

Die *in vitro* effek van osoon op die marmottragea

Cornelius J. Lotriet
Baccalaureus Pharmaciae

Verhandeling vir die gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in die Skool vir Farmasie (Farmakologie) aan die
Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys

Studieleiers : Prof. D.P. Venter en Prof. D.W. Oliver

Potchefstroom
2003

'Where shall I begin, please your majesty? he asked. "Begin at the beginning," the King said, gravely, "and go on till you come to the end: then stop."

Lewis Carroll, Alice's Adventures in Wonderland (1865)

Uittreksel

Osoon is 'n natuurlike allotroop van suurstof met 'n sterk oksiderende vermoë en 'n verskeidenheid gebruike, onder meer as antimikrobiese en deodoriserende middel.

Die toenemende gebruik van osoon het die vraag laat ontstaan hoe veilig die gebruik daarvan is indien die mens in direkte kontak met verskillende konsentrasies kom. Dit is van uiterste belang om moontlike nuwe-effekte te identifiseer en om betyds vas te stel of chroniese blootstelling langtermyn-effekte tot gevolg het. Een gebied wat van besondere belang is, is blootstelling van die lugweë aan osoon.

Hierdie studie fokus spesifiek op die effek van osoon op die geïsoleerde marmottragea, asook die effek daarvan op die tragea in die teenwoordigheid van verskillende geneesmiddels met 'n bekende effek, onder meer metacholien, atropien, isoproterenol en indometasien.

Die resultate toon dat osoon twee direkte effekte op die tragea tot gevolg het: (i) 'n Definitiewe kontraksie van die geïsoleerde tragea direk na blootstelling aan osoon, en (ii) 'n duidelik waarneembare en beduidende hipersensitiwiteit van die geïsoleerde tragea teenoor irritante (in hierdie geval metacholien).

Daar is gevind dat osoon 'n beduidende inhiberende effek op die verslappende effek van β -agoniste (isoproterenol) het, terwyl isoproterenol self 'n verslappende effek op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea het. Ascorbiensuur voorkom die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea indien dit teenwoordig is in die orgaanbad, maar beïnvloed nie die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien nie. Indometasien het 'n verlagende effek op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea indien teenwoordig in die fisiologiese oplossing, moontlik as gevolg van inhibering van inflammatoriese mediatore wat vrygestel word na blootstelling aan osoon. Muskariene antagonist soos atropien beïnvloed nie die osoon-geïnduseerde kontraksie nie, maar voorkom dat hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien na osoon-blootstelling waargeneem is. Indometasien het ook 'n antagonistiese effek teenoor metacholien-geïnduseerde kontraksie getoon indien dit tydens eksperimente met osoon gebruik is. Eksperimente met waterstofperoksied toon dat die waargenome effekte van osoon nie is as gevolg van die vorming van peroksiede in die fisiologiese oplossing ná blootstelling van water aan osoon nie.

Waarnemings uit hierdie studie toon dat osoon 'n definitiewe negatiewe effek op funksies van die lugweë het, en daar word aanbeveel dat inaseming van osoon vermy word deur persone wat daarmee werk of in kontak daarmee kom, veral pasiënte met bestaande lugwegsiekte-toestande, byvoorbeeld asma. Anti-oksidante kan as profilaktiese beskerming teen sommige van die effekte van osoon gebruik word.

Abstract

Ozone is a natural occurring allotrope of oxygen with a strong oxidizing potential and a variety of potential uses, including its antimicrobial and deodorising properties.

The increased use of ozone led to questions regarding its safety when humans get exposed to relative high concentrations of the gas. It is of extreme importance to identify possible side effects and to determine in time whether chronic exposure to ozone has any negative long-term health effects.

This study specifically focussed on the effect of ozone on the isolated guinea pig trachea as well as its effect on the isolated trachea in the presence of various drugs with well-known effects, including methacholine, atropine, isoproterenol and indomethacin.

The results found identified two direct effects on the isolated trachea due to ozone exposure: (i) A definite contraction of the isolated trachea immediately after exposure to ozone, and (ii) a clearly visible and significant hypersensitivity of the isolated trachea to irritants (methacholine in this case).

We found that ozone has a significant inhibitive effect on the effect of β -agonists (isoproterenol), while the drug itself has a relaxing effect on the ozone-induced contraction of the isolated trachea. Ascorbic acid has a prophylactic effect on the ozone-induced contraction of the trachea without any effect on the ozone-induced methacholine hypersensitivity. Indomethacin reduces the ozone-induced contraction of the trachea if present in the physiological solution, probably due to inhibition of inflammatory mediators that forms after ozone exposure.

Muscarinic antagonist such as atropine does not appear to have any affect on the ozone-induced contraction, but did prevent the observation of hypersensitivity of the trachea to methacholine. Indomethacin was also found to have an antagonistic effect towards the methacholine-induced contraction. Experiments with hydrogen peroxide showed that the observed effects of ozone are not due to the formation of peroxides in the physiological solution after the exposure of ozone to water.

Observations in this study show that ozone does have a definite negative effect on respiratory health, and it is recommended that inhalation of ozone be avoided by workers who get in daily contact with the gas, and especially by those with existing airway diseases.

Anti-oxidants can be use as prophylactic protection against some of the effects of ozone.

Voorwoord

As gelowige wil ek allereers aan God my opregte dank betuig vir die gesondheid, talente, inspirasie en geleenthede wat Hy aan my gegee het. Daarsonder sou dit onmoontlik gewees het om te kom waar ek vandag is.

Baie dankie ook aan die volgende persone wat deur die loop van hierdie studie waardevolle hulp verskaf het:

- Prof. Oliver en Prof. Venter, my studieleiers, vir hul belangstelling, aanmoediging, waardevolle insette en geduld,
- Personeel van die departement Fisika aan die Potchefstroomse Universiteit vir die beskikbaarstelling van die osoongenerators en sommige data wat tydens hierdie studie gebruik is,
- Prof. Gerhard Lachman vir sy belangstelling en bystand tydens absorpsie bepalinge asook die samestelling van formules wat tydens konsentrasie bepalinge gebruik is,
- Mev. Maureen Steyn met haar waardevolle bystand en insette tydens geïsoleerde proefdierorgaaneksperimente,
- Dirk Lotriet wat die taalversorging van hierdie verhandeling behartig het,
- En laaste maar nie die minste nie, baie dankie aan Christell, Neelsie en my ouers vir hul volgehoue begrip, belangstelling en ondersteuning.

Inhoudsopgawe

Uittreksel	i
Abstract	ii
Voorwoord	iii
Inhoudsopgawe	iv
Tabel van tabelle	viii
Tabel van figure	ix
Woordelys	xii
Hoofstuk 1: Inleiding	1
1.1 Agtergrond	1
1.2 Probleemstelling	2
1.3 Studiebenadering	3
1.4 Samevatting	4
Hoofstuk 2: Literatuur.....	5
2.1 Die struktuur van osoon	5
2.2 Chemie van osoon	6
2.2.1 Fisiese eienskappe	7
2.2.2 Halfleeftyd van O ₃ as 'n funksie van temperatuur.....	7
2.2.3 Oplosbaarheid van osoon in vloeistowwe	9
2.2.4 Vorming van osoon	10
2.2.4.1 Vorming van osoon in die stratosfeer	10
2.2.4.2 Die afbraak van osoon in die stratosfeer	12
2.2.4.3 Osoon in die troposfeer	15
2.2.4.4 Chemiese vorming van osoon in besoe- delde lug.....	16
2.3 Historiese perspektief.....	18
2.4 Die voorkoms van osoon.....	21
2.4.1 Samestelling van die atmosfeer.....	21
2.4.1.1 Die troposfeer.....	22
2.4.1.2 Die stratosfeer.....	23
2.4.2. “Voordelige” en “nadelige” osoon	24
2.4.3. Wie loop die risiko om deur “slegte” osoon beïnvloed te word?.....	25
2.4.3.1 Aktiewe kinders.....	25

2.4.3.2 Gesonde volwassenes.....	26
2.4.3.3 Asmaliers en asmatiese kinders.....	26
2.4.3.4 'n Sub-groep van die algemene publiek wat meer sensitief is vir osoon.....	27
2.5 Gesondheidsstandaarde vir osoonvlakke	28
2.6 Effek van osoon	32
2.6.1 Effek op mens en dier	32
2.6.1.1 Akute blootstelling	33
2.6.1.2 Chroniese blootstelling	36
2.6.1.3 Bespreking van akute en chroniese effekte	38
2.6.2 Effek op plante en die omgewing	40
2.7 Gebruik van osoon	42
Hoofstuk 3: Eksperimentele metodes en apparaat	50
3.1 Geïsoleerde orgaan eksperimente	50
3.2 Orgaan isolering	51
3.3 Samestelling Van Krebs-Hensleit oplossing	53
3.4 Apparaat	54
3.5 Algemene struktuur van eksperimente	56
3.6 Trek van konsentrasie-effekskurwes	57
3.7 Lys van eksperimente wat uitgevoer is.....	57
3.8 Statistiese verwerking.....	68
Hoofstuk 4: Resultate en bespreking	69
4.1. Die direkte effek van osoon op die tragea.....	69
4.1.1 Die effek van osoon op die tragea.....	69
4.1.2 Die effek van osoon op die metacholien- geïnduseerde trageakontraksie.....	70
4.1.3. Samevatting.....	71
4.2. Die invloed van osoon op die effek van isoproterenol.....	73
4.2.1 Die effek van isoproterenol voor en na osoon behandeling.....	73
4.2.1.1. Die effek van isoproterenol op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea.....	73
4.2.1.2. Die invloed van isoproterenol op hipersensitiwiteit van die tragea.....	75
4.2.1.3. Die invloed van osoon op die isoproterenol-geïnduseerde verslapping van die tragea.....	76
4.2.2. Die effek van isoproterenol na metacholien en osoonbehandeling.....	77
4.2.2.1. Die invloed van isoproterenol op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea..	78

4.2.3. Die effek van isoproterenol op metacholien- kontraksie van die tragea ná osoon-behandeling.....	79
4.2.4. Samevatting.....	79
4.3. Die invloed van askorbiensuur (anti-oksidente) op die effek van osoon	81
4.3.1 Die effek van isoproterenol wat askorbiensuur as preserveermiddel bevat op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.....	81
4.3.2 Die invloed van suiwer askorbiensuur op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.....	82
4.4. Die invloed van atropien op die werking van osoon.....	84
4.4.1 Die invloed van atropien op die osoon- geïnduseerde hiperaktiwiteit van die tragea teenoor metacholien.....	85
4.4.2 Die invloed van atropien op die osoon- geïnduseerde kontraksie van die tragea.....	87
4.5. Die effek van nie-steroïed anti-inflammatoriese middels (NSAIM's) op die effek van osoon	89
4.5.1. Die invloed van indometasien op die osoon- geïnduseerde kontraksie van die tragea indien teenwoordig <i>voor</i> osoon-deurborreling.....	90
4.5.2. Die invloed van indometasien op die basislyn van registogramme.....	91
4.5.3. Invloed van indometasien op die metacholien- geïnduseerde kontraksie van die tragea.....	92
4.5.4. Die invloed van indometasien op die osoon- geïnduseerde kontraksie van die tragea indien bygevoeg <i>na</i> osoon deurborreling.....	93
4.5.5. Samevatting.....	94
4.6. Bepaling van die verband tussen die effek van osoon en waterstofperoksied	95
4.6.1. Die direkte effek van waterstofperoksied op die tragea.....	96
4.6.2. Die invloed van waterstofperoksied op die metacholien-geïnduseerde trageakontraksie.....	97
4.6.3. Samevatting van resultate.....	98
4.7. Grondvlak-toetsing vir osoon.....	98
4.7.1 Resultate en bespreking.....	99
Hoofstuk 5: Samevatting.....	100
Hoofstuk 6: Gevolgtrekking.....	102
6.1. Verband tussen resultate en doelstelling.....	102
6.2. Aanbevelings.....	102
6.3. Toekomstige studies.....	103

Bylaag A: Bepaling van osoonproduksietempo en osoon- konsentrasie.....	104
Bibliografie.....	111

Tabel van Tabelle

Tabel 2.1. Fisiese eienskappe van osoon.....	7
Tabel 2.2. Halfleeftyd van osoon as 'n funksie van temperatuur.....	8
Tabel 2.3. Uiteensetting van beperkings op osoonkonsentrasies in die VSA.....	29
Tabel 2.4. Effekte na akute osoonblootstelling.....	33
Tabel 2.5. Effek as gevolg van chroniese osoonblootstelling.....	36
Tabel 2.6. Uitwerking van osoon op omgewing.....	40
Tabel 2.7. Verskillende gebruike en indikasies van osoon.....	43
Tabel 3.1. Samestelling van krebs-hensoleit.....	53
Tabel 3.2. Prosedure vir die aanmaak van indometasien.....	63
Tabel 3.3. Areas waar toetsstrokie opgestel is (vir ten minste 8 ure)	66
Tabel 4.1. Eksperimentele resultate uit Schoenbein-toetsstrokie- Eksperiment.....	99

Tabel van figure

Figuur 2.1. Grafiese voorstelling van 'n osoonmolekule	5
Figuur 2.2. Resonansstrukture van osoon	5
Figuur 2.3. Waargenome osoonstruktuur	6
Figuur 2.4. Bepaling van halfleeftyd van osoon in water by 37 °C met behulp van ekstrapolering	8
Figuur 2.5. Oplosbaarheid van osoon in water as 'n funksie van Temperatuur	9
Figuur 2.6. Afbraak van osoon deur CFC.....	12
Figuur 2.7. Vloeidiagram van al die osoon-prosesse in die stratosfeer.....	14
Figuur 2.8. Stappe in die produksie van osoon in die omliggende (besoedelde) atmosfeer.....	17
Figuur 2.9. Uiteensetting van die samestelling van die atmosfeer	22
Figuur 2.10. Variasie in temperatuur en osoonkonsentrasie in die onderskeie lae van die atmosfeer	23
Figuur 2.11. Vergelyking van 'n gesonde lugweg met 'n lugweg blootgestel aan osoon.....	38
Figuur 2.12. 'n Vergelyking van die morfologie in die terminale brongioli en sentriasinêre area (CAR) van die long na blootstelling van laboratoriumrotte aan gefiltreerde lug en na blootstelling aan gesimuleerde besoedelde, osoonbevattende lug vir 'n tydperk van tot 78 weke.....	39
Figuur 3.1. Snitte van die tragea.....	52
Figuur 3.2. Opstelling van die apparatuur	55
Figuur 3.3. Scoenbein-kleurskaal	67
Figuur 3.4. Relatiewe humiditeit-skaal	67

Figuur 4.1. Vergelyking van die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die tragea teenoor die metacholien (MCh)-geïnduseerde kontraktsie (kontrole).....	69
Figuur 4.2. Die effek van osoon op die metacholien-geïnduseerde kontraktsie van die geïsoleerde tragea.....	71
Figuur 4.3. Sensitiwiteit van die geïsoleerde tragea teenoor metacholien na 'n rusperiode van twee ure.....	72
Figuur 4.4. Grafiese voorstelling van die effek van osoon op isoproterenol-geïnduseerde verslapping van die tragea asook die effek van isoproterenol op osoonkontraktsie	74
Figuur 4.5. Hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien as 'n funksie van tyd	75
Figuur 4.6. Verslapping van die metacholien- geïnduseerde kontraktsie van die tragea met isoproterenol as 'n funksie van tyd.....	76
Figuur 4.7. Grafiese voorstelling van die % effek van isoproterenol op die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die geïsoleerde tragea	77
Figuur 4.8. Die invloed van isoproterenol op die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die tragea.....	78
Figuur 4.9. Grafiese voorstelling van die persentasie effek van isoproterenol op die tweede metacholien-geïnduseerde kontraktsie van die tragea asook die effek van isoproterenol op die derde metacholien-geïnduseerde kontraktsie van die tragea na verdere blootstelling van die tragea aan osoon.....	80
Figuur 4.10. Osoon-geïnduseerde kontraktsies van die tragea soos waargeneem nadat metacholien-geïnduseerde kontraktsies van die tragea verslap is met onderskeidelik isoproterenol wat askorbien as preserveermiddel in die oplossing bevat , en suiwer isoproterenol sonder askorbiensuur	82
Figuur 4.11. Osoon-geïnduseerde kontraktsies van die tragea soos waargeneem nadat die fisiologiese oplossing onderskeidelik behandel is met en sonder suiwer askorbiensuur.....	83

Figuur 4.12. Die anagonistiese effek van atropien op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die geïsoleerde trachea.....	84
Figuur 4.13. Vergelyking van kontraksies van die geïsoleerde trachea tydens die verloop van die eksperiment.....	85
Figuur 4.14. Die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde hiperaktiwiteit van die trachea teenoor metacholien	86
Figuur 4.15. Die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die trachea.....	87
Figuur 4.16. Stappe in die ensiematiese prostaglandiensintese waar indometasien 'n effek het.....	89
Figuur 4.17 Vergelyking van osoon-geïnduseerde kontraksies van die trachea in onderskeidelik die teenwoordigheid en afwesigheid van indometasien.....	90
Figuur 4.18. Verslapping van die basislyn as indometasien by die fisiologiese oplossing gevoeg word.....	91
Figuur 4.19. Die invloed van indometasien op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die trachea.....	92
Figuur 4.20. Verslapping van die osoon-geïnduseerde kontraksie van die trachea met indometasien.....	93
Figuur 4.21. Vergelyking van gemiddelde tracheale kontraksie veroorsaak deur osoon met die gemiddelde kontraksie veroorsaak deur waterstofperoksied.....	96
Figuur 4.22. Die effek van waterstofperoksied op die metacholien-geïnduseerde tracheakontrakisie.....	97

Woordelys

A

Absorbansie	Die logaritmiese funksie van die persentasie transmissie van 'n golflengte van lig deur 'n vloeistof
Agonis	'n Geneesmiddel wat oor beide intrinsieke aktiwiteit en affiniteit vir spesifieke reseptore beskik en in staat is om hierdie spesifieke reseptore te stimuleer tot 'n effek
Akuut	Blootstelling vir kort en ongereelde periodes van tyd
Allotroop	Enige individuele strukturele vorm van 'n element wat in ten minste twee verskillende strukturele tipes voorkom
Antagonis	'n Geneesmiddel wat die effek van 'n agonis kan verklein of kan ophef
Antimuskarinies	Inhibering of voorkoming van die aksies van muskarien en muskarien-agtige stowwe
Anti-oksidadant	Een van 'n groot aantal sintetiese of natuurlike stowwe wat by 'n produk gevoeg word om die afbraak daarvan deur suurstof te voorkom

		B	
Brongodilator			’n Geneesmiddel wat die lumen van die lugweë dilateer (vergroot) om sodoende verlaagde weerstand van lugvloei tot gevolg te hê
Buffer			Swak sure of basisse in ’n waterige omgewing met die doel om die pH van die oplossing stabiel te hou
		C	
CFC			Chloorfluorkoolwaterstowwe wat enige van verskeie organiese verbindings bestaande uit koolstof, fluoor, chloor en waterstof kan insluit. Hierdie gehalogeneerde koolwaterstowwe onder andere tri-chloorfluormetaan en dichloor-difluormetaan, is gebruik as dryfmiddel in aërosolkannetjies en yskaste
Chronies			Aanhoudend oor ’n verlengde periode van tyd
		D	
Deodoriserend			Eliminering of verskansing van reuke, veral onaangename reuke
Disinfektant			’n Reagens wat disinfekteer
Dobson (DE)	Eenhede		Een DE is gelyk aan ’n 0.01 mm dikte van suiwer osoon by die digtheid waaroor dit sou beskik indien dit by 1 atmosfeer druk (die drukking by grondvlak) sou voorkom. Normale osoonvlakke is ongeveer 350 DE

DPB Konsentrasie osoon bepaal in dele per miljard (Let wel: een miljard tydens hierdie studie verwys na een duisend miljoen)

DPM Konsentrasie osoon bepaal in dele per miljoen

E

EPA United States Environmental Protection Agency. `n Wetgewende en gesaghebbende organisasie in die VSA rakende die omgewing

EpAVF Epiteel afhanklike verslappingsfaktor

F

FDA Food and Drug Agency (VSA)

FEV₁ Geforseerde ekspiratoriese volume in een minuut

Fisiologiese vloeistof (draerstof) Sien krebs-hensoleit-oplossing

FVK Geforseerde Vitale Kapasiteit

G

Geïsoleerde proefdierorgaan `n Gedissekteerde orgaan of gedeelte van `n orgaan van `n proefdier, bv. rot of marmot wat kunsmatig *in vitro* lewendig gehou word en waarop die effekte van geneesmiddels gemeet word

Gedistilleerde water	Water wat gesuiwer is deur middel van distillasie
Geneesmiddel	`n Aktiewe bestanddeel wat gebruik word vir die voorkoming, diagnosering of behandeling van `n siekte-toestand
Generator	`n Masjien wat gebruik word vir vervaardiging, in hierdie geval osoon

H

Hiperreaktiwiteit	Oormatige reaktiwiteit
Hipersensitiwiteit	`n Toestand van gewysigde reaktiwiteit waartydens die liggaam reageer met `n oormatige immuunrespons teenoor `n vreemde stof

I

IBOMF	Internasionale Bio-Oksidatiewe Mediese Stigting
Inhiberend	Om te onderdruk of terug te hou
Interferone	Word vervaardig deur leukosiete en Interferon-gamma deur fibroblaste ná virale infeksie. Interferon-alfa en -beta word ook Tipe 1 interferone genoem, en tipe 2 (Interferon-gamma), sitokiene
Interleukiene	`n Verskeidenheid van natuurlike polipeptiede wat deel is van die sitokien-familie wat die funksie van spesifieke seltypes affekteer en in klein hoeveelhede voorkom

In vitro Binne in `n glas of `n proefbuis, dus in `n kunsmatige omgewing

Isoproterenol `n Katesjolanien wat `n verslappende effek op trageale kontraksie het

K

Kalibrasie Die standaardisering van enige meetinstrument

Konsentrasie-effekskurwe `n Grafiese voorstelling van konsentrasie teenoor effek, normaalweg as logaritmies (konsentrasie) teenoor liniêr (effek)

Korrosie Beduidende skade of afbraak van `n stof wat onder meer as gevolg van oksidering kan plaasvind

Krebs-hensoleit oplossing Fisiologiese oplossing wat gebruik word om gesuspenderde geïsoleerde organe aan die lewe te hou by liggaamstemperatuur

M

Metacholien `n Muskariniese agonis

N

NASA National Aeronautics and Space Administration

NIOSH National Institute of Occupational Safety and Health (VSA)

Nm	Nanometer
NO_x	Stikstofoksied
NSAIM	Nie-steroïed-anti-inflammatoriese middel
O	
Oksidant	`n Molekuul of atoom wat elektrone ontvang, neem of aanvaar in `n oksidasie-reduksie-reaksie
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
P	
Parasimpatolika	Anti-cholinergies, antiparasimpaties
Preserveermiddel	`n Chemiese middel wat by `n stof gevoeg word om die leeftyd daarvan te verleng
Presipitaat	Uitsaksel of afsaksel wat in `n vloeistof vorm, gewoonlik as `n stof nie behoorlik oplos nie
Profilaktiese	Voorkomend
R	
Radikaal	`n Atoom of elektries neutrale groep wat oor een of meer ongepaarde elektrone beskik
Radikaal opruimer	`n Opruimer of verwyderaar van radikale
RAR	Sien VAR
Registogram	Die eksperimentele uitdruk wat resultate wat deur die druksensors tydens eksperimente waargeneem is,

weergee

Reseptor

’n Molekule of gedeelte van ’n makromolekulêre kompleks van ’n lewende sel wat beskikbaar is om met ’n geneesmiddel te interageer

Resonans

Gebaseer op resonans-strukture. Wanneer dieselfde molekule verskeie elektroniese strukture besit, onder meer weens ongepaarde elektrone en t.o.v. dubbelbindings

Rotameter

’n Toestel wat gebruik word vir die meting van die vloeï van gas of vloeistowwe; die gas/vloeistof vloeï deur ’n buisie en lig ’n balletjie of ander gewiggie wat die vloeï gedeeltelik versper, totdat die gewiggie ’n breër area in die buisie bereik wat toelaat dat die vloeï rondom die obstruksie kan voortgaan

S

Sitokiene

Klein proteïene of biologiese substansie wat vrygestel word deur selle en ’n spesifieke effek op sel-sel-interaksie, kommunikasie en gedrag het. Het normaalweg ’n rol in die voorkoming en bevegting van virale infeksies deur die voorkoming van virus-vermenigvuldiging in selle. Sluit in TGF en interferone

SOD

Superoksied-dismutase

Siklo-Oksigenase 'n Ensiem-proteïenkompleks wat teenwoordig is in die meeste weefsel wat twee stappe in proteïen-biosintese kataliseer en produseer prostaglandiene en tromboksane vanaf aragidoonsuur

STD Standaard temperatuur en druk

Stimulus 'n Geneesmiddel-verwante term wat die vermoë van 'n agonis beskryf om 'n reseptor te stimuleer tot die ontstaan van 'n effek

Stratosfeer Die deel van die aarde se atmosfeer wat volg op die troposfeer. Word geskei van die troposfeer deur die tropopouse

Suspendeer Die opstelling van die geïsoleerde orgaan in die fisiologiese oplossing in die orgaanbad

T

TGF- β Transformerende groeifaktor (Transforming growth factor) beta

Tropopouse Die deel van die aarde se atmosfeer wat die troposfeer van die stratosfeer skei

Troposfeer Die gedeelte van die aarde se atmosfeer naaste aan die oppervlak van die aarde

U

UV

Ultraviolet

V

VAR

Vinnig aanpassende reseptore

VOV

Vluchtige organiese verbinding

W

WMO

World Meteorological Orga-
nisation

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1 AGTERGROND

Die woord osoon is afgelei van die griekse woord *ozein* wat “om te ruik” beteken. Osoon is `n blou gas met `n kenmerkende reuk en is toksies, selfs by lae konsentrasies (MKS, 2002).

Osoon is `n onstabiele allotroop van suurstof (Kloos, 2001) en bestaan uit drie suurstof-atome, waarvan twee van hierdie atome die basiese suurstof-molekule vorm wat noodsaaklik is vir lewe. Die derde beskik oor die vermoë om van die osoon-molekule te ontkoppel en weer te reageer met molekules van ander stowwe om sodoende die chemiese samestelling daarvan te verander. Osoon is dus `n oksideermiddel en kan oksidasie van enige stof, insluitende liggaamsweefsel, tot gevolg hê (Kloos, 2001).

Volgens Lippmann (1989) is osoon `n long-irritant wat die dood kan veroorsaak as gevolg van pulmonale edeem. Osoon is egter noodsaaklik vir lewe op aarde. In die atmosfeer (en spesifiek die osoonlaag) dien osoon as `n filter wat skadelike UV-B strale blokkeer. Oormatige blootstelling aan hierdie strale kan lei tot velkanker, katarakte en `n verswakte immuunstelsel (United States Environmental Protection Agency (EPA), 1996).

In die natuur vorm osoon wanneer suurstof in kontak met UV-lig kom, maar kan ook `n produk wees van besoedelingstowwe wat fotochemies deur UV-strale verander word na blootstelling aan sonlig. Osoon het presies dieselfde chemiese samestelling, hetsy dit in die stratosfeer of die troposfeer voorkom, en kan as “voordelige” of “nadelige” osoon geklassifiseer word, afhangende van waar dit in die atmosfeer voorkom (EPA, 1996; EPA, 1997b).

Die toenemende gebruik van chloor-bevattende verbindings as ontsmettingsmiddel is `n internasionale bron van kommer en osoon is die

ideale plaasvervanger daarvan vanweë die antimikrobiese en oksiderende eienskappe daarvan. Verskeie osoongenerators is reeds wêreldwyd in gebruik wat dit moontlik maak om osoon vanuit suurstof of selfs gewone lug binnenshuis te vervaardig. Vervaardigers van hierdie apparate maak verskeie aansprake en afleidings rakende die veiligheid van osoongebruik sonder enige substansiële wetenskaplike bewyse. Dit is veral mediese aansprake wat nog nie voldoende ondersoek is nie, en die effektiwiteit en die veiligheid is nog nie vasgestel nie. Hierdie mediese aansprake sluit onder meer in die gebruik van osoon as behandeling vir kankers (Paulesu, Luzzi & Bocci, 1991; Rilling & Viebahn, 1987; Sunnen, 1988) en virale infeksies, insluitende MIV (Rilling & Viebahn, 1987; Wolfstaedler, 1993).

Herhaaldelike blootstelling aan troposferiese osoon kan aanleiding gee tot 'n wye reeks nuwe-effekte by die mens, veral wat die respiratoriese stelsel betref. Dit sluit onder meer versteurde asemhaling (Lin *et al.*, 1982), inflammasie van die lugweg (Joad, Kott & Bonham, 1998) en epiteelskade (Tepper *et al.*, 1989) in.

Osoon beskik egter oor geweldig baie potensiële gebruike. Hierdie gebruike blyk ook meer kostedoeltreffend te wees in vergelyking met bestaande toepassings. Dit word reeds regoor die wêreld gebruik vir nie-medisinale toepassings, onder meer die suiwering van water, lug en grond (Bin *et al.*, 2001). Ten opsigte van menslike medisinale gebruik is die suksesvolle toepassing van osoon in die behandeling van mondkulke onlangs gerapporteer (Viebahn-Haensler, 2001).

1.2 PROBLEEMSTELLING

Die toenemende aanwending van osoon het die vraag laat ontstaan hoe veilig die gebruik daarvan is indien die mens in direkte kontak daarmee kom. Dit is van uiterste belang om moontlike nuwe-effekte te identifiseer en om betyds vas te stel of akute en chroniese blootstelling toksiese, karsinogeniese en/of ander langtermyn-nuwe-effekte tot gevolg het.

Hierdie studie fokus spesifiek op die effek van osoon op die lugweë, asook die effek daarvan op die lugweë in die teenwoordigheid van verskillende geneesmiddels. As model word die geïsoleerde tragea van die marmot gebruik. Die geïsoleerde tragea is direk aan osoon blootgestel.

1.3 STUDIEBENADERING

- i. *In vitro* geïsoleerde proefdierorgaaneksperimente is uitgevoer in die geïsoleerde proefdierorgaanlaboratorium.
- ii. Die tragea van die marmot is gebruik as proefdierorgaan waarop eksperimente uitgevoer is.
- iii. Osoon is vervaardig deur gebruik te maak van 'n generator wat vervaardig en gepatenteer is deur die departement Fisika aan die Potchefstroomse Universiteit. Suiwer medisinale suurstof is omgeskakel na osoon.
- iv. Relatief hoë konsentrasies osoon in vergelyking met vorige eksperimente wat in die literatuur beskryf is, is gebruik om die effekte van osoon te identifiseer.
- v. Geneesmiddels waarvan die effekte op die geïsoleerde marmottragea reeds bekend is, is gebruik en die effek hiervan in die teenwoordigheid van osoon is vergelyk met die reeds bekende resultate om sodoende vas te stel wat die invloed van osoon is. Geneesmiddels wat gebruik is sluit onder meer metacholien, isoproterenol, atropien, askorbiensuur en indometasien in.
- vi. Verdere eksperimente wat uitgevoer is sluit die kwalitatiewe konsentrasiebepaling van sogenaamde "grondvlak-osoon" in deur middel van die gebruik van Schoenbein-toetsstrokies wat op 'n oksidatiewe reaksie gebaseer is.

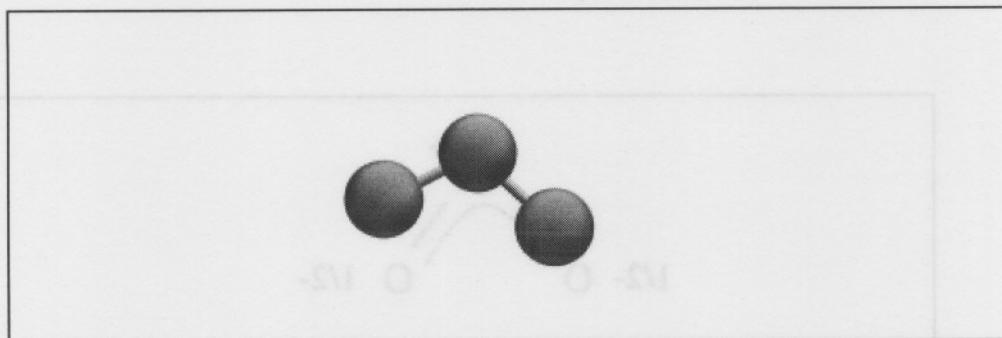
1.4 SAMEVATTING

Osoon toon verskeie ongewenste effekte alhoewel dit daaglik oor 'n breë spektrum velde gebruik word. Die doel van hierdie navorsing is om vas te stel presies wat die effek van osoon op die lugweg is en hoe dit die werking van sekere geneesmiddels beïnvloed.

HOOFSTUK 2

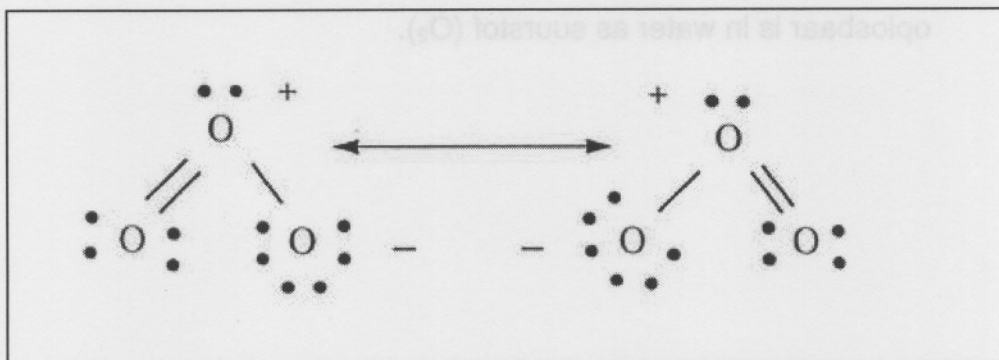
LITERATUUR

2.1. Die struktuur van osoon



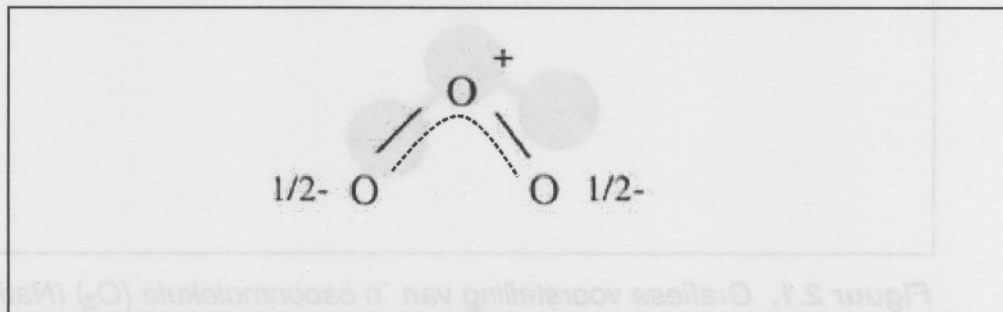
Figuur 2.1. Grafiese voorstelling van 'n osoonmolekule (O_3) (National Center Of Atmospheric Research (NCAR), 2002).

Osoon is 'n onstabiele molekule wat bestaan uit drie suurstof-atome (Kloos, 2001). Figuur 2.1 is 'n voorstelling van die struktuur daarvan. Elke resonant van osoon bestaan uit een enkel- en een dubbelbinding. Die enkelbinding is analoog aan peroksiedbindings, wat relatief swak is en lei tot die formasie van vry-radikale. Die dubbelbinding is analoog aan molekulêre suurstof (O_2), wat sterk gebind is en relatief onreaktief is (Kloos, 2001).



Figuur 2.2. Resonansstrukture van osoon (Kloos, 2001)

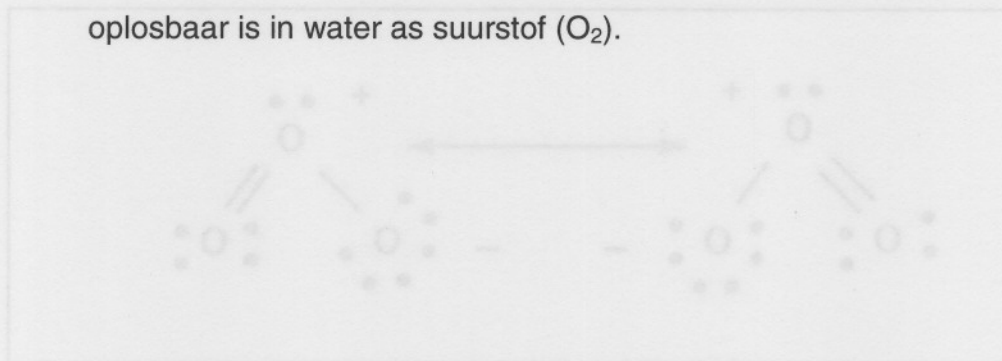
Die omskakeling tussen die twee resonansstrukture in Figuur 2.2 vind so vinnig plaas dat die waargenome osoonstruktuur 'n kombinasie is van die twee resonansstrukture (Figuur 2.3). As 'n resultaat kan die twee suurstof-tot-suurstof bindings as gelykstaande gesien word – elk 1.5 in orde. (Kloos, 2001).



Figuur 2.3. Waargenome osoonstruktuur (Kloos, 2001)

2.2. Chemie van osoon

Alhoewel osoon 'n natuurlike allotroop van molekulêre suurstof (O_2) is, verskil dit beduidend ten opsigte van onder meer fisiese eienskappe en oplosbaarheid (Kloos, 2001). Tabel 2.1 vergelyk die fisiese eienskappe van osoon met dié van molekulêre suurstof. Uit bogenoemde tabel is dit belangrik om daarop te let dat osoon meer as 10 keer beter oplosbaar is in water as suurstof (O_2).



Figuur 2.2. Resonansstrukture van osoon (Kloos, 2001)

2.2.1 Fisiese Eienskappe

Tabel 2.1. Fisiese eienskappe van osoon (MKS, 2002)

Eienskap	Osoon (O ₃)	Molekulêre suurstof (O ₂)
Kleur	As gas: Blou Opgelos in water: Bloupers in konsentrasies groter as 20 dpm	As gas : Kleurloos Opgelos in water : Ligblou
Molekulêre massa	48	32
Digtheid (g/cm ³)	2.144	1.429
Oplosbaarheid in H ₂ O by 0 °C (β)*	0.64	0.049
Elektrochemiese potensiaal (V)	2.08	1.23
Kookpunt, °C (°K)	-112 (161.2)	-183 (90)

*β = Bunsenkoëffisient (Vanuit die wet van Henry)
(β=opgeloste konsentrasie / gas konsentrasie)

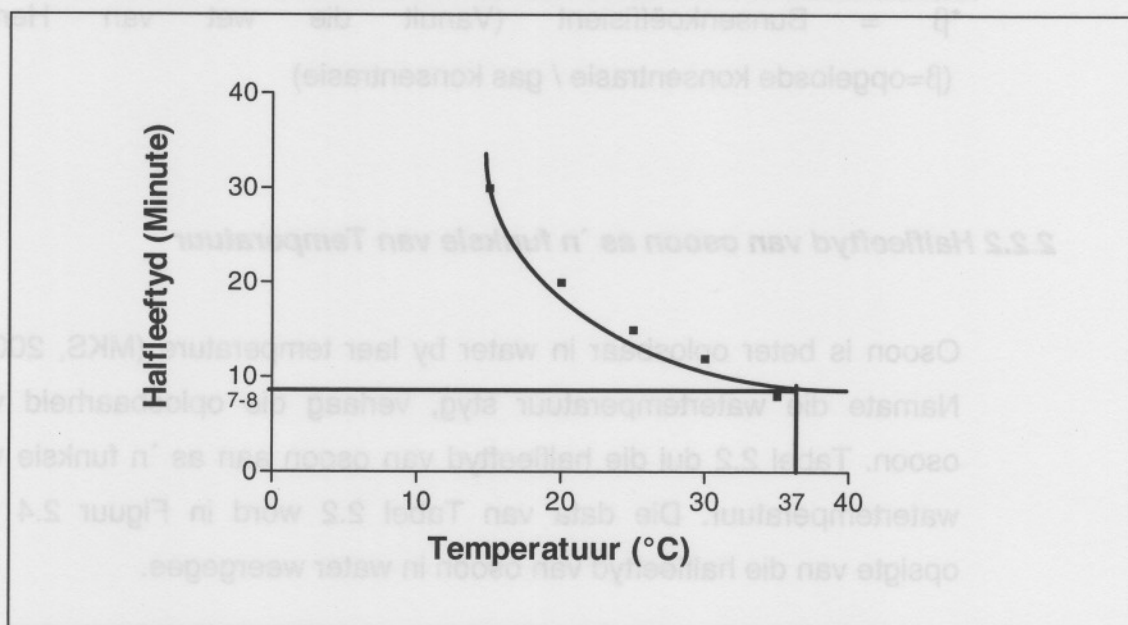
2.2.2 Halfleeftyd van osoon as 'n funksie van Temperatuur

Osoon is beter oplosbaar in water by laer temperature (MKS, 2002). Namate die watertemperatuur styg, verlaag die oplosbaarheid van osoon. Tabel 2.2 dui die halfleeftyd van osoon aan as 'n funksie van watertemperatuur. Die data van Tabel 2.2 word in Figuur 2.4 ten opsigte van die halfleeftyd van osoon in water weergegee.

Tabel 2.2. Halfleeftyd van osoon as 'n funksie van temperatuur (MKS,2002)

Opgelos in Water (ph 7)		Gas	
Halfleeftyd	Temp	Halfleeftyd	Temp
~ 30 minute	15 °C	~ 3 maande	-50 °C
~ 20 minute	20 °C	~18 dae	-35 °C
~ 15 minute	25 °C	~ 8 dae	-25 °C
~ 12 minute	30 °C	~ 3 dae	20 °C
~ 8 minute	35 °C	~ 1.5 uur	120 °C
		~ 1.5 sekondes	250 °C

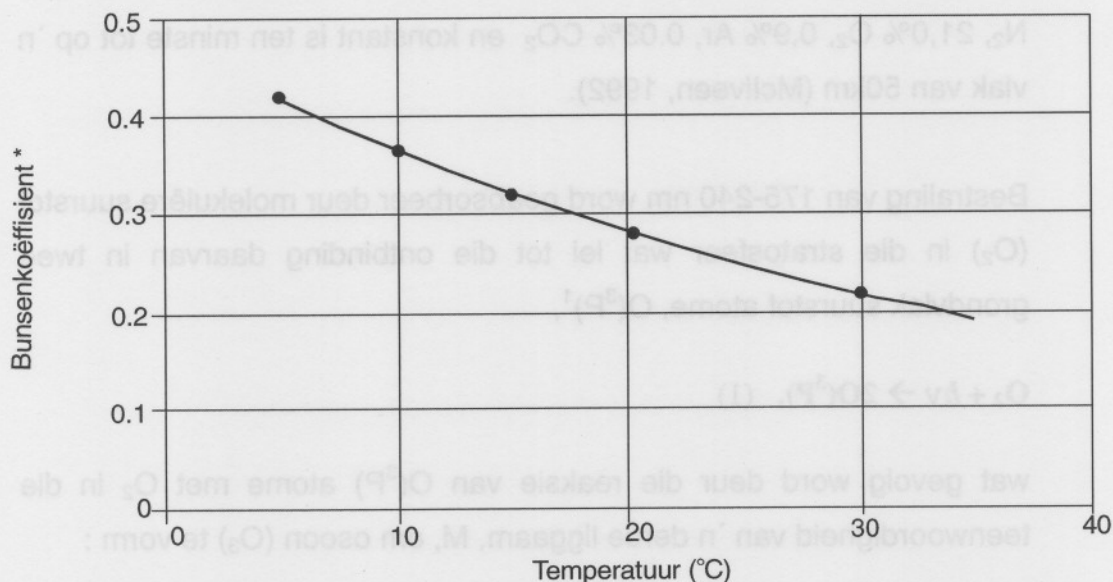
Uit Figuur 2.4 kan waargeneem word dat osoon steeds in oplossing is (vir 7-8 minute) by 37 °C, die temperatuur van die fisiologiese oplossing waarby eksperimente uitgevoer is, en dat dit steeds 'n biologiese effek tot gevolg kan hê.



Figuur 2.4. Bepaling van halfleeftyd van osoon in water by 37 °C met behulp van ekstrapolering (Saamgestel uit data in Tabel 2.2)

2.2.3 Oplosbaarheid van osoon in vloeistowwe

Osoon is swak oplosbaar in water, maar soos aangedui in Tabel 2.1, steeds nagenoeg twaalf maal meer oplosbaar as suurstof. Die oplosbaarheid word beïnvloed deur die temperatuur van water en die konsentrasie osoon in die gasfase. In Figuur 2.5 kan gesien word dat die oplosbaarheid van osoon verlaag namate temperatuur styg.



Figuur 2.5. Oplosbaarheid van osoon in water as 'n funksie van temperatuur (MKS, 2002).

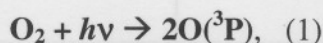
*Bunsenkoëffisient = opgeloste konsentrasie / gas konsentrasie

2.2.4. Vorming van osoon

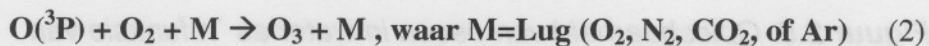
2.2.4.1. Vorming van osoon in die stratosfeer (EPA, 1996)

Osoon kom primêr in die boonste laag van die atmosfeer voor. By 'n hoogte van tussen 20 en 35 km bo die oppervlak van die aarde bestaan die stratosfeer uit 'n osoonlaag van ongeveer 10 dpm. Bestraling vanaf die son met 'n golflengte van 170 nm en hoër kom in kontak met die boonste lae van die atmosfeer wat bestaan uit $\pm 78\%$ N_2 , $21,0\%$ O_2 , $0,9\%$ Ar, $0,03\%$ CO_2 en konstant is ten minste tot op 'n vlak van 50km (McIlveen, 1992).

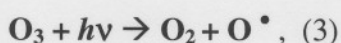
Bestraling van 175-240 nm word geabsorbeer deur molekulêre suurstof (O_2) in die stratosfeer wat lei tot die ontbinding daarvan in twee grondvlak suurstof atome, $O(^3P)^1$,



wat gevolg word deur die reaksie van $O(^3P)$ atome met O_2 in die teenwoordigheid van 'n derde liggaam, M, om osoon (O_3) te vorm :



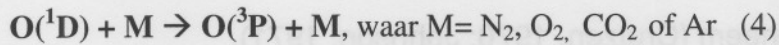
Osoon ondergaan ook fotolise by golflengtes van < 360 nm (DeMore *et al.*, 1992),



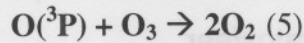
waar die suurstofatoom wat gevorm het in enige van die grondvlak, $O(^3P)$, of elektronies opgewekte toestand, $O(^1D)^2$, kan wees. Die $O(^1D)$ atome wat geproduseer word, word gedeaktiveer tot die grondvlak $O(^3P)$ atoom deur enige van N_2 , O_2 , CO_2 of Ar :

¹ Hierdie is die notasie soos gebruik deur die EPA in die literatuur vir grondvlak suurstof-atoom

² Hierdie is die notasie soos gebruik deur die EPA in die literatuur vir 'n suurstofatoom in die elektronies opgewekte toestand



Die reaksie van $\text{O}(^3\text{P})$ atome met osoon is die terminerende stap van hierdie reeks reaksies :

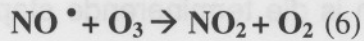


Bogenoemde reeks reaksies staan bekend as die Chapman-reaksies (Chapman, 1930) en is verantwoordelik vir die vorming van osoon in die stratosfeer. Hierdie stratosferiese osoon absorbeer bestraling laer as 290 nm. Slegs bestraling met 'n golflengte van hoër as 290 nm kan dus die troposfeer binnedring. Enige vermindering van osoon in die stratosferiese osoonlaag laat ook korter golflengte ultraviolet-bestraling (<320 nm) tot die troposfeer toe (EPA, 1996).

Verhoogde UV-B-strale (290-320 nm) het, behalwe vir biologiese effekte, ook veranderde troposferiese osoonvlakke tot gevolg. Berekeninge toon dat stedelike en plattelandse gebiede met antropogeniese NO_x besoedeling verhoogde troposferiese osoonvlakke kan ervaar namate UV-B-strale verhoog (Thompson, 1992; Thompson *et al.*, 1989; Gery *et al.*, 1988; Liu en Trainer, 1988). Die teenoorgestelde kan egter ook in afgeleë areas met lae NO_x -vlakke plaasvind. Osoonvlakke kan hier afneem as UV-B-bestraling toeneem (Liu en Trainer, 1988; Thompson *et al.*, 1989).

Volgens die Wêreld Meteorologiese Organisasie (1992) word stratosferiese osoonvlakke verder beïnvloed deur die emissie van N_2O vanuit grond en oseane. N_2O in die troposfeer is chemies inert en kan nie fotolise ondergaan nie (Prin *et al.*, 1990) en beweeg as gevolg daarvan op na die stratosfeer waar dit fotolise ondergaan en met $\text{O}(^1\text{D})$ atome reageer (DeMore *et al.*, 1992; Atkinson *et al.*, 1992). Hierdie reaksie van N_2O met die $\text{O}(^1\text{D})$ atoom is die hoofbron van stratosferiese $\text{NO}^\bullet$ wat in 'n reeks reaksies, naamlik die NO_x katalitiese

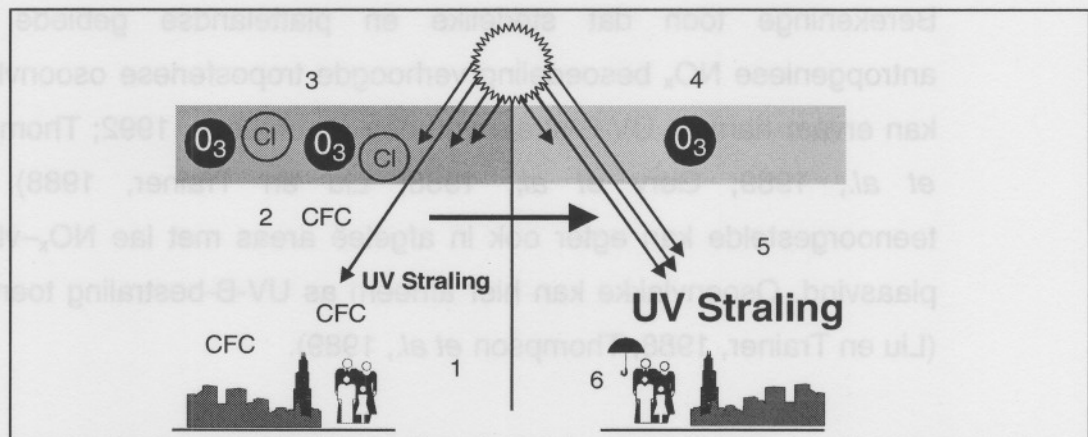
siklus, deelneem (Crutzen, 1970; Johnson, 1971).



Die Chapman-reaksies en NO_x katalitiese siklusreaksies bepaal en beheer die osoonkonsentrasies in die laer stratosfeer.

2.2.4.2. Die afbraak van osoon in die stratosfeer (EPA, 1996)

Chloorfluorkoolstowwe (CFC's) is in die 1920's deur DuPont ontdek en het ammoniak- en swaeldioksied-gasse in die verkoelingproses vervang, gedeeltelik omdat dit die gevaar van gevaarlike gaslekkasies en ontploffings geëlimineer het. Later is dit ook in lugversorgers en aërosol-kannetjies gebruik. CFC's was gesien as 'n wetenskaplike wonder vanweë die stabiliteit daarvan.



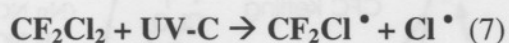
Figuur 2.6. Afbraak van osoon deur CFC (Briddell, Keebler & Venglik, 1998)

(1) CFC's word vrygestel (2) CFC's styg op na die osoonlaag (3) UV stel Cl vry vanuit CFC's (4) Cl vernietig osoon (5) Uitputting van osoon verhoog (6) Meer UV veroorsaak meer kanker

Dit is eers in die 1970's dat die chemiese reaksie waarmee CFC's osoon afbreek deur Rowland, Molina en Crutzen (waarvoor hulle in 1995 die Nobelprys in chemie ontvang het) ontdek is. Figuur 2.6 is 'n

grafiese voorstelling van hoe 'n toename in CFC's die gesondheid van die mens raak.

Daar is gerapporteer dat CFC's 'n gevaar vir die osoonlaag is omdat dit onstabiel is in die stratosfeer. Op die oppervlak van die aarde is CFC baie stabiel, maar indien dit vrygestel word in die atmosfeer styg dit tot in die stratosfeer waar dit fotochemiese reaksies ondergaan tydens 'n proses soortgelyk aan die een waartydens diatomiese suurstof deur UV-strale ontbind word:



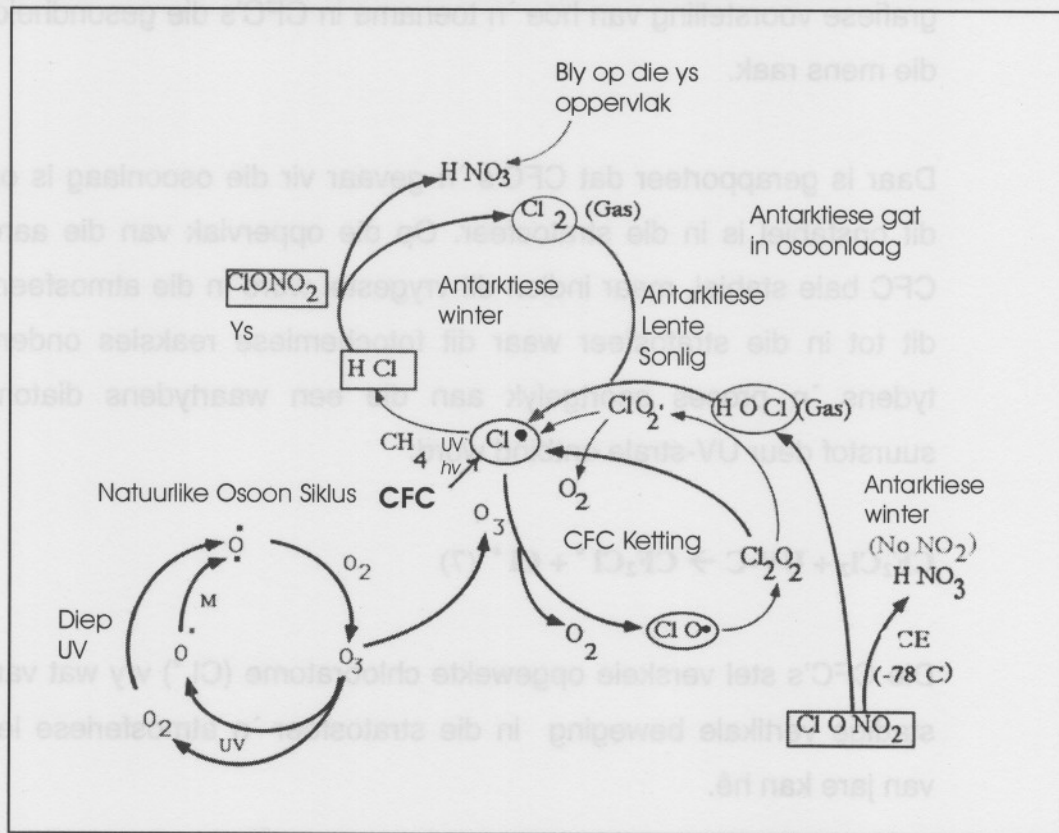
Die CFC's stel verskeie opgewekte chlooratome ($\text{Cl}^\bullet$) vry wat vanweë stadige vertikale beweging in die stratosfeer 'n atmosferiese leeftyd van jare kan hê.

Ander osoon-uitputtende verbindings sluit in hidrochloorfluorkoolstowwe (HCFC's), koolstof-tetrachloried (CCl_4), chloroform en metielbromied wat almal fotolise ondergaan om chloor- of broomatome in die stratosfeer vry te stel (Rowland, 1990; WMO, 1992).

Een chloor- of broom-atoom kan 'n groot aantal³ osoonmolekules vernietig wat tot gevolg het dat osoon baie vinniger verdwyn as wat die natuur dit kan skep. Dit kan jare neem voordat osoon-afbrekende molekules die stratosfeer bereik. Die realiteit is dat ofskoon die gebruik van skadelike stowwe geëlimineer is, die impak van jare se gebruik nou eers besig is om die osoonlaag te affekteer.

In Figuur 2.7 is al die prosesse opgesom (beide formasie en afbraak) waarby osoon in stratosfeer betrokke is. Die sentrale chloor-radikaal is die produk van verskeie reaksies, onder meer UV-bestraling en CFC's.

³ Daar word gepostuleer dat 'n enkel $\text{Cl}^\bullet$ (of Br) tot soveel as 100 000 osoon-molekules kan vernietig

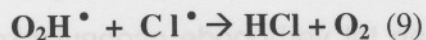
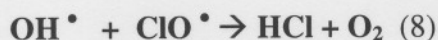


Figuur 2.7. Vloeidiagram van al die osoon-prosesse in die stratosfeer (Trumbore, 1996)

Die osoonsiklus is links onder in Figuur 2.7. Osoon kom in kontak en reageer met vry chloor-radikale om 'n ClO-radikaal te vorm. Laasgenoemde dimeriseer om Cl_2O_2 te vorm wat verder kan ontbind om chloor en suurstof te vorm (Trumbore, 1996).

Gedurende die Antarktiese winter daal temperature geweldig en dit lei tot die vorming van 'n polêre maalstroom oor die Suidpool. In die polêre stratosferiese wolke vorm ClONO_2 en soutsuurgas (sg. bergingsverbindings) wat chloor "stoor" sodat geen ontbinding van osoon tydens die winter plaasvind nie. Sodra die lente egter aanbreek, word die maalstroom opgehef en word die chloorverbindings vrygestel om deur middel van son-energie groot hoeveelhede elementêre chloor vry te stel (Trumbore, 1996).

In die stratosfeer is die belangrikste meganismes vir die verwydering van chlooratome die vorming van soutsuurgas :



Soutsuurgas is wateroplosbaar en presipiteer uiteindelik uit die stratosfeer in waterdruppels en yskristalle. Metaan en ander waterstofbevattende organiese verbindings, onder meer HCFC's, kan ook chloor na soutsuur omskakel.

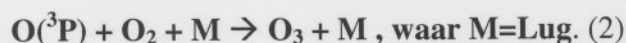
2.2.4.3. Osoon in die troposfeer (EPA, 1996)

Soos reeds gemeld gebeur dit soms dat osoon vanaf die stratosfeer na die troposfeer kan beweeg. Osoon in die troposfeer in die afwesigheid van besoedeling is baie belangrik omdat dit lei tot die vorming van $\text{OH}^\bullet$ wat op sy beurt 'n sleutelrol speel by die troposferiese afbraak van VOV's⁴ in die atmosfeer. Indien osoon egter in hoër konsentrasies voorkom het dit 'n negatiewe effek.

Die basiese fotochemiese proses wat die vorming van osoon in die troposfeer tot gevolg het, sluit die fotolise van stikstofdoksied (NO_2) om $\text{NO}^\bullet$ en 'n grondvlak suurstofatoom, $\text{O}({}^3\text{P})$, te vorm :

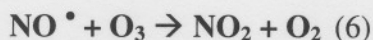


Die suurstofatoom reageer met molekulêre suurstof om osoon te vorm:

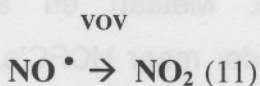


⁴ Vlugtige organiese verbindings (Vanaf Engels : Volatile organic compounds (VOC))

NO[•] en osoon reageer om weer NO₂ te vorm :



NO[•] word omskakel na NO₂ sonder osoon in die teenwoordigheid van VOV's en die fotolise van NO₂ lei dan tot verhoogde osoonvlakke wat 'n sikliese reaksie tot gevolg het:



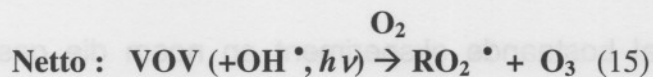
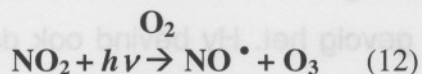
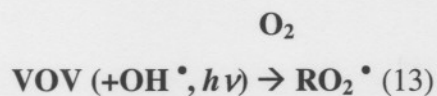
2.2.4.4. Chemiese vorming van osoon in besoedelde lug (EPA, 1996)

Soos reeds gesien reageer NO_x en VOV's in die teenwoordigheid van sonlig om osoon te vorm. Die belangrikste stappe in hierdie proses is die omskakeling van NO[•] na NO₂.



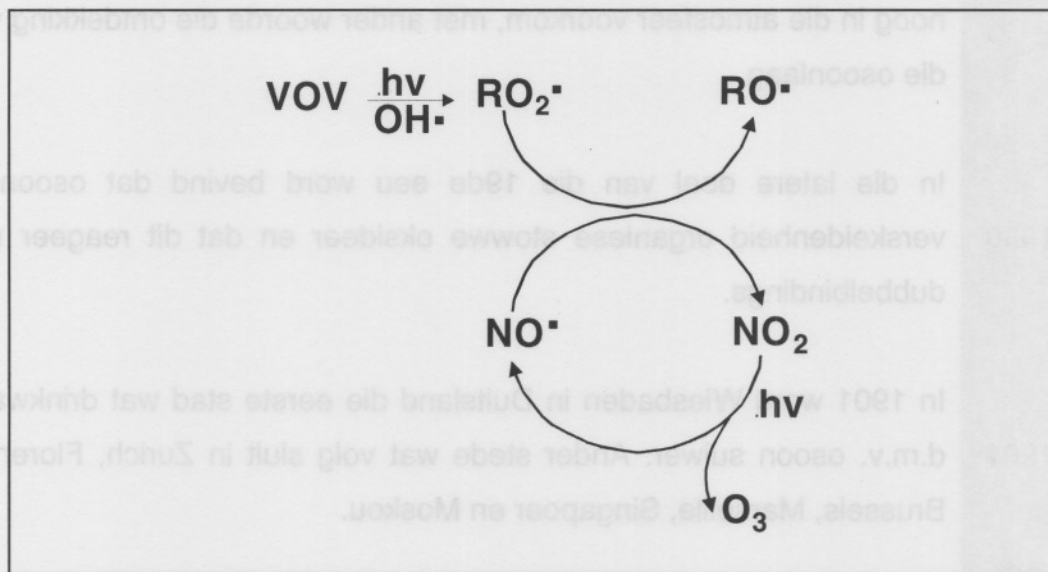
Indien geen VOV teenwoordig is nie, vorm geen ekstra osoon nie.

Die reaksie van 'n VOV met die OH-radikaal (of die fotolise daarvan) lei tot die vorming van HO₂[•] en organiese peroksied-radikale (RO₂) wat met NO[•] reageer in die teenwoordigheid van hoë konsentrasies NO :



Met die RO-radikaal wat verdere HO₂- of RO₂-radikale of beide tot gevolg het. Die resultaat is verdere produksie van osoon.

Figuur 2.8 is 'n skematiese opsomming van die stappe in die produksie van osoon in die omliggende (besoedelde) atmosfeer.



Figuur 2.8. Stappe in die produksie van osoon in die omliggende (besoedelde) atmosfeer. (R = H, alkiel of gesubstitueerde alkiel, of asiel) (EPA, 1996).

2.3. Historiese perspektief

Die historiese verloop van osoon is as volg.

- | | |
|-------------|--|
| 1785 | Van Marum bevind dat die blootstelling van suurstof aan elektriese ontlading 'n kenmerkende reuk tot gevolg het. Hy bevind ook dat dit bydra tot die oksidering van kwik. |
| 1840 | Schoenbein herhaal bostaande eksperiment en noem die gas wat aanleiding gee tot die reuk osoon, afgelei van die Griekse woord <i>ozein</i> , wat "om te ruik" beteken. Hy beskryf ook verskeie eienskappe van osoon, maar is nie in staat om die struktuur te identifiseer nie. 'n Paar jaar later identifiseer Soret dit as O_3 . |
| 1881 | Hartley stel vas dat osoon verantwoordelik is vir die absorbering van UV-lig by 200 tot 320 nanometer. Hy bewys ook dat osoon primêr hoog in die atmosfeer voorkom, met ander woorde die ontdekking van die osoonlaag. |
| 1900 | In die latere deel van die 19de eeu word bevind dat osoon 'n verskeidenheid organiese stowwe oksideer en dat dit reageer met dubbelbindings. |
| 1901 | In 1901 word Wiesbaden in Duitsland die eerste stad wat drinkwater d.m.v. osoon suiwer. Ander stede wat volg sluit in Zurich, Florence, Brussels, Marseille, Singapoer en Moskou. |
| 1913 | Tussen 1913 en 1932 vind Fabry en Buisson dat die totale hoeveelheid osoon in vertikale kolom gemeet kan word en dit in moderne eenhede gelyk is aan 300 Dobson eenhede. |

- Dobson gebruik sy nuut ontwikkelde spektrofotometer om 'n gereelde program van osoonmeting by Oxford op te stel. Hy bevind dat osoon rondom die aarde versprei as gevolg van stratosferiese wind.
- 1924**
- Midgley ontdek CFC-12 nadat hy gevra word om 'n plaasvervanger te vind vir die skadelike bestanddele (onder meer ammoniak) van yskaste nadat verskeie mense sterf. In dramatiese vertoning asem Midgley die CFC in en blaas 'n kers daarmee dood om te bewys dat dit nie giftig of vlambaar is nie.
- 1928**
- Chapman verduidelik hoe sonlig wat molekulêre suurstof in die atmosfeer tref aanleiding gee tot die vorming van osoon.
- 1930**
- Met toetse wat vanaf 'n ballon uitgevoer is, word bevind dat die oorgrootte meerderheid osoon op 'n hoogte van 20 km voorkom.
- 1934**
- In 1945 word CFC-12 algemeen gebruik in yskaste in die VSA.
- 1945**
- Internasionale geofisiese jaar - Vier tot vyf navorsingstasies in Antarktika word toegerus om gereeld osoonvlakke te kontroleer. 'n Standaard kwantitatiewe bepaling soos ontwikkel deur Dobson word gebruik.
- 1957**
- Daar word voorgestel dat stikstofradikale osoon kan vernietig. Crutzen bewys dat die ontbinding van N_2O stikstofoksiede aan die stratosfeer kan verskaf.
- 1970**
- In dieselfde jaar begin die Nimbus-satelite osoonlesings neem. Lovelock ontwikkel ook 'n detektor wat CFC-vlakke kan bepaal.
- 1971**
- Mcdonald toon aan dat 'n kwantitatiewe konneksie tussen velkanker en 'n afname in osoonvlakke bestaan.

- 1974** Rowland en Molina rapporteer dat CFC's osoon in die stratosfeer vernietig.
- Die nasionale akademie van wetenskappe in die VSA bevestig die
- 1976** Rowland-Molina-bevinding en as gevolg hiervan kondig die FDA en EPA in die VSA 'n uitfasering van CFC aan.
- 1978** CFC gebruik in aërosole word verbied in die VSA om sodoende die osoonlaag te probeer beskerm.
- 'n Britse navorsingsgroep onder leiding van Farman ontdek 'n 40%
- 1984** afname in osoon oor Antarktika in die lente.
- 1985** NASA verifieer die voorkoms van 'n sogenaamde gat in die osoonlaag.
- 1987** Die Montreal-protokol word geteken waarin gevra word dat die verbruik van CFC met 50% verminder.
- 1995** Die Nobelprys word toegeken aan Rowland, Molina en Crutzen vir hul werk in atmosferiese chemie, en spesifiek die bevinding dat CFC osoon vernietig.
- 1996** In 'n poging om die afname in atmosferiese osoon te verminder word 'n algehele verbod op die vervaardiging van industriële CFC's ingestel.
- Die EPA stel nuwe standaarde voor vir osoonvlakke in die
- 1997** werksomgewing wat onder meer behels dat vlakke van 0.080 dpm gedurende 'n 8 uur-tydperk nie oorskry mag word nie.

1999

Die hooggeregshof in die VSA lewer 'n uitspraak wat die voorgestelde 0.080 dpm vlak wat deur die EPA voorgestel is, afkeur. Dit volg na 'n reeks verklarings deur maatskappye waarin hulle die ekonomiese implikasies hiervan voorlê.

2001

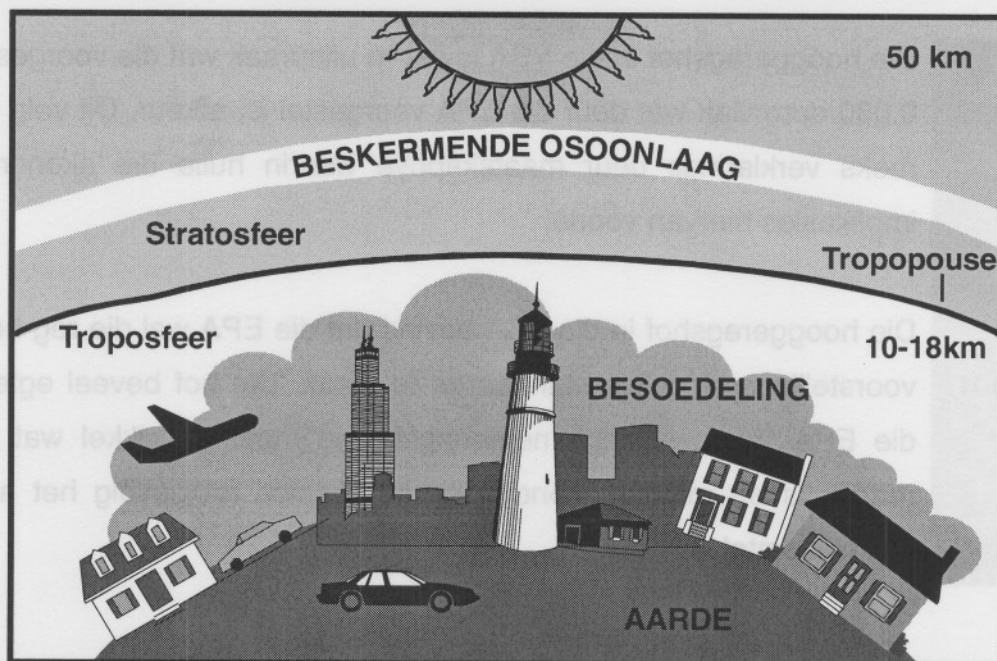
Die hooggeregshof in die VSA bevind dat die EPA wel die reg het om voorstellings vir nuwe standaarde te maak. Die hof beveel egter dat die EPA 'n nuwe implementeringsbeleid moet ontwikkel wat meer redelik is en minder ekonomiese implikasies tot gevolg het as die 1997-voorstel.

2.4. Die voorkoms van osoon

Osoon kom natuurlik in die atmosfeer van die aarde voor en vorm onder meer die osoonlaag (McIlveen, 1992). Die atmosfeer bestaan egter uit verskeie lae en die hoeveelheid osoon in die onderskeie vlakke kan tot gevolg hê dat osoon "voordelig" of "nadelig" is (EPA, 1996). Om hierdie klassifikasie te verstaan is dit nodig om na die samestelling van die atmosfeer te kyk.

2.4.1. Samestelling van die atmosfeer

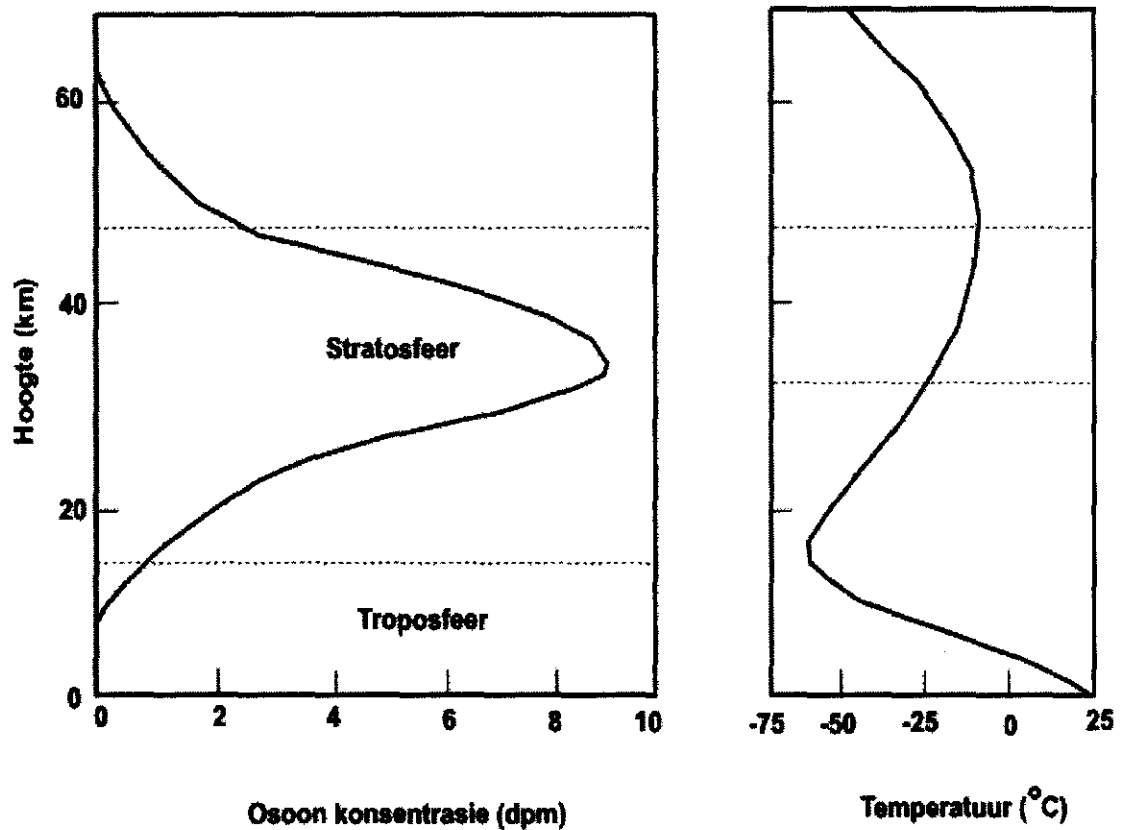
Volgens McIlveen (1992) bestaan die atmosfeer van die aarde uit 'n aantal lae. 'n Eenvoudige uiteensetting hiervan is die troposfeer, stratosfeer en die grens tussen hulle, die tropopouse, voorgestel in Figuur 2.9.



Figuur 2.9. Uiteensetting van die samestelling van die atmosfeer
(Volgens data verskaf deur McIlveen, 1992)

2.4.1.1. Die troposfeer

Die troposfeer strek vanaf die oppervlak van die aarde tot by die tropopouse (sowat 10 tot 18 km bo seespieël, afhangende van seisoen en breedte-ligging). Die hoogte daarvan is die grootste in die trope en die laagste tydens wintermaande oor die pole. Dit het 'n gemiddelde hoogte van ongeveer 14 km. In Figuur 2.10 kan gesien word dat die temperatuur en drukking in die troposfeer daal met 'n toename in hoogte ('n Gemiddelde temperatuur van 290 °K by die aarde se oppervlak tot sowat 210-220 °K by die tropopouse en 'n drukking van ongeveer 760 torr by die oppervlak van die aarde tot ongeveer 100 torr by die tropopouse) (McIlveen, 1992; EPA, 1996).



Figuur 2.10. *Variasie in temperatuur en osoonkonsentrasie in die onderskeie lae van die atmosfeer (Baird, 1995).*

2.4.1.2. Die stratosfeer

Die stratosfeer strek vanaf die tropopouse tot 'n hoogte van sowat 50 km. In Figuur 2.10 kan gesien word dat anders as in die troposfeer, die temperatuur in die stratosfeer styg met 'n toename in hoogte vanaf ongeveer 210-220 °K by die tropopouse tot ongeveer 270 °K by die bopunt van die stratosfeer. Die drukking in die stratosfeer daal egter steeds met 'n toename in hoogte. Drukking strek van sowat 100 torr by die tropopouse tot ongeveer 1 torr by die bopunt van die stratosfeer.

Die onverwagse styging in temperatuur in die stratosfeer is weens die eksotermiese, drieliggaam-botsings (sien vorming van osoon in die stratosfeer waarby die derde liggaam, M, betrokke is) tydens die vorming van osoon.

2.4.2. “Voordelige” en “nadelige” osoon

Osoon kom in beide die aarde se stratosfeer of op grondvlak (in die troposfeer) voor. Die samestelling van osoon bly presies dieselfde, ongeag waar dit voorkom. Osoon kan egter voordelig of nadelig wees, afhangende van waar dit voorkom. (EPA, 1997b)

Voordelige osoon

In die boonste stratosfeer (10-50 km bo die oppervlak van die aarde) dien osoon as 'n skild wat skadelike ultravioletstrale van inkomende sonstrale verwyder. Hoë konsentrasies osoon in die stratosfeer is dus tot voordeel van die omgewing (EPA, 1997b).

Nadelige osoon

In die aarde se laer atmosfeer (die troposfeer) besoedel osoon die omgewing. Hierdie osoonvorming vind plaas as besoedelingsgasse wat vrygestel word deur motors, kragstasies, raffinaderye, chemiese aanlegte en ander bronne chemies reageer in die teenwoordigheid van sonlig. Osoonbesoedeling is veral 'n bron van kommer gedurende die somermaande wanneer die weerstoestande wat benodig word vir die vorming van grondvlak-osoon, naamlik baie sonlig en hoë temperature, normaalweg voorkom. Hierdie osoon lei tot verskeie gesondheidseffekte en kan nadelig wees vir mense, diere en plante (EPA, 1997b).

Die EPA is tans besig om nuwe standaarde vir osoonvlakke te implementeer (kyk § 2.3).

2.4.3. Wie loop die risiko om deur “nadelige” osoon beïnvloed te word?

Die EPA (1997a) het verskeie groepe mense geïdentifiseer wat 'n verhoogde risiko het om deur relatief hoë vlakke osoon beïnvloed te word:

2.4.3.1 Aktiewe kinders

Volgens die EPA (1997a) is kinders die groep wat die hoogste risiko loop om deur osoonblootstelling negatief beïnvloed te word omdat hulle groot dele van die warm (en osoonryke) seisoene in die buitelug⁵ deurbring. Verhoogde fisiese aktiwiteit het vinniger en dieper asemhaling tot gevolg.

- 'n Volwassene asem 13 000 liter lug per dag in. Kinders asem selfs meer lug in per kilogram liggaamsgewig. Kinders het dus 'n hoër asemhalingstempo as volwassenes in verhouding met liggaamsgewig en long-oppervlakarea. Die gevolg is dat 'n hoër dosis osoon hul longe bereik. (EPA, 1997a)
- Kinders se lugweë is steeds besig om te ontwikkel en is dus meer vatbaar vir bedreigings vanuit die omgewing (EPA, 1997a).
- Selfs al ervaar kinders 'n beduidende daling in longfunksie wil dit voorkom asof hulle die akute simptome wat met osoon gepaardgaan in volwassenes, glad nie aanmeld nie. Kinders is dus nie in staat om die waarskuwings te ontvang of te verstaan om minder tyd in die buitelug deur te bring en sodoende hul osoonblootstelling te verminder nie (EPA, 1997a).
- Die lugweë van 'n kind is nouer as die van 'n volwassene. Blootstelling wat slegs 'n effense irretasie of inflammasie by 'n volwassene tot gevolg het kan lei tot 'n beduidende obstruksie van die lugweë in 'n jong kind (EPA, 1997a).

⁵ Buitelug verwys na lug wat elke dag algemeen ingeasem word en verwys nie noodwendig na besoedelde lug nie

- Tydens oefening haal kinders, net soos volwassenes, deur beide hul mond en neus asem. As die neus tydens die asemhalingsproses gesystap word, word die filter-effek daarvan verlaag en word meer irriterende ingeasem wat in kombinasie met osoon tot asma-aanvalle kan lei (EPA, 1997a).
- Osoon kan lei tot meer gereelde respiratoriese infeksies vanweë onderdrukking van die long se selfbeskermingsvermoë. Die moontlikheid bestaan dat kinders wat gereeld laer-lugweginfeksies opdoen die risiko loop om 'n verlaagde longfunksie later in hul lewe te hê (EPA, 1997a).

Kinders is tot drie maal meer aktief as volwassenes en asem dus meer besoedelde lug diep in hul longe in. Dit is ook meer waarskynlik dat 'n groter persentasie kinders asma het, waarvan die simptome vererger kan word deur asma (EPA, 1997a).

2.4.3.2 Gesonde volwassenes

Aktiewe volwassenes van alle ouderdomme wat meer oefening of fisiese werk in die buitelug doen, het 'n hoër vlak van osoonblootstelling as minder aktiewe mense van hul ouderdom:

- Volwassenes wat selfs net matige oefening doen kan 'n verlaging van 15-20% in longfunksie hê weens blootstelling aan lae vlakke van osoon (EPA, 1997a).
- Herhaalde osoonblootstelling kan longskade veroorsaak wat 'n verlaagde lewenskwaliteit tot gevolg kan hê. Toetse op proefdiere toon dat herhaalde blootstelling beduidende en permanente veranderings in longstruktuur tot gevolg kan hê (EPA, 1997a).

2.4.3.3 Asmaliers en asmatiese kinders

Persone met asma of ander verwante longkwale wat die longe meer sensitiseer vir die effek van osoon, sal oor die algemeen vroeër en by

laer osoonkonsentrasies simptome wat osoonverwant is opmerk (EPA, 1997a).

- Asma is 'n groeiende bedreiging vir kinders en volwassenes. 25 persent van die populasie in die VSA is kinders. 40% van alle asma-gevalle in die VSA is kinders (EPA, 1997a).
- In die VSA sterf 14 Amerikaners daaglik vanweë asma. Dit is drie maal hoër as wat dit 20 jaar gelede was. Swart Amerikaners sterf teen 'n tempo wat ses maal hoër is as wat die geval is by blankes (EPA, 1997a).
- Osoon veroorsaak en vererger asma as gevolg van sensitering van die lugweë (EPA, 1997a).

Oor die algemeen ervaar meer en meer mense negatiewe effekte soos wat die konsentrasies van grondvlak-osoon styg. Die effekte raak ernstiger en meer mense word in hospitale opgeneem weens respiratoriese probleme. Hoër osoonvlakke behoort 'n bron van kommer te wees vir almal, hetsy dit binne of buite voorkom (EPA, 1997a).

2.4.3.4 'n Sub-groep van die algemene publiek wat meer sensitief is vir osoon

Studies het bevind dat 'n sub-groep van die algemene gesonde populasie op so 'n manier op osoonblootstelling tydens oefening reageer dat hul afname in longfunksie aansienlik groter is as normaal. Daar is tans geen manier om hierdie sensitiewe groep voor osoonblootstelling te identifiseer nie, maar die EPA (1996) skat dat hierdie groep tussen 5 tot 20 persent van die Amerikaanse bevolking kan wees.

2.5. Gesondheidstandaarde vir osoonvlakke

Volgens die FDA (2001) is "Ozone a toxic gas with no known useful medical application in specific, adjunctive, or preventive therapy. In order for ozone to be effective as a germicide, it must be present in a concentration far greater than that which can be safely tolerated by man and animals".

Verskeie organisasies in die VSA het vlakke daargestel vir die veilige gebruik van osoon. Dit blyk dat die VSA die meeste beheer en beperkinge op osoonvlakke uitoefen en dat geen sodanige beperkinge vir gebruik daarvan in die RSA geld nie. Tabel 2.3 dui op bestaande regulasies vir en beperkings op osoonkonsentrasies in die VSA.

Osoonkonsentrasies word in dele per miljoen (dpm) bepaal. Vlakke van 0.03 - 0.6 dpm word gereeld in stede in die VSA gemeet, terwyl vlakke in die platteland wissel tussen 0.005 dpm en 0.01 dpm. Die menslike irritasiedrempel blyk om ongeveer 0.06 dpm te wees met geen bewys van gesondheidsrisiko by herhaaldelike blootstelling aan laer konsentrasies nie. Die reukdrempel vir mense is tussen 0.01 dpm en 0.015 dpm (EPA, 1996).

Tabel 2.3. Uiteensetting van beperkings op osoonkonsentrasies in die VSA

Osoon Konsentrasie	Organisasie	Opmerking
0.12 dpm *	EPA	Algemene lugkwaliteit-standaard vir osoon gestel deur "Environmental Protection Agency". Dit is 'n maksimum gemiddelde konsentrasie oor 'n periode van 8 uur.
0.10 dpm	NIOSH	Maksimumvlak van osoon soos gestel deur die "National Institute of Occupational Safety and Health" wat op geen stadium oorskry mag word nie.
0.10 dpm	OSHA	Die "Occupational Safety and Health Administration" vereis dat werkers nie blootgestel word aan 'n gemiddelde konsentrasie van meer as 0.10 dpm oor 'n tydperk van 8 ure nie.
0.05 dpm	FDA	Maksimumvlakke van osoon binnenshuis gegenereer deur osoongenerators.

* Die EPA is tans in hofsake gewikkel waarmee hulle probeer om die maksimum osoonvlak na 0.08 dpm te verlaag.

Vir die doel van hierdie verhandeling is die hoeveelheid osoon wat tydens sintese met behulp van osoongenerators in kontak met die menslike lugweë kom, onder andere as lugsuiweraar, van belang.

**Die FDA (2001) stel spesifieke regulasies vir die gebruik van
osoongenerators :**

(U.S. Federal Drug Administration, 2001)

“

Subpart H--Special Requirements for Specific Devices

Sec. 801.415 Maximum acceptable level of ozone..

(c) A number of devices currently on the market generate ozone by design or as a byproduct. Since exposure to ozone above a certain concentration can be injurious to health, any such device will be considered adulterated and/or misbranded within the meaning of sections 501 and 502 of the act if it is used or intended for use under the following conditions:

(1) In such a manner that it generates ozone at a level in excess of 0.05 part per million by volume of air circulating through the device or causes an accumulation of ozone in excess of 0.05 part per million by volume of air (when measured under standard conditions at 25 deg.C (77 deg.F) and 760 millimeters of mercury) in the atmosphere of enclosed space intended to be occupied by people for extended periods of time, e.g., houses, apartments, hospitals, and offices. This applies to any such device, whether portable or permanent or part of any system, which generates ozone by design or as an inadvertent or incidental product.

(2) To generate ozone and release it into the atmosphere in hospitals or other establishments occupied by the ill or infirm.

(3) To generate ozone and release it into the atmosphere and does not indicate in its labeling the maximum acceptable concentration of ozone which may be generated (not to exceed 0.05 part per million by volume of air circulating through the device) as established herein and

the smallest area in which such device can be used so as not to produce an ozone accumulation in excess of 0.05 part per million.

(4) In any medical condition for which there is no proof of safety and effectiveness.

(5) To generate ozone at a level less than 0.05 part per million by volume of air circulating through the device and it is labeled for use as a germicide or deodorizer.

(d) This section does not affect the present threshold limit value of 0.10 parts per million (0.2 milligram per cubic meter) of ozone exposure for an 8-hour-day exposure of industrial workers as recommended by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

(e) The method and apparatus specified in 40 CFR part 50, or any other equally sensitive and accurate method, may be employed in measuring ozone pursuant to this section.

”

2.6. Effek van osoon

2.6.1. Effek op mens en dier

Volgens Lippman (1989) is osoon 'n long-irritant wat die dood tot gevolg kan hê weens pulmonale edeem. Chroniese brongitis, fibrose en emfisemiese verandering word ook algemeen by verskeie spesies, onder meer mense en knaagdiere, waargeneem na blootstelling aan osoon (Amdur *et al.*, 1978).

Die FDA (2001) stel dat *“although undesirable physiological effects on the central nervous system, heart, and vision have been reported, the predominant physiological effect of ozone is primary irritation of the mucous membranes. Inhalation of ozone can cause sufficient irritation to the lungs to result in pulmonary edema. The onset of pulmonary edema is usually delayed for some hours after exposure; thus, symptomatic response is not a reliable warning of exposure to toxic concentrations of ozone. Since olfactory fatigue develops readily, the odor of ozone is not a reliable index of atmospheric ozone concentration.”*

Vir die meeste persone wat aan lae konsentrasies osoon blootgestel word, sal dit egter nooit meer as 'n matige irretant wees nie (EPA, 1996). Blootstelling aan matige tot hoë konsentrasies lewer egter verskeie nuwe-effekte wat al deur verskeie navorsers genoteer is. Hierdie blootstelling aan osoon kan ingedeel word in akute- en chroniese blootstelling (sien Tabela 2.5 en 2.6). Nuwe-effekte in ander dele van die liggaam is moontlik, maar vir die doel van hierdie studie is slegs gefokus op die moontlike effek van osoon op die lugweë.

2.6.1.1. Akute Blootstelling

Akute blootstelling word vir die doel van hierdie navorsing gedefinieer as blootstelling van hoogstens een dag. Blootstellings in Tabel 2.4 wissel tussen een en agt uur. Konsentrasies varieer van 0.1 – 1.0 dpm.

Tabel 2.4. Effekte na akute osoonblootstelling

Vinnige, vlak asemhaling	Linn <i>et al.</i> , 1982; Tepper <i>et al.</i> , 1989
Pynlike asemhaling	EPA , 1996
Moegheid	EPA, 1996
Hoofpyn	EPA, 1996
Slaapsteurnisse	EPA, 1996
Verlaagde longfunksie	Joad <i>et al.</i> , 1998
Verhoogde lugwegweerstand	EPA, 1996
Lugweginflamasie	Joad <i>et al.</i> , 1998; Tepper <i>et al.</i> , 1989.
Hoes	Joad <i>et al.</i> , 1998

Tabel 2.4 (vervolg) Effekte na akute osoonblootstelling

Droë keel	EPA, 1996
Lugweghiperreaktiwiteit	Joad <i>et al.</i> , 1998; Linn <i>et al.</i> , 1982.; Tepper <i>et al.</i> , 1989
Verhoogde brongiale epiteeldeur- laatbaarheid	Joad <i>et al.</i> , 1998
Verlaagde siliëre opruiming	Joad <i>et al.</i> , 1998; EPA, 1996
Verhoging van asmatiese simptome, veral by kinders	Joad <i>et al.</i> , 1998
Lugwegkongestie	Linn <i>et al.</i> , 1982; Tepper <i>et al.</i> , 1989
Afname in geforseerde vitale kapasiteit (FVK)	Linn <i>et al.</i> , 1982; Tepper <i>et al.</i> , 1989
Afname in geforseerde ekspiratoriese volume in een sekonde (FEV ₁)	Linn <i>et al.</i> , 1982; Tepper <i>et al.</i> , 1989
Epiteelskade	Tepper <i>et al.</i> , 1989.

Tabel 2.4 (vervolg) Effekte na akute osoonblootstelling

Pulmonale edeem wat tot dood kan lei	Lippman, 1989
Verhoogde C-veselaktiwiteit	Hahn, 1986
Verlaagde funksie van EpAVF (Epiteel-afhanklike verslappings-faktor) wat deur lugweg vrygestel word om kontraksie van lugweggladdespier te voorkom	Jones <i>et al.</i> , 1988
DNA kettingbreking	Ferng <i>et al.</i> , 1997
Verhoogde proteïeninhoud van longvloeistof	Ferng <i>et al.</i> , 1997
Metaplasiese effek op mukusselle	Wagner <i>et al.</i> , 2001
Veranderinge in serotonien opruiming	Gross <i>et al.</i> , 1991
Verhoogde vrystelling van substans P deur inflammatoriese selle wat kan lei tot gladdespier-kontraksie en verhoogde mukus-sekresie	Joos <i>et al.</i> , 2000

Tabel 2.4 (vervolg) Effekte na akute osoonblootstelling

Naarheid	EPA, 1996
Neutrofilliese rinitis en brongioltis	EPA, 1996
Degeneratiewe veranderinge in Tipe I selle asook 'n swelling of skeuring van die kapillêre endoteel in die alveoli	Lippman, 1989

2.6.1.2. Chroniese blootstelling

Met chroniese blootstelling word verwys na blootstelling van verlengde periodes, bv. 3-7 dae. Effekte van chroniese osoonblootstelling word in Tabel 2.5 weergegee. Konsentrasies, soos wat die geval met akute blootstelling was, varieer tussen 0.1 en 1.0 dele per miljoen.

Tabel 2.5. Effek as gevolg van chroniese osoonblootstelling.

Oordrewe effek van vinnig aanpassende reseptore (VAR ⁶) wat 'n soortgelyke effek as akute osoonblootstelling tot gevolg het.	Joad <i>et al.</i> , 1998
--	---------------------------

⁶ Vanaf Engels : Rapid acting receptors (RAR)

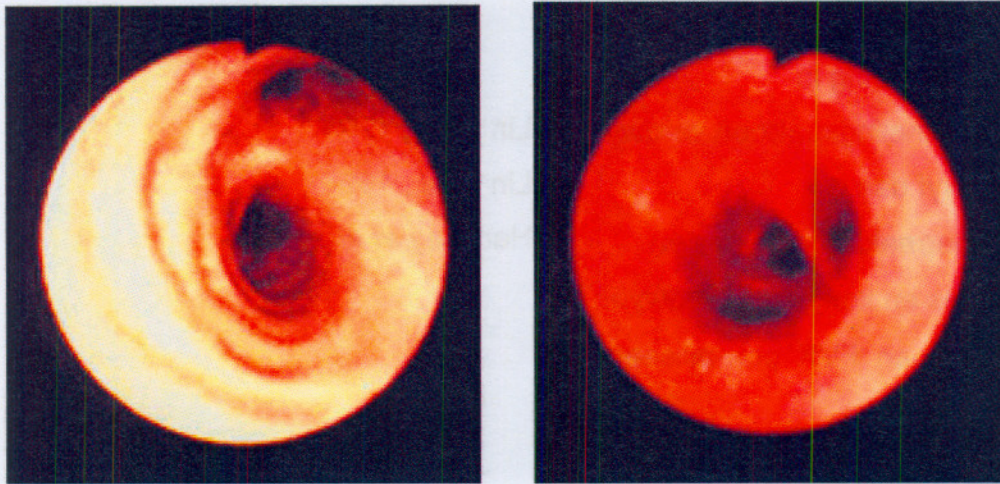
Tabel 2.5 (vervolg) Effek as gevolg van chroniese osoonblootstelling.

Aanpassing⁷ van die lugweë teenoor sommige effekte van osoonblootstelling: • Verandering in asemhalingspatroon verdwyn na vyf dae. • Hiperreaktiwiteit verdwyn. • Hoes en kongestie verdwyn. • FEV₁ en FVK normaliseer na twee dae. Onderliggende skade aan die lugweg word egter steeds aangerig.	Tepper <i>et al.</i>, 1989; Lin <i>et al.</i>, 1994. Lin <i>et al.</i>, 1994 Lin <i>et al.</i>, 1994 Hackney <i>et al.</i>, 1977
Epiteelskade	Tepper <i>et al.</i>, 1989
Vrystelling van leukotrien C₄, prostaglandien F_{2α}, histamien en bradikiniën wat VAR kan sensiteer en stimuleer.	Rajakulasingham <i>et al.</i>, 1991
Chroniese blootstelling aan lae konsentrasies veroorsaak meer simptome as akute blootstelling aan hoë konsentrasies – dit is dus moontlik dat aanpassing⁸ (adaptasie) by lae konsentrasies nie plaasvind nie.	Hackney <i>et al.</i>, 1977

⁷ Vanaf Engels : Adaptation

⁸ 'n Verlagings in effekte wat tydens chroniese blootstelling waargeneem word

In Figuur 2.11 kan die effek op die lugweë as gevolg van osoonblootstelling duidelik waargeneem word. Hierdie inflammasie is moontlik verantwoordelik vir kongestie en verlaagde lugvloei.



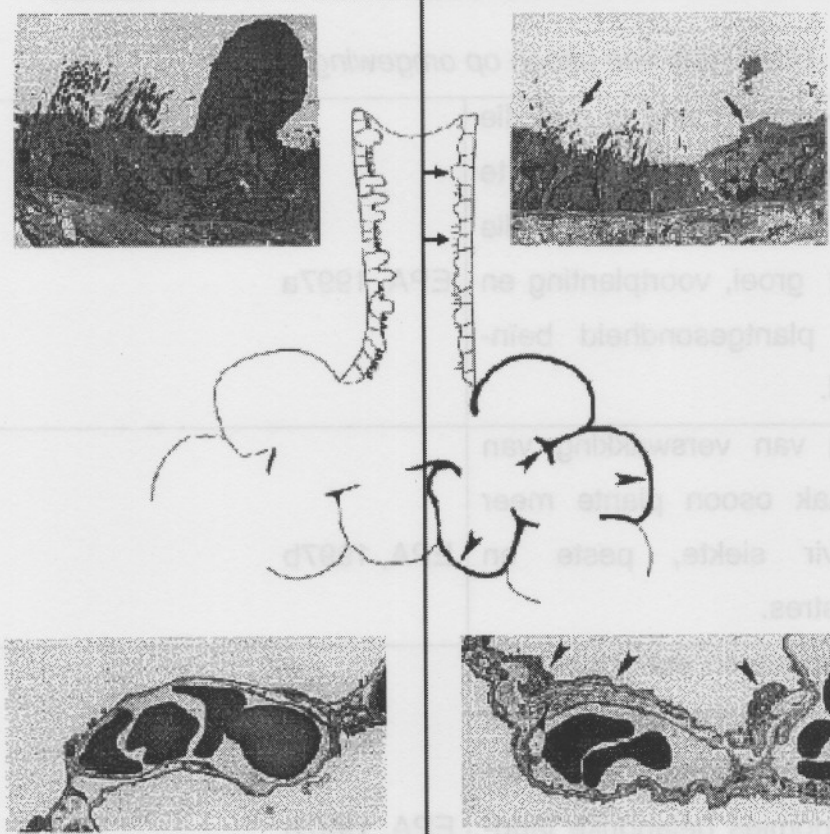
Figuur 2.11. Vergelyking van 'n gesonde lugweg (links) met 'n lugweg blootgestel aan osoon (regs) (EPA, 1999). Let op die inflammatoriese veranderinge van die lugweg aan die regterkant.

Figuur 2.12 vergelyk die verandering aan 'n lugweg wat blootgestel is aan osoon met dié van 'n gesonde lugweg ('n lugweg blootgestel aan skoon lug).

2.6.1.3. Bespreking van akute en chroniese effekte

Beide chroniese en akute blootstelling aan osoon het inflammatoriese veranderinge en epiteelskade tot gevolg. By chroniese blootstelling wil dit egter voorkom asof aanpassing ná herhaalde blootstelling plaasvind. Hierdie aanpassing het onder meer 'n verlaging in osoon-geïnduseerde hiperreaktiewiteit van die tragea teenoor metacholien en kongestie tot gevolg (Kyk Tabel 2.5). Dit wil voorkom of aanpassing nie plaasvind ná chroniese blootstelling aan lae konsentrasies nie, maar slegs by volgehoue hoë osoon konsentrasies. Akute blootstelling het dus oor die algemeen meer heftige reaksies tot gevolg as wat die geval met chroniese blootstelling is. Osoon rig egter steeds onderliggende skade aan al word minder simptome waargeneem.

LUG OSOON



Figuur 2.12. 'n Vergelyking van die morfologie in die terminale brongioli en sentriasiênêre area (CAR⁹) van die long na blootstelling van laboratoriumrotte aan gefiltreerde lug en na blootstelling aan gesimuleerde besoedelde, osoonbevattende lug vir 'n tydperk van tot 78 weke. In die terminale brongioli het die grootte van die selle van die "Koepel van Clara"¹⁰ kleiner geword na osoonblootstelling, en die hoeveelheid silia is verminder (aangedui deur die pyltjies, →). In die CAR het die epiteel dikker geword as gevolg van kollageen neerlegging (aangedui deur die pylkoppe, ►). Bron : Chang et al. (1992).

⁹ Vanaf Engels: Centriacinar region

¹⁰ Vanaf Engels: Dome of Clara

2.6.2. Effek op plante en omgewing

Blootstelling aan hoë konsentrasies osoon het ook ongewenste effekte op die omgewing. Tabel 2.6 bevat 'n uiteensetting van die algemene newe-effekte.

Tabel 2.6. *Uitwerking van osoon op omgewing*

Grondvlak-osoon meng in met die vermoë van plante om voedsel te vervaardig en te stoor, met die gevolg dat groei, voortplanting en algemene plantgesondheid beïnvloed word.	EPA, 1997a
As gevolg van verswakking van plante maak osoon plante meer vatbaar vir siekte, peste en omgewingstres.	EPA, 1997b
Dit is al aangetoon dat grondvlak osoon verantwoordelik is vir verlaagde oeslewering van verskeie ekonomies belangrike landbougewasse, onder meer soja-bone, koring en katoen).	EPA, 1997b
Die uitwerking van grondvlak-osoon op spesies met 'n lang leeftyd soos bome neem toe oor 'n aantal jare met die gevolg dat hele plantasies of ekosisteme geaffekteer kan word.	EPA, 1997b
Osoon kan ook 'n negatiewe impak uitoefen op ekologiese funksies soos water-beweging, mineraal en nutriënt-sirkulering asook die habitat van verskeie plant- en dierespesies.	EPA, 1997b

Tabel 2.6 (vervolg) Uitwerking van osoon op omgewing

Osoon kan blare laat sterf of tot so `n mate beskadig dat dit vlekke toon of selfs afval. Hierdie effek kan `n beduidende afname hê op die natuurlike skoonheid van `n gebied, onder meer nasionale parke en rekreasieareas.	EPA, 1997b
Stikstof-oksied, een van die belangrikste verbindings wat deur osoon voortgebring kan word, dra by tot vissterftes en die verhoogde groeï van alge in sensitiewe waterweë.	EPA, 1997b

Dit is duidelik dat osoon die gesondheid van plante nadelig beïnvloed deur onder meer groei te inhibeer deur voedselopname te verminder. Plante word ook meer vatbaar vir siektes ná blootstelling aan relatief hoë osoonkonsentrasies. Osoon kan dus duidelike finansiële implikasies op die kommersiële verbouing van plante hê en beïnvloed verder ook die prag van die natuur deurdat dit blare vlek.

2.7. Gebruike van osoon

Vele nie-medisinale aanwendings van osoon kan in die literatuur gevind word. Hierdie aanwendings staan in verband met die oksiderende eienskappe van osoon op die gebied van onder meer water-, lug- en grondsuiwering. Daarteenoor word osoon vir 'n groot verskeidenheid medisinale doeleindes gebruik. Die wetenskaplike evaluering van hierdie medisinale gebruike is egter nog nie deur middel van aanvaarbare kliniese en pre-kliniese studies bevestig nie. Verder beweer die FDA (2001) dat osoon oor geen bekende bruikbare mediese toepassing beskik nie. Dit bring mee dat daar erge twyfel is oor die terapeutiese potensiaal van osoon, terwyl osoon steeds toenemend *ad hoc* gebruik word vir die behandeling van verskeie siektetoestande sonder wetenskaplike bewyse. Die medisynebeheerowerede het wêreldwyd nog nie erkenning verleen aan sodanige medisinale aansprake nie, met die uitsondering van die behandeling van mondkulke. Enkele mediese wetenskaplikes poog egter om die medisinale veld van osoon aan te pak, veral wat pre-kliniese studies betref. Sodanige data behoort van waarde wees by die uiteindelijke kliniese evaluering van osoon.

Tabel 2.7 is 'n opsomming van moontlike indikasies, asook reeds bekende gebruike van osoon. Let daarop dat nie-medisinale aanduidings in meeste gevalle op wetenskaplik gefundeerde studies gebaseer is, terwyl medisinale aansprake meestal gebaseer is op lukrake waarnemings wat nog nie wetenskaplik bewys is nie.

Tabel 2.7. Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

Gebruik/ Aanspraak	Opmerking	Bron
Die beheer van reuke	Nuttig by neutralisering van reuke van onder meer swael, sigarette, perspirasie, dierlike afval, ens.	Nebel <i>et al.</i> , 1975
Verpakking van farmaseutiese produkte	`n Osoonbevattende atmosfeer word gebruik om `n steriele produksielyn daar te stel.	Kilham & Dod, 1999
Bleiking	Vanweë osoon se sterk oksiderende vermoë.	Rice, 2001
Verpakking van kos	Steriele verpakking van bederfbare produkte kan `n langer rakleef tyd verseker.	Rice, 2001
Landbou	Die kweking van sekere tipes plante, byvoorbeeld aarbeie, toon definitiewe voordele ten opsigte van die kweek daarvan in `n gekontroleerde osoonbevattende omgewing	EPA, 1996

Tabel 2.7 (vervolg) Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

Reiniging van water	Hetsy vir behandeling van drinkwater, industrieel of selfs vir gebruik in swembaddens.	Bin, Annusewicz & Konopczynski. 2001
Selektief antibakteriële effek, onder meer op <i>Stafilokokkale</i> en <i>E. Coli</i> -infeksies	Osoon is 'n disinfektant en beskik oor 'n breë spektrum antibakteriële werking. Dit het onder andere 'n vernietigende effek op bakteriële selwande.	Bocci, 1996; Rilling & Viebahn, 1987; Wolfstaedter, 1993
Inhiberende effek op <i>Plasmodium Falciparum</i> in rooibloedselle	Weens verhoogde oksidatiewe stres op parasiete word reproduksie ontwrig.	Viebahn-Hansler, Lell & Kremsner, 2001
Behandeling van ulkuse en vir wondreiniging	Word gebruik as 'n disinfektant.	Viebahn-Haensler, 2001

Tabel 2.7 (vervolg) Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

Tandheelkunde • Na tandekstraksies • Bukkale infeksies • Parodontose	Die gebruik van osoon verlaag die moontlikheid van infeksies, help met wondreining en tree op as 'n disinfektant	Viebahn-Haensler, 2001
Arteriële sirkulatoriese afwykings	Aktivering van rooibloedsel-metabolisme met 'n verbetering van suurstof-vrystelling. Aktivering van RSS (reaktiewe suurstofspesies) en radikaal-opruimers.	Viebahn-Haensler, 2001
Kankers	Dit is gerapporteer dat osoon die produksie van interleukin II (Carpendale en Freeberg, 1991) asook tumornekrose faktor by menslike leukosiete, stimuleer (Paulesu, Luzzi and Bocci, 1991). Kankerselle beskik oor min of geen oksidasiebuffers nie o.a. SOD, en peroksidase (Galeotti, Bartoli en	Paulesu, Luzzi & Bocci, 1991; Rilling <i>et al.</i>, 1987; Sunnan, 1988.

Tabel 2.7 (vervolg) Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

	Santini, 1981). In hierdie opsig is kankers soortgelyk aan anaërobe organismes waarin daar geen nut vir 'n oksidatiewe buffersisteem is nie. Osoon is dus veral beskadigend teenoor kankerselle¹¹. Volgens Rilling <i>et al.</i>, 1987 en Sunnen, 1988 kan osoon aangedui word vir die behandeling van byna enige soort kanker	
Virale infeksies (o.a. MIV, herpes-simpleks en -zoster, cytomegalovirus, Epstein-Barr, myxovirusse en retrovirusse	Osoon is 'n vinnige en selektiewe oksideerder van virusse	Rilling and Viebahn, 1987; Wolfstaedter 1993

¹¹ Gesonde selle van die gasheer self word moontlik gespaar van oksidering weens 'ingeboorde' beskerming van die oksidasiebuffers tokoferol, askorbiensuur, superoksiedismutase (SOD), uriensuur en glutatioon- peroksidase (Sunnen, 1988).

Tabel 2.7 (vervolg) Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

Inflammatoriese toestande soos • Knie-artrose • Traumatiese knietoestande	Daar is gerapporteer dat osoon oor die volgende anti-inflammatoriese effekte beskik: • Aktivering van antioksidatiewe ensieme as radikaal opruimers • Aktivering van immuunbevoegde- en kraakbeenselle met vrystelling van TGF-β	Viebahn-Haensler, 2001
Kandidiase		Internasionale Bio-Oksidatiewe Mediese Stigting (IBOMF)
Hart- en bloedvat-siektes: • Perifere Vaskulêre siektes • Serebrale vaskulêre siektes • Kardiovaskulêre siektes • Koronêre spasmas	Volgens die IBOMF is hierdie siektes al met osoon behandel met verskeie grade van sukses	Internasionale Bio-Oksidatiewe Mediese Stigting (IBOMF)

Tabel 2.7 (vervolg) Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

• Hart aritmeë • Gangreen • Raynaud se siekte • Temporale artritis • Vaskulêre en troshoofpyne		
Immuuntekort en immuunwanbalans, bv.: • Chroniese vorms van Hepatitis B en C • Ondersteunende behandeling van kankerpatiënte • Ondersteunende behandeling in reumatoïede artritis	Aktivering van immuunbevoegde selle met vrystelling van sitokiene soos o.a. interferone en interleukiene Regulering van die immuunstelsel Toename van antioksidatiewe kapasiteit deur aktivering van biologiese antioksidante	Viebahn-Haensler, 2001

Tabel 2.7 (vervolg) Verskillende gebruike en indikasies van osoon.

Ander siektes: • Parkinson se siekte • Alzheimer • Migraine • Chroniese pyn-sindroom	Volgens die IBOMF is hierdie siektes al met osoon behandel met verskeie grade van sukses	Internasionale Bio-Oksidatiewe Mediese Stigting (IBOMF)
--	---	--

Uit Tabel 2.7 is dit duidelik dat daar 'n wye verskeidenheid en diverse medisinale-aansprake gemaak word rakende die terapeutiese aanwending van osoon. Die noodsaaklikheid om positiewe farmakologiese data uit *in vitro* pre-kliniese studies in kliniese studies te toets is van uiterste belang ten einde hierdie aansprake as medisinaal aanvaarbaar te staaf.

Osoon word reeds met groot sukses nie-medisinaal gebruik in die vervanging van chloor-bevattende produkte wat tans by sterilisasie en suiwing van water gebruik word, terwyl die aanwending van osoon vir kankerbehandeling en virale infeksies ook moontlikhede inhou. Dit is belangrik om daarop te let dat osoon 'n toksiese gas is met verskeie nuwe-effekte en dat die voordele die nadele beduidend moet oorskry om die gebruik daarvan te regverdig.

HOOFSTUK 3

Eksperimentele Metodes en Apparaat

Eksperimente is uitgevoer om die effek van osoon op die geïsoleerde marmottragea waar te neem, asook die effekte van sekere geneesmiddels op geïsoleerde trageapreparate.

3.1 Geïsoleerde orgaan-eksperimente

Konsentrasie-effekskurwes kan opgestel word uit data wat verkry word uit *in vitro* eksperimente op geïsoleerde organe. Hieruit kan die werking van geneesmiddels of osoon onderskeidelik waargeneem word in die spesifieke konteks van elke eksperiment.

Die spesifieke orgaan (in hierdie geval die tragea) word geïsoleer deur middel van disseksie en gesuspendeer in 'n fisiologiese oplossing ('n Krebs-Henseleit oplossing). Die vloeistoftemperatuur word konstant by liggaamstemperatuur gehou en die vloeistof word deurborrel met karbogeën (5% O₂ + 95% CO₂) om die geïsoleerde orgaan aan die lewe te hou. Vir die doel van hierdie eksperiment word osoon ook op stadiums in die eksperiment deur die oplossing geborrel via 'n silikoonbuisie vanuit 'n osoongenerator. Silikoon is spesifiek gebruik omdat dit bestand is teen die korrosiewe eienskappe van osoon. Die osoon word vervaardig vanuit suiwer medisinale suurstof met behulp van 'n osoongenerator wat deur die Departement Fisika aan die Potchefstroomse Universiteit vervaardig en gepatenteer is.

Oplossings van die geneesmiddels wat gebruik word, word in verskillende konsentrasies by die fisiologiese vloeistof gevoeg en daar is gepostuleer dat die geneesmiddels direk in kontak kom met die reseptore (o.a. muskarinies en β-adrenergies. Ariëns, Simonis & Van Rossum, 1964). Die geneesmiddels (en in hierdie geval ook osoon) veroorsaak verskeie reaksies en lei tot spesifieke stimuli wat 'n

bepaalde effek tot gevolg het. Hierdie effek kan met behulp van 'n registreerder geregistreer word sodat data verwerk kan word tot meer betekenisvolle grafieke.

Van Rossum (1963) se eksperimentele metodes vir die aanmaak van geneesmiddeloplossings, disseksie, voorbereiding van die tragea, opstelling van geïsoleerde organe en verwerking van data word in hierdie eksperimente gebruik.

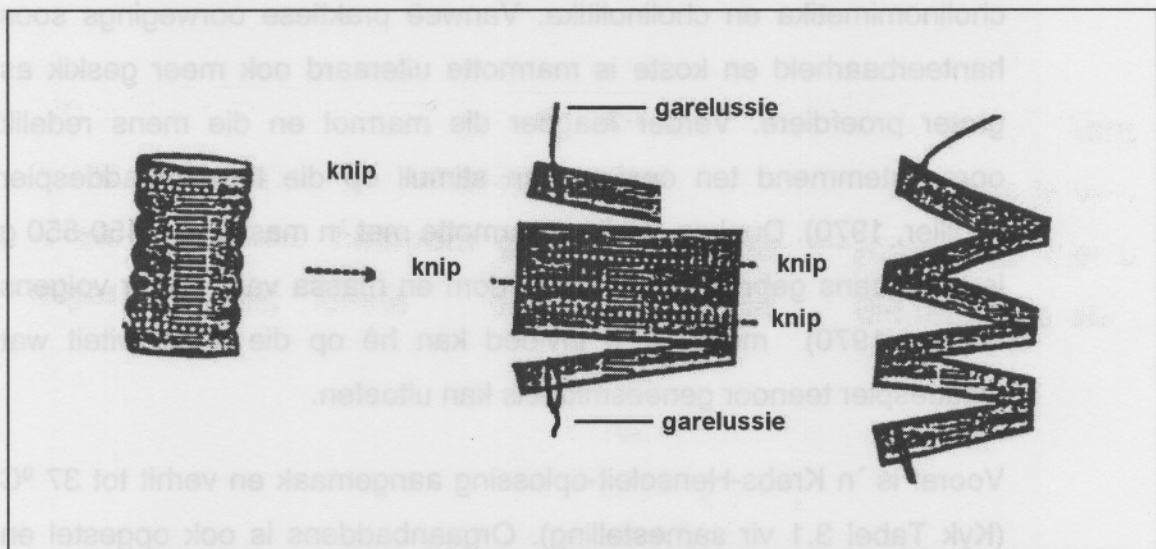
3.2. Orgaan-isolering

Die tragea van die marmot is vir eksperimente tydens hierdie studie gebruik hoofsaaklik omdat dit bestendig is en geskik is vir byvoorbeeld die studie van simpatomimetika en simpatolitika sowel as cholinomimetika en cholinolitika. Vanweë praktiese oorwegings soos hanteerbaarheid en koste is marmotte uiteraard ook meer geskik as groter proefdiere. Verder reageer die marmot en die mens redelik ooreenstemmend ten opsigte van stimuli op die lugweggladdespier (Collier, 1970). Dunkan-Hartley-marmotte met 'n massa van 450-550 g is deurgaans gebruik omdat ouderdom en massa van 'n dier volgens Collier (1970) moontlik 'n invloed kan hê op die sensitiwiteit wat gladdespier teenoor geneesmiddels kan uitoefen.

Vooraf is 'n Krebs-Henseleit-oplossing aangemaak en verhit tot 37 °C (Kyk Tabel 3.1 vir samestelling). Orgaanbaddens is ook opgestel en karbogeen deurborreling is aangeskakel. In elke orgaanbad is 10 ml van die Krebs-oplossing gevoeg.

Marmotte is met CO₂ gedood deur hulle in 'n gaskassie wat met die gas gevul is te plaas vir ongeveer 10-15 minute. Die keel van die dooie marmot is van die borskas tot by die bopunt van die nek oopgesny en die tragea is geïsoleer, verwyder en in 50 ml Krebs-Henseleit-oplossing by 37 °C geplaas om selle aan die lewe te hou. Die tragea is skoongemaak en alle oortollige weefsel wat steeds daaraan geheg was, is verwyder.

Die geïsoleerde orgaan is geknip volgens die tegniek van Timmerman en Scheffer (1967). Hierdie tegniek behels dat die tragea in die lengte van onder na bo deur die kraakbeenringe geknip word aan die teenoorgestelde kant van die tragea as wat die spier geleë is. Die geknipte tragea word oopgevlek en vyf snitte word beurtelings van beide kante deur die spier gemaak (soos aangedui in Figuur 3.1). Hierdie metode het tot gevolg dat indien die tragea uitgerek word, dit steeds by die alternatiewe kraakbeengedeeltes geheg is. Garelussies word aan beide die bo- en onderkant gevorm en aan die punte van die tragea vasgebind (lank bo en kort onder). Die orgaan word in 'n orgaanbad met Krebs-Henseleit by 37 °C gesuspenseer en die bokant van die orgaan word aan 'n druksensor gekoppel. Twee gram spanning word op die orgaan geplaas.



Figuur 3.1. Snitte van die tragea

3.3. Samestelling van Krebs-Hensleit-oplossing

’n Gewysigde Krebs-Hensleit-oplossing word gebruik en dien as ’n bufferoplossing vir die tragea-eksperimente. Dit is aangemaak volgens die spesifikasies van Patil en Jacobowitz (1968) :

Tabel 3.1. Samestelling van Krebs-Hensleit

Chemikalie	Konsentrasie
NaCl	119 mM
KCl	4.7 mM
CaCl ₂ (2H ₂ O)	1.9 mM
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.54 mM
NaHCO ₃	24.0 mM
NaH ₂ PO ₄	1.0 mM
Glukose	11.1 mM

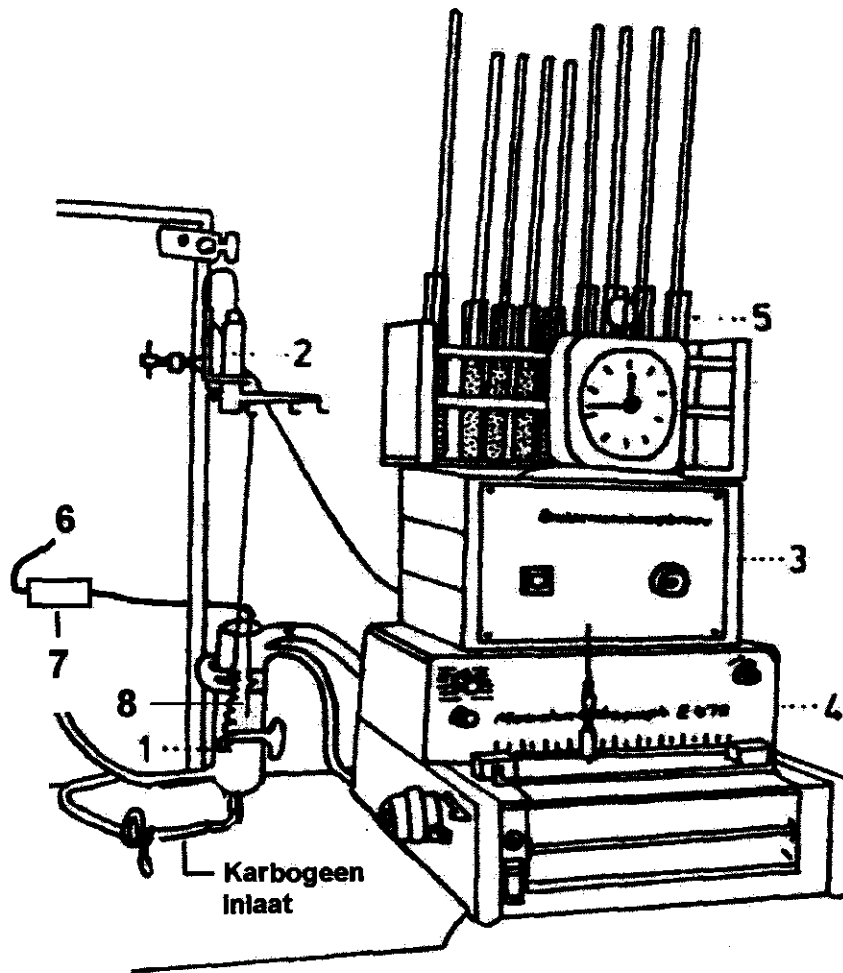
Die chemikalieë in Tabel 3.3 is opgelos in gedemineraliseerde en dubbelgedistilleerde water. Bestanddele is een vir een afgeweg en opgelos voordat die volgende bestanddeel bygevoeg is. KCl en MgCl₂ is laaste bygevoeg om die vorming van ’n presipitaat te verhoed. Karbogeën (5% CO₂ + 95% O₂) is deurgans deur die oplossing geborrel terwyl die oplossing tot 37 °C verhit is. Om te verseker dat ’n konstante pH van 7.4 deurgaans heers, is pH-bepalings gereeld uitgevoer met ’n geykte pH-meter.

3.4 Apparaat

Die geïsoleerde tragea word in 'n orgaanbad gesuspendeer soos beskryf deur Van Rossum (1963). Die orgaanbad bestaan uit die binnekant van die bad self waarin die fisiologiese oplossing geplaas word, en die mantel waardeur water met 'n temperatuur van 37 °C aaneenlopend met behulp van 'n elektriese pompstelsel deurspoel word. Karbogeen word konstant deur die fisiologiese oplossing geborrel.

Die geïsoleerde tragea word met behulp van 'n garelussie (kyk § 3.2.2) onder in die orgaanbad geanker. Die bokant van die tragea is verbind met 'n Statham UL-2 druksensor met behulp van 'n Statham UL-5 mikroskaalhefboom en versterk deur 'n versterker. Isotoniese kontraksies word deur 'n Metrohm Labograph potensiometriese registreerder (Model E 478) waargeneem en geregistreer. Die spanning in die orgaan is ingestel op 2 g deurdat die registreerder vooraf gekalibreer is met 'n 2 g gewig wat gehang is aan die mikroskaalhefboom. Die uitwyking is op die registreerder waargeneem. Die gewiggie is verwyder, die orgaan aan die hefboom gekoppel en die spanning op die orgaan vervolgens sodanig ingestel dat dieselfde uitwyking op die registreerder verkry is.

Osoon word met behulp van 'n silikoonbuisie direk in die fisiologiese oplossing vrygelaat (sien Figuur 3.2)



Figuur 3.2. Opstelling van die apparatuur.

1. Orgaanbad met orgaan
2. Druksensor
3. Druksensorkragbron
4. Skrywer
5. Proefbuisse met geneesmiddeloplossing en pipette
6. Silikoonbuisie vanaf medisinale suurstof
7. Osoongenerator
8. Osoon inlaat

3.5 Algemene prosedure van eksperimente:

Die geïsoleerde orgaaneksperimente wat uitgevoer is in hierdie verhandeling volg deurgans 'n algemene gemeenskaplike prosedure wat die voorbereidende en aanvangsfase van die studies behels. Die studies verskil in hul prosedures t.o.v. die geneesmiddels wat gebruik is en die volgorde van toediening. Slegs hierdie spesifieke aspekte word in die individuele eksperimente beskryf.

Die marmot word gedood in 'n gaskassie met koolstofdiksied waarna die geïsoleerde orgaan deur middel van disseksie verwyder en in 'n 37 °C Krebs-Henseleit-oplossing geplaas word. Die geïsoleerde tragea van elke marmot word in twee verdeel en die nodige snitte (soos beskryf in §3.2) word uitgevoer. Elke tragea-helfte word in 'n afsonderlike orgaanbad gesuspendeer en met vars Krebs-oplossing by 37 °C deurspoel waardeur karbogeen deurborrel word. Voor die aanvang van die eksperiment word die tragea-helftes vir 60 minute laat rus sodat 'n stabiele rustoestand bereik kan word. Met die aanvang van elke eksperiment word 'n standaard metacholien konsentrasie-effekskurwe geregistreer wat as 'n kontrole eksperiment dien. Die effek word geregistreer deur metacholien by die fisiologiese oplossing te voeg in toenemende konsentrasies (van 1×10^{-9} M tot 3×10^{-4} M). Na elke metacholien-konsentrasie bygevoeg is, word gewag vir afplatting van die maksimale effek by die bepaalde konsentrasie voordat die volgende konsentrasie bygevoeg word.

Die trageas word, nadat bogenoemde algemene prosedure (dus nadat die effek van die laaste metacholien-dosis waargeneem is), uitgespoel met vars Krebs-Henseleit-oplossing by 37 °C. Tussen eksperimente word die trageas vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Die betrokke eksperiment word hierna uitgevoer en registogramme word geregistreer. Aan die einde van die eksperiment word die tragea weer uitgespoel en vir 20 minute laat rus. Nog 'n metacholien-kurwe word na die rusperiode geregistreer en word met die aanvanklike kurwe vergelyk.

3.6 Trek van konsentrasie-effekskurwes

Konsentrasie-effekskurwes word getrek volgens die metodes van Van Rossum (1963). Die hoogte van die effek op registogramme word gemeet vanaf die basislyn en word op die grafiek uitgestip as 'n persentasie van die maksimum effek van die kontrole eksperiment. Die grafiek bestaan uit 'n logaritmiese X-as wat die konsentrasie voorstel, en 'n lineêre Y-as wat die effek as 'n persentasie van die maksimum voorstel. Die maksimale effek van die kontrole eksperiment (kyk § 3.5) is gelyk gestel aan 100% en die konsentrasie-effekskurwes is ten opsigte hiervan uitgeteken.

3.7 Lys van eksperimente wat uitgevoer is

3.7.1 Die direkte effek van osoon op die tragea

Tydens hierdie eksperiment is 'n kontrole konsentrasie-effekskurwe geregistreer met metacholien en vergelyk met 'n tweede metacholien-konsentrasie-effekskurwe wat geregistreer is nadat die tragea blootgestel is aan osoon. Die verloop van die eksperiment is as volg:

Die algemene prosedure (§3.5) word gevolg deur uitspoeling van die orgaanbad met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37 °C, waarna die tragea vir 20 minute laat rus word om 'n stabiele rustoestand te bereik. Die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeën steeds deurborrel word. Aan die einde van die eksperiment word die tragea weer uitgespoel en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Nog 'n metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer en word met die aanvanklike kurwe vergelyk.

As verdere kontrole is die eksperiment ook uitgevoer met suiwer medisinale suurstof uit dieselfde sisteem waaruit osoon verkry is.

3.7.2. Die invloed van osoon op die effek van isoproterenol

In hierdie eksperiment is die uitwerking van isoproterenol op die metacholien-geïnduseerde kontraksie en die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea bepaal. Die effek van osoon op die isoproterenol-geïnduseerde verslapping van die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea is ook bepaal.

Drie variasies van hierdie eksperiment is uitgevoer :

1. Isoproterenol (1×10^{-4} M as 'n enkele konsentrasie) word bygevoeg na die eerste metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea.
2. Isoproterenol (1×10^{-4} M as 'n enkele konsentrasie) word bygevoeg na die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.
3. Isoproterenol (1×10^{-4} M as 'n enkele konsentrasie) word bygevoeg na die tweede metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea.

Weens die vinnige oksidering van die isoproterenol-oplossing is 'n klein hoeveelheid askorbiensuur by die geneesmiddel-oplossing gevoeg om as preserveermiddel en anti-oksidadant te dien.

Die algemene prosedure word gevolg deur 'n byvoeging van isoproterenol (as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M) by die fisiologiese oplossing (variasie een). Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37°C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeen steeds deurborrel word. Nadat die maksimale effek verkry is word isoproterenol (as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M) by die fisiologiese oplossing gevoeg (variasie twee). Die tragea word hierna weer uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37°C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Nog 'n metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer. Nadat die maksimale effek verkry is word isoproterenol (as 'n

enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M) by die fisiologiese oplossing gevoeg (in variasie een, twee en drie). Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37°C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeen steeds deurborrel word. Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37°C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Nog 'n metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer. Nadat die maksimale effek verkry is word isoproterenol (as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M) by die fisiologiese oplossing gevoeg (in variasie twee en drie).

3.7.3. Die invloed van askorbiensuur (anti-oksidante) op die effek van osoon

Hierdie fase van die studie het ten doel om te bepaal of die anti-oksiderende eienskappe van askorbiensuur 'n effek het op die oksiderende eienskappe van osoon.

3.7.3.1 Die effek van isoproterenol wat askorbiensuur as preserveermiddel bevat op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.

In hierdie eksperiment word die eksperiment met isoproterenol wat verlaagde osoonkontrakisie getoon het, herhaal (§ 3.7.2 variasie een), maar word dit met twee variasies uitgevoer – een met askorbiensuur as deel van die geneesmiddel-oplossing (wat as kontrole dien) en een daarsonder.

Die algemene prosedure word uitgevoer (die maksimale kontrakisie word in hierdie geval verkry deur 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M metacholien by die orgaanbad te voeg) en gevolg deur die byvoeging

van isoproterenol (sonder enige askorbiensuur as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M) by die fisiologiese oplossing. Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37 °C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeen steeds deurborrel word. Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37 °C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Nog 'n maksimale metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer en met die kontrole vergelyk.

As kontrole word dieselfde eksperiment uitgevoer met isoproterenol wat wel askorbiensuur in die oplossing bevat. Hierdie eksperimentele resultate word met mekaar vergelyk.

3.7.3.2 Die invloed van suiwer askorbiensuur op die osoon geïnduseerde kontraksie van die tragea

Tydens hierdie eksperiment word die tragea aan suiwer askorbiensuur blootgestel vir 30 minute voor die byvoeging van osoon.

Die algemene prosedure word uitgevoer (die maksimale kontraksie word in hierdie geval verkry deur 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M metacholien by die orgaanbad te voeg) en gevolg deur uitspoeling van die orgaanbad met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37 °C, waarna die tragea vir 20 minute laat rus word om 'n stabiele rustoestand te bereik. Askorbiensuur (as 'n enkele konsentrasie) word by die fisiologiese oplossing gevoeg en die oplossing word laat rus vir 'n periode van 30 minute. Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37 °C. Die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeen steeds deurborrel word. Die tragea word hierna uitgespoel met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37 °C en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand

te bereik. Nog 'n maksimale metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer en met die kontrole vergelyk. As kontrole word dieselfde eksperiment sonder enige askorbiensuur uitgevoer. Hierdie eksperimentele resultate word met mekaar vergelyk.

3.7.4. Eksperimente met osoon en atropien

3.7.4.1 Eksperiment een: Die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde hiperaktiwiteit van die tragea teenoor metacholien.

In hierdie eksperiment is atropien (as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-7} M) bygevoeg ná deurborreling van osoon om waar te neem of die antagonis 'n effek op die hiperaktiwiteit van die tragea teenoor metacholien wat osoon tot gevolg het, het. Die verloop van die eksperiment is as volg:

Die algemene prosedure word uitgevoer (die maksimale kontrakisie word in hierdie geval verkry deur 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M metacholien by die orgaanbad te voeg) en gevolg deur uitspoeling van die orgaanbad met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37°C , waarna die tragea vir 20 minute laat rus word om 'n stabiele rustoestand te bereik. Die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeën steeds deurborrel word, waarna die tragea weer uitgespoel word met vars Krebs-Hensleit-oplossing by 37°C .

Atropien (as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-7}) word by die fisiologiese oplossing gevoeg waarna nog 'n maksimale metacholien-konsentrasie-effekskurwe geregistreer word.

As kontrole word dieselfde eksperiment sonder osoon-deurborreling uitgevoer waarteenoor eksperimentele resultate vergelyk word.

3.7.4.2 Eksperiment twee: Die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.

In eksperiment een is dit nie moontlik om waar te neem of atropien 'n effek op die kontraksie van die tragea wat deur osoon veroorsaak word, het nie. Eksperiment twee word uitgevoer om te bepaal of atropien die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea onderdruk.

Die algemene prosedure word uitgevoer (die maksimale kontraksie word in hierdie geval verkry deur 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M metacholien by die orgaanbad te voeg) en gevolg deur uitspoeling van die orgaanbad met vars Krebs-Hensoleit-oplossing by 37°C , waarna die tragea vir 20 minute laat rus word om 'n stabiele rustoestand te bereik. Atropien (as 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-7} M) word by die fisiologiese oplossing gevoeg. Die geïsoleerde orgaan word hierna aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl karbogeen steeds deurborrel word. Nog 'n maksimale metacholien-konsentrasie-effekskurwe word hierna geregistreer.

As kontrole word dieselfde eksperiment sonder atropien byvoeging uitgevoer waarteenoor eksperimentele resultate vergelyk word.

Let op dat atropien in hierdie eksperiment bygevoeg word voor die deurborreling met osoon. Indien dit dus 'n antagonis van osoon is sal osoon se effek verminder word.

3.7.5. Die effek van indometasien (nie-steroïed anti-inflammatoriese middels) op die effek van osoon.

Die algemene prosedure word gevolg deur uitspoeling van die orgaanbad met vars Krebs-Hensoleit-oplossing by 37°C , waarna die tragea vir 20 minute laat rus word om 'n stabiele rustoestand te bereik.

Die suurstoftoevoer (uit die sisteem waaruit osoon vervaardig word) word na die rusperiode aangeskakel. Indometasien (as 'n enkel dosis van 8 μg) word by die fisiologiese oplossing gevoeg. Die osoongenerator word aangeskakel en die geïsoleerde orgaan word aan osoon blootgestel vir 10 minute terwyl kurbogeen steeds deurborrel word. Aan die einde van die eksperiment word die tragea weer uitgespoel en vir 20 minute laat rus om 'n stabiele rustoestand te bereik. Nog 'n metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer en word met die aanvanklike kurwe vergelyk. (In 'n ander variasie van hierdie eksperiment is die indometasien (as 'n enkel dosis van 8 μg) direk na die osoon-geïnduseerde kontraktsie by die fisiologiese oplossing gevoeg om die invloed van indometasien op die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die tragea te bepaal).

As kontrole word dieselfde eksperiment sonder enige indometasien uitgevoer. Hierdie eksperimentele resultate word met mekaar vergelyk.

Indometasien is water-onoplosbaar en moet stadig in etanol verhit word tot nagenoeg 60 °C om oplosbaarheid te vergemaklik. Dit is waargeneem tydens proefnemings dat 20 μM indometasien in eksperimente die tragea laat sterf onmiddelik na byvoeging in die orgaanbad. Daar is besluit om 8 μg as konsentrasie te gebruik. Die geneesmiddel is aangemaak soos uiteengesit in Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Prosedure vir die aanmaak van indometasien

0,20 g indometasien word opgelos in 5 ml verhitte (± 60 °C) etanol
1 ml hiervan word gevoeg in 9 ml etanol
0,1 ml hiervan word gevoeg in 9.9 ml etanol
Van hierdie oplossing is : 0.1 ml = 4 μg , en 0.2 ml = 8 μg

3.7.6. Bepaling van die verband tussen die effek van osoon en waterstofperoksied

Die teenwoordigheid van waterstofperoksied in die fisiologiese oplossing word met die peroksiedtoets (§3.7.6.1) bepaal.

3.7.6.1. Die peroksiedtoets (National Research Council (NRC), 1995)

Hierdie toets is 'n aanduiding van die teenwoordigheid van waterstofperoksied in die fisiologiese oplossing. Die intensiteit van die kleurverandering is 'n aanduiding van die konsentrasie peroksied teenwoordig.

By 10 ml van 'n waterige oplossing met 'n onbekende konsentrasie peroksied is bygevoeg :

1. Kaliumjodied (ongeveer 0.5 g)
2. Gedistilleerde water (5 ml)
3. Etanol (5 ml)
4. Twee druppels gekonsentreerde swaelsuur

'n Onmiddellike verandering van kleur van die oplossing dui op die teenwoordigheid van peroksiede.

3.7.6.2 Bepaling van die verband tussen die effek van osoon en waterstofperoksied

Die algemene prosedure word uitgevoer (die maksimale kontraksie word in hierdie geval verkry deur 'n enkele konsentrasie van 1×10^{-4} M metacholien by die orgaanbad te voeg) en gevolg deur die byvoeging van waterstofperoksied (as 'n enkele dosis van 0.003% m/v) by die fisiologiese oplossing. Veranderinge in die registogram word waargeneem totdat stabiliteit bereik word. Aan die einde van die eksperiment word die tragea weer uitgespoel en vir 20 minute laat rus

om 'n stabiele rustoestand te bereik. Nog 'n metacholien-konsentrasie-effekskurwe word na die rusperiode geregistreer en word met die aanvanklike kurwe vergelyk.

3.7.7. Grondvlak toetsing vir osoon

Prosedures en inligting vir hierdie eksperiment is gebaseer op inligting soos verskaf deur die Nasionale Sentrum vir Atmosferiese Navorsing (NCAR), Boulder Colorado, V.S.A (2002).

Hierdie eksperiment is gebasseer op die oksiderende eienskappe van osoon. Dit berus op die beginsel dat osoon kaliumjodied oksideer om jodium te vorm wat met stysel reageer om 'n kleurverandering tot gevolg te hê wat 'n direkte indikasie van die konsentrasie osoon teenwoordig is. Toetsstrokies word soos volg vervaardig en opgestel:

Voeg 100 ml gedistilleerde water in 'n 250 ml glasbeker. Voeg 5 g stysel daarby. Verhit die oplossing totdat 'n jel vorm (Die oplossing verdik en raak effens deursigtig). Verwyder die beker van die hittebron en voeg 1 g kaliumjodied by. Roer die oplossing goed en laat dit afkoel. Verf 'n vel filtreerpapier eweredig aan beide kante met die oplossing. Laat die papier droog word (vermy direkte sonlig). Sny die papier in strokies en stoor in 'n lugdigte houer buite direkte sonlig. Die toetsstrokies word net voor gebruik aan beide kante met gedistilleerde water gesproei en word vir ten minste 8 ure opgestel volgens Tabel 3.3 in vyf verskillende dataversameling-areas.

Tabel 3.3. Areas waar toetsstrookies opgestel is (vir ten minste 8 ure)

Direkte blootstelling : Die osoon wat direk van die generator af kom is vir `n kort periode direk op die toetsstrokie geblaas
Laboratorium-omgewing : Dit is die osoonvlakke in die spesifieke vertrek waar met osoon gewerk is.
Naby `n fotostaatmasjien : Die zerografiese proses in meeste fotostaatmasjiene maak gebruik van elektrostatiese lading van `n silinder. Die gepaardgaande ionisering vervaardig osoon in die omliggende lug. `n Vertrek wat `n fotostaatmasjien bevat is dus `n goeie lokasie vir hierdie eksperiment.
Buitelug : Toetsstrookies is opgestel in `n warm droë omgewing
Buitelug (hoë humiditeit) : Toetsstrookies is opgestel in `n vogtige omgewing waar humiditeit aanvoelbaar is.

Om die resultate na die 8-uur periode waar te neem word die strokie weereens met gedistilleerde water gesproei en die Schoenbein-getal kan bepaal word deur die geobserveerde kleur te vergelyk met die Schoenbein-kleurskaal in Figuur 3.3.



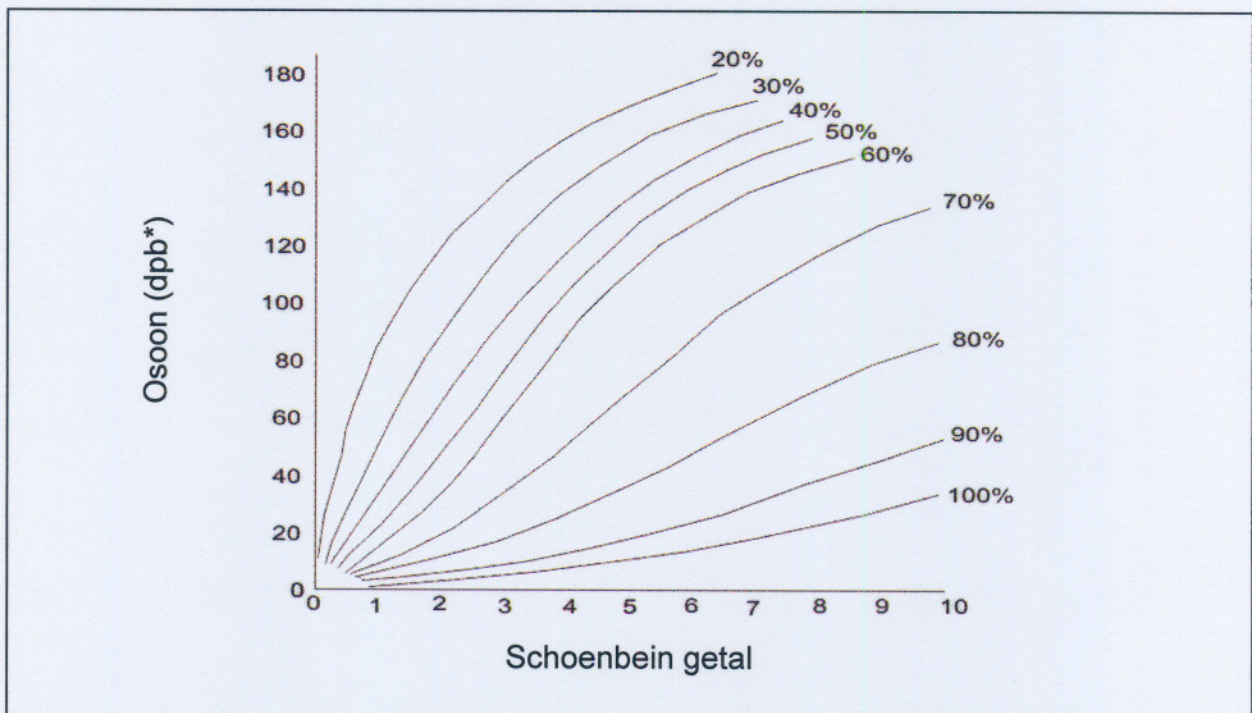
Gebruik bostaande kleurindeks saam met onderstaande skaal om die betrokke Schoenbein-getal te kry.

Schoenbein kleurskaal getal

0-3	Klein of geen verandering ten opsigte van kleur
4-6	Waargenome kleur is laventel
7-10	Waargenome kleur is blou, pers of selfs bruin.

Figuur 3.3. Schoenbein-kleurskaal

Die relatiewe humiditeit in die omgewing moet nou bepaal word. Dit is belangrik aangesien hoë humiditeit die toetsstrokies meer sensitief maak vir osoon en veroorsaak dat 'n hoër Schoenbein-getal waargeneem word. Gebruik weerdata of 'n psigrometer om die humiditeit te bepaal. Rond die relatiewe humiditeit lesing af tot die naaste 10%. Vergelyk hierdie lesing op die relatiewe humiditeit skaal in Figuur 3.4 om die dele per miljard osoon te bepaal.



Figuur 3.4. Relatiewe humiditeit-skaal

* dpb = Dele per miljard (Sien woordelys vir verklaring)

3.8. Statistiese verwerking

Konsentrasie-effekskurwes in hierdie studie is met behulp van GraphPad Prism weergawe 3.0 uitgeteken. Dieselfde program is gebruik om standaardafwykings te bereken. Die student-T toets is toegepas om statistiese beduidendheid te bepaal en p-waardes kleiner as 0.05 is as beduidend beskou. Resultate is deurgans bereken vanuit ten minste vier ($n=4$) eksperimente.

HOOFSTUK 4

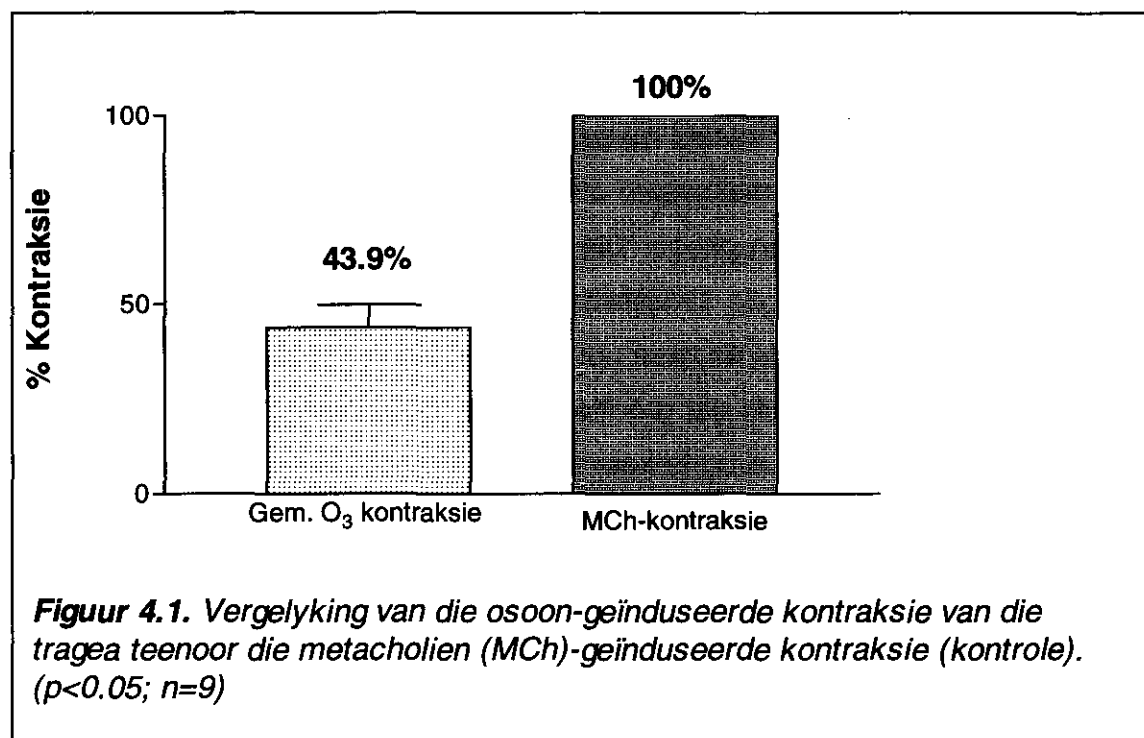
RESULTATE EN BESPREKING

4.1. Die direkte effek van osoon op die tragea

Soos reeds in hoofstuk 3 verduidelik is metacholien (’n muskariene agonis) as die standaard geneesmiddel gebruik om effek van kontraksie van die tragea deur ander middels teen te meet. In hierdie fase van die studie is die effek van osoon en metacholien op die tragea in verskeie kombinasies van eksperimente vergelyk ten einde die effek van osoon te bepaal.

4.1.1. Die effek van osoon op die tragea

Die resultate van die effek van osoon op die kontraksie van die tragea word in Figuur 4.1 weergegee.



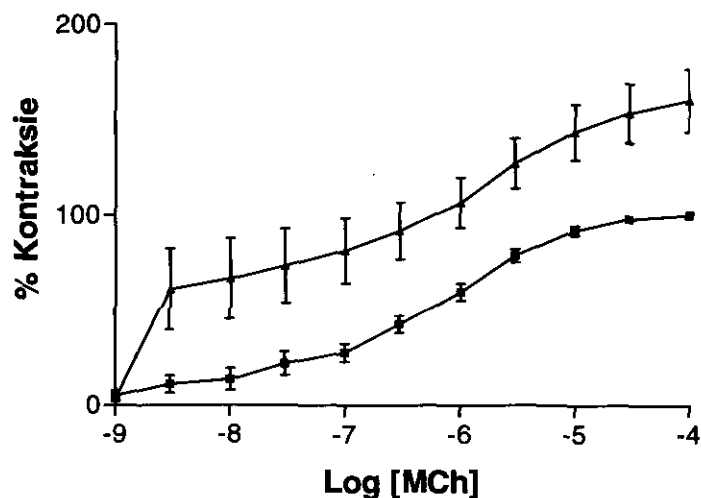
Indien die tragea aan osoon blootgestel word toon dit 'n definitiewe kontraksie na blootstelling (kyk Figuur 4.1). Hierdie kontraksie bereik 'n maksimum wat vir die duur van die blootstelling konstant bly. Indien die tragea uitgespoel en toegelaat word om te rus, verslap die tragea en bereik weer sy normale grondtoestand. Die maksimale kontraksie wat deur osoon veroorsaak word is egter kleiner as die maksimale kontraksie wat deur metacholien veroorsaak word. Hierdie kontraksie kan moontlik verskynsels soos vlak asemhaling (Lin *et al.*, 1982), verhoogde lugwegweerstand (EPA, 1996), verhoogde asmatiese simptome by kinders (Joad, 1998), lugwegkongestie (Lin *et al.*, 1982) en vele ander soortgelyke simptome verklaar.

4.1.2. Die effek van osoon op die metacholien geïnduseerde trageakontraksie

Die invloed (uitwerking) van osoon op metacholien-geïnduseerde trageakontraksie word in figure 4.2 en 4.3 weergegee.

Na blootstelling aan osoon het die geïsoleerde tragea 'n dramatiese hipersensitiwiteit teenoor metacholien ontwikkel wat tot sterk kontraksies van die tragea by lae konsentrasies metacholien lei (kyk Figuur 4.2). Die osoongesensiteerde tragea se maksimale effek is aansienlik groter as wat die effek was voor blootstelling aan osoon. Die sensitiwiteit blyk ook om 'n verlengde effek te hê. Die verhoogde sensitiwiteit wat waargeneem is na behandeling met osoon bestaan steeds na twee uur soos gesien in Figuur 4.3.

Daar is egter 'n afname in die grootte van die sensitisering en waargenome effek toon 'n neiging om terug te keer na die oorspronklike effek waargeneem tydens die metacholien kontrole eksperiment. Hierdie neiging dui daarop dat die effek van osoon 'n mate van omkeerbaarheid vertoon wat moontlik daarop kan dui dat effekte na blootstelling aan osoon omgekeer kan word deur 'n pasiënt na 'n osoonvrye omgewing te neem.



Figuur 4.2. Die effek van osoon op die metacholien(MCh)-geïnduseerde kontraksie van die geïsoleerde tragea. Die resultate dui aan dat osoon die effek van metacholien op die tragea verhoog en dat die effek hoër is as die maksimale effek van die metacholien kontrole. ($p < 0.05$)

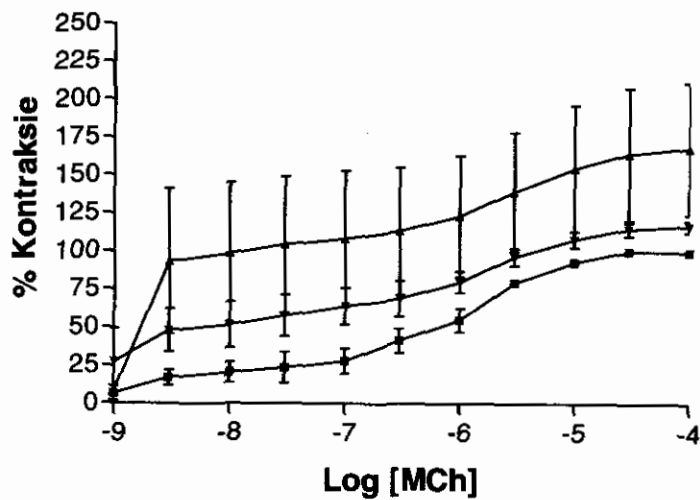
Verduideliking:

- MCh-kontraksie voor byvoeging van osoon (kontrole)
- MCh-kontraksie na byvoeging van osoon

4.1.3. Samevatting

Osoon veroorsaak twee duidelik waarneembare effekte op die tragea :

1. 'n Kontraksie van die tragea wat kleiner as die maksimale kontraksie veroorsaak deur metacholien (1×10^{-4} M) is, maar steeds statisties beduidend is.
2. 'n Verhoogde sensitiviteit van die tragea teenoor metacholien. Die maksimale kontraksie word by laer konsentrasies van metacholien verkry na blootstelling van die tragea aan osoon.



Figuur 4.3. Sensitiwiteit van die geïsoleerde tragea teenoor metacholien (MCh) na 'n rusperiode van twee ure. Die sensitiwiteit bestaan steeds, alhoewel effens verminderd.

Verduideliking:

- MCh-kontraksie voor byvoeging van osoon (kontrole)
- MCh-kontraksie na byvoeging van osoon
- MCh-kontraksie na 2 ure rusperiode

4.2. Die invloed van osoon op die effek van isoproterenol

Isoproterenol is 'n sintetiese, non-selektiewe β -adrenerge agonis. Dit is 'n derivaat van noradrenalin en het 'n kragtige brongodilatoriese effek. Isoproterenol in oplossing oksideer maklik en daarom is 'n klein hoeveelheid askorbiensuur by die geneesmiddel gevoeg om as anti-oksidant en preserveermiddel te dien.

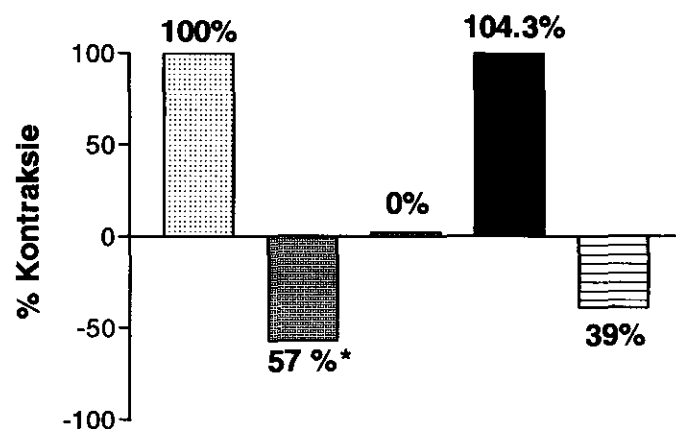
Drie verskillende eksperimente is uitgevoer om die invloed van osoon op die effek van isoproterenol te bepaal. Die eksperimente verskil ten opsigte van die volgorde waarin die studies uitgevoer is en met betrekking tot die orde van osoonbehandeling. Uit hierdie verskillende volgorde van toediening kan die effek van isoproterenol in die teenwoordigheid van osoon bepaal word.

4.2.1 Die effek van isoproterenol voor en na osoon behandeling

4.2.1.1. Die effek van isoproterenol op die metacholien geïnduseerde kontraksie van die trachea

Figuur 4.4 gee die grafiese uiteensetting van die behandelingsvolgorde van hierdie eksperiment asook die persentasie kontraksie waargeneem.

Die resultate in Figuur 4.4 toon die verwagte en reeds gerapporteerde effekte van isoproterenol (Hoffman & Lefkowitz, 1996). Nadat isoproterenol (1×10^{-4} M as 'n enkele konsentrasie) by die geïsoleerde orgaan gevoeg is vind die kontraksie van die trachea wat deur osoon veroorsaak word soos waargeneem in Figuur 4.1, glad nie plaas nie, of word dit tot 'n hoë mate onderdruk (Figuur 4.4). Volgens Trenga *et al.* (2001) vind brongokonstriksie tot 'n mindere mate plaas by pasiënte wat dieëtaanvullings van anti-oksidante ontvang het voor blootstelling aan osoon.



Figuur 4.4. Grafiese voorstelling van die effek van osoon op isoproterenol-geïnduseerde verslapping van die tragea asook die effek van isoproterenol op osoonkontraksie. Isoproterenol verslap die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea voor en na osoon-blootstelling. Geen osoon-contraksie (0%) vind plaas nadat isoproterenol by die fisiologiese oplossing gevoeg is nie. (Let daarop dat 'n positiewe waarde van die Y-as op kontraksie dui, terwyl 'n negatiewe waarde verslapping toon). (* $p < 0.05$ in vergelyking met kontrolle)

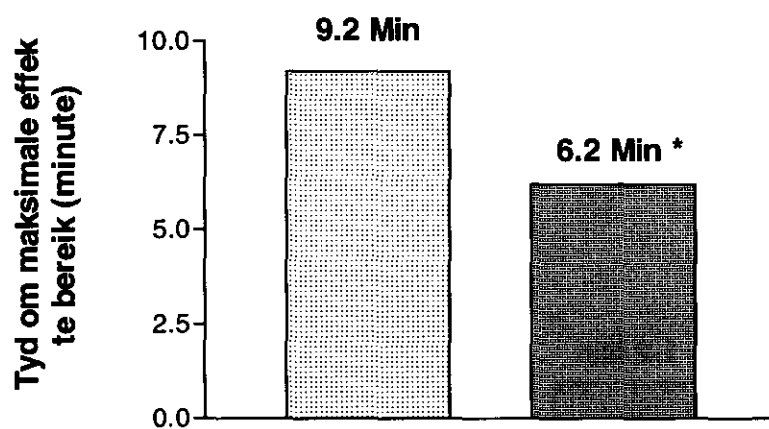
Verduideliking:

-  MCh-contraksie van die tragea voor byvoeging van osoon (kontrolle)
-  Isoproterenol verslapping van die kontrolle MCh-contraksie
-  Osoon-contraksie van die tragea
-  MCh-contraksie van die tragea
-  Isoproterenol verslapping van die Ch-geïnduseerde tragea-contraksie

Hieruit kan afgelei word dat die waargenome resultaat (Figuur 4.4) waarskynlik nie as gevolg van die isoproterenol self is nie, maar moontlik as gevolg van die anti-oksidadant wat in oplossing saam met die geneesmiddel is. Eksperimente met isoproterenol sonder 'n anti-oksidadant mag dalk nie hierdie verskynsel toon nie. Paragraaf 4.5 beskryf 'n eksperiment waar hierdie eksperiment met isoproterenol wat wel askorbiensuur bevat en isoproterenol daarsonder uitgevoer is.

4.2.1.2. Die invloed van isoproterenol op hipersensitiwiteit van die tragea

Figuur 4.5 toon die gemiddelde hiperreaktiwiteit van die tragea teenoor metacholien as 'n funksie van tyd (kontraksie voor en na osoon) na blootstelling aan isoproterenol. Die maksimale kontraksie van die tragea word vinniger bereik (6.2 minute teenoor 9.2 minute tydens die kontrole eksperiment). Dit wil dus voorkom asof isoproterenol nie die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien na osoonblootstelling beïnvloed nie, selfs al is geen osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea waargeneem nie.



Figuur 4.5. Hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien as 'n funksie van tyd. In die grafiek kan gesien word dat die tweede maksimum metacholien-kontraksie aansienlik vinniger bereik word na osoon-blootstelling. Dit wil dus voorkom asof isoproterenol geen effek op hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien na osoon-blootstelling het nie. (* $p < 0.05$)

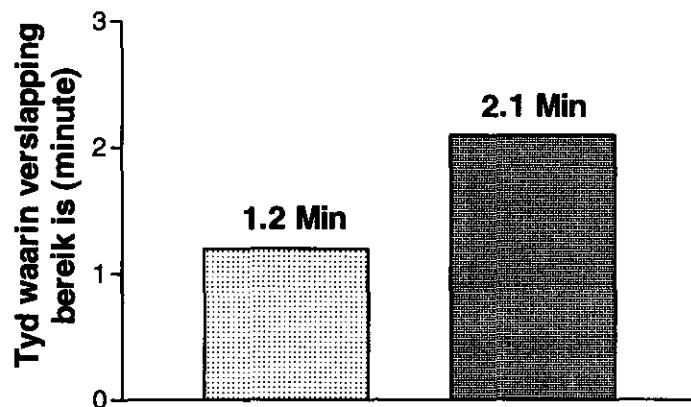
Verduideliking:

-  Voor osoon blootstelling
-  Na osoon blootstelling

Die gebruik van isoproterenol het geen effek gehad op die hiperreaktiwiteit wat osoon teenoor metacholien veroorsaak nie. Sensitiwiteit van die geïsoleerde tragea by lae konsentrasies metacholien bestaan steeds (kyk Figuur 4.5). Die maksimum metacholien-kontraksie na blootstelling aan osoon is ook oor die algemeen groter as die kontraksie voor osoon blootstelling.

4.2.1.3. Die invloed van osoon op die isoproterenol geïnduseerde verslapping van die tragea

In Figuur 4.6 kan die invloed van osoon op die verslappende effek van isoproterenol op die tragea as 'n funksie van tyd waargeneem word. Die tyd wat dit neem vir isoproterenol om dieselfde effek te bereik verhoog van 1.2 minute na 2.1 minute.



Figuur 4.6. Verslapping van die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea met isoproterenol as 'n funksie van tyd. Hierdie grafiek toon dat isoproterenol langer neem om 'n verslapping wat kleiner as die eerste is, tot gevolg te hê nadat die tragea aan osoon blootgestel is. ($p < 0.05$)

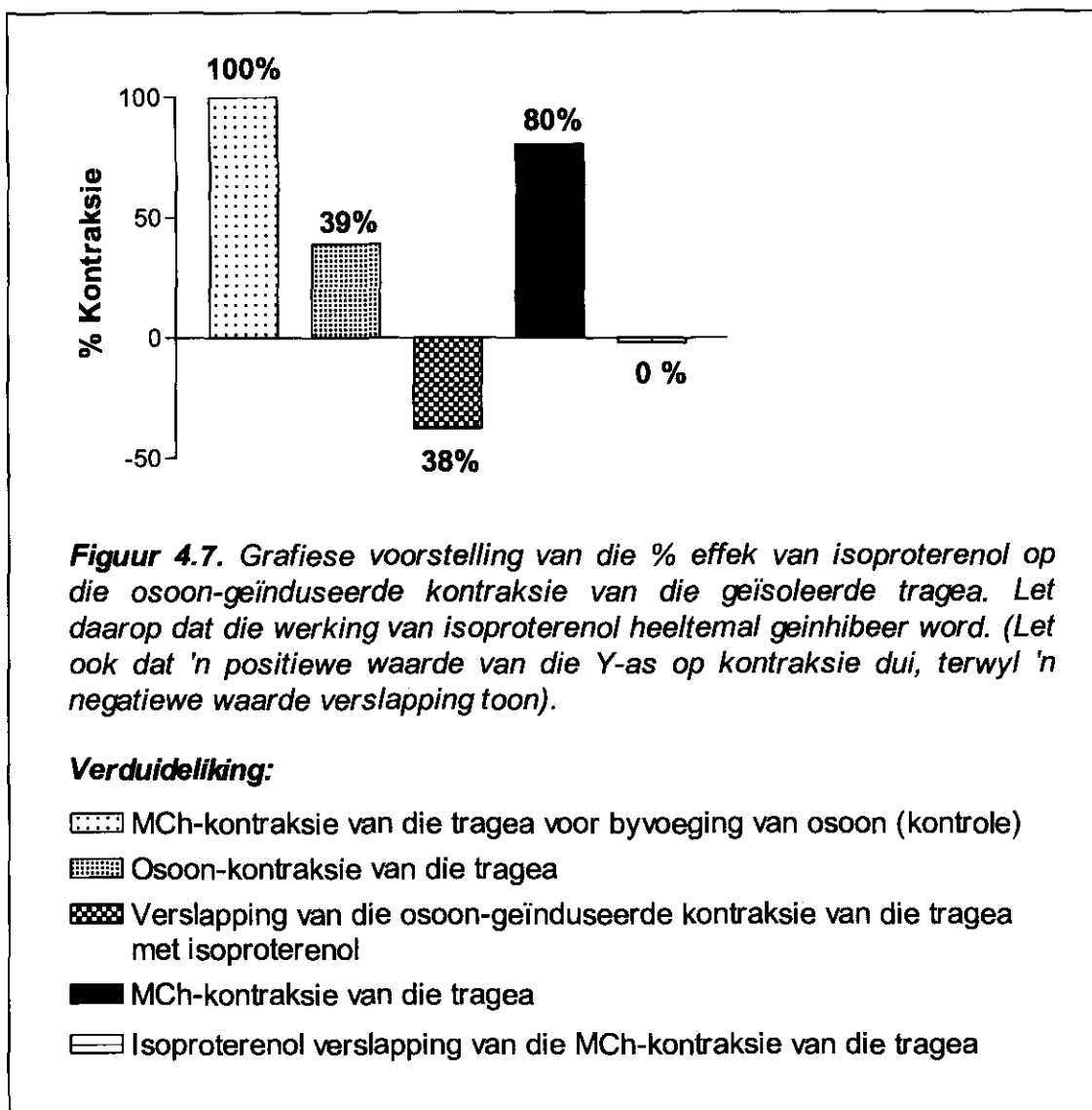
Verduideliking:

- Verslapping van die tragea met isoproterenol voor osoon byvoeging
- Verslapping van die tragea met isoproterenol na osoon byvoeging

Uit die data in Figuur 4.6 word gevind dat die mate en die tyd om tragea-
verslapping te bewerkstellig nadelig deur osoonblootstelling beïnvloed
word. Verslapping van die geïsoleerde tragea vind egter steeds tot 'n
mate plaas.

4.2.2. Die effek van isoproterenol na metacholien en osoon behandeling

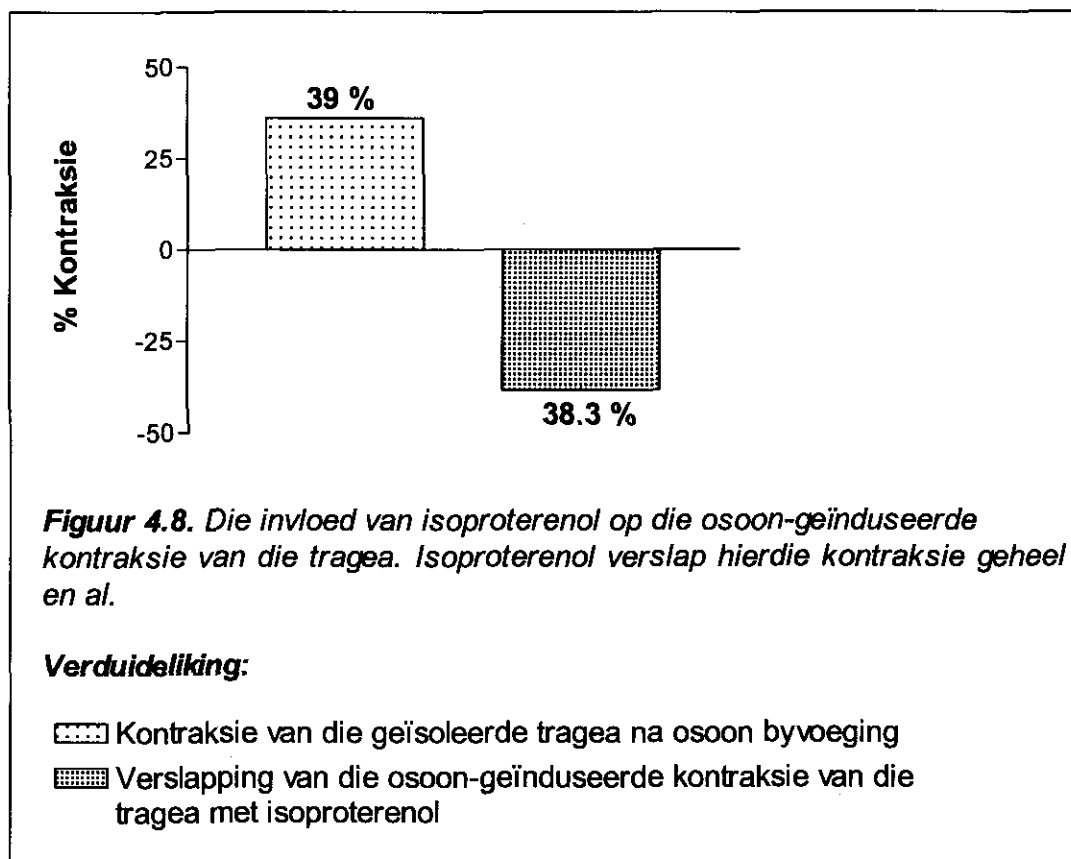
Figuur 4.7 is 'n grafiese uiteensetting van die verloop van die
eksperiment.



Die resultate in Figuur 4.7 toon aan dat die isoproterenol-geïnduseerde verslapping die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die tragea byna volledig (100%) omkeer. Die daaropvolgende metacholien-geïnduseerde kontraktsie van die tragea reageer glad nie of tot 'n mindere mate op isoproterenol byvoeging. Hierdie resultaat word slegs waargeneem indien die osoonkontraktsie aanvanklik met isoproterenol verslap is.

4.2.2.1. Die invloed van isoproterenol op die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die tragea

In Figuur 4.8 kan die invloed van isoproterenol op die osoon-geïnduseerde kontraktsie van die tragea waargeneem word.



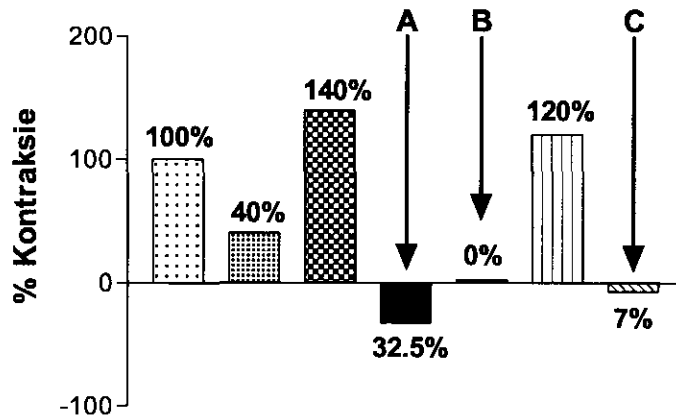
Figuur 4.8 toon dat isoproterenol wat by die fisiologiese oplossing gevoeg word na osoondeurborreling, 'n verslappende effek op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea tot gevolg het.

4.2.3. Die effek van isoproterenol op metacholien-kontraksie van die tragea ná osoon-behandeling

In hierdie eksperiment is verslapping met isoproterenol uitgevoer na die tweede metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea (kyk punt A in Figuur 4.9). Isoproterenol het verslapping soos normaal laat plaasvind. Blootstelling hierna aan osoon het, net soos in variasie een, geen effek getoon nie (kyk punt B in Figuur 4.9). Indien isoproterenol na die derde metacholien-geïnduseerde kontraksie bygevoeg word, word die tragea in 'n baie kleiner graad deur isoproterenol verslap en in sommige gevalle het dit glad nie plaasgevind nie (kyk punt C in Figuur 4.9).

4.2.4. Samevatting

1. Die effek van osoon word onderdruk nadat die geïsoleerde orgaan reeds aan isoproterenol blootgestel is. Volgens Trenga *et al.* (2001) vind brongokonstriksie tot 'n mindere mate plaas by pasiënte wat dieëtaanvullings van anti-oksidante ontvang het voor blootstelling aan osoon. Die onderdrukte osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea is waarskynlik as gevolg van die kombinasie van die isoproterenol-oplossing met askorbiensuur.
2. Osoon het 'n verlagende invloed op die effek van isoproterenol op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea.
3. Isoproterenol het geen effek op hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien na blootstelling aan osoon nie.



Figuur 4.9. Grafiese voorstelling van die persentasie effek van isoproterenol op die tweede metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea asook die effek van isoproterenol op die derde metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea na verdere blootstelling van die tragea aan osoon. (Let daarop dat 'n positiewe waarde van die Y-as op kontraksie dui, terwyl 'n negatiewe waarde verslapping toon). Punt A dui op die eerste verslapping van die tragea met isoproterenol. Punt B dui op die 0% kontraksie van die tragea na osoon blootstelling, en punt C dui op die tweede (verlaagde) isoproterenol verslapping van die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea.

Verduideliking:

-  MCh-kontraksie van die tragea (kontrole)
-  O₃-kontraksie van die tragea
-  MCh-kontraksie van die tragea
-  Isoproterenol-verslapping van die MCh-geïnduseerde kontraksie van die tragea (A)
-  O₃-kontraksie van die tragea(B)
-  MCh-kontraksie van die tragea
-  Isoproterenol-verslapping van die MCh-geïnduseerde kontraksie van die tragea (C)

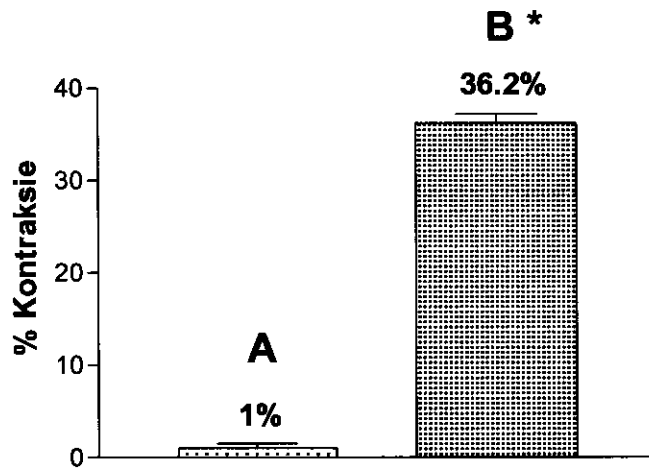
4.3. Die invloed van askorbiensuur (anti-oksidente) op die effek van osoon

Askorbiensuur (vitamien C) is 'n wateroplosbare, anti-oksident wat natuurlik voorkom. 'n Anti-oksident is 'n substans wat indien teenwoordig in lae konsentrasies relatief tot die oksideerbare substraat oksidasie van die substraat beduidend vertraag of verminder.

Tydens die eksperimente met isoproterenol (§4.2) is daar bevind dat geneesmiddel wat askorbiensuur as 'n preserveermiddel gebruik het, verlaagde osoonkontraksie getoon het. Die doel van hierdie eksperimente is om te bepaal of dit wel die anti-oksident is wat die verlaagde funksie tot gevolg het.

4.3.1 Die effek van isoproterenol wat askorbiensuur as preserveermiddel bevat op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea

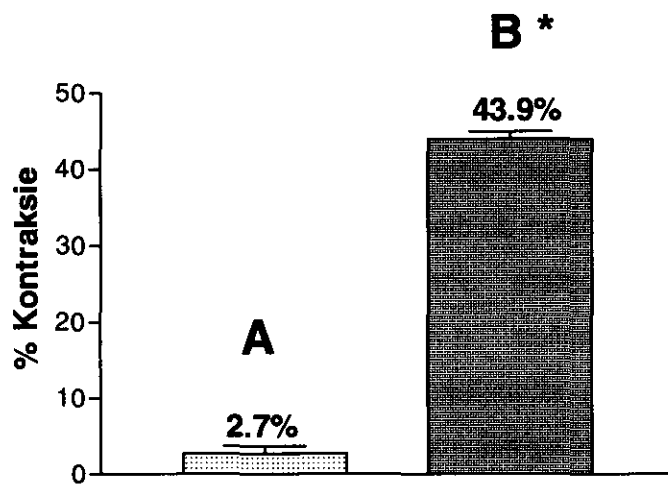
Figuur 4.10 is 'n grafiese voorstelling van osoon-geïnduseerde kontraksies van die tragea soos waargeneem nadat metacholien-geïnduseerde kontraksies van die tragea verslap is. Verslapping van die tragea is verkry met onderskeidelik isoproterenol wat askorbieen as preserveermiddel in die oplossing bevat, en suiwer isoproterenol sonder askorbiensuur.



Figuur 4.10. Osoon-geïnduseerde kontraksies van die tragea soos waargeneem nadat metacholien-geïnduseerde kontraksies van die tragea verslap is met onderskeidelik isoproterenol wat askorbiën as preserveermiddel in die oplossing bevat (A), en suiwer isoproterenol sonder askorbiënsuur (B). (* $p < 0.05$)

4.3.2 Die invloed van suiwer askorbiënsuur op die osoon geïnduseerde kontraksie van die tragea

Figuur 4.11 is 'n grafiese voorstelling van osoon-geïnduseerde kontraksies van die tragea soos waargeneem nadat die fisiologiese oplossing onderskeidelik behandel is met en sonder suiwer askorbiënsuur. Askorbiënsuur lei tot 'n definitiewe verlaging in osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea (soos waargeneem in figure 4.10. en 4.11). Die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea is aansienlik kleiner en vind in sekere gevalle glad nie plaas nie. Askorbiënsuur het egter geen effek op die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien nie.



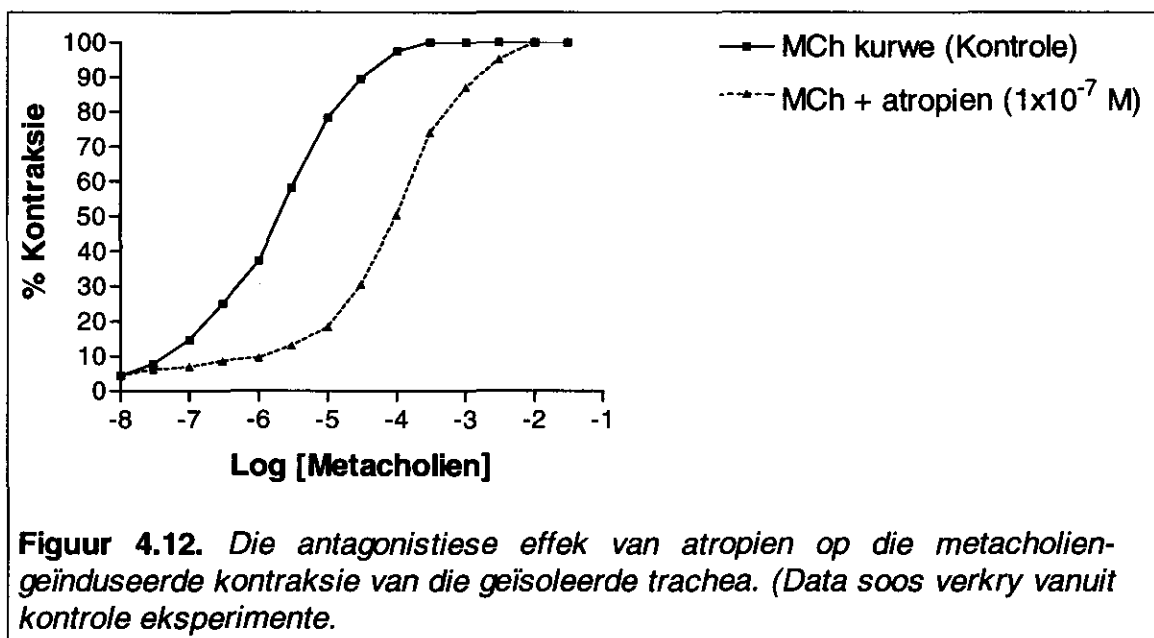
Figuur 4.11. *Osoon-geïnduseerde kontraksies van die tragea soos waargeneem nadat die fisiologiese oplossing onderskeidelik behandel is met (A) en sonder (B) suiwer askorbiensuur. (* $p < 0.05$)*

Moontlike redes as verklaring van hierdie waarneming kan wees dat die reduseermiddel die werking van osoon in die orgaanbad of binne die orgaan neutraliseer. Ander onbekende meganismes kan ook betrokke wees.

Die implikasie van hierdie verskynsel is dat askorbiensuur moontlik as profilaktiese behandeling teen osoon-geïnduseerde brongokonstriksie gebruik kan word by pasiënte wat in kontak kom met relatief hoë konsentrasie osoon.

4.4. Die invloed van atropien op die werking van osoon

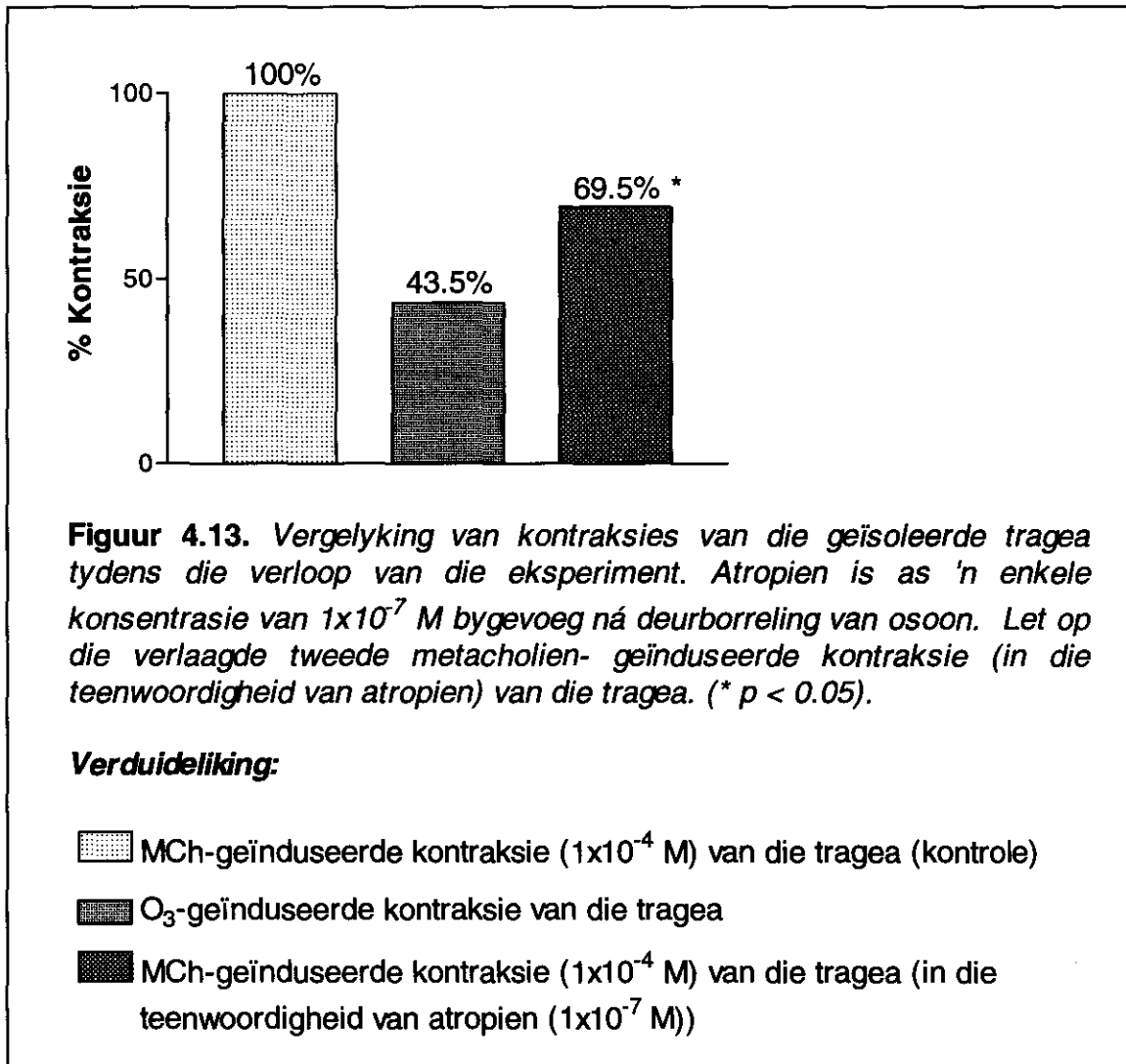
Atropien word geklassifiseer as 'n anti-cholinergiese middel of parasimpatolitiese geneesmiddel. Dit kan egter meer akkuraat beskryf word as 'n anti-muskarietiese middel aangesien dit die muskarietiese werking van asetielcholin en ander cholinesters antagoniseer. Atropien is 'n kompeterende antagonist van metacholin. 'n Kompeterende antagonist is 'n middel met affiniteit vir, maar geen intrinsieke aktiwiteit op die spesifieke reseptore nie, wat terselfdertyd met 'n agonis kompeteer om die besetting van die spesifieke reseptore en daardeur die effek van 'n bepaalde konsentrasie van 'n agonis verminder of ophef (Ariëns, 1964). Figuur 4.12 toon die kompeterende antagonisme van atropien op die metacholienkurwe.



Atropien verminder die aantal muskarietiese reseptore wat vir metacholin beskikbaar is, en die konsentrasie-effekskurwe van metacholin word na regs verplaas (kyk Figuur 4.12) in ooreenstemming met vorige bevindings (Venter, 1997).

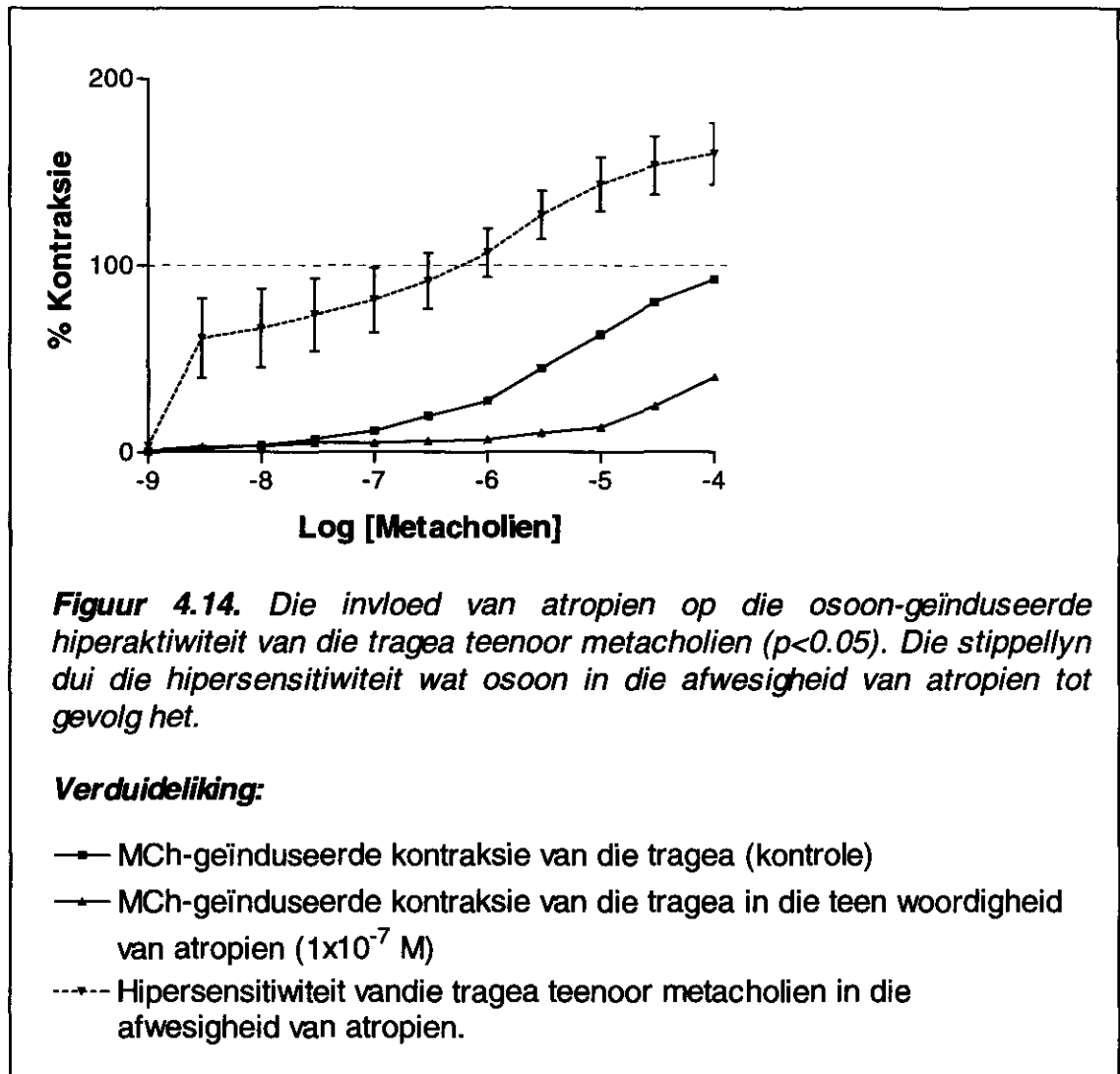
4.4.1 Die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde hiperaktiwiteit van die tragea teenoor metacholien.

Figuur 4.13 is 'n grafiese uiteensetting van die persentasie kontrakisie van die tragea tydens die verloop van hierdie eksperiment.



Antagonisme kan in konsentrasie-effeks kurwes waargeneem word as opskuiwing van die kurwe na regs (Venter, 1997) en kan duidelik in Figuur 4.12 waargeneem word. Die onderdrukte kontrakisie van die tweede metacholien-kontrakisie in Figuur 4.13 kan ook aan antagonisme toegeskryf word.

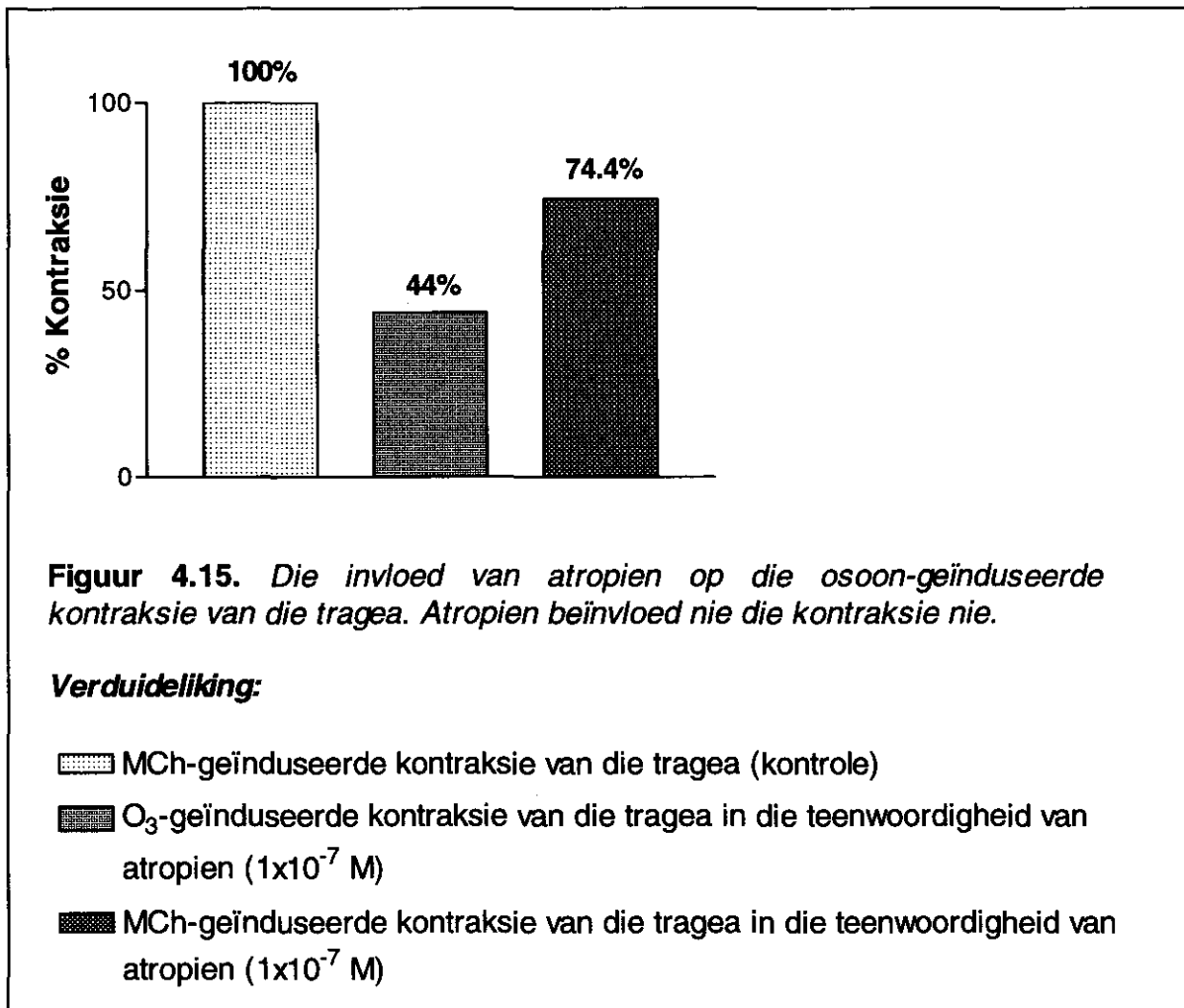
In Figuur 4.14 kan die afwesigheid van die osoon-geïnduseerde hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien weens atropien behandeling waargeneem word.



Hipersensitiwiteit van die geïsoleerde tragea teenoor metacholien na blootstelling aan osoon (soos waargeneem is § 4.1.2 en aangedui as stippellyn in Figuur 4.14) kan nie tydens hierdie eksperiment waargeneem word nie, waarskynlik as gevolg van antagonisme van die tweede metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea.

4.4.2. Die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.

In hierdie eksperiment is die tragea blootgestel aan atropien voordat osoon deur die fisiologiese oplossing geborrel is. In Figuur 4.15 kan die invloed van atropien op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea waargeneem word.



Hierdie eksperiment is uitgevoer om te bepaal of atropien die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea onderdruk. Let op dat atropien by die fisiologiese oplossing gevoeg word voor die deurborreling van osoon. Indien atropien dus 'n antagonist van osoon is sal dit die osoonkurwe vertraag.

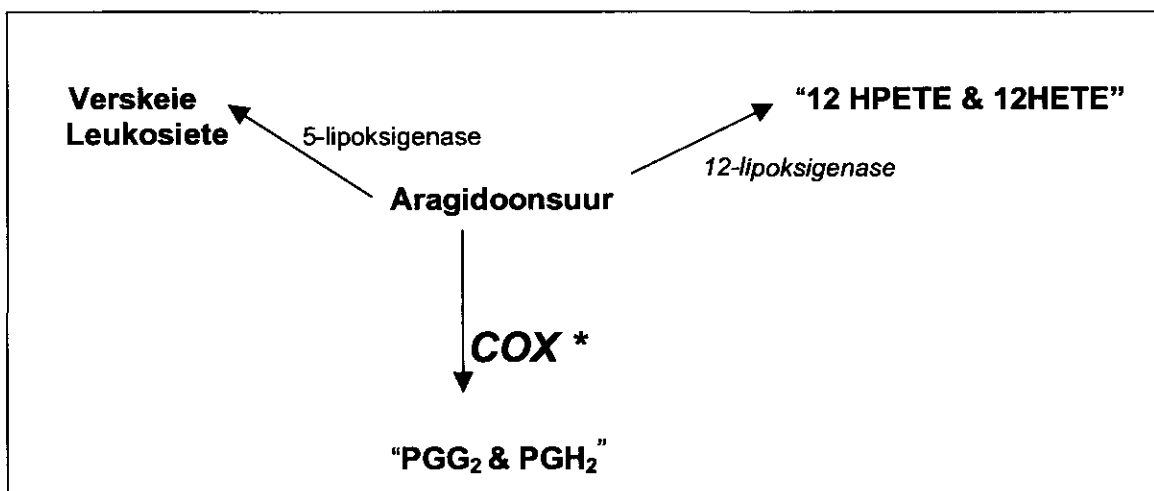
Die kontraksie van die tragea deur osoon vind egter soos normaal plaas (kyk Figuur 4.15) en atropien onderdruk dus nie die osoon-geïnduseerde

kontraksie nie. Kompetierende antagonisme vind ook steeds plaas soos wat die geval was in §4.4.1.

4.5. Die effek van nie-steroïed anti-inflammatoriese middels (NSAIM's) op die effek van osoon

Aangesien osoon aanleiding gee tot aansienlike lugweg-inflamasie (Joad, 1998; Tepper *et al.*, 1989), is besluit om *in vitro* eksperimente met 'n anti-inflammatoriese middel, naamlik indometasien, uit te voer om vas te stel of enige verandering in die effek van osoon waargeneem kan word.

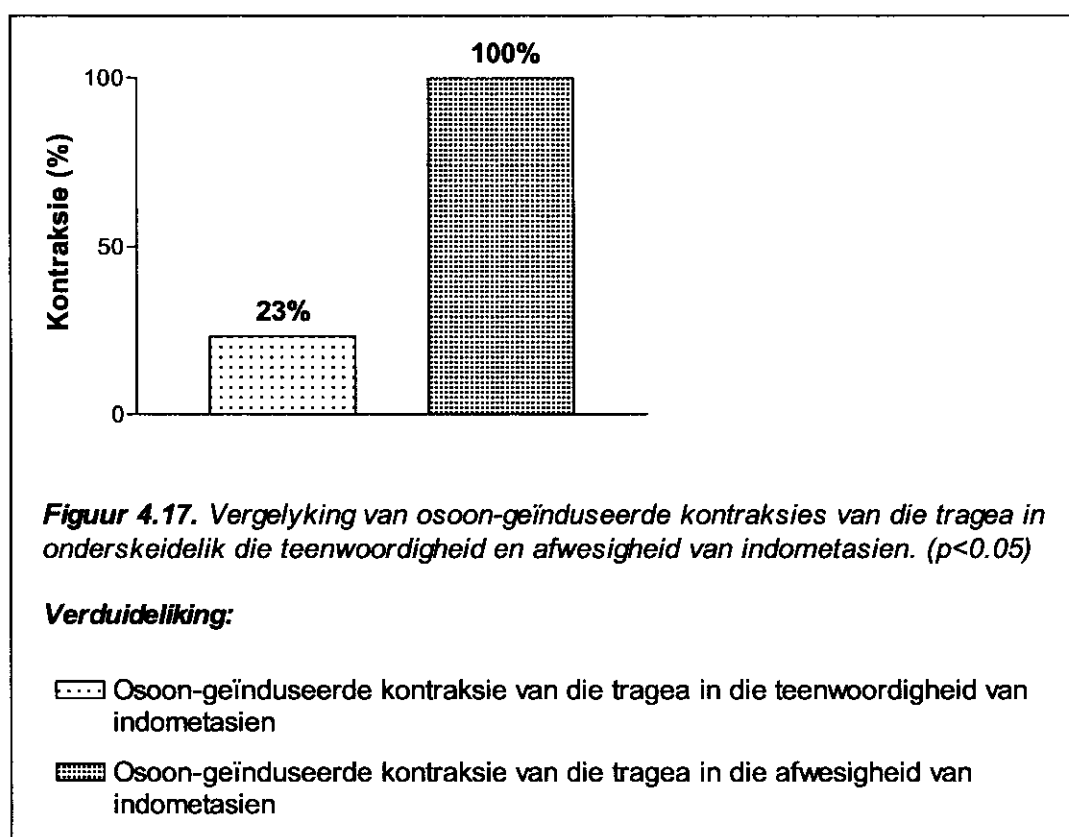
Indometasien is 'n indool-asetielsuur derivaat en 'n nie-steroïed anti-inflammatoriese-middel (NSAIM) en beskik oor anti-inflammatoriese, analgetiese en anti-piretiese eienskappe soortgelyk aan dié van salisilate. Dit is 'n potente inhibeerder van prostaglandien-vormende siklo-oksigenases (COX₁ en COX₂) en inhibeer ook die motiliteit van polimorfonukleêre leukosiete (Sien Figuur 4.16). Die terapeutiese effek van indometasien word bereik deur 'n verlaging in prostaglandiensintese.



Figuur 4.16. Stappe in die ensiematiese prostaglandiensintese waar indometasien 'n effek het. Indometasien onderdruk nie lipoksigenase nie. Slegs COX en prostaglandiensintese. Dit het dus geen effek op leukotrien-vorming nie.

4.5.1. Die Invloed van indometasien op die osoon geïnduseerde kontraksie van die tragea indien teenwoordig voor osoon-deurborreling

Die invloed van indometasien op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea word in Figuur 4.17 weergegee.



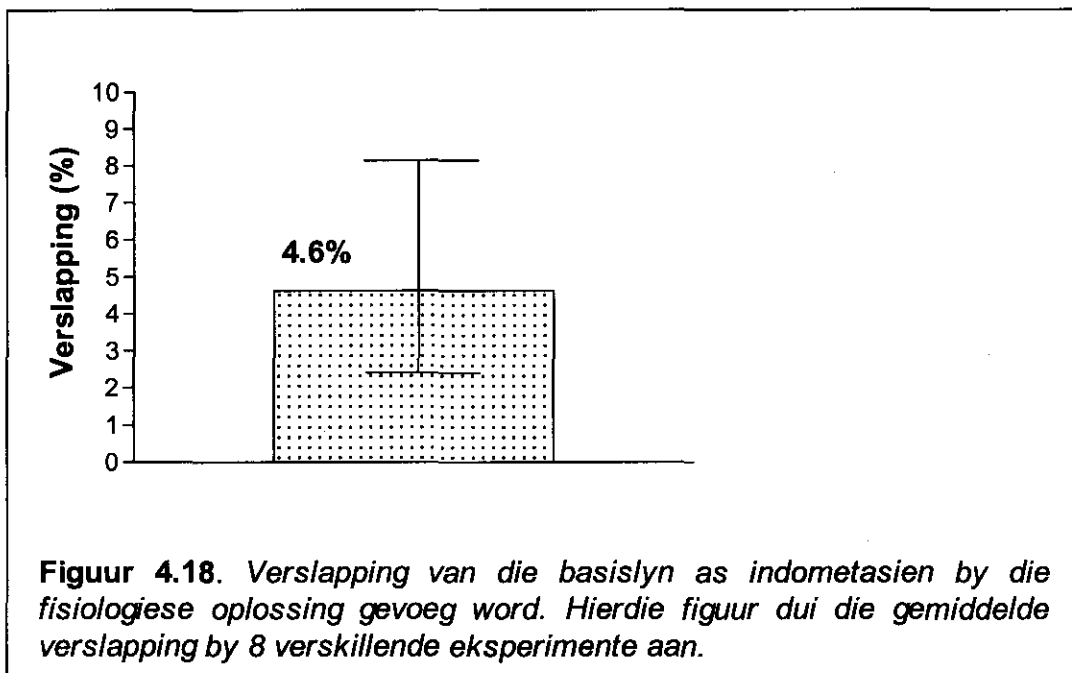
Figuur 4.17. Vergelyking van osoon-geïnduseerde kontrakties van die tragea in onderskeidelik die teenwoordigheid en afwesigheid van indometasien. ($p < 0.05$)

Uit die resultate gevind in Figuur 4.17 dat die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea in die teenwoordigheid van indometasien aansienlik laer is as die kontraksie in die afwesigheid van indometasien. Dit stem ooreen met die resultate van Dunlop en Smith (1976) waar bevind is dat indometasien antigeen-geïnduseerde kontraksie van die menslike brongi verlaag. Hierdie effek is waarskynlik as gevolg van die anti-inflammatoriese en prostaglandiensintese-inhiberende eienskappe van indometasien. Prostaglandiene word vrygestel vanuit masselle deur die afbraak van aragidoonsuur deur siklo-oksigenase (Insel, 1996),

waarvan inhibeerders byvoorbeeld indometasien die produksie inhibeer van beide die brongokonstriktiewe prostaglandiene D2 en F2, en die brongodilaterende prostaglandiene E2 en I2. Dit dui daarop dat inflammasie en prostaglandiensintese 'n gedeeltelike rol by die osong-geïnduseerde kontrakisie van die tragea kan speel.

4.5.2. Die invloed van indometasien op die basislyn van registogramme

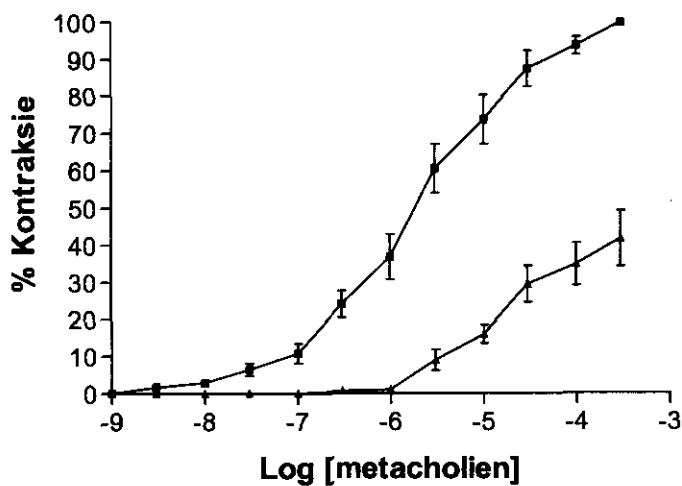
In Figuur 4.18 word die invloed van indometasien op die basislyn van registogramme na byvoeging daarvan by die fisiologiese oplossing aangedui.



In eksperimente met indometasien is daar waargeneem dat sodra indometasien by die fisiologiese oplossing gevoeg word, dit 'n onmiddellike verslapping (gemiddeld 4.6%) van die basislyn van die tragea tot gevolg gehad het (Figuur 4.18).

4.5.3. Invloed van indometasien op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea

Die invloed van indometasien op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea kan in Figuur 4.19 waargeneem word. Die metacholien-geïnduseerde kontraksie in hierdie grafiek is as 100% geneem.



Figuur 4.19. Die invloed van indometasien op die metacholien-geïnduseerde kontraksie van die tragea. Indometasien verminder die effek van metacholien. Let daarop die kurwe na regs skuif. ($p < 0.05$)

Verduideliking:

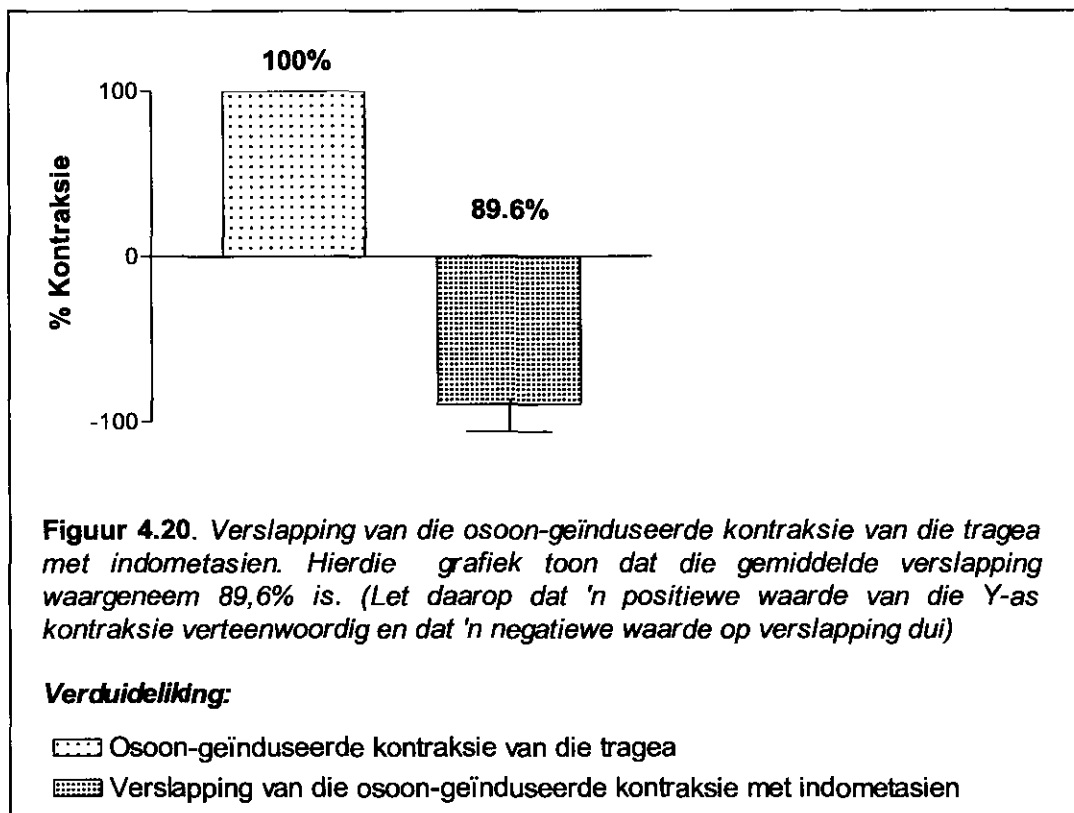
- MCh-geïnduseerde kontraksie van die tragea (kontrolle)
- ▲— MCh-geïnduseerde kontraksie van die tragea in die teenwoordigheid van indometasien (8µg)

Uit die resulate in Figuur 4.19 kan gesien word dat indometasien 'n antagonistiese effek op die metacholien-kurwe toon deurdat 'n merkbare

opskuiwing van die metacholien-kurwe na regs, asook 'n onderdrukking van die maksimale effek, waargeneem word.

4.5.4. Die invloed van indometasien op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea indien bygevoeg na osoon deurborreling

In Figuur 4.20 kan gesien word dat indometasien verslapping van die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea tot gevolg het.



Figuur 4.20. Verslapping van die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea met indometasien. Hierdie grafiek toon dat die gemiddelde verslapping waargeneem 89,6% is. (Let daarop dat 'n positiewe waarde van die Y-as kontraksie verteenwoordig en dat 'n negatiewe waarde op verslapping dui)

Verduideliking:

- ▤ Osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea
- ▦ Verslapping van die osoon-geïnduseerde kontraksie met indometasien

Daar is bevind dat indometasien die kontraksie van die tragea wat deur osoon veroorsaak word, met gemiddeld 90% (en sommige gevalle selfs 100%) verslap sodra dit in die orgaanbad gevoeg word (Figuur 4.20). Dit sluit aan by die resultate van Dunlop en Smith (1976) wat stel dat indometasien antigeen-geïnduseerde kontraksie van die menslike brongi verlaag.

4.5.5 Samevatting

1. Indometasien onderdruk die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea beduidend (gemiddeld 77%) indien dit teenwoordig is in die fisiologiese oplossing *tydens* osoon deurborreling (Figuur 4.17).
2. Indometasien tree antagonisties op teenoor metacholien deurdat dit die metacholien-kurwe na regs verskuif.
3. Indometasien verslap osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea met gemiddeld 90% indien dit bygevoeg word *na* osoon deurborreling (Figuur 4.20).

4.6. Bepaling van die verband tussen die effek van osoon en waterstofperoksied

Waterstofperoksied is 'n sterk oksideermiddel met antiseptiese, disinfektiewe, deodoriserende, matige antibakteriële en antivirale (insluitende MIV) eienskappe. Waterstofperoksied werk deur middel van die vrystelling van suurstof wanneer dit in kontak kom met weefsel. Die effek duur egter net solank as wat suurstof vrygestel word en die werking daarvan is van korte duur. Die teenwoordigheid van ander organiese materiaal kan die antimikrobiële effek van peroksied verlaag.

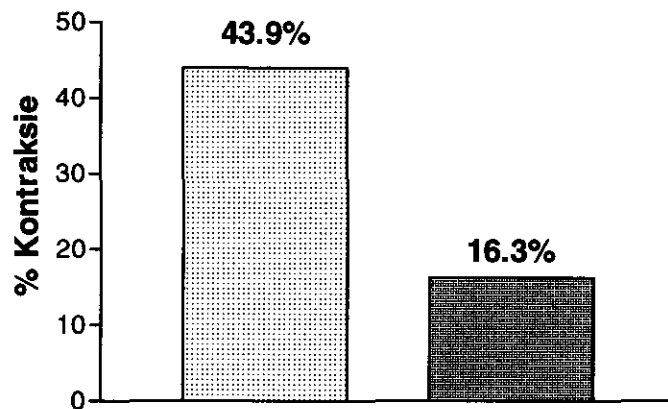
Indien osoon met water in kontak kom vorm waterstofperoksied volgens die reaksie:



Hierdie reaksie kan dus ook plaasvind indien osoon in kontak met mukusmembrane of ander vogtige weefsel kom. Aangesien baie van waterstofperoksied se effekte ooreenstem met dié van osoon, is besluit om 'n eksperiment uit te voer om te bepaal of die effek van osoon moontlik is as gevolg van die vorming van waterstofperoksied in die orgaanbad. Eksperimente is uitgevoer (met die waterstofperoksied toets in §3.2.7.6.1) om vas te stel wat die konsentrasie waterstofperoksied in die Krebs-oplossing is ná blootstelling aan osoon vir 30 minute (en wat dus tydens eksperimente kan vorm). Dieselfde eksperiment is hierna uitgevoer met hierdie konsentrasie waterstofperoksied. Die kleure van die twee eksperimente het ooreengestem by 0,003% waterstofperoksied. Hierdie konsentrasie is tydens eksperimente gebruik.

4.6.1. Die direkte effek van waterstofperoksied op die tragea

Die direkte effek van waterstofperoksied op die tragea word in Figuur 4.21 weergegee.



Figuur 4.21. *Vergelyking van gemiddelde trageale kontraksie veroorsaak deur osoon met die gemiddelde kontraksie veroorsaak deur waterstofperoksied (0,003% oplossing) (* $p < 0.05$)*

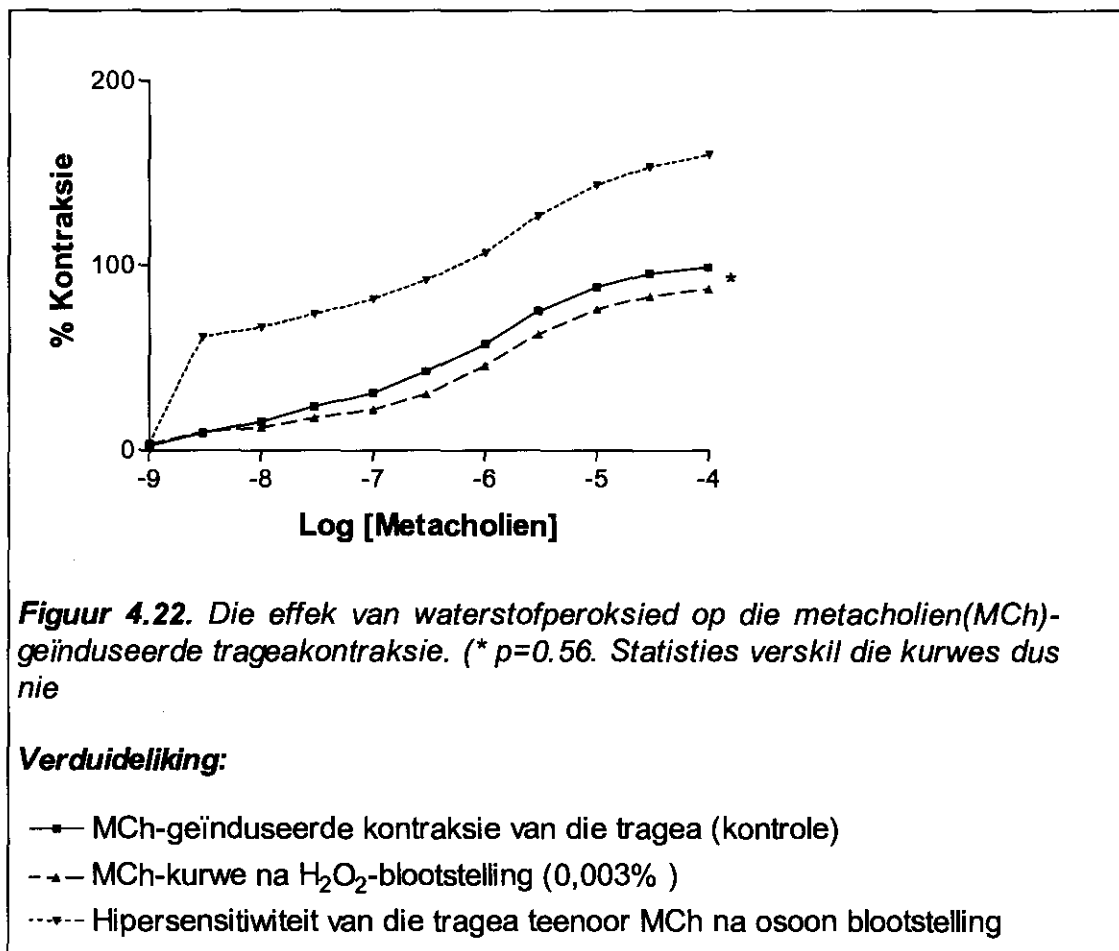
Verduideliking:

-  O₃-geïnduseerde kontraksie van die tragea
-  H₂O₂-geïnduseerde kontraksie van die tragea

Waterstofperoksied veroorsaak 'n merkbare kontraksie van die tragea (kyk Figuur 4.21). Dit is moontlik dat hierdie verskynsel wat by osoon waargeneem word, deels 'n resultaat kan wees van waterstofperoksiedvorming in die fisiologiese oplossing. Indien die gemiddelde kontraksie van die tragea wat deur waterstofperoksied veroorsaak word vergelyk word met die gemiddelde kontraksies wat deur osoon in vroeëre eksperimente veroorsaak is, word egter gevind dat die kontraksie veroorsaak deur osoon (43.9%) aansienlik groter is as die veroorsaak deur peroksied (16.3%).

4.6.2. Die invloed van waterstofperoksied op die metacholien-geïnduseerde trageakontraksie

In Figuur 4.22 kan die invloed van waterstofperoksied op die metacholien-geïnduseerde trageakontraksie waargeneem word.



Die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien na blootstelling aan osoon wat tydens eksperimente met osoon waargeneem is (stippellyn in Figuur 4.22), herhaal nie in die eksperimente met waterstofperoksied nie (sien Figuur 4.22). Waterstofperoksied in konsentrasies wat moontlik kan vorm is dus waarskynlik nie verantwoordelik vir die sensitisering van die tragea nie.

4.6.3. Samevatting van resultate

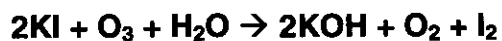
1. Waterstofperoksied veroorsaak 'n beduidende kontraksie van die tragea, maar dit is nie van dieselfde grootte as die kontraksie van die tragea wat deur osoon veroorsaak is nie.
2. Die tragea toon nie 'n hipersensitiwiteit teenoor metacholien na blootstelling aan peroksied nie. Dit is in teenstelling met die effek waargeneem na osoonblootstelling.

4.7. Grondvlak-toetsing vir osoon

Osoon is nie net teenwoordig in die laboratorium of in die direkte omgewing van osoongenerators wat gebruik word nie, maar is ook algemeen in warm weerstoestande en rondom sekere elektriese apparate soos byvoorbeeld fotostaatmasjiene. Hierdie 'natuurlike' osoon het dieselfde effekte as 'sintetiese' osoon en kan tot dieselfde simptome lei. Vlakke van osoon in die natuur word onder meer beïnvloed deur vlakke van ultraviolet lig en die relatiewe humiditeit (EPA, 1996)

Frederich Schoenbein, die ontdekker van osoon, het in die 1800's 'n toets ontwikkel om die vlakke van osoon in die atmosfeer te bepaal. Die toets behels die maak van toetsstrokies wat kaliumjodied en stysel bevat en is gebaseer op die oksidasievermoë van osoon. ***Dit is belangrik om daarop te let dat hierdie slegs 'n kwalitatiewe toets is wat geskatte resultate lewer.***

Strokies word vir 'n tydperk van ten minste 8 uur in koelte buite direkte sonlig geplaas. Atmosferiese osoon oksideer die kaliumjodied op die toetsstrokie om jodium te vorm. Die jodium reageer met die stysel en 'n pers kleur ontstaan. Die presiese intensiteit en skadu van die kleur korreleer met die hoeveelheid osoon teenwoordig.



I_2 + stysel → Blou of pers verkleuring

Die resultate vir die grondvlakbepaling van osoon by vyf verskillende dataversameling-areas word in Tabel 4.1 weergegee

4.7.1 Resultate en bespreking

Tabel 4.1. Eksperimentele resultate uit Schoenbein-toetsstrokie-eksperiment

Area waar opgestel	Intensiteit van kleur	DPM volgens Figuur 3.6
Direkte osoon-blootstelling	++++	Groter As 180
Laboratorium-omgewing waar met osoon gewerk word. (Ongeveer 5 m vanaf generator)	+++	140-160
Fotostaatmasjien	+	75-100
Buitelug	+	75-100
Buitelug (hoë humiditeit)	++	100-125

Dit is duidelik dat osoon wat sinteties vervaardig word met hierdie spesifieke generator beduidend hoër vlakke osoon waaraan gebruikers direk blootgestel word tot gevolg het as wat natuurlik voorkom.

HOOFSTUK 5

SAMEVATTING

Uit die eksperimente uitgevoer tydens navorsing vir die skryf van hierdie verhandeling is bevind dat:

1. Osoon veroorsaak 'n kontraksie van die geïsoleerde marmottragea direk ná blootstelling. Die kontraksie is aansienlik kleiner as die maksimale metacholien-kontrakisie, maar is steeds beduidend. Die tragea verslap normaal na 'n rusperiode.
2. Osoon veroorsaak 'n hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien. Die maksimale effek (kontrakisie van die tragea) is aansienlik hoër en word vinniger bereik by laer metacholien konsentrasies as dié waarby die maksimale effek verkry is voor osoon blootstelling.
3. Die hipersensitiwiteit is selfs na uitspoeling en 'n rusperiode (2 uur) steeds duidelik waameembaar.
4. Antioksidante (askorbiensuur) verlaag die osoon-geïnduseerde kontrakisie van die tragea, maar het geen effek op die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien nie.
5. Isoproterenol verslap die osoon-geïnduseerde kontrakisie van die tragea, maar het geen effek op die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien nie.
6. Osoon verminder die doeltreffendheid van isoproterenol beduidend, wat insluit verminderde verslapping en 'n verlenging van die tydsduur wat verloop van toediening van isoproterenol totdat verslapping begin.
7. Atropien het geen effek op die osoon-geïnduseerde kontrakisie van die tragea nie.
8. Atropien is 'n antagonis van metacholien en verhoed dat hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien waargeneem kan word na blootstelling aan osoon.

9. Indometasien het 'n inhiberende effek op die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea.
10. Indometasien het konstant 'n verslapping van die basislyn tot gevolg gehad direk ná byvoeging by die fisiologiese oplossing wat moontlik op inverse agonisme kan dui. Hierdie verskynsel sal in latere navorsing ondersoek word.
11. Indometasien het 'n antagonistiese effek op metacholien en die hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien na osoon blootstelling is dus nie waargeneem nie.
12. Indometasien verminder die osoon-geïnduseerde kontraksie van die tragea indien dit na die kontraksie by die fisiologiese oplossing gevoeg word.
13. Waterstofperoksied het 'n kontraksie van die geïsoleerde tragea tot gevolg by konsentrasies soortgelyk aan dié wat tydens osoon-eksperimente in die fisiologiese oplossing vorm, maar hierdie kontraksie is aansienlik kleiner as dié wat deur osoon veroorsaak is.
14. Waterstofperoksied veroorsaak geen hipersensitiwiteit van die tragea teenoor metacholien nie.

HOOFSTUK 6

GEVOLGTREKKING

6.1. Verband tussen resultate en doelstelling

Die doelstelling van hierdie studie was om te bepaal of osoon 'n invloed het op die lugweë en ander brongeo-aktiewe geneesmiddels. Uit die resultate verkry is dit duidelik dat osoon 'n negatiewe effek het indien die lugweë blootgestel word aan hoë konsentrasies van die gas. Verskeie effekte is waargeneem, onder meer kontraksie van die lugweg en verhoogde sensitiwiteit teenoor allergeene wat ooreenstem met genoemde nuwe-effekte uit die literatuur (sien tabel 2.5 en 2.6). Verder is ook bevind dat osoon 'n negatiewe effek het op die werking van sommige geneesmiddels werkzaam in die lugweë, byvoorbeeld isoproterenol (sien §4.2). Dit is egter belangrik om te vermeld dat osoon baie nuttig is vir nie-medisinale aanwending, en met die nodige voorsorg veilig gebruik kan word.

6.2 Aanbevelings

Daar word aanbeveel dat persone wat werkzaam is in 'n omgewing waar osoon gebruik word, direkte kontak moet probeer vermy. Persone met reeds bestaande lugwegsiekte-toestande (byvoorbeeld asma of ander allergiese toestande wat 'n effek op die lugweg het) moet veral op die effek van osoon let en ook beseft dat die terapeutiese effek van byvoorbeeld brongodilatore verminder kan word. Verder word aanbeveel dat diegene wat gereeld met osoon werk of daaraan blootgestel word, 'n daaglikse aanvulling van antioksidante (byvoorbeeld askorbiensuur) gebruik as profilaktiese behandeling vir brongokonstriksie.

6.3 Toekomstige studies

Dit is belangrijk om daarop te let dat eksperimente tydens hierdie studie slegs uitgevoer is om *in vitro* effekte van osoon op die lugweë en geneesmiddels wat 'n effek daar het, waar te neem. In latere navorsing sal gefokus word op die moontlike meganisme van die werking van osoon deur verdere *in vitro* eksperimente, maar veral ook deur *in vivo* proefdier eksperimente.

BYLAAG A

Bepaling van osoonproduksietempo en osoonkonsentrasie

Die osoon wat tydens eksperimente in hierdie studie gebruik is, is vervaardig met 'n osoongenerator wat ontwikkel, vervaardig en gepatenteer is deur die Departement Fisika aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys. Die osoongenerator vervaardig hoë konsentrasies osoon vanaf suiwer medisinale suurstof. Daar is gebruik gemaak van twee verskillende osoongenerators - een hoë produksie generator en een met 'n aangepaste sel wat 'n laer opbrengs osoon lewer.

Vanweë die onstabiliteit van osoonmolekules moes osoon tydens farmakologiese eksperimente geproduseer word. Hierdie osoon is met behulp van silikoonbuisies na die orgaanbad vervoer waar dit in direkte kontak met die gesuspendeerde geïsoleerde orgaan in die fisiologiese vloeistof, gekom het.

Die presiese konsentrasie osoon wat deur die spesifieke osoongenerators vervaardig word, was egter onbekend, en eksperimente om die konsentrasie (dele per miljoen) te bepaal, moes uitgevoer word. Ten einde die osoonkonsentrasie te bepaal is die osoonproduksie eers bepaal deur die absorbansie van die geproduseerde osoon te bepaal.

1. Absorbansie

Absorbansie is 'n aanduiding van die hoeveelheid van 'n bepaalde stof wat in 'n monster teenwoordig is – hoe hoër die absorbansie, hoe hoër is die konsentrasie van die stof wat bepaal word. Absorbansie van osoon wat vervaardig is deur elke spesifieke osoongenerator is bepaal

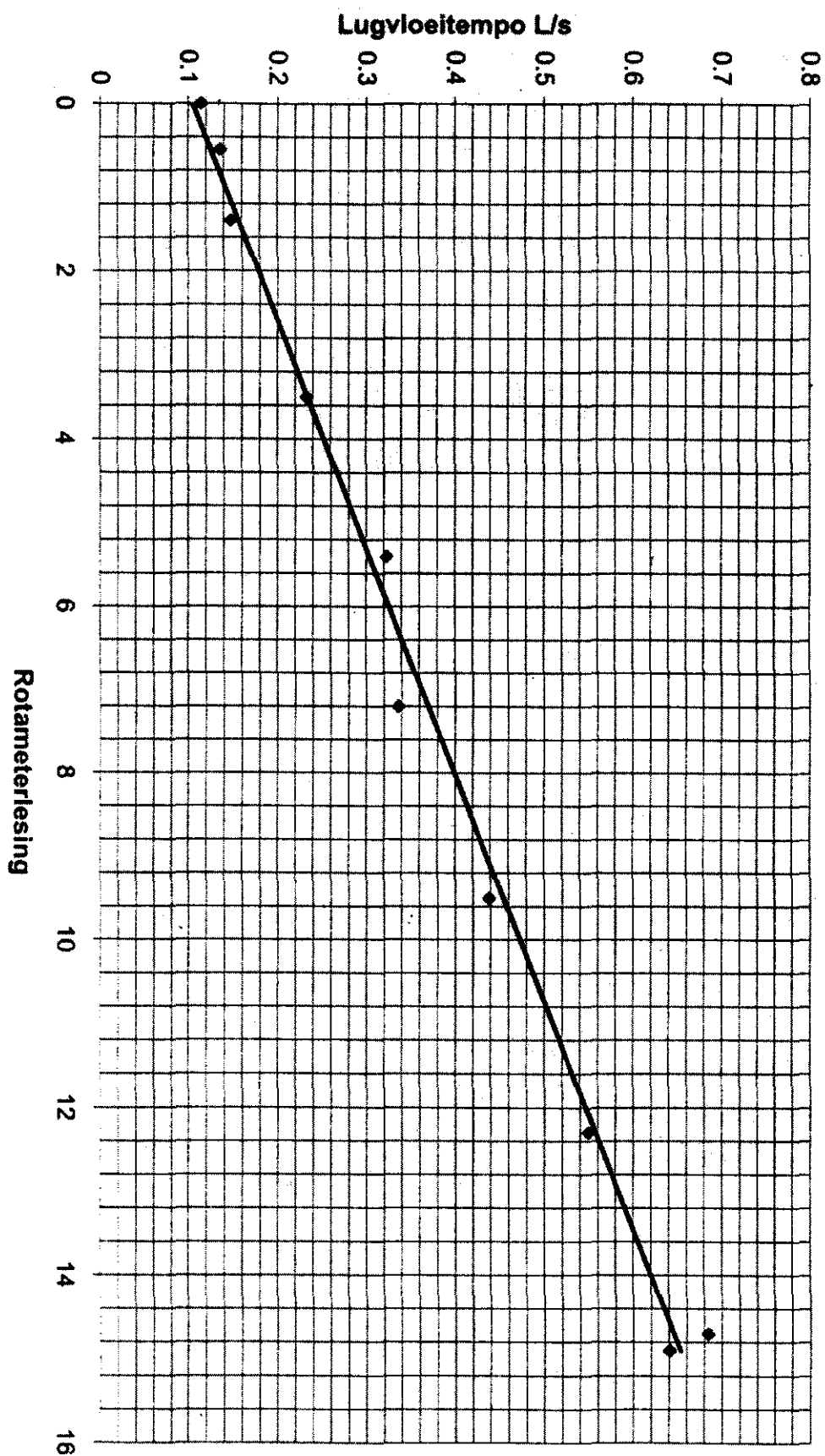
met 'n spektrofotometer by 254 nanometer. Die eksperiment is uitgevoer op osoon vervaardig vanuit beide atmosferiese lug en medisinale suurstof. Tydens die eksperimente is dieselfde rotameter gebruik. Die rotameter is vooraf deur departement chemie aan die Potchefstroomse Universiteit gekalibreer om 'n akkurate lugvloeiempo volgens Figuur 1 weer te gee. Tabel 1 bevat die eksperimentele resultate wat verkry is.

Tabel 1. Eksperimentele data van absorpsiebepaling

Osoon vervaardig vanuit suurstof		Osoon vervaardig vanuit gewone lug	
Rotameter lesing	Absorpsie	Rotameter lesing	Absorpsie
1.4	0.098	0.8	0.074
2	0.072	2	0.039
3	0.048	2.9	0.03
4	0.034	4	0.02
5	0.027	4.8	0.015
6	0.023	6.1	0.012
7	0.019	7.1	0.009

Rotameterkalibrasie

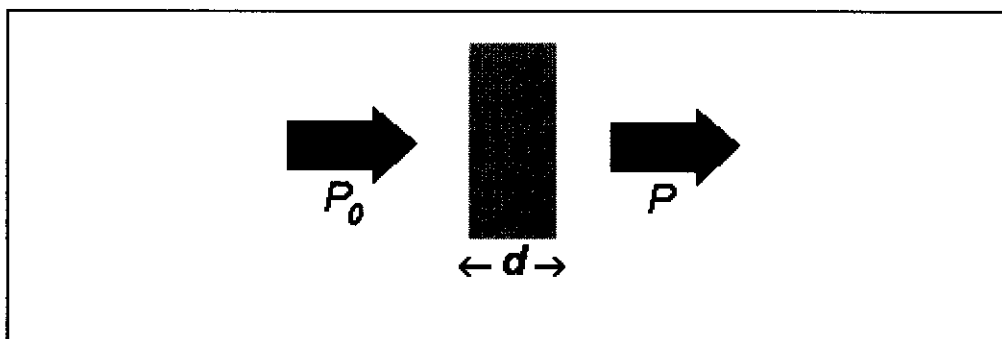
Metric 10 P



Figuur 1. Lugvloei (L/s) soos gelever by spesifieke rotameterlesing

2. Die wet van Lambert-Beer

Verskeie verbindings absorbeer ultraviolet (UV) of sigbare lig. Figuur 2 dui hoe 'n straal monochromatiese bestraling met 'n bestralingskrag van P_0 gerig word op 'n monster. Absorpsie vind plaas en die bestraling wat die monster verlaat het 'n bestralingskrag van P .



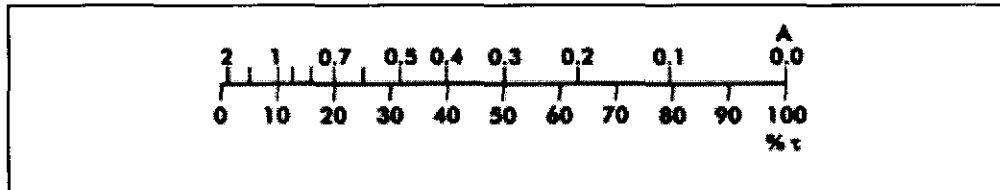
Figuur 2. Die vloeï van monochromatiese lig deur 'n monster. P_0 is die bestralingskrag van bestraling gerig op die monster, d die padlengte van die monster en P die bestralingskrag van die bestraling wat die monster verlaat.

Die hoeveelheid bestraling wat geabsorbeer word kan op 'n aantal maniere gemeet word (kyk Tabel 2) onder meer transmissie (T), persentasie transmissie (%T) en absorptansie (A).

Tabel 2. Metodes om bestraling deur 'n monster te meet

Transmissie (T)	$T = P / P_0$
Persentasie transmissie (%T)	$\%T = 100 T$
Absorptansie (A)	$A = \log_{10} P_0 / P$ $A = \log_{10} 1 / T$ $A = \log_{10} 100 / \%T$ $A = 2 - \log_{10} \%T$

Die verhouding tussen absorptansie en transmissie is soos volg: As al die lig deur 'n monster gaan sonder enige absorpsie, dan is absorptansie nul en persentasie transmissie is 100. As al die lig geabsorbeer word is persentasie transmissie nul en is absorpsie oneindig. Figuur 3 is 'n skematiese voorstelling hiervan.



Figuur 3. Verhouding tussen absorptansie en transmissie

Die wet van Lambert-Beer word gebruik om absorptansie te bereken, en stel dat :

$$A = \epsilon dc$$

Waar :

- A** is absorptansie (geen eenheid, aangesien $A = \log_{10} P_0 / P$)
- ϵ** is die molêre absorptiviteit (substans spesifieke konstante)
- d** is die padlengte van die monster – dus die padlengte deur die kuvet waarin die monster voorkom in eenhede van sentimeter.
- c** is die konsentrasie van die verbinding uitgedruk in $\text{mg O}_2/\text{cm}^3$

3. Berekening van osoonproduksietempo

Vanuit die wet van Lambert-Beer is die volgende formule saamgestel vir die berekening van osoonproduksie (Prof. G. Lachman, departement chemie, Potchefstroomse Universiteit) :

$$\text{Produksietempo (mg O}_3\text{/h)} = 57,6 \cdot A^{254} \cdot v(\text{cm}^3/\text{h})$$

4. Berekening van osoonkonsentrasie

Vanuit die wet van Lambert-Beer is die volgende formule saamgestel vir die berekening van osoonkonsentrasie (Prof. G. Lachman, departement chemie, Potchefstroomse Universiteit) :

$$\text{Osoonkonsentrasie (\% v/v O}_3\text{)} = 0,925 \cdot A^{254} \text{ by 658 mmHg en 20 } ^\circ\text{C} \\ \text{(Gemiddeld vir Potchefstroom)}$$

$$\text{Osoonkonsentrasie (mg O}_3\text{/cm}^3\text{)} = 0,0160 \cdot A^{254} \text{ by standaard} \\ \text{temperatuur en druk}$$

5. Berekening van dele per miljoen

Die konsentrasie osoon uitgedruk in dele per miljoen kan spesifiek vir Potchefstroom se gemiddelde temperatuur en druk (658 mmHg en 20 °C) bereken word met die volgende formule (Prof. G. Lachman, departement chemie, Potchefstroomse Universiteit):

$$\text{Dele per miljoen} = (\text{mg/m}^3 \times 27,85) / \text{molekulêre massa}$$

Bibliografie

AMDUR, M.O., DUBRIEL, M. & CREASIA, D.A. 1978. Respiratory response of guinea pigs to low levels of sulphuric acid. *Environ. Res*, 15:418-423.

ATKINSON, R., BAULCH, D.L., COX, R.A., HAMPSON, R.F., KERR, J.A. & TROE, J. 1992. Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: supplement IV, IUPAC subcommittee on gas kinetic data evaluation for atmospheric chemistry. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 21:1125-1568.

ARIËNS, E.J., SIMONIS, A.M. & VAN ROSSUM, J.M. 1964. Drug receptor interaction: Interaction of one or more drugs with different receptor systems.

In: Molecular pharmacology, Vol. I. Ariëns, E.J., (red). Academic Press. p.287-393.

BAIRD, C. 1995. Environmental chemistry. New York : Freeman.

BIN, A., ANNUSEWICZ, A. & KONOPCZYNSKI, A. 2001. Swimming pool water treatment with ozone as a standard of the highest water quality in the newly constructed swimming pools in Poland. *In: Proc. 15th Ozone world congress, London, Vol. 1* (International Ozone Association, 2001), p. 390-401.

BRIDDELL, T., KEEBLER, E. & VENGLIK, J. 1998. Ozone action. <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/7974/ozone/intro.htm>.

BROWN, J.H. & TAYOR, P. 1996. Muscarinic receptor agonists and antagonists. *In: Hardman, J.G. (red.) The pharmacological basis of therapeutics.* USA : McGraw-Hill. p. 141-160.

BOCCI, V. 1996. Ozone as bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozone therapy today. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 51(4): 353-67.

CARPENDALE, M.T. & FREEBERG, J.K. 1991. Ozone inactivates HIV at non-cytotoxic concentrations. *Antiviral Research*, 16:281-292.

CHANG, L.Y., HUANG, Y., STOCKSTILL, B. L., GRAHAM, J.A., GROSE, E.C., MÉNACHE, M.G., MILLER, F.J., COSTA, D.L. & CRAPO, J.D. 1992. Epithelial injury and interstitial fibrosis in the proximal alveolar regions of rats chronically exposed to a simulated pattern of urban ambient ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 115: 241-252.

CHAPMAN, S. 1930. A theory on upper-atmospheric ozone. *Mem. R. Meteorol. Soc*, 3:103-125.

COLLIER, H.O.J. 1970. Advances in Drug Research. Harper, N.J., Simmonds, A.B. (red.) New York : Academic Press. 5. p. 95-107.

CRUTZEN, P.J. 1970. The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Q.J.R. Meteorol. Soc*, 96:320-325.

DEMORE, W.B., SANDER, S.P., GOLDEN, D.M., HAMPSON, R.F., KURYLO, M.J., HOWARD, C.J., RAVISHANKARA, A.R., KOLB, C.E. & MOLINA, M.J. 1992. Chemical kinetics and photochemical data for use in stratospheric modelling. Pasadena, CA : NASA Panel for Data Evaluation, Jet Propulsion Laboratory; Publication no. 92-20.

DUNLOP, L.S. & SMITH, A.P. 1976. Reduction of antigen-induced contraction of sensitised human bronchus *in-vitro* by indomethacin. *Br. J. Pharmacol*, 54. p. 495-497.

EPA. *Sien US EPA.*

FDA. *Sien US FDA.*

FERNG, S.F., CASTRO, C.E., AFIFI, A.A., BERMUDEZ, E. & MUSTAFA, M.G. 1997. Ozone-induced DNA strand breaks in guinea-pig tracheobronchial epithelial cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 51(4):353-67.

GALEOTTI, T., BARTOLI, G.M. & SANTINI, S. 1981. Growth related changes in tumor superoxide dismutase content. In: M.A. Rodgers, M.A. & Powers, E.L. (Red) *Oxygen and oxy-radicals in chemistry and biology*. New York : Academic Press.

GERY, M.W., WHITTEN, G.Z. & KILLUS, J.P. 1988. Development and testing of the CMB-IV for urban and regional modelling. Research Triangle Park, NC : U.S. *Environmental Protection Agency*, Atmospheric Sciences Research Laboratory; report no. EPA-600/3-88-012.

GROSS, K.B., WHITE, H.J. & SARGENT, N.E. 1991. The effect of ozone inhalation on metabolic functioning of vascular endothelium and on ventilatory function. *Toxicology and applied Pharmacology*, 109(2):336-51.

HACKNEY, J.D., LINN, W.S., KARUZA, S.K., BUCKLEY, R.D., LAW, D.C., BATES, D.V., HAZUCKA, M., PENGELLY, L.D. & SILVERMAN, F. 1977. Effects of ozone exposure in Canadians and Southern Californians. *Archives of environmental Health*, 32:110-116.

HACKNEY, J.D., LIN, W.S., MOHLER, J.G. & COLLIER, C.R. 1977. Adaptation to short-term respiratory effects of ozone in men exposed repeatedly. *Journal of applied physiology*, 43:82-85.

HAHN, H.L. 1986. Role of the parasympathetic nervous system and of cholinergic mechanisms in bronchial hyper reactivity. *Bulletin Europeenne Physiopathologie respiratoire*, 22 Suppl 7:112-142.

HOFFMAN, B.B. & LEFKOWITZ, R.J. 1996. Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonists. *In:* Hardman, J.G. (red.) *The pharmacological basis of therapeutics*. USA: McGraw-Hill. p. 199-248.

INTERNATIONAL BIO-OXIDATIVE MEDICAL FOUNDATION (IBOMF). Oxidative therapy. Oklahoma City.

INSEL, P.A. 1996. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. *In:* Hardman, J.G. (red.) *The pharmacological basis of therapeutics*. USA : McGraw-Hill. p. 617-657.

JOAD, J.P., KOTT, K.S. & BONHAM, A.C. 1998. Exposing guinea pigs to ozone for 1 wk enhances responsiveness of rapidly adapting receptors. *Journal of applied physiology*, 84(4):1190-97.

JOAD, J.P., KOTT, K.S. & BRIC, J.M. 1996. The local C-fibre contribution to ozone induced effects on the isolated guinea pig lung. *Toxicology and applied Pharmacology*, 141(2):561-67.

JOHNSON, H. 1971. Reduction of stratospheric ozone by nitrogen oxide catalysts from supersonic transport exhausts. *Science (Washington, DC)* 173:517-522.

JONES, G.L., LANE, C.G., DANIEL, E.E. & O'BYRNE, P.M. 1988. Release of epithelium-derived relaxing factor after ozone inhalation in dogs. *Journal of applied physiology*, 65(3):1238-43.

JOOS, G.F., GERMONPRE, P.R. & PAUWELS, R.A. 2000. Neural mechanisms in asthma. clinical and experimental: *Journal of the British society for allergy and clinical immunology*, Supplement 1: 60-65.

KILHAM, L.B & DOD, R.M. 1999. The Application of Ozone for Air Treatment (Case Study of a Bingo Hall HVA System). *In Proc. 14th Ozone World Congress*. Dearborn, MI. Vol. 2 (Stamford, CT: Intl. Ozone Assoc., Pan American Group), p. 49-56.

KLOOS, S.D. 2001. A discussion on ozone chemistry. www.osmonics.com.

LIN, W.S., MEDWAY, D.A., ANZAR, U.T., VALENCIA, L.M., SPIER, C.E., TSAO, S.D., FISHCHER, D.A. & HACKNEY, J.D. 1982. Persistence of adaptation to ozone in volunteers exposed repeatedly for six weeks. *American review of respiratory disease*, 125:491-495.

LIPPMANN, M. 1989. Health effects of ozone: a critical review. *J. Air Pollut. Control Assoc*, 39:672-695.

LIU, S.C. & TRAINER, M. 1988. Responses of the tropospheric ozone and odd hydrogen radicals to column ozone change. *J.Amos.Chem*, 6:221-233.

MARCUS, R. & COULSTON, A.M. 1996. Water-soluble vitamins: The vitamin B complex and ascorbic acid. *In*: Hardman, J.G. (red.) *The pharmacological basis of therapeutics*. USA : McGraw-Hill. p. 1555-1572.

MCILVEEN, R. 1992. Fundamentals of weather and climate. London, UK : Chapman & Hall.

MKS. 2002. Ozone Data & Conversion Tables. *Bulletin Ozone Brochure - 08/02*. p. 1-5.

NATIONAL CENTER OF ATMOSPHERIC RESEARCH. 2002. Ozone in our atmosphere. <http://www.ucar.edu/learn>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1995. Prudent practices in the laboratory. Washington, D.C.: National Academy Press.

NEBEL, C., GOTTSCHLING, & O'NEILL, H.J. 1975. Ozone treatment of sewage plant odors. In: *Proc. First Intl. Symposium on Ozone for Water & Wastewater Treatment* (Stamford, CT: Intl. Ozone Assoc., Pan American Group), p. 445-449.

PATIL, P.N. & JACOBWITZ, D. 1968. Steric aspects of adrenergic drugs. IX. Pharmacologic and histochemical studies on isomers of cobefrin (α -metylnorepinephrine). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 161. p.279-295.

PAULESU, L., LUZZI, E. & BOCCI, V. 1991. Studies on the biological effects of ozone: induction of tumor necrosis factor in human leucocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:409-412.

PRINN, R., CUNNOLD, D., RASMUSSEN, R., SIMMONDS, P., ALYEA, F., CRAWFORD, A., FRASER, P. & ROSEN, R. 1990. Atmospheric emissions and trends of nitrous oxide deduced from 10 years of ALE-GAGE data. *J. Geophys. Res. [Atmos]*. 95:19369-85.

RAJAKULASINGAM, K., POLOSA, R., HOLGATE, S.T. & HOWARTH, P.H. 1991. Comparative nasal effects of bradikynin, kallidin and [Des-Arg]-Bradykinin in atopic rhinitic and normal volunteers. *Journal of physiology (London)*, 437:577-587.

RAZUMOVSKII, S.D. & ZAIKOV, G.E. 1984. *Ozone and its reactions with organic compounds*. Elsevier, New York.

RICE, R.G. 2001. Century 21 – Pregnant with ozone. In *Proc. 15th Ozone World Congress, London, Vol.1* (International Ozone Association, 2001), p. 20-27.

RILLING, S. & VIEBAHN, R. 1987. The use of ozone in medicine. Stuttgart: Arztliche Gesellschaft fur Ozonotherapie publication. 172 p.

ROWLAND, F.S. 1990. Stratospheric ozone depletion by chlorofluorocarbons. *Ambio*, 19:281-292.

SCHONBEIN, C. 1869. Notice of C Schonbein., the discoverer of ozone. *Annual Report of the Board of Regents of the Smithsonian Inst.*, 185-192.

SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY, SCHOOL OF SCIENCE AND MATHEMATICS. 2001. Beer's law.
<http://www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/molspec/beers1.htm>.

SUNNEN, G.V. 1988. Ozone in medicine: Overview and future directions. *Journal of Advancement in Medicine*. Vol.1, No.3. p.159-174.

TEPPER, J.S., COSTA, D.L., LEHMANN, J.R., WEBER, M.F. & HATCH, G.E. 1989. Unattenuated structural and biochemical alterations in the rat lung during functional adaptation to ozone. *American review of respiratory disease*, 140:493-501.

THOMPSON, A.M. 1992. The oxidizing capacity of the Earth's atmosphere: probable past and future changes. *Science (Washington, DC)*, 256: 1157-1165.

THOMPSON, A.M., STEWART, R.W., OWENS, M.A. & HERWEHE, J.A. 1989. Sensitivity of tropospheric oxidants to global chemical and climate change. *Atmos. Environ*, 23:519-32.

TIMMERMANN, H. & SCHEFFER, N.G. 1967. A new tracheal strip preparation for the evaluation of β -adrenergic activity. *J.Pharm. Pharmacol*, 20:78-79.

TRENGA, C.A., KOENIG, J.Q. & WILLIAMS, P.V. 2001. Dietary antioxidants and ozone-induced bronchial hyper responsiveness in adults with asthma. *Arch Environ Health*, 56(3): 242-9.

TRUMBORE, C.N. 1996. Lecture Notes from CHEM367: Environmental Chemistry: F96.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1995. Ozone generators in indoor air settings. Report prepared for the office of research and development by Raymond Steiber. National Risk Management Research Laboratory. U.S. EPA. Research Triangle Park. EPA-600/R-95-154.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1996. Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidants. Research Triangle Park, NC: National Centre for Environmental Assessment-RTP Office; report nos. EPA/600P-93/004aF-cF, 3v.NTIS, Springfield, VA; PB-185582, PB96-185590 and PB96-185608.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1997a. Health and environmental effects of ground-level ozone. U.S. EPA. Research Triangle Park.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1997b. Ozone: Good up high, bad nearby. U.S. EPA. Research Triangle Park. EPA-451/K-97-002.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1999. Smog – Who does it hurt? U.S. EPA. Research Triangle Park. EPA-452/K-99-001.

U.S. FEDERAL DRUG ADMINISTRATION. 2001. Maximum acceptable level of ozone. *In: Code of Federal Regulations.* U.S. Government Printing Office. Title 21, Volume 8. p. 26-27.

VAN ROSSUM, J.M. 1963. Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Archive International Pharmacodyn*, 143(3-4):299-330.

VENTER, D.P. 1997. *Geneesmiddelenreceptorinteraksies.* Potchefstroom : PU vir CHO. 162p.

VIEBAHN-HAENSLER, R. 2001. Milestones of medical ozone. *In: Proc. 15th Ozone World Congress, London, Vol.1* (International Ozone Association, 2001), p. 20-27.

VIEBAHN HANSLER, LELL & KREMSLER. 2001. The effect of ozone on Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *In: Proc. 15th Ozone World Congress, London, Vol.1* (International Ozone Association, 2001). p. 26-39.

WAGNER, J.G., VAN DYKEN, S.J., HOTCHKISS, J.A. & HARKEMA, J.R. 2001. Endotoxin enhancement of ozone-induced mucous cell metaplasia is neutrophil-dependant in rat nasal epithelium. *Toxicological sciences: An official journal of the society of Toxicology*, 60(2): 338-47.

WOLFSTAEDTER, H.D. 1993. Ozone Therapy. NATC Caucus Proceedings of the International AIDS Society. Berlin.

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (WMO). 1992. Scientific assessment of ozone depletion: 1991, Geneva, Switzerland. WMO; report no. 25.

