellen Jahresgrenzwertes für NO₂. Bisherige Studien wurden in deutlich höheren Konzentrationen durchgeführt.

4.6.2 Festlegung von Schwellenwerten

Da in unseren Studien zur Toxizität von 0,01 ppm NO₂ genotoxische Schäden in Form von DNA-Fragmentierungen bereits ab der kürzesten Expositionszeitdauer von 0,5 h im Comet Assay auftraten, konnte ein Schwellenwert für NO₂ von uns nicht festgestellt werden. Wenn es einen solchen gibt, müsste er unterhalb der untersuchten Konzentration von 0,01 ppm NO₂ liegen.

Manifeste genotoxische Schäden in Form erhöhter Mikrokernraten wurden bei 3-stündiger Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ nachgewiesen. Es liegt nahe, dass manifeste Schäden nach dem Prinzip der Stochastik auftreten, das heißt nach einem Zufallsprinzip, wobei die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens mit der Konzentration und der Expositionszeit wächst.

Die Existenz eines Wertes, unterhalb dem weder geno- noch zytotoxische Effekte *in vitro* auftreten, würde die Festlegung von Schwellenwerten ermöglichen, die für NO₂ zyto- beziehungsweise genotoxische Effekte ausschließen könnten. Jedoch treten aerogene Schadstoffe gemeinsam auf, sodass sich dieser Vorteil schnell wieder durch Überlagerung der Wirkungen auflösen könnte. Deswegen sollte insbesondere die Erforschung des Zusammenwirkens von NO₂ mit anderen Schadstoffen Gegenstand weiterer Studien sein.

4.6.3 Wertung aktueller Grenzwerte

Bei der Festlegung präventiver Grenzwerte spielen neben gesundheitlichen auch gesellschaftspolitische und wissenschaftsferne Gründe eine Rolle. Präventive Motive sind im Zusammenhang mit der Diskussion um NO₂-Grenzwerte von Bedeutung, da ein Schwellenwert für NO₂ bisher nicht festgestellt werden konnte.

Bei der Belastung mit NO₂ muss zwischen einer Innen- und einer Außenraumbelastung unterschieden werden. So können Belastungen durch Luftschadstoffe in Räumlichkeiten deutlich höher als Belastungen durch Luftschadstoffe in der Umwelt sein. Durch Zigarettenrauch und Heizen mit Gas können Schadstoffe freigesetzt werden, die stärker belastend sind als die durch städtischen Verkehr. Nach Analyse der aktuellen Studienlage bleibt die Höhe der häuslichen NO₂-Produktion nach unserer Auffassung jedoch spekulativ. Demnach kann zur Zeit auch keine verlässliche Aussage über das Verhältnis der endogenen zur exogenen Belastung mit NO₂ getroffen werden.

Der aktuelle Jahresgrenzwert zum Schutz der menschlichen Gesundheit liegt bei 0,02 ppm NO₂ [Bundesregierung Deutschland 2010]. Die von uns untersuchte Konzentration von 0,01 ppm NO₂ entspricht der Hälfte des Jahresgrenzwertes und liegt somit in einem ubiquitär auftretenden Konzentrationsbereich.

Auch wenn in unseren Studien keine zytotoxischen Schäden im Mikrokerntest oder Caspase-3 ELISA gefunden wurden, besteht dennoch die Möglichkeit, dass nach Langzeitexpositionen solche auch in niedrigeren Konzentrationen auftreten. Zur Überprüfung dessen müssten auch *in vitro*-Langzeitstudien über Monate beziehungsweise Jahre durchgeführt werden.

Genotoxische Effekte wurden hingegen schon ab der kürzesten Expositionsdauer von 0,5 h gegenüber 0,01 ppm NO₂ im Comet Assay und bei 3-stündiger Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ im Mikrokerntest nachgewiesen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die im Comet Assay nachgewiesenen genotoxischen Effekte nach entsprechender Regenerationszeit *in vivo* repariert werden und die Schädigung geringer ausfällt als *in vitro* nachgewiesen. Allerdings kann über die Qualität der Reparatur und möglicherweise hierbei entstehende Fehler bestenfalls spekuliert werden. Aufgrund der nachgewiesenen und bleibenden Schädigung im Mikrokerntest bei 3-stündiger Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ sollte jedoch versucht werden aktuelle Grenzwerte einzuhalten beziehungsweise eine Reduktion durch technische Fortentwicklung in der Schadstoffemission und der Luftreinigung zu erreichen.

Die Europäische Union hat zur Verringerung der Schadstoffemissionen von Kraftfahrzeugen die Euro-5- und die Euro-6-Norm eingeführt [EU 2007]. Diese sollen insbesondere eine Reduktion der produzierten Partikel- und Stickstoffoxidemissionen bewirken. In der Euro-5-Norm wurden hierzu die erlaubten Stickstoffoxidemissionen für Fahrzeuge mit Diesel- und Benzinbetrieb um 20-25 % reduziert. Im Vergleich mit der Euro-5-Norm wird mit der ab 2014 geltenden Euro-6-Norm eine zusätzliche 50-prozentige Reduktion der Stickstoffoxidemissionen von Dieselfahrzeugen vorgeschrieben.

Mit der europäischen Richtlinie für Luftqualität setzte man die Vorgaben der WHO in europaweites Recht um [EU 2008]. Jahres- und Einstundengrenzwert wurden in nationales Recht umgewandelt [Bundesregierung Deutschland 2010]. Gegenwärtig werden an über 50 % der verkehrsnahen Messstationen die Jahresgrenzwerte von 0,02 ppm NO₂ überschritten. An den übrigen Messstationen in ländlichen und stadtnahen Bereichen werden sie eingehalten. Eine Einhaltung der geltenden Grenzwerte ist erstrebenswert, um mögliche und noch nicht nachgewiesene Langzeiteffekte zu vermeiden. In unseren Studien konnte ein zeitlicher Schwellenwert bei 0,01 ppm NO₂, dessen Unterschreitung das Auftreten von DNA-Schäden ausschließen würde, nicht gefunden werden. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens bleibender DNA-Schäden nach einem Zufallsprinzip, einer sogenannten stochastischen Wahrscheinlichkeit, sollte durch minimale NO₂-Exposition gering gehalten werden.

4.7 Ausblick

Die in unseren Versuchen beobachteten genotoxischen Schädigungen nach Exposition gegenüber realen NO₂-Konzentrationen sollten weiter untersucht werden. Um die Tragweite der aufgetretenen Schädigung beurteilen zu können, wird nun die Analyse genotoxischer Wirkungen des NO₂ auf die Chromatidebene ausgedehnt.

Von besonderem Interesse ist die Untersuchung möglicher Reparaturvorgänge nach einer Exposition. Es könnten Reparaturvorgänge nur bis zu einer gewissen Expositionsdauer ablaufen, sodass bei Langzeitexpositionen vermehrt bleibende Schäden auftreten würden. Studien zu *in vitro*-Langzeitexpositionen wären aus diesen Gründen ebenso von Interesse wie auch eruiert werden sollte, bis zu welcher Expositionsdauer Reparaturvorgänge wirken können.

Alternativ zu den vorhandenen epidemiologischen Studienergebnissen bestände so auch die Möglichkeit speziell die Langzeiteffekte des NO₂ ohne Beteiligung weiterer Luftschadstoffe zu testen. Allerdings zeigt auch die vorliegende Arbeit Grenzen von zeitlichen Expositionen auf, sodass zunächst Verbesserungen des Expositionsmodells im Hinblick auf Langzeitexpositionen erfolgen müssten.

Gerade im Hinblick auf epidemiologische Studienergebnisse wäre eine *in vitro*-Untersuchung der Wechselwirkungen des NO₂ mit anderen genotoxischen Substanzen interessant.

5 Zusammenfassung

Bisherige *in vitro*-Untersuchungen konnten genotoxische Effekte bei der Konzentration des aktuellen Einstundengrenzwertes für NO₂ (0,1 ppm NO₂) nachweisen [Koehler et al. 2011]. In der Diskussion um Grenzwerte für NO₂ interessieren insbesondere real auftretende Konzentrationsbereiche. Hierzu wurde in vorliegender Studie der Konzentrationsbereich unterhalb des Jahresgrenzwertes für NO₂ (0,02 ppm NO₂) untersucht.

Primäre Nasenschleimhautzellen wurden im Air-Liquid-Interface (ALI) kultiviert und in n=10 Versuchen gegenüber 0,01 ppm NO₂ beziehungsweise gegenüber synthetischer Luft exponiert. Die Expositionsdauern betragen jeweils 0,5 h, 1 h, 2 h sowie 3 h. Die Exposition gegenüber synthetischer Luft diente als Negativkontrolle. Mit Comet Assay und Mikrokerntest konnten genotoxische, mit Trypanblau-Ausschlusstest, Caspase-3 ELISA und Mikrokerntest zudem zytotoxische Effekte untersucht werden.

Ab der kürzesten Expositionszeitdauer von 0,5 h ließen sich für 0,01 ppm NO₂ mit dem Comet Assay genotoxische Effekte als DNA-Fragmentierung nachweisen, während sich mit dem Mikrokerntest nur bei 3-stündiger Exposition gegenüber 0,01 ppm NO₂ genotoxische Schäden im Sinne einer erhöhten Anzahl von Mikrokernen nachweisen ließen. Zytotoxische Effekte im Sinne erhöhter Caspase-3-Aktivität beziehungsweise einer erhöhten Anzahl auftretender Apoptosen oder Nekrosen konnten weder mit dem Caspase-3 ELISA noch mit dem Mikrokerntest nachgewiesen werden. Auch wurden keine zytotoxischen Effekte durch Beeinflussung der Vitalität mit dem Trypanblau-Ausschlusstest oder des Zellzyklus und der Zellproliferation mit dem Mikrokerntest festgestellt.

Bei der von uns untersuchten realen Konzentration von 0,01 ppm NO₂ ließen sich also genotoxische, jedoch keine zytotoxischen Effekte nachweisen. Ein Schwellenwert, unterhalb dessen man nachteilige Wirkungen von NO₂ ausschließen kann, konnte somit in dem von uns untersuchten Konzentrationsbereich nicht gefunden werden.

Zukünftige Versuchsreihen fokussieren auf NO₂-Konzentrationen unter 0,01 ppm. Die abschließende Beurteilung dieser sehr geringen Konzentrationen erfordert weitere Testverfahren mit spezifischen Endpunkten der Genotoxizität als auch *in vivo*-Versuche.

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Laborgeräte

Laborgeräte	Firma, Ort
Einhängethermostat, Haake C 10	Thermo Electron, Karlsruhe
Elektrophoresekammern	Renner, Dannstadt
Elektrophoresenetzgerät, EV 202	Consort, Turnhout, Belgien
ELISA-Reader, Multiskan Plus II	Labsystems, Helsinki, Finnland
Expositonskammer	Vitrocell Systems, Waldkirch
Fluoreszenzmikroskop, DM 4000 B	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop, DMI 4000 B	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Lichtmikroskop, 473028	Zeiss, Oberkochen
Mass-Flow-Controller, EL FLOW select	Bronkhorst, Ruurlo, Niederlande
NO ₂ -Analysator, AC 31 M	Ansyco, Karlsruhe
Pumpe, Trivac	LH Leybold, Köln
Wasserbecken, Haake P5	Thermo Electron, Karlsruhe
Zählkammer, Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zentrifuge, Universal 16 R	Andreas Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5810	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge, Cell Spin-1	Tharmac, Waldsolms

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
Deckgläser (24 mm x 32 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated-Life Sciences, NY, NY, USA
Falcon-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger (26 mm x 76 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen
96-Well ELISA Platte	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA, USA
12-Well Platte mit Membraneinsätzen	Corning Incorporated-Life Sciences, NY, NY, USA

6.1.3 Lösungen, Medien und Reagenzien

Testsubstanzen	Firma, Ort
MMC	Sigma-Aldrich, Steinheim
MMS	Sigma-Aldrich, Steinheim
10 ppm NO ₂ in kohlenwasserstofffreier synthetischer Luft	Linde, Pullach
synthetische Luft, kohlenwasserstofffrei	Rießner-Gase, Lichtenfels

Chemikalien	Firma, Ort
Acridinorange	Serva, Heidelberg
Agarose <i>normal melting point</i> (Typ I)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose <i>low melting point</i> (Typ II)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	J. T. Baker, Griesheim
FCS	Linaris Biologische Produkte, Wertheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kollagen A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (30 %)	Serva, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin
PBS, 10x	Roche Diagnostics, Mannheim
Retinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypan 0,4 % Blue Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim

Enzyme	Firma, Ort
Desoxyribonuklease	Roche Diagnostics, Mannheim
Protease	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 %)	Biochrom, Berlin

Nährmedien	Firma, Ort
BEGM mit Supplement	Promo Cell, Heidelberg
RPMI-Medium 1640	Biochrom, Berlin
MEM	Sigma-Aldrich, Steinheim

6.2 Datenanhang

Versuch	synthetische Luft 0,5 h Vitalität (%)	synthetische Luft 1 h Vitalität (%)	synthetische Luft 2 h Vitalität (%)	synthetische Luft 3 h Vitalität (%)	0,01 ppm NO ₂ 0,5 h Vitalität (%)	0,01 ppm NO ₂ 1 h Vitalität (%)	0,01 ppm NO ₂ 2 h Vitalität (%)	0,01 ppm NO ₂ 3 h Vitalität (%)	vor Exposition Vitalität (%)
1	88	90	90	89	88	86	88	86	87
2	84	86	89	90	87	93	82	91	86
3	87	85	85	84	90	89	85	85	93
4	93	90	82	88	85	95	82	86	85
5	90	87	90	86	84	87	90	84	94
6	84	90	87	85	88	85	90	86	92
7	87	89	85	93	89	89	88	89	83
8	92	91	88	92	90	91	82	93	87
9	86	85	86	88	92	83	92	85	90
10	89	92	90	89	89	82	86	86	87
Median	87,5	90	88	89	88,5	88	87	86	87
Mean	88	89	87	88	88,2	88	87	87	88,4
SD	3,06	2,5	2,7	2,9	2,39	4,2	3,7	2,9	3,66

Tab. 6.1: Auswertung des Trypanblau-Ausschlusstests; Vitalität (%) = Anzahl der vitalen Zellen (bezogen auf 100 Zellen); SD = Standardabweichung.

Versuch	synthetische Luft 0,5 h Einheiten/ml	synthetische Luft 1 h Einheiten/ml	synthetische Luft 2 h Einheiten/ml	synthetische Luft 3 h Einheiten/ml	0,01 ppm NO ₂ 0,5 h Einheiten/ml	0,01 ppm NO ₂ 1 h Einheiten/ml	0,01 ppm NO ₂ 2 h Einheiten/ml	0,01 ppm NO ₂ 3 h Einheiten/ml	MMS 100 mM Einheiten/ml
1	8	7	5	5	8	24	2	14	500
2	24	11	5	1	7	3	2	11	60
3	47	73	105	80	100	63	80	85	250
4	98	50	68	58	85	125	70	80	550
5	100	130	160	180	140	115	120	140	300
6	63	73	70	70	68	145	75	230	650
7	13	14	12	13	80	25	18	20	125
8	12	10	19	32	20	25	44	33	420
9	24	30	22	38	90	25	22	25	125
10	48	54	75	44	40	36	65	75	93
Median	35,5	40,0	45,0	41,0	74,0	30,5	54,5	54,0	275,0
Mean	43,7	45,2	54,1	52,1	63,8	58,6	49,8	71,3	307,3
SD	34,2	39,3	51,1	52,2	43,9	50,8	38,7	69,4	211,6

Tab. 6.2: Auswertung des Caspase-3 ELISA; Einheiten/ml = Einheit der Caspase-3-Aktivität; MMS = Methylmethansulfonat (100 mM); SD = Standardabweichung.

Versuch	synthetische Luft 0,5 h			synthetische Luft 1 h			synthetische Luft 2 h			synthetische Luft 3 h			0,01 ppm NO ₂ 0,5 h			0,01 ppm NO ₂ 1 h			0,01 ppm NO ₂ 2 h			0,01 ppm NO ₂ 3 h			MMS 500 µM		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	1,13	3,00	52,88	1,82	4,43	58,12	2,11	5,47	55,13	1,94	4,82	59,7	1,92	4,94	56,47	1,52	3,71	56,54	5,33	12,49	80,2	7,81	17,88	90,69	11,13	24,37	92,56
2	0,82	2,43	40,3	1,84	3,85	52,8	1,24	3,06	54,95	4,68	10,75	64,54	2,18	4,98	44,29	1,29	3,07	42,92	3,23	5,59	57,18	4,32	11,08	57,11	14,04	31,92	102,9
3	4,98	10,73	61,27	7,76	13,69	86,36	6,32	14,35	69,44	8,87	17,80	87,17	6,16	11,42	70,30	11,67	18,93	96,21	6,33	11,09	74,15	12,49	21,94	86,19	31,27	53,00	136,4
4	0,58	2,03	37,73	1,30	3,22	44,18	1,97	4,58	44,84	2,10	5,32	64,43	1,45	3,38	54,31	1,92	4,47	52,44	2,76	5,79	55,15	4,35	8,48	66,67	18,81	36,47	114,2
5	0,51	1,70	47,13	1,30	3,71	56,81	1,73	4,23	56,13	3,40	6,77	66,67	1,29	3,65	49,79	2,06	4,67	59,61	4,66	9,93	76,96	5,15	11,36	72,11	19,05	38,20	110,6
6	0,56	1,76	40,19	1,05	2,97	48,58	1,97	5,03	48,99	2,71	7,00	62,58	1,20	3,33	46,18	2,65	6,90	54,06	3,65	8,61	59,91	6,61	12,63	78,75	21,87	45,78	114,5
7	0,60	2,18	44,45	0,95	2,97	55	1,18	3,58	52,14	2,02	5,49	56,42	0,99	3,11	51,37	1,31	3,85	49,06	1,50	4,31	60,59	1,66	4,57	54,07	22,07	44,15	116,2
8	0,61	2,14	41,31	1,43	3,94	56,92	1,72	4,74	66,69	2,87	7,66	64,09	1,27	4,16	50,65	1,92	5,18	50,38	4,10	9,49	60,77	3,08	7,97	54,63	41,30	63,02	142,7
9	1,56	4,08	44,86	0,69	2,36	38,94	1,58	3,83	43,43	2,92	7,69	51,40	1,42	4,22	41,61	2,27	5,91	45,15	2,43	6,32	47,88	1,77	5,22	43,51	20,74	43,65	105,0
10	2,05	5,00	82,86	1,83	4,24	83,25	2,17	5,15	82,53	3,59	7,79	91,96	2,55	6,10	81,97	2,52	5,36	80,52	2,51	5,26	90,87	3,73	8,13	90,41	36,37	53,77	152,1
Median	0,72	2,30	44,66	1,37	3,78	55,91	1,85	4,66	55,04	2,90	7,33	64,26	1,44	4,19	51,01	1,99	4,92	53,25	3,44	7,46	60,68	4,34	9,78	69,39	21,31	43,90	114,4
Mean	1,34	3,50	49,30	2,00	4,54	58,10	2,20	5,40	57,43	3,51	8,11	66,90	2,04	4,93	54,69	2,91	6,20	58,69	3,65	7,89	66,34	5,10	10,93	69,41	23,66	43,43	118,7
SD	1,38	2,75	13,71	2,06	3,28	15,36	1,49	3,23	12,14	2,06	3,80	12,82	1,52	2,46	12,45	3,12	4,61	16,81	1,48	2,80	13,44	3,24	5,46	16,84	9,66	11,35	18,96

Tab. 6.3: Auswertung des Comet Assays; OTM = Olive Tail Moment, DT = DNA-Anteil im Schweif; TL = Schweiflänge; MMS = Methylmethansulfonat (500 µM); SD = Standardabweichung.

Versuch	synthetische Luft 0,5 h			synthetische Luft 1 h			synthetische Luft 2 h			synthetische Luft 3 h			0,01 ppm NO ₂ 0,5 h			0,01 ppm NO ₂ 1 h			0,01 ppm NO ₂ 2 h			0,01 ppm NO ₂ 3 h			MMC 600 ng/ml					
	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k	1-k	2-k	m-k			
1	787	210	3	809	188	3	893	105	2	840	156	4	801	198	1	790	210	0	814	186	0	814	186	0	785	210	5	829	166	5
2	794	205	1	808	191	1	851	147	2	818	182	0	791	206	3	829	170	1	822	178	0	822	178	0	793	205	2	773	226	1
3	804	194	2	825	172	3	845	153	2	845	152	3	830	168	2	832	165	3	865	131	4	865	131	4	799	198	3	837	160	3
4	873	126	1	874	123	3	921	79	0	872	124	4	911	88	1	861	139	0	892	107	1	892	107	1	886	113	1	884	115	1
5	839	159	2	857	140	3	840	154	6	850	150	0	890	110	0	866	133	1	843	152	5	843	152	5	850	147	3	825	173	2
6	863	137	0	818	181	1	858	142	0	835	162	3	832	166	2	790	209	1	877	122	1	877	122	1	901	98	1	828	169	3
7	800	200	0	833	166	1	792	202	6	803	194	3	816	182	2	825	174	1	785	208	7	785	208	7	780	213	7	811	186	3
8	879	120	1	885	112	3	884	113	3	930	65	5	850	148	2	880	117	3	873	125	2	873	125	2	900	98	2	882	114	4
9	743	253	4	673	322	5	650	342	8	809	190	1	801	196	3	698	294	8	694	303	3	694	303	3	828	169	3	672	321	7
10	734	262	4	807	191	2	768	231	1	707	281	12	781	213	6	830	166	4	804	192	4	804	192	4	768	229	3	810	183	7
Median	802	197	1,5	821,5	176,5	3	848	150	2	837,5	159	3	823	175	2	829,5	168	1	832,5	165	2,5	832,5	165	2,5	813,5	183,5	3	826,5	171	3
Mean	811,6	186,6	1,8	818,9	178,6	2,5	830,2	166,8	3	830,9	165,6	3,5	830,3	167,5	2,2	820,1	177,7	2,2	826,9	170,4	2,7	826,9	170,4	2,7	829	168	3	815,1	181,3	3,6
SD	51,14	50,05	1,48	58,44	57,91	1,27	77,75	75,89	2,75	56,71	55,15	3,44	42,64	41,52	1,62	52,1	50,66	2,44	58,42	57,81	2,31	58,42	57,81	2,31	51,82	50,6	1,83	60,05	59,04	2,17

Tab. 6.4.1: Auswertung des Mikrokerntests; 1-k = einkernig, 2-k = doppelkernig, m-k = mehrkernig; MMC = Mitomycin C (600 ng/ml); SD = Standardabweichung.

6.3 Abbildungsnachweis

Abbildung 2.4 a und Abbildung 2.4 b (modifiziert nach): Kleinsasser N., Koehler C., 2009. In vitro Toxizität und Genotoxizität von NO₂ an humanen Nasenschleimhautzellen in niedrigen, ubiquitär vorkommenden Konzentrationen. Report über ein Forschungsprojekt im Auftrag der Forschungsvereinigung Automobiltechnik, 21.

Eigene Abbildungen: alle Abbildungen außer Abbildung 2.4 a und Abbildung 2.4 b.

6.4 Literaturverzeichnis

- Abbey D. E., Nishino N., McDonnell W. F., Burchette R. J., Knutsen S. F., Lawrence Beeson W., Yang J. X., 1999. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 2, 373-382.
- Ackermann-Liebrich U., Leuenberger P., Schwartz J., Schindler C., Monn C., Bolognini G., Bongard J. P., Brandli O., Domenighetti G., Elsasser S., Grize L., Karrer W., Keller R., Keller-Wossidlo H., Kunzli N., Martin B. W., Medici T. C., Perruchoud A. P., Schoni M. H., Tschopp J. M., Villiger B., Wuthrich B., Zellweger J. P., Zemp E., 1997. Lung function and long term exposure to air pollutants in Switzerland. Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1, 122-129.
- Aga E., Samoli E., Touloumi G., Anderson H. R., Cadum E., Forsberg B., Goodman P., Goren A., Kotesovec F., Kriz B., Macarol-Hiti M., Medina S., Paldy A., Schindler C., Sunyer J., Tittanen P., Wojtyniak B., Zmirou D., Schwartz J., Katsouyanni K., 2003. Short-term effects of ambient particles on mortality in the elderly: results from 28 cities in the APHEA2 project. *Eur Respir J Suppl* 40, 28-33.
- Ayyagari V. N., Januszkiewicz A., Nath J., 2004. Pro-inflammatory responses of human bronchial epithelial cells to acute nitrogen dioxide exposure. *Toxicology* 197, 2, 149-164.
- Azad N., Rojanasakul Y., Vallyathan V., 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11, 1, 1-15.
- Bakand S., Winder C., Khalil C., Hayes A., 2006. An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicol Lett* 165, 1, 1-10.

- Bakand S., Winder C., Khalil C., Hayes A., 2006. A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *J Environ Monit* 8, 1, 100-105.
- Ballarin C., Sarto F., Giacomelli L., Bartolucci G. B., Clonfero E., 1992. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers. *Mutat Res* 280, 1, 1-7.
- Barth P. J., Muller B., 1999. Effects of nitrogen dioxide exposure on Clara cell proliferation and morphology. *Pathol Res Pract* 195, 7, 487-493.
- Beelen R., Hoek G., van den Brandt P. A., Goldbohm R. A., Fischer P., Schouten L. J., Jerrett M., Hughes E., Armstrong B., Brunekreef B., 2008. Long-term effects of traffic-related air pollution on mortality in a Dutch cohort (NLCS-AIR study). *Environ Health Perspect* 116, 2, 196-202.
- Blomberg A., Krishna M. T., Bocchino V., Biscione G. L., Shute J. K., Kelly F. J., Frew A. J., Holgate S. T., Sandstrom T., 1997. The inflammatory effects of 2 ppm NO₂ on the airways of healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 2 Pt 1, 418-424.
- BMU, 2009, Stickstoffoxide. http://www.bmu.de/gesundheit_und_umwelt/luftreinhaltung/stickstoffoxide/doc/print/44276.php (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Bundesregierung Deutschland, 2010. 39.Bundes-Immissionschutzverordnung. *Bundesgesetzblatt Jahrgang 2010, Teil I, Nr.40*, 1068.
- Chen G., Song G., Jiang L., Zhang Y., Zhao N., Chen B., Kan H., 2008. Short-term effects of ambient gaseous pollutants and particulate matter on daily mortality in Shanghai, China. *J Occup Health* 50, 1, 41-47.

- Chitano P., Hosselet J. J., Mapp C. E., Fabbri L. M., 1995. Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system: insights from experimental animal research. *Eur Respir J* 8, 8, 1357-1371.
- Cook P. R., Brazell I. A., Jost E., 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 22, 2, 303-324.
- Countryman P. I., Heddle J. A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41, 2-3, 321-332.
- Crowther J. R., 2001. *Methods in Molecular Biology, Vol. 149: The ELISA Guidebook*, 0-89603-728-2, 2.
- Dab W., Medina S., Quenel P., Le Moullec Y., Le Tertre A., Thelot B., Monteil C., Lameloise P., Pirard P., Momas I., Ferry R., Festy B., 1996. Short term respiratory health effects of ambient air pollution: results of the APHEA project in Paris. *J Epidemiol Community Health* 50 Suppl 1, 42-46.
- El-Zein R. A., Fenech M., Lopez M. S., Spitz M. R., Etzel C. J., 2008. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 5, 1111-1119.
- Emmendoerffer A., Hecht M., Boeker T., Mueller M., Heinrich U., 2000. Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. *Toxicol Lett* 112-113, 185-191.
- Engvall E., Perlmann P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 9, 871-874.

- EU, 2007. Verordnung (EG) Nr. 715/2007 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Juni 2007 über die Typgenehmigung von Kraftfahrzeugen hinsichtlich der Emissionen von leichten Personenkraftwagen und Nutzfahrzeugen (Euro 5 und Euro 6) und über den Zugang zu Reparatur- und Wartungsinformationen für Fahrzeuge.
- EU, 2008. Richtlinie 2008/50/EG über Luftqualität und saubere Luft für Europa. L 152/130.
- Evans H. J., Neary G. J., Williamson F. S., 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol* 1, 216-229.
- Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R. H., Mann M., Mersch-Sundermann V., 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566, 3, 209-229.
- Fehrenbach H., Zimmermann G., Starke E., Bratu V. A., Conrad D., Yildirim A. O., Fehrenbach A., 2007. Nitrogen dioxide induces apoptosis and proliferation but not emphysema in rat lungs. *Thorax* 62, 5, 438-446.
- Fenech M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 3, 101-107.
- Fenech M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455, 1-2, 81-95.
- Fenech M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600, 1-2, 58-66.

- Fenech M., Morley A. A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 161, 2, 193-198.
- Ferguson L. R., 2010. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res* 690, 1-2, 3-11.
- Filleul L., Rondeau V., Vandentorren S., Le Moual N., Cantagrel A., Annesi-Maesano I., Charpin D., Declercq C., Neukirch F., Paris C., Vervloet D., Brochard P., Tessier J. F., Kauffmann F., Baldi I., 2005. Twenty five year mortality and air pollution: results from the French PAARC survey. *Occup Environ Med* 62, 7, 453-460.
- Friedman M., 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J Am Statist Ass* 32, 675-701.
- Glauner B., 2006, Stromausschlussverfahren Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=932681, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Graw J., 2010. Genetik, 5. Auflage, 978-3-642-04998-9, 431.
- Grisham M. B., Jourdeuil D., Wink D. A., 2000. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism-implications in DNA damage and mutagenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 14 Suppl 1, 3-9.
- Hagenbjork-Gustafsson A., Forsberg B., Hestvik G., Karlsson D., Wahlberg S., Sandstrom T., 1996. Measurements of indoor and outdoor nitrogen dioxide concentrations using a diffusive sampler. *Analyst* 121, 9, 1261-1264.
- Hajat S., Haines A., Goubet S. A., Atkinson R. W., Anderson H. R., 1999. Association of air pollution with daily GP consultations for asthma and other lower respiratory conditions in London. *Thorax* 54, 7, 597-605.

- Halios C. H., Assimakopoulos V. D., Helmis C. G., Flocas H. A., 2005. Investigating cigarette-smoke indoor pollution in a controlled environment. *Sci Total Environ* 337, 1-3, 183-190.
- Harkema J. R., Carey S. A., Wagner J. G., 2006. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 34, 3, 252-269.
- Heddle J. A., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J. T., Newell G. W., Salamone M. F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 123, 1, 61-118.
- Helleday R., Huberman D., Blomberg A., Stjernberg N., Sandstrom T., 1995. Nitrogen dioxide exposure impairs the frequency of the mucociliary activity in healthy subjects. *Eur Respir J* 8, 10, 1664-1668.
- Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie, 2008, Umweltatlas Hessen, Luft: Immisionskataster, Stickstoffdioxid Stoffeigenschaften. http://atlas.umwelt.hessen.de/servlet/Frame/atlas/luft/ik/qualitaet/no2/no2_txt.htm, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Hirst D. G., Robson T., 2007. Nitrosative stress in cancer therapy. *Front Biosci* 12, 3406-3418.
- Ichinose T., Fujii K., Sagai M., 1991. Experimental studies on tumor promotion by nitrogen dioxide. *Toxicology* 67, 2, 211-225.
- Isomura K., Chikahira M., Teranishi K., Hamada K., 1984. Induction of mutations and chromosome aberrations in lung cells following in vivo exposure of rats to nitrogen oxides. *Mutat Res* 136, 2, 119-125.

- Jorres 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, 3, 416-424.
- Khalil M., Shariat-Panahi A., Tootle R., Ryder T., McCloskey P., Roberts E., Hodgson H., Selden C., 2001. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J Hepatol* 34, 1, 68-77.
- Kienast K., Knorst M., Riechelmann H., Schellenberg J., Muller-Quernheim J., Ferlinz R., 1993. In vitro studies of the beat frequency of ciliary cell cultures after short-term exposure to SO₂ and NO₂. *Med Klin (Munich)* 88, 9, 520-524.
- Kim P. K., Zamora R., Petrosko P., Billiar T. R., 2001. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 1, 8, 1421-1441.
- Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrom G., 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363, 2, 89-96.
- Kleinsasser N. H., Juchhoff J., Wallner B. C., Bergner A., Harreus U. A., Gamarra F., Buhrlen M., Huber R. M., Rettenmeier A. W., 2004. The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 561, 1-2, 63-73.
- Knasmueller S., Holland N., Wultsch G., Jandl B., Burgaz S., Misik M., Nersesyan A., 2011. Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies. *Mutagenesis* 26, 1, 231-238.
- Koehler C., Ginzkey C., Friehs G., Hackenberg S., Froelich K., Scherzed A., Burghartz M., Kessler M., Kleinsasser N., 2010. Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 2, 219-225.

- Koehler C., Ginzkey C., Friehs G., Hackenberg S., Froelich K., Scherzed A., Burghartz M., Kessler M., Kleinsasser N., 2011. Ex vivo toxicity of nitrogen dioxide in human nasal epithelium at the WHO defined 1-h limit value. *Toxicol Lett* 207, 1, 89-95.
- Kraft M., Eikmann T., Kappos A., Kunzli N., Rapp R., Schneider K., Seitz H., Voss J. U., Wichmann H. E., 2005. The German view: effects of nitrogen dioxide on human health--derivation of health-related short-term and long-term values. *Int J Hyg Environ Health* 208, 4, 305-318.
- Kubota K., Murakami M., Takenaka S., Kawai K., Kyono H., 1987. Effects of long-term nitrogen dioxide exposure on rat lung: morphological observations. *Environ Health Perspect* 73, 157-169.
- Lang F., Lang P., 2007. *Basiswissen Physiologie*, 2.Auflage, 978-3-540-71401-9, 16.
- Linn W. S., Szlachcic Y., Gong H., Jr., Kinney P. L., Berhane K. T., 2000. Air pollution and daily hospital admissions in metropolitan Los Angeles. *Environ Health Perspect* 108, 5, 427-434.
- Magnussen H., Nowak D., Jorres R., 1994. Experimental effects of air pollutants on healthy probands and asthmatic patients. *Pneumologie* 48, 2, 85-88.
- Merck, 2012, Acridine Orange. http://www.emdmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-US-Site/en_CA/-/USD/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=SGCb.s1L_.sAAEWWhmEfVhTm&ProductUUID=fsCb.s1OZxQAAAEiAmxRV196&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LAYMAAAEWzdUfVhT, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Merkle H. P., Ditzinger G., Lang S. R., Peter H., Schmidt M. C., 1998. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 29, 1-2, 51-79.

- Nafstad P., Haheim L. L., Oftedal B., Gram F., Holme I., Hjermann I., Leren P., 2003. Lung cancer and air pollution: a 27 year follow up of 16 209 Norwegian men. *Thorax* 58, 12, 1071-1076.
- Nafstad P., Haheim L. L., Wisloff T., Gram F., Oftedal B., Holme I., Hjermann I., Leren P., 2004. Urban air pollution and mortality in a cohort of Norwegian men. *Environ Health Perspect* 112, 5, 610-615.
- Ohyama K., Ito T., Kanisawa M., 1999. The roles of diesel exhaust particle extracts and the promotive effects of NO₂ and/or SO₂ exposure on rat lung tumorigenesis. *Cancer Lett* 139, 2, 189-197.
- Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E., 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122, 1, 86-94.
- Østling O., Johanson K. J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 1, 291-298.
- Papi A., Amadesi S., Chitano P., Boschetto P., Ciaccia A., Geppetti P., Fabbri L. M., Mapp C. E., 1999. Bronchopulmonary inflammation and airway smooth muscle hyperresponsiveness induced by nitrogen dioxide in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 374, 2, 241-247.
- Pathmanathan S., Krishna M. T., Blomberg A., Helleday R., Kelly F. J., Sandstrom T., Holgate S. T., Wilson S. J., Frew A. J., 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, 11, 892-896.

- Pedersen M., Wichmann J., Autrup H., Dang D. A., Decordier I., Hvidberg M., Bossi R., Jakobsen J., Loft S., Knudsen L. E., 2009. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. *Environ Res* 109, 8, 1012-1020.
- Pope C. A., 3rd, Burnett R. T., Thun M. J., Calle E. E., Krewski D., Ito K., Thurston G. D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 9, 1132-1141.
- Porter A. G., Janicke R. U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 2, 99-104.
- Reichhold S., Neubauer O., Hoelzl C., Stadlmayr B., Valentini J., Ferk F., Kundi M., Knasmuller S., Wagner K. H., 2009. DNA damage in response to an Ironman triathlon. *Free Radic Res* 43, 8, 753-760.
- Richters A., 1981. Facilitation of cancer metastases by an air pollutant. *J Surg Oncol* 17, 2, 159-162.
- Rijnders E., Janssen N. A., van Vliet P. H., Brunekreef B., 2001. Personal and outdoor nitrogen dioxide concentrations in relation to degree of urbanization and traffic density. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 3, 411-417.
- Roguet R., 1997. In *Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Castell, J. V. Gomez-Lechon, M. J., 0-12-163390-X, 215.
- Rosenlund M., Forastiere F., Porta D., De Sario M., Badaloni C., Perucci C. A., 2009. Traffic-related air pollution in relation to respiratory symptoms, allergic sensitisation and lung function in schoolchildren. *Thorax* 64, 7, 573-580.
- Rutkowski R., Pancewicz S. A., Rutkowski K., Rutkowska J., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski* 23, 134, 131-136.

- Sakahira H., Enari M., Nagata S., 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 6662, 96-99.
- Samet J. M., Dominici F., Curriero F. C., Coursac I., Zeger S. L., 2000. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med* 343, 24, 1742-1749.
- Sandstrom T., Helleday R., Bjermer L., Stjernberg N., 1992 a. Effects of repeated exposure to 4 ppm nitrogen dioxide on bronchoalveolar lymphocyte subsets and macrophages in healthy men. *Eur Respir J* 5, 9, 1092-1096.
- Sandstrom T., Ledin M. C., Thomasson L., Helleday R., Stjernberg N., 1992 b. Reductions in lymphocyte subpopulations after repeated exposure to 1.5 ppm nitrogen dioxide. *Br J Ind Med* 49, 12, 850-854.
- Sarkar A., 2009. *Stem Cell Culture*, 978-81-8356-400-7, 185.
- Schierhorn K., Zhang M., Matthias C., Kunkel G., 1999. Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 5, 1013-1019.
- Schwartz J., 1989. Lung function and chronic exposure to air pollution: a cross-sectional analysis of NHANES II. *Environ Res* 50, 2, 309-321.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 1, 184-191.
- Smith S. M., Stuhmiller J. H., Januszkiewicz A. J., 1996. Evaluation of lethality estimates for combustion gases in military scenarios. *Toxicology* 115, 1-3, 157-165.

- Stopper H., 2010. Toxikologie, Band 1: Grundlagen der Toxikologie, Vohr H.-W. 978-3-527-32319-7, 151-152.
- Strand V., Salomonsson P., Lundahl J., Bylin G., 1996. Immediate and delayed effects of nitrogen dioxide exposure at an ambient level on bronchial responsiveness to histamine in subjects with asthma. *Eur Respir J* 9, 4, 733-740.
- Szabo C., Ohshima H., 1997. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1, 5, 373-385.
- Szirmai S., Berces J., Koteles G. J., 1993. Computerized image analysis for determining micronucleus frequency. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 3, 57-60.
- Thannickal V. J., Fanburg B. L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, 6, L1005-1028.
- Thomas D. D., Ridnour L. A., Isenberg J. S., Flores-Santana W., Switzer C. H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolucci N., Ambs S., Colton C. A., Harris C. C., Roberts D. D., Wink D. A., 2008. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45, 1, 18-31.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 3, 206-221.
- Tice R. R., Strauss G. H., 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13 Suppl 1, 207-214.
- Tukey J. W., 1977. *Exploratory Data Analysis*, 0-201-07616-0, 27-56.

- Tunnicliffe W. S., Burge P. S., Ayres J. G., 1994. Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet* 344, 8939-8940, 1733-1736.
- Umweltbundesamt, 2009, Entwicklung der Luftqualität in Deutschland. <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3760.pdf>, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Umweltbundesamt, 2011 a, Fragen und Antworten zum Thema Stickstoffoxide. http://www.umweltbundesamt.de/luft/schadstoffe/downloads/faq_nox.pdf, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Umweltbundesamt, 2011 b, Luftbelastungssituation 2010 -vorläufige Auswertung-. <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/4063.pdf>, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Umweltbundesamt Österreich, 2009, Anwendungsbereiche molekularbiologischer Analytik, Narendja F., 14-15.
- Victorin K., Busk L., Cederberg H., Magnusson J., 1990. Genotoxic activity of 1,3-butadiene and nitrogen dioxide and their photochemical reaction products in *Drosophila* and in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat Res* 228, 2, 203-209.
- Villarini M., Moretti M., Fatigoni C., Agea E., Dominici L., Mattioli A., Volpi R., Pasquini R., 2008. Evaluation of primary DNA damage, cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms for CYP1A1 and GSTM1 in road tunnel construction workers. *J Toxicol Environ Health A* 71, 21, 1430-1439.
- Wallner B. C., Harreus U. A., Gamarra F., Sassen A., Kleinsasser N. H., 2005. Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations] *HNO* 53, 12, 1037-1046.

- WHO, 2006, WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide, Global update 2005, Summary of risk assessment. http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf, (letzter Zugriff: 01.11.2012).
- Wilcoxon F., 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biomet Bull* 1, 6, 80-83.
- Witschi H., 1988. Ozone, nitrogen dioxide and lung cancer: a review of some recent issues and problems. *Toxicology* 48, 1, 1-20.
- Wolz L., Krause G., Scherer G., Aufderheide M., Mohr U., 2002. In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food Chem Toxicol* 40, 6, 845-850.
- Yuan Z., Schellekens H., Warner L., Janssen-Heininger Y., Burch P., Heintz N. H., 2003. Reactive nitrogen species block cell cycle re-entry through sustained production of hydrogen peroxide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 6, 705-712.

6.5 Kongressbeiträge und Publikation

Kongressbeiträge:

Thielen S., Koehler C., Hackenberg S., Kleinsasser N. Toxizität von NO₂ bei der ubiquitär vorkommenden Konzentration von 0,01 ppm. 82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Freiburg i. Br., 2011.

Koehler C., Thielen S., Kessler M., Kleinsasser N. Toxizität von Stickstoffdioxid in realistischer Umweltkonzentration in humaner nasaler Schleimhaut. 56. Österreichischer HNO-Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, St. Pölten, 2012.

Publikation:

Koehler C., Thielen S., Ginzkey C., Hackenberg S., Scherzed A., Burghartz M., Paulus M., Hagen R., Kleinsasser N. H., 2013. Nitrogen dioxide is genotoxic in urban concentrations. *Inhal Toxicol* 25, 6, 341-347.

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für die Möglichkeit, in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde experimentell arbeiten zu können.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA danke ich für eine vielseitige und interessante Themenstellung, seine Motivation und die stetige Betreuung und Förderung meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. med. Christian Köhler möchte ich mich für die intensive Betreuung dieser Arbeit und seiner zuverlässigen Hilfe und Unterstützung bei Fragen und Problemen bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Gudrun Friehs danke ich für die dauerhafte Ansprechbarkeit bezüglich inhaltlicher und labortechnischer Fragen zu meiner Doktorarbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei dem Laborteam um Frau Petra Joa und insbesondere bei Herrn Michael Kessler bedanken, der mir bei labortechnischen Fragen kollegial zur Seite stand.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich währenddessen immer unterstützten.