

# Gentoxizität und Zytotoxizität in humanen bronchialen Zellen (A-549) nach Exposition von ausgewählten flüchtigen organischen Verbindungen (VOC)

---

Sascha Lauenroth

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Gentoxizität und Zytotoxizität in humanen  
bronchialen Zellen (A-549) nach Exposition  
von ausgewählten flüchtigen organischen  
Verbindungen (VOC)

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Sascha Lauenroth (geb. Hüttner)**

aus Oberwesel

Gießen 2013



Aus dem Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie  
des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Volker Mersch-Sundermann

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. Volker Mersch-Sundermann
2. Gutachter: Prof. Dr. Saverio Bellusci

Tag der Disputation: 03. Juni 2014

*Meinen Eltern gewidmet*

*Wenn man auf ein Ziel zugeht, ist es äußerst wichtig, auf den Weg zu achten.*

*Denn der Weg lehrt uns am besten, ans Ziel zu gelangen, und er bereichert uns, während wir ihn zurück legen.*

*(Paulo Coelho)*

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. Volker Mersch-Sundermann für die Überlassung des interessanten Themas, die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen, Geduld und natürlich die Bereitstellung aller für die Experimente erforderlichen Mittel.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. Richard Gminski und Frau Dr. biol. hom. Evelyn Lamy für die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit. Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Richard Gminski bedanken.

Ein Dank gilt meiner Kollegin Karla Sabisch für die Schaffung einer warmen und motivierenden Atmosphäre während langer Labortage. Die gemeinsame Zeit war sehr lehrreich für mich.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. Simone Burger für die stilistischen und orthografischen Korrekturvorschläge, für die große und freundliche Hilfsbereitschaft und ihren unglaublichen Optimismus. Die interessante Zeit mit lebhaften Diskussionen in freundschaftlicher Atmosphäre möchte ich nicht missen.

Dank auch an meinen Lebenspartner Marco Lauenroth der mich während der arbeitsreichen Zeit der Ausfertigung dieser Arbeit jederzeit unterstützt und motiviert hat.

Der größte Dank gebührt allerdings meinen Eltern, Hugo und Renate Hüttner, die mir das Medizinstudium und somit auch die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben. Sie haben in vielfältiger Weise, insbesondere durch Ihre Geduld und Ermutigungen zum Gelingen wesentlich beigetragen.

Zum Schluss sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der abgegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, Juni 2013

---

Sascha Lauenroth

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1. EINLEITUNG 1

1.1 Allgemeines	1
1.2 Holz- und Holzwerkstoffe als VOC-Emissionsquelle	4
1.3 Terpene als Bestandteil der VOC-Emissionen aus Holz- und Holzwerkstoffen	7
1.4 Gesundheitliche Aspekte	9
1.5 Ziel der Arbeit	12

## 2. MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 Materialien	13
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.1.1 Benzo[a]pyren: Referenz-und Positivkontrolle	14
2.1.1.2 DMSO (Dimethylsulfoxid)	15
2.1.1.3 Terpene	16
2.1.2 Lösungen	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte	22
2.1.3.1 Software	23
2.1.3.2 Die humane Lungenkarzinom Zelllinie A-549	24
2.2 Methoden	26
2.2.1 Kultivierung und Behandlungsmethoden der Zellkulturen	26
2.2.2 Alkalische Einzelzellelektrophorese (Cometassay)	28
2.2.2.1 Grundlagen der Methode	28
2.2.2.2 Durchführung	32

## 3. ERGEBNISSE 36

3.1 Zytotoxische und gentoxische Effekte nach Exposition gegenüber Benzo[a]pyren	37
--	----

3.2	Zytotoxische und gentoxische Effekte nach Exposition gegenüber Limonen	39
3.3	Zytotoxische und gentoxische Effekte nach Exposition gegenüber $\delta$ -3-Caren	41
3.4	Zytotoxische und gentoxische Effekte nach Exposition gegenüber $\alpha$ -Pinen	43
3.5	Zytotoxische und gentoxische Effekte nach Exposition gegenüber $\beta$ -Pinen	45

#### **4. DISKUSSION 47**

4.1	Risikobewertung von ausgewählten Terpenen als VOC-Emission aus Holz- und Holzwerkstoffen	47
4.2	Vergleich der vorliegenden Studie im Kontext vorhandener Literatur	49
4.3	Ist das verwendete Testmodell als Risikobewertung der ausgewählten Terpene ausreichend?	53
4.4	Gesundheitliche Einschätzung der VOC-Emissionen	54

#### **5. ZUSAMMENFASSUNG 56**

#### **6. SUMMARY 57**

#### **7. LITERATURANGABEN 58**

#### **8. ANHANG 71**

8.1	Rohdaten zu Benzo[a]pyren	71
8.2	Rohdaten zu Limonen	72
8.3	Rohdaten zu $\delta$ -3-Caren	73
8.4	Rohdaten zu $\alpha$ -Pinen	74
8.5	Rohdaten zu $\beta$ -Pinen	75

**Danksagung I**

**Erklärung II**

**Inhaltsverzeichnis III**

**Abbildungsverzeichnis VI**

**Tabellenverzeichnis VII**

**Abkürzungsverzeichnis****VIII**

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: OSB-Platte	4
Abbildung 2: Geruch- und Geschmacksinn	11
Abbildung 3: Benzo[a]pyren	14
Abbildung 4: DMSO (Dimethylsulfoxid)	16
Abbildung 5: A-549 Zelllinie / Lungenepithelzellen	24
Abbildung 6: Kometen in A-549 Zellen	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Durchführung des Cometassays	35
Abbildung 8: OTM nach Exposition von A549 Zellen gegenüber 25-500 $\mu\text{mol/L}$ B[a]P	38
Abbildung 9: OTM nach Exposition von A549 Zellen gegenüber 7,75-20,67 $\mu\text{mol/L}$ Limonen.	40
Abbildung 10: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,93-21,13 $\mu\text{mol/L}$ $\delta$ -3-Caren.	42
Abbildung 11: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,86-20,97 $\mu\text{mol/L}$ $\alpha$ -Pinen.	44
Abbildung 12: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,95-21,20 $\mu\text{mol/L}$ $\beta$ -Pinen.	46

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klassifizierung flüchtiger organischer Innenraumluftschadstoffe	6
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	13
Tabelle 3: ausgewählte Terpene aus GESTIS-Stoffdatenbank des IFA	17
Tabelle 4: Lösungen und deren Zusammensetzung	21
Tabelle 5: Verwendete Geräte	23
Tabelle 6: Untersuchungen mit der Zelllinie A-549	25
Tabelle 7: Chromosomenschäden, die im Cometassay nachgewiesen werden können	29
Tabelle 8: OTM-Mittelwerte für B[a]p	37
Tabelle 9: OTM-Mittelwerte für Limonen	39
Tabelle 10: OTM-Mittelwerte für $\delta$ -3-Caren	41
Tabelle 11: OTM-Mittelwerte für $\alpha$ -Pinen	43
Tabelle 12: OTM-Mittelwerte für $\beta$ -Pinen	45

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AgBB	Ausschuss zur gesundheitlichen Bewertung von Bauprodukten
B[a]P	Benzo[a]pyren
BGA	Bundesgesundheitsamt
BIKAS	Biologisches Kammeremissions- und Expositionssystem
BRI	Building-Related-Illness
CB	Carbon black
CMR-Stoff	Stoff mit cancerogener (krebserzeugender), mutagener (erbgutverändernder) oder reproduktionstoxischer (fruchtschädigender) Wirkung
CO <sup>2</sup>	Kohlenstoffdioxid
DIBt	Deutsches Institut für Bautechnik
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMEM	Dulbecco´s minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECA	European Collaborative Action
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Environmental Protection Agency
FKS	fötales Kälberserum
GC-MS/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GESTIS	Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
GIRL	Europäische Geruchsmissionsrichtlinie
HCL	Wasserstoffchlorid
IPP	Isopentenylpyrophosphat
LMP	Low melting point
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level

MMS	Methylmethansulfonat
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBA	Nitrobenzanthrone
NIK-Wert	niedrigste (toxikologisch) interessierende Konzentration
NMP	Normal melting point
NO	Stickoxid
OCIA	Organic Compound in Indoor Air
OSB	oriented strand (bzw. structural) board
OTM	Olive tail moment
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwas- serstoffe
PBS	Phosphate buffered saline
RW	Richtwert
SBS	Sick-Building-Syndrome
SCE	sister-chromatid exchange
UPM	Urban particulate matter
VOC	volatile organic compound
WHO	World Health Organization

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Allgemeines

Innenräume sind definiert als Wohnungen mit Wohn-, Schlaf-, Bastel-, Sport- und Kellerräumen, Küchen und Badezimmern; Arbeitsräume in Gebäuden, die nicht im Hinblick auf Luftschadstoffe arbeitsrechtlichen Kontrollen unterliegen (zum Beispiel Büro- und Verkehrsräume); öffentliche Gebäude (Krankenhäuser, Schulen, Kindergärten, Sporthallen, Bibliotheken, Gaststätten, Theater, Kinos und andere Veranstaltungsräume) sowie die Aufenthaltsräume in Kraftfahrzeugen und allen öffentlichen Verkehrsmitteln (VDI 1995).

In der medizinischen Forschung und in der Öffentlichkeit gewinnt die Qualität der Innenraumluft zunehmend an Bedeutung. Dafür gibt es hauptsächlich folgende Gründe:

- Den weitaus größten Teil seiner Zeit, ca. 90 %, verbringt der Mensch in den Industrienationen in Innenräumen (Krause und Schulz, 1998; Mersch-Sundermann und Scholz, 2001).
- Durch den zunehmenden Einsatz von Haushalts- und Hobbyprodukten, beispielsweise Reinigungsmittel und Raumluftsprays, aber auch Tabakkonsum und neuartige Baustoffe sowie Renovierungsmaterialien, ist der Mensch zunehmenden Emissionsquellen ausgesetzt.
- Infolge umfassender Energie- und Wärmeschutzmaßnahmen beim Bau von Häusern und Wohnungen mittels „Abdichtung“ des Wohnraumes gewinnt diese Problematik immer mehr an Bedeutung. Verfügbare Gebäude bzw. Räume älterer Bauart über Luftwechselraten von  $>1\text{h}^{-1}$  (d.h. das gesamte Luftvolumen im Innenraum wurde pro Stunde einmal ausgetauscht), betragen die Luftwechselraten in modernen Gebäuden oftmals nur noch zwischen 0,1 und  $0,2\text{h}^{-1}$  (und damit einem Luftaustausch von nur noch  $1/10$  bzw.  $1/5$  des Raumvolumens). Bei einer angenommenen geringer belasteten Außenluft, führt eine höhere Luftwechselrate zu einer stärkeren Verdünnung der Innenraumluft (Brown, 1999). Im Rahmen einer Analyse von insgesamt 20 Feldstudien haben Seppänen et al. (1999) einen signifikanten Einfluss der Lüftungsrate auf das Wohlbefinden feststellen können. Demnach führen geringere Lüf-

tungsraten zu einer signifikanten Verschlechterung der empfundenen Luftqualität (perceived air quality). Höhere Lüftungsraten haben eine als deutlich angenehmer wahrgenommene Innenraumluftqualität zur Folge (Seppänen et al., 1999). Auch Wargocki et al. (2002) sind bei einem Vergleich von insgesamt 105 wissenschaftlichen Publikationen zu einem ähnlichen Ergebnis gekommen. Hieraus ist ein deutlicher Zusammenhang von Belüftung, Wohlbefinden (wahrgenommene Luftqualität) und Gesundheit (unter anderem Sick-Building-Syndrom, Reizungen, Infektionen, Asthma sowie kürzere Krankmeldungen) zu erkennen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen zu niedrigen Luftwechselraten ( $< 0,5 \text{ h}^{-1}$ ) und allergischen Symptomen bei schwedischen Kindern konnten auch Bornehag et al. (2005) nachweisen (Makowski, 2007).

In mehreren Studien zeigte sich, dass die erforderlichen Belüftungsraten für eine hygienisch unbedenkliche Raumluftqualität in 50 % bis 60 % der untersuchten Gebäude nicht mehr erreicht wurden (Münzenberg, 2004; ECA, 1997; Bornehag et al., 2005) (Projektbeschreibung BIKAS).

Diese Umstände haben zu einem Anstieg der Konzentrationen besonders flüchtiger organischer Verbindungen (volatile organic compound; VOC) in den letzten Jahren in der Innenraumluft geführt. Unter dem Begriff VOC werden eine Vielzahl von flüchtigen organischen Verbindungen gezählt, unter anderem aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Terpene, Aldehyde, Alkohole, Ketone und Ester. Nach Schlei-binger et al. (2001) können vor allem Aldehyde in höheren Konzentrationen in der Innenraumluft gemessen werden. Die Konzentrationen der gemessenen VOCs können weit über denen der Außenluft liegen (Bloemen und Burn, 1993; Saarela et al., 2000).

Emissionen leichtflüchtiger organischer Verbindungen in der Innenraumluft wurden in den letzten Jahren zunehmend mit gesundheitlichen Beschwerden in Zusammenhang gebracht.

Darüber hinaus zeigte sich in einer Studie, dass Neubauten bis zu zweimal höhere Konzentrationen der VOCs aufwiesen als ältere Gebäude, wobei eine mittlere Konzentration von  $170 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Raumluft nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Quelle für Aldehydemissionen stellen beispielsweise Schränke dar, die mit ihren ver-

schiedenen Ausgangsmaterialien Emissionen an die Raumluft abgeben (Hodgson et al., 2002).

Die Innenraumbelastung, welche durch organische Stoffe hervorgerufen wird, lässt sich mit dem sogenannten OCIA-Konzept (Organic Compound in Indoor Air) beschreiben (Wolkoff, 2003). Hierbei werden unter anderem alle biologisch relevanten organische Verbindungen und organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 500-1000 Dalton und oberflächenaktive Stoffe, die partikelgebunden auftreten, berücksichtigt. Auch intermediäre Verbindungen, wie z.B. Radikale und ionische Verbindungen werden hierbei einbezogen. Die Verbindungen können aus der Außenluft stammen oder durch menschliche Aktivität im Innenraum erzeugt werden (durch Laserdrucker, Fotokopierer). Manche Substanzen können mit sich selbst oder mit anderen Verbindungen reagieren und dabei neue Produkte bilden, welche dann unter Umständen reaktiver sind als ihre Vorläufersubstanzen (Weschler und Schields, 1997). Ein Beispiel hierfür ist die Gasphasenreaktion von Terpenen mit Ozon. Über Ozonoide und Biradikale führt die Reaktion zu Carbonylverbindungen unter der Bildung von OH-radikalen. Aus Terpenen können zum Beispiel eine Reihe verschiedener gas- und aerosolförmiger Oxidationsprodukte entstehen, z.B. Carboxylsäuren, Aldehyde, Ketone sowie diverse Kombinationen daraus (Docherty et al., 2005; Glasius et al., 2000).

Als eine wichtige Quelle von VOC-Emissionen werden vor allem großflächige Baumaterialien (z.B. Bodenbeläge) und Einrichtungsgegenstände (Holzprodukte) benannt. Es ist mittlerweile bekannt, dass Kiefernholz und Grobspanplatten, auch OSB-Platten (für englisch: oriented strand (bzw. structural) board – Platte aus ausgerichteten Spänen) eine hohe Anzahl an Terpenen und Aldehyden an die Innenraumluft abgeben (Brown, 1999; Makowski und Ohlmeyer, 2005; Makowski et al., 2005; Kim et al., 2006). VOC verursachen in Konzentrationen von wenigen  $\text{mg}/\text{m}^3$  lokale Irritationen von Augen, Nase und Rachen, Austrocknen von Haut und Schleimhaut, Rötung der Haut sowie neurologische Symptome wie Müdigkeit und Kopfschmerzen (Baumann et al., 2000; Jensen et al., 2001).



**Abbildung 1: OSB-Platte**

(für englisch: oriented strand bzw. structural board) – Platte aus ausgerichteten Spänen

Terpene und Aldehyde werden zu den wichtigsten Raumlufverunreinigungen gezählt. Daher sind vor allem Holz- und Holzprodukte von den Anstrengungen zur Verbesserung der Innenraumlufqualität betroffen. Besondere Beachtung gilt hierbei den plattenförmigen Holzwerkstoffen, wie zum Beispiel OSB, welche ausgesprochen vielseitig im Innenraum verwendet werden, unter anderem als Boden-, Wand- oder Deckenaufbauten. Hinzu kommt, dass in Europa überwiegend extraktstoffreiches Fichten- oder Kiefernholz als Rohstoff für ihre Herstellung eingesetzt wird, was somit vermehrte VOC-Emissionen mit sich führt (Makowski, 2007).

## **1.2 Holz- und Holzwerkstoffe als VOC-Emissionsquelle**

Ein entscheidender Einfluss auf Höhe und Zusammensetzung der VOC-Emissionen geht von der Holzart bzw. dem Extraktstoffgehalt aus. So weisen insbesondere Nadelhölzer oft recht hohe Konzentrationen an verschiedenen Terpenen auf. Daneben verändert sich das Emissionsbild der Holzwerkstoffe: die Terpenemissionen sinken, gleichzeitig steigt die Anzahl und Konzentration reaktiv gebildeter Verbindungen an. (Makowski, 2007).

VOC-Emissionen aus Holzprodukten treten nicht nur in der Nutzungsphase auf. Auch während der Be- und Verarbeitung, vor allem infolge erhöhter Temperaturen bei der

Holztrocknung oder dem Heißpressvorgang lassen sie sich nachweisen. Infolgedessen ist zwischen Produkt- und Prozessemissionen zu unterscheiden.

Sogenannte Produktemissionen bestehen häufig aus Kohlenwasserstoffen, Alkoholen und organischen Säuren. Zusammensetzung und Höhe der Emissionen sind von verschiedenen Faktoren abhängig vor allem von der Holzart oder der Art des Trocknungsprozesses. (Englund und Nussbaum, 2000; McDonald et al., 1999a; 1999b; 2002; 2004; Shmulsky, 2000a–c; Shmulsky und Ingram, 2000). VOCs werden naturgemäß auch bei anderen thermischen Bearbeitungsschritten emittiert, zum Beispiel bei der Heißpressung von Holzwerkstoffen. Die genauen Eigenschaften der Emissionen hängen unter anderem ab von der Holzart, der Mattengröße oder den eingesetzten Bindemitteltypen (Jiang et al., 2002; Wang et al., 1999; 2002; 2003; Wang und Gardner; 1999).

Neben den Hauptbestandteilen des Holzes wie Lignin, Cellulose und Hemicellulosen, gibt es eine Vielzahl frei vorliegender Stoffe. Zu diesen so genannten akzessorischen Bestandteilen zählen zum Beispiel Monoterpene (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>-Strukturen, bestehend aus zwei Isopren-Einheiten) des Nadelholzes, aus denen sich das flüchtige Terpentinöl zusammensetzt (Fengel und Wegener, 1989). Hierbei handelt es sich um mono-, bi-, tri- und acyclische Verbindungen mit einer, zwei oder drei Doppelbindungen. Bezogen auf das Trockengewicht des Holzes schwankt der Terpengehalt von *Pinus sylvestris* L. (Kiefernholz) zwischen 0,4 % und 0,5 % im Splint bzw. 0,8 % und 1,1 % im Kern. Fichtenholz (*Picea abies*) dagegen enthält lediglich 0,02 % bis 0,08 % (Englund und Nussbaum 2000). Die bedeutendsten Monoterpene des Holzes sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen, Limonen,  $\delta$ -3-Caren, Myrcen sowie  $\beta$ -Phellandren (Englund und Nussbaum, 2000).

Produktemissionen werden zu den chemischen Luftverunreinigungen gezählt, die sich in anorganische Gase und luftgetragene organische Verbindungen unterteilen lassen. Die luftgetragenen organischen Verbindungen lassen sich gemäß der WHO (1989) nach ihren Siedepunkten bzw. der davon abhängigen Flüchtigkeit gliedern (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Klassifizierung flüchtiger organischer Innenraumlufschadstoffe (WHO 1989)**

Beschreibung	Siedebereich (°C)	Sammelmedium
VVOC (leichtflüchtige organische Verbindungen)	<0 bis 50-100	Aktivkohle
VOC (flüchtige organische Verbindungen)	50–100 bis 240-260	Tenax, graphisierter Kohlenstoff oder Aktivkohle
SVOC (schwerflüchtige organische Verbindungen)	240–260 bis 380-400	Polyurethanschaum oder XAD – 2
POM (partikuläre organische Substanz)	>380	Sammlung auf Filtern

Nadelhölzer weisen in der Regel hohe Emissionen auf, die vor allem aus Terpenen bestehen. Mit der Verarbeitung des Vollholzes sinken die Terpenemissionen, zugleich steigt die Anzahl und Konzentration reaktiv gebildeter Verbindungen. Es zeigt sich hierbei, dass Holzwerkstoffe deutlich mehr Aldehyde freisetzen als das Vollholz (Risholm und Sundmann, 2002). Im Fall von Kiefernholz sinkt der Terpenanteil von 70 % der Emissionen bei Vollholz auf bis zu 10 % bei thermobehandeltem Holz. Der Anteil freigesetzter Aldehyde, Alkohole und Ketone steigt jedoch an (Broege, 2001; Tobisch et al., 2005).

Für die meisten VOC–Emissionen, sowohl spezifisch als auch produktspezifisch, gibt es noch keine gesetzlichen Grenz- und Richtwerte. Dies ist vor allem durch die schwierige und aufwendige Bewertung von Studien bedingt, da es sich bei der Innenraumluft um ein komplexes Gemisch diverser Verbindungen handelt.

Zulassungspflichtige und innenraumrelevante Bauprodukte müssen in Deutschland heute den Anforderungen des Ausschusses zur gesundheitlichen Bewertung von Bauprodukten (AgBB) genügen (AgBB 2005). Die Bewertung der Einzelstoffe erfolgt auf Grundlage der Emissionen von VOCs und SVOCs und dient dem Deutschen Institut für Bautechnik (DIBt) als Grundlage für Bautechnische Zulassungen.

Für die meisten der holz- bzw. holzwerkstofftypischen VOC – Emissionen wurden bisher keine oder aber nur sehr unzureichende Studien über die biologische Wirksamkeit durchgeführt. Dies ist jedoch für eine genaue Risikobewertung, bezogen auf die schädigende Wirkung dieser Stoffe und Stoffgemische bzw. zur Ableitung von Sicherheitsabständen dringend erforderlich.

Darüber hinaus ergibt sich das Problem bei Holzwerkstoffen, wie z.B. OSB, welche die Anforderungen des AgBB – Schemas zurzeit nicht erfüllen, die Grundsatzfrage, ob von einem Naturprodukt wie Holz gesundheitsschädliche Emissionen ausgehen können.

### **1.3 Terpene als Bestandteil der VOC-Emissionen aus Holz- und Holzwerkstoffen**

In dieser Arbeit soll besonders auf die Terpene (Limonen,  $\delta$ -3-Caren,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen) als wichtiger Bestandteil der VOC-Emissionen eingegangen werden, wobei die Quellen für eine Terpen-Exposition des Menschen vielfältig sind. Nicht nur Holz- und Holzprodukte stellen eine Emissionsquelle dar. Technisch wird zum Beispiel  $\alpha$ -Pinen in ätherischen Ölen, als Duftstoff, in Putz- und Reinigungsmitteln sowie als Lösemittel (Terpentinöl) in Lacken und Klebern eingesetzt. Zudem ist  $\alpha$ -Pinen in Arzneimitteln zur inhalativen und systemischen Behandlung von Erkältungskrankheiten sowie mit lokaler und systemischer Applikation bei Muskelbeschwerden und Verdauungsstörungen im Handel (Mersch-Sundermann, 2007).

Vermutlich wegen der häufigeren Verwendung von Weichhölzern (vor allem Kiefer und Fichte) sowie sogenannter Biolacke und terpenhaltiger Kleber ist in den 1990er Jahren eine deutliche Zunahme der Konzentration bicyclischer Terpene in der Innenraumluft zu verzeichnen (Sagunski und Heinzow, 2003). Demnach hat die Konzentration von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen sowie  $\delta$ -3-Caren in der Innenraumluft innerhalb eines Jahrzehnts deutlich zugenommen. Andere Untersuchungen in Deutschland bestätigen diesen Trend (Scholz und Santl, 1999; Ullrich et al., 1999; Scheiblinger et al., 2001; Schreiner et al., 2001). Die mittlere Konzentration von  $\alpha$ -Pinen in der Innenraumluft liegt zwischen  $7\text{--}44\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  und  $4\text{--}17\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  für  $\delta$ -3-Caren (Lux et al. 2001). In neu renovierten Gebäuden können maximale Werte für  $\alpha$ -Pinen von  $100\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  erreicht werden (Hodgsen et al., 2000; Wolkoff et al., 2000; Lux et al., 2001; Rehwagen et al., 2003). Konzentrationen  $>500\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  sind extrem selten und lassen entweder bauliche Mängel oder zusätzliche Quellen (z.B. Reinigungs- oder Lösungsmittel, Klebstoffe) vermuten. Nach Angaben im Schlussbericht des INDEX-Projektes der EU (European Commission, 2005) liegt die durchschnittliche personenbezogene Exposition gegenüber  $\alpha$ -Pinen zwischen  $7\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  und  $18\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Studien von Adgate et al. (2004) zur

Exposition von 153 Kindern gegenüber  $\alpha$ -Pinen in Minnesota ergaben eine vergleichbare Expositionsgröße von  $<10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (90 % Perzentile). Insgesamt scheint die durchschnittliche  $\alpha$ -Pinenexposition in den USA mit  $1,0 - 2,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$  niedriger zu liegen als in Europa (Mersch-Sundermann, 2007).

Die Konzentration von Terpenen in Hölzern ist abhängig von Ort und Vegetationsperiode, Baumart sowie individuellen Baum- und Pflanzengewebe (Kasanen et al., 1999).

In den letzten Jahren wurde die Frage, ob durch die Freisetzung von  $\alpha$ -Pinen aus Holz und Holzwerkstoffen in die Innenraumlufte negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit zu erwarten sind, vielfach diskutiert. In kontrollierten Expositionsstudien am Menschen zeigten sich Hinweise auf eine meist schwache irritative Wirkung von  $\alpha$ -Pinen via inhalationem ab Expositions-konzentrationen von  $450 \text{mg}/\text{m}^3$ . Diese Befunde scheinen jedoch wissenschaftlich nur wenig belastbar (Mersch-Sundermann, 2007). Verschiedene arbeitsmedizinische Studien zeigen, dass auch bei Langzeitexpositionen gegenüber Terpenen in Konzentrationen von mehr als  $200 \text{mg}/\text{m}^3$  keine Terpen-assoziierten Effekte zu erwarten sind (Mersch-Sundermann, 2007).

Bisher gibt es nur wenige Studien in welchen die Eigenschaften ausgewählter Terpene in Modellsystemen getestet wurden.

In einer weiteren Studie von Gminski et al. (2010) wurden ausgewählte Terpene und Aldehyde auf ihr zytotoxisches und gentoxisches Potential in humanen A-549 Lungenzellen getestet. Um die Exposition der Zellen mit dem jeweiligen Agens via Gasphase zu erleichtern, wurde eine 250L Emissionskammer mit einem Vitrocell<sup>®</sup> System kombiniert. Die VOC Konzentration wurde mittels Gaschromatographen/Massendetektor (Gas Chromatography/Mass Selective Detector; GC/MSD) gemessen. Die biologischen Effekte wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, nach einer Expositionsdauer von einer Stunde mit Hilfe des Erythrosin-B-Testes (Zytotoxizität) und des Cometassays (Gentoxizität) gemessen. Zusammenfassend stellte sich bei dieser Studie heraus, dass  $\delta$ -3-Caren und  $\alpha$ -Pinen weder einen zytotoxischen noch einen gentoxischen Effekt aufwiesen, wobei eine „worst-case“ Situation mit  $13 \text{m}^2/\text{m}^3$  Spanplattenauskleidung und einer gemessenen VOC-Konzentration von  $80 \text{mg}/\text{m}^3$  vorlag.  $\alpha$ -Pinen und  $\delta$ -3-Caren induzierten keine toxischen Effekte bei einer Konzentration von  $1800 \text{mg}/\text{m}^3$  und  $600 \text{mg}/\text{m}^3$ . Somit konnten im Rahmen dieser Studie keine Hinweise auf mögliche ungünstige Effekte auf A-549 Lungenzellen

von VOCs und VOC-Gemischen detektiert werden. Die Konzentrationen der VOCs lagen hierbei um das  $10^2$  bis  $10^5$ -fache höher als in der normalen Innenraumluft (Gminski et al., 2010).

#### 1.4 Gesundheitliche Aspekte

Im Allgemeinen hängt der gesundheitsschädliche Einfluss von Schadstoffen auf den Menschen von einer Vielzahl komplexer und zusammenhängender Faktoren ab. Hierzu zählen unter anderem physikalische und chemische Eigenschaften der verschiedenen Stoffe sowie Dauer und Konzentration der Exposition. Weiterhin ist die Art der Aufnahme z.B. über die Atemwege oder den Magen-Darm-Trakt sowie die Metabolisierung des entsprechenden Stoffes zu beachten. Die biologische Reaktion des Körpers auf eine Exposition ist auch eine Funktion klimatischer und psychologischer Faktoren, die von sozialen Einwirkungen, zum Beispiel der Anpassungsfähigkeit, Toleranz oder sozialen Stellung, beeinflusst werden können (Plessas, 1980).

Zu den spezifischen Gesundheitsstörungen, die im Zusammenhang mit VOC-Belastungen der Innenraumluft diskutiert werden, zählen Allergien, asthmatische Erkrankungen, bösartige Tumore bzw. bösartige Malignome, neurologische Erkrankungen und Atemwegserkrankungen. Diese spezifischen Erkrankungen sind in der Regel nicht auf die normalen Belastungen in Wohnräumen, sondern auf Arbeitsplatzbelastungen mit VOC in zumeist hohen Konzentrationen bei Exposition über längere Zeiträume zurückzuführen (Mersch-Sundermann 2009).

Sensorische Effekte, wie z.B. Geruchswahrnehmung, neurovegetative Effekte, wie z.B. Kopfschmerzen und Müdigkeit, sowie irritative Effekte wie Triggerung von Asthmaanfällen, werden zu den unspezifischen Gesundheitsstörungen im Zusammenhang mit VOC-Belastungen in der Innenraumluft gezählt.

Besonders zwei Beschwerden werden gemäß EPA (Environmental Protection Agency, 2005) mit einer schlechten Innenraumluftqualität in Verbindung gebracht: das sogenannte Sick-Building-Syndrome (SBS) sowie die Building-Related-Illness (BRI). Für das SBS sind Symptome wie Kopfschmerzen, Reizungen der Augen, der Nase und des Rachens typisch. Zudem häufen sich Klagen über Konzentrationschwäche, Müdigkeit und Geruchsbeeinträchtigungen. Die Ursache der Symptome bleibt dabei meist unklar, sie verschwinden allerdings nach Verlassen des Gebäu-

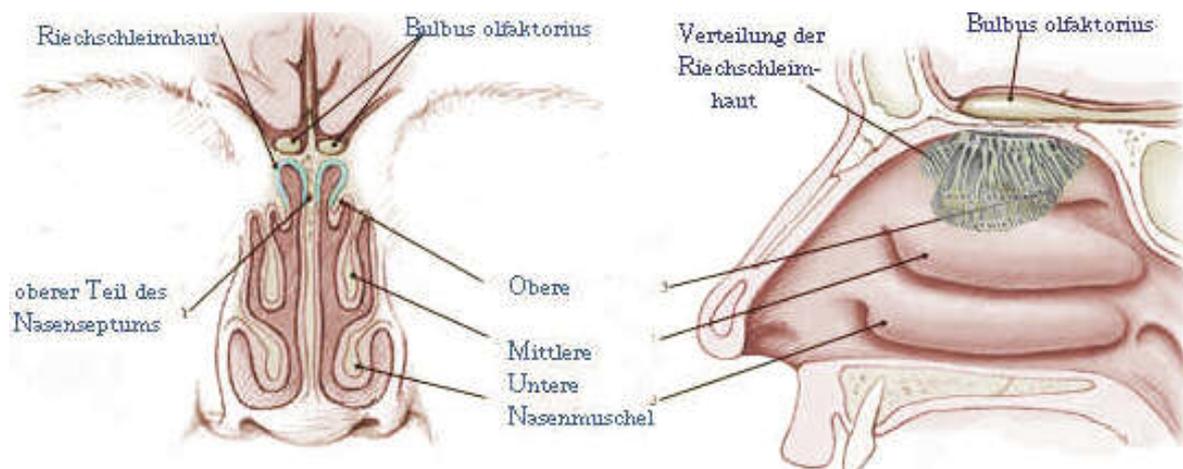
des. Husten, Fieber und Muskelschmerzen sind für BRI typische Symptome. Im Gegensatz zum SBS gibt es hierfür allerdings klinisch nachvollziehbare Ursachen. Überdies dauern die Symptome auch nach Verlassen des Gebäudes an.

Die luftgetragenen Verbindungen werden aber oft auch sensorisch bzw. olfaktorisch wahrgenommen. Neben den für Geruchswahrnehmungen verantwortlichen olfaktorischen Nerven ist gleichzeitig eine Reizung des N. trigeminus möglich. Dies hat Irritationen der Augen und Atemwege zur Folge, die als brennend, beißend und warm, kalt oder schmerzhaft wahrgenommen werden (ECA 1999). Eine einzelne Substanz kann dabei auch mehrere Regionen gleichzeitig anregen und beeinflussen woraus sich der Gesamteindruck der Beschwerden für die exponierte Person ergibt (Dalton, 2002).

Die Rezeptoren des olfaktorischen Systems befinden sich auf der Riechschleimhaut (Regio olfactoria) oberhalb der oberen Nasenmuschel im Naseninneren. Ein Netzwerk aus Nervenfasern auf der Gesichts- und Stirnhaut sowie den Nasen-, Mund- und Augenschleimhäuten gehören zum Trigeminus-Nerv. Im Gegensatz zu den Riechzellen des olfaktorischen Systems sind dem Nerv keine spezifischen sensorischen Zellen zuzuordnen.

Geruchs- und Geschmackssinn werden als chemische Sinne bezeichnet, da der Reiz auf der Interaktion chemischer Verbindungen mit den Rezeptormolekülen beruht. Dabei werden reversible und schwache Bindungen mit den Rezeptorproteinen ausgebildet, unter anderem auf Basis von Van-der-Waals-Kräften sowie Wasserstoffbrückenbindungen (ECA 1999).

Die Mehrzahl der Innenraumluftschadstoffe sind geruchsaktiv. Chemische Analysen erlauben jedoch keine Aussage darüber, wie die Luftqualität vom Menschen wahrgenommen wird. Chemisch messbare Emissionen korrelieren nicht oder nur in Ausnahmefällen mit Ergebnissen sensorischer Messmethoden (Salthammer et al., 2004, Schulz, 2003; ECA 1999). Als Ursache hierfür werden unter anderem unterschiedliche Geruchsschwellen und ein möglicherweise synergistisches Verhalten verschiedener luftgetragener Verbindungen angeführt (ECA 1999). Weiterhin ist davon auszugehen, dass durch Sekundäremissionen neue geruchsaktive Substanzen mit niedrigeren Geruchsschwellen entstehen. So konnten Knudsen et al. (1999) trotz kontinuierlich sinkender VOC-Emissionen ansteigende bzw. konstante sensorische Wirkungen bei Bauprodukten feststellen, unter anderem bei Nylon-Teppichboden oder Acryl-Lack auf Buchenparkett (Makowski, 2007).



**Abbildung 2: Geruch- und Geschmacksinn**

(aus „Gray’s Anatomie für Studenten“ Elsevier, München; Urban & Fischer).

Wirkungen und Folgen von Geruchswahrnehmungen können nach ECA (1999) Verstimmungen („Annoyance“) oder somatische Beschwerden sein. Zu den sogenannten Verstimmungen zählen unter anderem Missmut, Ärger und Übelkeit. Symptome wie Schlafstörungen, Müdigkeit und Kopfschmerzen gehören zu den somatischen Beschwerden. Hierzu werden außerdem eine Reihe unerklärter medizinischer Phänomene mit unspezifischen Symptomen (z.B. SBS) gezählt. Nach ECA (1999) beziehen sich derzeit die meisten Erkenntnisse in diesem Zusammenhang auf die Geruchsbelastung der Außenluft und können nicht ohne weiteres auf den Innenraum übertragen werden. Dennoch ist grundsätzlich davon auszugehen, dass negativ empfundene Gerüche Reizwirkungen verstärken bzw. verursachen können (ECA, 1997, Oppl, 1999, Makowski, 2007).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen moderner, energiesparender Techniken, die zunehmend beim Haus- und Wohnungsbau eingesetzt werden, kommt es zu einem reduzierten Luftwechsel. Aus diesem Grund rücken Emissionen von flüchtigen organischen Verbindungen aus Baumaterialien und Einrichtungsgegenständen zunehmend in den Blickpunkt gesundheitlicher Überlegungen. So auch die Emissionen aus Holz und Holzwerkstoffen wie zum Beispiel Oriented Strand Boards. Aus zahlreichen chemischen Analysen und Innenraumuntersuchungen ist bekannt, dass aus Holz und Holzwerkstoffen flüchtige organische Verbindungen wie natürliche Terpene sowie gesättigte und ungesättigte Aldehyde in die Innenraumluft abgegeben werden können.

Um potentielle adverse Effekte der VOC Expositionen abschätzen zu können, hat die vorliegende Arbeit das Ziel, grundlegende toxikologische Daten für eine gesundheitliche Bewertung holz- bzw. holzwerkstofftypischer Emissionen zu erheben.

Dazu wurden ausgewählte Terpene (Limonen,  $\delta$ -3-Caren,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen) auf ihre genotoxische und zytotoxische Wirkung hin untersucht. Die Untersuchungen wurden an einer humanen Tumorzelllinie aus der menschlichen Lunge (A549, Typ-II-alveolar cell like lung carcinoma cells) durchgeführt. Für die Genotoxizitätsuntersuchungen wurden DNS – Strangbrüche in dem Einzelzellgelelektrophorese – Assay (Cometassay) studiert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 2 sind die Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller aufgelistet, die zur Zellkultivierung der A-549 Zellen und für die Durchführung des Cometassays benötigt wurden.

**Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien**

**(Angabe der Reinheiten in % sofern verfügbar)**

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Aceton, >99%	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose LMP (Low melting Point)	Serva, Heidelberg
Agarose NMP (Normal Melting Point)	Merck, Darmstadt
Benzo[a]pyren, 98%	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM (Dulbecco's minimal essential medium)	PAA, Pasching/ Austria
DMSO (Dimethylsulfoxid), >99%	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA-Tritiplex, 100 %	Merck, Darmstadt
Erythrosin-B, 95 %	Merck, Darmstadt
Ethanol > 99 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
FKS (fetales Kälberserum)	PAA, Pasching / Austria
Gentamicin	Sigma Aldrich, Steinheim
HCl, 37 %	Merck, Darmstadt
NaCl, ≥ 99,5 %	Roth, Karlsruhe
NaOH, >99 %	Roth, Karlsruhe

PBS (Phosphate buffered saline)	PAA, Pasching / Austria
Tris, 100 %	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin, 2,5 %	PAA, Pasching / Austria
(R)-(+)-Limonen	Sigma Aldrich, Steinheim
(+)- $\alpha$ -Pinen	Sigma Aldrich, Steinheim
(-)- $\beta$ -Pinen	Sigma Aldrich, Steinheim
(+)- $\delta$ -3-Caren	Sigma Aldrich, Steinheim

### 2.1.1.1 Benzo[a]pyren: Referenz-und Positivkontrolle

Das Benzo[a]pyren-Molekül gehört zu den pentanuklearen, d. h. aus fünf Benzol-Ringen bestehenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Das Molekül besitzt, wie Benzol aufgrund des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems, aromatischen Charakter. Benzo[a]pyren (B[a]p) ist ein gelber, kristalliner Feststoff, der entweder in Form von Plättchen mit einer Dichte von 1,282 g/cm<sup>3</sup> oder als Nadeln (Dichte 1,351 g/cm<sup>3</sup>) vorliegt. B[a]p schmilzt bei 179 °C und siedet bei 495 °C. In Wasser und Alkoholen ist es gering- bzw. unlöslich. In aromatischen Kohlenwasserstoffen löst es sich hingegen gut.

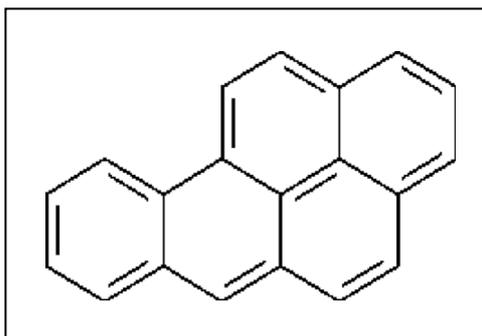


Abbildung 3: Benzo[a]pyren

B[a]p ist die Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Diese entstehen hauptsächlich durch unvollständige Verbrennung von organischen Materialien (z.B. in Verbrennungsmotoren) und bei der Pyrolyse von Amino-

säuren, Fettsäuren und Kohlenhydraten. PAK sind auch im Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten und in geräucherten Lebensmitteln vorhanden. Emittierte PAK werden hauptsächlich an Partikel gebunden in der Luft verteilt. Im Bereich von Verkehrswegen, Industriestandorten und Altlaststandorten und auch in landwirtschaftlich genutzten Böden wurden zum Teil außerordentlich hohe Werte zwischen 1,3 mg/kg und 60 mg/kg B[a]p gemessen. Wichtigste Bezugsquelle des Menschen sind neben beruflicher Exposition, die Nahrung und Tabakrauch (Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2005).

Durch Phase-I-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, insbesondere CYP1A1, erfolgt eine Aktivierung des B[a]p zu Benzo[a]pyren-Dihydrodiolepoxid (BPDE). BPDE kann kovalent an zelluläre Makromoleküle, wie auch an DNA binden. Dadurch können Schäden bei der DNA-Replikation resultieren sowie Mutationen, die zu kanzerogenen Veränderungen führen können (Melendez-Colon et al., 1999). Auf Grund seiner genotoxischen Wirkung wird B[a]p in vielen genotoxischen Studien als Positivkontrolle eingesetzt (Laky et al. 2002, Uhl et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit diente B[a]P im Cometassay mit A-549 Zellen ebenfalls als Positivkontrolle.

B[a]P wurde für die durchgeführten Versuche in sterilem DMSO gelöst und in einer Konzentration von 200 µmol/L verwendet.

#### **2.1.1.2 DMSO (Dimethylsulfoxid)**

Als Lösungsmittelkontrolle wurde im Cometassay DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt. DMSO ist eine organische, farblose Flüssigkeit, die als Lösungsmittel weitverbreitet in Labor und Technik Anwendung findet.

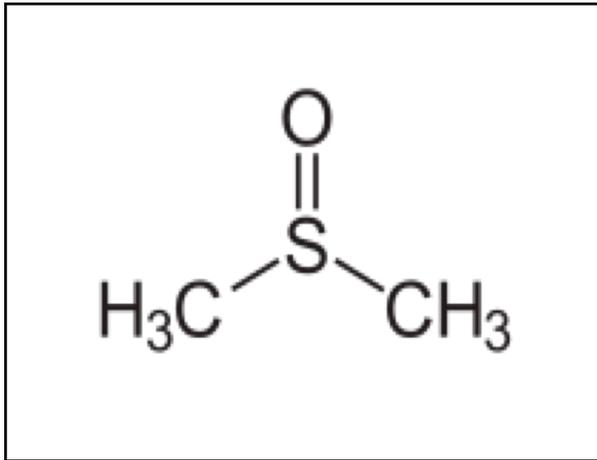


Abbildung 4: DMSO (Dimethylsulfoxid)

### 2.1.1.3 Terpene

#### Allgemeines

Der Begriff Terpene stammt vom Terpentin (Balsamum Terebinthinae) ab.

Terpentin oder auch „Kiefernharz“ ist eine zähe Flüssigkeit mit einem angenehm frischen Geruch, welche beim Anschneiden aus der Rinde und dem jungen Holz mehrerer Kiefernarten (Piniaceae) gewonnen wird.

Traditionell werden die Terpene als Naturstoffe überwiegend pflanzlicher Herkunft bezeichnet, die durchweg aus Isopren-Untereinheiten aufgebaut sind. Schon seit längerem ist bekannt, dass Nadelhölzer, Balsambäume und Citrusfrüchte, Coriander, Eucalyptus, Lavendel, Lemongras, Lilien, Nelken und viele andere Pflanzen oder deren Bestandteile charakteristische, meist als angenehm empfundene Düfte verbreiten, würzig schmecken oder bestimmte pharmakologische Wirkungen entfalten. Die Terpene sind Hauptbestandteil der in Pflanzen produzierten ätherischen Öle.

Sie sind eine heterogene und sehr umfangreiche Gruppe von chemischen Verbindungen. Sie lassen sich biosynthetisch von Isopren- beziehungsweise Isopentenyleinheiten ableiten. Die Biosynthese erfolgt über aktivierte Formen dieser Moleküle, dem Dimethylallylpyrophosphat und dem Isopentenylpyrophosphat.

Diese Moleküleinheiten besitzen fünf Kohlenstoffatome und somit lässt sich die Kohlenstoffanzahl der Terpene immer durch fünf teilen (C5-Regel).

Es sind mehr als 8.000 Terpene und über 30.000 Terpenoide bekannt.

Diese Stoffgruppe ist in vielfacher Weise biologisch und pharmakologisch interessant, wobei ihre biologische Funktion bisher nur sehr unvollständig erforscht ist.

In der Industrie werden sie beispielsweise als umweltfreundliche Insektizide sowie als Geruchs- oder Geschmacksstoffe in Parfüms und kosmetischen Produkten verwendet.

Zu den bicyclischen Terpenen (Monoterpenen) zählen die Trimethylbicycloheptene  $\alpha$ -Pinen,  $\delta$ -3-Caren, Camphen und die isomeren Methenyldimethylbicycloheptane (z.B.  $\beta$ -Pinen). Im Unterschied zu den bicyclischen Terpenen weisen monocyclische Terpene wie die Menthadiene Limonen, Terpinen, Terpinolen und Phellandren eine einfache Ringstruktur sowie 2 Doppelbindungen auf (Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz (2003)46, 346-352).

**Tabelle 3: ausgewählte Terpene aus GESTIS-Stoffdatenbank des IFA**

Name	CAS	Summenformel	Kurzbeschreibung
(R)-(+)-Limonen	5989-27-5	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	farblose, brennbare Flüssigkeit, charakteristischer Geruch nach Zitronen
(+)- $\alpha$ -Pinen	2437-95-8	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Farblose Flüssigkeit mit terpentinartigem Geruch
(+)- $\beta$ -Pinen	23089-32-9	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	farblose Flüssigkeit mit terpentinartigem Geruch
((+)- $\delta$ -3-Caren)	498-15-7	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	farblose Flüssigkeit mit terpentinartigem Geruch

## Stoffeigenschaften und technische Anwendung

Bicyclische Terpene stellen flüchtige Bestandteile des Harzöls von Nadelhölzern dar. Das Destillat der flüchtigen Fraktion des Harzes wird als Terpentinöl bezeichnet und enthält als Hauptbestandteil  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und  $\delta$ -3-Caren. Der  $\alpha$ -Pinen-Anteil im Terpentinöl kann nach Herkunftsland erheblich schwanken, von über 90 % in südeuropäischen Terpentinölen bis unter 20 % in nordeuropäischen Terpentinölen (Mohr, 1998; Kasanen et al., 1999).

Bicyclische Terpene verfügen über mindestens ein asymmetrisches Kohlenstoffatom und liegen deshalb in zwei sogenannten enantiomeren Formen vor. Diese beiden Formen werden mit (+) und (-) gekennzeichnet. Das griechische Terpentinöl enthält überwiegend (+)- $\alpha$ -Pinen, während sein (-)-Enantiomer in spanischem, französischem und österreichischem Terpentinöl vorkommt (Heinzow et al., 2000). Im Terpentinöl aus nordeuropäischen Koniferen kann der Anteil am  $\delta$ -3-Caren 40 % erreichen (Kasanen et al., 1999).

Die einzelnen Enantiomere können erhebliche Unterschiede in der toxischen wie auch der olfaktorischen Wirkungsstärke aufweisen. Da eine analytische Trennung der Enantiomere in der Praxis nur selten erfolgt, ist die Darstellung der Wirkungsunterschiede der Enantiomere derzeit von eher theoretischem Interesse (Sagunski und Heinzow, 2003).

Bicyclische Terpene werden als Lösungsmittel in Oberflächenbehandlungsmitteln und Klebern, in Haushaltsprodukten (z.B. Schuhcremes, Bodenreinigungsmittel) und als Duftzusatz in Kosmetika eingesetzt. Sie sind natürliche Bestandteile pflanzlicher Lebensmittel (z.B. Orangen, Zitronen, Karotten) sowie in Arzneimitteln enthalten (Heinzow et al., 2000; Deutsche Forschungsgemeinschaft; 1996).

## Exposition

Die englische Abkürzung VOC (volatile organic compounds) bezeichnet die Gruppe der flüchtigen organischen Verbindungen. VOCs sind gas- und dampfförmige Stoffe organischen Ursprungs in der Luft. Dazu gehören zum Beispiel Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde und organische Säuren. Viele Lösungsmittel, Flüssigbrennstoffe und synthetisch hergestellte Stoffe können als VOC auftreten, aber auch zahlreiche organische Verbindungen, die in biologischen Prozessen gebildet werden. Viele hundert verschiedene Einzelverbindungen können in der Luft gemeinsam auftreten

([www.umweltbundesamt.de/gesundheit/stoffe/voc.htm](http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit/stoffe/voc.htm); Stand Mai 2011). Ein wichtiger Bestandteil der VOCs sind unter anderem die Terpene.

## Innenraumluf

Bauprodukte und Einrichtungsgegenstände können eine bedeutsame Quelle für die Belastung der Innenraumluf durch VOC darstellen.

Seit den 90er Jahren ist eine deutliche Zunahme der Konzentration bicyclischer Terpene in der Innenraumluf zu verzeichnen. So hat sich die Konzentration von  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und  $\delta$ -3-Caren innerhalb eines Jahrzehnts um etwa eine Größenordnung erhöht (Scholz und Santl, 1999; Ullrich et al., 1999; Schleibinger et al., 2001; Schreiner et al., 2001). In Bezug auf gesundheitliche Aspekte durch inhalative Exposition von Terpenen in der Innenraumluf muss besonders die sensorische Wirkung (Geruchswahrnehmung) sowie die akute irritative Wirkung auf die Schleimhäute des oberen und des unteren Respirationstraktes und der Konjunktiven beachtet werden. Die Geruchsschwelle für  $\alpha$ -Pinen liegt nach Angaben von Devos et al. (1990) bei etwa  $4000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (0,69 ppm); nach neueren Studien von Mølhave et al. (2000) bei  $2300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Im Jahr 2003 wurden auf der Grundlage tierexperimenteller Studien und arbeitsmedizinischer Daten sowie einiger humaner Expositionsstudien von einer Ad-hoc-Arbeitsgruppe aus Mitgliedern der Innenraumlufthygienekommission beim Umweltbundesamt sowie der Arbeitsgemeinschaft der Obersten Landesgesundheitsbehörden für die bicyclischen Terpene mit der Leitsubstanz  $\alpha$ -Pinen Richtwerte für die Innenraumluf formuliert. Der Richtwert I (RW I) wurde dabei mit  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , der Richtwert II (RW II) mit  $2000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  festgesetzt.

Der Richtwert I ist „die Konzentration eines Stoffes in der Innenraum, bei der im Rahmen einer Einzelstoffbetrachtung nach gegenwärtigen Erkenntnisstand auch bei lebenslanger Exposition keine gesundheitlichen Schäden zu erwarten sind. Eine Überschreitung ist mit einer über das übliche Maß hinausgehenden, hygienisch unerwünschten Belastung verbunden“. Aus Vorsorgegründen besteht auch im Konzentrationsbereich zwischen RW I und RW II Handlungsbedarf. Der RW I wird vom RW II durch Einführen eines zusätzlichen Faktors (in der Regel 10) abgeleitet.

Richtwert II (RW II) ist nach Definition „ein wirkungsbezogener, begründeter Wert, der sich auf die gegenwärtigen toxikologischen und epidemiologischen Kenntnisse

zur Wirkungsschwelle eines Stoffes unter Einführung von Unsicherheitsfaktoren stützt. Er stellt die Konzentration eines Stoffes dar, bei deren Erreichen bzw. Überschreiten ein dringender Handlungsbedarf besteht, da diese Konzentration geeignet ist, insbesondere für empfindliche Personen bei Daueraufenthalt in den Räumen eine gesundheitliche Gefährdung darzustellen.

Nach Auswertung von Studien (BGA, 1991; Wolkoff et al., 2000; Edwards et al., 2001) zeigte sich, dass die typischen Konzentrationen von Terpenen, insbesondere von  $\alpha$ -Pinen, in der Innenraumluft auch unter Berücksichtigung der länderspezifischen Bauweisen und der lokal verwendeten Hölzer zwischen 10 und 40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  betragen. Holz- und Holzwerkstoff- bedingte  $\alpha$ -Pinenkonzentrationen in der Innenraumluft von einigen Hundert  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  können als Maxima angenommen werden; Konzentrationen  $> 500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  sind extrem selten und lassen entweder bauliche Mängel oder zusätzlich Quellen (z.B. Reinigungs- oder Lösemittel, Klebstoffe) vermuten. Bicyclische Terpene werden nur in geringem Maße aus der Außenluft in Innenräume getragen (Sagunski und Heinzow; 2003).

### **Interne Exposition**

Bei Beschäftigten, die am Arbeitsplatz gegenüber Terpenen exponiert werden, stellt die inhalative Aufnahme bicyclischer Terpene den wesentlichen Aufnahmepfad dar. Hierbei korreliert die interne Belastung gut mit der äußeren Exposition (Luftkonzentration) (Rosenberg et al., 2002). Es zeigt sich, dass es in umweltmedizinisch relevanten Expositionssituationen häufig zu unregelmäßigen Ereignissen bezüglich der Aufnahme von Terpenen kommt. So zum Beispiel bei Verwendung von terpenhaltigen Medikamenten oder nach Renovierung von Wohnräumen. Ein Zusammenhang zwischen innerer Belastung und der Konzentration von Terpenen kann somit nicht immer zuverlässig hergestellt werden (Sagunski und Heinzow, 2003).

### **Lebensmittel**

Messungen bezüglich der Aufnahme der Terpene über die Nahrung wurden bisher nicht gefunden (Sagunski und Heinzow, 2003).

## Toxikokinetik

Bicyclische Terpene werden gut in der Lunge resorbiert. Bei einer 2 stündigen Exposition gegenüber 450 mg  $\alpha$ -Pinen,  $\delta$ -3-Caren oder einem Gemisch bicyclischer Terpene (240 mg  $\alpha$ -Pinen, 50 mg  $\beta$ -Pinen und 160 mg  $\delta$ -3-Caren) pro m<sup>3</sup> Raumluft wurden etwa 60% der angebotenen Mengen an  $\alpha$ -Pinen aufgenommen. Für  $\beta$ -Pinen lagen die Werte bei 66% und für  $\delta$ -3-Caren bei 70 % (Falk et al., 1990; Falk et al., 1991; Falk und Filipsson, 1996).

Die aufgenommenen Terpene wurden in fettreichen Geweben verteilt. Bicyclische Terpene werden durch mikrosomale Monooxygenasen hydroxyliert und als Glucuronsäure-Konjugate renal ausgeschieden. Etwa 2-8 % der aufgenommenen Menge werden unverändert abgeatmet. Die Clearance bicyclischer Terpene aus menschlichem Blut nach einer zweistündigen Exposition folgt einer dreiphasigen Kinetik. Die Halbwertszeit der langsamsten Ausscheidungsphase von  $\alpha$ -Pinen beträgt 0,5 Tage,  $\beta$ -Pinen 0,4 Tage und  $\delta$ -3-Caren 1,3 Tage (Falk et al., 1990; Falk et al., 1991). Nach Exposition gegenüber einem Gemisch bicyclischer Terpene verlängerte sich die Halbwertszeit der langsamsten Ausscheidungsphase von  $\alpha$ -Pinen auf 1,3 Tage, von  $\beta$ -Pinen auf 1 Tag und von  $\delta$ -3-Caren auf 1,8 Tage (Savolainen und Pfäffli, 1978).

### 2.1.2 Lösungen

In Tabelle 4 sind die Lösungen, die zur Durchführung dieser Dissertation hergestellt wurden, aufgeführt.

**Tabelle 4: Lösungen und deren Zusammensetzung**

Lösungen	Zusammensetzung	Volumenangaben
Agarose	NMP (1 %)	0,1 g/10 ml PBS
	NMP (0,7 %)	0,07 g/10 ml PBS
	LMP (0,5 %)	0,05 g/10 ml PBS

EDTA-PBS-Lösung	EDTA PBS	100 mg 500 ml
Elektrophoresepuffer	NaOH (0,3 M) EDTA-Tritiplex (1 mM)	12 g/l Aqua dest. 0,372 g/l Aqua dest.
Erythrosin-B-Lösung	Erythrosin-B PBS	20 mg 50 ml
Ethidiumbromid-Lösung	Stammlösung: Ethidiumbromid / Aqua dest. Gebrauchslösung: Stammlösung / Aqua dest.	1 mg/1 ml 100 µl/900 µl
Kulturmedium	DMEM FKS Gentamicin	424,5 ml 75 ml 500 µl
Lyselösung	NaCl (2,5 M) EDTA-Tritiplex (0,1 M) NaOH (0,2 M) Triton X-100 (1 %)	146,1 g/l Aqua dest. 37,22 g/l Aqua dest. 8,0 g/l Aqua dest. 2 ml/198 ml Lösungsgemisch Einstellen auf pH 10 durch Zugabe von NaOH bzw. HCl
Neutralisationspuffer	Tris (0,4 M) HCl (37 %)	48,44 g/l Aqua dest. ca. 25 ml => pH = 7,5
Trypsin 0,05 %	Trypsin (2,5%) EDTA-PBS-Lösung	1 ml 49 ml

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Neben den üblichen Laborgeräten und Verbrauchsmaterialien wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Geräte verwendet.

**Tabelle 5: verwendete Geräte**

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Autosampler	Combipal (CTC), PAL System, Zwingen / Switzerland
Elektronische Analysenwaage AS 60	Ohaus, Nänikon / Switzerland
Elektrophoresekammer	Combipal (CTC), PAL-System, Zwingen / Switzerland
Spannungsgeber für Elektrophoresekammer	EPS 300, Pharmacia Biotech, Uppsala / Sweden
Fluoreszenzmikroskop	DMS, Leica, Wetzlar
Kühlanlage für Elektrophoresekammer	MultiTemp III, Pharmacia Biotech, Uppsala / Sweden
Mikroskop	DMR, Leica, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	MAGV, Rabenau-Londorf
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler	Roto-Shake Genie, Scientific Industries Inc., New York / USA
Sterile Arbeitsbank	Kendro Herasafe, Langenselbold
Wasserbar Isotemp 215	Fischer Scientific, Schwerte
Zentrifuge Universal 30 F	Hettich, Kirchlingern

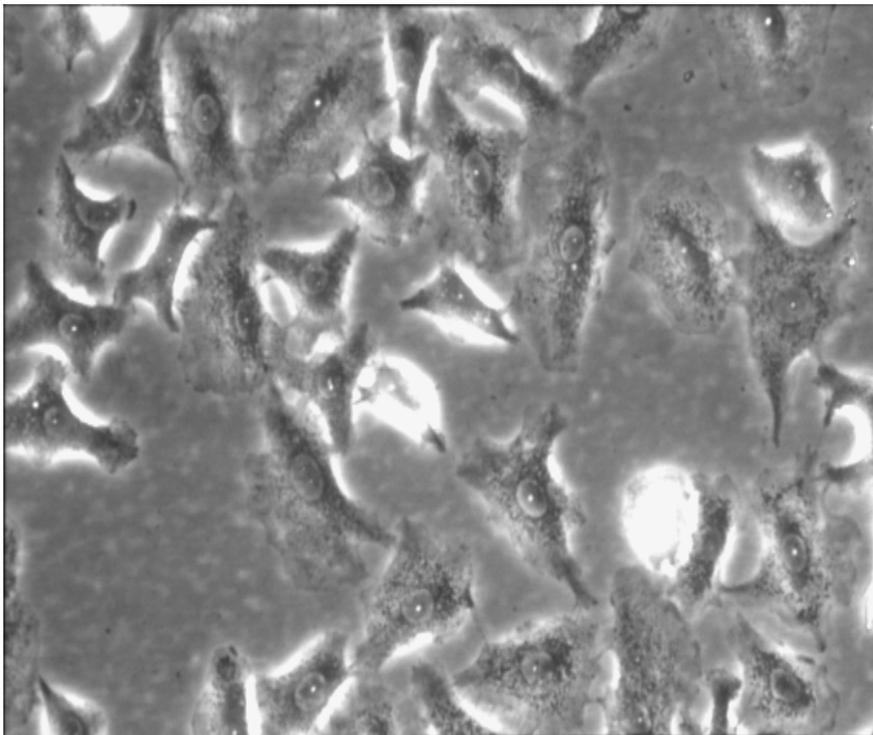
### 2.1.3.1 Software

Im Folgenden ist die Software aufgelistet, die für die Auswertung, Erstellung der Texten, Grafiken und Tabellen verwendet wurde.

- Excel, Microsoft Excel 2000 Analysis Macro / Comet 3.1, Europe, Kinetic Imaging, Liverpool, GB
- Excel, Microsoft Excel 2007
- Word, Microsoft Word 2007

### 2.1.3.2 Die humane Lungenkarzinom Zelllinie A-549

1976 wurde die Zelllinie A-549 aus einem Alveolarzellkarzinom, das zu den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen gehört, isoliert. Diese Tumorzellen gingen von einem Zellklon aus. Sie besitzen multilamellare, zytoplasmatische Einschlusskörperchen, Oberflächenmoleküle CD54 und CD58 und ko-stimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86. Ebenfalls werden chemotaktische Stoffe synthetisiert und freigesetzt und die Zellen haben die Möglichkeit zur Synthese von Lecithin, dem typischen Bestandteil des Surfactant-Faktors. A-549 Zellen verändern sich auch nach langer Zeit in Kultur kaum. Nach konfluenter Langzeitkultur von A-549 Zellen untersuchte Wottrich (2003) die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf mögliche Nekrose bzw. „Autoapoptose“. Erst nach 96 Stunden zeigten die Zellen einen geringen Anstieg der Zahl apoptotischer und nekrotischer Zellen, somit ist diese Zelllinie für die bei dieser Arbeit durchgeführten Versuche uneingeschränkt verwendbar.



**Abbildung 5: A-549 Zelllinie / Lungenepithelzellen**

(Aus Forster KA, Oster CG, Mayer MM, Auery ML, Audus KL (1998) Exp cell Res 15, 359 – 66)

Ca. 40 bis 60 verschiedene Zelltypen gibt es in der menschlichen Lunge, dabei sind die flachen Typ I – und die kuboidalen Typ II – Zellen die wichtigsten Epithelzellen in

den Alveolen. Das Alveolarepithel besteht zu 95 % aus Pneumozyten I (Deckzellen), deren flache Zytoplasmaausläufer sich gegenseitig überlappen. Dazwischen liegen die Pneumozyten II (Nischenzellen), die reich an Organellen sind. Diese dienen der Synthese von Surfactant sowie als Vorläuferzellen für die Typ I – Zellen.

Bei den A-549 Zellen handelt es sich um Adenokarzinomzellen, die in ihren Eigenschaften weitgehend den Alveolarepithelzellen vom Pneumozyten Typ II entsprechen. Die Zellen kommunizieren miteinander indem sie eine ganze Reihe von Mediatoren bilden (Khirwadkar et al., 1993). Außerdem verfügen sie über eine umfangreiche Ausstattung von Cytochrom-P450-Enzymen (Hukkanen et al., 2000). Ihre Generationszeit liegt bei 24 Stunden.

**Tabelle 6: Untersuchungen zur Zelllinie A-549**

Gentoxischer Stoff	Testsystem	Literatur
Zigarettenrauch	Cometassay	Aufderheide und Mohr 2000
Methylmethansulfonat (MMS)	Micronuclei test, Comet assay	Seidel und Kreja 2001
Carbon black (CB)	Cometassay	Carero et al. 2001
Urban particulate matter (UPM)	Cometassay	Carero et al. 2001
Diesel Partikel	Cometassay	Carero et al. 2001
Nitrobenzanthrone (NBA)	Micronuclei test, Cometassay	Lamy, Kassie, Gminski et al. 2005
NiCl <sub>2</sub> , particles black NiO	Alkali unwinding assay	Schwerdtle and Hartwig 2006
Zementstaub	Micronuclei test	Zhang, Gminki, Lu et al. 2008
Aldehyde (VOC)	Cometassay	Hepfner et al. )
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	Cometassay	Zhang et al.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Behandlungsmethoden der Zellkulturen

#### Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer Atmosphäre mit einem 5 %igen Anteil an CO<sub>2</sub>. Für die *in vitro*-Versuche wurden die Zellpassagen 8 - 25 verwendet. Die Bearbeitung der Zellkulturen erfolgte grundsätzlich unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank.

#### Auftauen der Zellkulturen

Bis zu ihrer Verwendung wurden die A-549 Zellen in der Dampfphase flüssigen Stickstoffs bei einer Temperatur von -180 °C gelagert.

Zum Auftauen einer Zellkultur wurde zunächst Kulturmedium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und 10 ml davon in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Ein Aliquot der gelagerten Zellen wurde ebenfalls bei 37 °C rasch aufgetaut, in das vorgelegte Medium überführt und für 5 Minuten bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Zellpellet wurde in 10 – 20 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Polystyren-Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Nach einer ersten Kultivierungsphase von 24 Stunden im Wärmeschrank wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

#### Kultivierung und Passagierung

Vor Arbeitsbeginn wurde das Kulturmedium, Trypsin 0,05 % und PBS auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Kulturflasche wurde zunächst makro- wie auch mikroskopisch auf pathogene Mikroorganismen oder sonstige Verunreinigungen untersucht. Anschließend wurde das Kulturmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Zellkultur zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Je nach Flaschengröße (75 cm<sup>2</sup>/175 cm<sup>2</sup>) wurden 1 bzw. 3 ml Trypsin gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Danach erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Hiernach wurde unter mikroskopischer Betrachtung das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden

kontrolliert. Um die Trypsin vermittelte Reaktion zu stoppen, wurde Kulturmedium zugesetzt und die gesamte Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Mittels einer Einmalspritze und Injektionsnadel wurden die Zellen durch wiederholtes Aufziehen vereinzelt. Danach wurde der Suspension eine Probe entnommen um die Zellzahl zu bestimmen. Dazu wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit Erythrosin-B versetzt und die Zellen in diesem Gemisch in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\underline{n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammervolumen} \times \text{ml Zellsuspension}}$$

Ein Teil der Zellsuspension wurde daraufhin entnommen und in eine mit Medium vorbereitete Kulturflasche überführt, welche anschließend zur Inkubation in den Brutschrank gestellt wurde. Die genaue Menge der Zellen pro Flasche richtete sich nach vorhandener Zellzahl und nach benötigter Zellzahl für die Versuche. Die Passagierung der Zellen erfolgte, je nach Wachstumsdichte der Zellen, alle 3 bis 5 Tage. An jedem 2.Tag wurden die A-549 Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt.

### **Subkulturen in Zellkulturplatten**

Für die Durchführung der Versuche wurden Zellen in Zellkulturplatten mit jeweils 12 Vertiefungen kultiviert. Dazu wurden die Zellen wie bei der Zellpassage behandelt. Das Kulturmedium wurde aus der Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Zellboden gelöst und die Reaktion mit Medium gestoppt. Die Zellen wurden vereinzelt und anschließend die Zellzahl bestimmt. In die Vertiefungen der Zellkulturplatten wurden je 2 ml Kulturmedium vorgelegt und  $3 \times 10^5$  Zellen eingesät. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten für 24 Stunden im Brutschrank.

### **Behandlung der Zellen**

In den Versuchsansätzen zur Gentoxizität wurde jeweils eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und eine Positivkontrolle (B[a]p; 200  $\mu\text{M}$ ) mitgeführt. In den Versuchsansätzen zur Antigentoxizität wurde ebenfalls DMSO als Negativ- und Referenzkontrolle eingesetzt und B[a]p (200  $\mu\text{M}$ ) als Referenzkontrolle.

## **Untersuchungen zur Gentoxizität**

Die in den Kulturplatten eingesäten Zellen wurden gegenüber den Terpenen exponiert und 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Die verwendeten Terpenkonzentrationen wurden in Vortestungen ermittelt.

### **2.2.2 Alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay)**

#### **2.2.2.1 Grundlagen der Methode**

Mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay) ist es möglich, DNA-Schäden und Reparaturen auf Einzelzellniveau mittels einer elektrophoretischen Technik zu detektieren (Singh et al., 1988; Tice et al., 1990).

Die Zellen werden lysiert und anschließend in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Im elektrischen Feld erfolgt die Migration geschädigter DNA in Richtung der Anode. Nach der Elektrophorese wird die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) angefärbt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop erinnert die migrierte DNA der Zellen an einen „Kometenschweif“, die nicht-migrierte DNA an den Kopf des „Kometen“. In Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen können, je nach eingestelltem pH-Wert, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA und alkalilabile sowie DNA-Quervernetzungen (crosslinks) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7: Chromosomenschäden, die im Cometassay nachgewiesen werden können (nach Tice et al., 2000)**

pH-Kondition	pH 7 - 8	pH 12.1 - 12.5	pH >13
Nachweis	Doppelstrangbrüche Crosslinks	Einzelstrangbrüche Doppelstrangbrüche Crosslinks Exzisions- Reparaturstellen	Einzelstrangbrüche Doppelstrangbrüche Crosslinks Exzisions- Reparaturstellen Alkalilabile Stellen
<b>Verstärkte Migration</b>		<b>Verminderte Migration</b>	
Einzel- und Doppelstrangbrüche Alkalilabile Stellen DNA Exzisions-Reparaturstellen		DNA-DNA Strangvernetzung DNA-Protein Strangvernetzung	

### **Nachweisbare DNA-Schäden von gentoxischen Substanzen:**

Einzelstrangbrüche werden nicht als entscheidend für das mutagene Potential eines Stoffes angesehen, da diese in der Regel vom zelleigenen Reparatursystem repariert werden (Fairbairn et al., 1995).

Einige gentoxische Substanzen besitzen die Fähigkeit, nicht direkt Strangbrüche der DNA sondern alkalilabile Stellen im DNA-Molekül zu erzeugen (z.B. Dimethylsulfat). Die alkylierte DNA ist an diesen Stellen empfindlich für die dort verstärkt stattfindende Denaturierung. Im alkalischen Milieu führen die abasischen Stellen zu DNA-Strangbrüchen und können dann nachgewiesen werden. Dies geschieht bei pH 13 im Cometassay (Klaude et al., 1996). Vorübergehend können Brüchen im Cometassay sichtbar gemacht werden, wenn bestehende Läsionen durch Basen- oder Nukleotidexzision repariert werden. Eine mit dem Cometassay gemessene hohe Anzahl an Schäden stellt somit entweder großen Schaden oder effiziente Reparatur dar.

DNA-Crosslinks bewahren die DNA vor der Denaturierung so wie sie im alkalischen Milieu erfolgt. Das heißt, in der Elektrophorese bewirken derartige Crosslinks eine verminderte Migration. Crosslinks können von Chemotherapeutika, wie zum Beispiel den bifunktionellen alkylierenden Substanzen Cisplatin oder Mitomycin C verursacht werden.

### **Prinzip der „Kometenentstehung“:**

Zur Erklärung der Entstehung des Kometenschweifes existieren zwei Theorien. Diese richten sich nach dem jeweils verwendeten Milieu des Testes, alkalisch oder neutral.

Nach Österling und Johanson (1984) besteht die DNA-Struktur bei neutralem pH-Wert auch noch nach dem Lysierungsschritt in der geordneten Form von Schleifen, welche die vielfach gewundene Struktur, die zuvor in den Nukleosomen enthalten war, beibehalten.

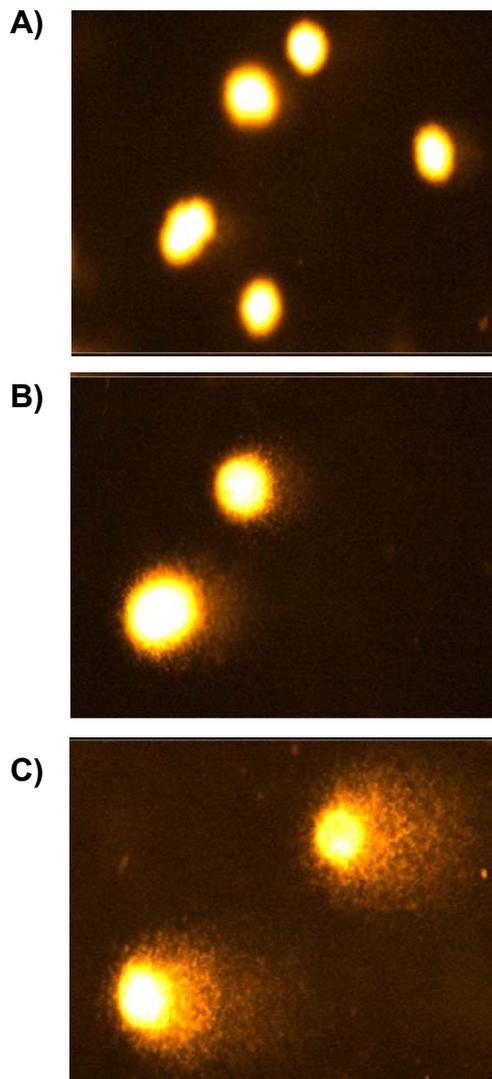
Durch das Einwirken genotoxischer Agenzien entstehen Einzelstrangbrüche im Molekül der DNA, dadurch werden die Schleifen gelockert. Die Enden der Stränge bleiben an größeren DNA-Stücken befestigt, z.B. indem sie mit anderen Strangmolekülen des Kernmaterials Verbindungen eingehen.

Im elektrischen Feld strecken sich diese negativ geladenen Schleifen des DNA-Materials in Richtung der Anode. Sie entfernen sich dabei nur wenig vom Kopf des Kometen. Die gegabelte Form solcher Strangenden sowie ihre relative Größe wirkt dabei zusätzlich hindernd auf eine Wanderung im elektrischen Feld (Klaude et al., 1996). Bei zunehmender Schädigung der DNA-Struktur durch genotoxische Einflüsse entstehen vermehrt Doppelstrangbrüche. Daraus resultiert, dass vermehrt ganze Fragmente unter elektrophoretischen Bedingungen aus dem Kopf in den Schweif des Kometen wandern.

In der alkalischen Version des Cometassays besteht der Kometenschweif grundsätzlich aus zwei Arten von Fragmenten (Klaude et al., 1997). Entstehen Brüche im selben Strang in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander, entspiralisiert sich der DNA-Strang komplett und wird als einzelner Fragmentstrang frei. Liegen hingegen die Bruchstellen weiter voneinander entfernt, dann können sich keine Einzelfragmente bilden, da die Entspiralisierung der DNA-Doppelhelix unterbrochen wird.

Bei stärkerer Schädigung der DNA-Struktur durch ein Agens nimmt auch die Zahl der Einzelfragmente zu.

Somit liegt nach diesen Modellvorstellungen die Annahme zu Grunde, dass mit wachsender Zahl der DNA-Strangbrüche proportional die Intensität des Kometenschweifes zunimmt, nicht aber die Länge des Schweifes. Beobachtungen zufolge nimmt die Länge des Schweifes zumindest in der neutralen Protokollversion, lediglich anfangs mit wachsendem Schaden zu, erreicht aber schnell ein Maximum, welches von den elektrophoretischen Bedingungen bestimmt wird.



**Abbildung 6: Kometen in A-549 Zellen**

Die Abbildungen zeigen verschiedene Stufen von DNA-Migration in A-549 Zellen bei 400facher Vergrößerung. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt.

**A)** keine DNA-Migration in Form eines Kometen erkennbar. A-549 Zellen wurden mit Aqua dest. inkubiert.

**B)** die DNA-Migration nach einer Exposition der Zellen gegenüber B[a]P 25 µmol/L.

**C)** nach einer Exposition gegenüber B[a]P 50 µmol/L.

Vorteile des Cometassays sind die geringe benötigte Zellzahl, die kostengünstige und schnelle Durchführbarkeit und die Möglichkeit der Identifikation von DNA-Schäden auf Einzelzellniveau. Dabei ist eine sehr hohe Empfindlichkeit des Testsystems gegeben, welches eine Erkennung von bis zu einigen hundert Brüchen pro Zelle ermöglicht (Collins et al., 1997).

Bis heute wurde eine Vielzahl von DNA-schädigenden Substanzen mit dem Cometassay untersucht (Faust et al., 2004; Mersch-Sundermann et al., 2004; Knasmüller et

al., 2004; Rojas et al., 1999; Faibairn et al., 1995; Tice, 1995). Dabei hat sich gezeigt, dass praktisch mit allen eukaryotischen Zellen gearbeitet werden kann.

Apoptotische Zellen können anhand ihres abweichenden Erscheinungsbildes mit dem Cometassay zum Teil detektiert werden. Sie weisen im Vergleich einen kleinen Kopf mit diffusem, fächerartigem Schweif auf. Große Köpfe mit schmalem Schweif kennzeichnen nekrotische Zellen, sie sind vom Aussehen her kaum von tatsächlich genotoxisch geschädigten Zellen zu unterscheiden (Tice et al., 2000).

Es gilt also zu beachten, dass zytotoxische Substanzen zum Absterben der behandelten Zellen führen können und so eine Degradierung der DNA induzieren, die nicht auf eine direkte Interaktion der Testsubstanz oder ihrer Metabolite beruht. Aus diesem Grund muss vor einer Testung ein Zytotoxizitätseffekt ausgeschlossen werden, da sonst falsch positive Ergebnisse resultieren können (Elia, 1994; Schwaab, 2005).

Uhl et.al. (1999) entwickelten ein Standardprotokoll zur Durchführung des Cometassay, dessen Methoden in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurden.

### **2.2.2.2 Durchführung**

#### **Vorbereitung der Objektträger**

Zunächst wurden die verwendeten Agaroselösungen hergestellt. Für den jeweiligen Versuchsansatz wurden Agaroselösungen in den Konzentrationen NMP 0,7%, LMP 0,5% und NMP 1% angefertigt. Dazu wurde PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) auf 120 °C erhitzt und die Agarose in der entsprechenden Konzentration unter Rühren gelöst. Im Anschluss wurden die Agaroselösungen auf 40 °C temperiert und auf die Objektträger gebracht.

Die hierfür benötigte Menge an angerauten Objektträgern wurde zuvor durch spülen in einem Ethanol/Essigsäuregemisch (Verhältnis 1:1) gereinigt und entfettet. Nun wurde die erste Agaroseschicht (NMP 1 %) mit 85 µl auf die vorbereiteten Objektträger pipettiert und mit Hilfe eines Deckgläschens gleichmäßig verteilt. Um die Agarose aushärten zu lassen, wurden die Objektträger für 24 h im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet.

Am nächsten Tag wurde nach dem Entfernen des Deckgläschens, die zweite Schicht Agarose (NMP 0,7 %) aufgetragen und wiederum mittels Deckgläschen gleichmäßig

verteilt. Danach folgte eine 15 minütige Aufbewahrung im Kühlschrank um die Agaroseschicht abkühlen zu lassen.

### Aufarbeitung der Zellkultur

Von den in der Zellkultur behandelten Zellen wurde unter sterilen Bedingungen das Medium abgesaugt und anschließend die A-549 Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen.

Nachdem der Puffer entfernt wurde, erfolgte die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Wells mittels Trypsinierung. Dazu wurden je 250 µl Trypsin in einer Konzentration von 0,05 % in jedes Well pipettiert und anschließend bei 37 °C für 5 min inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde anschließend je 750 µl Kulturmedium in die Wells der Zellkulturplatten pipettiert. Hiernach wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt. Durch wiederholtes Aufziehen der Suspension mit einer Einmalspritze und Injektionsnadel wurden die Zellen vereinzelt. Um die Zytotoxizität zu bestimmen, wurde je ein Aliquot der behandelten Zellen mit Erythrosin-B versetzt (Erythrosin-B-Assay).

Dazu wurde Zellsuspension mit dem Farbstoff im Verhältnis 1:1 in einem Mikroröhrchen gemischt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Die Prozentzahl an ungefärbten Zellen wurde als Indikator für die Zellvitalität (% lebende Zellen) gewertet.

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Erythrosin-B-negative Zellen}}{\text{Erythrosin-B-pos. Zellen} + \text{Erythrosin-B-neg. Zellen}} \times 100$$

Der zweite Teil der Suspension, welcher in dem Zentrifugenröhrchen verblieb, wurde bei 1200 U/min für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand danach dekantiert. Das entstandene Pellet wurde nun in 150 µl 0,5 %iger LMP-Agarose resuspendiert und mittels Vortex kurz gemischt. Anschließend wurden 100 µl der Suspension auf die zuvor präparierten Objektträger aufgetragen. Diese wurden wiederum mit einem Deckgläschen abgedeckt und für mindestens 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert um die Agarose aushärten zu lassen.

## **Lyse**

Nachdem Entfernen der Deckgläschen, wurden die Objektträger in eine mit Lyselösung befüllte Schiefferdecker-Kammer überführt und für mindestens eine Stunde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

## **Elektrophorese**

Nachdem die Objektträger der Lyselösung entnommen und kurz mit Aqua dest. gespült wurden, erfolgte die Überführung in eine mit kalter, alkalischer Pufferlösung gefüllte Elektrophoresekammer.

Darin wurden die Objektträger für 20 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Elektrophorese. Die Kammer wurde bei 300 mA/25 V für 25 Minuten gestartet. Durch Zubzw. Entnahme von Puffer wurden die Elektrophoresebedingungen eingestellt. Mittels einer an die Kammer angeschlossenen Kühlanlage konnte der Puffer und die darin gelagerten Objektträger während des gesamten Vorganges auf ca. 0 °C gekühlt werden.

## **Neutralisation**

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Objektträger zurück in die Schiefferdecker-Kammer überführt. Diese wurde mit Neutralisationslösung befüllt und für 10 Minuten im Kühlschrank gelagert. Daran schloss sich ein erneutes Spülen der Objektträger mit Aqua dest. an.

## **Färbung**

Nach der Neutralisation folgte eine kurze Trockenzeit von ca. 5 Minuten. Hiernach folgte die Färbung mit Ethidiumbromid. Dazu wurden je Objektträger 80 µl Ethidiumbromid-Lösung aufgetragen und durch auflegen eines Deckgläschens gleichmäßig verteilt. Um das Austrocknen der Gele zu verhindern, wurden die so behandelten Objektträger in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert. Die Auswertung folgte nach maximal drei Tagen.

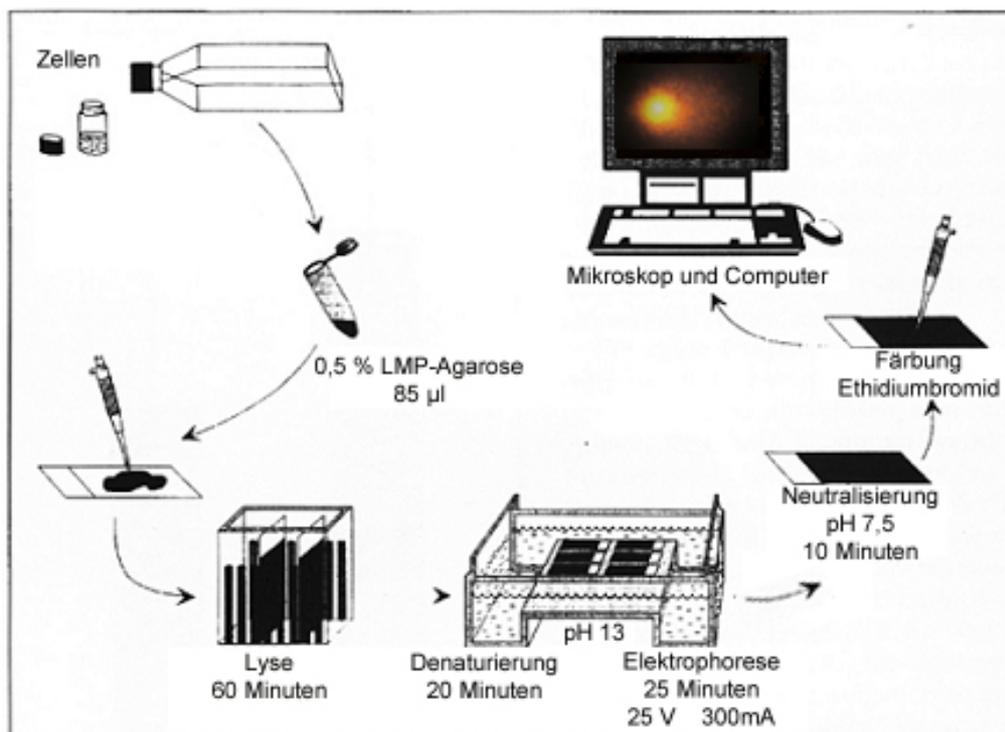
## Auswertung

Die Auswertung der Objektträger erfolgte bei 400facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop mit einer aufgesetzten Kamera in Verbindung zu einem Computer. Mit Hilfe einer Software (Comet 3.1 Europe, Kinetic Imaging) konnte das Ausmaß an DNA-Schädigung der A-549 Zellen ausgewertet werden. Es wurden 102 Zellen pro Objektträger zufällig ausgewählt und nach folgenden Parametern ausgewertet. Das Software Programm erlaubt die Differenzierung zwischen den Parametern: Schweiflänge ( $\mu\text{m}$ ), Anteil der DNA im Kometenschweif (in %) und Olive Tail Moment (OTM).

## Beurteilung der Zytotoxizität

Um falsch positive Ergebnisse, welche auf Zytotoxizität zurückzuführen sind zu vermeiden, sollte die maximale Konzentration einer Testsubstanz eine Zellvitalität von  $>75\%$  generieren (Henderson et al., 1998).

Alle Versuche zur Ermittlung der Gen-Antigentoxizität der untersuchten Terpene wurden bis zu einer durchschnittlichen Zellvitalität von  $>70\%$  durchgeführt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Durchführung des Cometassays** (modifiziert nach Plappert et al. 1995)

### 3. ERGEBNISSE

Im nachfolgenden Teil werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Gen- und Antigentoxizität der o.g. Terpene in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Dabei zeigt jeder Balken die arithmetischen Mittelwerte von je vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Mit dem Programm Microsoft Excel wurde die jeweilige Standardabweichung ermittelt.

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests nach Student ermittelt und anschließend ebenfalls mit Excel berechnet. Der Test wurde hierfür beidseitig durchgeführt (Therre, 2004).

Die gemittelten Ergebnisse wurden mit dem Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) verglichen, bei den Tests auf antigenoxische Wirkungen erfolgte ein Vergleich der Ergebnismittelwerte mit dem Wert der Referenzkontrolle.

In den Tabellen sind die Daten der vier voneinander unabhängigen Tests aufgeführt, einschließlich der arithmetischen Mittelwerte, Standardabweichung und t-Tests.

Die Ergebnisdarstellung des Cometassay erfolgte mit Hilfe des Parameters: „olive tail moment“ (OTM).

Der OTM kann auf verschiedene Arten kalkuliert werden, ist jedoch im Prinzip das Produkt aus Schweiflänge und relativer Schweifintensität:

$$\text{OTM} = l_{\text{mkms}} \times \text{DNA}_{\text{Schweif}}$$

wobei  $l_{\text{mkms}}$  den Abstand zwischen Massenmittelpunkt des Kopfes und der Massenmittelpunkt des Schweifes definiert.

Der OTM-Wert stellt einen Versuch dar, welcher die Informationen über Schweiflänge und Schweifintensität kombiniert. Er beinhaltet zum einen die Messung der geringsten Nachweismenge migrierter DNA, welche sich in der Schweiflänge widerspiegelt, und zum anderen die Messung der Menge relaxierter DNA bzw. der Menge von DNA-Fragmenten welche die DNA-Intensität des Schweifes kennzeichnet (Fairbairne, 1995).

Eine vollständige Auflistung der einzelnen Messwerte ist im Anhang dargestellt.

### 3.1 Gentoxische Effekte von Benzo[a]pyren

Zur Überprüfung des Testablaufes werden bei jedem Test eine Negativ- und eine Positivkontrolle mit getestet. In den vorliegenden Versuchen mit der Testsubstanz Benzo[a]pyren (B[a]p) diente DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Der Anstieg des OTM ist signifikant, wenn  $p < 0,05$  erreicht wird und eine Dosis – Wirkungsbeziehung ersichtlich ist. In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse des Cometassays für die ausgewählten Terpene (Limonen,  $\delta$ -3-Caren,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen) sowie für B[a]p dargestellt.

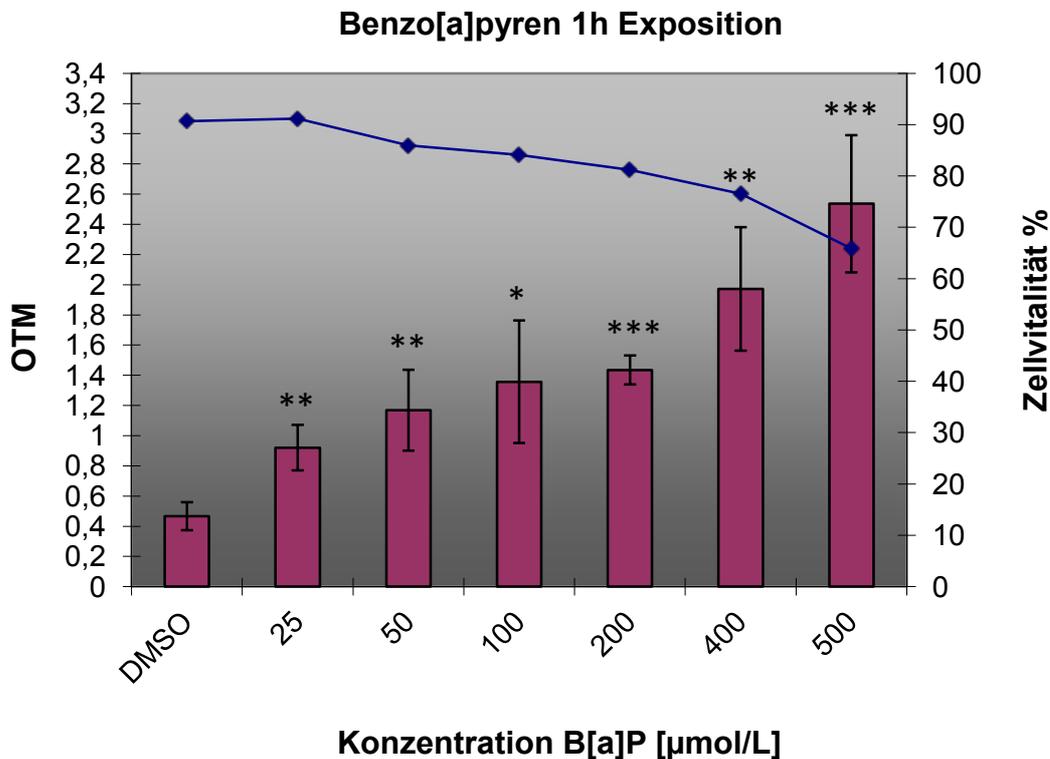
**Tabelle 8: OTM-Mittelwerte für B[a]P**

**OTM-Mittelwerte (MW) nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 25 $\mu$ mol/L - 500 $\mu$ mol/L Benzo[a]pyren (1h). Anzahl der Experimente (n), Standardabweichung (STABW) und Vitalität (%).**

	n	MW	STABW	Vitalität (%)
<b>DMSO</b>	4	0,47	0,09	90,69
<b>25<math>\mu</math>mol/L</b>	4	0,92	0,15	91,16
<b>50<math>\mu</math>mol/L</b>	4	1,17	0,26	85,96
<b>100<math>\mu</math>mol/L</b>	4	1,36	0,41	84,10
<b>200<math>\mu</math>mol/L</b>	4	1,43	0,10	81,21
<b>400<math>\mu</math>mol/L</b>	4	1,97	0,41	76,56
<b>500<math>\mu</math>mol/L</b>	4	2,53	0,45	65,87

In Abbildung 8 ist die DNA – Migration in A-549 Zellen nach einstündiger Exposition gegenüber 25–500 $\mu$ mol/L B[a]P dargestellt. Zur Darstellung der Dosis – Wirkungsbeziehung von der Testsubstanz im Cometassay wurde als Parameter für die Schädigung der Zellen der OTM herangezogen. B[a]p induzierte einen signifikanten Anstieg des OTM. Für die Lösungsmittelkontrolle DMSO ergab sich ein OTM von  $0,47 \pm 0,10$ . Die niedrigste untersuchte B[a]P-Konzentration (25 $\mu$ mol/L) induzierte einen OTM von  $0,92 \pm 0,15$  und die höchste untersuchte Konzentration von (500  $\mu$ mol/L) einen OTM von  $2,53 \pm 0,45$ . Bei einer Konzentration von 200 $\mu$ mol/L B[a]P erreichte der OTM einen Wert von  $1,43 \pm 0,10$  und ist damit als Vergleich zur Lö-

sungsmittelkontrolle um das 3,04-fache erhöht. Diese Konzentration von 200µmol/L B[a]P wurde in den folgenden Versuchsreihen als Positivkontrolle verwendet. Die Zellvitalität blieb in den Konzentrationen bis 400µmol/L im Mittel über >70 % und gab somit keinen Hinweis auf eine relevante Zytotoxizität.



**Abbildung 8: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 25 – 500µmol/L B[a]P**

Die Balken stellen die Untersuchung von DNA – Brüchen (SCGE / Cometassay) in humanen A-549 Lungenzellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h Exposition gegenüber 25 – 500µmol/L B[a]P dar. Die Linie zeigt die Untersuchung der Zellvitalität (Erythrosin-B – Vitalfärbung) von humanen A-549 Zellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h gegenüber 25-500µmol/L B[a]P; OTM = olive tail moment; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; n = Versuchsanzahl (4), Lösungsmittelkontrolle: DMSO

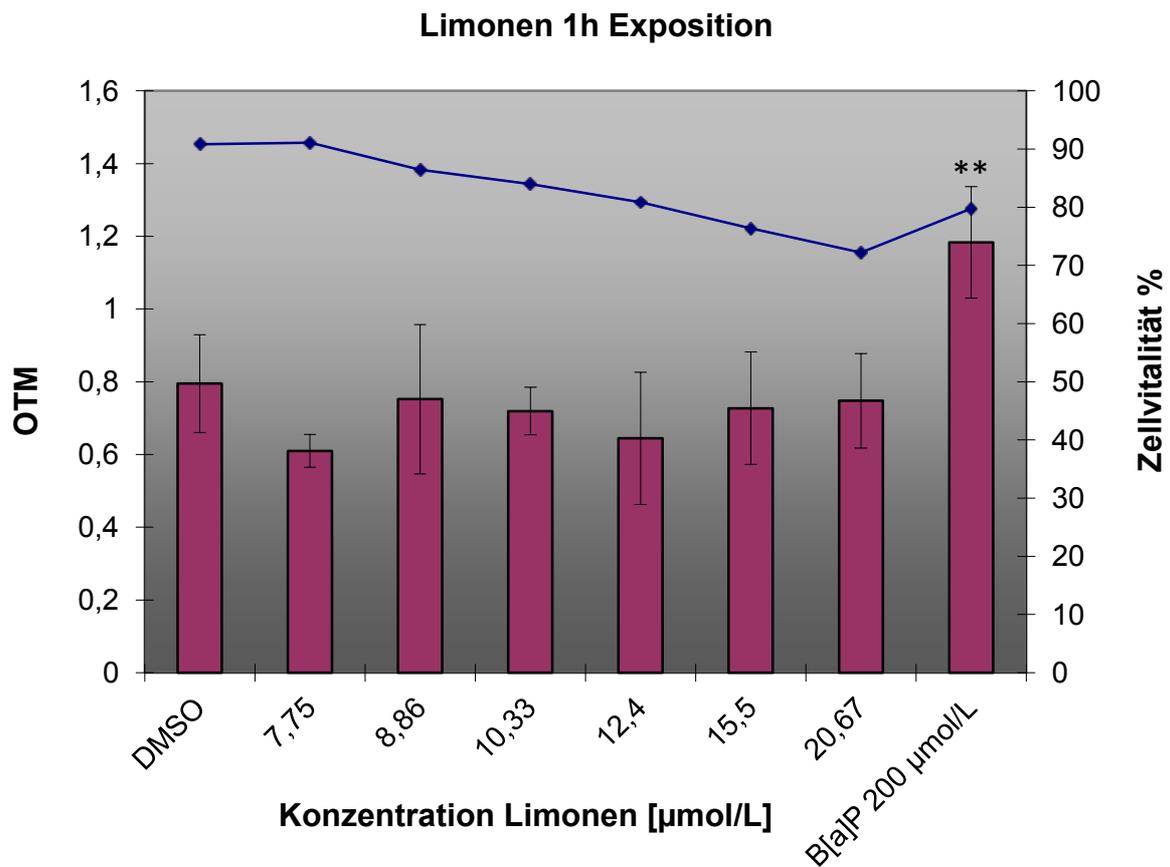
### 3.2 Gentoxische Effekte von Limonen

Tabelle 9: OTM-Mittelwerte für Limonen

OTM-Mittelwerte (MW) nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,75µmol/L – 20,67µmol/L Limonen (1h). Anzahl der Experimente (n), Standardabweichung (STABW) und Vitalität (%).

	n	MW	STABW	Vitalität (%)
<b>DMSO</b>	4	0,79	0,13	90,79
<b>7,75µmol/L</b>	4	0,61	0,05	91,09
<b>8,86 µmol/L</b>	4	0,75	0,20	86,43
<b>10,33µmol/L</b>	4	0,72	0,07	83,97
<b>12,40µmol/L</b>	4	0,64	0,18	80,86
<b>15,5µmol/L</b>	4	0,72	0,15	76,36
<b>20,67µmol/L</b>	4	0,75	0,13	72,21
<b>Bap 200µmol/L</b>	4	1,18	0,15	79,76

In Abbildung 9 ist die DNA-Migration in A-549 Zellen nach 1-stündiger Exposition gegenüber Limonen (Konzentration 7,75µmol/L – 20,67µmol/L) als OTM dargestellt. Die Werte hierfür sind auf der linken vertikalen Achse dargestellt. Zugleich ist die für die jeweilige Konzentration im Erythrosin-B-Test gemessene Zellvitalität in % aufgeführt. Die Werte entsprechen den %-Angaben der rechten vertikalen Achse. In Abhängigkeit von der Konzentration induzierte Limonen keinen signifikanten Anstieg des OTM. In der Vitalitätsbestimmung zeigte sich jedoch ein Abfall der Vitalität von 91,09% (bei einer Konzentration von 7,75µmol/L) auf 72,21% (bei einer Konzentration von 20,67µmol/L).



**Abbildung 9: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,75 – 20,67 $\mu\text{mol/L}$  Limonen.**

Die Balken stellen die Untersuchung von DNA-Brüchen (SCGE / Cometassay) in humanen A-549 Lungenzellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h Exposition gegenüber 7,75 – 20,67 $\mu\text{mol/L}$  Limonen dar. Die Linie zeigt die Untersuchung der Zellvitalität (Erythrosin-B – Vitalfärbung) von humanen A-549 Zellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h gegenüber 7,75–20,67 $\mu\text{mol/L}$  Limonen; OTM = olive tail moment;

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; n = Versuchsanzahl (4); Lösungsmittelkontrolle = DMSO; Positivkontrolle = 200 $\mu\text{mol/L}$  B[a]P

### 3.3 Gentoxische Effekte von $\delta$ -3-Caren

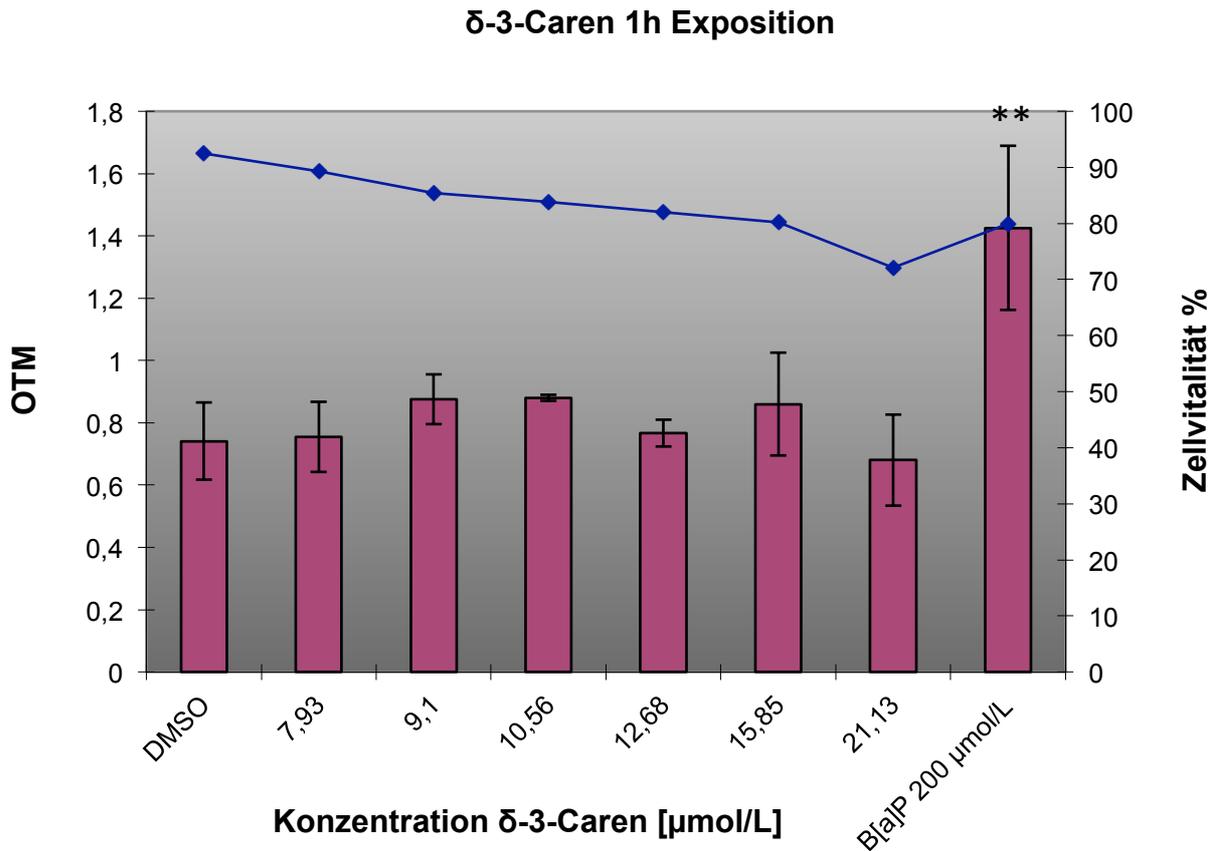
Tabelle 10: OTM-Mittelwerte für  $\delta$ -3-Caren

OTM-Mittelwerte (MW) nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,93 $\mu$ mol/L – 21,13 $\mu$ mol/L  $\delta$ -3-Caren (1h). Anzahl der Experimente (n), Standardabweichung (STABW) und Vitalität (%).

	n	MW	STABW	Vitalität (%)
DMSO	4	0,77	0,12	92,48
7,93 $\mu$ mol/L	4	0,75	0,11	89,34
9,10 $\mu$ mol/L	4	0,88	0,08	85,46
10,56 $\mu$ mol/L	4	0,88	0,01	83,85
12,68 $\mu$ mol/L	4	0,77	0,04	82,03
15,85 $\mu$ mol/L	4	0,86	0,17	80,23
21,13 $\mu$ mol/L	4	0,68	0,15	72,11
B[a]P 200 $\mu$ mol/L	4	1,43	0,26	79,95

In Abbildung 10 ist die DNA-Migration in A-549 Zellen nach 1-stündiger Exposition gegenüber  $\delta$ -3-Caren (Konzentration 7,93 $\mu$ mol/L-21,13 $\mu$ mol/L) als OTM dargestellt. Die Werte hierfür sind auf der linken vertikalen Achse dargestellt. Zugleich ist die für die jeweilige Konzentration im Erythrosin-B-Test gemessene Zellvitalität in % aufgeführt. Die Werte entsprechenden %-Angaben der rechten vertikalen Achse. In Abhängigkeit von der Konzentration induzierte  $\delta$ -3-Caren keinen signifikanten Anstieg des OTM.

In der Vitalitätsbestimmung zeigte sich jedoch einen Abfall der Vitalität von 89,34% (bei einer Konzentration von 7,93 $\mu$ mol/L) auf 72,11% (bei einer Konzentration von 21,13 $\mu$ mol/L).



**Abbildung 10: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,93 – 21,13μmol/L δ-3-Caren.** Die Balken stellen die Untersuchung von DNA-Brüchen (SCGE / Cometassay) in humanen A-549 Lungenzellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h Exposition gegenüber 7,93 – 21,13μmol/L δ-3-Caren dar. Die Linie zeigt die Untersuchung der Zellvitalität (Erythrosin-B – Vitalfärbung) von humanen A-549 Zellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h gegenüber 7,93 - 21,13μmol/L δ-3-Caren. OTM = olive tail moment; \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; n = Versuchsanzahl (4); Lösungsmittelkontrolle = DMSO; Positivkontrolle = 200μmol/L B[a]P

### 3.4 Gentoxische Effekte von $\alpha$ -Pinen

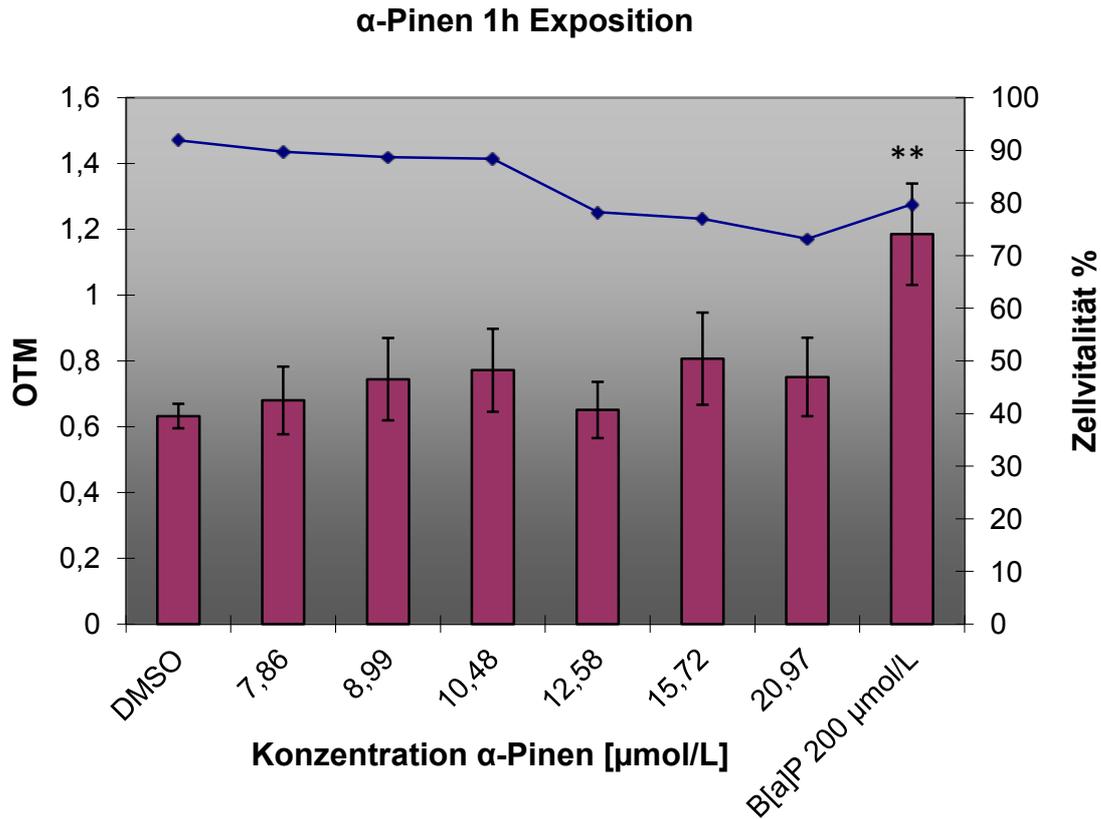
Tabelle 11: OTM-Mittelwerte für  $\alpha$ -Pinen

OTM-Mittelwerte (MW) nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,86 $\mu$ mol/L – 20,97 $\mu$ mol/L  $\alpha$ -Pinen (1h). Anzahl der Experimente (n), Standardabweichung (STABW) und Vitalität (%).

	n	MW	STABW	Vitalität (%)
DMSO	4	0,77	0,04	91,93
7,86 $\mu$ mol/L	4	0,68	0,10	89,77
8,99 $\mu$ mol/L	4	0,74	0,12	88,72
10,48 $\mu$ mol/L	4	0,77	0,13	88,43
12,58 $\mu$ mol/L	4	0,65	0,09	78,27
15,72 $\mu$ mol/L	4	0,81	0,14	77,03
20,97 $\mu$ mol/L	4	0,75	0,12	73,18
B[a]P 200 $\mu$ mol/L	4	1,19	0,15	79,76

In Abbildung 11 ist die DNA-Migration in A-549 Zellen nach 1-stündiger Exposition gegenüber  $\alpha$ -Pinen (Konzentration 7,86 $\mu$ mol/L – 20,97 $\mu$ mol/L) als OTM dargestellt. Die Werte hierfür sind auf der linken vertikalen Achse dargestellt. Zugleich ist die für die jeweilige Konzentration im Erythrosin-B-Test gemessene Zellvitalität in % aufgeführt. Die Werte entsprechen den %-Angaben der rechten vertikalen Achse. In Abhängigkeit von der Konzentration induzierte  $\alpha$ -Pinen keinen signifikanten Anstieg des OTM.

In der Vitalitätsbestimmung zeigte sich jedoch einen Abfall der Vitalität von 89,77% (bei einer Konzentration von 7,86 $\mu$ mol/L) auf 73,18% (bei einer Konzentration von 20,97 $\mu$ mol/L).



**Abbildung 11: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,86 – 20,97 μmol/L α-Pinen.**

Die Balken stellen die Untersuchung von DNA-Brüchen (SCGE / Cometassay) in humanen A-549 Lungenzellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h Exposition gegenüber 7,86 - 20,97 μmol/L α-Pinen dar. Die Linie zeigt die Untersuchung der Zellvitalität (Erythrosin-B – Vitalfärbung) von humanen A-549 Zellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h gegenüber 7,86 – 20,97 μmol/L α-Pinen. OTM = olive tail moment;

\*:  $p > 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; n = Versuchsanzahl (4); Lösungsmittelkontrolle = DMSO; Positivkontrolle = 200 μmol/L B[a]P

### 3.5 Gentoxische Effekte von $\beta$ -Pinen

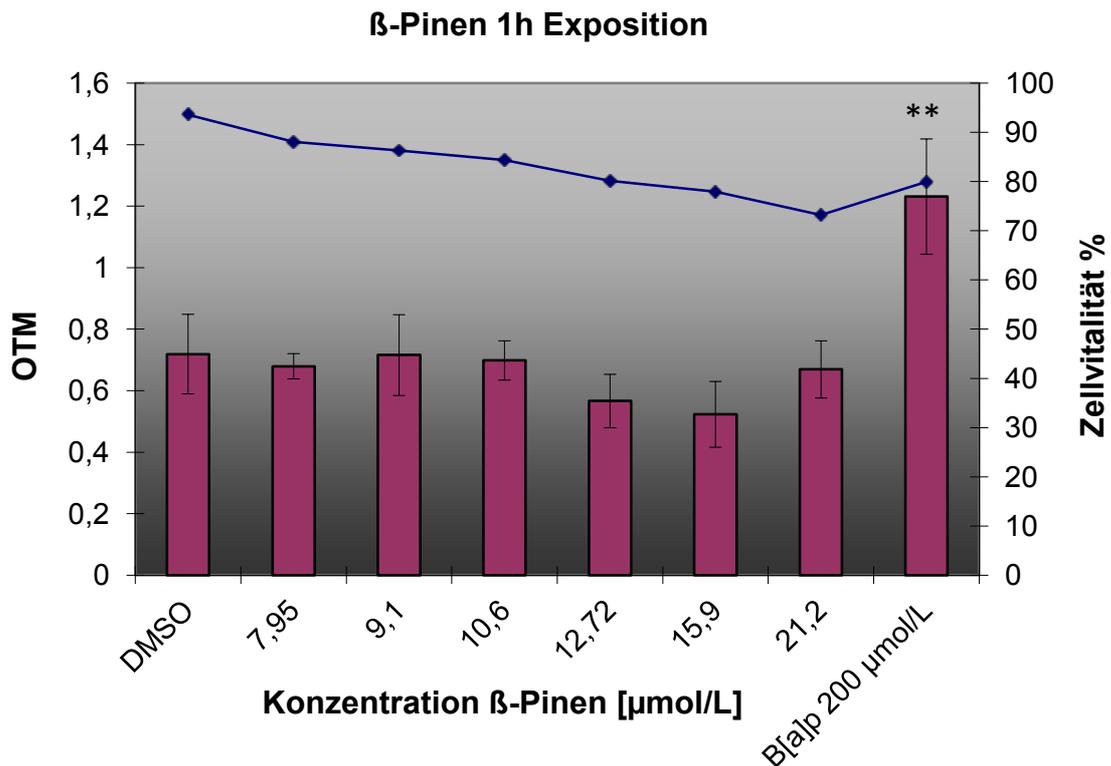
Tabelle 12: OTM-Mittelwerte für  $\beta$ -Pinen

OTM-Mittelwerte (MW) nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,95 $\mu$ mol/L – 21,20 $\mu$ mol/L  $\beta$ -Pinen (1h). Anzahl der Experimente (n), Standardabweichung (STABW) und Vitalität (%).

	n	MW	STABW	Vitalität (%)
DMSO	4	0,72	0,13	93,61
7,95 $\mu$ mol/L	4	0,68	0,04	88,08
9,10 $\mu$ mol/L	4	0,72	0,13	86,30
10,60 $\mu$ mol/L	4	0,70	0,06	84,14
12,72 $\mu$ mol/L	4	0,57	0,09	80,14
15,90 $\mu$ mol/L	4	0,52	0,11	77,91
21,20 $\mu$ mol/L	4	0,67	0,09	73,21
B[a]p 200 $\mu$ mol/L	4	1,23	0,19	79,95

In Abbildung 12 ist die DNA-Migration in A-549 Zellen nach 1-stündiger Exposition gegenüber  $\beta$ -Pinen (Konzentration 7,95 $\mu$ mol/L – 21,20 $\mu$ mol/L) als OTM dargestellt. Die Werte hierfür sind auf der linken vertikalen Achse dargestellt. Zugleich ist die für die jeweilige Konzentration im Erythrosin-B-Test gemessene Zellvitalität in % aufgeführt. Die Werte entsprechenden %-Angaben der rechten vertikalen Achse. In Abhängigkeit von der Konzentration induzierte  $\beta$ -Pinen keinen signifikanten Anstieg des OTM.

In der Vitalitätsbestimmung zeigte sich jedoch einen Abfall der Vitalität von 88,08% (bei einer Konzentration von 7,95 $\mu$ mol/L) auf 73,21% (bei einer Konzentration von 21,20 $\mu$ mol/L).



**Abbildung 12: OTM nach Exposition von A-549 Zellen gegenüber 7,95 – 21,20μmol/L β-Pinen.**

Die Balken stellen die Untersuchung von DNA-Brüchen (SCGE / Cometassay) in humanen A-549 Lungenzellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h Exposition gegenüber 7,95-21,20μmol/L β-Pinen dar. Die Linie zeigt die Untersuchung der Zellvitalität (Erythrosin-B – Vitalfärbung) von humanen A-549 Zellen (Zellzahl  $1 \times 10^5$ ) nach 1 h gegenüber 7,95-21,20μmol/L β-Pinen. OTM = olive tail moment;

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; n = Versuchsanzahl (4); Lösungsmittelkontrolle = DMSO; Positivkontrolle = 200μmol/L B[a]p

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Risikobewertung von ausgewählten Terpenen als VOC-Emission aus Holz- und Holzwerkstoffen

Die Bedeutung flüchtiger organischer Verbindungen (volatile organic compound; VOC), insbesondere die Emissionen aus Holzprodukten in der Innenraumluft, rückt in den letzten Jahren zunehmend ins Interesse der Öffentlichkeit. Vor allem durch neue Bauweisen und verbesserte Isolierungsmaßnahmen, besonders aus Klimaschutzgründen, kommt es in neuen Gebäuden zu einer massiven Reduktion der Luftwechselraten. Gleichzeitig nimmt der Einsatz von Haushalts- und Hobbyprodukten, wie zum Beispiel Raumlufsprays und Reinigungsmitteln als zusätzliche Emissionsquelle zu. Der moderne Mensch verbringt zudem einen Großteil der Tageszeit in Gebäuden und atmet somit die ihn umgebende Raumluft ein.

Um die Toxizität von VOC näher zu untersuchen und somit grundlegende toxikologische Daten für eine gesundheitliche Bewertung holz- und holzwerkstofftypischer Emissionen in der Innenraumluft zu sammeln, wurde die Zytotoxizität und die Genotoxizität in humanen Lungenkarzinomzellen der Reihe A-549 nach Exposition der entsprechend Substanz mit Hilfe des Cometassays analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Terpene Limonen,  $\delta$ -3-Caren,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen getestet.

Die Untersuchungen wurden an einer humanen Tumorzelllinie aus der menschlichen Lunge (A-549, type-II-alveolar cell like lung carcinoma cells) durchgeführt. Für die Genotoxizitätsuntersuchungen wurden DNA – Strangbrüche in dem Cometassay studiert. Die biologischen Effekte wurden nach 1-stündiger direkter Exposition an der Zelloberfläche gemessen.

Insbesondere der Cometassay ist geeignet, Effekte umweltmedizinisch relevanter Expositionen zu erfassen. Er kann auf Grund der vergleichenden Daten als ein hochsensitiver Screeningtest betrachtet werden (Faust, 2004). Bis heute wurde eine Vielzahl von DNA-schädigenden Substanzen mit dem Cometassay untersucht (Faust et al., 2004; Mersch-Sundermann et al., 2004; Knasmüller et al., 2004; Rojas et al., 1999; Faibairn et al., 1995; Tice, 1995). Dabei hat sich gezeigt, dass praktisch mit allen eukaryotischen Zellen gearbeitet werden kann.

Apoptotische Zellen können anhand ihres abweichenden Erscheinungsbildes mit dem Cometassay zum Teil detektiert werden. Sie weisen im Vergleich einen kleinen Kopf mit diffusem, fächerartigem Schweif auf. Große Köpfe mit schmalem Schweif kennzeichnen nekrotische Zellen. Sie sind vom Aussehen her kaum von tatsächlich genotoxisch geschädigten Zellen zu unterscheiden (Tice et al., 2000).

Es gilt also zu beachten, dass zytotoxische Substanzen zum Absterben der behandelten Zellen führen können und so eine Degradierung der DNA induzieren, die nicht auf eine direkte Interaktion der Testsubstanz oder ihrer Metabolite beruht. Aus diesem Grund muss vor einer Testung ein Zytotoxizitätseffekt ausgeschlossen werden, da sonst falsch positive Ergebnisse resultieren können (Elia, 1994; Schwaab, 2005).

Die Zellreihe A-549 wurde in vielen Studien getestet und ist als Model zum Nachweis von zytotoxischen und mutagenen Effekten chemischer Verbindungen gut geeignet (Aufderheide und Mohr, 2000; Don Port Carero et al., 2001; Kreja und Seidel, 2002; Bekand et al., 2006; Scherdtle und Hartwig, 2006).

Der Vergleich des Parameters „olive tail moment“ (OTM) der in dieser Arbeit untersuchten Terpene zeigte, dass keine der im Cometassay getesteten Substanzen im Bereich der getesteten Konzentrationen signifikante dosisabhängige DNA-Schäden in den A-549 Zellen verursachten.

Die OTM-Werte waren im Vergleich zur getesteten Lösungsmittelkontrolle DMSO (Dimethylsulfoxid) nicht signifikant erhöht.

Hinweise auf mögliche genotoxische Effekte der Terpene ließen sich bei den hier verwendeten Konzentrationen also nicht nachweisen.

## 4.2 Vergleich der vorliegenden Studie im Kontext vorhandener Literatur

Bisher gibt es nur wenige Studien in welchen die Eigenschaften ausgewählter Terpene in Modellsystemen getestet wurden. Die Wirkung von  $\alpha$ -Pinen wurde anhand von *Salmonella typhimurium* Stämmen TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537 und TA1538 mit und ohne Aktivierung des S-9 Metabolismus getestet. Es zeigte sich keine Mutagenität bei Konzentrationen bis zu 1000  $\mu\text{g}/\text{Platte}$  (Gomes-Carneiro et al., 2005). Weiterhin zeigte eine Studie von Heck et al. (1989), dass  $\alpha$ -Pinen keine unkontrollierte DNA-Synthese in Rattenhepatozyten induzierte. Bei  $\beta$ -Pinen und Campher ergaben sich keine Anzeichen auf einen Schwester-Chromatid-Austausch (sister-chromatid exchange, SCE) in kultivierten Chinesischen Hamster Ovarzellen (Sasaki et al., 1989). Im Amestest wurde bei  $\delta$ -3-Caren ein positiver Effekt in *Salmonella typhimurium* Stämmen TA100 und TA102 bei einer verwendeten Konzentration von 2157  $\mu\text{g}$  und 4314  $\mu\text{g}/\text{Platte}$  berichtet, wobei sich jedoch keine Hinweise auf das Vorliegen von metabolisch aktivem Potential zeigten (Kurtzio et al., 1990). Weitere Daten für eine mögliche gentoxische oder mutagene Aktivität von  $\delta$ -3-Caren liegen bisher nicht vor.

In einer weiteren Studie von Gminski et al. (2010) wurden VOCs, welche typischerweise von Kiefernholz und OSBs emittiert werden, insbesondere ausgewählte Terpene und Aldehyde, auf ihr zytotoxisches und gentoxisches Potential in humanen A-549 Lungenzellen getestet. Um die Exposition der Zellen mit dem jeweiligen Agens via Gasphase zu erleichtern, wurde eine 250L Emissionskammer (Biologisches Kammeremissions- und Expositionssystem, BIKAS) mit einem Vitrocell<sup>®</sup>-System kombiniert. Die VOC Konzentration wurde mittels Gaschromatographen/Massendetektor (Gas Chromatography/Mass Selective Detector; GC/MSD) gemessen. Die biologischen Effekte wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, nach einer Expositionsdauer von einer Stunde mit Hilfe des Erythrosin-B-Testes (Zytotoxizität) und des Cometassays (Gentoxizität) gemessen. Zusammenfassend stellte sich bei dieser Studie heraus, dass die getesteten Terpene  $\delta$ -3-Caren und  $\alpha$ -Pinen, weder einen zytotoxischen, noch einen gentoxischen Effekt aufwiesen, wobei eine „worst-case“ Situation mit 13  $\text{m}^2/\text{m}^3$  Spanplattenauskleidung und einer gemessenen VOC-Konzentration von 80  $\text{mg}/\text{m}^3$  vorlag.  $\alpha$ -Pinen und  $\delta$ -3-Caren induzierten keine toxischen Effekte bei einer Konzentration von 1800  $\text{mg}/\text{m}^3$  bzw. 600  $\text{mg}/\text{m}^3$ . Somit konnten im Rahmen dieser Studie keine Hinweise auf mögliche ungünstige Effekte auf A-

549 Lungenzellen von VOCs und VOC-Gemischen detektiert werden. Die Konzentrationen der VOCs lagen hierbei um das  $10^2$  bis  $10^5$ -fache höher als in der normalen Innenraumlufte (Gminski et al., 2010).

Diese Ergebnisse sind also mit den Daten der vorliegenden Arbeit insoweit konform, dass auch hierbei keine genotoxischen oder zytotoxischen Effekte der getesteten Terpene ( $\alpha$ -Pinen und  $\delta$ -3-Caren) detektiert werden konnten.

In einigen *in vitro* Studien wurden verschiedene Parameter zum Nachweis gesundheitsschädlicher Wirkungen verschiedener Terpene an einem Probandenkollektiv untersucht. Hierbei lag das Augenmerk hauptsächlich auf Irritationen der Augen und des oberen Respirationstraktes. Bestimmt wurden zum Beispiel verschiedene Parameter der Lungenfunktion, Frequenz des Lidschlussreflexes oder spezielle Entzündungswerte in Blutproben. Alle diese Studien haben gemeinsam, dass sie einzelne Bestandteile der VOCs oder künstliche Gemische austesteten und damit nicht der realen Situation, wie sie in der Innenraumlufte vorliegt, gerecht werden (Mersch-Sundermann, 2007).

In einer Studie von Gminski et al. (2010) wurden mögliche chemosensorische, irritative und Geruchswahrnehmungseffekte nach Kurzzeitexposition von hochkonzentrierten VOC-Emissionen aus OSB-Platten an einem gesunden Probandenkollektiv gemessen.

In dieser Studie wurden 2 x 24 gesunde Probanden (Nichtraucher) über jeweils 2 Stunden in einer  $48 \text{ m}^3$ -Emissionskammer bei einem Luftwechsel von 1/h unter geringer körperlicher Belastung (Fahrradergometer mit 50 W Leistung) gegenüber den Holz- bzw. Holzwerkstofftypischen Emissionen exponiert. Die Expositionen erfolgten pro Studienteilnehmer insgesamt fünfmal innerhalb von zehn Wochen mit drei unterschiedlichen Expositionskonzentrationen und zwei Lösungsmittelkontrollen.

Die Kiefernholzplatten wurden fabrikneu und luftdicht verpackt kurz vor der Exposition im Handel erworben, um sie am Vortag des Experiments zur Einstellung der emissionsbedingten VOC-Konzentration in der Kammer zu platzieren. Bei OSB wurden produktionsfrische und emissionsdicht eingepackte Platten vom Hersteller eingesetzt. Während der Experimente wurden kontinuierlich Temperatur, relative Feuchtigkeit, Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ )- und TVOC-Konzentrationen in der Kammerluft gemessen. Zudem wurden die Konzentrationen der relevanten einzelnen VOC chemisch analysiert.

Die Studienteilnehmer wurden vor und unmittelbar nach jeder Exposition medizinisch untersucht. Neben dem aktuellen Allgemeinzustand wurden vor allem Zeichen von Augenreizungen und Reizungen der oberen Atemwege geprüft. Ferner wurde eine Lungenfunktionstestung vorgenommen und zur Ermittlung von Effekten auf die Augenbindehäute die Lidschlussfrequenz gemessen. Erfasst wurde außerdem Stickoxid (NO) in der Atemluft der Probanden als Zeichen allergischer und entzündlicher Prozesse und wegen möglicher Schleimhautreizungen die Schleimhautdurchblutung mittels einer kontinuierlichen optischen Rhinometrie.

Hierzu wie auch zur Erfassung subjektiver Befindungsstörungen sowie zur Klassifikation der Geruchswahrnehmung der Probanden wurden vielfach praktizierte und international anerkannte Verfahren eingesetzt.

Bei den Probanden zeigten sich nach der durchgeführten Expositionen im Vergleich zu den Negativkontrollen keine negativen gesundheitlichen Effekte; insbesondere keine Schleimhaut- und Augenreizungen sowie keine Veränderung der Lungenfunktion, auch wenn mit relativ hohen VOC-Konzentrationen exponiert wurde, denen Menschen in einem normalen Wohnumfeld nicht ausgesetzt sind. So lagen in der Studie die Kammerkonzentrationen der bicyclischen Terpene mit etwa  $10 \text{ mg/m}^3$  um das 5- bzw. 50-fache über den RW-II- bzw. RW-I-Werten, welche die Innenraumlufthygienekommission des Umweltbundesamtes mit  $2 \text{ mg/m}^3$  bzw.  $0,2 \text{ mg/m}^3$  festgelegt hat. Zieht man die Ergebnisse der mittlerweile zahlreichen Studien zum Vorkommen von VOC in privaten Wohnungen oder Häusern heran, so bedeuten Terpenkonzentrationen von etwa  $10 \text{ mg/m}^3$  eine Überschreitung innenraumbezogener Mittelwerte um das 100- bis 1000-fache.

Trotz der Exposition der Probanden gegenüber solch hohen Konzentrationen ließen sich keine klinischen Auffälligkeiten erkennen.

Vergleicht man die LOAEL (niedrigste Konzentration eines Stoffes, bei der unerwünschte Wirkungen auftreten) mit den Angaben zu den niedrigsten interessierenden Konzentrationen (NIK) nach AgBB ergeben sich aus den *in vitro*-Studien Sicherheitsabstände zwischen LOAEL und NIK von  $< 1:100$  bzw.  $< 1:1000$ .

Hinsichtlich der Geruchswahrnehmung wurde auf Basis der Europäischen Geruchsmissionsrichtlinie (GIRL) zwar ein deutlicher Wahrnehmungseffekt festgestellt, die Probanden empfanden den Geruch des Vollholzes und der OSB aber eher als angenehmen (Duft). Die Geruchswahrnehmung sank mit zunehmender Expositionsdauer.

Auch in der einzigen mit  $\alpha$ -Pinen als Einzelsubstanz durchgeführten kontrollierten Expositionsstudie von Falk et al. (1990) an gesunden Probanden, konnte bis zu einer  $\alpha$ -Pinen-Konzentration von  $450\text{mg}/\text{m}^3$  keine Veränderung der Lungenfunktion festgestellt werden.

Selbst nach einer lang andauernden arbeitsmedizinischen Terpenexposition ( $>100\text{mg}/\text{m}^3$ ) konnten keine signifikanten Beziehungen zwischen Terpenexpositionen und arbeitsplatzbezogenen Gesundheitsstörungen gesehen werden. Hierbei sollte jedoch kritisch angemerkt werden, dass Studien, die einen möglichen Zusammenhang zwischen  $\alpha$ -Pinen bzw. Terpenexposition und gesundheitlichen Effekt zu belegen meinen, methodische Mängel aufwiesen. Sie bedürfen somit einer Reevaluation bzw. Validierung durch Studien, die im Studiendesign dem Untersuchungsgegenstand angemessen sind, oder einer Bestätigung durch kontrollierte Expositionsstudien beim Menschen mit Erfassung klinischer Effektparameter (Mersch-Sundermann 2007).

Tierexperimentelle Studien, insbesondere jene von Kasanen et al. (1998) und Nielsen et al. (2005) bieten eine wissenschaftlich belastbare Grundlage für die Einschätzung eines irritativen, bronchokonstriktorisches und zentralnervös-atemdepressiven Potentials von  $\alpha$ -Pinen (Mersch-Sundermann 2007).

Hierbei zeigte sich, dass das (+)-Enantiomer des  $\alpha$ -Pinens irritative pulmonale Effekte hervorruft, während dies für das (-)-Enantiomer nicht bewiesen werden konnte. Aus den Untersuchungen kann geschlussfolgert werden, dass sich (+)- $\alpha$ -Pinen wie ein chemisch nicht reaktives sensorisches Irritanz verhält. Möglicherweise sind allosterische Effekte für die Inaktivität von (-)- $\alpha$ -Pinen am Irritanzrezeptor der trigeminalen Nervenendigungen verantwortlich (Mersch-Sundermann 2007).

Auf der Basis der Studienergebnisse von Nielsen et al. (2005) treten ZNS-Effekte im Sinne einer Atemdepression wenn überhaupt, dann in sehr hohen Expositionsdosen ( $>10\text{g}/\text{m}^3$ ) auf.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die bisherigen Studien zur Bewertung einer möglichen gentoxischen Wirkung bzw. gesundheitsschädigenden Wirkung von Terpenen aus VOC-Emissionen in der Innenraumluft keinen sicheren Hinweis

auf DNA-schädigendes Potential zeigen konnten. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten im Cometassay keine auffälligen Effekte nachgewiesen werden.

Die von Gminski et al. durchgeführte Modellstudie, bei welcher die Exposition von A-549 Zellen via Gasphase im Kammersystem und in Kombination mit dem Vitrocell®-System erfolgte, orientiert sich an den in der Realität vorliegenden Verhältnissen. Dies spiegelt die inhalative Aufnahme der VOC und damit auch der entsprechenden Terpene wider. Somit kann diese Studie sicher als Fortentwicklung der vorliegenden Arbeit betrachtet werden.

#### **4.3 Ist das verwendete Testmodell als Risikobewertung der ausgewählten Terpene ausreichend?**

Kritisch sollte angemerkt werden, dass eine Risikobewertung oder eine Aussage zur gesundheitlichen Bewertung von Terpenen in der Innenraumlufte mit Hilfe eines *in vitro* Kurzzeittestungen nicht sicher möglich sind. Hieraus Schlüsse über Effekte der Terpene auf humane Organ- oder Zellsysteme zu ziehen, wären lediglich wissenschaftlich basierende Spekulationen.

Es stellt sich ferner die Frage nach der Bioverfügbarkeit der Terpene im Kulturansatz, ob die Testsubstanzen überhaupt in *in vitro* Assays in den Zellkulturen verbleiben und dort Effekte an den Indikatorzellen ausüben können. Fragwürdig ist auch wie lange und wie weit die Testsubstanzen im 37°C warmen Kulturansatz von A-549 Zellen nach Applikation nachweisbar sind. Dieser Nachweis könnte mittels GC/MS erbracht werden. Je geringer die Nachweisbarkeit der Substanzen im *in vitro* Assay ist, umso kritischer sind negative Testergebnisse in Zellkulturansätzen zu betrachten.

Weiterhin sollte kritisch hinterfragt werden, in wieweit die Zelllinie A-549, eine humane Lungenkarzinomzelle, als Zielzelle für genetische Effekte von Terpenen geeignet ist. Zwar wurde die Zellreihe A-549 bereits häufig als Modell angewendet, jedoch scheint die Nutzung einer homogenen Zellreihe zur Beurteilung komplexer gentoxischer Effekte inhalativ oder oral aufgenommener Stoffe nur eingeschränkt sinnvoll zu sein. Eine mögliche Alternative wäre der Einsatz von Mischkulturen, wie sie der physiologischen Zellflora des Bronchialsystems entspricht. Auch wäre der Einsatz einer anderen Zielzelle des Nasopharyngealraumes, zum Beispiel Mukosazellen, denkbar.

Diese Zellen könnten mittels Tupferabstrich leicht und non-invasiv von Probanden gewonnen werden. Ferner könnten nasale Epithelzellen als Indikatorzellen für das genetische Bioeffektmonitoring eingesetzt werden (Glück und Gebbers, 2000).

In Untersuchungen von Varlverde et al. (1997) wurden neben Leukozyten auch bukkale und nasale Epithelzellen als Indikatorzellen eingesetzt, um DNA-Schäden durch inhalative Noxen aufzudecken.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Untersuchung schädigender Einflüsse von VOC auf komplexe Zellsysteme ist die nähere Analyse möglicher molekularbiologischer Effekte auf Genexpressionsebene. Auch mögliche Langzeiteffekte, die sich möglicherweise aus einer Exposition mit Terpenen auf bestimmte Zell- oder Organsysteme ergeben, sollten in weiteren Studien untersucht werden.

#### **4.4 Gesundheitliche Einschätzung der VOC-Emissionen**

Vom Ausschuss zur gesundheitlichen Bewertung von Bauprodukten (AgBB) wurden zur gesundheitlichen Einschätzung von VOC-Emissionen NIK-Werte (niedrigste interessierende Konzentration), analog zum englischen LCI (Lowest Concentration of interest) aufgestellt. Eine gesundheitliche Bewertung der Freisetzung von VOC aus Bauprodukten, wie auch aus Holz- und Holzwerkstoffen, soll heute auf der Grundlage von Emissionsmessungen in definierten Kammersystemen sowie sensorischen Prüfungen stattfinden. Die Aufstellung der NIK-Werte erfolgt dabei anhand von festgelegten Grundsätzen, wobei soweit verfügbar, der in Europa niedrigste Arbeitsplatzgrenzwert (LOEL) als Grundlage herangezogen wird. Bei Nicht-CMR-Stoffen wird über einen Sicherheitsfaktor von 100 aus dem LOEL ein kammerbezogener NIK Wert festgelegt.

Ungeachtet der Festlegung des AgBB (NIK-Werte) sind auch weiterhin Prüfungen zur human-toxikologischen Wirksamkeit von VOC und VOC-Komplexgemischen für eine tragfähige Risikoabschätzung notwendig. Dies gilt insbesondere dann, wenn Stoffe unter dem Verdacht stehen, genotoxisches und zytotoxisches Potential zu besitzen, da chronische Effekte im Niedrigdosisbereich diskutiert werden müssen. Die Gegebenheiten bei baustoffspezifischen VOC-Emissionen unter Kammerbedingungen sollten mit denen in realen Innenräumen verglichen werden, um regulatorische An-

sätze (wie etwa das AgBB-Schema) und Grenzwertfestlegungen aus konzeptioneller Sicht kritisch zu evaluieren und Fehleinschätzungen bei der Risikobewertung von VOC-Emissionen aus Holz- und Holzwerkstoffen zu vermeiden (Mersch-Sundermann, 2010).

In den bisherigen Studien sind gesundheitliche Risiken durch VOC, wie sie in Konzentrationen in Realräumen vorkommen, nicht zu erkennen. Ein gesundheitliches Risiko von Holz und Holzprodukten im Innenraum, eine sachgerechte Anwendung vorausgesetzt, ist also nicht zu erwarten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung flüchtiger organischer Verbindungen (volatile organic compound; VOC), insbesondere die Emissionen aus Holzprodukten in der Innenraumluft, rückt in den letzten Jahren zunehmend ins Interesse der Öffentlichkeit. Vor allem durch neue Bauweisen und verbesserte Isolierungsmaßnahmen, besonders aus Klimaschutzgründen, kommt es in neuen Gebäuden zu einer massiven Reduktion der Luftwechselraten. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, grundlegende toxikologische Daten für eine gesundheitliche Bewertung holz- bzw. holzwerkstofftypischer Emissionen und möglicher adverser Effekte der VOCs zu erheben.

Dazu wurden ausgewählte Terpene (Limonen,  $\delta$ -3-Caren,  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen) auf ihre genotoxische und zytotoxische Wirkung hin untersucht. Die Untersuchungen wurden an einer humanen Tumorzelllinie aus der menschlichen Lunge (A549, Typ-II-alveolar cell like lung carcinoma cells) nach direkter Exposition an der Zelloberfläche durchgeführt. Die biologischen Effekte wurden nach 1-stündiger Exposition mit Hilfe des Erythrosin-B-Testes (Zytotoxizität) und des Cometassays (Genotoxizität) gemessen.

Der Vergleich des Parameters „olive tail moment“ (OTM) der in dieser Arbeit untersuchten Terpene zeigte, dass keine der im Cometassay getesteten Substanzen im Bereich der untersuchten Konzentrationen signifikante dosisabhängige DNA-Schäden in den A-549 Zellen verursachten.

Die OTM-Werte waren im Vergleich zur getesteten Lösungsmittelkontrolle DMSO (Dimethylsulfoxid) nicht signifikant erhöht.

## 6. SUMMARY

Due to the massive reduction of air-change rates in modern, energy saving houses and dwellings, the contribution of volatile organic compound (VOCs) emissions from wood-based materials to indoor air quality has become increasingly important. To evaluate toxicity of VOC mixtures typically emitted from pine wood and oriented strand boards (OSB) and their main constituents (selected terpenes), cytotoxicity and genotoxicity were investigated in human A-549 lung cells.

Biological effects were recorded after direct exposure of cells for one hour and included cell viability analysis (erythrosine B-Assay) and determination of genotoxicity by single cell gel electrophoresis (Comet- Assay). Compared to the negative control (DMSO), neither cytotoxic nor genotoxic effects were observed.

## 7. LITERATURANGABEN

- Adgate J.L., Church T.R., Ryan A.D. et al. (2004): Outdoor, indoor and personal exposure to VOCs in children. *Environ Health Perspect* 112, 1386-1392
- AgBB (2005): Vorgehensweise bei der gesundheitlichen Bewertung der Emissionen von flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) aus Bauprodukten mit aktualisierten NIK-Werten. Ausschuss zur gesundheitlichen Bewertung von Bauprodukten.
- Aufderheide, M., Mohr U. (2000): CULTEX-an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne particulants at the air/liquid interphase. *Exp. Toxicol. Pathol.* 52, 265-270
- Baumann M., Battermann A., Zhang G.Z. (1999): terpene emissions from particleboard and medium-density fibreboards products. *Forrest products Journal* 49(9): 49-56
- Baumann M., Lorenz L., Battermann A., Zhang G.Z. (2000): Aldehyde emissions from particleboard a medium-density fiberboards products. *Forrest products Journal* 50(9): 75-82
- Bekand S., Winder C., Khalil C., Hayes A. (2006): A novel *in vitro* exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *J. Environ. Monito.* 8, 100-115
- Belitz H.D., Grosch W. (1992): Sensorische Eigenschaften von Aromastoffen aus der Lipidperoxidation, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* 187.
- Bloemen H.J.T., Burn J. (1993): *Chemistry and Analysis of Volatile Organic Compounds in the Environment*. Blackie Academic & Professional, pp. 2-24
- Bornehag C.G., Sundell J., Hägerhed – Engman L., Sigsgaard T. (2005): Association between ventilation rates in 390 Swedish homes and allergic symptoms in children. *Indoor Air* 15: 275-280

- Broege M. (2001): Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter praxisbezogener Trocknungsbedingungen auf nachträgliche Emissionen geruchsintensiver Verbindungen. Ihd – Forschungsbericht, pp. 1-40
- Brendler-Schwaab, Hartmann A., Pfuhler S., Speit G. (2005): The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20, 245-254
- Brown S.K. (1999): Chamber Assessment of Formaldehyde and VOC emissions from Wood-Based Panels. *Indoor Air* 9: 209-215
- Brown S.K. (2002): Volatile organic pollutants in new and established buildings in Melbourne, Australia. *Indoor air* 12 (1): 55-63
- Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz (2003) 46,346-352
- Collins A.R., Dobson V.L., Dusinka M., Kennedy G., Stetina R. (1997): The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375: 183-193
- Dalton P. (2002): Odor, irritation and perception of health risk. *International Archives in Occupational and Environmental Health* 75, 283-290
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1996): Terpentinöl. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 22. Lieferung. VCH-Verlagsgesellschaft. Weinheim
- Devos M., Platte F., Rouault J., Laffort P., Van Gemert L. J. (1990): Standardized human olfactory thresholds. Oxford:IRL Press at Oxford University Press, 1990,p. 1-165.
- Docherty K.S., Wu W., Lim Y.B., Zimmermann P.J. (2005): Contributions of organic peroxides to secondary aerosol formed from reactions of monoterpenes with O<sub>3</sub>. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 4049-4059.
- Don Porto Carero A., Hoe P.H.M., Verschlaeve L., Schoeters G., Nemery B. (2001): Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ. Mol. Mutagen* 37, 155-163

- Elias P.S. (1994): The toxicological evaluation of novel foods. In: Demand for Increased Knowledge in the Safety Evaluation of Novel Foods. OECD-Workshop. 12.-15.9.1994, Hohenheim.
- European Commission (2005): The INDEX project: Critical Appraisal of the Setting and Implementation for Health and Consumer Protection, Physical and Chemical exposure Unit, Ispra, Italy
- ECA (1997): European Collaborative Action „Indoor Air Quality and its Impact on Man“: Total Volatile Organic Compounds (TVOC) in Indoor Air Quality Investigations. Report No. 19 Eur. 17675 EN. European Commission, Joint Research Centre, Environment Institute. Pp. 1-7. Mutation Res. 339, 37-59
- ECA (1999): European Collaborative Action „Indoor Air Quality and its Impact on Man“: Sensory Evaluation of Indoor Air Quality. EUR. 18676. European Commission, Joint Research Centre, Environment Institute. Pp.1-73
- Edwards R., Jurveling J., Saarela K., Jantunen M. (2001): VOC concentrations measured in personal samples and residential indoor, outdoor and workplace microenvironments in EXPOLIS-Helsinki, Finland. Atmos Environ 35, 4531-4543
- EPA (2005): Indoor Air Facts No.4 (revised): Sick Building Syndrome (SBS). <http://www.epa.gov/iaq/voc.html>, Stand: Mai 2011
- Englund F., Nussbaum R. (2000): Monoterpenes in Scots Pine and Norway Spruce and their emission during kiln drying. Holzforschung 54(5): 449-456
- Falk A.A., Hagberg M.T., Lof A.E., Wigaeus-Hjelm E.M., Wang Z.P(1991): Human exposure to  $\delta$ -3-Carene: Toxicokinetics, effects on pulmonary function and occurrence of irritative and CNS symptoms. Toxicology and Applied Pharmacology 110, 198-205.
- Falk A.A., Hagberg M.T., Löf A.E., Wigaeus-Hjelm E.M., Wang Z. (1990): Uptake, distribution and elimination of  $\alpha$ -pinen in man after exposure by inhalation. Scan J work Environ Health 16, 372-378
- Falk Filipsson A. (1996): Short term inhalation exposure to turpentine: toxicokinetics and acute effects in men. Occup Environ Med 53, 100-105

- 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 bio-monitoring studies, *Mutat. Res.* 566: 209-229
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neil K.L. (1995): the comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339, 37-59
- Fengel D., Wegener G. (1989): *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1989. Pp. 182-222
- Giard, D.J., Aoronson S.A., Todaro G.J., Arnsein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423
- Glasius M., Lahaniati M., Calogirou A. et al. (2000): Carboxylic acids in secondary aerosols from oxidation of cyclic monoterpenes by ozone. *Environ Sci Technol* 2000; 34: 1001-1010.
- Glück U., Gebbers J.O. (2000): The Comet Assay of Nasal Epithelia: Measurement of DNA Damage for the Assessment of Genotoxic Air Pollution. *The Laryngoscope* Volume 110, Issue 1, pages 123–125
- Gminski R., Tang, T., Mersch-Sundermann V. (2010): Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A-549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicology Letters* 196, 33-41
- Gminski R., Marutzky R., Kevekordes S., Fuhrmann F., Bürger W., Hauschke D., Ebner W., Mersch-Sundermann V. (2010): Chemosensory irritation and pulmonary effects of acute exposure to emissions from oriented strand boards. *Human and Experimental Toxicology* 1-18
- Gomes-Carneiro M.R., Viana M.E.S., Felzenszwalb I., Paumgarten F.J.R. (2005): Evaluation of  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -terpinene and (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene in the Salmonella/microsome assay. *Food Chem. Toxicol.* 43, 247-252
- Groß J., *Leitfaden Umweltmedizin*, Urban und Fischer, München, Jena, 2001

- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlison B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R. (2003): Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51
- Hartmann A., Elhajouji A., Kiskins E., Poetter F., Martus H.J., Fjällman A., Frieauff W., Sutter W. (2001): Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the mikronukleus test. *Food and Chem Toxicol* 39, 843-858
- Hartmann A., Schumacher M., Plappert-Helbig U., Lowe P., Sutter W., Mueller L. (2004): Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 19; 51-59
- Heinzow B., Mohr S., Ploigt A. (2000) Chemische Einflussfaktoren. Teil 4 Organische Stoffe-Terpene. In: Beyer A, Eis D. (Hrsg.) *Praktische Umweltmedizin*. 1 6. Lieferung 1/2000. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. (1998): The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13, 89-94 et al., 1995
- Hodgson A.T., Rudd A.F., Beal D., Chandra S. (2000): Volatile organic compound concentrations and emission rates in new manufactured and site-built houses. *Indoor Air* 10(3): 178-192
- Hodgson A.T., Beal D., McIlvaine J.E.R. (2002): Source of formaldehyde, other aldehydes and terpenes in a new manufactured house. *Indoor Air* 12 (4): 235-242
- Hott U., Scheiblinger H., Marchl D., Braun P. (2004): Konzentrationsänderungen von VOC in Innenräumen im Zeitraum von 1983-2003- Konsequenz für statistisch basierte Bewertungsmodelle. *Umwelt, Gebäude & Gesundheit. Innenraumhygiene, Raumluftqualität und Energiesparung*, München. AGÖF.pp. 69-80
- Hu Q., Hill R.P. (1996): Radiosensitivity, apoptosis and repair of DNA double-strand breaks in radiation-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants treated at different dose rates. *Radiat res* 146, 636-645
- Hukkanen J, Lassila A, Päiväranta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, Pelkonen O, Raunio H. (2000): Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cyto-

chrome P450s in the human A-549 lung adenocarcinoma cell line. Citation Am J Respir Cell Mol Biol. 22(3):360-6.

Jensen B., Wolkoff P. (1996): VOCBASE-Odor and Mucous Membrane Irritation Thresholds and Other Physico-Chemical Properties. National Institute of Occupational Health, Copenhagen, National Agency for Housing and Building. (Version 2.1)

Jensen J.K., Larsen A., Molhave L., Hansen M.K., Knudsen B. (2001): health evaluation of volatile organic compounds (VOC) emissions from wood and wood-based materials. Archives of Environmental Health 56, 419-432

Jiang T., Gardner D.J., Baumann M. (2002): Volatile organic emissions arising from the hot-pressing of mixed-hardwood particleboard. Forrest Products Journal 52 (11/12): 66-77

Kasanen J.P., Pasanen A.L., Pasanen P. et al. (1999): Evaluation of sensory irritation of delta- $\delta$ -3-Carene and turpentine and acceptable levels of monoterpenes in occupational and indoor environmental. J Toxicol Environ Health Part a (1999) 56; 89-114

Kassie F., Knasmüller S. (2000): Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). Chem Biol Interact 127, 163-180

Kautiainen A. (1992): Determination of hemoglobin adducts from aldehyde formed during lipid peroxidation *in vitro*, Chem.-Biol. Interactions 83, 55-63

Kim S., Moon S.J. (2006): Evaluation of VOC emissions from building finishing materials using a small chamber and VOC analyser. Indoor Build Environ. 15, 511-523

Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnstrom G. (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutat Res., 363(2): 89-96

Knudsen H.N., Kjaer U.D., Nielsen P.A., Wolkoff P. (1999): Sensory and chemical characterization of VOC emissions from building products: impact of concentration and air velocity. Atmospheric Environment 33(8): 1217-1230

- Krause C., Schulz C. (1998): Aufenthaltszeiten der deutschen Bevölkerung im Innenraum, im freien, im Straßenverkehr. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 3: 249
- Kreja L., Seidel H. (2002): Evaluation of genotoxic potential of some microbial volatile organic compounds (MVOC) with the comet assay, the micronucleus assay and the HPRT gene mutation assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 513, 143-150
- Kurtio P., Kalliokoske P., Lampelo S., Jantunen M.J. (1990): Mutagenic compounds in wood-chip drying fumes. *Mutat. Res.* 242, 9-15
- Larsen A., Forst L., Funch L.W. (2000): Emission of Volatile Organic Compounds from Wood and Wood-based Materials. *Arbeitsbericht Danish Technological Institute. Wood Technology*, p. 70-71
- Lamy E (2008): MTBITC – induced apoptosis and cell cycle arrest of human hepatoma (HepG2) cells: A link between p53 and human telomerase? *Dissertation, Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie, JLU, Gießen*
- Lux W., Mohr S., Heinzow B., Ostendorp G. (2001): Belastung der Raumluft privater Neubauten mit flüchtigen organischen Verbindungen. *Bundesgesundheitsblatt* 44(6): 619-624
- Makowski M. (2003): Untersuchungen zur VOC-Emissionen aus Holzstoffen in der Innenraumluft. *Diplomarbeit Universität Hamburg, Fachbereich Biologie. 80 S.*
- Molhave L., Kjærgaard S.K., Hempel-Jørgsen A, et al. (2000): The eye irritation and odor potencies of four terpenes which are major constituents of the emissions of VOCs from nordic soft woods. *Indoor Air* 10, 315-318
- Ohlmeyer M., Makowski M., Schöler M. et al. (2006): Entwicklung von Konzepten zur Reduzierung von VOC-Emissionen aus Holz und Holzwerkstoffen unter Berücksichtigung des Herstellungsprozesses: Grundlagenuntersuchungen. *Bundesforschungsanstalt für Forst-und Holzwirtschaft Hamburg; Arbeitsbericht Nr. 2006/01*

- Österling O., Johanson K.J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291-298
- Makowski M. (2007): Untersuchung über die Emissionen flüchtiger organischer Verbindungen von OSB aus Kiefernholz (*Pinus sylvestris* L.). Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg.
- McDonal A., Gifford J., Dare P., Steward D. (1999a): Characterization of the condensate generated from vacuum-drying of radiata pine wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* 57, 251-258
- McDonal A., Gifford J., Dare P., Steward D. (2002): Assessment of air emissions from kiln-drying of radiata pine wood. *Holz als Roh- und Werkstoff* 60, 181-190
- McDonald A., Gifford J., Steward D., Dare P., Riley S., Simpson I. (2004): Air emission from timber drying: high temperature drying and re-drying of CGA treated timber. *Holz als Roh- und Werkstoff* 62(4): 291-302
- McDonald A., Steward D., Franich R. (1999b): Monoterpene composition of radiata pine (*Pinus radiata*) sapwood from a 13 progeny trial. *Holz als Roh- und Werkstoff* 57, 301-302
- Mersch-Sundermann V., Scholz H. (2001): Innenraumluft. Leitfaden Umweltmedizin - Befund, Diagnostik, Therapie, Prävention. Fischer Verlag, München, S.214-221
- Mersch-Sundermann V. Gesundheitliche Bewertung von  $\alpha$ -Pinen in der Innenraumluft: Aktueller Kenntnisstand. *Umwelt. Forsch Praxis* 2007; 12: 129-151.
- Miyamae Y., Iwasaki K., Kinase N., Tsuda S., Murakami M., Taka M., Sasaki Y.F. (1997): Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay: 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Res* 393, 107-113
- Mohr S. (1998): Neue Lasten durch ökologische Baustoffe? Vorkommen und Bewertung von Terpenen in der Innenraumluft. In: Behrens HB (Hrsg) *Aspekte der Wohnmedizin: gesundes Wohnen durch ökologisches Bauen?* Hannoversche Ärzte-Verlags-Union, Hannover, 61-101

- Münzenberg U. (2004): Der natürliche Luftwechsel in Gebäuden und seine Beurteilung bei Schimmelpilzschäden. Umwelt, Gebäude & Gesundheit: Innenraumhygiene, Raumluftqualität und Energieeinsparung, München. Pp. 262-271
- Oppl R. (1999): Flüchtige organische Stoffe (VOC) in der Raumluft von Bürogebäuden. Miljö-Chemie, Studie Nr.: 90829
- Phillips D.H. (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. Mutation Res 443, 139-147
- Plessas D. (1980): The Social costs of Air Pollution in the Greater Athen Region. Centre of Planning and Economic Research, Athen, 1980.pp.25-156
- Rehwagen M., Schlink U., Herbarth O.; (2003): Seasonal cycle of VOCs in apartments. Indoor Air Volume 13, Issue 3, pages 283–291
- Risholm-Sundmann M. (2002): VOC-Emissions from Wood Based Panels. Tagungsband „Umweltschutz in der Holzwerkstoffindustrie“, pp. 152-157
- Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. (1999): Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications J Chromat B, 722: 225-254
- Rosenberg C., Liukkonen T., Kileas-tarpila T. et al. (2002): Monoterpenes and wood dust exposures: work-related symptoms among Finnish sawmill workers. American Journal of Industrial Medicine 41, 38-53
- Rydberg B., Johanson K.J. (1978): Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, DNA Repair and Mechanisms (eds. Hanawalt E.C., Friedberg E.E., Fox C.F.), Academic Press, New York, 465-468
- Saarela K., Villberg K., Lukkarinen T. (2000): Emissions from Materials and Structures. Healthy Buildings 2000, Espoo, Finland.pp.35-50
- Sagunski H., Heinzow B. (2003): Richtwerte für die Innenraumluft: Bicyclische Terpene (Leitsubstanz  $\alpha$ -Pinen). Bundesgesundheitsblatt 46, 346-352
- Saltharnmer T., Wensing M. (1999): Emissionsprüfkammer und -zellen zur Charakterisierung der Freisetzung flüchtiger organischer Verbindungen aus Produkten für den Innenraum. Handbuch für Bioklima und Lufthygiene, (Eds.), pp. 1-18

- Saltharnmer T., Boehme C., Meyer B., Siwinski N. (2003): Release of primary compounds and reaction products from OSB. In: Tham K.W., Sekhar C., Cheong D.: Proceedings of Healthy Buildings 2003, Vol.1, p.160-165
- Savolainen H., Pääfli P. (1978): Effects on long term turpentine inhalation on rat brain protein metabolism. Chem Biol Interact 21: 271-276
- Saski Y.F., Imanishi H., Ohta T., Shirasu Y. (1989): Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchange in cultured Chinese hamster ovary cells. Mutat. Res. 226, 103-110
- Scheiblinger H., Hott U., Marchl D. et al. (2001): VOC-Konzentrationen in Innräumen des Großraums Berlin im Zeitraum von 1988-1999. Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 61: 26-38
- Scholz H., Santl H. (1999): Occurrence and assessment of selected volatile organic compounds (VOC) in indoor air. Proc Indoor Air 99 Vol 1: 481-486
- Schreiner H, Wetzel H, Kirbach I (2001): Innenraumluftbelastung deutscher Kindergärten mit flüchtigen organischen Verbindungen. Umweltmedizin in Forschung und Praxis 6 (3), 143-149
- Schwerdtle T., Hartwig A. (2006) Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. Mater.Sci.Eng.Technol. 37, 521-525
- Schulz N. (2003): Beurteilung von Bauprodukten durch chemische und sensorische Prüfung. Sensorische Prüfung von Produkten für den Innenraum Methoden-Geruchsstoffe-Bewertung, WKI-Bericht.
- Seppänen O., Fisk W.J., Mendell M. (1999): Association of Ventilation Rates and CO2 Concentrations with Health and Other Responses in Commercial and Institutional Buildings. Indoor Air9: 226-252
- Shmulsky R., Ingram L. (2000): Empirical prediction of VOC emissions from drying southern yellow pine lumber. Forest Products Journal 59(4)
- Shmulsky R. (2000a): Influence of lumber dimensions on VOC emissions from kiln-drying loblolly pine lumber. Forest Products Journal 50(3) 63-66

- Shemulsky R. (2000b): Influence by drying schedule on VOC emissions from kiln-drying loblolly pine lumber. *Forest Products Journal* 50(5) 45-49
- Shemulsky R. (2000c): End-grain influence on VOC emissions from kiln-drying loblolly pine lumber. *Forest Products Journal* 50(5) 21-23
- Singh N.P., Mc Coy 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, 184-191
- Speit G., Hartmann A. (2005): The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291, 85-95
- Therre C. (2004): Genotoxizität und Antigenotoxizität von *Daphne mezereum*, *Euphorbia resinifera* und *Rula graveolens* (HAB 2000) in humanen metabolisch kompetenten Hepatomzellen (Hep G2). Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Med. Fakultät der Ruprecht-Karls –Universität Heidelberg
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlison B., Hartman 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 Mutag* 35, 206-221
- Tice R.R., Strauss G.H. (1990): The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem cell* 13, 207-214
- Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cell measured using the „comet assay“. *Radiat Res* 122, 86-94
- Olive P.L., Banath J.P. (1993): Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to x-rays, bleomycin, etoposide and 125 IdUrd. *Int J Radiat Biol* 64,349-358
- Olive P.L., Durand R.E. (2005): Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry Part A*. 66A, 1-8
- Uhl M., Helma C., Knasmüller S. (1999): Single-cell gel electrophoresis assay with human-derived hepatoma (Hep G2). *Mutation Res* 468, 215-225

- Ullrich D., Weiland S. K., Seifert B. (1999): VOC in homes of children with asthma – a case- control study of indoor air quality. *Proc Indoor Air 99 Vol 4*:131–132
- VDI (1995): Verein Deutscher Ingenieure: Messen von Innenluftverunreinigungen- Allgemeine Aspekte der Meßstrategie. VDI Richtlinie Nr. 4300, in VDI- Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 5
- Wang W., Gardner D.J. (1999): Investigations of volatile organic compound press emissions during particleboard production. Part 1. UF-bonded southern pine. *Forest Products Journal 49 (3)*: 65-72
- Wang W., Garder D.J., Baumann M. (1999): Volatile organic compound hot-press emissions from southern pine furnish as a function of adhesive type. *Tappi International Environmental Conference, Nashville, Tennessee*.pp.935-948
- Wang W., Garder D.J., Baumann M. (2002): Volatile organic compound emissions during hot-pressing of southern pine particleboard: panel size effects and trade-off between press time and temperature. *Forest Products Journal 52(4)*: 24-3
- Wang D., Gardner D.L., Baumann M. (2003): Factors affecting volatile organic compound emissions during hot-pressing of southern pine particleboard. *Forest Products Journal 53(3)*: 65-72
- Wargocki P., Sundell J., Bischof W., et al. (2002): Ventilation and health in non-industrial indoor environments: report from a European Multidisciplinary Scientific Consensus Meeting (EUROVEN). *Indoor Air 12*: 113-128
- Weschler C.J., Schields H.C. (1997): Potential reactions among indoor pollutants. *Atmos Environ 1997*; 31. 3487-3495.
- Wolkoff P., Clausen P.A., Wilkins C.A., Nielsen G.D. (2000): Formation of strong airway irritans terpene/ozone mixtures. *Indoor Air 10*, 82-91.
- Wolkoff P. (2003): Trends in Europe to reduce the indoor pollution of VOCs. *Indoor Air 13*: 5-11
- Wolkoff P., Wilkins C.K., Clausen P.A., Nielsen G.D. (2006): Organic compounds in office environments-sensory irritation, odor measurements and the role of reactive chemistry. *Indoor Air 16 (1)*: 7-19

Wottrich R. (2003): Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel : Entwicklung und Einsatz eines realitätsnahen *in vitro* Lungenmodells. Universität Karlsruhe.

## 8. ANHANG

### 8.1 OTM-Werte und Zellvitalität nach 1 h Exposition gegenüber Benzo[a]pyren

	DMSO	25	50	100	200	400	500
Filename							
Test 1	0,57469835	0,8764853	1,04675894	1,16758241	1,38546758	1,89467586	2,8665432
Test 2	0,34679582	0,76498543	1,01392157	1,16678453	1,37845867	2,4566975	2,75564213
Test 3	0,47649835	1,1255684	1,56856540	1,9654266	1,39754628	2,0669875	1,8665421
Test 4	0,4673895	0,9156874	1,04576854	1,1275864	1,57846754	1,4698752	2,65584325
Mittelwert	0,46634551	0,92068163	1,16875361	1,35684498	1,43498502	1,97205902	2,53614267
Standardabw.	0,09333923	0,15077373	0,26697719	0,40615037	0,09597933	0,40908948	0,45461987
T-Test	0,00368332	0,00922215	0,01917927	6,8714E-06	0,00397895	0,00214788	
Vitalität %	90,69	91,16	85,96	84,10	81,21	76,56	65,87

## 8.2 OTM-Werte und Zellvitalität nach 1 h Exposition gegenüber Limonen

Filename	DMSO	7,75	8,86	10,33	12,4	15,5	20,67	B[a]P 200µmol/L
Test 1	0,60794118	0,59656863	0,78245098	0,65901961	0,63147059	0,58264706	0,63921569	1,00372549
Test 2	0,90254902	0,57519608	1,01392157	0,69931373	0,89196078	0,86607843	0,93666667	1,37637255
Test 3	0,88192875	0,67627451	0,52294118	0,81193831	0,45529412	0,85598108	0,71294118	1,15186275
Test 4	0,78687464	0,59182766	0,68819277	0,70627351	0,59811674	0,60428857	0,70199371	1,20064537
Mittelwert	0,79482339	0,60996671	0,75187662	0,71913628	0,64421055	0,72724878	0,74770430	1,18315153
Standardabw.	0,13438787	0,04514515	0,20499546	0,06528045	0,18198584	0,15478430	0,13009546	0,15363711
T-Test	0,064985951	0,739836791	0,364067062	0,235342594	0,534628327	0,632357805	0,009216151	
Vitalität %	90,79	91,09	86,43	83,97	80,86	76,36	72,21	79,76

### 8.3 OTM-Werte und Zellvitalität nach 1 h Exposition gegenüber $\delta$ -3-Caren

Filename	DMSO	7,93	9,1	10,56	12,68	15,85	21,13	B[a]P 200 $\mu$ mol/L
Test 1	0,60794118	0,80705882	0,82068628	0,87950980	0,7668574	0,82294118	0,47794118	1,3887463
Test 2	0,90254902	0,80872549	0,81656863	0,87009804	0,80862745	0,98763330	0,67107843	1,37637255
Test 3	0,6985746	0,58617647	0,9876453	0,89254902	0,70696078	0,64127451	0,80715686	1,15186275
Test 4	0,75483726	0,8162534	0,87657483	0,8765884	0,7857463	0,98746322	0,7657483	1,78463503
Mittelwert	0,74097551	0,75455355	0,87536876	0,87968632	0,76704798	0,8598280	0,68048119	1,42540415
Standardabw.	0,12355042	0,11232262	0,07969757	0,00943420	0,0435467	0,16507689	0,14654701	0,26307135
T-Test	0,87619229	0,12560713	0,11005018	0,71229038	0,29613472	0,55181954	0,00790857	
Vitalität %	92,48	89,34	85,46	83,85	82,03	80,23	72,11	79,95

#### 8.4 OTM-Werte und Zellvitalität nach 1 h Exposition gegenüber $\alpha$ -Pinen

Filename	DMSO	7,86	8,99	10,48	12,58	15,72	20,97	B[a]P 200 $\mu$ mol/L
Test 1	0,60794118	0,76960784	0,56931373	0,8235462	0,58264706	0,84529412	0,72068627	1,00372549
Test 2	0,59647365	0,5322769	0,85892157	0,5888972	0,7754902	0,88519608	0,87264706	1,37637255
Test 3	0,67735242	0,69931373	0,75117647	0,79847361	0,62607843	0,5988216	0,59877225	1,15186275
Test 4	0,64736455	0,71864734	0,79846376	0,87645360	0,6187364	0,8976453	0,8125364	1,209844
Mittelwert	0,63228295	0,67996145	0,74446888	0,77184265	0,65073802	0,80673927	0,7511605	1,1854512
Standardabw.	0,03711935	0,10282398	0,12481878	0,12622062	0,08530667	0,14039897	0,11927118	0,15405452
T-Test	0,43509345	0,16952152	0,11066696	0,11066696	0,71135855	0,08512579	0,13814899	0,00418326
Vitalität %	91,93	89,77	88,72	88,43	78,27	77,03	73,18	79,76

### 8.5 OTM-Werte und Zellvitalität nach 1 h Exposition gegenüber $\beta$ -Pinen

Filename	DMSO	7,95	9,1	10,6	12,72	15,9	21,2	B[a]P 200 $\mu$ mol/L
Test 1	0,60794118	0,65352941	0,78245098	0,64833333	0,5715634	0,56378143	0,6277451	1,00372549
Test 2	0,90254902	0,7264545	0,52294118	0,67803922	0,45529412	0,36431373	0,57490196	1,37637255
Test 3	0,65732545	0,6377451	0,81186275	0,79245098	0,66666667	0,59970588	0,79147059	1,15186275
Test 4	0,70715635	0,69917465	0,74635445	0,67482645	0,57236456	0,56472545	0,68255473	1,3928576
Mittelwert	0,718743	0,67922591	0,71590234	0,69841249	0,56647219	0,52313162	0,66916809	1,2312046
Standardabw.	0,12905821	0,04086343	0,13140074	0,06408986	0,08652579	0,10719017	0,09262662	0,18730305
T-Test	0,59398122	0,97639265	0,7906019	0,7906019	0,10462052	0,0599181	0,55776636	0,0054657
Vitalität %	93,61	88,08	86,3	84,34	80,14	77,91	73,21	79,95



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6166-1



9 17838351961661