

مطالعه آثار هیستوپاتولوژیک فیومهای جوشکاری الکتریکی در برونشیولها و ریه موش صحرایی (Rat)

✉ محمد رضا عرب Ph.D.*، فریا کاکری M.D.**، فریدون سرگلزایی اول Ph.D.**

* گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

** بیمارستان علی بن ابیطالب علیه السلام دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

تاریخ وصول: مهرماه ۸۴، تاریخ پذیرش: آذرماه ۸۴

چکیده

هدف: شناسایی تغییرات کمی و کیفی برونشیولها و آلوئلهای ریوی پس از مواجهه با این آلاینده‌ها

مواد و روشها: در این مطالعه که به روش تجربی انجام شده، تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر از نژاد Sprague Dawley انتخاب و به دو گروه آزمایش (۴۰ سر) و شاهد (۲۰ سر) تقسیم شدند. هر کدام از گروههای آزمایش و شاهد به زیر گروه‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ هفته ای تقسیم شدند. موشهای گروه آزمایش به مدت ۲ ساعت در روز و ۵ روز اول هفته در معرض آلاینده‌های جوشکاری قرار گرفتند. با توجه به گروه‌بندی از موشهای آزمایش و شاهد در زمان مقرر نمونه‌گیری و مطابق روشهای معمول بافت‌شناسی پاساژ داده شد و برشهای گرفته شده از بلوکهای پارافینی با رنگ آمیزیهای هماتوکسیلین و ائوزین، پاس، وان گیسون، آلسین بلو با $pH=2.5$ و لکتینهای PNA & WGA مطالعه شدند. ضخامت پوشش تنفسی در برونشیولها اندازه‌گیری شد و اطلاعات به کمک آزمون کروسکال والیس تجزیه و تحلیل شدند. میزان ذرات معلق و گازهای جوشکاری در اتاقک گاز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه به هم ریختگیهای شدیدی را در پوشش تنفسی برونشیولها از نظر هیپرکرومازی هسته‌ای، جابجایی هسته‌ها و هم چنین نظم آلوئلهای ریوی نشان داد. وضعیت سلولهای پوششی از نظر قطبیت سلولی و هم چنین سلولهای جامی شکل از نظر گلیکوزآمینوگلیکانها تغییر نشان داد. افزایش میزان رشته‌های کلاژن در اطراف برونشیولها و عروق خونی نشان دهنده تغییرات فیبروتیک بافت ریوی بود. اختلاف ضخامت پوشش تنفسی میان گروههای آزمایش و شاهد ۴ و ۸ هفته‌ای از نظر آماری معنی دار بود ($P<0.02$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پاسخ برونشیولها و آلوئلهای به آلاینده‌های جوشکاری از یک روند تطابقی تبعیت می‌کند، که شدت این پاسخها با افزایش زمان بیشتر می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آلاینده‌های جوشکاری، فیبروزیس، برونشیول، آلوئل

✉ آدرس مکاتبه: زاهدان، میدان مشاهیر، دانشکده پزشکی، بخش بافت‌شناسی،

E-mail: mr_arabz@yahoo.com

صندوق پستی ۹۸۱۶۵-۴۹۳

مقدمه

هنگام جوش قطعات فلزی به همدیگر به کمک جریان الکتریکی معمولاً گازهایی مثل ازن، دی اکسید کربن، مونو اکسید کربن، مونو اکسید نیتروژن و دی اکسید نیتروژن از محل جوشکاری متصاعد می‌شود که سبب افزایش میزان آلاینده‌ها در محیط کاری کارگران می‌شود؛ آن‌چنان که میزان آلاینده‌ها نسبت به استاندارد بسیار بیشتر می‌شود. همچنین بخارات فلزی متصاعد شده هنگام جوشکاری که علت آن افزایش درجه حرارت فلز تا 4000° سانتی‌گراد است، سبب افزایش میزان بخارات عناصر فلزی معلق مثل روی، آهن، مس و منگنز در هوای تنفسی می‌شود [۱]. اپی‌تلیوم تنفسی به‌عنوان یک سد فیزیکی - فیزیولوژیکی عمل می‌کند که نقش مهمی در پاسخ به این فیوم‌ها دارد و همچنین واسطه عملکردی داروها نیز است. مطالعات نشان داده‌اند که این پوشش همراه با سلولهای موجود در آن ضمن ایفای نقش مهمی در فیزیولوژی طبیعی تنفس، دچار تغییرات فراوانی در حالت بیماری از جمله آسم می‌شوند [۲]. مطالعات نشان داده‌اند که فیومهای جوشکاری با انهدام پوشش مخاطی موجب آزاد شدن مدیاتورهای التهابی فراوانی می‌گردند که سبب انسداد شدید مجاری هوایی می‌شود که این عارضه در بیماران قلبی - عروقی و ریوی نمود شدیدتری پیدا می‌کند. یکی دیگر از مکانیسمهای ایجاد ضایعه در ریه متعاقب تاثیر ذرات فلزی معلق، رها شدن رادیکالهای آزاد از پلی مورفونوکلترها مخصوصاً نوتروفیلها است. این رادیکالهای آزاد بیان بیشتری از سیتوکاینها و آنزیمهای آنتی اکسیدان را موجب می‌شوند [۳ و ۴]. مطالعه تیلور (Taylor) و همکاران، افزایش میزان عناصر التهابی و انهدام سد خونی - ریوی را متعاقب تاثیر گازهای جوشکاری بر ریه نشان داده است. انهدام این سد خونی ریوی سبب نشت مقداری آلبومین به فضای خارج عروقی می‌شود [۳]. تحریکات مخاطی گازهای جوشکاری، سبب بروز برونشیتهای مزمن در کارگران جوشکاری می‌شود [۳]. به نظر می‌رسد تحریکات مخاطی فیومها موجب مهاجرت سلولهای التهابی به ریه‌ها و آزاد شدن مدیاتورهایی

مثل اینترلوکینها می‌شوند، آزاد شدن این عوامل می‌تواند علت بخشی از مهار پاسخهای ایمنی و افزایش احتمال بروز عفونتهای جدید در ریه باشد [۵]. مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده اند که این گازها و ذرات فلزی معلق می‌توانند سلامت کارگران را به طور جدی به خطر اندازند [۶]. شناسایی آثار مضر این گازها و ذرات معلق فلزی و به خطر افتادن سلامت کارگران می‌تواند زنگ خطری باشد برای مدیران کارگاهها و کارخانه‌ها، چرا که مطالعات نشان داده است که با ارتقای سیستمهای تهویه در کارگاهها می‌توان خطرات آلودگی با این فیومها را کاهش داد [۷]. مطالعات جانگ (Jang) و همکاران نشان داده است که افزایش میزان ازن می‌تواند باعث افزایش میزان نوتروفیلها در مایع برونکوآلوئولار شود. ازن یکی از اکسید کننده‌های قوی موجود در فیومهای جوشکاری است که همچنین می‌تواند سبب افزایش میزان پرولیفراسیون سلولهای اپی تلیومی آلوئولها شود که این افزایش کاملاً وابسته به دوز بوده و می‌تواند در شرایط حاد منجر به انسداد مجاری هوایی شود [۸]. از آنجا که اپی تلیوم تنفسی به‌عنوان اولین سد فیزیکی است که با این فیومها تماس پیدا می‌کند، بنابراین توجه به آن برای درک بیشتر فیزیوپاتولوژی بیماریهای شغلی منطقی به‌نظر می‌رسد، بنابراین هدف این مطالعه شناسایی تغییرات کمی و کیفی برونشیلها به‌عنوان یکی از بخشهای مهم و حساس مجاری هدایتی هوا پس از مواجهه با این فیومها در یک مدل تجربی در شرایط کاملاً کنترل شده از نظر میزان آلودگی با این گازها و ذرات فلزی معلق بود.

مواد و روشها

تعداد ۶۰ سر موش صحرایی از نژاد Sprague Dawley با وزن 20 ± 20 انتخاب شدند و در ۲ گروه آزمایش (۴۰ سر) و شاهد (۲۰ سر) قرار گرفتند. هر کدام از زیر گروههای آزمایش و کنترل به چهار زیر گروه ۲، ۴، ۶ و ۸ هفته‌ای تقسیم شدند. تعداد موشها در هر زیر گروه شاهد و آزمایش به ترتیب ۵ و ۱۰ سر بود. حیوانات پس از سازش در محیط زندگی در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت (22 ± 2)

درجه سانتیگراد)، میزان رطوبت ۵۰ - ۴۵ درصد دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. موشهای گروه آزمایش به مدت ۲ ساعت (ساعات ۱۴-۱۲)، ۵ روز اول هفته (شنبه تا چهارشنبه) درون اتاقک گازی با حجم حدود یک متر مکعب در معرض فیومهای جوشکاری قرار گرفتند. سرعت جوشکاری با

۰/۱ mg/m³ اندازه گیری و ثابت نگهداری شد [۹]. با توجه به جدول زمانی از موشهای گروه کنترل و آزمایش نمونه‌گیری شد. این نمونه‌ها مطابق روش معمول در بافت شناسی پاساژ داده شدند و از بلوکهای پارافینی تهیه شده، مقاطعی با ضخامت ۵-۷ میکرومتر تهیه شد و با روشهای هماتوکسیلین ائوزین، پاس و ون گیسون و لکتینهای PNA و WGA و آلسین

جدول ۱ مقایسه متوسط ضخامت پوشش تنفسی برونشیولها در موش صحرایی پس از مواجهه با فیومهای حاصل از جوش الکتریکی آهن

گروهها	هفته ۲		هفته ۴		هفته ۶		هفته ۸	
	آزمایش	شاهد	آزمایش	شاهد	آزمایش	شاهد	آزمایش	شاهد
ضخامت پوشش تنفسی به میکرومتر	۱۳/۴۲۵	۱۵/۹	۱۲/۷	۱۷/۲۵	۱۵/۶	۱۵/۴۷۵	۱۲/۱۴	۱۶/۵۷
انحراف معیار	۲/۶	۳/۲۵	۳/۲۵	۴/۵۵	۳/۹۵	۴/۴۷۵	۲/۹۲۵	۵/۶
ارزش عددی (p)	N S		P<0.000		N S		P<0.02	

NS=nonsignificant

الکترودها، ۰/۱ سانتیمتر بر دقیقه و سرعت تعویض هوای درون اتاقک ۱۵-۱۲ بار در ساعت ثابت نگهداری شد. الکترودهای مورد استفاده الکترودهای آما ۲۰۰۰ و شدت جریان الکتریکی ۱۰۰ آمپر بود. میزان گازهای دی اکسید کربن، مونواکسید کربن، دی اکسید و مونواکسید نیتروژن در هوای تنفسی درون اتاقک پس از اندازه‌گیری با دکتورهای (Gastec, GV100s Japan) به ترتیب به میزان ۸.۲۸ ppm، ۰.۶ppm، ۵۹۲ppm، ۲۶.۶ppm ثابت نگهداری شد. همچنین میزان عناصر فلزی معلق در هوای تنفسی درون اتاقک گاز با کمک فیلترهای استاندارد (SKC, England) و پمپهای نمونه بردار فردی (SKC, EX96D, 2102 England) و دستگاه جذب اتمی برای عناصر فلزی آهن، منگنز، مس و روی به ترتیب به میزان ۰/۴ mg/m³، ۰/۱۵ mg/m³، ۰/۰۲ mg/m³ و

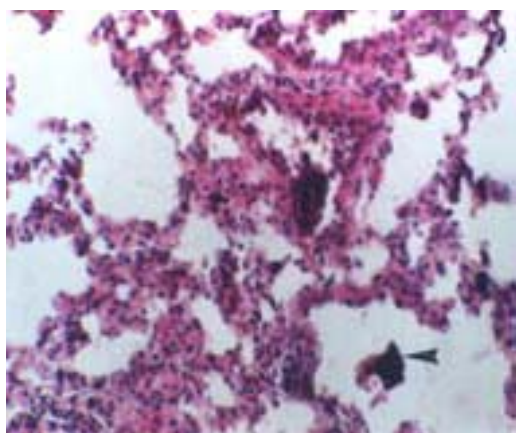
بلو ۲/۵ pH رنگ آمیزی شدند. بعد از کالیراسیون میکروسکوپ KF2 Zeiss به کمک اکولر مدرج و خط کش میکرومتری اقدام به اندازه‌گیری ضخامت اپی تلیوم تنفسی در برونشیولها با ابژکتیو ۴۰ شد. اطلاعات به دست آمده با نرم افزار آماری SPSS (ver. 10) به کمک آزمونهای کروسکال و ایس و مان ویتنی آنالیز شد و P<0.05 معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

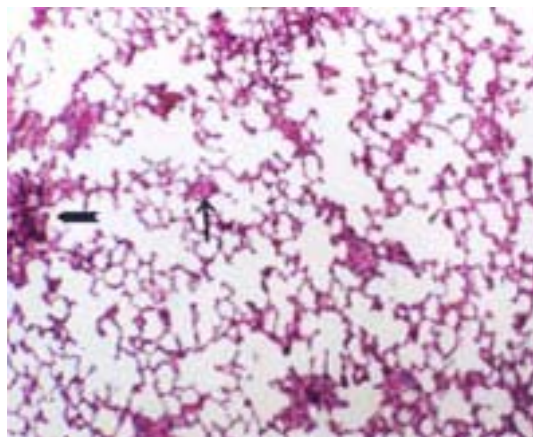
از هم گسیختگیهای سلولهای پوشش تنفسی در برونشیولها همراه با ریزش سلولهای در حال مرگ، از بین رفتن قطبیت سلولی از نظراسیدوفیلی و بازوفیلی نواحی مختلف سیتوپلاسم و همچنین هایپرکرومازی هسته‌ها و جابه‌جا شدن موقعیت مکانی آنها از ناحیه قاعده‌ای سلول و افزایش تعداد

سلولهای جامی از یافته‌هایی بود که در گروههای جوشکاری نسبت به گروههای شاهد کاملاً مشهود بود (شکلهای ۱ تا ۴). از بین رفتن نظم آلوئولی و همچنین دیواره‌های بین آلوئولی همراه با افزایش تعداد ماکروفاژها از یافته‌هایی بود که در آلوئولهای نمونه‌های جوشکاری نسبت به شاهد قابل مشاهده بود. افزایش تعداد سلولهای التهابی و تغییر واکنش سلولهای جامی شکل و سلولهای استوانه‌ای به لکئینها در گروه جوشکاری نسبت به شاهد و افزایش میزان رسوب مواد پاس مثبت در بافت بینابینی ریه از دیگر یافته‌های این تحقیق بود. شدت این تغییرات در تمام مواد فوق در گروههای ۸ هفته‌ای

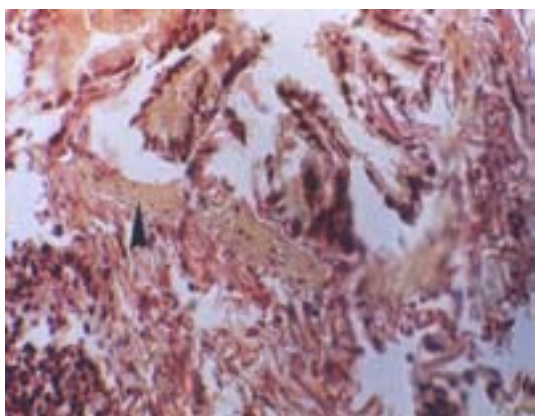
نسبت به دیگر گروهها بیشتر بود. (شکلهای ۵ تا ۸) نتایج حاصل از اندازه‌گیریهای کمی با تست غیر پارامتری کروسکال والیس نشان داد که ضخامت اپی تلیوم تنفسی در برونشیولها در گروه جوشکاری نسبت به شاهد تغییر می‌یابد و این تغییر از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.000$). آنالیز دو به دو اطلاعات به کمک آزمون مان ویتنی نشان داد که اختلاف ضخامت اپی تلیوم میان گروههای شاهد و جوشکاری ۴ هفته‌ای و شاهد و جوشکاری ۸ هفته‌ای از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.02$).



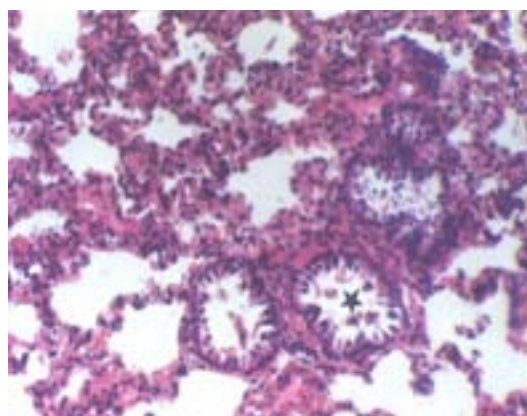
شکل ۲. از بین رفتن شدید نظم آلوئولی همراه با افزایش تعداد ماکروفاژها (نوک فلش) در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۸ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی: پاس، بزرگمایی: $\times 312$



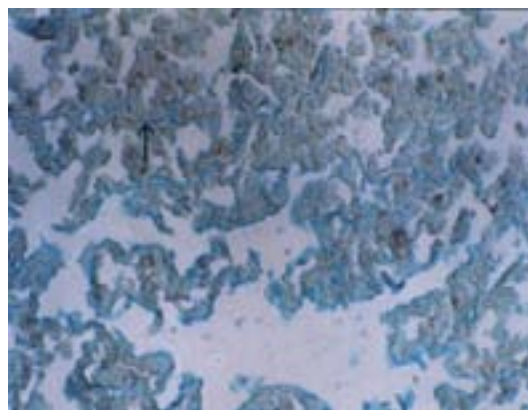
شکل ۱. شروع روند تغییرات واکنشی ریه‌ها به فیومهای جوشکاری (فلش ضخیم) و رسوب مواد پاس مثبت (فلش نازک) در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۲ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی: پاس، بزرگمایی: $\times 120$



شکل ۴. واکنش بافت ریوی به رنگ آمیزی وان گیسون (نوک فلش) برای نشان دادن رشته‌های کلاژن در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۸ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی وان گیسون، بزرگمایی: $\times 312$

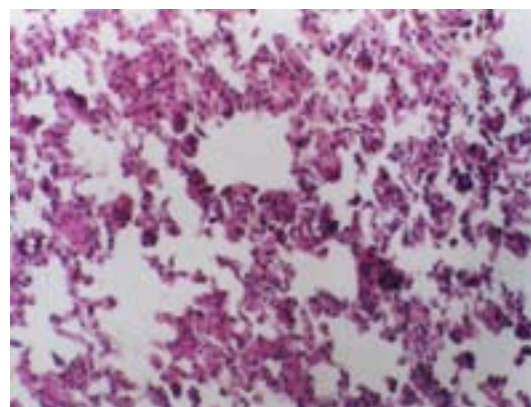
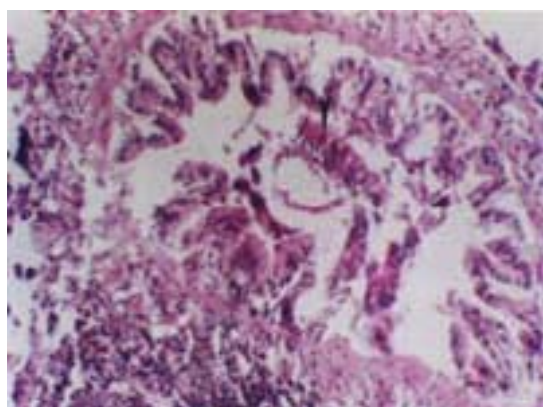


شکل ۳. حذف مژه‌های راسی همراه با از هم گسیختگی سلولی در پوشش برونشیول انتهایی (ستاره) در پاسخ به فیومهای جوشکاری در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۸ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی: پاس، بزرگمایی: $\times 312$



شکل ۶. کاهش پاسخ داربست ریه به آلسین بلو و پاسخ سلولهای پنوموسیتی به صورت پراکنده به لکتین (فلش) در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۶ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ‌آمیزی: PNA/Alcian blue (pH=2.5). بزرگنمایی: $\times 312$

شکل ۵. پاسخ داربست ریه به رنگ‌آمیزی آلسین بلو (فلش) برای ترکیبات اسیدی گلیکوزآمینوگلیکان در ریه. نمونه‌ای از گروه کنترل ۴ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ‌آمیزی: PNA/Alcian blue (pH=2.5). بزرگنمایی: $\times 312$



شکل ۸. انفیلتراسیون سلولهای آماسی در دیواره برونشیولها همراه با پاسخ پاس مثبت ساولهای جامی شکل در پوشش تنفسی برونشیولها (نوک فلش) در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۸ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ‌آمیزی پاس، بزرگنمایی: $\times 125$

شکل ۷. از هم گسیختگی دیواره‌های آلوئولی و افزایش تعداد ماکروفاژها در ریه. نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۸ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ‌آمیزی: پاس، بزرگنمایی: $\times 125$

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با این میزان آلودگی فیومها که بالاتر از حد استاندارد است، تغییرات کمی و کیفی فراوانی در اپی تلیوم تنفسی برونشیولها و همچنین ترکیب و نظم آلوئولی به وجود می‌آید. تغییراتی مانند هایپرکرومازی هسته‌ای، جابه‌جایی هسته‌ها، از بین رفتن پولاریته سلولهای پوششی و تغییر ماهیت موکوپلی ساکاریدهای سلولهای جامی شکل در پوشش تنفسی نشان از تغییرات دیسپلاستیک این اپی تلیوم دارد. به علاوه ریزش سلولی زیاد نشان دهنده نکروز

سلولهای پوششی در برونشیولها است. همچنین افزایش میزان رشته‌های کلاژن رنگ شده با رنگ‌آمیزی وان گیسون در این مطالعه، می‌تواند نشان دهنده تغییرات فیبروتیک بافت ریوی باشد. افزایش تعداد ماکروفاژهای آلوئولی و افزایش میزان سلولهای التهابی در اطراف مجاری هدایتی هوا و دیواره‌های بین آلوئولی نشان دهنده نیاز ریوی موجود به Clearance بالا برای مقابله با این فیومها است. مطالعات وارکس (Warrks) و همکارانش نشان داده است که افزایش میزان گازهای نیتروژن می‌تواند سبب افزایش میزان مهاجرت سلولهای التهابی به

از تنباکو و گازهای مثل SO₂ که از سوخته‌های فسیلی منشأ می‌گیرند می‌توانند ماهیت ترکیبات موکوسی در سلولهای جامی شکل را تغییر دهند [۲]. افزایش ضخامت اپی تلیوم تنفسی گزارش شده در این مطالعه همراه با افزایش میزان ریزش سلولهای پوشش تنفسی در برونش‌یولها می‌تواند انعکاسی از افزایش میزان تقسیم سلولی در این پوشش و نکروز بافتی حاصل از تاثیر گازهای آلوده کننده مثل ازن باشد. این یافته‌ها با نتایج جانگ (Jang) و همکاران مطابقت دارد [۸]. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده اند که آلاینده‌های موجود در هوای تنفسی می‌توانند موجب تشدید واکنشهای التهابی در ریه‌ها و همچنین تشدید پاسخهای آلرژیک در افراد مستعد شوند. بنابراین به نظر می‌رسد شناسایی دقیق تغییرات سلولی و ماتریکس خارج سلولی از نظر کمی و کیفی در ریه‌ها متعاقب تاثیر این آلاینده‌ها درک ما را از روند ایجاد بیماریهای شغلی افزایش داده و بدین ترتیب امکان درمان این بیماریها را فراهم می‌آورد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از همکاری شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، آزمایشگاه بهداشت محیط دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و کتابخانه مرکزی و بخش اینترنت دانشگاه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منطقه و همچنین کاهش ایندکسهای اسپرومتری شود [۱۰]. شاید بخشی از التهاب مشاهده شده در این مطالعه حاصل تاثیر گازهای نیتروژن بر مجاری هوایی و ریه‌ها است. البته نکروز و ریزش سلولی مشاهده شده در این مطالعه نیز می‌تواند حاصل آثار مخرب ذرات فلزی معلق موجود در هوای آلوده نیز باشد. این موضوع با نتایج مطالعه یو (Yu) و همکاران مطابقت دارد. این مطالعه نشان داده است که مهاجرت سلولهای التهابی به منطقه آسیب دیده معمولاً باعث آزاد شدن مدیاتوهای می‌شود که می‌تواند افزایش ضخامت اینترآلوئولارسپتاها را موجب شود و موجود را برای ابتلای ناشی از تاثیر دیگر عوامل پاتوژن مستعد کند [۱۱]. نتایج این مطالعه نشان داد که ضخامت اپی تلیوم تنفسی متعاقب تاثیر گازهای جوشکاری از نوعی روند افزایشی تبعیت می‌کند. به علاوه افزایش شدت واکنشهای بافتی از جمله افزایش ماکروفاژهای ریوی و عناصر التهابی و یا بروز واکنشهای فیبروتیک در اطراف برونش‌یولها و عروق خونی در گروههای آزمایش با زمان مواجهه بیشتر با نتایج مطالعه یو (Yu) و همکاران مطابقت دارد [۱۲].

نتایج این مطالعه نشان داد که ماتریکس خارج سلولی بافت بینابینی ریه و موکوپلی ساکاریدهای سلولهای جامی شکل در پوشش تنفسی در ریه تغییر پیدا می‌کند و رسوب عناصر پاس مثبت در استرومای ریه افزایش می‌یابد تا حدی که منجر به ایجاد تشکیلات گرانولومایی در ریه می‌شود. این یافته‌ها با نتایج مطالعه داریل (Darryl) و همکاران مطابقت دارد. در این مطالعه تاکید شده است که گازهای متصاعد شده

References

1. Erahabor GE, Fatusis Ombe OB. Pulmonary functional impairment in Arc welders in Ile Ife Nigeria. Med. East Afr 2001; 78(9): 461-4.
2. Darryl A, Knight DA, Tolgate ST. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. Respirology 2003; 8: 432-46.
3. Taylor MD, Roberts JR, Leonard SS, Xiaglin S, Antono M. Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in Rats. Toxicol Sci 2003; 75(1): 81-91.
4. Donaldson K, Mancnee W. The mechanism of lung injury caused by particulate matter in air pollution and health. Issues Environ Sci Technol 1998; 10: 21-33.
5. Antoni JM, Taylor MD, Millechial Bebout AR,

- Robert JR.** Suppression in lung defense responses after bacterial infection in Rats, pretreated with different welding fumes. *J Appl pharmacol.* 2004; 200(3): 206-18.
6. **Broskall L.** Health risk of occupational exposure in welding process. *Acta Medica* 2003; 46(1): 31-5.
7. **Kroczncki RE.** Occupational health concerns in the welding industry. *Appl Occ Environ Hyg* 2000; 15(12): 936-45.
8. **Jang AS, Choi As, Koh YI, Park CS, Lee JS.** The relationship between alveolar epithelial proliferation and airway obstruction after ozone exposure. *Allergy* 2002; 57: 737-40.
9. **Sung JH, Chio BG, Meang SH, Kim SJ, Chung YH, Man JH.** Recovery from welding fume exposure induced lung fibrosis and pulmonary changes in Sprague Dawley Rats. *Toxicol Sci* 2004; 82(2): 608-13.
10. **Kenneith W, Cecill F, Warner W.** Air pollution its origin and control. 3th edition. Addissin Welley 1988, pp 1-57.
11. **Yu IJ, J KIM, HK Chang, Han KT.** Pattern of deposition of tainless steel welding fumes particle inhaled into respiratory system of Sprague Dawley Rats exposed to a novel welding fumes generation system. *Tocol Letters* 2000, pp 103-11.
12. **Yu Se, Song KS, Chang HK, Han JH, Kim KJ.** Lung fibrosis in Sprague Dawley Rats induced by exposure to manual metal arc elding fumes. *Toxicol Sci* 2001; 63: 99-106.
13. **Holz O, Mucke M, Paasch K, Bohme S, Timm P, Richter K.** Repeated ozone exposure enhance bronchial allergen responses in subjects with rhinitis or asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 6811-89.