

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Analytische Chemie,
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

**Wirkung von verschiedenen Nanomaterialien auf
das isolierte Herz von Meerschweinchen, isolierte
Herzzellen und Neuronen**

Melanie Maier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Christian F. W. Becker

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. Martin Göttlicher

Die Dissertation wurde am 10.08.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.11.2009 angenommen.

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Luft- und Umweltschadstoffe	1
1.1.1	Quellen von PM	3
1.1.2	Nanopartikel	4
1.2	Partikeldeposition in der Lunge	6
1.2.1	Clearance und Translokation von Partikeln	7
1.3	Studien zur Partikelexposition und Epidemiologie	8
1.4	Das Herz	9
1.4.1	Modellsystem Langendorff-Herz	10
1.4.2	Aufbau des Herzens	10
1.4.3	HerzkranzgefäÙe (Koronararterien)	11
1.4.4	Herzzyklus.....	12
1.4.5	Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem des Herzens.....	12
1.4.6	Elektrokardiogramm (EKG).....	14
1.4.6.1	Das elektrische Signal der Reizleitung.....	14
1.4.6.2	Das Elektrokardiogramm (EKG)	15
1.4.6.3	Ableitungen des Elektrokardiogramms	16
1.5	Katecholamine	17
1.5.1	Betablocker.....	19
1.5.2	Reserpin.....	20
1.6	Herzzellen und deren freie intrazelluläre Calciumkonzentration	21
1.6.1	Freie intrazelluläre Calciumkonzentrationen in Herzzellen.....	22
1.7	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress	23
1.7.1	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	25
1.7.1.1	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR).....	25
1.7.1.2	Spin-Probe CMH - Substanz zur Detektion von ROS	26
1.8	Ziel dieser Arbeit	28
2	<i>Material und Methoden</i>	29
2.1	Geräte	29
2.2	Material	30
2.2.1	Herstellung von Partikelsuspensionen	30
2.2.1.1	Verwendete Partikel	30
2.2.2	Arbeiten am isolierten Langendorff-Herz	32

2.2.2.1	Chemikalien für Krebs-Henseleit-Bicarbonat Puffer (KHB).....	32
2.2.2.2	Weitere verwendete Chemikalien für Experimente am isolierten Langendorff-Herz	32
2.2.3	Zellkultur.....	32
2.2.3.1	Verwendete Zelltypen	32
2.2.3.2	Nährmedien und Chemikalien für Zellkultur	33
2.2.3.3	Verwendete Farbstoffe	33
2.2.4	Chemikalien zur Myocyten-Isolierung.....	33
2.3	Methoden.....	34
2.3.1	Herstellung der Herzperfusionslösung Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHB)	34
2.3.2	Herstellung von Partikelsuspensionen	35
2.3.3	Aufbau der Langendorff-Apparatur	36
2.3.3.1	Nachfüllautomatik mittels Lichtschranke	37
2.3.3.2	Tropfenzähler	38
2.3.3.3	Vorbereitung der Langendorff-Apparatur	38
2.3.3.4	Herzpräparation.....	39
2.3.4	Versuche am isolierten Langendorff-Herz.....	41
2.3.4.1	Versuchsablauf.....	41
2.3.4.2	Versuche am Langendorff-Herz mit β -Blocker Metoprolol	42
2.3.4.3	Versuche am Langendorff-Herz mit Reserpin behandelten Versuchstieren	43
2.3.5	Zellkultur.....	43
2.3.5.1	Anzucht und Kultivierung der Zellen.....	43
2.3.5.2	Beladung der Zellen	44
2.3.5.3	Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie zur Messung des freien intrazellulären Calciums	44
2.3.5.4	Fluoreszenzfarbstoff Fura-2	45
2.3.6	Versuche mit isolierten Herzzellen (Myocyten)	46
2.3.6.1	Myocyten-Gewinnung aus Meerschweinchen-Herzen	46
2.3.6.2	Beladung der Myocyten für Fluoreszenzmikroskopie	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Vergleich des Elektrokardiogramms von lebenden Tieren und isolierten Herzen.....	49

3.2	Rolle von Katecholaminen für den Partikel-induzierten Anstieg der Herzfrequenz.....	52
3.2.1	Versuche mit β -Blocker Metoprolol	53
3.2.2	Vergleich der Herzfrequenz mit der koronaren Durchflussrate im Langendorff-System	56
3.2.3	Versuche mit Reserpin behandelten Tieren	58
3.3	Wirkung von UFP auf das freie intrazelluläre Calcium in Neuronen	59
3.4	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	63
3.4.1	ROS-Induktor <i>tert</i> -Butylhydroperoxid (TBHP).....	63
3.4.2	Detektion von ROS mittels ESR.....	65
3.5	Wirkung von UFP auf das freie intrazelluläre Calcium in isolierten Herzzellen	68
3.6	Langendorff-System als selektives Testmodell für Partikel.....	71
3.6.1	Latex 40.....	71
3.6.2	Aerosil®	72
3.6.2.1	Aerosil® 90	72
3.6.2.2	Aerosil® 200	73
3.6.2.3	Aerosil® 380	75
3.6.3	GfG-Ruß.....	76
3.6.4	Nanotubes.....	77
4	Diskussion.....	80
4.1	Das Langendorff-System als Testmodell zur Toxizitätsanalyse von UFP und Nanopartikeln	80
4.2	Wirkungen von Partikeln auf Herz und Gefäße	84
4.3	Wirkungen von Partikeln auf das Nervensystem.....	85
4.4	Eingesetzte Partikelkonzentrationen und Umweltrelevanz	87
4.5	Potentielle Primärwirkungen von ultrafeinen Partikeln.....	88
4.5.1	Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf die Calciumregulation isolierter Herzzellen.....	88
4.5.2	Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf die Calciumregulation in neuronalen Zellen	90
4.5.3	Nachweis und Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch UFP	91

4.6	Mögliche Zusammenhänge der durch Partikel verursachten Veränderungen des Herzrhythmus	94
4.7	Ausblick.....	94
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literaturverzeichnis.....	98
7	Abkürzungsverzeichnis.....	119

1 Einleitung

Saubere Luft ist eine wichtige Grundlage für die Gesundheit. Die meisten Menschen in vielen Regionen der Welt sind zahlreichen Luftschadstoffen ausgesetzt, die die Gesundheit gefährden. Die potentiell gefährlichen Eigenschaften der meisten Luftschadstoffe sind allerdings noch nicht ausreichend erforscht. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat 2005 ihre ersten globalen Luftgüte-Richtlinien [WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide, Global update, 2005] veröffentlicht. In diesen werden deutlich niedrigere Richtwerte für Schadstoff-Immissionen festgelegt und die Regierungen der Welt dazu aufgerufen, die Luftqualität deutlich zu verbessern, um die menschliche Gesundheit zu schützen. Es wird davon ausgegangen, dass zum Beispiel nur durch die Verringerung des Feinstaubes die Todesfälle in besonders belasteten Städten pro Jahr um 15 % reduziert werden könnten. Die Richtlinien richten sich erstmalig an alle Weltregionen und geben einheitliche Richtwerte für die Luftqualität vor. Diese Ziele sind weitaus strenger als die nationalen Standards, die in großen Teilen der Welt Gültigkeit haben. In einigen Städten konnte dadurch der Schadstoffaustoss um mehr als zwei Drittel verringert werden. In dieser Arbeit soll die Wirkung von ultrafeinen Partikeln (UFP) bzw. Nanopartikeln auf das isolierte Herz von Meerschweinchen untersucht werden.

1.1 Luft- und Umweltschadstoffe

Zu den typischen Luftschadstoffen gehören Stickstoffoxide (NO_x), Schwefeldioxid (SO_2) und Ozon (O_3). Darüber hinaus zählt man den so genannten „Schwebstaub“ zu den Luftschadstoffen. Darunter versteht man alle festen und flüssigen Teilchen in der Luft, die eine Zeit lang in der Atmosphäre verweilen, bevor sie zu Boden sinken. In der englischsprachigen Wissenschaft bezeichnet man Schwebstaub als Particulate Matter (PM). Die Eigenschaften dieser Staubpartikel werden durch die Größe und chemische Zusammensetzung bestimmt. Der Durchmesser dieser Teilchen reicht von wenigen Nanometern bis zu 100 Mikrometer. Die Staubpartikel werden nach ihrer Größe in folgende Bereiche untergliedert:

- Ultrafeine Partikel: Teilchen kleiner als 100 nm
 - Feine Partikel: Teilchen kleiner als 2,5 μm
 - Grobe Partikel: Teilchen größer als 2,5 μm
-

- PM₁₀: Teilchen, die einen größenselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von 10 µm eine Abscheidewirksamkeit von 50 % hat (amtliche Definition aus EU-Richtlinie)
[Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften; Richtlinie 1999/30/EG]

Abb. 1.1-1 zeigt die Größenverteilung von Partikeln aus verschiedenen Quellen.

Die Teilchengröße ist für die Verweildauer in der Atmosphäre ebenso entscheidend wie für mögliche Transportwege der Teilchen. Ultrafeine Partikel haben nur einen geringen Massenanteil an PM. An der Oberfläche der Partikel lagern sich schädliche Stoffe, wie Schwermetalle, Dioxine oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe an.

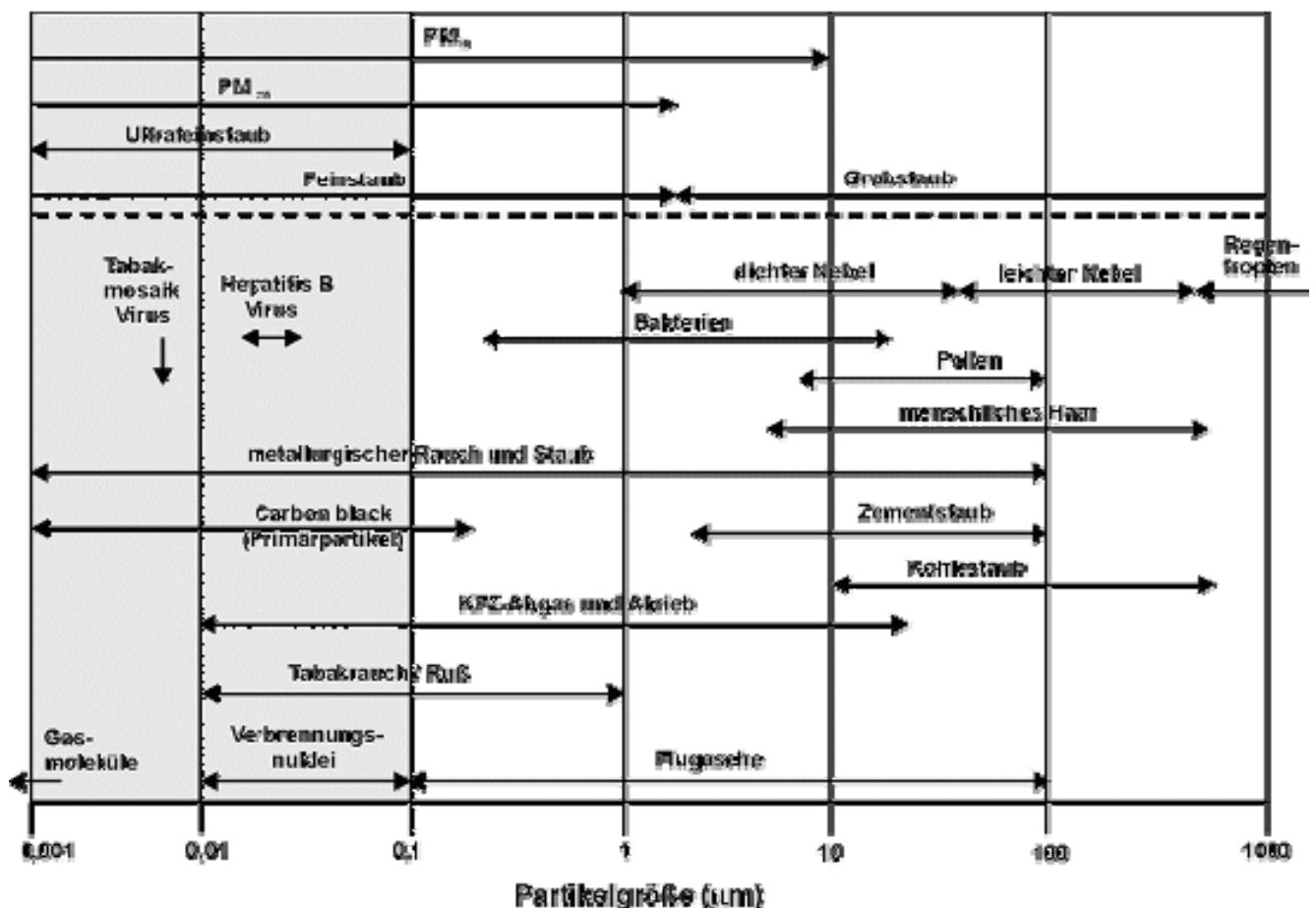


Abb. 1.1-1: Größenvergleich verschiedener Partikel [Krug *et al.*, 2004]

1.1.1 Quellen von PM

Bei den Quellen der Luft- und Umweltschadstoffe unterscheidet man zwischen anthropogenen, d.h. von Menschen verursachten, und natürlichen Quellen. Diese wiederum werden in primäre und sekundäre Quellen unterteilt.

Bei *primären anthropogenen Quellen* entstehen die Staubteilchen direkt in diesen Quellen und werden von ihnen freigesetzt. Dazu zählen stationäre Quellen, wie z.B. Kraftwerke, Abfallverbrennungsanlagen, Hausbrand und Industrieprozesse. In Ballungsgebieten sind mobile Quellen wie der Straßenverkehr (vor allem Diesel-Fahrzeuge) die Hauptquelle von PM. Hierzu tragen sowohl Rußpartikel aus dem Auspuff als auch Reifen-, Kupplungs- und Bremsenabrieb und aufgewirbelter Straßenstaub bei. Weitere mobile Quellen stellen der Luftverkehr, die Schifffahrt und der Schienenverkehr dar.

Bei *sekundären anthropogenen Quellen* werden reaktionsfähige Gase freigesetzt, die sich durch chemische Reaktionen oder Kondensation mit Wasserdampf in der Atmosphäre in sekundäre Staubteilchen verwandeln. Beispiele hierfür sind Stickstoffoxide (NO, NO₂), Schwefeloxide (SO₂, SO₃) und Ammoniak (NH₃). Durch die Fähigkeit große Entfernungen zu überwinden, tragen sie zu Luftbelastungen an weit vom Ursprung entfernten Stellen bei. Hauptquellen für sekundäre PM sind Verbrennungsanlagen, Hausbrand und Landwirtschaft.

Primäre PM natürlichen Ursprunges entstehen aus Meeren, Vulkanen, Bodenerosionen, Waldbränden und als biologisches organisches Material (Sporen, Pollen, Mikroorganismen).

Beispiele für *sekundäre PM natürlichen Ursprunges* sind Methan aus Feuchtgebieten, Gase aus Vulkanen oder Nitrat aus Boden und Gewässern.

Abb. 1.1.1-1 zeigt die prozentuale Aufgliederung der Quellen von PM.

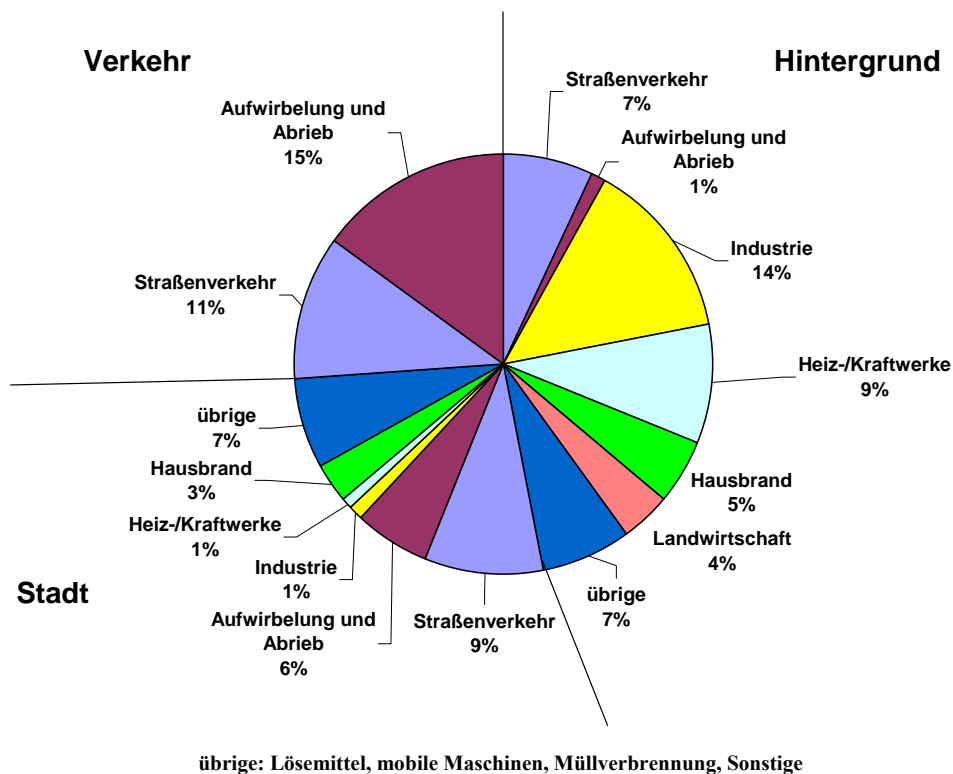


Abb. 1.1.1-1: Prozentuale Aufgliederung der PM-Quellen [Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt; Bund Naturschutz Bayern e.V., 2003]

1.1.2 Nanopartikel

In der Nanotechnologie ist zukünftig mit einem starken Aufschwung zu rechnen, besonders bei der Applikation von Arzneimitteln in Diagnose und Therapie, Lebensmittelprodukten und der Produktion von Biomaterialien [National Science & Technology Council, 2000; Meyer *et al.*, 2001]. Nanopartikel sind künstlich hergestellte Teilchen, die bereits in einer Vielzahl von Alltagsprodukten verwendet werden. Meist werden sie z.B. zur Oberflächenvergütung verwendet. Sie halten Ketchup flüssig, lassen Regentropfen von Autoscheiben abperlen, schützen Autolack vor Kratzern, die Haut vor UV-Strahlen oder verhindern analog zu PTFE (Polytetrafluorethylen) das Anbrennen in Pfannen und Töpfen. Die Möglichkeiten der Nanotechnologie scheinen unbegrenzt.

Die Wirkung von Nanopartikeln ist gegenüber größeren Partikeln gleicher chemischer Zusammensetzung verändert, das heißt die Funktionalität ist größeninduziert. Nanopartikel neigen zur Agglomeration, womit sie die spezifischen Nanoeigenschaften verlieren können. Auf ihrer Oberfläche können toxische Stoffe adsorbieren, die in unseren Organismus gelangen können. Für die Beurteilung der Gefährdung und die Grenzwertfestsetzung stellt sich die

Frage, ob die Partikelanzahl, die Partikeloberfläche, deren chemische Zusammensetzung oder andere Parameter heranzuziehen sind.

Um Nanomaterialien als isolierte Nanopartikel zu erzeugen, sind meist besonders aufwendige chemische und physikalische Verfahren erforderlich. Bei den kommerziell in großen Mengen hergestellten Produkten liegen die Nanopartikel nicht als einzelne Teilchen, sondern aggregiert und agglomeriert als Verbund mehrerer Teilchen vor. Es handelt sich nicht um Nanopartikel, sondern um nanostrukturierte Materialien, in denen die Nanopartikel miteinander verbunden sind. Eine Freisetzung von Nanopartikeln aus diesen Aggregaten und Agglomeraten ist ohne größere Energiezufuhr oft nicht möglich. Zum Teil werden Nanomaterialien bereits beim Hersteller zu Granulaten, Dispersionen und Kompositen verarbeitet. So ist also bei der nachfolgenden Verwendung eine Freisetzung von isolierten Partikeln nicht ohne weiteres zu erwarten.

Ein weiteres wichtiges Gebiet der Anwendung von Nanopartikeln umfasst neuartige Techniken der Medikamentenentwicklung, wie z.B. zur Behandlung von Tumoren [Matsumara *et al.*, 1986]. Die Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln werden beispielsweise genutzt, um bessere Möglichkeiten zur Positionierung von Medikamenten gegen befallene Körperteile, wie z.B. bei Krebs, zu erreichen. Hierbei soll das Medikament an den betroffenen Stellen im Körper in zeitlichen Intervallen freigesetzt werden [Fachjournal ACS Nano]. Je nach Form der Partikel haben diese im Infrarotlicht verschiedene Schmelzpunkte, sodass man von außen mit einer Infrarotlampe zum gewünschten Zeitpunkt steuern könnte, welches Medikament aus welchen Partikeln freigesetzt werden soll. Einer der Vorteile, Medikamente direkt an einer bestimmten Position im Körper freisetzen zu können, ist, dass giftige Substanzen ohne großflächige Schädigung von gesundem Gewebe eingesetzt werden können. In einer Reihe von Studien werden Nanopartikel eingesetzt, um Medikamente direkt bei einem Tumor zu platzieren und so die vielen Nebenwirkungen der traditionellen Chemotherapie zu umgehen. Die Position wird mit Infrarotlicht bestrahlt, wodurch sich die Partikel erwärmen und das enthaltende Medikament freisetzen.

In dieser Arbeit werden verschiedene Nanopartikel und Nanotubes bezüglich ihrer Wirkung auf das isolierte Herz untersucht.

1.2 Partikeldeposition in der Lunge

Partikel gelangen beim Atmen in die Atemwege. Feinstaubpartikel zwischen 3 und 10 μm Durchmesser werden in den oberen und mittleren Luftwegen abgefangen und abgehustet. Partikel, die kleiner als 3 μm sind, gelangen in die Bronchiolen und Lungenbläschen. Bei den meisten Partikeln, die in die Lungenbläschen gelangen, handelt es sich um ultrafeine Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm (Abb.1.2-1) [Kreyling *et al.*, 2002]. In den Lungenbläschen findet der Gasaustausch statt und gleichzeitig stellen sie die größte Oberfläche des menschlichen Organismus dar. Außerdem ist hier auch die dünnste Barriere des Körpers, da weniger als ein Mikrometer Gewebe die Atemluft vom Blut trennt. Daher sind die Lungenbläschen die Eintrittspforte für ultrafeine Partikel in den Körper.

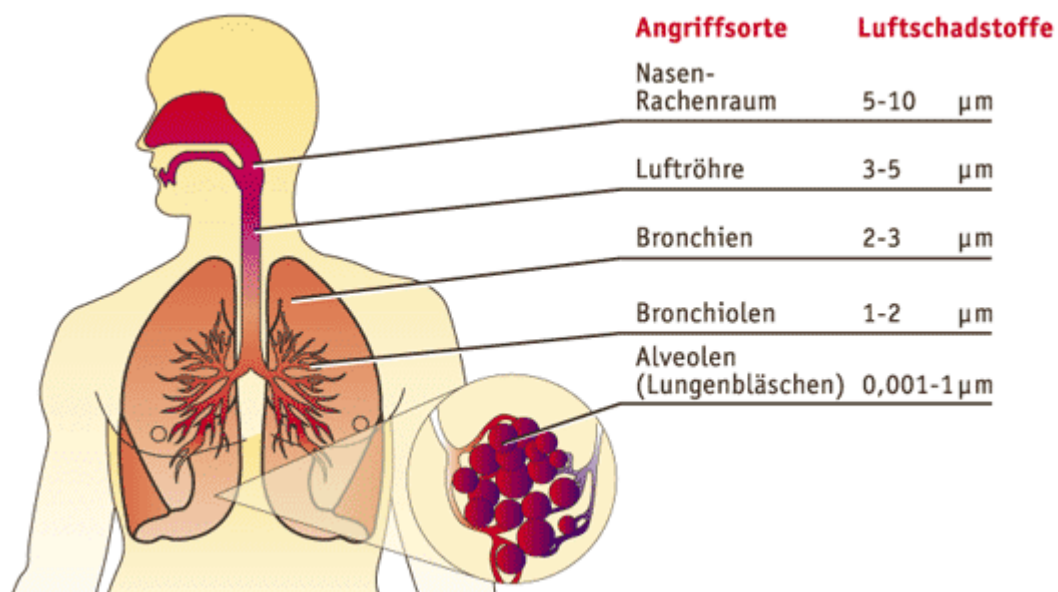


Abb. 1.2-1: Eindringtiefe von Luftschadstoffpartikeln in die Lunge

[<http://www.huss-umwelt.com/ch/infocenter/medizinische-bedeutung.php>]

1.2.1 Clearance und Translokation von Partikeln

Die Translokation von ultrafeinen Partikeln von der Lunge in den Blutkreislauf und die Aufnahme in verschiedene Organe kann zu kardiovaskulären Erkrankungen führen. Es gibt unterschiedliche Studien über die kurzzeitige Translokation und Akkumulation von Partikeln in der Leber. In Humanstudien reicht diese von $< 1 - 2 \%$ [Brown *et al.*, 2002] bis etwa 7% [Nemmar *et al.*, 2001], in Tierexperimenten sogar von $0,5 \%$ [Kreyling *et al.*, 2002] bis zu 50% [Oberdörster *et al.*, 2002]. Hingegen ist über die Translokation von der Lunge in andere Organe über längere Zeiträume nichts bekannt und auch nicht, ob die Ausscheidung (Clearance) von ultrafeinen Partikeln sich von der größerer Partikel unterscheidet. Auch wird angenommen, dass sich die Translokation von UFP von der größerer Partikel unterscheidet. Die Retention in der Lunge und die Clearance ist bei ultrafeinen Partikeln weniger durch Alveolarmakrophagen vermittelt als bei größeren Partikeln [Kreyling *et al.*, 2000]. Alveolarmakrophagen phagozytieren Partikel größer 100 nm , was sie im Falle von ultrafeinen Partikeln kaum tun. Allerdings sind sie trotzdem an phago- und pinozytischen Prozessen der UFP-Aufnahme und an der Sekretion von Botenstoffen beteiligt [Kreyling *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2001]. Die Dosimetrie von Partikeln in der Lunge kann mittels des Einsatzes von Metall- oder Metalloxid-Partikeln, die mit einem radioaktiven Gammastrahler markiert sind, durchgeführt werden [Kreyling *et al.*, 2000]. Obwohl Iridium kein relevantes Umwelt-aerosol darstellt, eignen sich ^{192}Ir -UFP, um Kinetiken der Partikel-Clearance zu studieren. In einer Inhalationsstudie an Ratten [Kreyling *et al.*, 2002] mit diesen Partikeln konnte gezeigt werden, dass während einer Woche nach Inhalation ein Großteil der Partikel in der Lunge verblieb. Die in den zuführenden Luftwegen und der Lungenperipherie abgelagerten Teilchen wurden vorwiegend durch die Luftwege und den Larynx (Kehlkopf) in den Gastrointestinaltrakt geleitet und mit dem Kot ausgeschieden. Außerdem war eine kleine Fraktion ($< 1 \%$) von Partikeln in sekundären Zielorganen (Leber, Milz, Herz und Gehirn) und eine etwas größere Fraktion ($< 5 \%$) im restlichen Körper nachweisbar.

Der Mechanismus der Translokation von Partikeln in verschiedene Gewebe wird ebenfalls stark diskutiert. Hierbei könnten die Oberflächencharakteristika der Partikel eine entscheidende Rolle spielen. Zum Beispiel könnten spezifische Verbindungen auf der Partikeloberfläche an den ApoE-Rezeptor binden, wodurch es zur Partikelpenetration käme [Kreuter *et al.*, 2002]. Des Weiteren könnten die Partikel mit Hilfe von Vesikeln durch Endothel- und Epithelzellen von der luminalen zur Gewebsseite transportiert werden. Mit Hilfe dieser Vesikel können Makromoleküle vom Lungenepithel ins Blut transportiert

werden. Dieser Mechanismus könnte insbesondere für Partikel mit einer Größe von 40 bis 100 nm ebenfalls in Frage kommen [Gumbleton, 2001]. Mittels des transaxonalen Transports über Synapsen und Neuronen können Partikel auf einem anderen Weg zu sekundären Zielorganen wie dem Herz, dem Zentralnervensystem oder dem Gehirn gelangen. Dieser Mechanismus wurde bereits vor Jahrzehnten bei Totenkopffaffen für nasal abgelagerte, kolloidale Goldpartikel mit einem Durchmesser von 50 nm gezeigt [De Lorenzo *et al.*, 1970]. Kohlenstoffpartikel könnten über den gleichen Weg ins Zentralnervensystem gelangen. Diese wurden im Riechkolben von Ratten nach Inhalation gefunden [Oberdörster *et al.*, 2002].

1.3 Studien zur Partikelexposition und Epidemiologie

Während der letzten Jahrzehnte wurde in zahlreichen Arbeiten über die signifikanten Gesundheitsrisiken durch Luftverschmutzung berichtet. Hierbei treten zum Beispiel bei Langzeitexposition Krebs und kardiovaskuläre Erkrankungen auf, bei kurzzeitiger Exposition Reizung von Augen, Nase und Hals und eine Verstärkung von bestehenden Allergien und asthmatischen Symptomen [Pope *et al.*, 2002]. Eine der Hauptquellen von PM in Großstädten ist der Straßenverkehr. Hierzu zählen Autoabgase, mechanischer Abrieb von Reifen und Bremsen. Diesel-betriebene Fahrzeuge gelten als Hauptquelle von ultrafeinen Partikeln [Kerminen *et al.*, 1997]. In den letzten Jahren wurde vor allem die Partikelexposition während der Benutzung von öffentlichen Verkehrsmitteln intensiv untersucht [Chan *et al.*, 2002; Duci *et al.*, 2003; Gulliver *et al.*, 2004]. Obwohl atmosphärische Partikel über lange Distanzen hinweg transportiert werden, treten die größten Partikelkonzentrationen nahe an viel befahrenen Straßen auf, wo sie ausgestoßen werden. Stationäre Messstationen registrieren Durchschnittskonzentrationen in ihrer unmittelbaren Umgebung, können aber normalerweise keine Hauptquellen, wie z.B. stark befahrene Straßen, erfassen. Andererseits zeigen Studien, dass die Partikelkonzentrationen innerhalb von Fahrzeugen signifikant höher sind als in der Nähe von Straßen [Gulliver *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2005; Hammond *et al.*, 2007]. Neben Berufs- und Gelegenheitsfahrern und Pendlern werden viele andere Populationsgruppen, wie z.B. Verkehrspolizisten, Straßenbauarbeiter und Menschen, die in Gebieten mit hohem Verkehrsaufkommen leben und arbeiten, schwerwiegend durch die hohen PM-Konzentrationen auf den Strassen belastet. Die Exposition mit solch hohen PM-Konzentrationen ist zwar meist nur von kurzer Dauer, allerdings konnte gezeigt werden, dass selbst Expositionen von weniger als einer Stunde zu schädlichen Gesundheitseinflüssen führen [Michaels *et al.*, 2000]. Es ist sogar möglich, dass viele andauernde bzw. chronische

Gesundheitseffekte das Ergebnis von wiederholter Exposition mit starken Partikelkonzentrationen sind [Schwartz, 2000].

Darüber hinaus zeigte sich, dass die Konzentrationsangabe als Partikelanzahl bei Messungen im Straßenverkehr ein sensitiverer Messparameter ist als die Massenkonzentration [Wahlin *et al.*, 2001; Weijers *et al.*, 2004]. Außerdem wurde gezeigt, dass ultrafeine Partikel ein größeres Potential besitzen Krankheiten zu verursachen, als größere Partikel [Donaldson *et al.*, 1998]. Ultrafeine Partikel konnten vermehrt in den tieferen Regionen des Respirationstraktes gefunden werden [Jaques *et al.*, 2000]. In einer weiteren Studie zeigte sich eine steigende Toxizität mit sinkender Partikelgröße [Oberdörster, 2000]. Dies lässt sich entweder auf die große spezifische Oberfläche der ultrafeinen Partikel zurückführen oder auf die Fähigkeit tiefer in das Lungengewebe eindringen zu können [Schwartz *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2000]. Aufgrund der großen Oberfläche der ultrafeinen Partikel kann sich auf ihnen eine Vielzahl von toxischen und kanzerogenen chemischen Komponenten, die während der Verbrennungsprozesse entstehen, ablagern.

Immer mehr epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass es durch die Exposition mit erhöhten Konzentrationen an feinen und ultrafeinen Partikeln in der Luft zu gesundheitlichen Schäden bei anfälligen Individuen kommt [Dockery *et al.*, 1993; Wichmann *et al.*, 2000; Ibaldo-Mulli *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2002; Pope, 2004; Schulz *et al.*, 2005]. In einer Studie mit Herzinfarkt-Patienten stellte sich heraus, dass das Auftreten des Infarktes in unmittelbarer Korrelation mit der Partikelexposition im Straßenverkehr stand [Peters *et al.*, 2004]. Trotz all dieser Studien ist weitestgehend unklar, wie genau die Teilchen das Herz schädigen.

Hypothesen für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen liegen in der Entzündung der Lunge und direkten Effekten am Herzen [Donaldson *et al.*, 2004].

1.4 Das Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, das den gesamten Körper durch rhythmische Kontraktionen mit Blut versorgt und so die Durchblutung aller Organe sicherstellt. Es arbeitet wie eine Pumpe, indem es das Blut aus einem Blutgefäß (Lungenvenen) ansaugt und durch ein anderes Blutgefäß (Aorta) ausstößt. Das menschliche Herz ist im Durchschnitt 15 cm lang, wiegt 0,5 % des Körpergewichts (etwa 300 Gramm) und besitzt ein Schlagvolumen von 70 cm³. Die Form des Herzens entspricht der eines abgerundeten Kegels, dessen Spitze im Körper nach unten und leicht nach links vorne zeigt. Im menschlichen Körper sitzt es leicht nach links versetzt hinter dem Brustbein.

1.4.1 Modellsystem Langendorff-Herz

Oskar Langendorff entwickelte 1895 eine nach ihm benannte Apparatur für Untersuchungen am einzelnen isolierten Herzen [Langendorff, 1895]. In diesem System werden, bei geschlossener Aortenklappe, die Koronargefäße des isolierten Herzens retrograd, d.h. entgegen der normalen Flussrichtung, über die Aorta mit warmer und sauerstoffgesättigter Perfusionsflüssigkeit durchströmt (retrograde perfused). Gleich nach Beginn der Perfusion beginnt das Herz wieder im Eigenrhythmus zu schlagen und es können Funktionsparameter wie beispielsweise die Herzfrequenz und der Koronarfluss fortlaufend registriert werden. Somit ermöglicht dieses System Untersuchungen am isolierten Organ ohne den Einfluss des Blutkreislaufes und anderer Organfunktionen.

1.4.2 Aufbau des Herzens

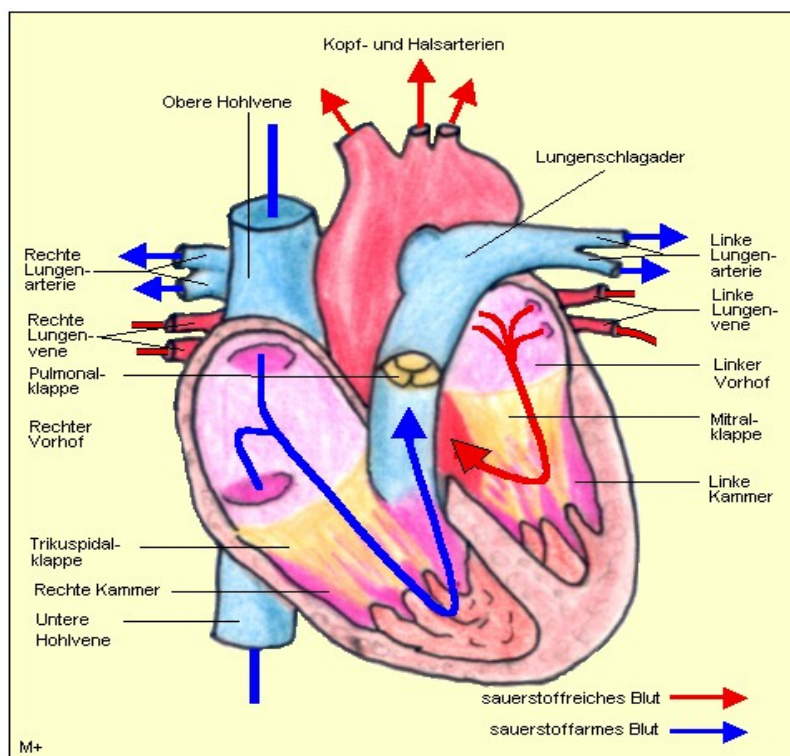


Abb. 1.4.2-1: Schematischer Aufbau des menschlichen Herzens [©MedizInfo®]

Abb. 1.4.2-1 zeigt den schematischen Aufbau des Herzens. Das Herz besteht aus zwei funktionellen Teilen (rechtes und linkes Herz). Die rechte Herzhälfte pumpt das Blut durch den Kreislauf der Lunge (kleiner Kreislauf), die linke Herzhälfte befördert das Blut durch den restlichen Körper (großer Kreislauf). Beide Teile bestehen jeweils aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventrikel). Getrennt werden die beiden Kompartimente durch die Herz-

scheidewand (Septum). Diese wird in die Vorhofscheidewand (Septum interatriale) und die Kammerscheidewand (Septum interventriculare, Ventrikelseptum) unterteilt.

Damit das Blut in den Herzräumen nur in eine Richtung fließen kann, befinden sich zwischen Ventrikeln und Atrien, sowie zwischen Ventrikeln und anschließenden Gefäßen die Herzklappen (Pulmonal-, Trikuspidal-, Mitral-, Aortenklappe), die als Rückschlagventile arbeiten. Alle vier Herzklappen liegen ungefähr in einer Ebene und sind gemeinsam an einer Bindegewebsplatte (Herzskelett) aufgehängt. Das Blut wird durch Arterien vom Herz zu den Organen und mittels Venen von den Organen zum Herzen transportiert. Die Arterien des Körperkreislaufs führen arterielles, d.h. sauerstoffreiches Blut, die Arterien des Lungenkreislaufs hingegen venöses, d.h. sauerstoffarmes Blut. Im Umkehrschluss ist das Blut in den Venen des Körperkreislaufs venös (sauerstoffarm) und das der Lungenvenen arteriell (sauerstoffreich).

Der Blutfluss im Herzen ist durch die Pfeile dargestellt. Venöses Blut gelangt über die obere und untere Hohlvene in das rechte Atrium. Der rechte Ventrikel leitet das Blut aus dem rechten Atrium über die Lungenarterie zur Lunge. Über die Lungenvene gelangt das sauerstoffreiche Blut aus der Lunge in das linke Atrium. Der linke Ventrikel pumpt das Blut über die Aorta in den Körperkreislauf und ist damit für die Pumpleistung des Herzens verantwortlich [Zervos-Kopp, 2006].

1.4.3 Herzkranzgefäße (Koronararterien)

Im Herzen gibt es zwei spezielle Blutgefäße, die so genannten Koronararterien (Herzkranzgefäße). Sie dienen zur Eigenversorgung des Herzmuskels mit Blut und zweigen aus dem Anfangsstück der Aorta ab. Die linke Koronararterie (Arteria coronaria sinistra) versorgt die Herzvorderseite und teilt sich in zwei Äste (Ramus circumflexus und Ramus interventricularis anterior). Die rechte Koronararterie (Arteria coronaria dextra) teilt sich ebenfalls in zwei Äste (Ramus interventricularis posterior und Ramus posterolateralis dexter). Sie versorgt die Wand der rechten Herzkammer und außerdem den Sinusknoten und Atrioventrikularknoten, welche wichtige Teile des Erregungssystems darstellen.

Das sauerstoffarme Blut aus dem Herzmuskel wird durch die Koronarvenen geleitet, welche im rechten Atrium münden.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten am Langendorff-System nutzt man aus, dass die Versorgungsgefäße des Herzens unmittelbar am Anfang der Aorta liegen. Im Langendorff-Versuch wird das Herz mit der Aorta an der Apparatur befestigt und die

Perfusionslösung wird über die Aorta zugeführt, was bedeutet, dass sie retrograd (rückwärts) perfundiert wird. Die Perfusionslösung drückt gegen die Aortenklappe und hält diese geschlossen, sodass die Ventrikel und Atrien über diesen Weg nicht gefüllt werden können. Die Herzkranzgefäße hingegen werden in der richtigen Richtung durchströmt. Sobald die Perfusionslösung wieder aus den im rechten Atrium mündenden Koronarvenen austritt, werden das rechte Atrium und somit auch der rechte Ventrikel gefüllt. Ventrikel und Atrium der linken Herzhälfte bleiben leer.

1.4.4 Herzzyklus

Die Pumptätigkeit des Herzens umfasst zwei Phasen: Systole und Diastole.

In der Systole (Austreibungsphase) kontrahiert sich die Herzmuskulatur und das Blut wird aus dem Herzen in die Arterien gepumpt. In der Diastole (Erschlaffungsphase) erschlafft die Herzmuskulatur und das Blut fließt aus den Venen in das Herz zurück.

Zuerst füllen sich die Atrien, während die Ventrikel gleichzeitig das Blut in die Arterien auswerfen. Wenn sich die Muskulatur der Ventrikel entspannt, öffnen sich die Segelklappen und das Blut fließt, verursacht durch den Druckabfall in den Ventrikeln, aus den Atrien in die Ventrikel. Dies wird durch ein Zusammenziehen der Atrien (Vorhofsystole) unterstützt und es folgt die Systole. Hierbei zieht sich die Muskulatur der Ventrikel zusammen, der Druck steigt, die Segelklappen schließen sich und das Blut strömt durch die nun geöffneten Taschenklappen in die Arterien aus. Während der Diastole ist kein Rückfluss des Blutes aus den Arterien möglich, da hier die Taschenklappen wieder geschlossen sind. Die Strömungsrichtung des Blutes wird also allein durch die Herzklappen bestimmt.

1.4.5 Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem des Herzens

Das autonome Reizleitungssystem des Herzens leitet elektrische Signale weiter, die die Pumptätigkeit des Herzens steuern. Der Grundrhythmus dieser Impulse wird durch das Erregungsbildungssystem erzeugt. Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass sowohl das Erregungsbildungssystem als auch das Erregungsleitungssystem nicht aus Nervenzellen, sondern aus spezialisierten Herzmuskelzellen bestehen.

Das Herz besitzt zwei myogene Impulsgeber (Schrittmacher). Als primärer Schrittmacher dient der Sinusknoten, der elektrische Impulse für die Kontraktion des Herzmuskels erzeugt. Der Sinusknoten befindet sich in der Wand des rechten Atriums an der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene. Folglich gehen die elektrische Erregung und die Kontraktion der Muskel-

zellen vom rechten Vorhof aus. Der sekundäre Schrittmacher des Herzens ist der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), der sich in der Wand des rechten Vorhofs an der Vorhof-Kammer-Grenze befindet. Vom Sinusknoten kommend, werden die Signale über den Vorhof zum AV-Knoten weitergeleitet. Der AV-Knoten sammelt die vom Sinusknoten kommenden Impulse und leitet sie an das His-Bündel weiter. Das His-Bündel ist ein in der Kammerscheidewand verlaufendes Faserbündel, das sich in zwei Stränge (Tawara-Schenkel) teilt, die zu je einem Ventrikel führen. An der Herzspitze teilen sich die Schenkel weiter in Purkinje-Fasern, welche die letzten Leitstrecken des Erregungsleitungssystems darstellen und in Kontakt mit den Herzmuskelfasern der Arbeitsmuskulatur treten. Von den Enden der Purkinje-Fasern erfasst die Erregung schließlich die gesamte Kammermuskulatur (Abb. 1.4.5-1). Im Falle eines Ausfalls des Sinusknotens kann der AV-Knoten die Impulsgebung übernehmen. Die Erregungsfrequenz des AV-Knotens ist geringer als die des Sinusknotens, weshalb die Schrittmachertätigkeit des AV-Knotens im gesunden Herzen nicht genutzt wird. Ist allerdings die Überleitung vom Sinusknoten zum AV-Knoten teilweise oder ganz gestört (AV-Block), fungiert der AV-Knoten als Schrittmacher des Herzens.

Die Automatie der Herzkontraktion kann innerhalb gewisser Grenzen durch sympathische beziehungsweise parasympathische Nerven beeinflusst werden. Unter dem Einfluss des Parasympathikus wird die Herzfrequenz verlangsamt und das Schlagvolumen verringert. Der Sympathikus hingegen beschleunigt die Herzfrequenz und erhöht das Schlagvolumen. Die Herzleistung kann somit an veränderte Situationen und Belastungen des Kreislaufsystems angepasst werden.

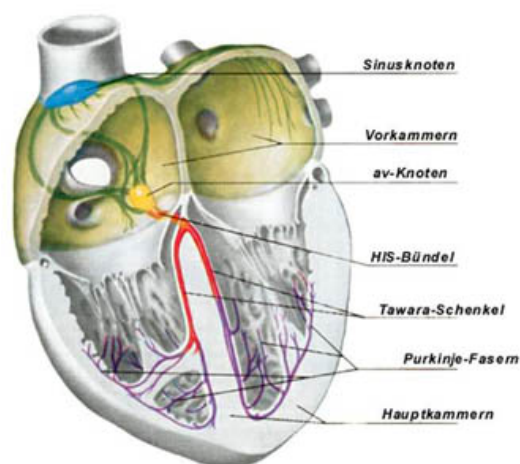


Abb. 1.4.5-1: Schematische Darstellung des Erregungsleitungssystems im Querschnitt

[Herz-Kreislauf-Zentrum Freiburg; <http://www.uniklinik-freiburg.de/hkz/live/KlinischeSchwerpunkte/ks-rhyt/ges.html>]

1.4.6 Elektrokardiogramm (EKG)

1.4.6.1 Das elektrische Signal der Reizleitung

Die Zellen des Erregungsleitungssystems übertragen Signale durch die Abfolge von De- und Repolarisationen. Die Mechanismen lassen sich durch elektrische Impulse messen (Abb. 1.4.6.1-1). Am Anfang ist die Zelle in Ruhe und somit im elektrischen Gleichgewicht (A). Ein elektrisches Messgerät zeigt in diesem Zustand keinen Ausschlag. Bei eingehendem Reiz beginnt die Zelle sich elektrisch zu laden, d.h. sich zu depolarisieren (B). Dies geschieht durch den Einstrom von Natriumionen aus dem extrazellulären Raum. Hierbei wird nun ein Ausschlag gemessen. Bei Beendigung der Depolarisation ist ein neues Gleichgewicht auf höherem Niveau erreicht (C). Nun leiten ausströmende Kaliumionen die Repolarisation ein (D). Dadurch werden die elektrischen Ladungen in entgegengesetzter Richtung zu (B) übertragen und erzeugen einen Messausschlag mit umgekehrtem Vorzeichen. Dieser Vorgang dauert länger als der vorgehende Natriumeinstrom. Deshalb zeigt die Messlinie einen längeren aber weniger starken Ausschlag an (E). Sobald die Repolarisation beendet ist, ist das Ruhepotential der Zelle wieder erreicht. Im Zeitraum bis zum nächsten Reiz werden die Ionen mittels einer Natrium-Kalium-Pumpe wieder ausgetauscht und somit die Ausgangsbedingungen wieder hergestellt (F).

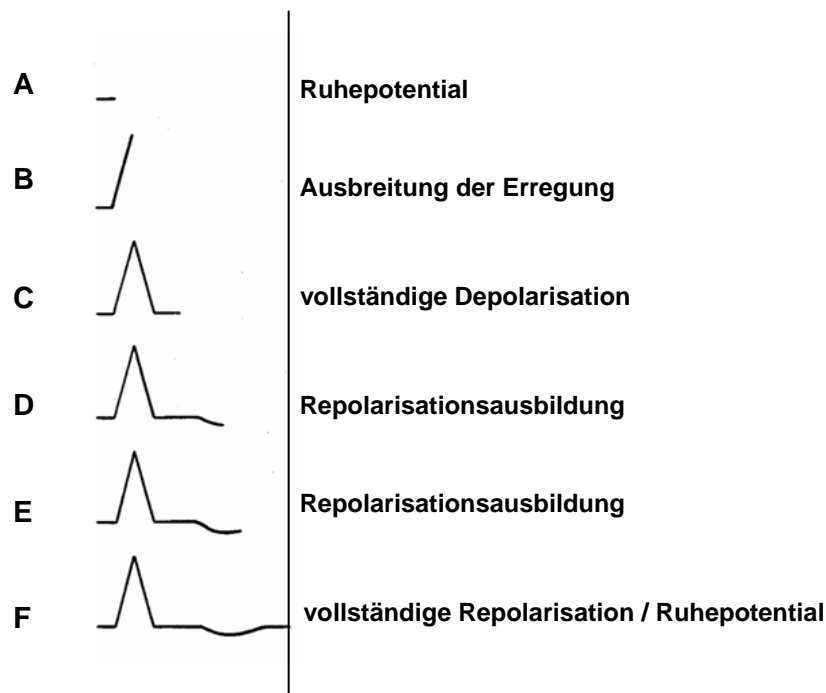


Abb. 1.4.6.1-1: Erregungsausbreitung in einer Einzelzelle

1.4.6.2 Das Elektrokardiogramm (EKG)

Bei Kontraktion eines jeden Muskels kommt es zu elektrischen Potentialänderungen. Ein erregter Muskelbezirk wird im Gegensatz zu einem nicht erregten Muskelbezirk als elektrisch negativ betrachtet. Mit Hilfe der Elektrokardiographie lassen sich die elektrischen Potentialänderungen registrieren, die mit der Aktion des Herzmuskels in Zusammenhang stehen. Der Herzmuskel wird nicht auf seiner ganzen Länge von der Erregung erfasst, sondern eine Erregungswelle wandert in Längsrichtung über die Faser.

Aufgrund der elektrischen Leitfähigkeit des das Herz umgebenden Mediums des Körpers ist die elektrische Aktivität der Herzmuskulatur beliebig in und am Körper ableitbar. Die Ableitung erfolgt jedoch üblicherweise an standardisierten Ableitpunkten mit Hilfe von Elektroden an der Körperoberfläche, von wo aus die gemessenen Potentialänderungen einem geeigneten Registrierer (Oszillograph) zugeführt werden [Csapo, 1980].

Mit dem EKG lassen sich vielfältige Aussagen über Eigenschaften und Erkrankungen des Herzens treffen. Allerdings spiegelt das EKG nicht die Auswurfleistung wider. Es können Herzfrequenz, Herzrhythmus und Lagetyp bestimmt und die elektrische Aktivität der Atrien und Ventrikel abgelesen werden. Für die Diagnostik von Herzrhythmusstörungen, wie z.B. Extrasystolen und Störungen der Erregungsleitung und -ausbreitung, wie z.B. AV-Block, ist das EKG ebenso unverzichtbar wie zur Erkennung eines Herzinfarktes. Auch Störungen der Rückbildung der Erregung (Repolarisation) können zu so genannten Kammerteil Veränderungen führen und im EKG detektiert werden.

Die Aufteilung des EKGs erfolgt in drei Hauptbereiche (Abb. 1.4.6.2-1).

Die P-Welle stellt die Aktivierung und Depolarisation der Atrien dar. Die PQ-Strecke zeigt die Überleitungszeit zum AV-Knoten, das heißt die Verzögerung der Signalweiterleitung an die Ventrikel.

Der QRS-Komplex stellt die zeitgleiche Depolarisation der beiden Ventrikel dar. Durch die Erregung der Herzscheidewand (Septum) entsteht die Q-Zacke, die R-Zacke durch die Kontraktion der Ventrikel. Das Ende der Erregung der Ventrikel stellt sich während des Beginns der ST-Strecke ein.

Das Ende eines Herzzyklus stellt die T-Welle dar. Hierbei erfolgt die Repolarisation der Ventrikel.

Durch die Repolarisation der Atrien gibt es außerdem noch eine U-Welle. Allerdings ist dieses Signal durch die geringe Masse der Vorhöfe so schwach, dass sich die U-Welle nicht von der T-Welle abhebt. Wenn allerdings die Amplitude der T-Welle sehr gering ist, wird die U-Welle sichtbar und es lässt sich ein Komplex aus T- und U-Wellen erkennen.

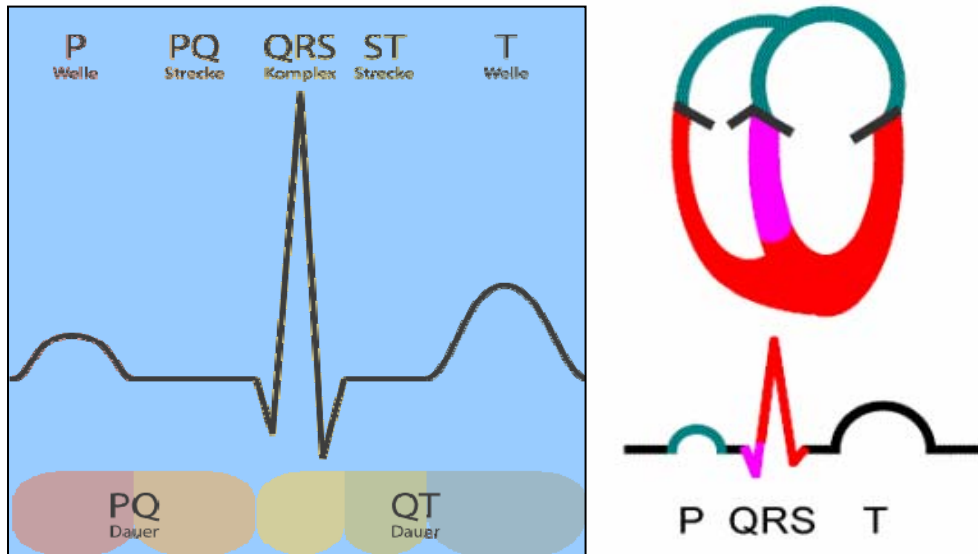


Abb. 1.4.6.2-1: Idealisiertes EKG mit farblicher Kennzeichnung der aktiven Region im Herzen [©1999 Dr. Stehle, aus Skript zur Vorlesung]

1.4.6.3 Ableitungen des Elektrokardiogramms

Bei den Ableitungen des Elektrokardiogramms unterscheidet man zwischen bipolaren und unipolaren Ableitungen. Bei den bipolaren Ableitungen wird die Spannung zwischen zwei gleichberechtigten Punkten auf der Körperoberfläche registriert, bei unipolaren hingegen zwischen einer differentiellen und einer indifferenten, d.h. nahezu potentialkonstanten, Bezugselektrode, die durch die Verschaltung mehrerer Elektroden entsteht. Durch den Zusammenschluss mehrerer Ableitstellen erhält man die Bezugselektrode.

Bei den Ableitungen nach Einthoven (Abb. 1.4.6.3-1 / obere Reihe) handelt es sich um bipolare Ableitungen. Hier wird die elektrische Potentialänderung zwischen den Extremitäten (Arme und Beine) gemessen. Ableitung I erfolgt vom rechten Arm zum linken Arm, Ableitung II vom rechten Arm zum linken Bein und Ableitung III vom linken Arm zum linken Bein.

Die Ableitungen nach Goldberger (Abb. 1.4.6.3-1 / untere Reihe) sind unipolare Ableitungen. Hier werden jeweils zwei Ableitungspunkte nach Einthoven als indifferente Elektrode zusammengeschaltet und gegen die verbliebene differentielle Elektrode abgeleitet. Dies ist bei aVR (augmented Voltage Right) der rechte Arm, bei aVL (augmented Voltage Left) der linke Arm und bei aVF (augmented Voltage Foot) das linke Bein.

Um Veränderungen in verschiedenen Bereichen des Herzmuskels und Ströme in verschiedenen Richtungen erfassen zu können, ist die Aufzeichnung mehrerer Ableitungen

von großer Bedeutung. Eigentlich geben die Ableitungen am isolierten perfundierten Herzen die „richtigen“ Vektoren der Erregungsbildung, und die Extremitäten-Ableitungen beim Menschen sind nur ein Surrogat.

Die Referenzelektrode wird in der Perfusionslösung vor dem Herz angebracht.

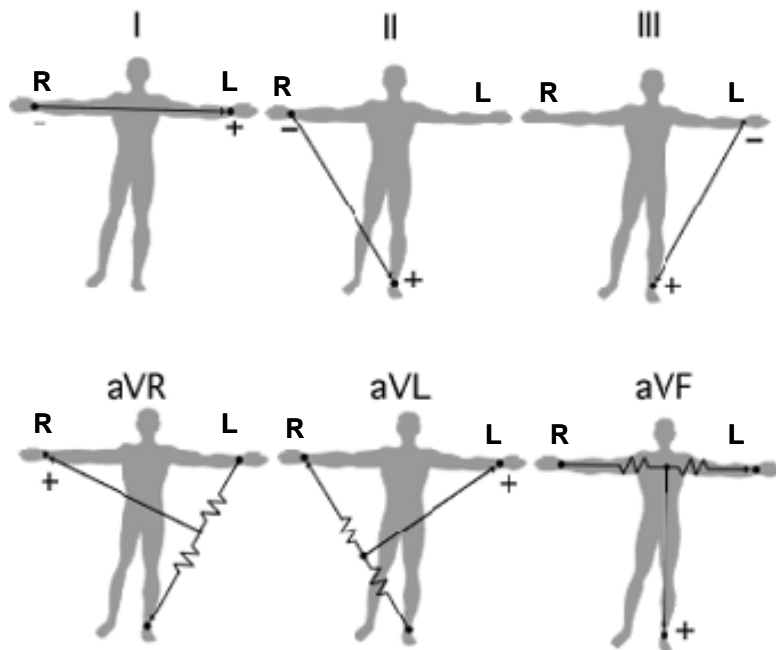


Abb. 1.4.6.3-1: Schematische Lage der Elektroden bei Einthoven (obere Reihe) und Goldberger (untere Reihe); EKG-Ableitung beim Menschen [nach Urban Frank aus Nobleprize.org]

1.5 Katecholamine

Bei Katecholaminen handelt es sich um körpereigene Stoffe, die über adrenerge Rezeptoren auf das Herz-Kreislaufsystem einwirken und das sympathische System des Herzens innervieren [Thews *et al.*, 1989].

Zu den Katecholaminen werden Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gezählt. Sie gehören zu den biogenen Aminen und sind Abkömmlinge der Aminosäure Tyrosin. Der Syntheseweg von Katecholaminen ist in Abb. 1.5-1 dargestellt. Die Bildung erfolgt in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, Noradrenalin wird zusätzlich in Ganglienzellen des Sympathikus synthetisiert. Freigesetzt werden sie aus der Nebennierenrinde und lokal aus den Enden des sympathischen Nervensystems. Bei Noradrenalin und Adrenalin handelt es sich um physio-

logische Transmitter des sympathischen Nervensystems. Sie werden in den Granula der präsynaptischen Membranen gespeichert. Nachdem sie durch den synaptischen Spalt diffundiert sind, binden sie an α - und β -Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Nach Auflösung der Bindung diffundiert der Großteil zurück zur präsynaptischen Membran, um durch aktiven „Reuptake“ wieder in die Speichergranula aufgenommen und inaktiviert zu werden. Nur etwa 5 % werden im synaptischen Spalt abgebaut. Die Wirkung der Neurotransmitter erfolgt über Adrenozeptoren ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), die sich durch ihre unterschiedliche Ansprechbarkeit auf die Transmitter unterscheiden. Die unterschiedlichen Katecholaminwirkungen an den Effektororganen lassen sich durch die unterschiedliche Verteilung der unterschiedlichen Rezeptoren an den Erfolgsorganen erklären. Der Wirkungsmechanismus liegt der Stimulation des Adenylatcyclasesystems zugrunde (Abb. 1.5-2). Herzspezifische Effekte werden vorwiegend über $\beta 1$ -Rezeptoren gesteuert. Hier ist die Wirkung positiv inotrop oder positiv chronotrop [Lüllmann *et al.*, 2003].

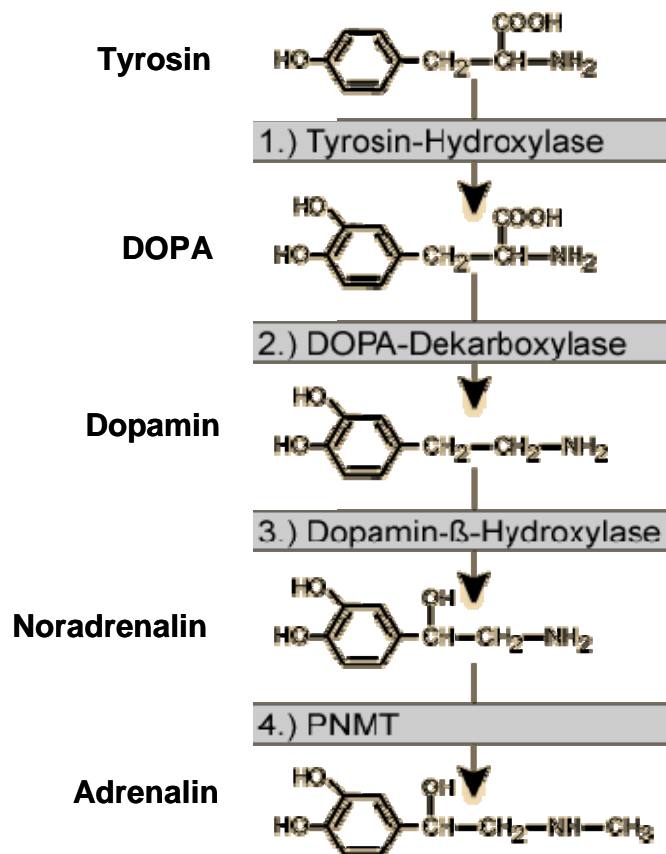


Abb. 1.5-1: Biosyntheseweg der Katecholamine

[Spinas, G.A., Heitz, P.U.; Universität Zürich]

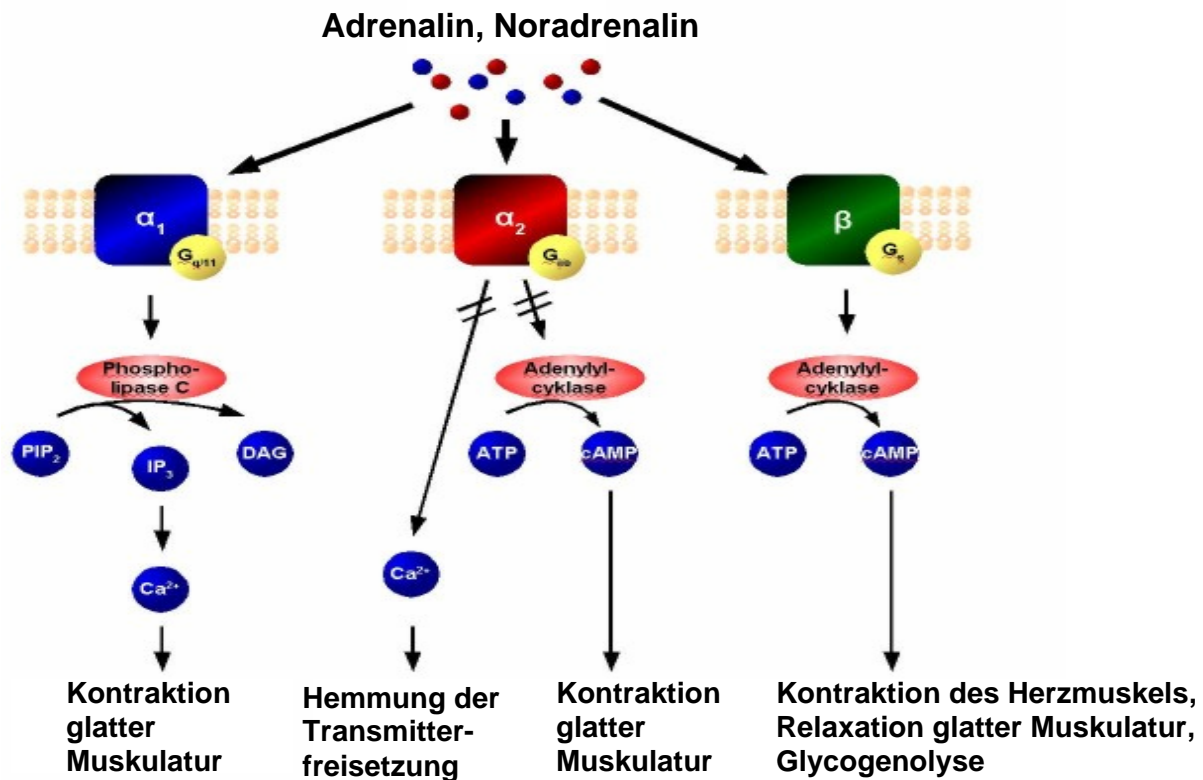


Abb. 1.5-2: Signaltransduktionswege der Adrenozeptoren [Griffin *et al.*, 2004]

1.5.1 Betablocker

Unter dem Begriff Betablocker (β -Blocker) fasst man in der Medizin eine Reihe ähnlich wirkender Arzneistoffe zusammen, die im Körper die β -Rezeptoren blockieren. Somit hemmen β -Blocker die Wirkung einiger Stresshormone, insbesondere die von Noradrenalin und Adrenalin, wodurch der stimulierende Effekt des Sympathikus auf die Zielorgane, vor allem das Herz, gedämpft wird. Dabei spielen zwei Arten von β -Rezeptoren eine Rolle. Die Herzleistung, d.h. Herzfrequenz und Schlagkraft, und damit auch der Blutdruck werden über β_1 -Rezeptoren beeinflusst. Die Anregung der β_2 -Adrenozeptoren wirkt hingegen auf die glatte Muskulatur der Bronchien und der Blutgefäße, wodurch die Blockierung dieser Rezeptoren im Gesamtorganismus Herzfrequenz und Blutdruck senkend wirkt. Durch die unterschiedliche Wirkung von Medikamenten auf die Rezeptoren kann man zwischen zwei Arten von Betablockern unterscheiden. Die unselektiven Betablocker wirken sowohl auf die β_1 -Rezeptoren als auch auf die β_2 -Rezeptoren. Selektive Betablocker wirken dagegen nur auf einen der beiden Rezeptortypen.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Betablocker handelt es sich um das so genannte Metoprolol, einen spezifischen β_1 -Adrenozeptorenblocker. Es besitzt negativ inotrope und negativ chronotrope Wirkungen [Vaughan Williams, 1985]. Metoprolol findet in der Therapie des Bluthochdrucks, koronarer Herzkrankheiten, bei Herzrhythmusstörungen und zur Akutbehandlung eines Herzinfarktes Anwendung. Metoprolol blockiert vor allem β_1 -Adrenozeptoren, die sich hauptsächlich im Erregungsbildungs- und Erregungsleitungs-gewebe des Herzens, d.h. im Sinusknoten, im AV-Knoten, den Vorhöfen, der Kammermuskulatur und den Herzkranzgefäßen befinden. Es senkt dadurch die Erregungsleitungs-geschwindigkeit, die Schlagfrequenz und die Kontraktionskraft des Herzens. Die Effekte der Blockade von Adrenozeptoren am isolierten Herzen wurden bereits in den 80er-Jahren untersucht [Dart *et al.*, 1984]. Ebenso wurde die Ausschüttung von endogenen Katecholaminen an isolierten Langendorff-Herzen studiert [Schömig *et al.*, 1984; Dart *et al.*, 1984].

1.5.2 Reserpin

Bei Reserpin handelt es sich um ein Indolalkaloid einiger Hundsgiftgewächse (Apocynaceae) der Gattung Rauwolfia (Abb. 1.5.2-1). Die Wirkung beruht auf der Hemmung der Aktivität des sympathischen Nervensystems, weshalb Reserpin auch als Antisymphathomimetikum bezeichnet wird. Der antihypertone Effekt basiert auf der Verarmung der Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin und Dopamin im postganglionären Sympathikus [Porzig *et al.*, 2000].

Reserpin vermindert die vesikuläre Speicherung von biogenen Aminen, indem es das Transportprotein in der Vesikalmembran für Katecholamine hemmt. Die Botenstoffe werden durch die mitochondriale Monoaminoxidase (MAO) außerhalb der Speichervesikel zu Ammoniak, Aldehyden und Wasserstoffperoxid abgebaut. Dadurch sinkt der Gehalt an Katecholaminen in den betreffenden Geweben stark ab. Die geschädigten Speichervesikel müssen mittels Neusynthese ersetzt werden, was einige Tage dauert. Wird Reserpin zu hoch dosiert, führt es zu einer irreversiblen Schädigung der Speichervesikel.

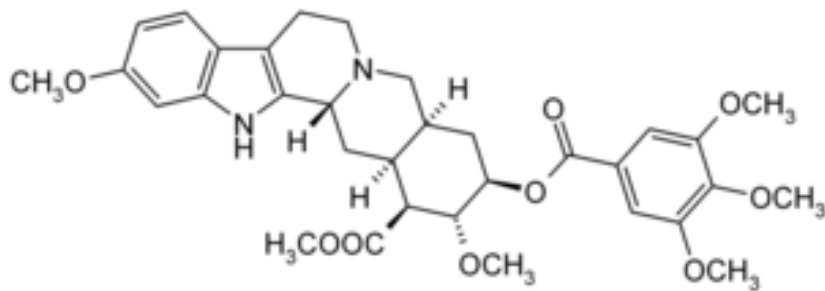


Abb. 1.5.2-1: Strukturformel von Reserpin

1.6 Herzzellen und deren freie intrazelluläre Calciumkonzentration

Die Wichtigkeit von Calcium-abhängigen Signalwegen im Herzen ist schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt [Übersichtsartikel: Marks, 2003]. Abbildung 1.6-1 zeigt ein vereinfachtes Modell einer Herzzelle. Bei jedem Herzschlag wird die Calciumkonzentration im Zytosol von Herzzellen kurzzeitig um das Zehnfache erhöht.

In dieser Arbeit sollen die Effekte von ultrafeinen Partikeln auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ an isolierten Herzzellen untersucht werden. Das freie intrazelluläre Calcium wird mittels Fluoreszenzmikroskopie und dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 bestimmt.

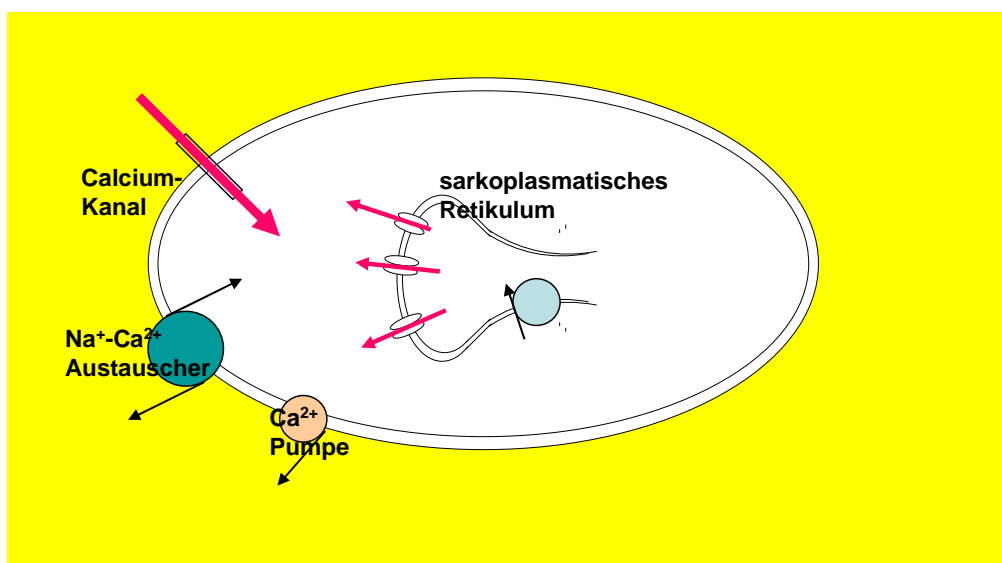


Abb. 1.6-1: Vereinfachtes Modell einer Herzzelle

1.6.1 Freie intrazelluläre Calciumkonzentrationen in Herzzellen

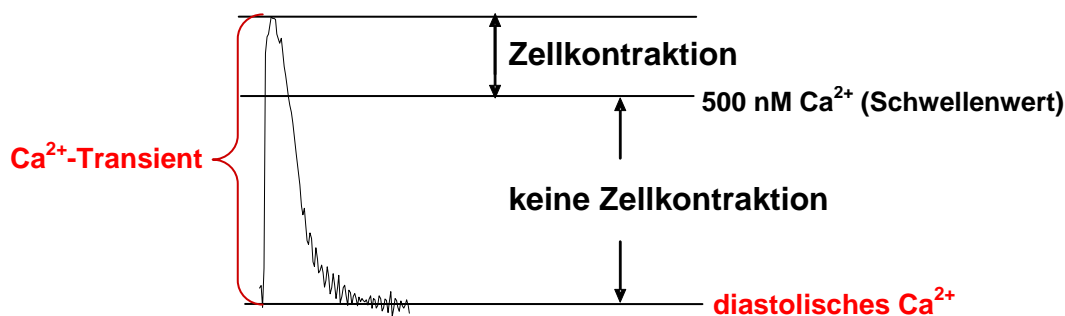


Abb. 1.6.1-1: $[Ca^{2+}]_i$ -Transient und diastolische Calciumkonzentration einer Herzmuskelzelle

Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in einer nicht erregten Herzmuskelzelle (diastolisches Calcium / Ruhe-Calcium) liegt bei 100 bis 200 nM. Aus dem Extrazellulärraum strömen über Calciumlecks ständig Calciumionen in die Zelle. Die Calciumpumpe (Ca^{2+} -ATPase) und der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher versuchen durch Ausschleusung von Calciumionen den Nettoeinstrom auf Null zu halten [Barry *et al.*, 1993; Carafoli, 1985]. Die Ca^{2+} -ATPase ist in der Lage, durch hydrolytische Spaltung eines ATP-Moleküls, ein Calciumion gegen das Konzentrationsgefälle aus der Zelle zu transportieren. Der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher ist ein so genanntes Antiport-System, das in einem Zyklus ein Calciumion gegen drei Natriumionen durch die Zellmembran austauscht. Der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher nimmt die größte Rolle beim Transport von Calciumionen aus der Zelle ein [Cannell, 1991].

Das Ruhepotential einer Herzmuskelzelle (-90 mV) wird beim Eintreffen eines weitergeleiteten Aktionspotentials in Richtung 0 mV verringert. Ist das Schwellenpotential von -40 mV erreicht, so nimmt die Leitfähigkeit der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle (L-type Ca^{2+} channel) rapide zu und das Membranpotential erreicht kurzfristig positive Werte bis +30 mV. Der Calciumeinstrom durch den L-type Ca^{2+} channel hat noch eine weitere Funktion. Als Trigger-Calcium-Strom aktiviert er die Calciumkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und führt so zu einer Freisetzung von Calciumionen aus den Speichern des SR. Diesen Vorgang bezeichnet man als „calcium-induced calcium-release“. Eine Calciumkonzentration von mehr als 500 nM aktiviert die kontraktilen Proteine und die Zelle kontrahiert [Moss, 1992]. Die Wiederherstellung des Ruhe-Calciums erfolgt durch die Rückspeicherung der Calciumionen in das SR mittels der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase. Außerdem trägt der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher dazu bei, durch

Ausschleusung von Calciumionen aus der Zelle das Ruhe-Calcium wiederherzustellen [Reeves *et al.*, 1984]. Auch wird Calcium durch Mitochondrien und calciumbindende Proteine kurzzeitig gespeichert [Wolska *et al.*, 1991; Miyata *et al.*, 1991]. Für die Phasen der ansteigenden und abnehmenden freien intrazellulären Calciumkonzentrationen nach einer Stimulation wird die Bezeichnung $[Ca^{2+}]_i$ -Transient verwendet. Abbildung 1.6.1-1 zeigt den Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ während der Kontraktion einer Herzmuskelzelle.

1.7 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativer Stress

Bei freien Radikalen handelt es sich um Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte freie Elektronen besitzen. Sauerstoffradikale entstehen im menschlichen Organismus während der Energieerzeugung und durch äußere Einflüsse. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden durch zelluläre physiologische Reaktionen in allen aeroben Organismen gebildet. Zu diesen ROS gehören der Singulett-Sauerstoff (1O_2) und folgende bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser gebildeten Zwischenprodukte: Hydroxyl-Radikale ($\cdot OH$), Alkoxy-Radikale ($R\cdot O$), Superoxidanion-Radikal ($\cdot O_2^-$), Peroxyl-Radikale ($R\cdot OO$), Hypochlorid ($HOCl$), Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Bei endogen gebildeten ROS handelt es sich meist um Superoxidanion-Radikale ($\cdot O_2^-$). Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei vielen zellulären Oxidationsreaktionen ein monovalenter Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff stattfinden kann, bei dem Superoxidanion-Radikale gebildet werden. Wasserstoffperoxid kann durch Elektronentransfer in das stark oxidierende Hydroxyl-Radikal überführt werden (Abb. 1.7-1).

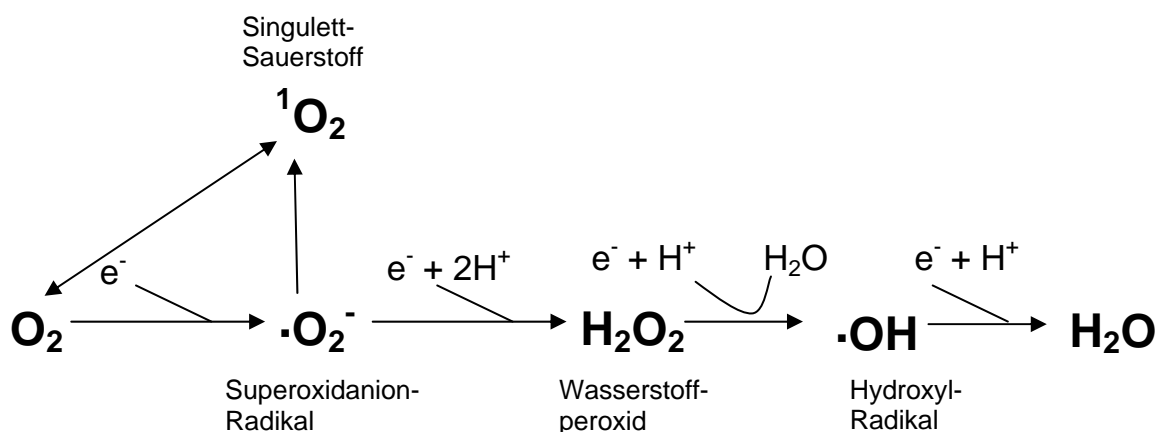


Abb.1.7-1: Reduktion von molekularem Sauerstoff über Superoxidanion, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal

Die meisten ROS besitzen eine sehr kurze Halbwertszeit von nur wenigen Nano- oder Millisekunden bis zu einer Sekunde (Tab. 1.7-1).

Symbol (Name)	Halbwertszeit (s)
$\cdot\text{OH}$ (Hydroxyl-Radikal)	10^{-9}
$\text{R-O}\cdot$ (Alkoxy-Radikal)	10^{-6}
$\cdot\text{O}_2^-$ (Superoxidanion-Radikal)	10^{-4}
$^1\text{O}_2$ (Singulett-Sauerstoff)	10^{-3}
$\text{R-OO}\cdot$ (Peroxyl-Radikal)	0,1
HOCl^- (Hypochlorid)	0,1
$\text{NO}\cdot$ (Stickstoffmonoxid-Radikal)	0,4
H_2O_2 (Wasserstoffperoxid)	1,0

Tab. 1.7-1: Intrazelluläre Halbwertszeiten von verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies

Mit der endogen und exogen induzierten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) befassen sich in den letzten Jahren viele Bereiche der medizinischen und biologischen Forschung [Finkel *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2003; Dröge, 2002]. Die Studien befassen sich unter anderem mit der Analyse der Sauerstoffradikale in verschiedenen biologischen Systemen, um deren Einfluss bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen, z.B. auch kardiovaskulärer Erkrankungen, besser verstehen zu können [Shah *et al.*, 2004; Haliwell, 1993; Fukai *et al.*, 2002].

Die Entstehung von ROS erfolgt sowohl extrazellulär als auch durch intrazelluläre Enzymsysteme, wie z.B. die mitochondriale Atmungskette, die NO-Synthase, die Cytochrom P450-Monooxygenase oder die NADPH-Oxidase [Fukai *et al.*, 2002]. Eine weitere, seit langem bekannte, Entstehungsmöglichkeit liegt in der Autooxidation von Flavinen, Ferredoxinen und Katecholaminen [Del Maestro, 1980]. Um physiologische Prozesse in den Zellen aufrechtzuerhalten, ist das Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau von ROS von enormer Wichtigkeit [Dröge, 2002].

Unter oxidativem Stress versteht man den kurzzeitigen Anstieg von ROS. Dieser entsteht durch eine verminderte antioxidative Abwehr oder eine übermäßige Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies [Fattman *et al.*, 2003]. Diese können mit biologischen Makromolekülen interagieren, was wiederum zur Bildung von inaktiven Proteinen und zur Mutation von DNA-Molekülen führt und letztendlich zelluläre Schäden zur Folge hat.

In zahlreichen neueren Studien stellte sich heraus, dass ultrafeine Partikel essentiell zur Entstehung von systemischem oxidativem Stress beitragen [Araujo *et al.*, 2008; Beck-Speier *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2008; Donaldson *et al.*, 2003; Nel *et al.*, 2001]. Außerdem kann es durch die Exposition mit UFP zu DNA-Schäden kommen, die aus oxidativem Stress resultieren [Bräuner *et al.*, 2007; Risom *et al.*, 2005]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass es durch die Lokalisation von UFP in Mitochondrien zu erheblichen strukturellen Veränderungen der Mitochondrien kommt [Ning, 2003].

In dieser Arbeit soll der Einfluss von ultrafeinen Partikeln auf die ROS-Produktion am isolierten Herzen untersucht werden.

1.7.1 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Messung der Bildung von Superoxidanion-Radikalen ($\cdot\text{O}_2^-$) ist aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit dieser ROS-Spezies sehr problematisch. Außerdem herrscht eine sehr niedrige intrazelluläre Konzentration von circa 1 nmol/l, die durch die endogene unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff zu $\cdot\text{O}_2^-$ und durch das Abfangen von $\cdot\text{O}_2^-$ durch zytoplasmatische und mitochondriale Superoxiddismutasen (SOD) zustande kommt [Brawn *et al.*, 1980; Cadenas *et al.*, 2000]. Dadurch wird eine Messtechnik benötigt, die empfindlich genug ist, um diese geringen Mengen detektieren zu können. Außerdem sollte es auch möglich sein, die intrazellulären Mengen messen zu können [Tarpey *et al.*, 2004]. Es gibt zahlreiche Methoden zur Messung von ROS. Beispielsweise können ROS mittels Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-basierten Techniken gemessen werden. Diese Methoden sind allerdings unspezifischer und weniger sensitiv als andere (vergleiche 1.7.1.1). Im Allgemeinen bestehen große Unterschiede in der Methodik und vor allem in der Qualität der Bestimmung von ROS [Dikalov *et al.*, 2007].

1.7.1.1 Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR)

Eine der wohl selektivsten Methoden zum Nachweis von ROS-Spezies mit ungepaarten Elektronen, d.h. den meisten ROS-Spezies, ist die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR), auch Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR) genannt.

Die ESR ist eine spektroskopische Methode, die 1944 erstmals von Sawoiski durchgeführt wurde. Ähnlich wie bei der Kernresonanz-Spektroskopie wird die Wechselwirkung zwischen magnetischen Momenten und elektromagnetischer Strahlung untersucht, um Aufschlüsse über

die Zusammensetzung bestimmter Stoffe zu gewinnen. Bei der ESR wird das magnetische Moment der Elektronen, der so genannte Elektronenspin genutzt. Es wird also die resonante Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch paramagnetische Substanzen, d.h. Substanzen mit ungepaarten Elektronen, in einem statischen äußeren Magnetfeld genutzt. Dabei werden die Zustände der Elektronenspins geändert, wodurch diese Absorption verursacht wird.

So lassen sich letztendlich alle Proben untersuchen, die über ein permanentes magnetisches Moment, d.h. über ungepaarte Elektronen verfügen und auf Grund des Drehimpulses dieser Elektronen oder des Kernspins ein magnetisches Moment besitzen und deswegen auf äußere Magnetfelder reagieren.

Die gemessenen Spektren sind spezifisch für die entsprechenden Radikale [Tarpey *et al.*, 2004]. Durch ihre paramagnetischen Eigenschaften stellen ROS ein geeignetes Substrat für die Bestimmung mit der ESR-Spektroskopie dar [Schneider und Plato: „Elektronenspinresonanz“].

Da die ROS, wie bereits erwähnt, sehr kurzlebig sind, erfolgt der Nachweis von ROS mittels der Verwendung von so genannten „Spin-Probes“ oder „Spin-Traps“. Durch deren Anwendung gehen die hochreaktiven, kurzlebigen ROS in stabile und länger nachweisbare Verbindungen über. Spin-Traps nehmen nach der Reaktion mit dem Radikal dieses in ihre Struktur auf und bilden eine paramagnetische Substanz mit einer längeren Halbwertszeit. Spin-Probes hingegen inkorporieren ROS nicht in ihre Struktur, sondern werden durch ROS oxidiert und formen stabile paramagnetische Moleküle, die im ESR ein Signal zeigen.

1.7.1.2 Spin-Probe CMH - Substanz zur Detektion von ROS

Um die hochreaktiven und wegen der im Bereich von Millisekunden liegenden Halbwertszeit schwer nachweisbaren ROS zu detektieren, wurde die Spin-Probe CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine) (Abb. 1.7.1.2-1) vom Hydroxylamin-Typ verwendet (Noxygen, Elzach, Deutschland). Durch die Bindung der Sauerstoffradikale an die Spin-Probe ist es möglich, die Superoxidanion-Radikale ($\cdot\text{O}_2^-$) länger zu stabilisieren und mittels ESR zu messen. Die Spin-Probe wird durch Oxidation durch Superoxid zu einem stabilen Spinaddukt ($\text{CM}\cdot$) transformiert (Abb. 1.7.1.2-2), wobei dessen Konzentration proportional zur ROS-Konzentration ist. CMH zeichnet sich außerdem durch eine kurze Reaktionszeit und hohe Stabilität aus [Mojovic *et al.*, 2004; Ristow *et al.*, 2003]. Ein weiterer großer Vorteil in der Verwendung von CMH besteht darin, dass es nahezu

resistent gegenüber Autooxidation, Reduktionsmitteln und anderen messungsbeeinflussenden Reagenzien ist [Dikalov *et al.*, 1998]. Die Konzentrationsbestimmung der signalgebenden CM-Moleküle erfolgt anhand der Amplitude des ESR-Spektrums.

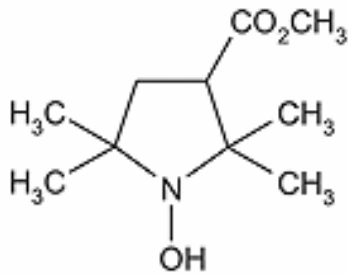


Abb. 1.7.1.2-1: Strukturformel der Spin-Probe CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine)

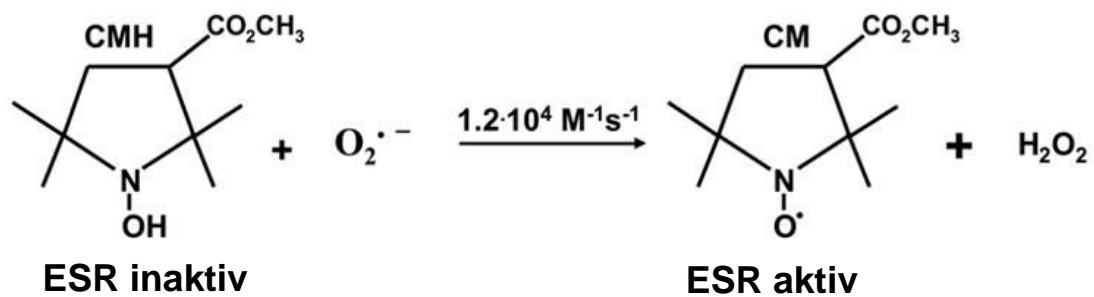


Abb. 1.7.1.2-2: Oxidation der Spin-Probe CMH durch Superoxid zum Spinaddukt CM• [Dikalov *et al.*, 2007]

1.8 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das Langendorff-System als selektives Testmodell für die Wirkung von ultrafeinen Partikeln (UFP) auf das isolierte Herz zu etablieren. Hierzu werden verschiedene Arten von ultrafeinen Partikeln und Nanotubes getestet. Es soll untersucht werden, ob die verwendeten Partikel generell zu einer Frequenzerhöhung und zur Entstehung von Arrhythmien am isolierten Herz führen oder ob es selektive Unterschiede gibt.

Des Weiteren soll untersucht werden, über welchen Mechanismus ultrafeine TiO₂- oder Kohlenstoff (Printex 90)-Teilchen in isoliert perfundierten Herzen zur Erhöhung der Herzfrequenz und Entstehung von Arrhythmien führen können. Primär soll in verschiedenen Versuchen unter Einsatz des Betablockers Metoprolol und Reserpin überprüft werden, ob die Frequenzerhöhung über Katecholamine hervorgerufen wird.

Da Calcium bei der Speicherung und Freisetzung von Katecholaminen wie Noradrenalin eine wichtige Rolle spielt, soll mittels Fluoreszenzmikroskopie geklärt werden, ob die Modellpartikel einen Einfluss auf die Calciumhomöostase von Nervenzellen haben.

Auch bei der Entstehung von Arrhythmien spielt Calcium eine Schlüsselrolle. Daher soll auch an isolierten Herzzellen untersucht werden, welchen Einfluss die ultrafeinen Partikel auf das Calcium während der Kontraktion und in der Ruhephase ausüben.

Eine weitere Hypothese besteht darin, dass die Partikel in der Lage sind ROS zu generieren und somit die Calciumhomöostase in Neuronen beeinflussen, was wiederum zu einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen führen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank:	BBD 6220 (37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % rH)	Heraeus Instruments, Osterode
EKG-Aufzeichnung:	ADInstruments Board	ADInstruments GmbH, Spechbach
Elektronen-Spin- Resonanz-Spektroskopie:	e-scan	Bruker Bio Spin GmbH, Rheinstetten
Langendorff-Apparatur:	Eigenaufbau	
Mikroskope:	Axiovert S 100 TV Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen Carl Zeiss AG, Oberkochen
Partikelmessung:	High Performance Particlesizer HPPS 5001	Malvern Instruments Herrenberg
pH-Meter:	pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Egelsbach
Photometer:	Uvikon Spectrophotometer 941 Plus	Kontron Instruments, Düsseldorf
Software:	TILLvisION v 3.3.	TILL Photonics, Martinsried
Spannungsgeräte:	Voltcraft [®] DC Power Supply PS 152 A	Voltcraft, Hirschau
Stereomikroskope:	Wilovert [®]	Will, Wetzlar
Ultraschalllanze:	Bandelin Sonoplus HD 2070 MS 72	Bandelin electronic, Berlin
Variopipetten:	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Waagen:	Feinwaage SBC 32 Analysenwaage L 2200 P	Scaltec Instruments, Göttingen Sartorius, Göttingen
Wasserbäder:	Haake B3 mit DC10	Thermo Haake, Karlsruhe

2.2 Material

2.2.1 Herstellung von Partikelsuspensionen

Einmalspritzen:	1 ml, 5 ml, 10 ml Omnifix [®]	B. Braun AG, Melsungen
Kanülen:	0,40 x 20 mm Sterican [®]	B. Braun AG, Melsungen
Küvetten:	Plastibrand [®] , 1,5 halbmikro	Brand, Wertheim
Spritzenvorsatzfilter:	220 µm Expressmembran (PES)	Millipore, Schwalbach
	100 µm Durapore Membran (PVDF)	Millipore, Schwalbach

2.2.1.1 Verwendete Partikel

Aerosil[®] 90: hydrophile pyrogene Kieselsäure, hydrophil,
Primärpartikelgröße 20 nm,
spezifische Oberfläche $90 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$, 99,8 % SiO₂
Degussa, Evonik Industries, Frankfurt

Aerosil[®] 200: hydrophile pyrogene Kieselsäure, hydrophil,
Primärpartikelgröße 12 nm,
spezifische Oberfläche $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$, 99,8 % SiO₂
Degussa, Evonik Industries, Frankfurt

Aerosil[®] 380: hydrophile pyrogene Kieselsäure, hydrophil,
Primärpartikelgröße 7 nm,
spezifische Oberfläche $380 \pm 30 \text{ m}^2/\text{g}$, 99,8 % SiO₂
Degussa, Evonik Industries, Frankfurt

GfG-Ruß: spark discharge generated soot, im Grafitfunkengenerator
erzeugt, hergestellt im Institut für Wasserchemie
und Chemische Balneologie, TU München

Latex 40: Polymer Microspheres in Wasser, 40 nm nomin. Durchmesser,
41 nm \pm 1,8 nm mean diameter (NIST traceable)
Duke Scientific Corporation, Fremont, Kalifornien

- Latex 60: Polymer Microspheres in Wasser, 60 nm nomin. Durchmesser, 60 nm \pm 2,5 nm mean diameter (NIST traceable)
Duke Scientific Corporation, Fremont, Kalifornien
- Latex 80: Polymer Microspheres in Wasser, 80 nm nomin. Durchmesser, 81 nm \pm 2,7 nm mean diameter (NIST traceable)
Duke Scientific Corporation, Fremont, Kalifornien
- Latex 100: Polymer Microspheres in Wasser, 100 nm nomin. Durchmesser, 102 nm \pm 3 nm mean diameter (NIST traceable)
Duke Scientific Corporation, Fremont, Kalifornien
- Latex 200: Polymer Microspheres in Wasser, 200 nm nomin. Durchmesser, 199 nm \pm 6 nm mean diameter (NIST traceable)
Duke Scientific Corporation, Fremont, Kalifornien
- Nanotubes: Carbon nanotube, single-walled, carboxylic acid functionalized, Durchmesser 4 - 5 nm, Länge 200 - 1500 nm
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Baytubes[®] C150P , multiple-walled (3 - 15 walls), carboxylic acid functionalized, Außendurchmesser 13 - 16 nm, Innendurchmesser 4 nm, Länge 1 - 10 μ m
Bayer MaterialScience AG, Leverkusen
- Printex 90 (P90): Kohlenstoff, 90 nm Durchmesser, spezifische Oberfläche 272 m²/g, Gehalt an Metallen 0,02 Vol. %, organische Verunreinigungen 0,7 - 1,0 Vol. %
Degussa, Evonik Industries, Frankfurt
- Titandioxid (TiO₂): 20 nm Durchmesser, spezifische Oberfläche 50 m²/g
Degussa, Evonik Industries, Frankfurt
-

2.2.2 Arbeiten am isolierten Langendorff-Herz

2.2.2.1 Chemikalien für Krebs-Henseleit-Bicarbonat Puffer (KHB)

Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose, minimum 99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2.2.2 Weitere verwendete Chemikalien für Experimente am isolierten Langendorff-Herz

Albumin from bovine serum (BSA), Minimum 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisenchelator Deferoxamin (DF)	Noxygen, Elzach
Heparin-Natrium-250000-ratiopharm [®]	Ratiopharm GmbH, Ulm
Histamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran CP [®]	Cp-pharma, Burgdorf
Kupferchelator Diethyldithiocarbamat (DETC)	Noxygen, Elzach
(±)-Metoprolol(+)-tartrate salt, Minimum 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reserpin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spin-Probe CMH	Noxygen, Elzach
TBHP (<i>tert</i> -Butylhydroperoxid)	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Verwendete Zelltypen

Neuro2A, mouse neuroblastoma, DSMZ no. ACC 148	DSMZ, Braunschweig
PC12, rat adrenal pheochromocytoma, DSMZ no. ACC 159	DSMZ, Braunschweig

2.2.3.2 Nährmedien und Chemikalien für Zellkultur

Accutase™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antibiotic antimycotic solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagen A	Biochrom, Berlin
Donor horse serum (Pferdeserum)	Biochrom, Berlin
Dulbecco's MEM (+ Glucose, L-Glutamine, Pyruvate)	Invitrogen, Karlsruhe
Foetal bovine serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Poly-D-Lysin	Roche Diagnostics, Penzberg
Trypsin / EDTA solution	Biochrom, Berlin

2.2.3.3 Verwendete Farbstoffe

Fura-2, AM, cell permanent	Invitrogen, Karlsruhe
Image-iT® LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.4 Chemikalien zur Myocyten-Isolierung

Albumin from bovine serum (BSA), Minimum 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Collagenase, Type CLS II	Biochrom, Berlin
D-(+)-Glucose, minimum 99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	Biochrom, Berlin
Hepes-Na solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Protease (0,36 units/mg solid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg

2.3 Methoden

Alle hergestellten Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben mit Reinstwasser (18,3 M Ω /cm), welches über eine Milli-Q PLUS QPAK[®]2 Filtrationsanlage (Millipore, Schwalbach) aufgereinigt wurde, angesetzt.

2.3.1 Herstellung der Herzperfusionslösung Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHB)

Stammlösungen:

CaCl ₂	8,8 g / 250 ml
KCl	11,01 g / 250 ml
MgSO ₄	7,26 g / 250 ml
NaCl	67 g / 1 l
NaHCO ₃	20,9 g / 1 l

Gebrauchslösung (1 l):

CaCl ₂	5 ml von Stammlösung	(1,2 mM Endkonzentration)
KCl	10 ml von Stammlösung	(5,9 mM Endkonzentration)
MgSO ₄	10 ml von Stammlösung	(1,2 mM Endkonzentration)
NaCl	100 ml von Stammlösung	(115 mM Endkonzentration)
NaHCO ₃	100 ml von Stammlösung	(25 mM Endkonzentration)

Es werden 2 g Glucose pro Liter Gebrauchslösung eingewogen und anschließend die jeweiligen Anteile der Stammlösungen zugegeben. Zu beachten ist, dass NaHCO₃ erst dann zugegeben wird, wenn die Gebrauchslösung mindestens zur Hälfte mit destilliertem Wasser aufgefüllt ist, da sonst die Gefahr des Ausflockens von NaHCO₃ besteht. Zuletzt wird die Lösung mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt und 20 Minuten mit Kohlensäure begast, um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen.

Damit konstante Versuchsbedingungen gewährleistet sind und um Agglomerationsprozesse der verschiedenen in den Experimenten verwendeten Partikel zu verhindern, bzw. zu minimieren, enthalten alle Versuchslösungen 1 % BSA (siehe 2.2.2.2). Hierfür werden 10 g BSA auf einen Liter Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHB) gegeben. Anschließend wird die Lösung etwa 30 Min. auf 37 °C erwärmt und weitere 15 Min. mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

2.3.2 Herstellung von Partikelsuspensionen

Zuerst wird 1 mg der jeweiligen Partikel (Printex 90, Titandioxid, Latex 40, GfG-Ruß) in ein unten spitz zulaufendes Reagenzglas eingewogen. Anschließend werden 5 ml KHB mit 1 % BSA zugegeben. Diese Suspension wird dann mit der Mikrospritze einer Ultraschalllanze (Leistung 40 Watt) zweimal für zwei Minuten und einer einminütigen Pause beschallt. Um thermische Effekte zu vermeiden, erfolgt die gesamte Beschallung des Reagenzglases in einer Schale mit Eiswasser.

Dann wird die Suspension durch einen Spritzenvorsatzfilter (Millipore) mit einer Porengröße von 220 nm und anschließend durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 100 nm gefiltert. Zuletzt wird die Extinktion bei 380 nm der Partikelstammlösung gemessen und zum Einsatz im Langendorff-Experiment mit der Herzperfusionslösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Abbildung 2.3.2-1 zeigt die verwendete Kalibriergerade für Printex 90.

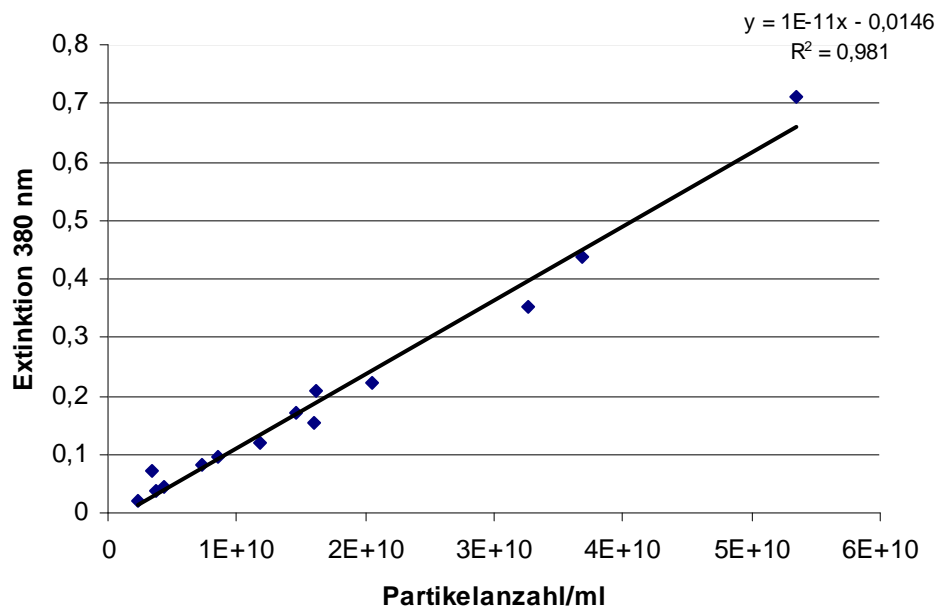


Abb. 2.3.2-1: Kalibriergerade für Printex 90

Um sicherzustellen, dass die hergestellten Partikelsuspensionen nur Partikel und Agglomerate kleiner als 100 nm enthalten, werden diese in einem HPPS Particlesizer (Malvern) gemessen. Die Vorgehensweise bei der Herstellung von Suspensionen mit den beiden verschiedenen Nanotubes und Aerosil[®]-Partikeln erfolgte ebenso. Allerdings wurden diese Suspensionen nicht filtriert.

2.3.3 Aufbau der Langendorff-Apparatur

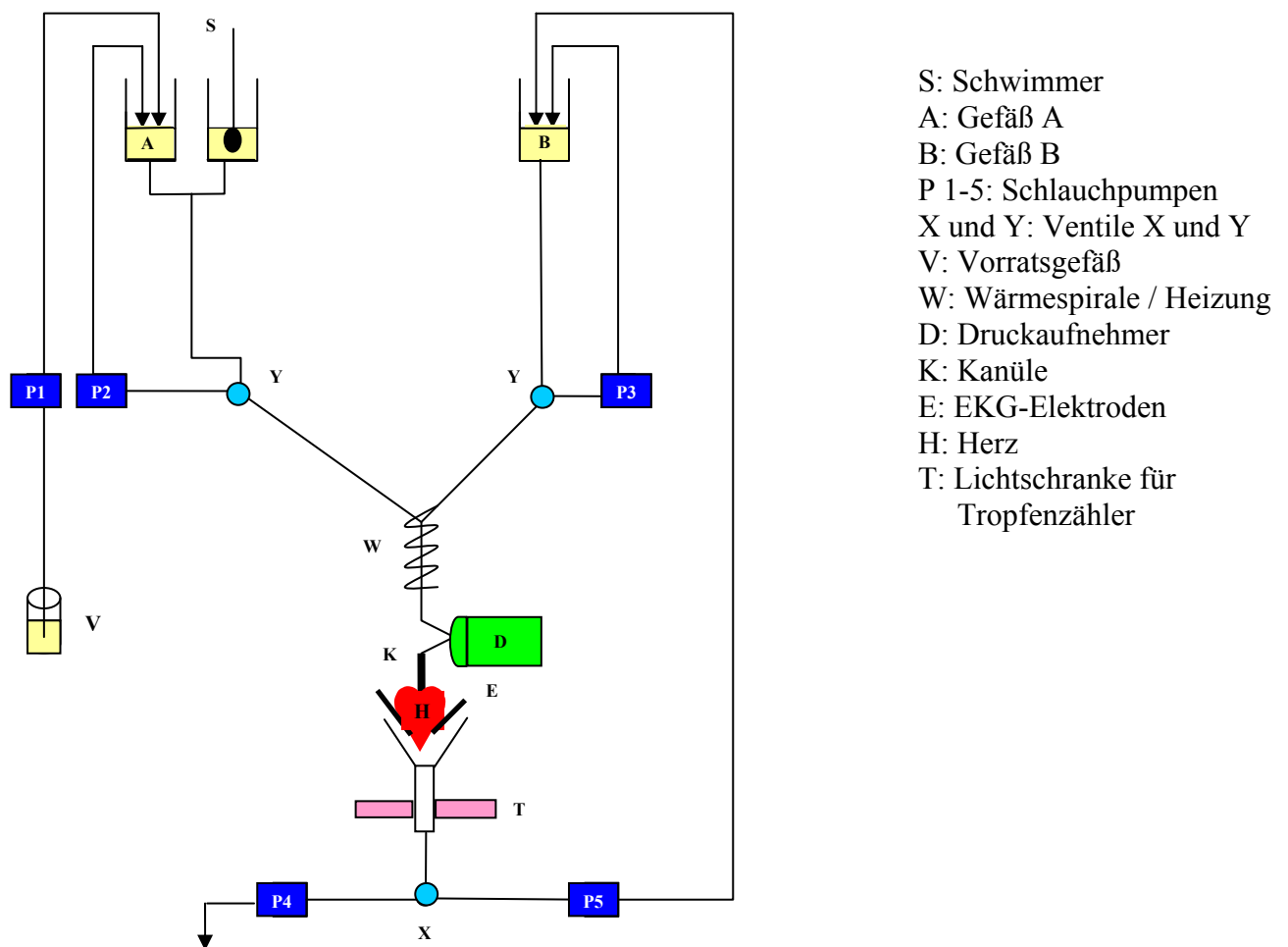


Abb. 2.3.3-1: Schematische Darstellung der Langendorff-Apparatur

In Abbildung 2.3.3-1 ist die für Versuche am isolierten Herzen verwendete Langendorff-Apparatur schematisch dargestellt. Dieses System wurde im Vergleich zum herkömmlichen Langendorff-Aufbau zum Teil modifiziert. Da zum Beispiel die eingesetzten Partikel-suspensionen nur in kleineren Mengen herstellbar waren, wurden diese nicht verworfen, sondern mussten in dem System rezykliert werden.

Das System besteht aus zwei Perfusionswegen, wobei Gefäß A die Lösung zum Auswaschen des Herzes und Gefäß B die rezyklierende und partikelhaltige Lösung enthält. Der Rücktransport der Perfusionslösung erfolgt mittels der Schlauchpumpe P5. Pumpe P4 sorgt hingegen dafür, dass das Perfusat während der Auswaschphase verworfen wird. Durch ein

Dreiwegeventil (X) wird nach der Auswaschphase auf den Perfusionskreislauf mit P5 umgeschaltet. Die Pumpen P2 und P3 sorgen dafür, dass die Lösungen jeweils in dem gerade nicht verwendeten Kreislauf A oder B zirkulieren, um zu gewährleisten, dass die Schläuche immer sauerstoffgesättigte Lösung enthalten. Pumpe P1 ist durch eine Lichtschranke gesteuert, um die Menge an Perfusionslösung in Gefäß A des Auswaschkreislaufes konstant zu halten. Zwischen den Perfusionslösungen wird durch zwei gegenläufig gekoppelte Dreiwegehähne (Y) auf Kreislauf A bzw. B umgeschaltet. Die Lösung im jeweils nicht benutzten Kreislauf wird rezirkuliert.

Die Perfusionslösung strömt durch eine Heizspirale (W) mit 37 °C und anschließend durch das an einer Kanüle (K) befestigte Herz (H). Außerdem befindet sich vor dem Herz ein Druckaufnehmer (D), der die vom Herzen ausgehenden Druckschwankungen registriert.

Die Perfusionslösung in den Vorratsgefäßen A und B wird während der gesamten Experimentdauer mit Carbogen begast, um eine Herzschädigung durch sauerstoffarme Lösung zu verhindern. Durch beide Gefäße wird das Herz mit einem artifiziellen Blutdruck von 80 cm Wassersäule (hydrostatischer Druck) perfundiert.

2.3.3.1 Nachfüllautomatik mittels Lichtschranke

Der artifizielle Blutdruck ist nur in Gefäß B konstant, da hier die Perfusionslösung zirkuliert und nicht verworfen wird. Für den Kreislauf A gilt dies hingegen nicht, da die Perfusionslösung verworfen wird. Hier ist ein Schwimmer (S) angebracht, durch den eine Lichtschranke gesteuert wird, die wiederum Pumpe P1 schaltet. P1 pumpt die Perfusionslösung aus dem Vorratsgefäß (V) in Gefäß A. Somit wird das Flüssigkeitsniveau in der Auswaschphase konstant gehalten. Durch die Schaumbildung aufgrund der Carbogenbegasung der BSA-haltigen Perfusionslösung befindet sich der Schwimmer nicht unmittelbar auf der Oberfläche der Lösung, sondern oberhalb des gewünschten Schaltpunktes. Dies ist der Grund dafür, dass der Schwimmer (S) für die Lichtschranke nicht in Gefäß A installiert ist. Er befindet sich in einem anderen nicht begasteten Gefäß, welches parallel geschaltet ist und somit als kommunizierende Röhre dient, was bedeutet, dass derselbe Flüssigkeitsspiegel besteht.

Um die Schaumbildung in den Gefäßen A und B zu minimieren, wurden hohe Vorratsgefäße benutzt und Plastiknetze angebracht, welche die Schaumblasen zum Platzen bringen.

2.3.3.2 Tropfenzähler

Nicht nur das EKG und Druckschwankungen während der Kontraktion des Herzens sind wichtige Faktoren für die Analyse der Herzfunktion, sondern auch die Menge des durchfließenden Perfusates. Deshalb befindet sich unter dem Trichter, durch den das Perfusat fließt, eine Lichtschranke (T). Bei jedem durchfließenden Tropfen verändert sich die Lichtintensität. Dies wird mittels eines Phototransistors registriert, verstärkt und über den A/D-Wandler und Powerlab Software auf einem Computer abgespeichert. Da die Lichtschranke mit einem frequenzmodulierten Infrarotsender arbeitet, ist sie kaum anfällig für andere einströmende Lichtquellen.

Durch die Lichtschranke ist es so möglich, anhand der Tropfengröße und Anzahl der Tropfen, die Menge an Durchsatz pro Zeiteinheit zu ermitteln.

2.3.3.3 Vorbereitung der Langendorff-Apparatur

Die Langendorff-Apparatur wird vor jedem Experiment gründlich mit destilliertem Wasser gespült, wobei schon während des Spülens die Heizung eingeschaltet wird. Die Perfusionslösung wird ebenfalls in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und mit Carbogen begast. Danach wird die Anlage mit der warmen und sauerstoffgesättigten Perfusionslösung mittels einer Spritze durch die Kanüle, an der das Herz später befestigt wird, befüllt. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass keine Luftblasen in die Apparatur gelangen. An den Kanten der Ventile und Schlauchverbinder entstandene Luftblasen werden durch leichtes Klopfen abgelöst. Sie steigen dann nach oben in die Vorratsgefäße A und B.

2.3.3.4 Herzpräparation

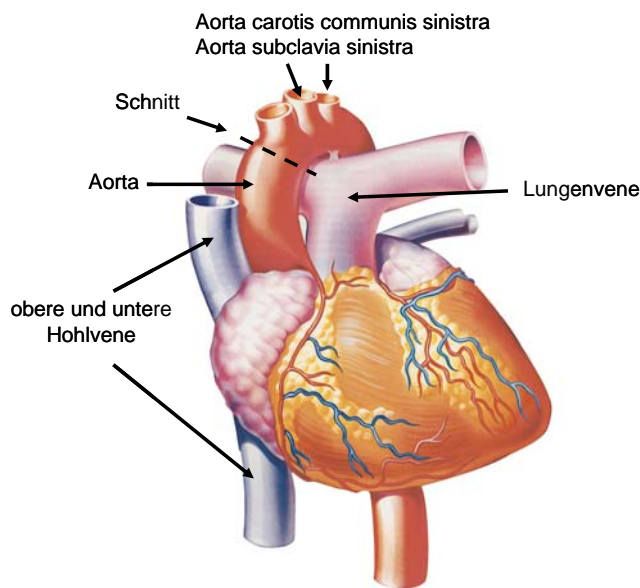


Abb. 2.3.3.4-1: Aufbau des Herzens mit eingezeichnetem Schnitt bei Präparation

[©Deutscher Apothekerverlag, 2005]

Dem Versuchstier werden etwa 30 Min. vor Versuchsbeginn 200 µl Heparin (25000 U) subkutan injiziert, um die Bildung von Blutgerinnseln während der Präparation zu verhindern. Für die Herzpräparation werden zwei 100-ml-Bechergläser und eine Präparierschale mit warmer und sauerstoffgesättigter Perfusionslösung bereitgestellt. Auch hier wird Heparin zugegeben (1 ml Heparin Stammlösung in 60 ml Perfusionslösung). Die Perfusionslösung in der Präparierschale wird während der gesamten Zeit mit Carbogen begast. Nach der Vorbereitung wird das Versuchstier mittels Genickbruch getötet, die Kehle wird durchgeschnitten und das Tier durch sanften Druck auf den Thorax leicht ausgeblutet. Nun folgen ein lateraler Schnitt unter den vorderen Extremitäten und ein vertikaler Schnitt bis zum Halsansatz, wodurch der Brustkorb geöffnet wird. Anschließend kann das Herz mit einem Schnitt entlang der Wirbelsäule von den Blutgefäßen getrennt werden. Das entnommene Herz wird unverzüglich in ein Becherglas mit warmer Perfusionslösung gegeben und wenige Sekunden sanft massiert, um das verbleibende Blut auszuspülen. Der gesamte Vorgang der Entnahme des Herzens sollte nicht länger als etwa 45 bis 60 Sekunden dauern. Nun wird das Herz kurz in dem zweiten Becherglas gespült, in die Präparierschale gelegt und die Lungenflügel und der Herzbeutel entfernt. Daraufhin wird die Aorta freipräpariert, wobei

darauf zu achten ist, dass diese nicht zu sehr gekürzt wird. Zu erkennen sind hier die beiden Abzweigungen „Aorta carotis communis sinistra“ und „Aorta subclavia sinistra“. Dort wird die Aorta durchtrennt (Abb. 2.3.3.4-1). Die nun unverzweigte Aorta wird an der Kanüle in der Langendorff-Apparatur befestigt, wobei unbedingt darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen in die Aorta bzw. das Herz gelangen. Dies kann dadurch bewerkstelligt werden, dass bereits beim Aufhängen des Herzens Perfusionslösung aus der Kanüle tropft. Während der gesamten Präparation ist im Besonderen darauf zu achten, die Vorhöfe nicht zu beschädigen. Besonders beim Anbinden der Aorta an die Kanüle besteht die Gefahr, den rechten Vorhof einzuschnüren, da die Vorhöfe asymmetrisch angeordnet sind und sich der rechte Vorhof weit oben an der Aorta befindet. Nun wird die Kanüle so gedreht, dass die Lungenvene (V. pulmonalis) nach hinten zeigt, wodurch sich von vorne gesehen die rechte Herzhälfte links und die linke Herzhälfte rechts befindet. Anschließend können die EKG-Elektroden analog zur Ableitung nach Einthoven (Abb. 1.4.6.3-1) angelegt werden. Die Elektrode für den „rechten Arm“ wird an der linken Herzhälfte knapp unter dem Vorhof angelegt, die Elektrode für den „linken Arm“ entsprechend an der rechten Herzhälfte. Die Elektrode für den „linken Fuß“ wird an der Herzspitze (Apex cordis) angebracht und die Erdungs- bzw. Referenzelektrode in dem Flüssigkeitsstrom über dem Herzen. Abbildung 2.3.3.4-2 zeigt ein isoliertes, an der Langendorff-Apparatur angebrachtes Herz eines Meerschweinchens. Zu sehen sind außerdem die Elektrodenhalterung, die EKG-Elektroden und das temperierte Wasserbad.

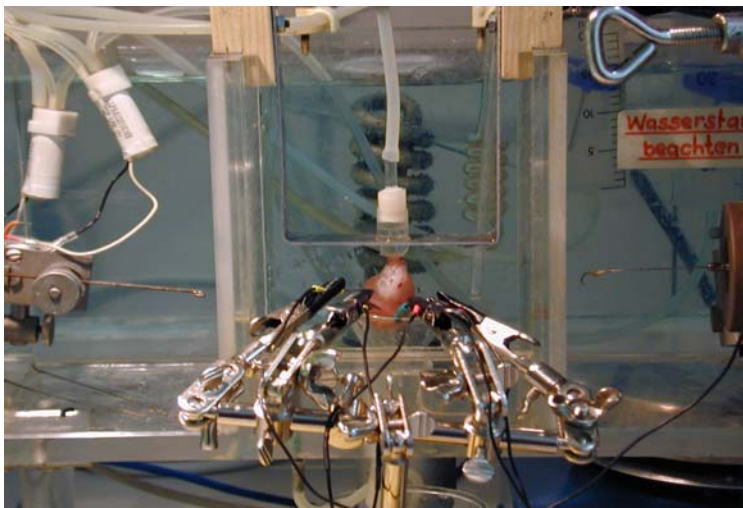


Abb. 2.3.3.4-2: Foto eines an der Langendorff-Apparatur befestigten Herzens mit EKG-Elektroden und Perfusionskanüle

2.3.4 Versuche am isolierten Langendorff-Herz

2.3.4.1 Versuchsablauf

Das Versuchsschema der Perfusion mit den verschiedenen Partikelarten ist in Abb. 2.3.4.1-1 dargestellt. Während des gesamten Versuches wird das EKG mit einem EKG-Verstärker Typ EGM Module Typ 701 (Hugo Sachs) aufgezeichnet, mittels Software und ADC-Board (AD Instruments) digitalisiert, am Computer online dargestellt und abgespeichert.

Zu Beginn eines jeden Experiments wird das Herz zuerst eine Stunde lang mit KHB perfundiert, um Blutreste und während der Präparation entstandene Stresshormone auszuwaschen (KHB auswaschen). Das Perfusat wird in diesem Zeitraum verworfen (A). Anschließend wird auf den zweiten Kreislauf (B) umgeschaltet und das Herz für eine weitere Stunde mit KHB perfundiert, wobei die Perfusionslösung zirkuliert (Kontrolle KHB). Nachdem sich eine stabile Herzfrequenz eingestellt hat, wird die entsprechende Partikelsuspension zugegeben und eine Stunde lang zirkuliert (UFP 1). Danach erfolgt die Verdopplung der Partikelkonzentration während der nächsten Stunde (UFP 2). Um die Partikel wieder auszuwaschen, erfolgt für 30 Minuten die Perfusion mit KHB, wobei das Perfusat wieder verworfen wird (A). Zuletzt wird das Herz weitere 30 Minuten mit KHB ohne Partikellösung perfundiert (B).

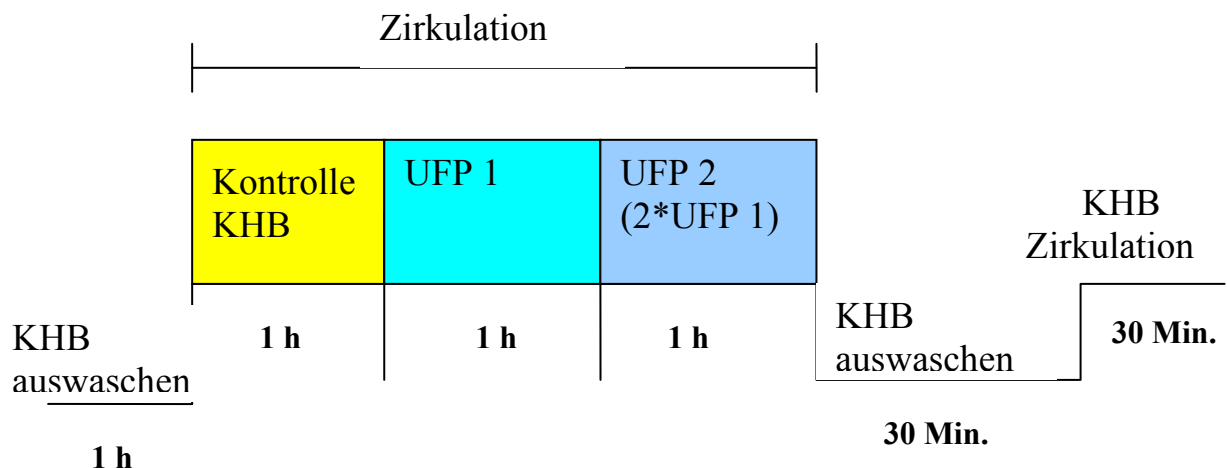


Abb. 2.3.4.1-1: Versuchsablauf eines Langendorff-Experiments mit der Applikation von UFP

2.3.4.2 Versuche am Langendorff-Herz mit β -Blocker Metoprolol

Um die Wirkung eines β -Blockers auf die Herzfrequenz des isolierte Herzens zu untersuchen, wurde der β -Blocker Metoprolol verwendet. Der Einsatz im Versuchsschema ist in Abb. 2.3.4.2-1 und Abb. 2.3.4.2-2 zu sehen.

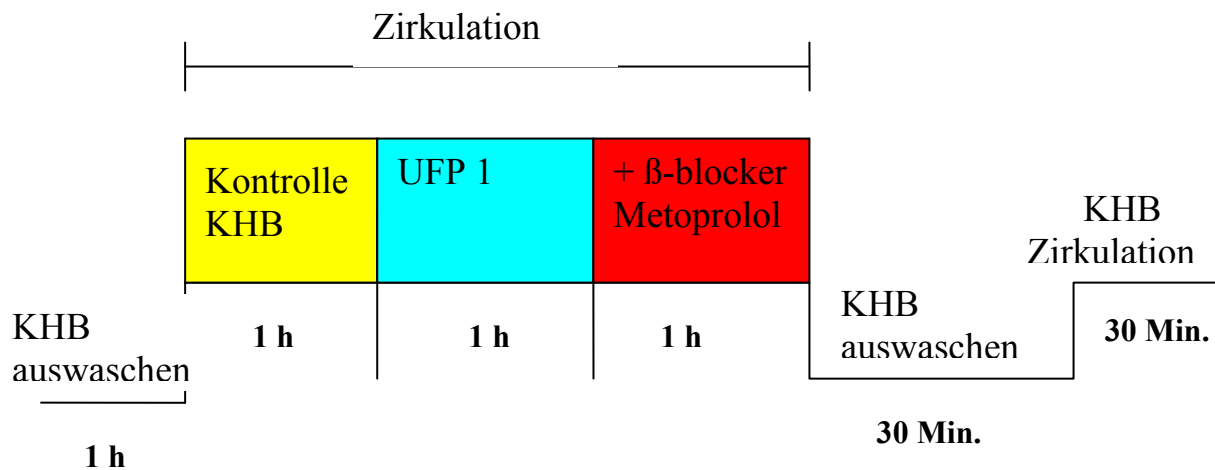


Abb. 2.3.4.2-1: Versuchsablauf eines Langendorff-Experiments mit der Applikation von UFP und β -Blocker Metoprolol

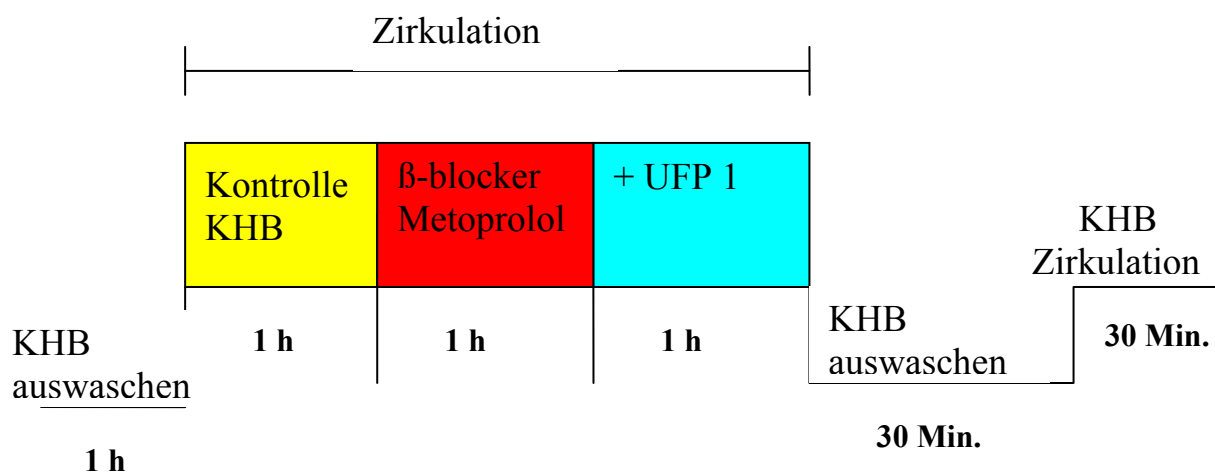


Abb. 2.3.4.2-2: Versuchsablauf eines Langendorff-Experiments mit der Applikation von β -Blocker Metoprolol und UFP

2.3.4.3 Versuche am Langendorff-Herz mit Reserpin behandelten Versuchstieren

Für die Vorbehandlung der Meerschweinchen mit Reserpin wurde zuerst eine Stammlösung mit 50 mg Reserpin in 25 ml 5 %iger Ascorbinsäure vorbereitet. Die Tiere wurden gewogen und anschließend wurde die entsprechende Menge von 5 mg/kg Körpergewicht subkutan in den Bauch injiziert. Die Entleerung der Noradrenalin-Speicher des Tieres erfolgt nach 16 h für ca. 48 h, der Einsatz der Herzen in Langendorff-Experimente nach 12- 16 h.

2.3.5 Zellkultur

2.3.5.1 Anzucht und Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Zellen benötigen folgende sterilfiltrierte Nährmedien zur Kultivierung:

Neuro2A: Dulbecco's Medium
 1 % Antibiotic antimycotic solution
 10 % FBS

PC12: Dulbecco's Medium
 1 % Antibiotic antimycotic solution
 5 % FBS
 10 % Pferdeserum

Zur Umsetzung der Zellen wird der Überstand des Mediums abgenommen und verworfen. Dann wird die Zellkulturflasche mit 1 - 2 ml PBS gespült und dieses verworfen. Um die Zellen von der Flasche abzulösen, werden 0,8 ml Trypsin zugegeben. Nun wird die Flasche mit Nährmedium gespült, die Zellen resuspendiert und das Medium auf neue Zellkulturflaschen bzw. Glasplättchen verteilt. Die Zellkulturflaschen und Glasplättchen werden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

PC12-Zellen müssen auf Poly-D-Lysin-beschichteten Flaschen bzw. Glasplättchen ausgebracht werden, um eine Anhaftung der Zellen sicherzustellen.

2.3.5.2 Beladung der Zellen

Zur Messung des freien intrazellulären Calciums mittels Fluoreszenzmikroskopie werden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gefärbt. Hierzu werden die mit den Zellen bewachsenen Glasplättchen in eine Schale mit 3 ml KHB und 30 μ l Fura-2 (1 mM) gelegt und für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen zwei Mal mit KHB gewaschen.

Wegen der Photoinstabilität von Fura-2 wird die Beladung im Dunkeln durchgeführt.

2.3.5.3 Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie zur Messung des freien intrazellulären Calciums

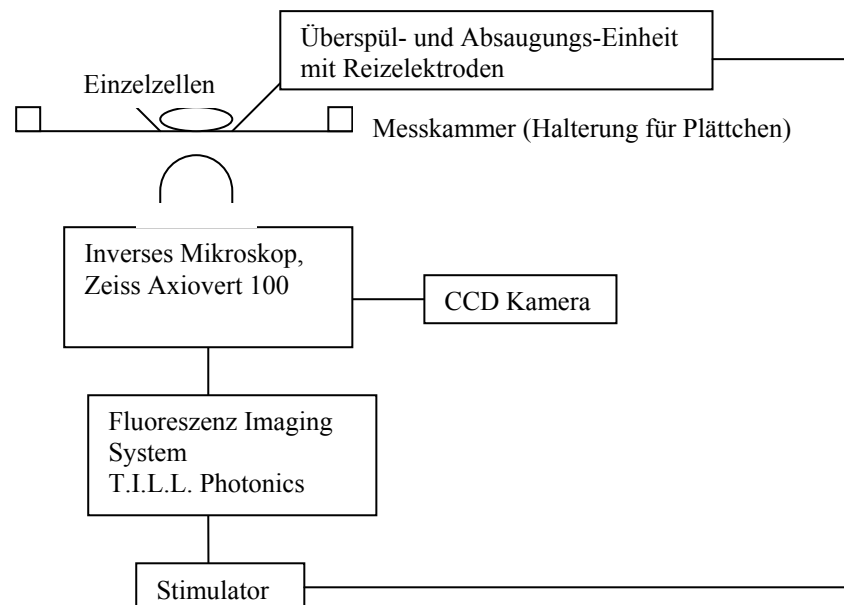


Abb. 2.3.5.3-1: Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 2.3.5.3-1 zeigt den Aufbau der Anlage, mit der die Messungen des freien intrazellulären Calciums in Einzelzellen durchgeführt wurden. Hierbei ist es möglich, mittels schneller und sehr sensibler Fluoreszenz-Detektion kleinste Veränderungen der Konzentration des freien intrazellulären Calciums sichtbar zu machen. Als Mikroskop für die Fluoreszenzmikroskopie dient das inverse Mikroskop Zeiss Axiovert 100, welches auf einem erschütterungsreduzierten Tisch platziert ist. Die zu untersuchenden Zellen werden 40-fach vergrößert. Auf dem beweglichen Objektisch befindet sich die Halterung der mit Zellen bewachsenen Glasplättchen (Messkammer). Mit der Überspülapparatur können die Zellen mit verschiedenen Versuchslösungen überspült und diese wieder abgesaugt werden.

Mit elektrischen Miniaturventilen kann alternierend zwischen verschiedenen Lösungen umgeschaltet werden. Die Überströmungsgeschwindigkeit wird mittels der Drehzahl der Pumpen reguliert. Nicht verwendete Lösungen werden in mit Carbogen begaste Vorratsbehälter zurückgepumpt. Die Halterung der Zufuhr- und Absaugkanülen wird auf 37 °C geheizt, wodurch die Versuchslösung erwärmt wird. Die Überspülungsvorrichtung wird so eingestellt, dass sich die zu untersuchenden Zellen zwischen den Enden der Zufuhr- und Absaugkanülen befinden. Die für die Messung benötigten Anregungswellenlängen werden abwechselnd durch einen Monochromator, der innerhalb 4 ms zwischen den gewählten Wellenlängen umschaltet, aus dem Licht einer Quecksilber-Hochdrucklampe erzeugt und über einen Lichtleiter in das Mikroskop geleitet. An einem Farbteiler wird das Licht reflektiert und gelangt durch das Objektiv zu den Zellen und regt dort die Fluoreszenz an. Für das emittierte Licht jedoch ist der Farbteiler durchlässig und dieses gelangt in den normalen Strahlengang des Mikroskops. Das Verhältnis der Emissionsintensitäten ($R_{340/380}$) ist das Maß für die freie intrazelluläre Calciumkonzentration. Die Software TILLvisION v 3.3. für die Messungen stammt von T.I.L.L. Photonics, Martinsried.

2.3.5.4 Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

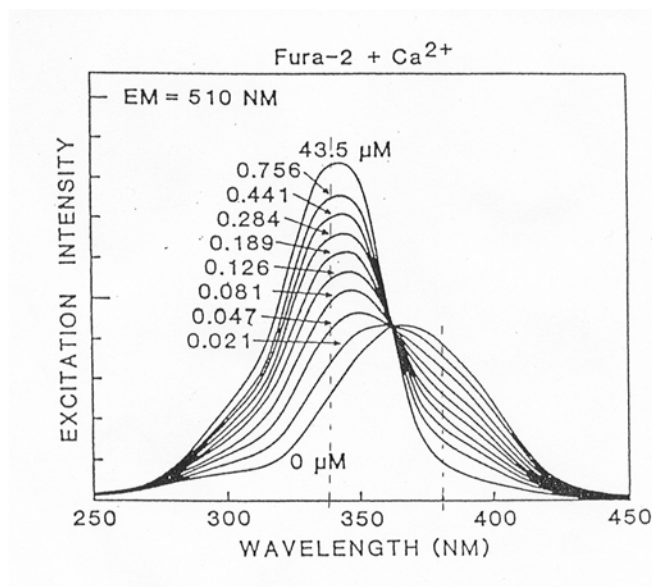


Abb. 2.3.5.4-1: Anregungsspektrum von Fura-2 für verschiedene Ca²⁺-Konzentrationen.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität, gemessen beim Emissionsmaximum 510 nm für Anregungswellenlängen jeweils im Bereich zwischen 250 nm und 450 nm. Bei 340-nm-Anregung nimmt die Fluoreszenz mit steigender Ca²⁺-Konzentration zu, bei 380-nm-Anregung dagegen nimmt diese mit steigender Ca²⁺-Konzentration ab.

Mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen, wie Fura-2, lässt sich die freie intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration bestimmen. Der Farbstoff fungiert als Chelatbildner, der die Calciumionen an einen Chelatkomplex bindet. Essentiell ist hierbei, dass dieser Vorgang spezifisch abläuft, quantitativ bestimmt werden kann und der Farbstoff die Zelle während der Versuchszeit nicht schädigt. Bei Fura-2, einem so genannten „dual excitation, single emission“ Farbstoff (Abbildung 2.3.5.4-1) wird die Emissionsintensität bei den optimalen Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm während einer Änderung der Calciumkonzentration gegenläufig verändert. Das Verhältnis der Emissionsintensitäten ist ein Maß für das freie intrazelluläre Calcium. Es ist unabhängig von der Anzahl der Furamoleküle in der Zelle und dem Ausbleichen des Farbstoffes. Da das für die Messung benötigte Fura-2-Salz nicht zellmembranpermeabel ist, wird Fura-2 AM, ein an einen Acetmethoxyester (AM) gebundenes Fura-2 verwendet, das zellmembranpermeabel ist. Der Ester wird dann in der Zelle abgespalten.

2.3.6 Versuche mit isolierten Herzzellen (Myocyten)

2.3.6.1 Myocyten-Gewinnung aus Meerschweinchen-Herzen

Lösungen:

Lösung A (500 ml):
0,54 g Glucose
5 ml Hepes-Na
783 µl von 3 M KCl-Lösung
6 ml von 0,1 M KH₂PO₄-Lösung
12,5 ml von 0,1 M MgSO₄-Lösung
21 ml von 3 M NaCl-Lösung
Der pH-Wert von Lösung A wird auf 7,3 eingestellt.

Lösung B:
400 mg BSA
400 ml Lösung A
88 mg Pyruvat

Spüllösung:
250 ml Lösung B
9,5 mg EGTA (0,1 mM)
Der pH-Wert der Spüllösung wird auf 7,4 eingestellt.

Waschlösung:	25 µl von 50 mM CaCl ₂ -Lösung*
	25 ml Lösung B
Enzymlösung:	37,5 µl von 50 mM CaCl ₂ -Lösung*
	37,5 mg Collagenase
	60 ml Lösung B
	30 mg Protease
	6 mg Trypsin

* Die CaCl₂-Lösung wird jeweils erst kurz vor der Herzperfusion mit der Enzymlösung zugegeben.

Die Zellisolierung erfolgt nach Abwandlung einer Methode zur Isolierung Ca²⁺-toleranter ventrikulärer Myocyten des Meerschweinchens [Bendukidze *et al.*, 1985]. Zum enzymatischen Verdau wird hierbei statt der von Bendukidze *et al.* verwendeten Pronase ein Enzymgemisch aus Collagenase, Protease und Trypsin eingesetzt.

Der Versuchsablauf ist folgendermaßen:

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts, 8 - 10 Wochen alt und zwischen 250 und 350 g schwer, werden durch zervikale Dislokation getötet [Sutherland *et al.*, 1987]. Nach Öffnung des Brustkorbes wird das Herz entnommen, Herzbeutel und anhaftendes Fett- und Bindegewebe entfernt. Die retrograde Perfusion des Herzens nach Langendorff erfolgt nach Fixierung der Aorta an der Kanüle der Perfusionsapparatur bei konstanter Temperatur.

Zuerst wird das Herz mit sauerstoffgesättigter Spüllösung ca. 8 Minuten perfundiert. Dann erfolgt das Umschalten auf die Enzymlösung. Nach ca. 2 - 3 Minuten hat ein sichtbarer enzymatischer Verdau stattgefunden. Nun wird das Herz von der Apparatur gelöst und die Vorhöfe entfernt. Die Ventrikel werden mit Skalpell zerkleinert und wieder in der Enzymlösung aufgenommen. Die erhaltene Zellsuspension wird mit Hilfe eines Kunststoffsiebes (Maschenweite 500 µm) von größeren Gewebestückchen befreit. Nach Aufteilung der Suspension auf vier Falcon-Zentrifugenröhrchen wird die Zellsuspension bei 500 rpm für 5 Min. abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen, je 2,5 ml der Waschlösung zugegeben und nochmals bei 500 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Nach erneutem Abnehmen des Überstandes und Zugabe von je 2,5 ml der Waschlösung erfolgt die schritt-

weise Calcium-Erhöpfung bis auf 1,2 mM. Nach der letzten Zentrifugation (500 rpm / 5 Min.) und Absaugen des Überstandes werden 2,5 ml DMEM-Zellkulturmedium mit 100 µl FCS auf jedes Zellpellet gegeben. Die resuspendierten Myocyten werden in kleine Petrischälchen gegeben und für eine Stunde im Dunkeln mit Carbogen begast. Danach erfolgt die Umsetzung der Zellen in ein neues Medium, d.h. das Nährmedium wird vorsichtig abgenommen und 1,5 ml KHB zugegeben. Nach einer weiteren Stunde der Inkubation im Dunkeln können die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen werden.

2.3.6.2 Beladung der Myocyten für Fluoreszenzmikroskopie

Die Beladung der Myocyten erfolgte mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fura-2. Hierzu gibt man 10 µl des Farbstoffes (1 mM) in ein Schälchen mit den in KHB ruhenden Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wird der Überstand aus den Schälchen abgenommen und durch 2,5 ml warmes KHB ersetzt. Nach weiteren 20 Minuten wird das Zellmedium nochmals ausgetauscht, bevor die Myocyten zur Messung eingesetzt werden.

Auch hier erfolgt die Beladung wegen der Photoinstabilität von Fura-2 im Dunkeln.

Die Zellen werden mittels der Überspüleinheit mit etwa 400 µl/min überspült und mit Rechteckimpulsen von etwa 3 V und 1 ms Dauer stimuliert. Die Stimulationspulse werden mit Reizelektroden in die Messkammer geleitet.

3 Ergebnisse

Mittels des sog. Langendorff-Systems können isolierte Herzen über die Aorta retrograd, d.h. entgegen der physiologischen Flussrichtung des Blutes mit speziellen Nährlösungen durchströmt und einige Stunden am Leben erhalten werden. So lassen sich verschiedene Studien über die Wirkung von Partikeln auf das isolierte Herz durchführen.

Die in dieser Arbeit verwendete Langendorff-Apparatur für Studien an isolierten Herzen von Meerschweinchen wurde von Roman Radykewicz aufgebaut. Ziel war es, bestimmte ultrafeine Partikel (Printex 90, Titandioxid und Siliziumdioxid) auf deren Effekte zu untersuchen. Hierzu wurden umweltrelevante Konzentrationen der jeweiligen UFP appliziert. Erste Versuche zeigten, dass die Partikel konzentrations- und materialabhängig zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und der Entstehung von Arrhythmien führen [Radykewicz, 2007]. Darauf aufbauend erfolgte in dieser vorliegenden Arbeit die weitere Etablierung des Langendorff-Systems als geeignetes Modell zur Partikeltoxizitätsanalyse.

3.1 Vergleich des Elektrokardiogramms von lebenden Tieren und isolierten Herzen

Um zu zeigen, dass das Elektrokardiogramm (EKG) eines isolierten, im Langendorff-System eingesetzten Meerschweinchenherzens mit dem EKG eines lebenden Tieres übereinstimmt und durch die Herzentnahme und –präparation nicht verändert wird, wurde zuerst das EKG an lebenden Tieren abgeleitet. Hierfür wurden an allen vier Extremitäten des Tieres selbstklebende Elektroden befestigt, diese wiederum an einen EKG-Verstärker angeschlossen, das EKG auf einem Oszillator sichtbar gemacht, digitalisiert, mit einem PC erfasst und gespeichert. Damit das EKG der Person, die das Tier während der Aufnahme festhält, nicht mit dem EKG des Tieres interferiert und um Störsignale so gering wie möglich zu halten, wurde das Tier mit Gummihandschuhen gehalten.

In Abb. 3.1-1 ist die Versuchsanordnung dargestellt.



Abb. 3.1-1: Aufzeichnung des Elektrokardiogramms eines Meerschweinchens

Anschließend wurde das Tier getötet und das Herz entnommen, im Langendorff-System perfundiert und das EKG registriert. So konnten die Elektrokardiogramme desselben Tieres direkt miteinander verglichen werden. Hier zeigte sich sowohl in der Frequenz als auch in der Form der EKGs eine gute Übereinstimmung.

Des Weiteren wurde das EKG eines Menschen mit der identischen Apparatur aufgezeichnet. Hierzu wurden die Elektroden am rechten Arm und linken Fuß (Ableitung II nach Einthoven) angebracht. Die Form dieses EKGs stimmt sehr gut mit der des Meerschweinchens überein. Zu berücksichtigen ist, dass die einzelnen Parameter des EKGs eines Menschen sich von denen des Meerschweinchens unterscheiden (Tabelle 3.1-1). Zum Beispiel ist die Herzfrequenz des Menschen um etwa zwei Drittel geringer als die des Meerschweinchens. Aufgrund der deutlich höheren Herzfrequenz des Meerschweinchens sind auch die anderen Parameter kürzer.

Zum Vergleich der EKG-Form wurden die EKGs mit identischem R-Zacken-Abstand dargestellt (Abb. 3.1-2).

EKG-Parameter	Mensch	Meerschweinchen
Herzfrequenz	80 Schläge/min	240 Schläge/min
P-Welle	0,05 - 0,1 Sekunden	$\leq 0,02$ Sekunden
PQ-Intervall	0,13 - 0,2 Sekunden	$\leq 0,07$ Sekunden
QT-Intervall	0,18 - 0,52 Sekunden	$\leq 0,14$ Sekunden
QRS-Dauer	0,05 - 0,1 Sekunden	$\leq 0,03$ Sekunden

Tabelle 3.1-1: Vergleich der EKG-Parameter von Mensch und Meerschweinchen

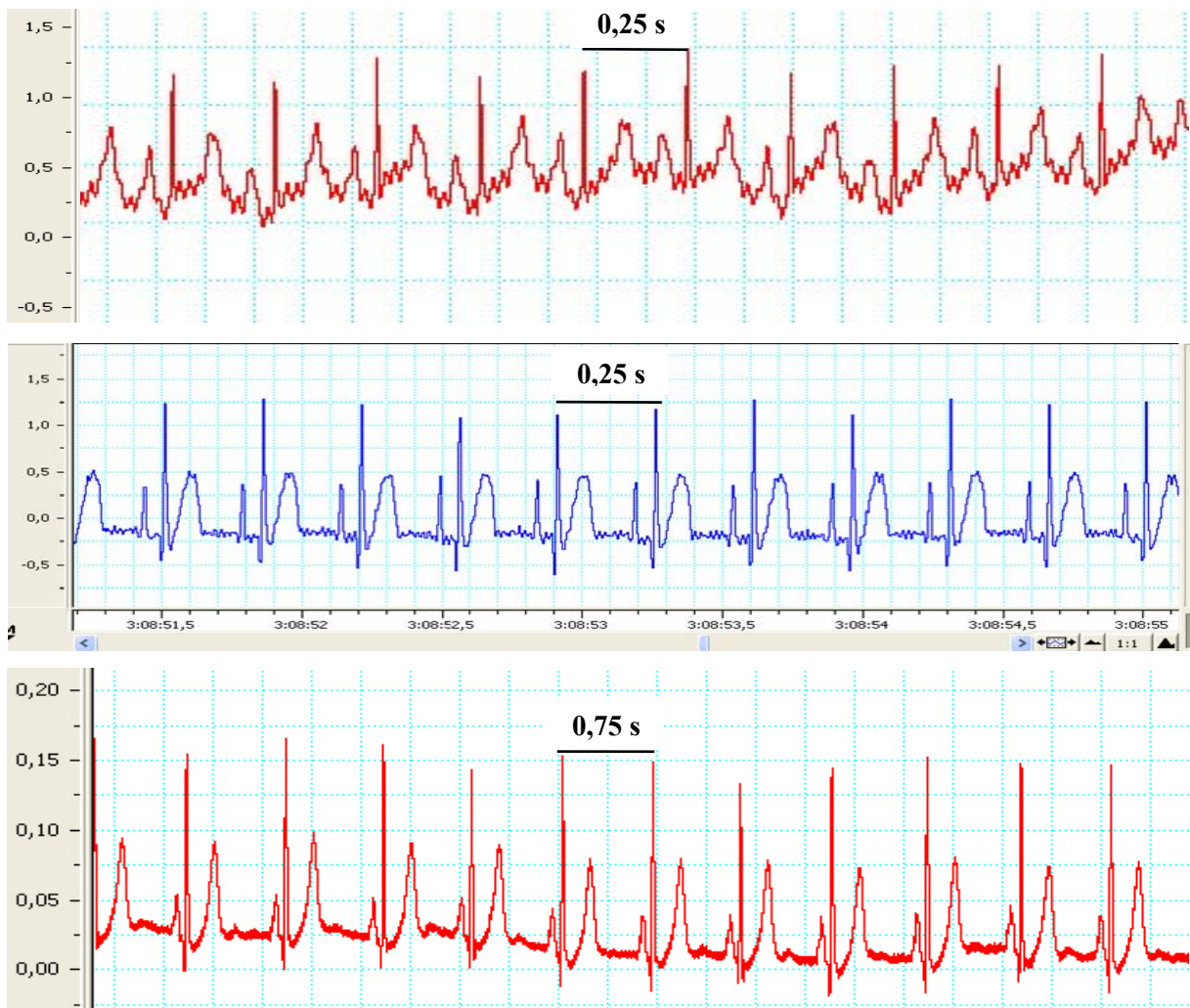


Abb. 3.1-2: Vergleich des Elektrokardiogramms eines lebenden Tieres (oben) mit dem EKG des isolierten Herz desselben Tieres (Mitte). EKG eines Menschen (unten); x-Achse auf gleichen R-Zacken-Abstand komprimiert

3.2 Rolle von Katecholaminen für den Partikel-induzierten Anstieg der Herzfrequenz

Wie bereits erwähnt, hat die Applikation von UFP eine Erhöhung der Schlagfrequenz isolierter Herzen zur Folge, dessen Ursache vorerst ungeklärt blieb.

Unsere Hypothese war, dass die Frequenzerhöhung durch die Ausschüttung von Katecholaminen aus den Nervenendungen des Herzens verursacht wird. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden zunächst Aliquota der Perfusionslösung vor und nach Partikelzugabe auf Katecholamine untersucht.

Die Probenvorbereitung [Smedes *et al.*, 1982; Bauch *et al.*, 1986] wurde auf den Mikromaßstab modifiziert und die chromatographische Trennung auf eine 3- μ m-C18-Säule optimiert [Ehrenreich *et al.*, 1997]. Die Auftrennung der extrahierten Proben erfolgt mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) mit anschließender amperometrischer Detektion. Für die amperometrische Detektion wird mit Hilfe einer Standard-Potentialreihe das optimale Arbeitspotential ermittelt (i.d.R. 550 mV). Mit einer Verdünnungsreihe aus Katecholamin-Standardlösung wird eine lineare Kalibrierfunktion erstellt, und aus dem Vergleich der Peakflächen von Standardsubstanz und Probe die Katecholaminkonzentration ermittelt. Die Wiederfindung des zugesetzten internen Standards DHBA schwankt zwischen 94 und 103 %. Die HPLC-Analyse wurde vom Labor für Stressmonitoring in Göttingen durchgeführt.

Bei Versuchen mit Partikeln wurden Aliquota zur Bestimmung des Noradrenaliningehalts am Ende der Zirkulation, d.h. vor Applikation von UFP (TiO_2), und nach 2 Stunden Partikel-Behandlung entnommen. Bei deren Analyse war ein Anstieg im Noradrenaliningehalt (pg/ml Perfusionslösung) zu beobachten. Der Mittelwert des Noradrenaliningehalts aus 7 Experimenten mit TiO_2 ($4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) vor Partikelapplikation lag bei 14,31 +/- 0,63 pg/ml und nach 2 Stunden bei 24,23 +/- 1,62 pg/ml. Der Anstieg des Noradrenaliningehalts war signifikant und betrug 69 % ($n = 7$; $p < 0,002$) (Abb. 3.2-1).

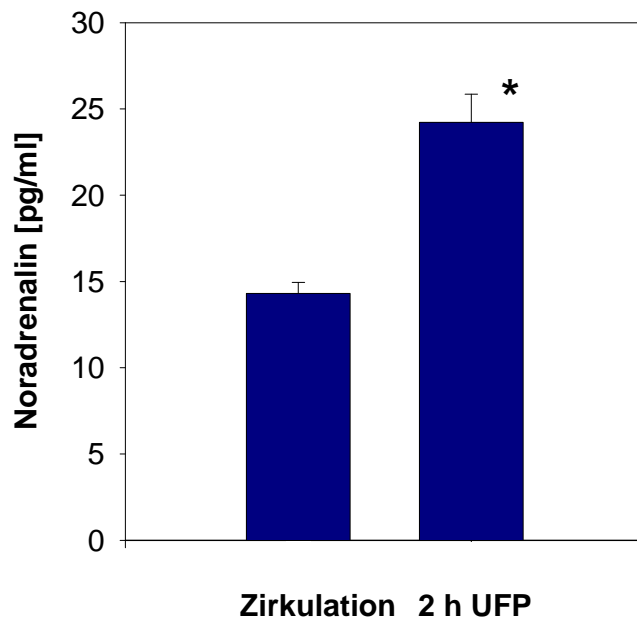


Abb. 3.2-1: Anstieg des Noradrenalinergehalts bei Versuchen mit TiO_2 ($4 \cdot 10^9$ Partikel/ml)
(Mittelwert \pm SEM; $n = 7$; * $p < 0,002$)

Es konnte in der Perfusionslösung zwei Stunden nach Partikelzugabe vor allem Noradrenalin nachgewiesen werden. Aufgrund der daraus abgeleiteten Hypothese wurden weitere Experimente mit pharmakologischer Hemmung der adrenergen Reaktion durch β -Blocker und Reserpin an isolierten Herzen durchgeführt. Falls diese die Katecholaminwirkung hemmen sollten, würde dies die partikelvermittelte Noradrenalin-Ausschüttung bestätigen.

3.2.1 Versuche mit β -Blocker Metoprolol

Um die Hypothese der partikelvermittelten Noradrenalin-Ausschüttung zu verifizieren, wurden verschiedene Versuche mit dem β -Blocker Metoprolol durchgeführt. β -Blocker hemmen die aktivierende Wirkung von Noradrenalin, wodurch der stimulierende Effekt auf die Zielorgane, vornehmlich das Herz gedämpft wird. Metoprolol blockiert die β_1 -Adrenozeptoren, wodurch Noradrenalin dort nicht mehr binden kann. Zuerst wurde in Vorversuchen die optimale Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ Metoprolol für Versuche an isolierten Herzen ermittelt. Wenn Metoprolol zugegeben wurde, war eine schnelle und signifikante Erniedrigung der Herzfrequenz von 11 % ($n = 15$) (Abb. 3.2.1-1) zu beobachten.

Bei den Versuchen mit Metoprolol und UFP am isolierten Langendorff-Herz wurde wie folgt verfahren: Die Herzen wurden für eine Stunde mit Printex 90 ($8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) bzw. TiO_2 ($4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) durchströmt. Diese Konzentrationen führen innerhalb einer Stunde zu einem Herzfrequenzanstieg von ca. 10 %. Bei Zugabe von Metoprolol nach einer Stunde erfolgte eine schnelle Abnahme der Herzfrequenz (Abb. 3.2.1-2 links).

Bei Zugabe von Metoprolol vor der Partikelzugabe konnte nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Herzfrequenz durch UFP beobachtet werden (Abb. 3.2.1-2 rechts). Durch die Blockade der Rezeptoren kann das während der Zirkulation in der Perfusionslösung befindliche und durch UFP vermehrt ausgeschüttete Noradrenalin nicht mehr zu einer Herzfrequenzerhöhung führen.

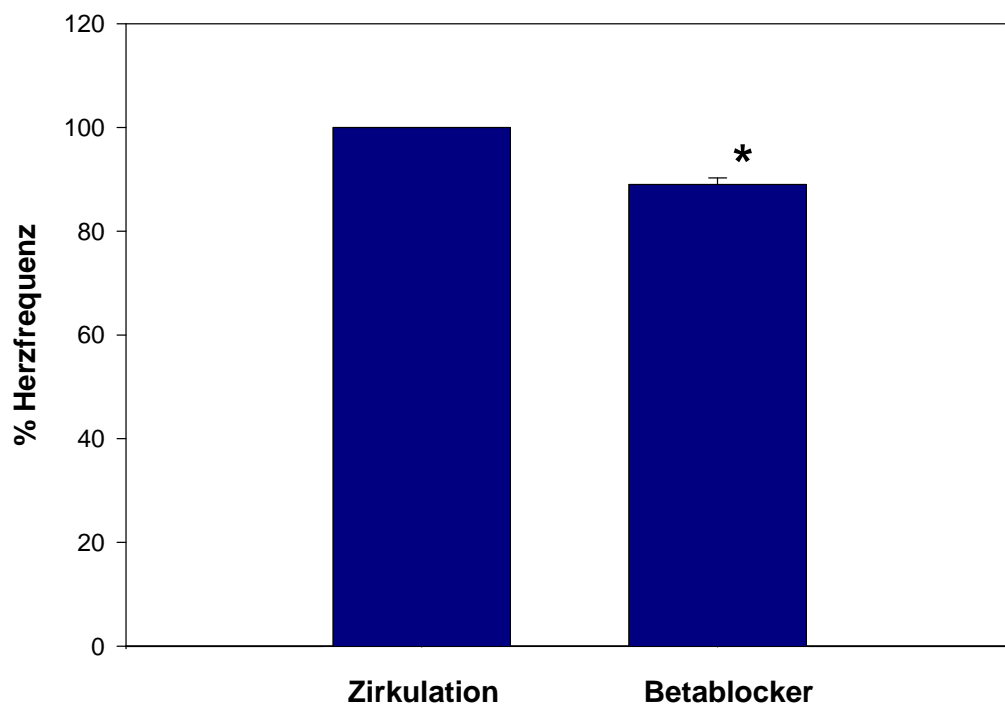


Abb. 3.2.1-1: Abnahme der Herzfrequenz nach Metoprolol-Zugabe (Mittelwert +/- SEM; n = 15; * p < 0,0001)

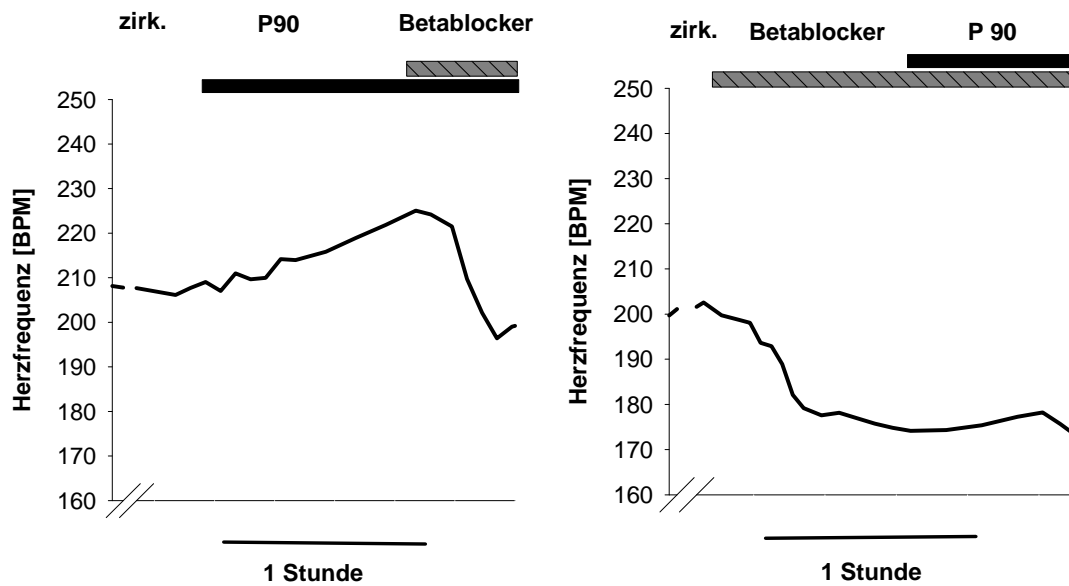


Abb.3.2.1-2: Typische Langendorff-Versuche mit Metoprolol. Zugabe von Metoprolol nach UFP (P90; $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) (links); Zugabe von Metoprolol vor UFP (P90; $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) (rechts)

In Kontrolleexperimenten blieb die Herzfrequenz über mehrere Stunden konstant (Abb. 3.2.1-3). In einem dieser Experimente wurde der Noradrenalingehalt bestimmt. Nach einer Stunde betrug der Noradrenalingehalt 14,9 pg/ml und nach drei Stunden 11,3 pg/ml.

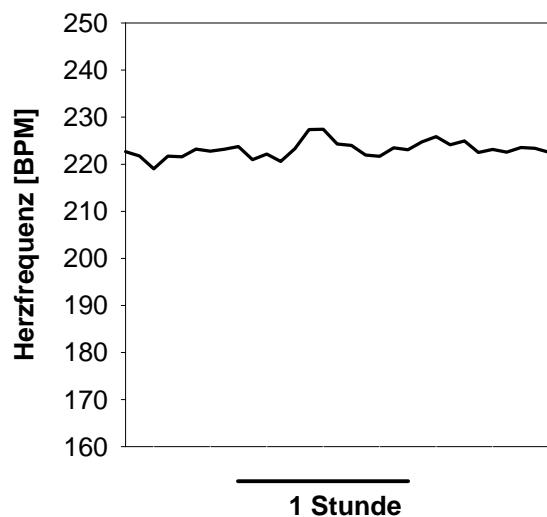


Abb. 3.2.1-3: Typischer Experimentverlauf bei einem unbehandelten Langendorff-Herz

3.2.2 Vergleich der Herzfrequenz mit der koronaren Durchflussrate im Langendorff-System

Ein wichtiger Parameter der Herzfunktion ist die Menge des durch das Herz strömenden Perfusates. Um diese Menge bestimmen zu können, wurde die Tropfrate mittels einer Lichtschranke über einen Phototransistor während des gesamten Experiments registriert.

Die Tropfrate korrelierte bei unseren Experimenten immer mit der Herzfrequenz. Dies ist ein wichtiges Indiz dafür, dass im Herzen keine lokalen Ischämien während der Experimente auftraten. In Abb. 3.2.2-1 ist ein typischer Versuch mit hoher TiO_2 -Konzentration ($2 \cdot 10^9$ Partikel/ml und $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) dargestellt. Der Einfluss des β -Blockers Metoprolol auf die Herzfrequenz und Durchflussrate ist in Abb. 3.2.2-2 gezeigt. Alle Abbildungen zeigen den Verlauf nach einer Stunde, das heißt zu Beginn der Zirkulation.

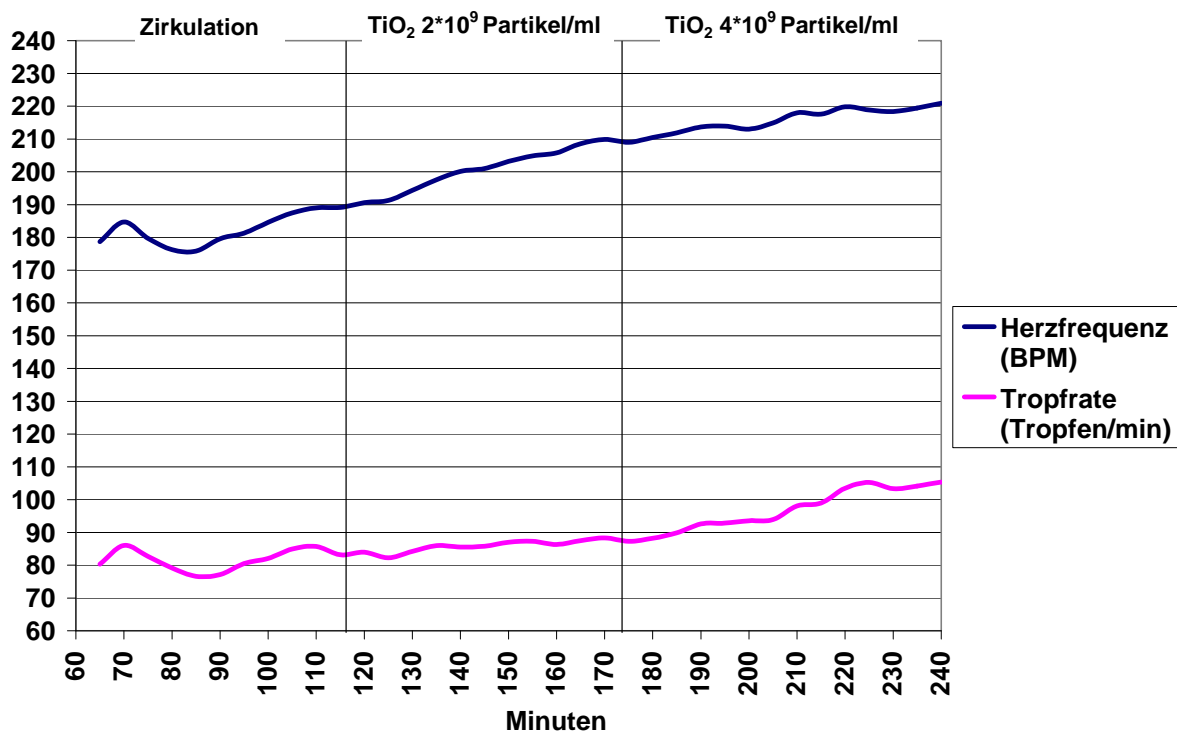


Abb.3.2.2-1: Korrelation der Herzfrequenz mit dem koronaren Fluss während Langendorff-Experimenten mit höchster TiO_2 -Konzentration ($2 \cdot 10^9$ Partikel/ml und $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml)

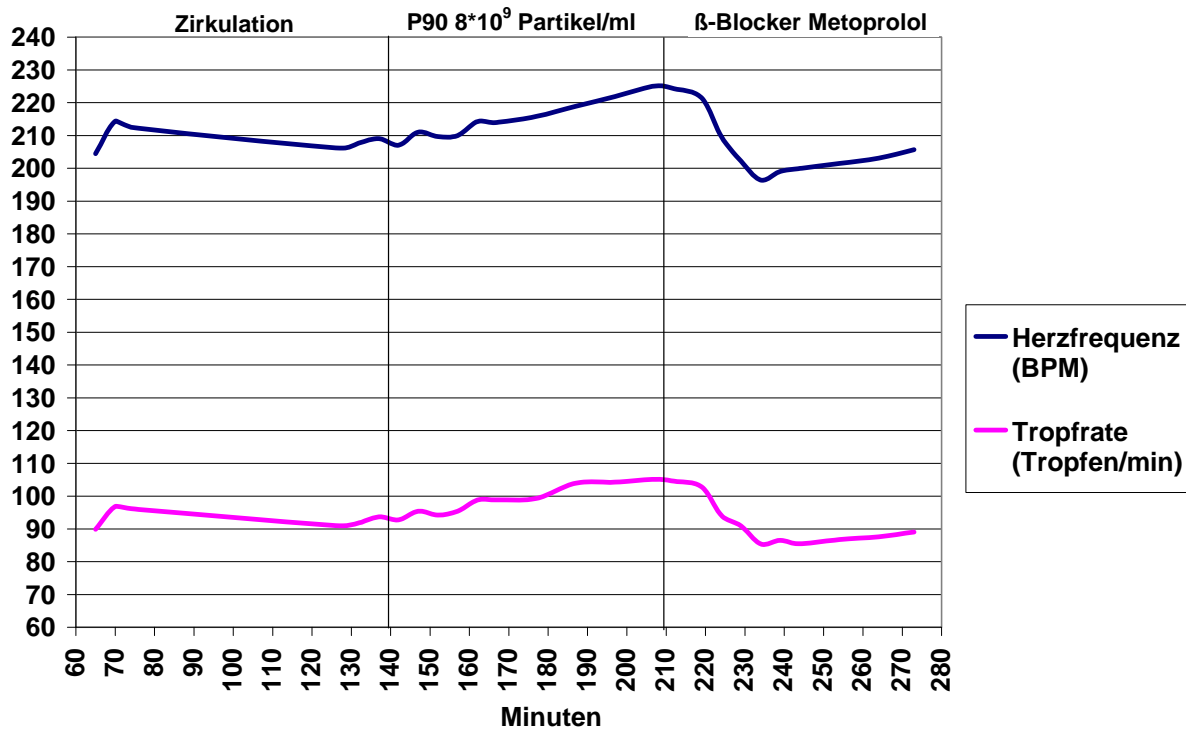


Abb. 3.2.2-2: Korrelation der Herzfrequenz mit dem koronaren Fluss während Langendorff-Experimenten mit höchster P90-Konzentration ($8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) und β -Blocker Metoprolol

Zur Kontrolle des Zusammenhangs von Herzfrequenz und Durchflussrate wurde Histamin, eine andere positiv inotrop und chronotrop wirkende Substanz eingesetzt.

Histamin besitzt über eine Aktivierung von H_2 -Rezeptoren eine positiv inotrope (die Schlagkraft steigernde) und positiv chronotrope (die Schlagfrequenz steigernde) Wirkung. Hierzu wurden in unterschiedlichen Experimenten verschiedene Dosen (250 nM und 1 μ M Endkonzentration) Histamin appliziert. Nach der Applikation von Histamin war sowohl eine deutliche Frequenzsteigerung als auch eine Erhöhung des Koronarflusses zu sehen. In Abb. 3.2.2-3 sind typische Experimentverläufe abgebildet.

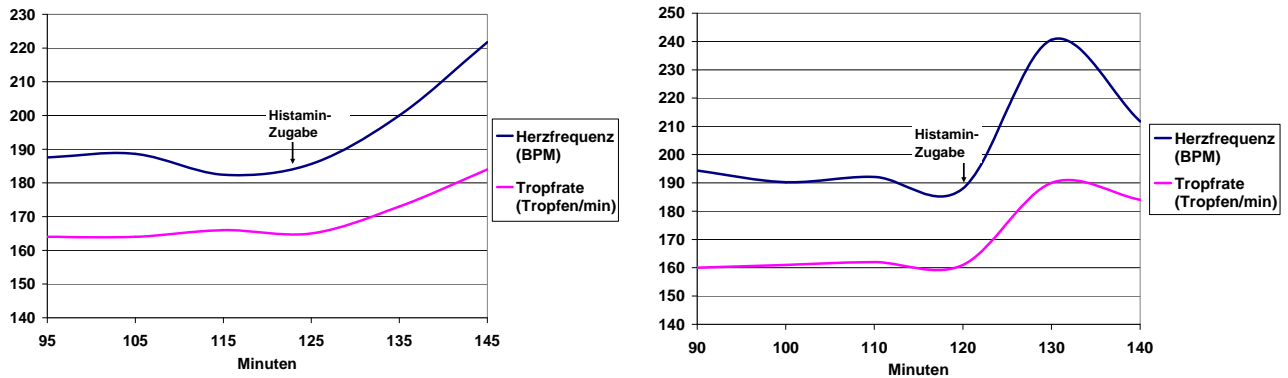


Abb. 3.2.2-3: Korrelation der Herzfrequenz mit dem koronaren Fluss während eines Langendorff-Experiments mit Zugabe von 250 nM Histamin (links) und 1 µM Histamin (rechts)

3.2.3 Versuche mit Reserpin behandelten Tieren

Für einen weiteren experimentellen Ansatz zur Bestätigung, dass der beobachtete Herzfrequenzanstieg durch Katecholamine hervorgerufen wird, wurde der Wirkstoff Reserpin verwendet. Reserpin ist ein sog. Antisymphomimetikum, dessen antihypertone Wirkung auf einer Verarmung des Neurotransmitters Noradrenalin im postganglionären Sympathikus beruht. Auf zellulärer Ebene beruht der Wirkmechanismus von Reserpin auf der „Entspeicherung“ biogener Amine wie den Botenstoffen Noradrenalin, Dopamin und Serotonin. Es hemmt die nicht selektiven vesikulären Monoamintransporter in den Membranen der Speichervesikel, wodurch die Botenstoffe nicht mehr in die Vesikel der präsynaptischen sympathischen Nervenendungen aufgenommen werden können. Außerhalb dieser werden biogene Amine von dem Enzym Monoaminoxidase (MAO) abgebaut, was zur Folge hat, dass die Menge an Noradrenalin, die bei Erregung freigesetzt werden kann, verringert wird. Für diese Versuche wurde den Meerschweinchen Reserpin (5 mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert. Nach 12 bis 16 Stunden wurden die Herzen der vorbehandelten Tiere im Langendorff-Versuch eingesetzt. Diese wurden für 2 Stunden mit TiO_2 -Partikeln ($2 \cdot 10^9$ Partikel/ml und $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) belastet, wobei keine Frequenzerhöhung auftrat (Abb. 3.2.3-1). Diese Konzentration führte jedoch bei nicht mit Reserpin vorbehandelten Herzen zu einer Herzfrequenzerhöhung von etwa 14 %.

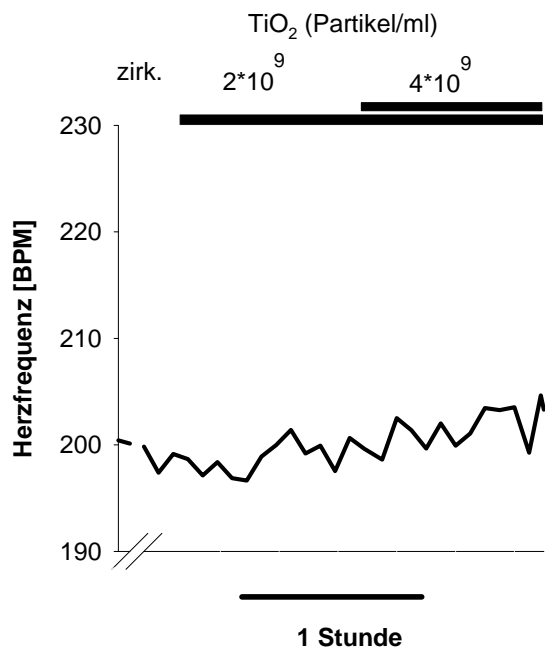


Abb. 3.2.3-1: Typischer Experimentverlauf mit Herzen von Reserpin-behandelten Tieren mit TiO₂-Partikelapplikation ($2 \cdot 10^9$ Partikel/ml und $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml)

3.3 Wirkung von UFP auf das freie intrazelluläre Calcium in Neuronen

Eine erhöhte Calciumkonzentration führt zu einer vermehrten Speicherung von Katecholaminen in den Speichervesikeln der Nervenzellen, was zu einer erhöhten Ausschüttung führen kann.

Die Herzfrequenzsteigerung durch ultrafeine Partikel wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Ausschüttung von Noradrenalin aus den Nervenendungen im Herzen hervorgerufen. Diese Ausschüttung kann unter anderem durch Veränderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentrationen beeinflusst werden. Die Stimulation der exozytotischen Sekretion von Katecholaminen aus den Speichervesikeln führt zu einem schnellen Anstieg der Calciumkonzentrationen, sowohl intrazellulär als auch in den Vesikeln.

Daher wurde die Wirkung von UFP auf das freie intrazelluläre Calcium von Neuronen in Zellkultur untersucht. Hierzu wurden adrenerge Neuronen (Neuro2A und PC12) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen und die intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen in jeder Einzelzelle mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Die Zellen wurden für 5 - 10 Minuten mit partikelfreiem KHB (1 % BSA) überspült und überprüft, ob die Konzentration des freien intrazellulären Calciums konstant bleibt. Es zeigte sich, dass die Einzelzellen leicht unterschiedliche intrazelluläre Calciumkonzentrationen $[Ca^{2+}]_i$ besitzen, die aber über die Zeit konstant bleiben. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Zellen intakt sind. Bei Membranschädigungen würde die Calciumkonzentration bei Beginn der Messung stark variieren und über die Zeit ansteigen.

Anschließend wurden die Zellen mit partikelhaltiger TiO_2 -Suspension ($4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) überspült. Während des gesamten Versuches wurde die Ca^{2+} -Konzentration registriert.

Kurz nach Beginn der Partikelüberströmung war eine Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration bei etwa 70 % der Zellen erkennbar. Abb. 3.3-1 zeigt ein typisches Experiment mit PC12-Zellen. Der Zeitverlauf zeigt den Anstieg des freien intrazellulären Calciums durch die Partikelapplikation. In Abb. 3.3-2 ist der Zeitverlauf der freien intrazellulären Calciumkonzentration von PC12-Zellen, in Abb. 3.3-4 von Neuro2A-Zellen nach Partikelapplikation zu sehen. In Kontrollversuchen, bei denen die PC12- (Abb. 3.3-3) oder Neuro2A-Zellen (Abb. 3.3-5) nur mit KHB (1 % BSA) überspült wurden, kommt es zu keinem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentrationen.

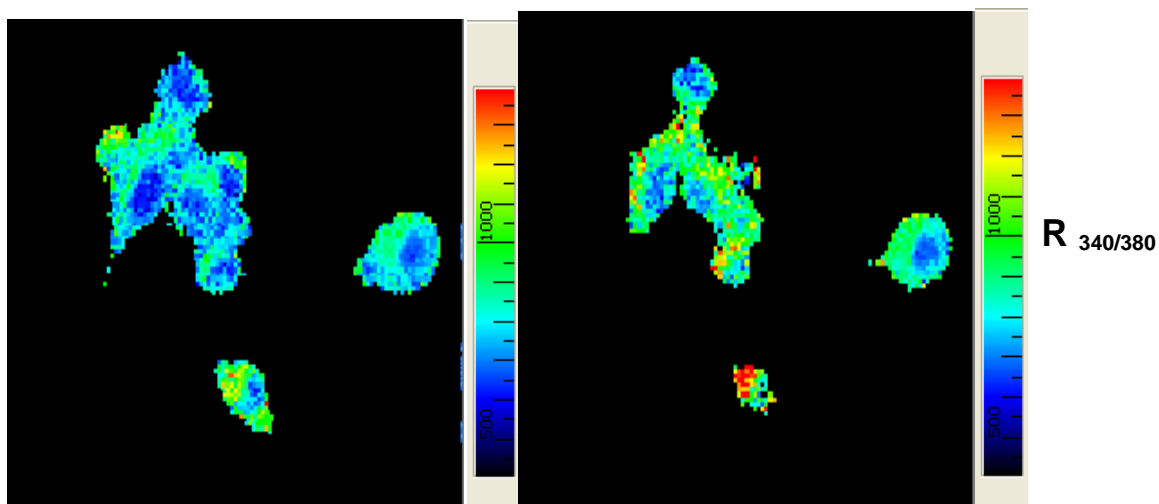


Abb. 3.3-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Neuronen (PC12)

links: Calciumkonzentration in PC12 ohne Partikelbehandlung

rechts: Calciumkonzentration in PC12 10 Minuten nach Partikelzugabe

Die Skala zeigt von blau über grün zu rot die ansteigende Calciumkonzentration

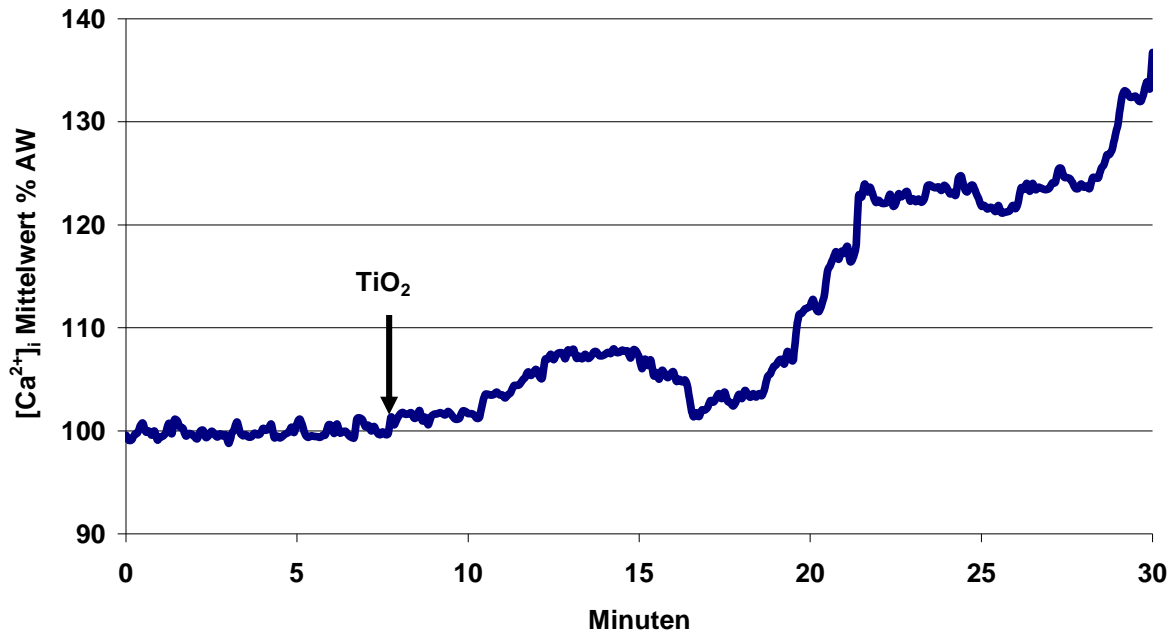


Abb. 3.3-2: Zeitverlauf der freien intrazellulären Calciumkonzentration in PC12-Zellen nach TiO_2 -Partikelapplikation mit $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml (MW, n = 12)

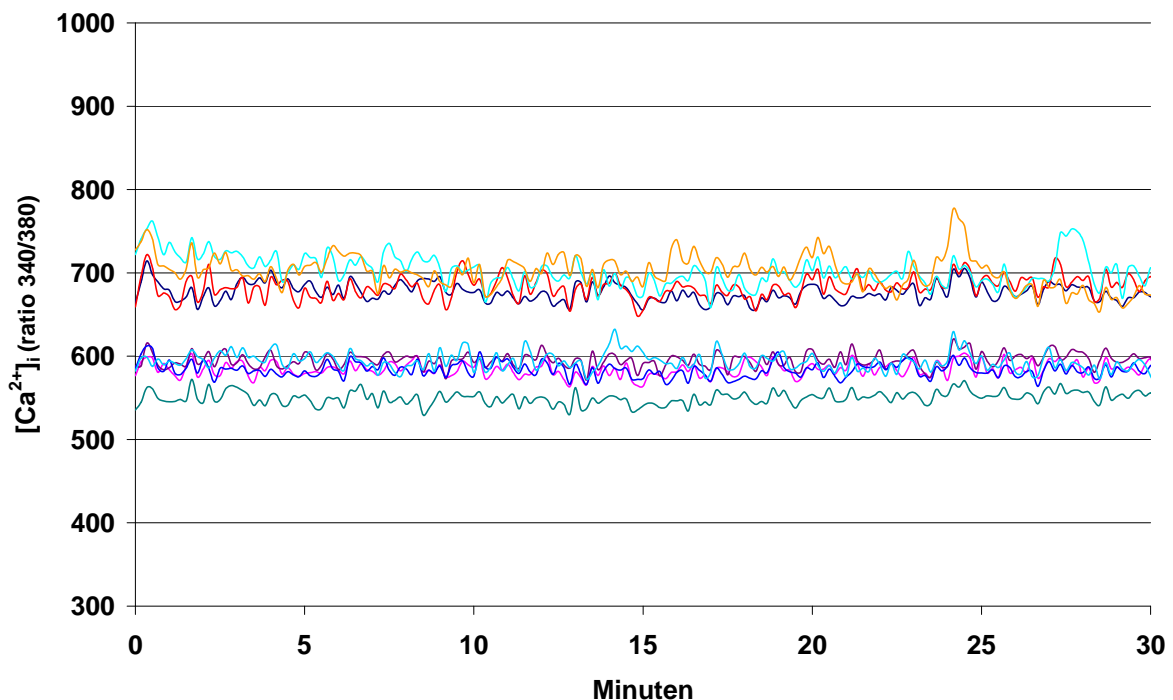


Abb. 3.3-3: Kontrolle: Zeitverlauf der freien intrazellulären Calciumkonzentration in PC12-Zellen ohne Partikelapplikation; jede Spur zeigt den Verlauf einer einzelnen Zelle

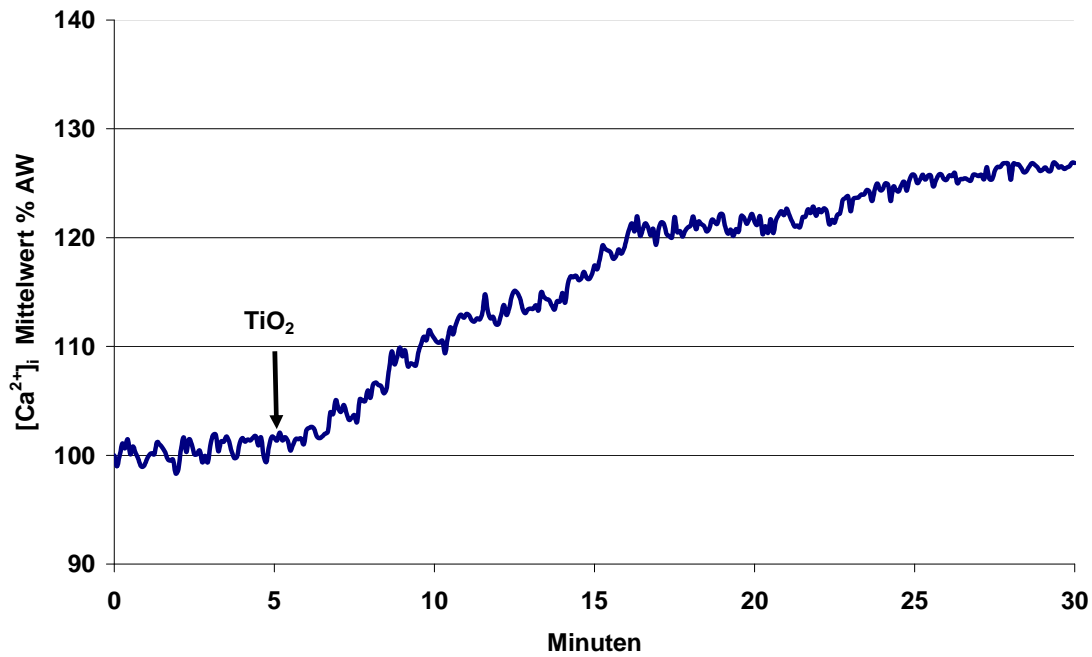


Abb. 3.3-4: Zeitverlauf der freien intrazellulären Calciumkonzentration in Neuro2A-Zellen nach TiO_2 -Partikelapplikation mit $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml (MW, $n = 14$)

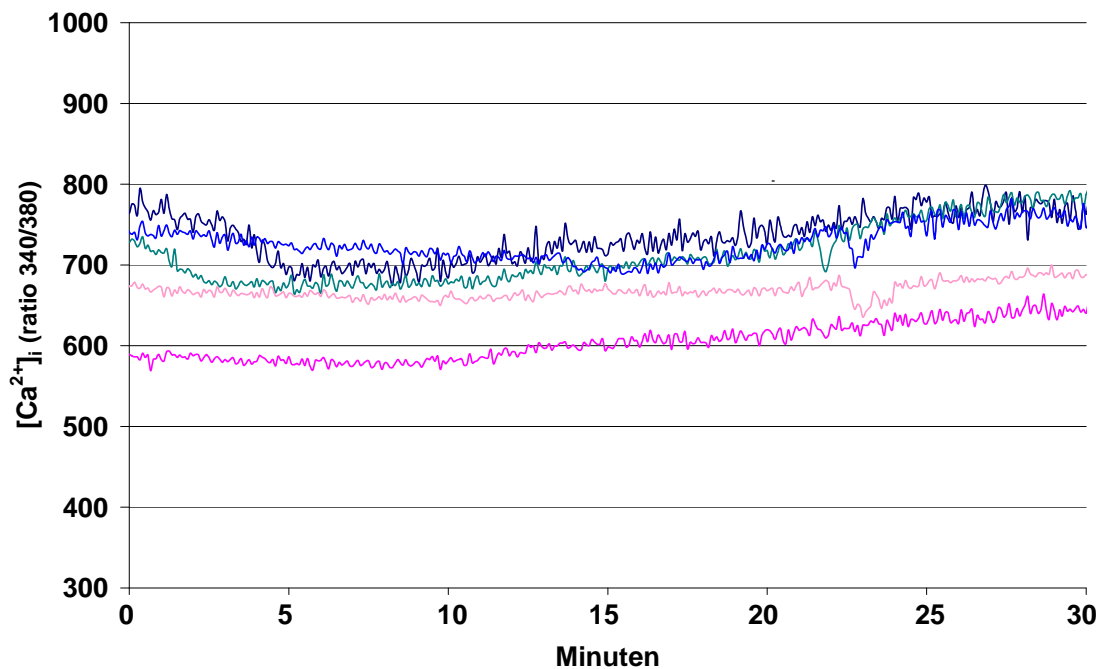


Abb. 3.3-5: Kontrolle: Zeitverlauf der freien intrazellulären Calciumkonzentration in Neuro2A-Zellen ohne Partikelapplikation; jede Spur zeigt den Verlauf einer einzelnen Zelle

3.4 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Heute ist bekannt, dass viele Partikeltypen in der Lage sind, freie Radikale zu generieren und auf diese Weise oxidativen Stress zu induzieren. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können wiederum andere Signalwege induzieren. Die Beteiligung von ROS an der partikel-induzierten Herzfrequenzerhöhung wurde mit verschiedenen Versuchsansätzen untersucht.

3.4.1 ROS-Induktor *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP)

Das sog. *tert*-Butylhydroperoxid ist ein organisches Peroxid, das an einer Vielzahl von Oxidationsprozessen beteiligt ist. Es induziert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Um die Wirkung des ROS-induzierenden Peroxids auf das isolierte Herz zu untersuchen, wurde nach Ende der Einlaufphase TBHP (Endkonzentration 200 μM) zugegeben. Abbildung 3.4.1-1 zeigt den Verlauf der Herzfrequenz in einem typischen Experiment mit der Applikation von TBHP. Unmittelbar nach Zugabe stieg die Herzfrequenz um 13,5 % ($n = 8$) (Abb. 3.4.1-2). In allen durchgeführten Experimenten erreichte die Herzfrequenz nach 10 Minuten ein erstes Maximum und nach 25 Minuten ein weiteres Maximum und sank anschließend wieder auf den Wert des ersten Maximums ab. Die Herzfrequenz war eine Stunde nach TBHP-Zugabe noch deutlich höher als der Ausgangswert vor der Zugabe.

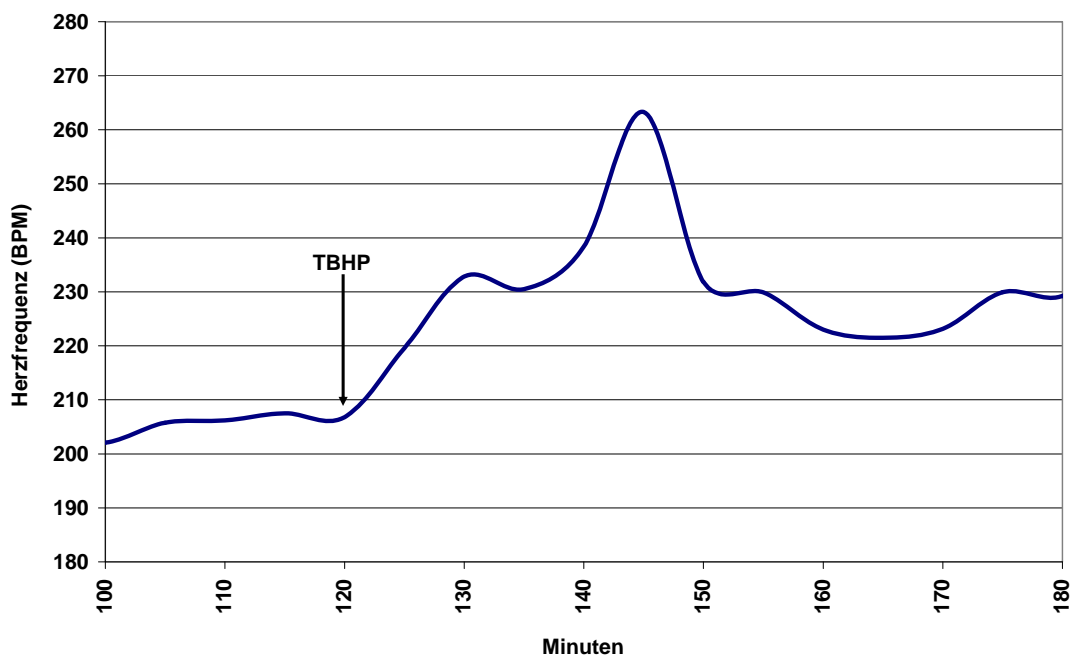


Abb. 3.4.1-1: Typischer Verlauf der Herzfrequenz nach Applikation von 200 μM TBHP

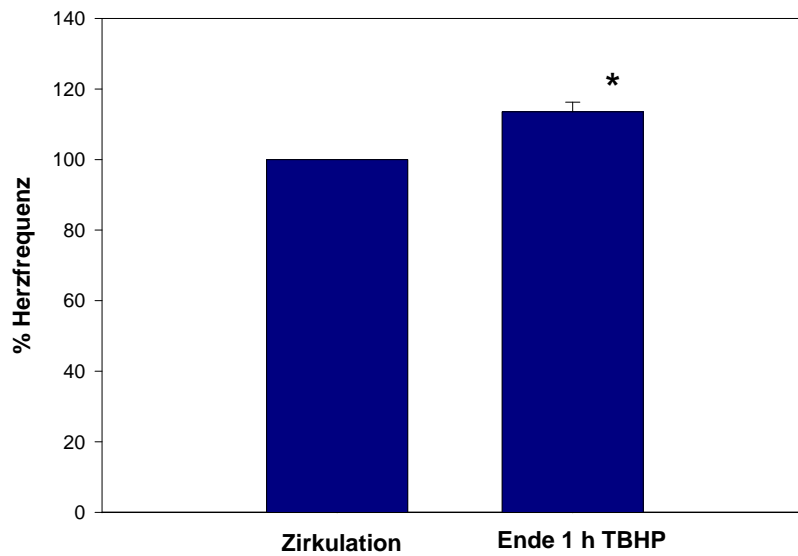


Abb. 3.4.1-2: Zunahme der Herzfrequenz nach TBHP-Zugaben nach 1 h
(Mittelwert +/- SEM; n = 8; * p = 0,0017)

Um den Gehalt an Noradrenalin bestimmen zu können, wurden bei drei Experimenten Aliquota der Perfusionslösung vor und 25 Minuten nach TBHP-Zugabe, wenn die Herzfrequenz das Maximum erreicht hatte, entnommen. Vor der Zugabe betrug der Noradrenalinhalt 13,8 pg/ml und 25 Minuten nach der Applikation von TBHP 17,2 pg/ml. Dies bedeutet einen Anstieg der Noradrenalinkonzentration von 24 % (n = 3) nach der Zugabe von TBHP (Abb. 3.4.1-3).

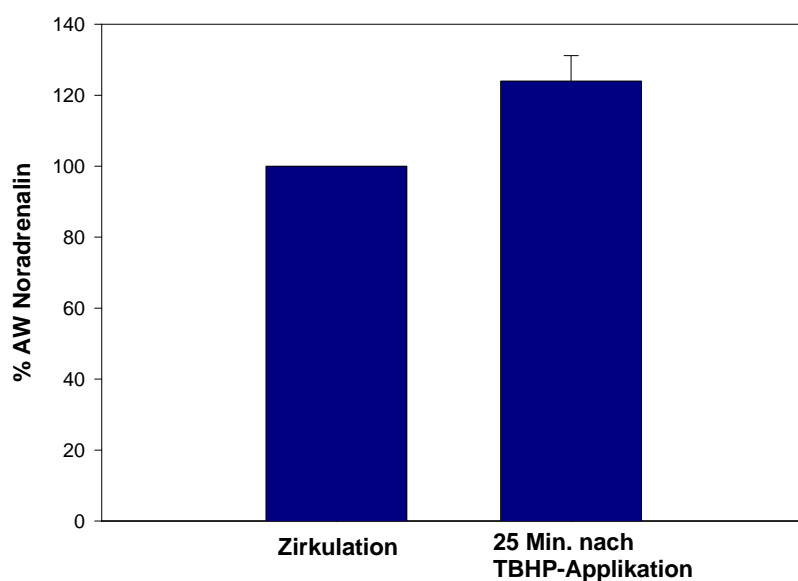


Abb. 3.4.1-3: Zunahme des Noradrenalinhalt in Herzperfusat 25 Minuten nach TBHP-Zugabe (Mittelwert +/- SEM; n = 3)

3.4.2 Detektion von ROS mittels ESR

Um den direkten Beweis dafür zu erhalten, dass UFP zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Herz führen, wurden diese bei zwei Langendorff-Experimenten mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) bestimmt. Hierzu wurde das Gerät „e-scan“ der Firma Bruker BioSpin verwendet. Um die hochreaktiven und wegen der im Bereich von 10^{-9} Sekunden ($\cdot\text{OH}$) bis 1 Sekunde (H_2O_2) liegenden Halbwertszeit schwer nachweisbaren ROS (siehe Abb. 1.7-2) zu detektieren, wurde die Spin-Probe CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine) verwendet. Durch die Bindung der Sauerstoffradikale an diese Spin-Probe ist es möglich, die Radikale länger zu stabilisieren und mittels ESR zu messen. Die Spin-Probe CMH wird durch Oxidation der ROS zu einem stabilen Spinaddukt $\text{CM}\cdot$ transformiert, das über 4 Stunden stabil bleibt und dessen Konzentration proportional zur ROS-Konzentration ist. $\text{CM}\cdot$ besitzt ein freies Elektron und kann somit zur ESR-Messung verwendet werden.

Bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums wird die Probe einer in Intensität und Wellenlänge konstanten Mikrowelle ausgesetzt. Zusätzlich wird ein sich variierendes Magnetfeld angelegt, das die Energieniveaus der ungepaarten Elektronen verändert. Deren Gesamtenergie wird um einen feldabhängigen Anteil vermindert bzw. erhöht. Die Differenz zwischen erniedrigter und erhöhter Energie ist proportional zu dem angelegten Magnetfeld. Das bei der ESR erhaltene Signal kommt dadurch zustande, dass ungepaarte Elektronen Energiequanten der Mikrowelle absorbieren, wenn sich die nach Planck's Beziehung gegebene Energie $E = h\nu$ und die Aufspaltung des Elektronenzustandes decken. Diese Absorption ist ein Maß für die ROS-Konzentration.

Zuerst wurden Vorversuche durchgeführt, um festzustellen, ob in unserer Perfusionslösung für die Langendorff-Experimente durch Verunreinigungen mit paramagnetischen Substanzen die Fenton-Reaktion auftritt und dadurch eine ROS-Entstehung vorgetäuscht werden könnte. Es wurden dem KHB der Kupferchelator DETC ($5\ \mu\text{M}$) und der Eisenchelator DF ($25\ \mu\text{M}$) zugegeben. Diese Konzentrationen sind Erfahrungswerte der Firma Noxygen, die aber dann noch den jeweiligen experimentellen Bedingungen angepasst werden müssen. Danach wurde dem KHB die Spin-Probe CMH ($200\ \mu\text{M}$) zugegeben. 45 Minuten nach Zugabe der Spin-Probe CMH wurden in einem Aliquot 1% BSA, in einem zweiten 1% BSA und P90 ($8 \cdot 10^9$ Partikel/ml), in einem dritten 1% BSA und TiO_2 ($4 \cdot 10^9$ Partikel/ml) zugegeben. Eine Stunde später wurde in jedem Aliquot die ROS-Konzentration mittels ESR bestimmt. Im reinen KHB betrug diese $2,53\ \mu\text{M/l}$, in dem Puffer, dem BSA zugegeben wurde, war die

Konzentration auf 15,7 $\mu\text{M/l}$ angestiegen. In den Aliquota, denen zusätzlich zum BSA noch TiO_2 oder P90 zugegeben worden war, war die Konzentration auf 17,1 $\mu\text{M/l}$ bzw. 16,36 $\mu\text{M/l}$ angestiegen (Abb. 3.4.2-1). Diese Zunahme ist jedoch verglichen mit der durch BSA hervorgerufenen Zunahme gering.

Das BSA enthält zum Beispiel Spuren von Kupfer und Eisen, die eine Fenton-Reaktion bewirken. Für zukünftige Messungen ist es sinnvoll, BSA mit geringerer Verunreinigung von Metallen einzusetzen, falls BSA mit dieser Qualität erhältlich ist. Der Anstieg der ROS-Konzentration durch den Einsatz von KHB mit 1 % BSA könnte auch damit erklärbar sein, dass nicht genügend Chelatoren eingesetzt wurden und die Fenton-Reaktion innerhalb einer Stunde nicht abgeschlossen ist. Deshalb muss die Dosierung der Chelatoren weiter optimiert werden. Eine weitere Erklärung ist das Vorhandensein von anderen Übergangsmetallen im BSA, die von den hier verwendeten Chelatoren nicht gebunden werden.

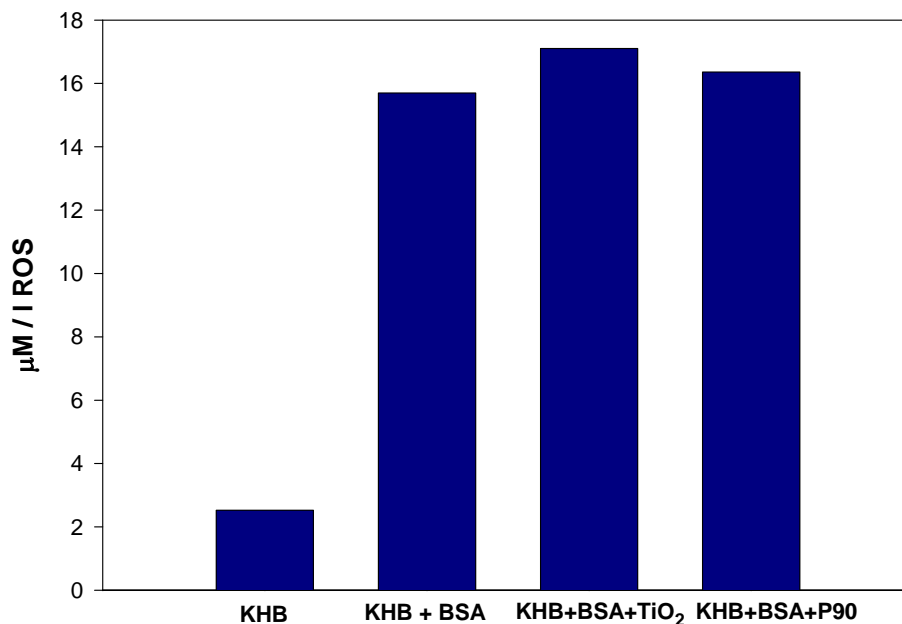


Abb. 3.4.2-1: ROS-Konzentration 1 Stunde nach Zugabe der Spin-Probe CMH in KHB, in KHB mit 1 % BSA, in KHB mit 1 % BSA und TiO_2 ($4 \cdot 10^9$ Partikel/ml), in KHB mit 1 % BSA und P90 ($8 \cdot 10^9$ Partikel/ml)

Nach diesen Vorversuchen wurde untersucht, ob UFP im Herzen ROS erzeugen. Dazu wurden während eines Langendorff-Experiments Proben der Perfusionslösung vor, 1 h und 2 h nach Zugabe von P90-Partikeln ($4 \cdot 10^9$ bzw. $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) entnommen. In einem

Kontrollexperiment wurden zu denselben Zeitpunkten Proben entnommen. Die Proben wurden mit dem e-scan Gerät analysiert.

Hier zeigte sich, dass die ROS-Aktivität in partikelbehandelten Herzen stärker anstieg als bei unbehandelten Herzen (Abb. 3.4.2-2). Nach einer Stunde war die ROS Aktivität um 9 %, nach 2 Stunden um 20 % höher als bei dem Kontrollexperiment. Der Anstieg der ROS-Aktivität bei unbehandelten Herzen lässt sich durch das in der Perfusionslösung enthaltene BSA erklären, wie in dem Vorversuch gezeigt wurde. Die weitere Zunahme der ROS-Aktivität in der zweiten Stunde bei dem mit Partikeln perfundierten Herzen lässt auf eine Entstehung von ROS im Herzgewebe schließen.

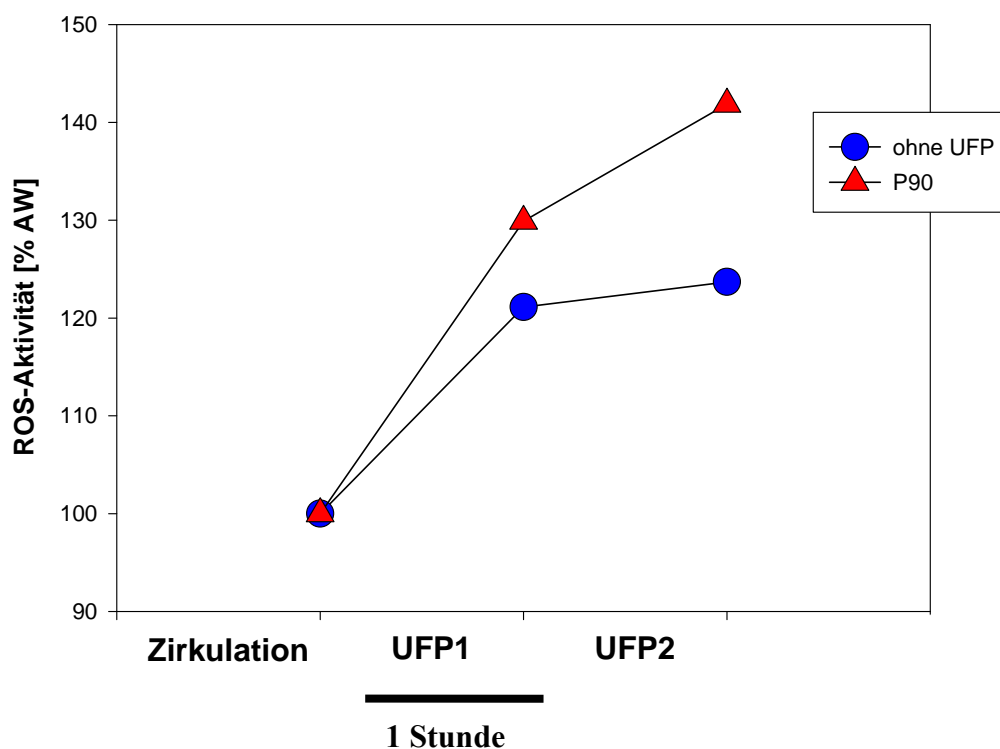


Abb. 3.4.2-2: Vergleich der im Perfusat durch die Spin-Probe CMH detektierten ROS-Aktivität zwischen unbehandeltem und mit UFP (UFP1: P90, $4 \cdot 10^9$ bzw. UFP2: P90, $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) belastetem Langendorff-Herz

3.5 Wirkung von UFP auf das freie intrazelluläre Calcium in isolierten Herzzellen

Die Herzfrequenz eines Erwachsenen beträgt etwa 70 Herzschläge pro Minute. Voraussetzung für die beinahe sekundliche Kontraktion ist eine synchronisierte Erregung der Herzmuskelzellen. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle, welche eine kontrollierte Entstehung, Ausbreitung und Beendigung der Erregung gewährleisten. Pathologische Veränderungen in der Aktivität dieser Ionenkanäle führen zu einem Verlust der synchronisierten Erregungsausbreitung, d.h. einer Herzarrhythmie.

Natriumkanäle sind für die myokardiale Weiterleitung und Aufrechterhaltung des Herzrhythmus verantwortlich. Calciumionen spielen eine fundamentale Rolle bei der Erregung und Kontraktion der Kardiomyozyten. Es wurden Mechanismen identifiziert, bei denen das intrazelluläre Calcium die Funktion der Natriumkanäle direkt beeinflusst [Tan *et al.*, 2002].

Da nach Applikation von ultrafeinen Partikeln am isolierten Herzen Arrhythmien, wie z.B. Veränderungen der ST-Strecke oder der AV-Block auftraten, sollte untersucht werden, welchen Einfluss UFP auf die Calciumhomöostase in Herzzellen ausüben.

Für diese Untersuchungen wurden Herzzellen verwendet, die enzymatisch aus Herzen von Meerschweinchen isoliert wurden. Die Beladung der Zellen erfolgte mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 und die Messung der freien intrazellulären Calciumkonzentrationen in Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Myocyten wurden elektrisch mit Rechteckpulsen stimuliert (3 V; 1 ms; 0,5 Hz), wodurch sie sich kontrahierten. Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration konnte so während der Kontraktion und in der Ruhephase bestimmt werden. Die Calciumkonzentration ($R_{340/380}$) wurde alle 33 ms bestimmt. Abbildung 3.5-1 zeigt die Konzentration des freien intrazellulären Calciums einer Herzzelle während der Kontraktion. Die Calciumkonzentration ist in Fehlfarben dargestellt.

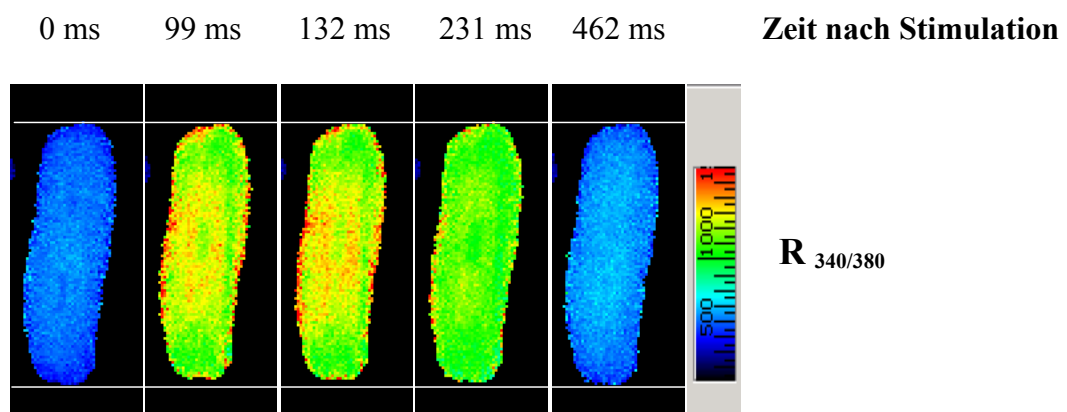


Abb. 3.5-1: Calciumkonzentration in einer stimulierten Herzzelle während der Kontraktion

Während der ersten 15 Minuten wurden die Zellen mit partikelfreiem KHB (1 % BSA) überströmt. Das diastolische Calcium (Calcium zwischen Kontraktionen) und der Calcium-Transient (Calcium während der Kontraktion) blieben unverändert, was ein Beweis für die Membranstabilität ist. Anschließend wurden die Zellen mit partikelhaltiger Lösung (TiO_2 : $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml; P90: $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) überströmt. Innerhalb der ersten Minuten zeigten sich ein Anstieg des diastolischen Calciums und gleichzeitig eine Abnahme der Amplitude des Calcium-Transienten. Dieser Effekt war sowohl bei der Applikation von TiO_2 wie auch bei P90 zu beobachten. Abb. 3.5-2 zeigt die Amplitude und deren Veränderung durch die Exposition mit ultrafeinen Partikeln. Abb. 3.5-3 stellt den Zeitverlauf des diastolischen und Calcium-Transienten dar. Abb. 3.5-4 zeigt als Kontrolle den Zeitverlauf des diastolischen und Calcium-Transienten von zwei Herzzellen, die nur mit KHB (1 % BSA) überströmt wurden. Bei Herzzellen, die mit partikelfreier Lösung überströmt wurden, blieben das diastolische Calcium und der Calcium-Transient während des Versuchszeitraums konstant. Die leichten Amplitudenschwankungen des Calcium-Transienten kommen durch die verwendete geringe Aufnahme­frequenz (30 Hz) der CCD-Kamera zustande. Die geringe Aufnahme­frequenz wurde gewählt, um ein starkes Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Die Dauer eines Calcium-Transienten beträgt etwa 300 ms und somit kann bei der gewählten Aufnahme­frequenz das Maximum nicht exakt erfasst werden.

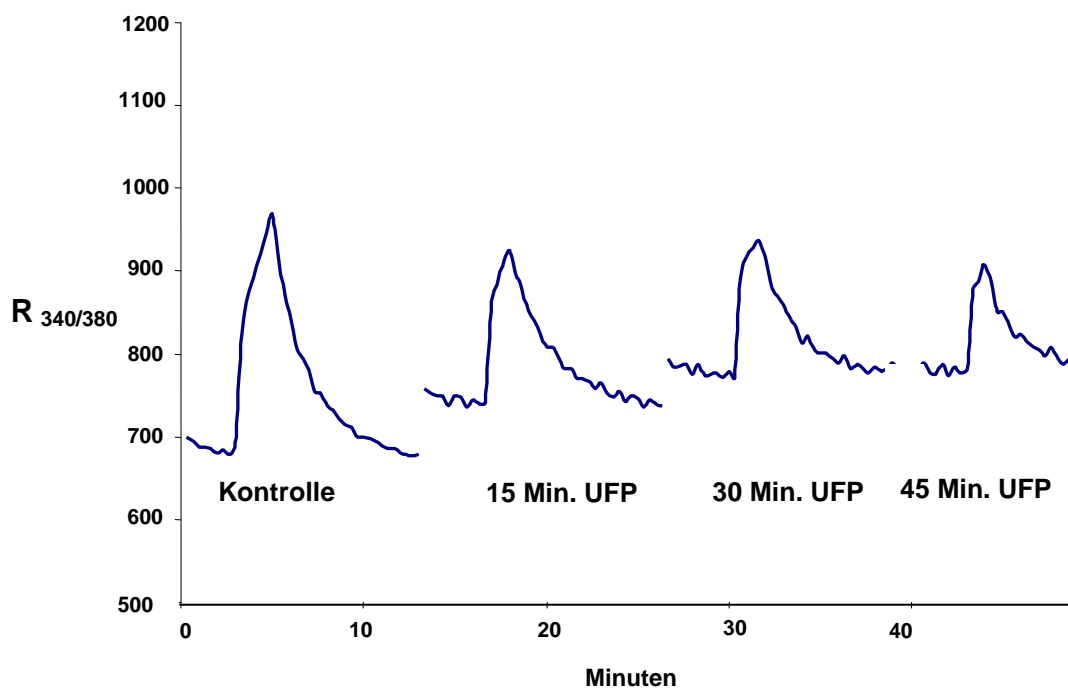


Abb. 3.5-2: Veränderung der Amplitudenform des freien intrazellulären Calciums einer stimulierten Herzzelle während Partikelapplikation

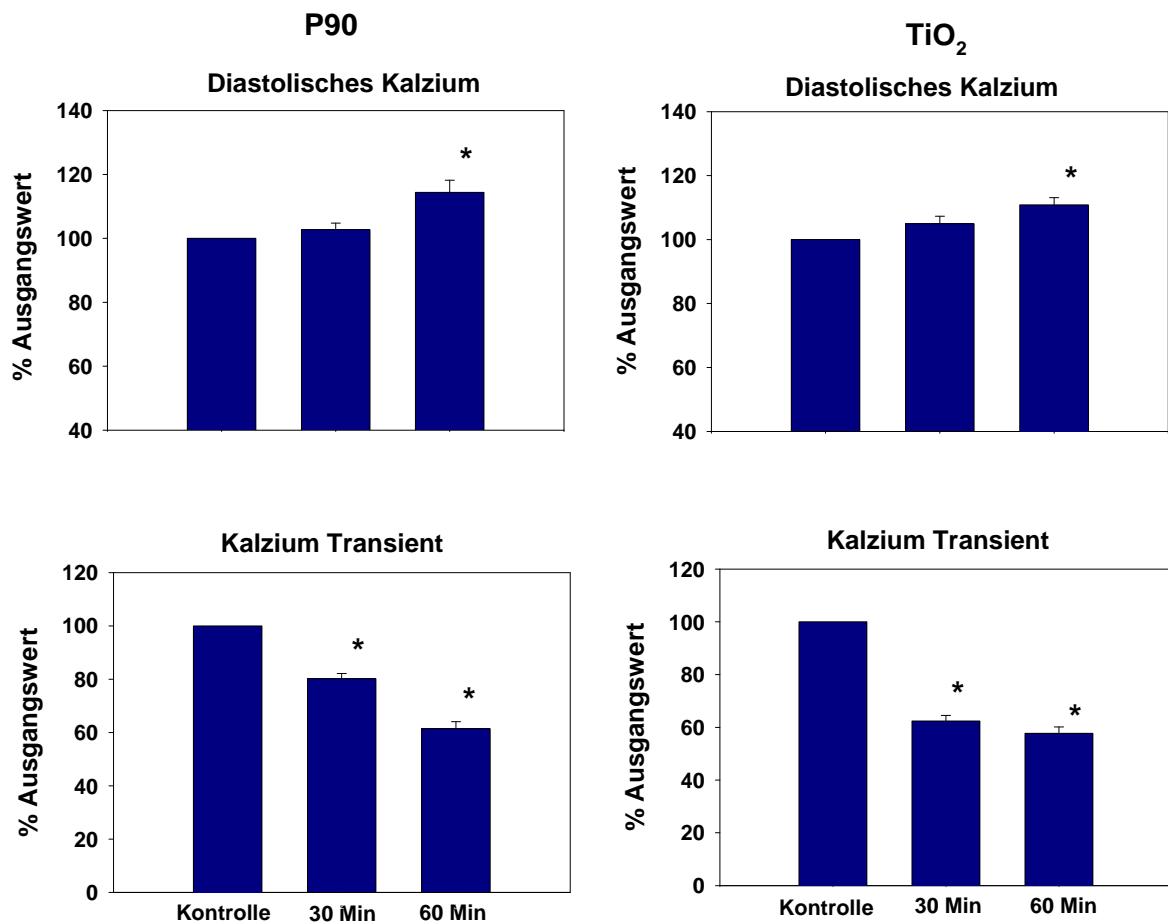


Abb. 3.5-3: Effekt von P90, $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml (links) und TiO₂, $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml (rechts) auf das diastolische Calcium und den Calcium-Transienten in % Ausgangswert; Mittelwert +/- SEM (n > 6); p < 0,001

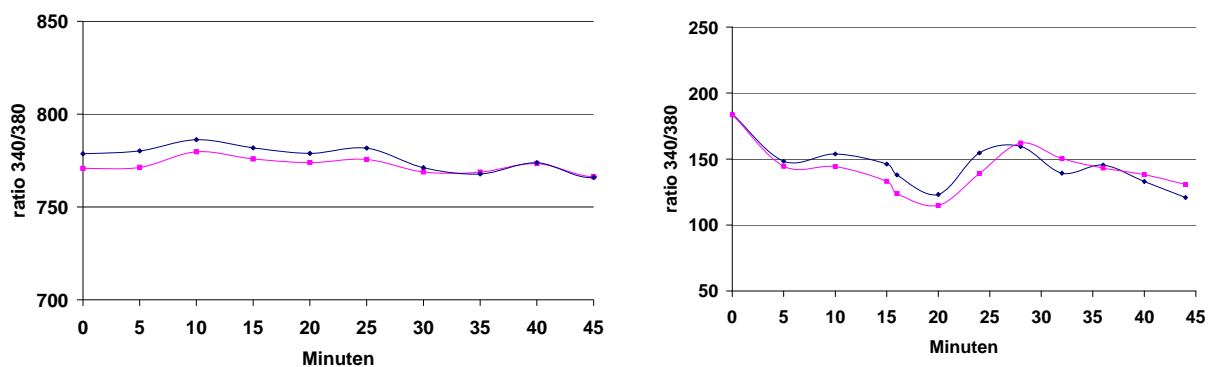


Abb. 3.5-4: Zeitverlauf des diastolischen Calciums (links) und des Calcium-Transienten (rechts) einer stimulierten Herzzelle ohne Partikelapplikation

3.6 Langendorff-System als selektives Testmodell für Partikel

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob andere Nanoteilchen mit unterschiedlichen definierten Durchmessern und ohne Agglomeratbildung, sowie Nanotubes, ebenso wie die Modellpartikel P90, TiO₂ und SiO₂ einen direkten Einfluss auf das Herz ausüben.

3.6.1 Latex 40

Zuerst wurden Experimente mit Latex 40-Partikeln durchgeführt. Diese haben einen Durchmesser von 40 nm und bilden im Gegensatz zu P90 und TiO₂ keine Agglomerate. Das heißt, sie sind beträchtlich kleiner als die Agglomerate von P90 und TiO₂ mit rund 100 nm Durchmesser. Bei der Anwendung von Latex 40 musste keine Kalibrierkurve erstellt werden, da hier die Konzentrationsangabe des Herstellers verwendet werden konnte. In der Versuchsdurchführung wurden entsprechend der höchsten P90-Konzentration $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml für eine Stunde appliziert und die Dosis in der zweiten Stunde verdoppelt. Im Gegensatz zu P90 und TiO₂ hatten diese Partikel keinen Einfluss auf die Herzfrequenz. Bei allen acht Experimenten konnte keine Änderung der Herzfrequenz durch Latex 40 beobachtet werden. Es trat lediglich eine minimale Abnahme der Herzfrequenz auf, die statistisch nicht signifikant ist und sich durch eine minimale Ermüdung des Herzmuskels erklären lässt. In Abb. 3.6.1-1 ist ein typischer Verlauf eines solchen Experiments dargestellt.

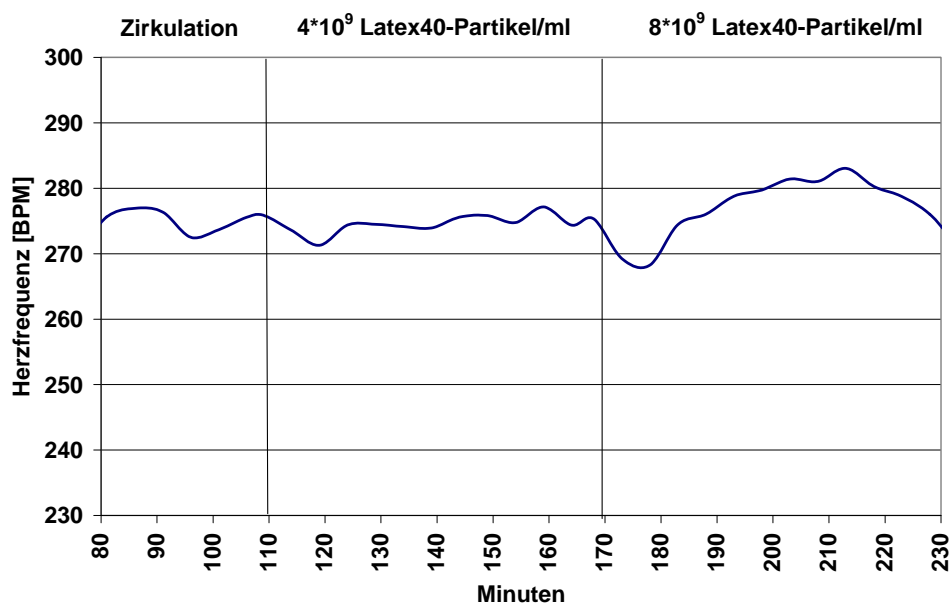


Abb. 3.6.1-1: Typischer Verlauf der Herzfrequenz nach Applikation von Latex 40 Partikeln (1 h mit $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml und 2 h mit $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml)

3.6.2 Aerosil®

Ein weiterer mit dem Langendorff-System untersuchter Partikeltyp ist das sog. Aerosil® der Firma Evonik Industries. Hierbei handelt es sich um synthetisches Siliziumdioxid, das unter anderem als kolloidale Kieselsäure unter dem Produktnamen Aerosil® im Handel ist. Anwendung findet es in Lebensmitteln, Kosmetika, Verdickungsmitteln und wird oft gegen das Verklumpen von Pulvern oder Salzen eingesetzt. Die Primärteilchen liegen in Nanogröße vor. Allerdings neigen die Partikel zur Bildung von Agglomeraten größer 100 nm. Vor Applikation der Aerosil®-Partikel wurden diese mit der Ultraschallnadel behandelt und im Particlesizer vermessen. Die durchschnittliche Größe der Partikel bzw. deren Agglomerate lag dann bei ca. 120 – 150 nm im Durchmesser. Für die Versuche wurden drei verschiedene Aerosil® Produkte verwendet: Aerosil® 90, Aerosil® 200 und Aerosil® 380. Diese unterscheiden sich in der Primärpartikelgröße und damit auch in der spezifischen Oberfläche. Aerosil® 90 hat die größte Primärpartikelgröße (20 nm) und folglich die kleinste spezifische Oberfläche (90 m²/g). Die Primärpartikelgröße von Aerosil® 200 beträgt 12 nm, die spezifische Oberfläche 200 m²/g. Aerosil® 380 hat die kleinste Primärpartikelgröße (7 nm), aber auch die größte spezifische Oberfläche (380 m²/g). Diese in Größe und Oberfläche unterschiedlichen Partikel wurden gewählt, um herauszufinden, ob eventuelle Effekte auf die Herzfrequenz mit der Größe oder spezifischen Oberfläche korrelieren. Für die Versuche wurde jeweils 1 mg des Aerosil®-Pulvers eingewogen, 5 ml KHB (1 % BSA) zugegeben und die Suspension zwei Mal für 2 Minuten auf Eis mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde diese im Particlesizer vermessen und die Extinktion bei 380 nm bestimmt. Die Partikelsuspension wurde in den Langendorff-Experimenten auf eine Extinktion von 0,02 verdünnt. Diese Extinktion entspricht bei TiO₂-Suspensionen 4*10⁹ Partikeln/ml. Die Dosis wurde analog zu den Experimenten mit P90 und TiO₂ in der zweiten Stunde verdoppelt.

3.6.2.1 Aerosil® 90

Die Applikation von Aerosil® 90 (größte Primärpartikelgröße und kleinste spezifische Oberfläche) erfolgte an drei Langendorff-Heizen. Es konnte nach einer Stunde eine Frequenzabnahme von 0,7 % und nach Verdopplung von 5,3 % (Abb. 3.6.2.1-1) beobachtet werden. Diese Änderung ist nicht signifikant und kann auf einer Ermüdung des Herzmuskels während der zweistündigen Experimentzeit beruhen.

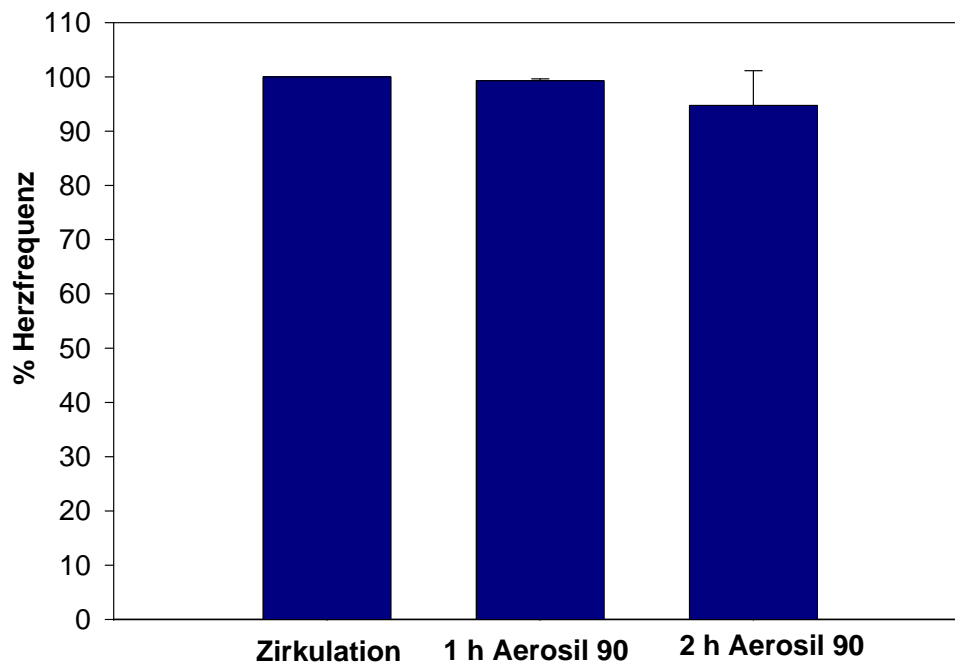


Abb. 3.6.2.1-1: Herzfrequenz nach 1 h und 2 h mit Applikation von Aerosil[®] 90
(Mittelwert +/- SEM; n = 3)

3.6.2.2 Aerosil[®] 200

Langendorff-Versuche mit Aerosil[®] 200 (Primärpartikelgröße 12 nm, spezifische Oberfläche 200 m²/g) erfolgten an acht Langendorff-Herzen. Nach einer Stunde konnte eine Frequenzabnahme von 0,8 % und nach Verdopplung eine Frequenzzunahme von 1,4 % (n = 8) (Abb. 3.6.2.2-1) beobachtet werden. Auch hier ist weder die geringe Abnahme nach einer Stunde, noch die minimale Zunahme nach zwei Stunden signifikant. Solch geringe Schwankungen in der Herzfrequenz über die Experimentzeit wurden auch bei Kontrollexperimenten beobachtet.

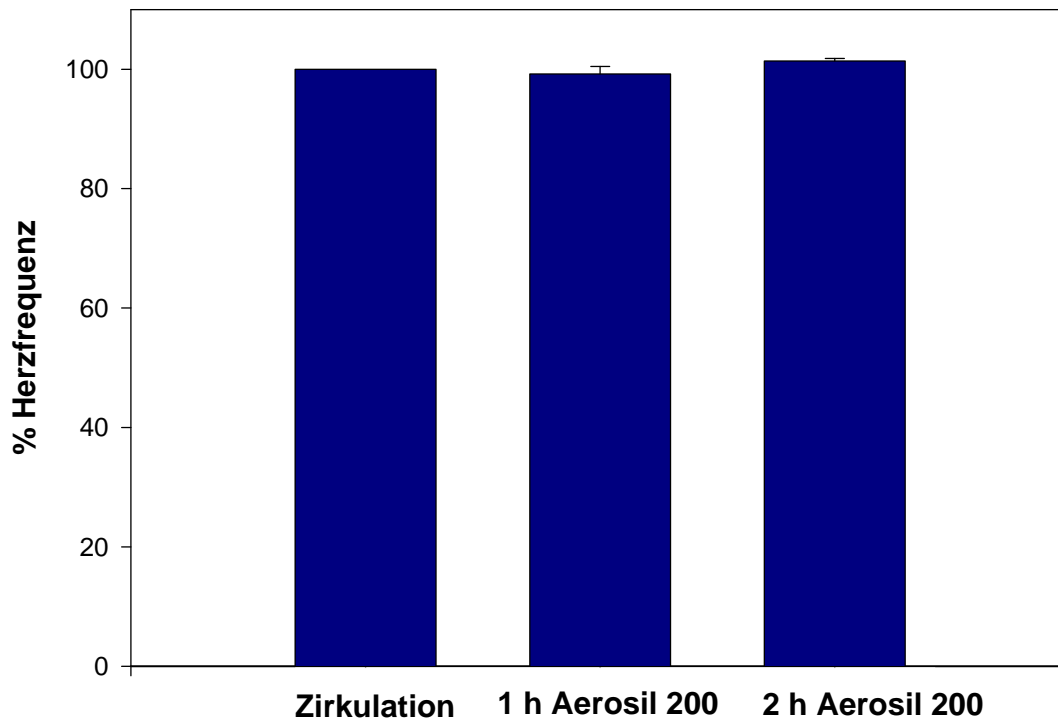


Abb. 3.6.2.2-1: Herzfrequenz nach 1 h und 2 h mit Applikation von Aerosil[®] 200
(Mittelwert +/- SEM; n = 8)

Bei den Versuchen mit Aerosil[®] 200 wurden darüber hinaus bei drei Experimenten Proben zur Katecholaminbestimmung mittels HPLC entnommen.

Der Noradrenalingehalt (pg/ml Perfusionslösung) war nach einer Stunde Einwirkung von Aerosil[®] 200 um 5,5 %, nach zwei Stunden um 13 % niedriger als der Ausgangswert, d.h. vor der Zugabe von Aerosil[®] 200 (Abb. 3.6.2.2-2). Diese Abnahme war nicht signifikant und lag im Bereich der Kontrollexperimente. Diese Abnahme der NoradrenalinKonzentration lässt sich durch den Zerfall von Noradrenalin in der Perfusionslösung erklären. Bei der Probenaufarbeitung, Lagerung oder bei Probenentnahme kann es zu leichten Unterschieden in der Konzentration der Katecholamine kommen.

Es lässt sich schließen, dass Aerosil[®] 200 weder einen signifikanten Einfluss auf die Herzfrequenz, noch auf die Ausschüttung von Noradrenalin besitzt.

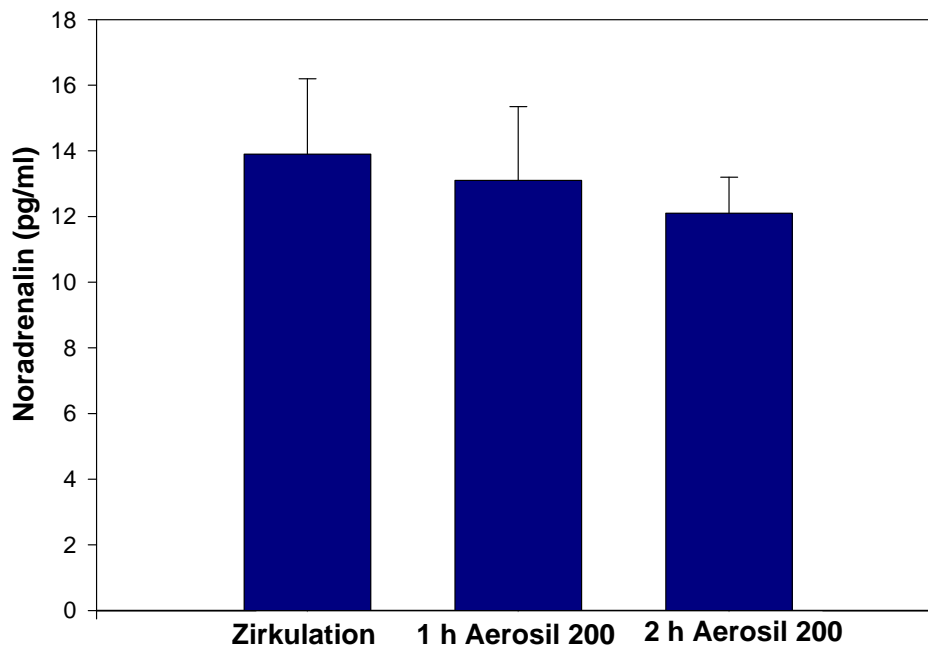


Abb. 3.6.2.2-2: Noradrenalin Gehalt in Perfusionslösung bei Langendorff-Versuchen nach 1 h und 2 h Aerosil[®] 200 (Mittelwert \pm SEM; n = 3)

3.6.2.3 Aerosil[®] 380

Die Applikation von Aerosil[®] 380 (kleinste Primärpartikelgröße und größte spezifische Oberfläche) erfolgte an drei Langendorff-Herzen. Es konnte weder eine Stunde nach Zugabe, noch nach zwei Stunden bei Verdopplung der Konzentration eine Veränderung der Herzfrequenz festgestellt werden (Abb. 3.6.2.3-1).

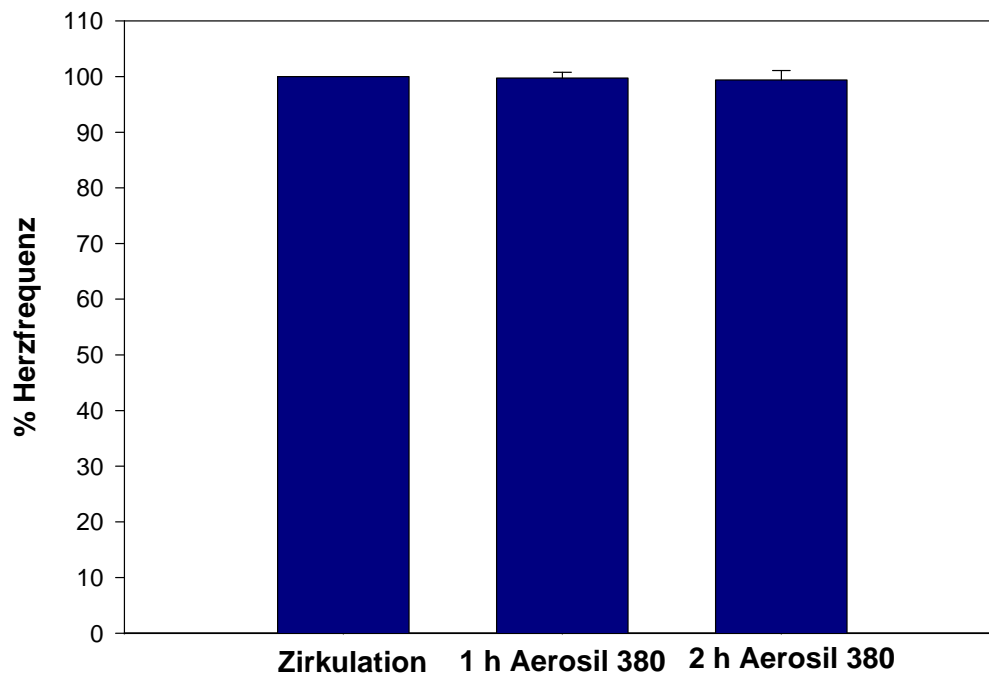


Abb. 3.6.2.3-1: Herzfrequenz nach 1 h und 2 h mit Applikation von Aerosil[®] 380
(Mittelwert +/- SEM; n = 3)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Versuche mit den verschiedenen Aerosil[®]-Partikeln keine Hinweise auf eine Wirkung von diesen auf das Herz ergeben.

3.6.3 GfG-Ruß

Bei GfG-Ruß handelt es sich um Modellruß-Aerosole. Diese werden künstlich in einem so genannten Graphitfunkengenerator (Palas, Karlsruhe) erzeugt. GfG-Ruß unterscheidet sich hinsichtlich seiner chemischen Morphologie und Zusammensetzung deutlich von „echten“ Rußpartikeln aus Verbrennungsprozessen, wie z.B. Dieselruß oder Ruß aus der Biomassenverbrennung [Hintzenberger *et al.*, 1999; Lyyränen *et al.*, 1999]. GfG-Ruß ist gut charakterisiert und wird deshalb oft als Modellruß verwendet. Auf der Partikeloberfläche befinden sich im Gegensatz zu realen Rußpartikeln, z.B. aus Verbrennungsprozessen, keine organischen Rückstände.

Der GfG-Ruß wurde in vier Langendorff-Experimenten eingesetzt. In allen zeigte sich eine signifikante Herzfrequenzzunahme von 9,2 % nach der ersten Applikation. Nach Verdopplung der Konzentration verstärkte sich dieser Effekt, was sich in einer Frequenzzunahme von 13,6 % zeigte (Abb.3.6.3-1). Dieser Effekt ähnelt dem von Printex 90. Diese Ähnlichkeit

ist plausibel, weil es sich bei beiden Partikelarten um Kohlenstoffpartikel handelt und beide eine ähnliche Primärpartikelgröße besitzen.

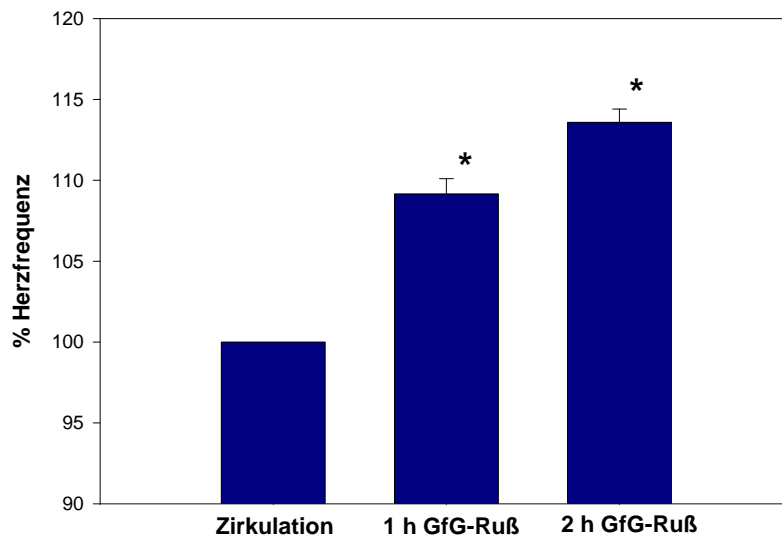


Abb. 3.6.3-1: Zunahme der Herzfrequenz nach 1 h und 2 h Applikation von GfG-Ruß
(Mittelwert +/- SEM; n = 4; * p < 0,002)

3.6.4 Nanotubes

Bei so genannten Nanotubes handelt es sich um Röhren, deren Durchmesser kleiner als 100 Nanometer ist. Meist beträgt der Durchmesser aber nur wenige Nanometer. Bei mehrwandigen Tubes beträgt der Durchmesser der inneren Röhren nur bis zu 0,3 nm. Somit sind einige dieser Nanotubes um ein Zehntausendfaches dünner als ein menschliches Haar. Damit von einer Röhre gesprochen werden kann, muss die Länge den Durchmesser übersteigen, wobei die typische Länge von Nanotubes im Bereich von einigen Mikrometern liegt. Sehr gut untersucht sind Kohlenstoff-Nanotubes (carbon nanotubes, CNTs). Die Schichtstrukturen des Kohlenstoffs sind als Graphit schon lang bekannt. Es wird vermutet, dass alle Stoffe, die solche Schichtstrukturen aufweisen, bei geeigneten Herstellungsbedingungen Röhren ausbilden.

Nanotubes können ein- oder mehrwandig sein. Bei einwandigen Nanotubes spricht man von single wall nanotubes (SWNTs) und bei mehrwandigen von multiple wall nanotubes (MWNTs). Die Wände können einen geschlossenen Ring oder eine spiralförmige Struktur ausbilden. Ebenso können die Enden der Röhren geschlossen oder geöffnet, das Innere kann leer oder gefüllt sein. Abhängig von den Produktionsbedingungen entstehen auch ganze Bündel oder Fäden von Nanotubes.

Die gesundheitlichen Auswirkungen, die im Zusammenhang mit CNTs auftreten können, sind noch nicht ausreichend erforscht. Die längliche räumliche Struktur ähnelt der von Asbest und es stellt sich deshalb die Frage, ob die Nanotubes ähnliche Effekte auf die Gesundheit haben.

Bei den von uns in Langendorff-Versuchen eingesetzten Nanotubes handelte es sich zum einen um Kohlenstoff-SWNTs mit einem Durchmesser von 4 - 5 nm und einer Länge von 200 - 1500 nm, zum anderen um Kohlenstoff-MWNTs mit 3 - 15 Wänden, einem Außendurchmesser von 13 - 16 nm, einem Innendurchmesser von 4 nm und einer Länge von 1 - 10 μm .

Für die Versuche wurde je 1 mg der jeweiligen Nanotubes abgewogen, in 5 ml KHB (1 % BSA) suspendiert und 2 x 2 Minuten mit der Ultraschalllanze behandelt. Anschließend wurde die Extinktion bei 380 nm gemessen. Die im Experiment verwendete Suspension hatte bei 380 nm eine Extinktion von 0,01. Diese Extinktion entspricht der niedrigsten P90-Konzentration von $0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml.

Der Particlesizer kann hier nicht korrekt messen, da die Nanotubes keine Kugelform besitzen, sondern im Vergleich zum Durchmesser sehr lang sind. Eine Kalibrierreihe oder genauere Abschätzung der Konzentration war im Gegensatz zu Printex 90 oder ähnlichen Partikeln auf Grund der Struktur und Form der Nanotubes nicht möglich.

Bei Applikation der MWNTs konnte kein signifikanter Effekt auf die Herzfrequenz beobachtet werden (Abb. 3.6.4-1). Auch bei der Verdopplung der Konzentration war kein Effekt zu sehen.

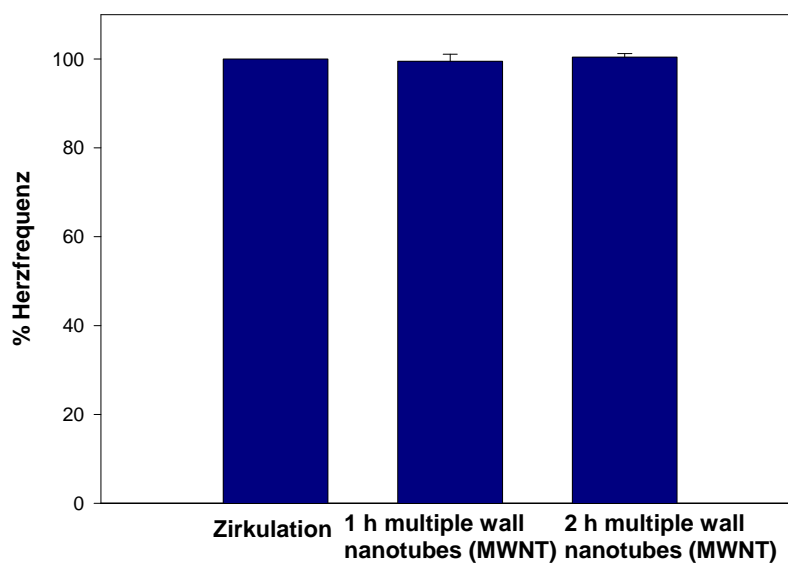


Abb. 3.6.4-1: Effekt von multiple wall nanotubes (MWNTs) auf Herzfrequenz nach 1 h und 2 h Einwirkdauer (Mittelwert +/- SEM; n = 5)

Bei Applikation der SWNTs, die in der gleichen Konzentration wie die MWNTs eingesetzt wurden, war hingegen bereits nach wenigen Minuten ein Abfall in der Herzfrequenz von 14,4 % zu beobachten. Ebenso traten während der Behandlung starke Arrhythmien auf, sodass eine Konzentrationsverdopplung nach einer Stunde nicht mehr möglich war. Abb. 3.6.4-2 zeigt die Herzfrequenzabnahme bei Behandlung mit SWNTs. Die starken Effekte dieser Nanotubes lassen sich wohl am ehesten damit erklären, dass es zum Verschluss von kleinen Herzgefäßen kommt, das Herz so nicht mehr ausreichend versorgt wird und daraus letztendlich Arrhythmien und Frequenzverlangsamung resultieren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die bei der Synthese von Nanotubes verbleibenden metallischen Rückstände, wie z.B. Nickel oder Kobalt, die beobachteten Effekte verstärken.

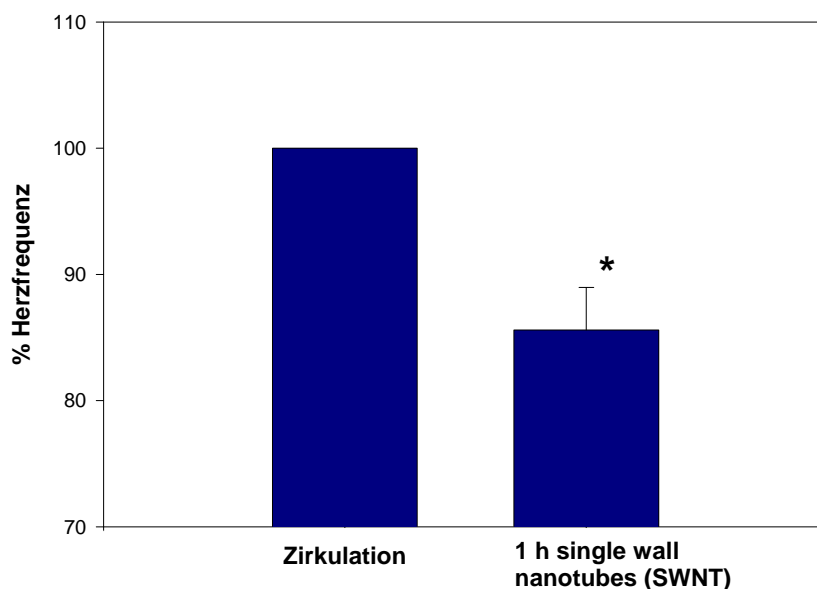


Abb. 3.6.4-2: Effekt von single wall nanotubes (SWNTs) auf Herzfrequenz nach 1 h Einwirkdauer (Mittelwert +/- SEM; n = 6; * p = 0,0152)

4 Diskussion

Die Wirkung von ultrafeinen Partikeln und Nanoteilchen bzw. -tubes auf die Herzfrequenz wurde an isolierten Herzen von Meerschweinchen untersucht. Hierbei konnten unterschiedliche Effekte der verschiedenen Partikel auf die Herzfrequenz festgestellt werden. Ebenso konnte die Arbeitshypothese, dass die verursachte Frequenzerhöhung durch die Ausschüttung von Noradrenalin aus den Nervenendungen des Herzens hervorgerufen wird, bestätigt werden. Auch scheint eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies dabei eine wichtige Rolle zu spielen.

Darüber hinaus hatten die Partikel einen Einfluss auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration von isolierten Herzmuskelzellen und Neuronen.

4.1 Das Langendorff-System als Testmodell zur Toxizitätsanalyse von UFP und Nanopartikeln

Das isoliert perfundierte Langendorff-Herz ist ein geeignetes Modell, um direkte Wirkungen von Umweltstäuben auf das Herz zu untersuchen. Das isolierte Herz von kleinen Säugetieren stellt ein gut erforschtes Präparat dar, das in großer Zahl untersucht werden kann [Vork *et al.*, 1993]. Es ermöglicht die Messung und Untersuchung morphologischer, biochemischer, pharmakologischer und physiologischer Faktoren. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese ohne den Einfluss anderer Organfunktionen und des Blutkreislaufes bestimmt werden können [Schunkert *et al.*, 1995].

In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Langendorff-Apparatur zur Analyse der Effekte von ultrafeinen Partikeln, Nanopartikeln und Nanotubes auf das isolierte Herz von Meerschweinchen verwendet und etabliert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Form des EKGs als auch die Herzfrequenz von lebenden Tieren mit den aus ihnen isolierten Herzen übereinstimmte. Dies lässt so die Vergleichbarkeit mit *in vivo* Studien zu. Das Meerschweinchen wurde als Versuchstier gewählt, da es das einzige Nagetier ist, dessen EKG dem des Menschen sehr ähnlich ist.

Durch die Korrelation von Herzfrequenz und der Menge der durch das Herz strömenden Perfusionslösung (Durchflussrate) konnte sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte nicht durch einen geringeren Fluss und somit durch eine Unterversorgung mit Sauerstoff oder Nährstoffen, sondern durch die Partikel per se hervorgerufen werden.

Die Verwendung von isolierten Langendorff-Herzen verschiedener Tierspezies wird für diverse Fragestellungen benutzt, wie zum Beispiel für die Untersuchung des Gentransfers von

Viren [Wiechert *et al.*, 2003]. Auch in neueren Studien wurde der Effekt von umwelt-relevanten Partikeln auf das isolierte Herz untersucht [Simkhovich *et al.*, 2007]. In dieser Studie wurde die Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf den Blutdruck von isolierten Herzen alter und junger Tiere untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Partikel dieselbe Kardiotoxizität in jungen und alten Herzen haben, eine Erklärung für diese wurde in der Arbeit jedoch nicht gezeigt.

In unseren Versuchen traten nach Partikelapplikation Arrhythmien am isolierten Herzen auf. Der Auslöser von Arrhythmien sind Unregelmäßigkeiten bei der Erregungsbildung im Sinusknoten oder bei der Signalweiterleitung. Die Arrhythmien können die Form des Elektrokardiogramms verändern. Die in unseren Experimenten beobachteten Arrhythmien waren der AV-Block dritten Grades begleitet von ST-Strecken-Erhöhungen. Eine Erhöhung der ST-Strecken ist bei Patienten nach Herzinfarkt zu sehen. Allerdings gab es in unseren Experimenten keine Anzeichen eines Infarktes, wobei eine Myokardischämie ein Vorläufer des Infarktes sein kann. Jedoch konnten wir nicht beobachten, ob sich die ST-Strecken-Erhöhung wieder zurückbildet, da die Experimentdauer hierfür zu kurz war.

In der Arbeit von Wold *et al.* (2006) dient ebenfalls das Langendorff-Modell zur Untersuchung der Hypothese von partikelinduzierten Effekten auf die Herzfunktion und Arrhythmien.

Nach Etablierung des Langendorff-Modells wurden verschiedene Kohlenstoff-Nanotubes untersucht. Aufgrund ihrer hohlen Struktur und ihrem Durchmesser von nur wenigen Nanometern, können die Kohlenstoff-Nanotubes als Transporter für Arzneimittel verwendet werden. Durch die Funktionalisierung der Kohlenstoff-Nanotubes mit Peptiden, Proteinen oder mit Molekülen von Arzneimitteln können sie als Träger zum Transport von bioaktiven Molekülen in die Zellen verwendet werden, ohne dabei toxisch zu wirken [Yu *et al.*, 2008]. Die Herstellung von funktionalisierten Kohlenstoff-Nanotubes mit hoher Dispergierbarkeit und geringer Toxizität als Arzneimittel-Transporter wird in der Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen.

Kohlenstoff-Nanotubes sind normalerweise hydrophob und lassen sich in keiner organischen oder wässrigen Lösung suspendieren. Um sie löslich zu machen, werden sie organisch funktionalisiert. Je größer diese Funktionalisierung ist, desto größer ist die Aufnahme in verschiedene Organe, wie Leber, Niere und Herz. Aber auch die Ausscheidung erfolgt schneller. Wie in einer Studie [Kostarelos *et al.*, 2007] gezeigt wurde, ist die zelluläre Aufnahme von Kohlenstoff-Nanotubes sowohl vom Grad der Funktionalisierung der Tubes als auch vom Zelltyp unabhängig. Unfunktionalisierte Nanotubes hingegen können nicht in Zellen

aufgenommen werden, da sie sofort zu großen Bündeln aggregieren. Die so genannte „Nanoneedle“ Hypothese geht davon aus, dass die Nanotubes die Zellmembran förmlich durchstechen, also ohne Aufnahme durch Endosomen in die Zellen gelangen. Die von uns verwendeten mehrwandigen Kohlenstoff-Nanotubes (MWNTs), die funktionalisiert waren, führten zu keiner Steigerung der Herzfrequenz. Die Applikation der einwandigen funktionalisierten Kohlenstoff-Nanotubes (SWNTs) jedoch hatte einen starken Herzfrequenzabfall von 15 % zur Folge. Dies könnte auf den unterschiedlichen Größen der Nanotubes beruhen. Die MWNTs mit einem Durchmesser von 13 - 16 nm sind zwischen 1 und 10 μm lang und sind somit wahrscheinlich nicht in der Lage in die Mikrogefäße des Herzens einzudringen. Allerdings könnte dies den SWNTs möglich sein, da diese nur einen Durchmesser von 4 - 5 nm haben und zwischen 0,2 und 1,5 μm lang sind. Somit könnte die Versorgung des Herzens durch einen Verschluss kleinerer Gefäße, der wiederum zu einer Minderversorgung des Herzens führt, durch diese SWNTs hervorgerufen werden. Dadurch wäre die Abnahme der Herzfrequenz erklärbar.

Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen Herzfrequenzerhöhung und Partikelgröße sollten noch kleinere Partikel als die Agglomerate von Printex 90 und TiO_2 untersucht werden. Hierzu wurden Latex-Kalibrierpartikel mit einem Durchmesser von 40 nm appliziert. Hierbei zeigte sich keine Veränderung der Herzfrequenz, was darauf schließen lässt, dass diese kein toxisches Potential besitzen. Ob dies an der Größe der Partikel liegt, bleibt fraglich. Die chemische Zusammensetzung der Partikel und die Anlagerung von organischen Substanzen oder Metallspezies an der Partikeloberfläche könnte auch eine große Rolle bei der Wirkung auf das Herz spielen. Deshalb wurde auch im Graphitfunkengenerator erzeugter Ruß (GfG-Ruß) am Langendorff-Modell getestet. Hauptbestandteil von Ruß sind Partikel aus elementarem Kohlenstoff, an die organische Verbindungen wie kanzerogene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) adsorbiert sein können. Der elementare Kohlenstoff besteht aus annähernd kugelförmigen Primärteilchen, die sich zu verzweigten kettenförmigen Aggregaten verbinden können. Von größter umweltmedizinischer Bedeutung sind die Dieselrußemissionen, da Dieselrußpartikel wegen ihres kleinen Durchmessers von etwa 100 bis 200 nm mit der inhalierten Luft tief in die Atemwege vordringen können. Auch führen Rußpartikel zur Entstehung von oxidativem Stress und zu Entzündungsreaktionen in der Lunge [Rouse *et al.*, 2008]. Auch wir konnten eine signifikante Steigerung der Herzfrequenz nach der Applikation von GfG-Ruß am isolierten Herzen beobachten.

Eine andere Art von Partikeln, die hier getestet wurden, waren verschiedene Aerosil[®] Partikel. Aerosil[®] ist amorphes Siliziumdioxid. Dieses wird in der dekorativen Kosmetik als Füllstoff,

in Haut- und Haarpflegemitteln, in Antitranspirantien, als Suspensionsstabilisatoren oder als Kleb- und Dichtstoffe verwendet. Als Fließhilfsmittel ist es im Lebensmittelbereich zugelassen, in Staubform gilt jedoch ein MAK-Wert (maximale Arbeitsplatzkonzentration) von 4 mg/m^3 . Spätestens bei Überschreitung dieses Wertes sollte eine Staubmaske mit Partikelfilter getragen werden.

Um etwaige durch Aerosil[®] verursachte Effekte auf das isolierte Herz mit der Partikeloberfläche korrelieren zu können, verwendeten wir drei verschiedene Arten von Aerosil[®], die sich in der Größe ihrer Oberfläche (Aerosil[®] 90: $90 \text{ m}^2/\text{g}$; Aerosil[®] 200: $200 \text{ m}^2/\text{g}$; Aerosil[®] 380: $380 \text{ m}^2/\text{g}$) unterscheiden. Bei keiner der drei Partikelarten konnte ein Einfluss auf die Herzfrequenz beobachtet werden.

Insgesamt stellt das Langendorff-Modell eine gute Methode zur Untersuchung der Wirkung verschiedenster Teilchen auf die Herzfrequenz und das EKG dar (Tabelle 4.1-1).

Partikelart	Effekte am isolierten Langendorff-Herz
Titandioxid (TiO ₂)	Erhöhung der Herzfrequenz Entstehung von Arrhythmien Ausschüttung von Noradrenalin Produktion von ROS
Printex 90 (P90)	Erhöhung der Herzfrequenz Entstehung von Arrhythmien Ausschüttung von Noradrenalin Produktion von ROS
Latex 40	kein Effekt
GfG-Ruß	Erhöhung der Herzfrequenz Entstehung von Arrhythmien
Aerosil [®] 90	kein Effekt
Aerosil [®] 200	kein Effekt
Aerosil [®] 380	kein Effekt
multiple wall nanotubes (MWNTs)	kein Effekt
single wall nanotubes (SWNTs)	Erniedrigung der Herzfrequenz Entstehung von Arrhythmien

Tabelle 4.1-1: Effekte verschiedener Partikel am isolierten Langendorff-Herz

4.2 Wirkungen von Partikeln auf Herz und Gefäße

Die Assoziation zwischen Umweltstaubbelastung und des vermehrten Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen lässt vermuten, dass Ultrafeinstäube und Nanopartikel extrapulmonale Wirkungen vor allem auf das Herz-Kreislauf-System ausüben können. Der Mechanismus, wie inhalierte Nanoteilchen auf das Herz und die Gefäße wirken, ist bis heute nicht ausreichend bekannt. Es gibt folgende Hypothesen zur Pathophysiologie:

- Indirekte Wirkungen:
 - Die inhalierten Partikel induzieren eine lokale pulmonale Entzündung, welche eine erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes und systemische Inflammationsreaktionen mit Wirkungen auf das Herz und die Gefäße zur Folge haben.
 - Die inhalierten Partikel beeinflussen bronchopulmonale autonome Nervenendungen, was beispielsweise über sympathische Aktivierung Herzrhythmusstörungen auslösen kann.
- Direkte Wirkung:
 - Die inhalierten Partikel translozieren aus der Lunge in den Blutkreislauf und erreichen so unmittelbar die Gefäßwände, das Herz und andere Organe, wo sie direkt an den Zelloberflächen negative Wirkungen hervorrufen können.

Alle drei Hypothesen können unter bestimmten experimentellen Bedingungen in Tierversuchen bestätigt werden: Gold- und Polystyrol-Partikel führen zur Hämolyse, das heißt zur Zerstörungen von Erythrozyten. Ultrafeine Partikel aus Verbrennungsprozessen und Polystyrol führen zu einer Steigerung der Thrombogenität des Blutes [Borm *et al.*, 2006; Oberdörster, 2005]. Schwarze kohlenstoffhaltige Teilchen (carbon black) lösen die Aggregation von Thrombozyten aus und haben außerdem prothrombotische Effekte [Khandoga *et al.*, 2004]. Darüber hinaus können ultrafeine Partikel arteriosklerotische Plaques bei Hasen destabilisieren [Suwa *et al.*, 2002]. Auch über die Beeinflussung des Herzens selbst wurde berichtet. Nanopartikel aus der Dieselmotoremission führen zum Beispiel bei Ratten zur Beeinflussung des Herzschrittmacherzentrums mit sich verändernden Herzfrequenzen [Campen *et al.*, 2003]. Nanopartikel können sogar in die Aortenwand des Herzens eindringen [Westedt *et al.*, 2002].

4.3 Wirkungen von Partikeln auf das Nervensystem

Nanopartikel können über Nervenfasern aufgenommen werden. Schon in den 40er Jahren wurde der transsynaptische Transport von 30 nm großen Polioviren entdeckt. Heute weiß man, dass Nanopartikel, wie zum Beispiel Goldpartikel, Kohlenstoffpartikel, Manganoxid und andere denselben Transportweg benutzen [Borm *et al.*, 2006]. Die Nanopartikel können über den Riechnerv (Nervus olfactorius) und das olfaktorische Epithel ins Gehirn gelangen [Oberdörster *et al.*, 2004]. Auch die systemische Aufnahme über den stärksten Hirnnerv, den Nervus trigeminus, oder über sensorische Nervenfasern im Tracheobronchialtrakt ist vorstellbar. Der Übertritt der Partikel aus dem Blut über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn findet nur in sehr geringen Mengen statt [Oberdörster *et al.*, 2005]. Sind die Partikel allerdings auf bestimmte Art beschichtet oder bestehen bereits Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke, z.B. bei entzündlichen Erkrankungen von Gehirn und Rückenmark, können größere Mengen an Partikeln translozieren [Borm *et al.*, 2006]. In einer Studie mit Mäusen wurden nach der Exposition mit UFP zu einer erhöhten TNF- α -Konzentration gemessen und zudem war die Anzahl dopaminerger Neuronen im Gehirn stark reduziert [Campbell *et al.*, 2005]. Es wurde sogar demonstriert, dass die Exposition von Probanden mit Dieselaabgasen zu funktionellen Veränderungen der Gehirnaktivität und Veränderungen der Hirnströme, das heißt des EEGs, führt [Crüts *et al.*, 2008].

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die Applikation von ultrafeinen Partikeln (TiO₂, P90, GfG-Ruß) an isolierten Herzen zu einer Steigerung der Herzfrequenz führt. Es wurde außerdem bewiesen, dass die Herzfrequenzerhöhung durch eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin aus den Nervenendungen des Herzens hervorgerufen wird. Es ist bekannt, dass im Herzen und den Herzkranzgefäßen zahlreiche Katecholamin-ausschüttende Nervenfasern und β -adrenerge Rezeptoren lokalisiert sind [Cavallotti *et al.*, 2002]. Die Erzeugung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin findet zum größten Teil im Nebennierenmark statt, die Produktion von Dopamin hauptsächlich in den dopaminergen Zellen des Hirnstamms. Die Nervenzellen des sympathischen Nervensystems setzen vorwiegend Noradrenalin frei.

Die Katecholaminmengen in der Perfusionslösung von isolierten Herzen wurden mittels HPLC bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Noradrenalins nach der Applikation von ultrafeinen Partikeln im Vergleich zu unbehandelten Herzen. Das nachgewiesene Noradrenalin muss also vom Herz selbst ausgeschüttet worden sein, das heißt aus den im Herz lokalisierten Enden der Nerven. Der Anstieg von Noradrenalin könnte zu einer

durch eine vermehrte Ausschüttung erklärt werden. Eine andere Erklärung wäre der reduzierte Abbau von Noradrenalin oder die Blockierung der Rückspeicherung des Katecholamins.

Um diese Annahme zu prüfen, wurden Langendorff-Versuche mit Reboxetin durchgeführt. Reboxetin ist ein selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (NARI), der die Transportmoleküle blockiert, die die Rückführung der Neurotransmitter bewerkstelligen. Dadurch verbleiben die Neurotransmitter folglich länger im synaptischen Spalt und können gewünschte Signale mehrfach übertragen. In einem großen Konzentrationsbereich von 2,5 μM bis 75 μM konnte kein Einfluss von Reboxetin auf die Herzfrequenz beobachtet werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Anstieg der Herzfrequenz durch UFP durch eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin aus den Nervenendungen und nicht durch eine stark verminderte Rückspeicherung verursacht wird.

Zur weiteren Untersuchung der partikelvermittelten Noradrenalin-Ausschüttung wurden Experimente mit dem Betablocker Metoprolol durchgeführt. Betablocker wirken auf die β -Rezeptoren und mindern die durch Noradrenalin hervorgerufene Herzfrequenzerhöhung. Wurde der Betablocker vor den Partikeln appliziert, so kam es nach Partikelzugabe nicht mehr zum Anstieg der Herzfrequenz. Dies bedeutet, dass die ausgeschütteten Noradrenalin-Moleküle nicht mehr an die β -Rezeptoren binden und somit auch keinen Herzfrequenzanstieg induzieren können. Wurde der Betablocker nach dem Frequenzanstieg durch UFP zugegeben, kam es zu einer sofortigen Abnahme der Herzfrequenz. Da die Experimente mit Metoprolol nur einen indirekten Beweis für die durch Partikel vermittelte Noradrenalinausschüttung lieferten, wurden weitere Versuche mit Reserpin, das zur Entleerung der Noradrenalin-Speicher führt, unternommen. Bei den Herzen von reserpinisierten Tieren konnte nach Partikelzugabe kein Frequenzanstieg beobachtet werden. Dies ist der eindeutige Beweis, dass der Frequenzanstieg durch die Partikel über die Ausschüttung von Noradrenalin vermittelt wird. Eine direkte Beeinflussung des Schrittmacherzentrums (Sinusknoten) durch UFP ist aufgrund dieser Befunde sehr unwahrscheinlich. Die erhöhte Noradrenalin-Ausschüttung durch UFP könnte auch durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst werden (siehe Kapitel 3.4).

4.4 Eingesetzte Partikelkonzentrationen und Umweltrelevanz

In zahlreichen Studien wurde die Partikelkonzentration von ultrafeinen Partikeln an verschiedenen Orten, wie z.B. an viel befahrenen Straßen, gemessen. Allerdings wird meist die Massenkonzentration der Partikelmenge gemessen. In nur wenigen Studien wird die Konzentration in Teilchen/cm³ (Partikel/Volumen) bestimmt. Eine solche Studie in London zeigte zum Beispiel, dass die belastete Luft nahe einem Lastkraftwagen $4,4 \cdot 10^5$ UFP/cm³ enthielt [Kaur *et al.*, 2006]. In einer anderen Veröffentlichung [Diapouli *et al.*, 2008] wurden $2 \cdot 10^5$ UFP/cm³ in einem auf großen Hauptstraßen Athens fahrenden Auto gemessen.

In den hier durchgeführten Langendorff-Experimenten wurden Partikelkonzentrationen von $0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml bis $8 \cdot 10^9$ Partikel/ml eingesetzt. Diese Konzentrationen wurden mit den Daten der veröffentlichten Studie aus Athen verglichen. Für diesen Vergleich wurde ein Respirationsvolumen von 7 Litern pro Minute und eine Lungenperfusion von 5 Litern pro Minute angenommen. Des Weiteren wurde angenommen, dass 50 % der inhalierten Partikel von der Lunge zurückgehalten werden und 1 % der restlichen Menge in den Blutstrom transloziert. Aufgrund dieser Annahme wurde eine Aufnahme von $7 \cdot 10^6$ Partikeln pro Minute in den Blutstrom oder eine erneute Aufnahme von $1,4 \cdot 10^3$ Partikeln pro Kubikzentimeter Blut während jedem Durchfluss durch die Lunge berechnet.

Der Übertritt dieser Partikelmengen und die Belastung des Herzgewebes hängen natürlich auch stark von der angenommenen Clearance, d.h. der Beseitigung der Partikel aus dem Blutstrom, ab. Allerdings gibt es nur sehr wenige Daten über die Clearance der Partikel. Eine der wenigen Studien deutet auf ein langes Persistieren der Partikel im Körper hin [Semmler *et al.*, 2004]. Die Halbwertszeit der hier verwendeten Iridium-Partikel beträgt 70 Tage.

Wenn die Partikel vorwiegend im Blutstrom verweilen würden, wäre es eine vorsichtige Schätzung anzunehmen, dass die in 10 Tagen aufgenommene Dosis mindestens der dauernden im Blut befindlichen Partikelmenge entspricht. Die Aufnahme von $7 \cdot 10^6$ Partikeln pro Minute würde dann in einer Gesamtmenge von $1 \cdot 10^{11}$ Partikeln innerhalb von 10 Tagen und in einer Konzentration im Blut von $2 \cdot 10^7$ Partikeln/cm³ resultieren. Somit wäre die niedrigste in dieser Arbeit verwendete Partikelkonzentration ($0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) um ein 50-faches höher als die in Athen gemessene umweltrelevante Konzentration.

Falls man nun annimmt, dass die Partikel schnell aus dem Blutstrom beseitigt werden und sich in den Geweben ablagern, muss die erneute Aufnahme von $1,4 \cdot 10^3$ Partikeln pro Kubikzentimeter Blut ausgeglichen in die Zielorgane erfolgen. Dies ist wahrscheinlich auch von den Perfusionsraten der jeweiligen Organe abhängig. Die Herzperfusion des menschlichen Herzens beträgt durchschnittlich 250 ml pro Minute. Dies ergäbe eine Ablagerung im Herzen

von $3,5 \cdot 10^5$ Partikeln pro Minute. Die aufgenommene Menge innerhalb von 10 Tagen läge dann bei $5 \cdot 10^9$ Partikeln in einem Herz mit einem Gewicht von 300 Gramm. Dies entspräche einer Menge von $1,66 \cdot 10^7$ Partikeln pro Gramm Herzgewebe. Die niedrigste verwendete Konzentration ($0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) entspricht folglich einer Gesamtmenge von $2,4 \cdot 10^{10}$ Partikeln in 30 ml Perfusionslösung. Eine Deposition von 10 % während der Experimentzeit ergäbe dann eine Konzentration von $2,4 \cdot 10^9$ Partikeln pro Gramm Herzgewebe. Das Herzgewicht eines Meerschweinchens beträgt etwa ein Gramm, was bedeutet, dass die verwendete Dosis etwa 150-fach höher ist als die für den Menschen unter Umweltbedingungen erwartete Dosis.

In dieser Arbeit wurde als Konzentration Partikel/ml anstelle der üblichen mg/ml verwendet. Eine Abschätzung des verwendeten Anteils der eingewogenen Teilchenmasse/ml mittels des Absorptionsfaktors der Suspension ergab, dass unsere höchste Konzentration in etwa $0,8 \mu\text{g/ml}$ anstelle der in der Literatur angegebenen üblichen 10, 50 und $100 \mu\text{g/ml}$ betrug [Bagate *et al.*, 2006].

Die in dieser Arbeit verwendete Partikelkonzentration führt bereits bei nicht vorbelasteten Herzen zu gravierenden Veränderungen der Herzfrequenz und zur Entstehung von Arrhythmien. Es ist daher auch denkbar, dass sich die Effekte bei Populationen mit bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen noch verstärken.

4.5 Potentielle Primärwirkungen von ultrafeinen Partikeln

Neben der durch UFP verursachten Herzfrequenzerhöhung durch vermehrte Noradrenalinausschüttung am isolierten Herz konnten in dieser Arbeit weitere potentielle Primärwirkungen von UFP gezeigt werden.

Die UFP verursachen Veränderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration isolierter Herzzellen und Neuronen. Außerdem kommt es durch die Applikation von UFP zu einer vermehrten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies.

4.5.1 Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf die Calciumregulation isolierter Herzzellen

Für die Kontraktionskraft des Herzens ist die Calciumregulation besonders wichtig. Ist diese Regulation gestört, kommt es zur Verminderung der Herzleistung und zur Entstehung der Herzinsuffizienz. Das Absterben von Kardiomyozyten durch Apoptose und Störungen der

Calciumhomöostase sind pathologische Merkmale der chronisch ischämischen Herzinsuffizienz und des Myokardinfarktes.

In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob UFP einen Einfluss auf die Calciumhomöostase in isolierten Herzzellen ausüben, was sich bei Risikogruppen, d.h. zum Beispiel bei Menschen mit bestehender Herzinsuffizienz, negativ auswirken kann. Bei den Versuchen mit isolierten Herzzellen zeigte sich, dass UFP sowohl den $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten als auch die Calciumkonzentration in den Kontraktionspausen, das Ruhe-Calcium, beeinflussen. Die Überströmung der Herzzellen mit UFP-Suspensionen führte zu einer Reduzierung des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten. Diese Wirkung der Partikel beruht eventuell auf einer Reduzierung des Calciumeinwärtsstroms, der bei der Entstehung des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten maßgeblich beteiligt ist. Bei einer elektrischen Stimulation der Zelle wird die Zellmembran depolarisiert und es strömen extrazelluläre Calciumionen durch Calciumkanäle ins Zellinnere. Die einströmenden Calciumionen führen zu einer Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), dem so genannten „calcium-induced calcium-release“. Die einströmenden extrazellulären und die durch das SR freigesetzten Calciumionen ergeben zusammen den $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten nach einer Stimulation [Lipp *et al.*, 1992]. Je mehr Calciumionen einströmen, desto höher ist die Anzahl der aus dem SR freigesetzten Calciumionen [Fabiato, 1983]. Wenn der Calciumeinstrom durch die UFP vermindert wird, führt dies zu einer geringeren Freisetzung von Calcium aus dem SR und folglich zu einer Reduzierung des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten. Eine anderer Wirkmechanismus wäre, dass die UFP in die Zelle gelangen und dort die Rückspeicherung in das SR vermindern, was dann zu einer geringeren Freisetzung aus dem SR bei der Stimulation führen würde. Diese Reduzierung des $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten führt zu einer Verminderung der Kontraktionskraft des Herzens, da diese von der Höhe des freien intrazellulären Calciums abhängt.

Der zweite durch die Partikel beobachtete Effekt war eine Erhöhung des Ruhe-Calciums, das heißt der freien intrazellulären Calciumkonzentration in den Kontraktionspausen. Diese Erhöhung kann Apoptose auslösen [Mattson *et al.*, 2003]. Für den Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ könnte ebenfalls die verminderte Speicherung von Calcium im SR verantwortlich sein, was zu einer Dauererhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen würde. Weiter könnte eine direkte oder indirekte Hemmung der Calciumelimination für die Erhöhung des diastolischen Calciums verantwortlich sein. Denkbar wäre eine Beeinträchtigung der Funktion des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers oder der membranären Calciumpumpe. Aber auch eine Hemmung der Na^+ - K^+ -Pumpe (Na^+ - K^+ -ATPase) durch die Partikel könnte über die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration zu einer schlechteren Effizienz des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers

führen. Um die intrazelluläre Seite der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe beeinflussen zu können, müssten die Partikel ins Zellinnere gelangen. Aber auch die Wirkung auf extrazellulärer Seite wäre denkbar. Allerdings sollte es bei einer reinen hemmenden Wirkung auf die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe zumindest vorübergehend zu einer Kontraktionskraft-steigernden und entsprechend zu einer Zunahme des Calcium-Transienten wie unter dem Einfluss von Digitalis-Glykosiden kommen.

4.5.2 Wirkung von ultrafeinen Partikeln auf die Calciumregulation in neuronalen Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass UFP zu einer Ausschüttung von Noradrenalin aus den Nervenendungen des Herzens führen, wurde untersucht, ob mit diesem Effekt auch eine Änderung der Calciumregulation einhergeht. Dazu wurden Neuronen in Zellkultur verwendet. Bei Exposition der Neuronen mit P90 und TiO_2 zeigte sich eine Zunahme der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Diese kann durch einen vermehrten Einstrom durch die Zellmembran oder eine vermehrte Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum erklärt werden. Auch könnten die UFP zu einer Verminderung von ATP führen und somit zu einer reduzierten Funktion der membranären Pumpen. Der Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Kanäle ist ein typischer Mechanismus zur Ausschüttung von Katecholaminen [Berridge, 1998; Mahapatra *et al.*, 2004; Douglas, 1968; Mahata *et al.*, 1997]. Da ultrafeine Partikel zu einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen führen, ließe sich auch eine erhöhte freie intrazelluläre Calciumkonzentration in Neuronen dadurch erklären. Eine Wirkung von UFP auf das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in anderen Zellen wurde in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt. Einige Studien zeigen, dass UFP sowohl in humanen Zelllinien als auch in bronchoalveolaren Zellen und Makrophagen von Ratten zu Veränderungen im Calcium-Signaling führen [Stone *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2001]. Auch konnte gezeigt werden, dass UFP nur einen geringen, aber signifikanten Einfluss auf zytosolische Calciumkonzentrationen von Makrophagen besitzen. Der vollständige Effekt von UFP auf Makrophagen wurde allerdings erst nach Zugabe eines zweiten Stimulus beobachtet. Die Gabe von Thapsigargin, welches die Calciumspeicher des endoplasmatischen Retikulums entleert, initiiert den Einstrom von extrazellulärem Calcium durch membranäre Calciumkanäle. Die Partikel verstärken diesen „calcium release-activated calcium current“ entlang der Plasmamembran um das 2,5-fache. Diese Daten lassen vermuten, dass die Partikel beim Vorhandensein eines zweiten Stimulus, wie zum Beispiel inflammatorischen Mediatoren, einen gravierenden Effekt auf die intrazellulären Calciumsignalwege ausüben.

Der exakte Mechanismus, durch den UFP in der Lage sind, den Calciumeinstrom zu verstärken, bleibt allerdings ungeklärt. Einen wichtigen Einfluss könnten auch die durch UFP erzeugten radikalen Sauerstoffspezies ausüben. Zum Beispiel führte die Zugabe von Antioxidantien in den Versuchen mit Makrophagen zu einer deutlichen Verringerung des Anstiegs des freien intrazellulären Calciums.

4.5.3 Nachweis und Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch UFP

Bei einem freien Radikal handelt es sich um eine chemische Verbindung oder ein einzelnes Element, welches mit unpaarigen Elektronen existieren kann. Durch die Reduktion von Sauerstoff und Elektronenaufnahme können aus Sauerstoff zwei Arten von freien Radikalen entstehen. Bei der aeroben Verstoffwechslung von Sauerstoff im Körper entstehen diese Radikale ständig. Sie werden durch antioxidative Schutzmechanismen in verschiedenen Kompartimenten intra- und extrazellulär durch Katalyse abgebaut. Kommt es zu einer vermehrten Sauerstoffradikalbildung, spricht man von oxidativem Stress. Dieser wird aufgrund seiner Gewebetoxizität als wichtiger Mechanismus bei der Entstehung zahlreicher Krankheitsbilder eingestuft.

Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies gestaltet sich allerdings schwierig. Da die Halbwertszeit der Moleküle sehr kurz ist, gibt es nur wenige Methoden zum Nachweis von ROS. Erste Versuche zur Bestimmung von ROS auf zellulärer Ebene wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hier zeigte sich allerdings, dass diese Methode bei unseren Versuchen nicht sensitiv genug war. Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung wäre zum Beispiel die quantitative Bestimmung der Antioxidantien [Bassenge *et al.*, 2000] oder der Lipidperoxidation im Gewebe. Allerdings können so nur Produkte der Reaktion von ROS mit zellulären Elementen nachgewiesen werden und somit lässt sich keine Aussage über die Freisetzung im gesamten Organ, bzw. Herzen treffen. Auch gelten viele Methoden zur ROS-Bestimmung als sehr unspezifisch. Die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) hingegen ist direkter und weniger artefaktanfällig [Munzel *et al.*, 2002] und ermöglicht einen sehr sensitiven und genauen Nachweis von ROS. Die neuartige Spin-Sonde CMH (1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine) wird durch ROS oxidiert und bildet somit stabile paramagnetische, im ESR signalaktive Moleküle. Die Halbwertszeit von CMH beträgt einige Stunden und ermöglicht ein „Scavenging“ mit einer Reaktionsrate von $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Auch gegen die Reduktion zu einem signalinaktiven Molekül ist CMH weniger anfällig [Dikalov *et al.*, 1998].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ESR-Methode gegenüber bisherigen Verfahren zur ROS-Bestimmung einen direkten und spezifischen Nachweis der Radikale ermöglicht. Auch bei Studien an isolierten Organen, wie der Lunge [Weissmann *et al.*, 2005] und der Niere [Sammelmann *et al.*, 2007] erwies sich die Methode als gut geeignet. Ebenso ist die Methode auch bei Studien an einzelnen Zellen einsetzbar. Zum Beispiel konnte ROS *in vitro* an Herzmuskelzellen bestimmt werden [Bassenge *et al.*, 2000]. Die Methode der ESR eignete sich also auch zur Bestimmung von ROS am isolierten Herzen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kommt es bei der Exposition mit UFP zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) in isolierten Meerschweinchenherzen. Die Produktion von ROS spielt eine wichtige Rolle bei zytotoxischen Effekten, die z.B. durch einatembare Dieselrußpartikel (DEP) und andere Stäube verursacht werden [Knaapen *et al.*, 2004]. Durch Partikel verursachter oxidativer Stress kann mehrere Ursachen haben:

Das Vorhandensein von freien Radikalen und Oxidantien auf der Partikeloberfläche selbst kann zur Entstehung von ROS führen [Fubini *et al.*, 2004]. Sobald sich lösliche Übergangsmetalle, wie z.B. Eisen oder Kupfer, auf der Partikeloberfläche befinden, kommt es zur Entstehung von ROS mittels der so genannten Fenton-Reaktion. Auch eine große Zahl von organischen Molekülen auf der Oberfläche von Kohlenstoffpartikeln ist in der Lage ROS zu generieren. Eine anderer Erklärung für die Entstehung von ROS liegt in der veränderten Funktion von Mitochondrien oder der NADPH-Oxidase [Li *et al.*, 2003]. Mitochondrien spielen zum einen eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus, zum anderen sind sie essentiell zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotentials und bedeutend für die Calciumhomöostase und Apoptose. ROS entstehen hauptsächlich in den Mitochondrien und die Mitochondrien können andererseits auch durch diese geschädigt werden. Wenn die verwendeten Partikel die Mitochondrien schädigen, könnte dies also zu einer erhöhten Produktion von ROS führen. Um die Mitochondrien selbst zu schädigen, müssten die Partikel in das Zellinnere gelangen.

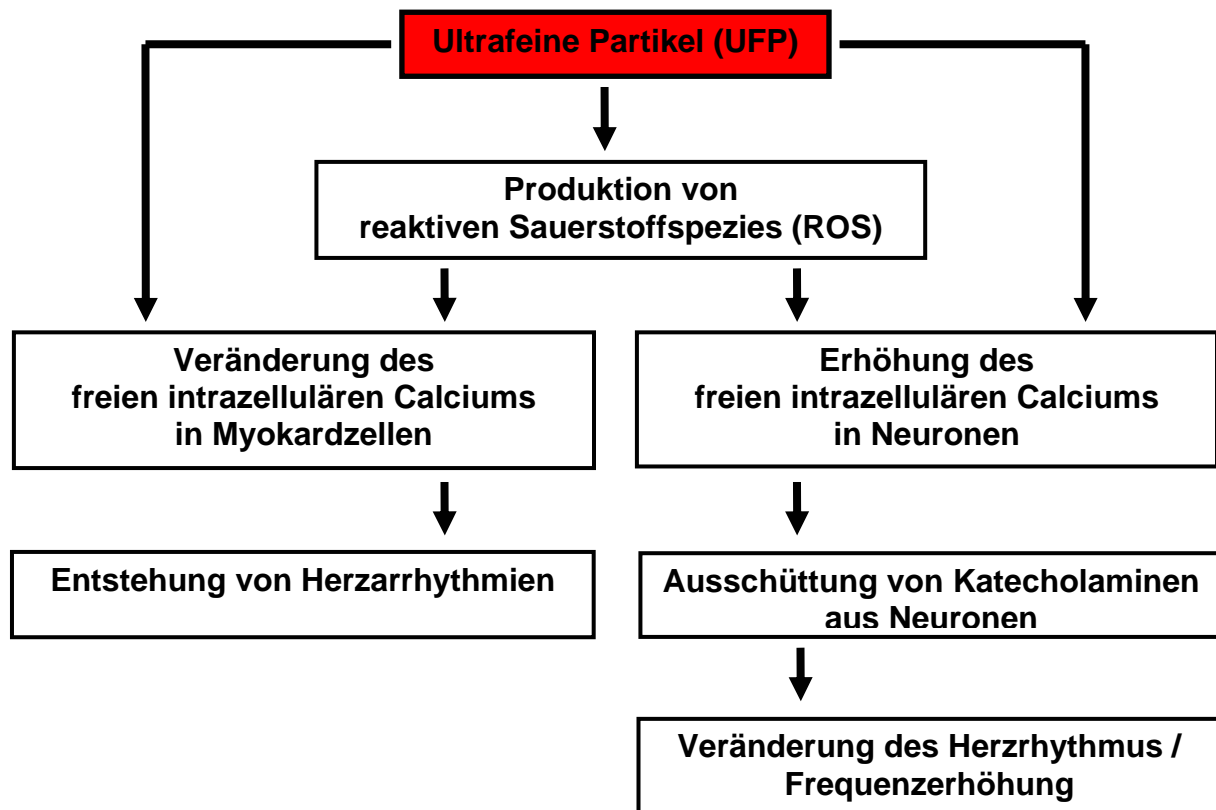
Auch die Aktivierung von inflammatorischen Zellen kann zur Generierung von ROS führen, was allerdings in den hier durchgeführten Experimenten am Langendorff-Herz nicht in Betracht kommt, da es aufgrund der kurzen Experimentdauer am isolierten Herzen nicht zu Entzündungsprozessen kommt.

Eine übermäßige partikelvermittelte Generation von ROS, die das antioxidative Abwehrsystem überwindet, kann zelluläre Biomoleküle oxidieren. Diese freien Radikale sind dann sogar in der Lage, eine große Anzahl von DNA-Modifikationen, wie zum Beispiel die Oxidation von Basen, zu verursachen.

Eine weitere Erklärung für die Entstehung von ROS am isolierten Herzen könnte in der Autooxidation von Katecholaminen liegen. Die Autooxidationsreaktionen von Katecholaminen stellen eine wichtige endogene Quelle von Superoxidradikalen und anderen toxischen Radikalen dar [Bindoli *et al.*, 1989]. Bei vermehrter Katecholaminbildung und Katecholaminausschüttung werden die Autooxidationsprozesse und die damit verbundene Bildung verschiedener Sauerstoffradikale beschleunigt. Über eine durch Sauerstoffradikale verursachte Herzschädigung bei erhöhten Katecholaminkonzentrationen wurde berichtet [Jiang *et al.*, 1990].

Um zu prüfen, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhter Herzfrequenz und erhöhter Entstehung von ROS gibt, wurden Langendorff-Versuche mit dem Einsatz von TBHP (*tert*-Butylhydroperoxid) durchgeführt. TBHP ist eine pro-oxidative Substanz und wird für Studien der Mechanismen von zellulären Veränderungen, die durch die freie Radikale hervorgerufen werden, verwendet [Martin *et al.*, 2001]. Nach Zugabe von TBHP am isolierten Herz konnten wir einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz beobachten. Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass der durch UFP verursachte Anstieg der Herzfrequenz durch eine erhöhte ROS-Produktion und der Wirkung von ROS auf Neuronen hervorgerufen wird.

4.6 Mögliche Zusammenhänge der durch Partikel verursachten Veränderungen des Herzrhythmus



4.7 Ausblick

Das Langendorff-Herz zeigte sich als ein selektives Testmodell zur Untersuchung der Toxizität verschiedener ultrafeiner Partikel.

Ein Teil der untersuchten UFP hat keinen Einfluss auf die Herzfunktion, der andere führt zu einer Herzfrequenzerhöhung und zur Entstehung von Arrhythmien. Dies geschieht in Abhängigkeit der Teilchenart und Konzentration. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin aus den Nervenendungen des Herzens eine Ursache des Herzfrequenzanstiegs während der Partikelapplikation. Fraglich bleibt allerdings, ob der Herzfrequenzanstieg auch mit einem verminderten Reuptake von Noradrenalin zusammenhängt. Um dies zu klären, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, bei denen ein selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer verwendet wird.

Zum mechanistischen Verständnis sollten weitere Versuche mit Neuronen durchgeführt werden, die Aufschluss darüber geben, wie es durch UFP zur Ausschüttung von Noradrenalin kommen kann. Besonderes Augenmerk sollte man hierbei auf die Calciumhomöostase richten, die für die Ausschüttung von Katecholaminen von Bedeutung ist.

Außerdem wäre es wichtig, den Zusammenhang zwischen der durch UFP verursachte ROS-Produktion und der Herzfrequenzerhöhung zu untersuchen. Auch hier sollten Versuche mit Neuronen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob die Entstehung von ROS mit einer erhöhten Noradrenalinausschüttung einhergeht.

Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob die Toxizität von Nanopartikeln oder Nanotubes zum Beispiel mit deren Größe, deren Oberfläche oder deren Ladung zusammenhängt, wäre es zweckmäßig weitere unterschiedliche Teilchenarten zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Selektivität des Langendorff-Systems als Testmodell für die Wirkung von ultrafeinen Partikeln (UFP) auf das isolierte Herz zu überprüfen. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Mechanismen für die Herzfrequenzerhöhung durch bestimmte UFP verantwortlich sind.

Um herauszufinden, ob das Langendorff-System ein selektives System zur Untersuchung der Wirkung von Partikeln darstellt, wurden verschiedene Partikelarten hinsichtlich ihrer Wirkung auf das isolierte Herz getestet. Eine Herzfrequenzerhöhung und die Entstehung von Arrhythmien konnte durch die Applikation von Titandioxid (TiO₂) und Printex 90 (P90) beobachtet werden. Auch GfG-Ruß, d.h. in einem so genannten Graphitfunkengenerator (Palas) künstlich erzeugte Modellruß-Aerosole, führte zu einer Herzfrequenzerhöhung. Latex- und Aerosil®-Partikel hingegen zeigten keinen Einfluss auf die Herzfrequenz. Nanotubes zeigten unterschiedliche Effekte. Single wall nanotubes (SWNTs) führten zu einer erheblichen Abnahme der Herzfrequenz, während multiple wall nanotubes (MWNTs) die Herzfrequenz überhaupt nicht veränderten.

Die unterschiedlichen Wirkungen der verschiedenen Partikel belegen folglich die Selektivität des Langendorff-Modellsystems.

Die Untersuchungen zu möglichen Mechanismen der partikelvermittelten Herzfrequenzerhöhung gingen davon aus, dass die autonome Zunahme der Herzfrequenz durch eine vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen verursacht wird, da Katecholamine bei der Frequenzregulation eine zentrale Rolle spielen.

Die quantitative Bestimmung der Katecholaminkonzentration in der Herzperfusionslösung zeigte insbesondere einen signifikanten Anstieg von Noradrenalin. Dieser Anstieg der Noradrenalinkonzentration wurde nur bei Versuchen mit Partikeln beobachtet, die auch zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führen. Bei den Partikeln, die keinen Einfluss auf die Herzfrequenz hatten, blieb die Noradrenalinkonzentration hingegen unverändert.

Die These, dass die Freisetzung von Noradrenalin den partikelinduzierten Anstieg der Herzfrequenz vermittelt, wurde experimentell belegt. Hierzu wurde zum einen der Betablocker Metoprolol eingesetzt. Bei Zugabe von Metoprolol vor der Partikelapplikation konnte nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Herzfrequenz beobachtet werden. Durch die Blockade der Rezeptoren kann das während der Zirkulation in der Perfusionslösung befindliche und durch UFP vermehrt ausgeschüttete Noradrenalin nicht mehr zu einer Herzfrequenzerhöhung führen. Zum anderen wurden Versuche mit Reserpin-Vorbehandlung der Tiere vor

Organentnahme durchgeführt. Reserpin bewirkt die Entleerung der Katecholaminspeicher. Bei diesen Versuchen führten die Partikel nicht mehr zum Anstieg der Herzfrequenz.

Somit konnte eindeutig belegt werden, dass die erhöhte Schlagfrequenz des isolierten Herzens durch Katecholamine hervorgerufen wird.

Die vermehrte Katecholaminfreisetzung kann mittels einer durch UFP hervorgerufenen erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) initiiert werden.

Daher wurde die Konzentration von ROS im Herzgewebe mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass im Gegensatz zu Kontrollgewebe in partikelbelastetem Gewebe die Konzentration von ROS höher war. Es ist daher denkbar, dass die Katecholaminausschüttung indirekt durch die Entstehung von ROS verursacht wird.

ROS wird hauptsächlich in den Mitochondrien erzeugt und beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse und Signalwege. So ist ROS auch in der Lage, die Calciumhomöostase von Zellen zu beeinflussen. Der Calciumgehalt von Neuronen ist für die Speicherung von Katecholaminen in diesen von essentieller Bedeutung. Die Calciumkonzentration in einzelnen Neuronen wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es durch Partikelapplikation zu einem Anstieg des freien intrazellulären Calciums kommt. Möglicherweise führt dies zur vermehrten Speicherung von Katecholaminen, was wiederum zu einer vermehrten Ausschüttung führen könnte.

Auch in isolierten Herzzellen wurden durch UFP Veränderungen in der Calciumkonzentration beobachtet. Zum einen kommt es zur Erhöhung des Ruhe-Calciums zwischen den Kontraktionen, zum anderen zur Reduktion des Calcium-Transienten. Diese Veränderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentrationen, die wiederum andere Ionenkanäle beeinflussen, könnten die unter Partikelexposition entstehenden Arrhythmien erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Langendorff-Modell ein selektives Testsystem für die Wirkung von Partikeln auf das Herz darstellt. Ein großer Vorteil ist die Möglichkeit der Untersuchung der Wirkung von Partikeln auf das isolierte Herz ohne Einflüsse von anderen Organen. Des Weiteren ist das Langendorff-Modell ein guter Ansatzpunkt zur Aufklärung des durch Partikel vermittelten Mechanismus der Herzfrequenzerhöhung.

6 Literaturverzeichnis

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (1999).

Richtlinie 1999/30/EG des Rates.

Grenzwerte für Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid und Stickstoffoxide,
Partikel und Blei in der Luft.

Araujo, J.A., Barajas, B., Kleinman, M., Wang, X., Bennett, B.J., Gong, K.W., Navab, M., Harkema, J., Sioutas, C., Lulis, A.J., Nel, A.E. (2008).

Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress.

Circ Res 102: 589-596.

Archer, S. (1993).

Measurement of nitric oxide in biological models.

FASEB J 7: 349-360.

Bagate, K., Meiring, J.J., Gerlofs-Nijland, M.E., Cassee, F.R., Wiegand, H., Osornio-Vargas, A., Borm, P.J.A. (2006).

Ambient particulate matter affects cardiac recovery in a Langendorff ischemia model.

Inhal Toxicol 18: 633-643.

Barry, W.H., Bridge, J.H.B. (1993).

Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes.

Circulation 87(6): 1806-1815.

Bassenge, E., Sommer, O., Schwemmer, M., Bunger, R. (2000).

Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 279: H2431-H2438.

Bauch, H.J., Kelsch, U., Hauss, W.H. (1986).

Einfache, schnelle, selektive und quantitative Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma durch Kombination von Flüssigextraktion, HPLC-Trennung und elektrochemischer Detektion.

J Clin Chem Clin Biochem 24: 651-658.

Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K.L., Schuhmann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmeier, K., Bors, W., Ghio, A., Samet, J.M., Heyder, J. (2005).

Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles.

Free Radic Biol Med 38(8): 1080-1092.

Bendukidze, Z.A., Isenberg, G., Klöckner, U. (1985).

Ca-tolerant guinea-pig ventricular myocytes as isolated by pronase in the presence of 250 microM free calcium.

Basic Res Cardiol 80 (Suppl 1): 13-17.

Bendukidze, Z.A., Lopatin, A.N., Ignat'eva, V.B., Sokolova, S.N. (1985).

Method for isolating single cardiac cells in the guinea pig using pronase. The role of calcium ions.

Biull Eksp Biol Med 99(6): 762-764.

Berridge, M.J. (1998).

Neuronal calcium signalling.

Neuron 21: 13-26.

Bindoli, A., Rigobello, M.P., Galzigna, L. (1989).

Toxicity of aminochromes.

Toxicol Lett 48(1): 3-20.

Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusche, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdörster, E. (2006).

The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.

Part Fibre Toxicol 3: 1-35.

Bräuner, E.V., Forchhammer, L., Moeller, P., Simonsen, J., Glasius, M., Wahlin, P., Raaschou-Nielsen, O., Loft, S. (2007).

Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stress-induced DNA damage.

Environmental Health Perspectives 115(8): 1177-1182.

Brawn, K., Fridovich, I. (1980).

Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense.

Acta Physiol Scand (Suppl) 492: 9-18.

Brown, J.S., Zeman, K.L., and Bennett, W.D. (2002).

Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung.

Am J Respir Crit Care Med 166 (9): 1240-1247.

Cadenas, E., Davies, K.J. (2000).

Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.

Free Radic Biol Med 29: 222-230.

Campbell, A., Oldham, M., Becaria, A., Bondy, S.C., Meacher, D., Sioutas, C., Misra, C., Mendez, L.B., Kleinman, M. (2005).

Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain.

Neurotoxicology 26: 133-140.

Campen, M.J., McDonald, J.D., Gigliotti, A.P., Seilkop, S.K., Reed, M.D., Benson, J.M. (2003).

Cardiovascular effects of inhaled diesel exhaust in spontaneously hypertensive rats.

Cardiovasc Toxicol 3: 353-361.

Cannell, M.B. (1991).

Contribution of sodium-calcium exchange to calcium regulation in cardiac muscle.
Ann N.Y. Acad Sci 634: 428-443.

Carafoli, E. (1985).

The homeostasis of calcium in heart cells.
J Mol Cell Cardiol 17: 203-212.

Cavallotti, C., Bruzzone, P., Mancone, M. (2002).

Catecholaminergic nerve fibers and beta-adrenergic receptors in the human heart and coronary vessels.
Heart Vessels 17(1): 30-35.

Chan, L.Y., Lau, W.L., Lee, S.C., Chan, C.Y. (2002).

Commuter exposure to particulate matter in public transportation modes in Hong Kong.
Atmospheric Environment 36: 3363-3373.

Crüts, B., van Etten, L., Törnqvist, H., Blomberg, A., Sandström, T., Mills, N.L., Borm, P.J. (2008).

Exposure to diesel exhaust induces changes in EEG in human volunteers.
Part Fibre Toxicol 5: 4-8.

Csapo, G. (1980).

Konventionelle und intrakardiale Elektrokardiographie.
CIBA-GEIGY GmbH, Wehr / Baden.

Dart, A.M., Dietz, R., Hieronymus, K., Kübler, W., Mayer, E., Schömig, A., Strasser, R. (1984).

Effects of alpha and beta adrenoceptor blockade on the neurally evoked overflow of endogenous noradrenaline from the rat isolated heart.
Br J Pharmacol 81: 475-478.

Dart, A.M., Schömig, A., Dietz, R., Mayer, E., Kübler, W. (1984).

Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part B: Effect of sympathetic nerve stimulation.
Circ Res 55: 702-706.

De Lorenzo, A., Darin, A.J. (1970).

The olfactory neuron and the blood-brain barrier.
In: Taste and Smell in Vertebrates.
editors: Wolstenholme, G.E.W. and Knight, J., London-Churchill, 151-176.

Del Maestro, R.F. (1980).

An approach to free radicals in medicine and biology.
Acta Physiol Scand (Suppl) 492: 153-168.

Diapouli, E., Grivas, G., Chaloulakou, A., Spyrellis, N. (2008).

PM10 and ultrafine particles counts in-vehicle and on-road in the Athens area.
Water Air Soil Pollut Focus 8:89-97.

Dikalov, S., Fink, B., Skatchkov, M., Sommer, O., Bassenge, E. (1998).

Formation of reactive oxygen species in various vascular cells during glyceryltrinitrate metabolism.
J Cardiovasc Pharmacol Ther 3: 51-62.

Dikalov, S., Griendling, K.K., Harrison, D.G. (2007).

Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies.
Hypertension 49: 1-11.

Dikalov, S., Grigor'ev, I.A., Voinov, M., Bassenge, E. (1998).

Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation.
Biochem Biophys Res Commun 20; 248: 211-215.

Dikalov, S., Li, W., Mehranpour, P., Wang, S.S., Zafari, A.M. (2007).

Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay.

Biochem Pharmacol 73(7): 972–980.

Dockery, D.W., Pope, C.A., Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Jr., Speizer, F.E. (1993).

An association between air pollution and mortality in six U.S. cities.

N Engl J Med 329: 1753-1759.

Donaldson, K., Li, X.Y., MacNee, W. (1998).

Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury.

J Aerosol Sci 29: 553-560.

Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J., Jimenez, L.A., Gilmour, P.S., Schins, R.P., Knaapen, A.M., Rahman, I., Faux, S.P., Brown, D.M., MacNee, W. (2003).

Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀).

Free Radic Biol Med 34(11): 1369-1382.

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., and MacNee, W. (2001).

Ultrafine particles.

Occup Environ Med 58(3): 211-216.

Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., MacNee, W. (2001).

Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms.

Environmental Health Perspectives 109: 523-527.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W., and Borm, P.J. (2004).

Nanotoxicology.

Occup Environ Med 61(9): 727-728.

Douglas, W.W. (1968).

Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromafin and other cells.
Br J Pharmacol 34(3):451-474.

Dröge, W. (2002).

Free radicals in the physiological control of cell function.
Physiol Rev 82: 47-95.

Duci, A., Chaloulakou, A., Spyrellis, N. (2003).

Exposure to carbon monoxide in the Athens urban area during commuting.
The Science of the Total Environment 309: 47-58.

Ehrenreich, H., Schuck, J., Stender, N., Pilz, J., Gefeller, O., Schilling, L., Poser, W., Kaw, S. (1997).

Endocrine and hemodynamic effects of stress versus systemic CRF in alcoholics during early and medium term abstinence.
Alcohol Clin Exp Res 21(7): 1285-1293.

Fabiato, A. (1983).

Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.
Am J Physiol 245: 1-14.

Fattman, C.L., Schaefer, L.M., Oury, T.D. (2003).

Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine.
Free Radic Biol Med 35: 236-256.

Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000).

Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.
Nature 408: 239-247.

Fubini, B., Fenoglio, I., Ceschino, R., Ghiazza, M., Martra, G., Tomatis, M., Borm, P.J., Schins, R., Bruch, J. (2004).

Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity *in vitro* and *in vivo*.

Int J Hyg Environ Health 207: 89-104.

Fukai, T., Folz, R.J., Landmesser, U., Harrison, D.G. (2002).

Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease.

Cardiovasc Res 55: 239-249.

Griffin, P.P., Schubert-Zsilavec, M., Stark, H. (2004).

Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren.

In: Pharmazie in unserer Zeit. Bd. 33, Nr. 6: 442–449.

Gulliver, J., Briggs, D.J. (2004).

Personal exposure to particulate air pollution in transport microenvironments.

Atmospheric Environment 38: 1-8.

Gumbleton, M. (2001).

Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium.

M Adv Drug Delivery Rev 49(3): 281-300.

Halliwell, B. (1993).

The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system.

Haemostasis 23 (Suppl 1): 118-126.

Hammond, D.M., Lalor, M.M., Jones, S.L. (2007).

In-vehicle measurement of particle number concentrations on school buses equipped with diesel retrofits.

Water, Air & Soil Pollution 179: 217-225.

Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003).

Role of oxidative stress in atherosclerosis.

Am J Cardiol 91: 7A-11A.

Harrison, R.M., Yin, J. (2000).

Particulate matter in the atmosphere: Which particle properties are important for its effects on health?

Science of the Total Environment 249: 85-101.

Hintzenberger, R., Jennings, S.G., Larson, S.M., Dillner, A., Cachier, H., Galambos, Z., Rouc, A., Spain, T.G. (1999).

Intercomparison of measurement methods of black carbon aerosols.

Atmospheric Environment 33: 2823-2833.

Ibald-Mulli, A., Wichmann, H.E., Kreyling, W., Peters, A. (2002).

Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles.

J Aerosol Med 15: 189-201.

Jaques, P.A., Kim, C.S. (2000).

Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women.

Inhal Toxicol 12: 715-731.

Jiang, J.P., Downing, S.E. (1990).

Catecholamine cardiomyopathy: review and analysis of pathogenetic mechanisms.

Yale J Biol Med 63(6): 581-591.

Kang, J.L., Moon, C., Lee, H.W., Park, E.M., Kim, H.S., Castranova, V. (2008).

Comparison of the biological activity between ultra fine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress.

J Toxicol Environ Health A 71(8): 478-485.

Kaur, S., Clark, R.D.R., Walsh, P.T., Arnold, S.J., Colvile, R.N., Nieuwenhuijsen, M.J. (2006).

Exposure visualization of ultrafine particle counts in a transport microenvironment.
Atmospheric Environment 40(2): 386-398.

Kaur, S., Nieuwenhuijsen, M.J., Colvile, R.N. (2005).

Personal exposure of street canyon intersection users to PM_{2.5}, ultrafine particle counts and carbon monoxide in central London, UK.
Atmospheric Environment 39: 3629-3641.

Kerminen, V.M., Makela, T.E., Ojanen, C.H., Hillmano, R.E., Vilhunen, J.K., Rantanen, L. (1997).

Characterization of the particulate phase in the exhaust from a diesel car.
Environmental Science and Technology 31: 1883-1889.

Khandoga, A., Stampfl, A., Takenaka, S., Schulz, H., Radykewicz, R., Kreyling, W., Krombach, F. (2004).

Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice *in vivo*.
Circulation 109: 1320-1325.

Klinge, Rainer (2002).

Das Elektrokardiogramm.
Thieme, Stuttgart, ISBN 3-13-554008-1.

Knaapen, A.M., Borm, P.J., Albrecht, C., Schins, R.P. (2004).

Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms.
Int J Cancer 109: 799-809.

Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A. (2007).

Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type.
Nat Nanotechnol 2(2): 108-113.

Kreyling, W., Scheuch, G. (2000).

Clearance of particles deposited in the lungs.

In: Vol.: Particle Lung Interactions, eds. P. Gehr and J. Heyder, pp. New York, Marcel Dekker, p 323-376.

Kreyling, W., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., Ziesenis, A. (2002).

Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low.

J Toxicol Environ Health A 65(20): 1513-1530.

Krug, H.F., Kern, K., Diabaté, S. (2004).

Toxikologische Aspekte der Nanotechnologie. Versuch einer Abwägung.

Technikfolgenabschätzung Nr. 2, 13. Jahrgang: 58-64.

Langendorff, O. (1895).

Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.

Pflueger's Archive für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere 61: 291.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A. (2003).

Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage.

Environmental Health Perspectives 111: 455-460.

Lipp, P., Pott, L., Callewaert, G., Carmeliet, E. (1992).

Calcium transients caused by calcium entry are influenced by the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig atrial myocytes.

J Physiol 454: 321-338.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (2003).

Pharmakologie und Toxikologie.

Thieme Verlag, 15. Auflage.

Lyrränen, J., Jokiniemi, J., Kauppinen, E.I., Joutsensaari, J. (1999).

Aerosol characterisation in medium-speed diesel engines operating with heavy fuel oils.
J Aerosol Sci 30: 771-784.

Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Mahata, M., Yoo, S.H., Taupenot, L., Wu, H., Gill, B.M., Parmer, R.J. (1997).

Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist.
J Clin Invest 100(6): 1623-1633.

Mahapatra, N.R., Mahata, M., Hazra, P.P., McDonough, P.M., O'Connor, D.T., Mahata, S.K. (2004).

A dynamic pool of calcium in catecholamine storage vesicles.
Journal of Biochemical Chemistry 279(49): 51107-51121.

Marks, A.R. (2003).

Calcium and the heart: a question of life and death.
J Clin Invest 111: 597-600.

Martin, C., Martinez, R., Navarro, R., Ruiz-Sanz, J.I., Lacort, M., Ruiz-Larrea, M.B. (2001).

Tert-butyl hydroperoxide-induced lipid signalling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals.
Biochemical Pharmacology 62: 705-712.

Matsumura, Y., Maeda, H. (1986).

A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanisms of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.
Cancer Res 46: 6387-6392.

Mattson, M.P., Chan, S.L. (2003).

Calcium orchestrates apoptosis.
Nature Cell Biology 5(12): 1041-1043.

Meyer, M., Persson, O., Power, Y. (2001).

Mapping excellence in Nanotechnologies, Brüssel.

Michaels, R.A., Kleinman, M.T. (2000).

Incidence and apparent health significance of brief airborne particles excursions.
Aerosol Science and Technology 32: 93-105.

Miyata, H., Silvermann, H.S., Sollott, S.J., Lakatta, E.G., Stern, M.D., Hansford, R.G. (1991).

Measurement of mitochondrial free Ca^{2+} concentration in living single rat cardiac myocytes.
Am J Physiol 261: 1123-1134.

Mojovic, M., Vuletic, M., Bacic, G.G., Vucinic, Z. (2004).

Oxygen radicals produced by plant plasma membranes: an EPR spin-trap study.
J Exp Bot 55: 2523-2531.

Moss, R.L. (1992).

Ca^{2+} -regulation of mechanical properties of striated muscle. Mechanistic studies using extraction and replacement of regulatory proteins.
Circ Res 70(5): 865-884.

Münzel, T., Afanas'ev, I.B., Kleschyov, A.L., Harrisopn, D.G. (2002).

Detection of superoxide in vascular tissue.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 1761-1768.

National Science & Technology Council (2000).

National Nanotechnology Initiative, Washington DC.

Nel, A.E., Diaz-Sanchez, D., Li, N. (2001).

The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress.
Cur Opin Pulm Med 7: 20-26.

Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Verbruggen, A., and Nemery, B. (2001).

Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster.

Am J Respir Crit Care Med 164(9): 1665-1668.

Ning, L. (2003).

Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage.

Environmental Health Perspectives 111: 455-460.

Oberdörster, G., Utell, M.J. (2002).

Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract - and beyond?

Environmental Health Perspectives 110(8): A440-A441.

Oberdörster, G. (2000).

Toxicology of ultrafine particles: *In vivo* studies.

Philosophical Transactions of the Royal Society of London A 358: 2719-2740.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005).

Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.

Environmental Health Perspectives 113(7): 823-839.

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W., and Cox, C. (2002).

Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats.

J Toxicol Environ Health A 65(20): 1531-1543.

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., Cox, C. (2004).

Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain.

Inhal Toxicol 16: 437-445.

Peters, A., Pope, C.A. (2002).

Cardiopulmonary mortality and air pollution.

Lancet 360: 1184-1185.

Peters, A., von Klot, S., Heier, M.D., Trentinaglia, I., Hörmann, A., Wichmann, H.E., Löwel, H. (2004).

Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction.

N Engl J Med 351: 1721-1730.

Pope, C.A. (2004).

Air pollution and health - good news and bad.

N Engl J Med 351: 1132-1134.

Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D. (2002).

Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution.

Journal of the American Medical Association 287: 1132-1141.

Porzig und Häusler (2000).

Pharmaka mit Wirkung auf das vegetative Nervensystem.

In: Estler (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer, Stuttgart/New York, ISBN 3794518985, S. 96.

Radykewicz, R. (2007).

Wirkung ultrafeiner Modellpartikel auf das isolierte Langendorff-Herz von Meerschweinchen.

Dissertation, Technische Universität München.

Reeves, J.P., Hale, C.C. (1984).

The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system.

J Biol Chem 259: 7733-7739.

Risom, L., Moeller, P., Loft, S. (2005).

Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution.

Mutation Research 592: 119-137.

Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T.J., Muller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Muller, J., Isken, F., Spranger, J., Muller-Wieland, D., Magnuson, M.A., Mohlig, M., Koenig, M., Pfeiffer, A.F. (2003).

Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass.

J Clin Invest 112: 527-534.

Rouse, R.L., Murphy, G., Boudreaux, M.J., Paulsen, D.B., Penn, A.L. (2008).

Soot nanoparticles promote biotransformation, oxidative stress, and inflammation in murine lungs.

Am J Respir Cell Mol Biol 39(2): 198-207.

Schmidt, Thews (1995).

Physiologie des Menschen.

Springer Verlag, 26. Auflage.

Schneider, F., Plato, M. (1971).

Elektronenspinresonanz.

Thiemig-Taschenbücher, Verlag Karl Thieme KG München.

Schömig, A., Dart, A.M., Dietz, R., Mayer, E., Kübler, W. (1984).

Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A:

Locally mediated release.

Circ Res 54: 689-701.

Schulz, H., Harder, V., Ibal-Mulli, A., Khandoga, A., Koenig, W., Krombach, F.,

Radykewicz, R., Stampfl, A., Thorand, B., Peters, A. (2005).

Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles.

J Aerosol Med 18: 1-22.

Schunkert, H., Sadoshima, J., Cornelius, T., Kagaya, Y., Weinberg, E.O., Izumo, S., Riegger, G., Lorell, B.H. (1995).

Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II.

Circ Res 76(3): 489-497.

Schwartz, J. (2000).

Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions?

Epidemiology 12: 55-61.

Schwartz, J., Dockery, D.W., Neas, J.M. (1996).

Is daily mortality associated specifically with fine particles?

Journal of Air and Waste Management Association 46: 927-939.

Semmelmann, A., Neeff, H., Sommer, O., Thomusch, O., Hopt, U.T., von Dobschuetz, E. (2007).

Evaluation of preservation solutions by ESR-spectroscopy: superior effects of University of Wisconsin over Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate in reducing renal reactive oxygen species.

Kidney Int 71: 875-881.

Semmler, M., Seitz, J., Erbe, F., Mayer, P., Heyder, J., Oberdörster, G., Kreyling, W. (2004).

Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs.

Inhal Toxicol 16(6): 453-459.

Shah, A.M., Channon, K.M. (2004).

Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease.

Heart 90: 486-487.

Shah, A.P., Pietropaoli, A.P., Frasier, L.M., Speers, D.M., Chalupa, D.C., Delehanty, J.M., Huang, K., Utell, M.J., Frampton, M.W. (2008).

Effect of inhaled carbon ultrafine particles on reactive hyperemia in healthy human subjects.

Environmental Health Perspectives 116(3): 375-380.

Simkhovich, B.Z., Marjoram, P., Kleinman, M.T., Kloner, R.A. (2007).

Direct acute cardiotoxicity of ultrafine particles in young and old rat hearts.

Basic Res Cardiol 102(6): 467-475.

Smedes, F., Kraak, J.C., Poppe, H. (1982).

Simple and fast solvent extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine.

J Chromatogr 231: 25-39.

Stone, V., Brown, D.M., Watt, N., Wilson, M., Donaldson, K., Ritchie, H., MacNee, W. (2001).

Ultrafine particle-mediated activation of macrophages: intracellular calcium signalling and oxidative stress.

Inhal Toxicol 12 (Suppl 3): 345-351.

Stone, V., Tuinman, M., Vamvakopoulos, J.E., Shaw, J., Brown, D., Petterson, S., Faux, S.P., Borm, P.J., MacNee, W., Michaelangeli, F. (2000).

Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black.

Eur Respir J 15: 297-303.

Sutherland, S.D., Festing, M.F.M. (1987).

The guinea pig.

In: Poole TB. (ed) The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals.

Essex, Longman, 339.

Suwa, T., Hogg, J.C., Quinlan, K.B., Ohgami, A., Vincent, R., van Eeden, S.F. (2002).

Particulate air pollution indices progression of atherosclerosis.

J M Coll Cardiol 39: 935-942.

Tan, H.L., Kupersmidt, S., Zhang, R., Stepanovic, S., Roden, D.M., Wilde, A.A., Anderson, M.E., Balser, J.R. (2002).

A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability.

Nature 415(6870): 442-447.

Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B. (2004).

Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286: R431-R444.

Thews, G., Mutschler, E., und Vaupel, P. (1989).

Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt; Bund Naturschutz Bayern e.V. (2003).

<http://www.mucl.de/~gschuber/bn/zuko-web/Feinstaub.htm>

Vaughan Williams, E.M. (1985).

Cardiac electrophysiological effects of selective adrenoceptor stimulation and their possible roles in arrhythmias.

J Cardiovasc Pharmacol 7 (Suppl 5): 61-64.

Vaughan Williams, E.M. (1985).

Delayed ventricular repolarization as an anti-arrhythmic principle.

Eur Heart J 6 (Suppl D): 145-149.

Vork, M.M., Glatz, J.F., Surtel, D.A., Van der Vusse, G.J. (1993).

Release of fatty acid binding protein band lactate dehydrogenase from isolated rat heart during normoxia, low-flow ischemia, and reperfusion.

Can J Physiol Pharmacol 71(12): 952-958.

Wahlin, P., Palmgren, F., van Dingenen, R. (2001).

Experimental studies of ultrafine particles in streets and the relationship to traffic.
Atmospheric Environment 35: 63-69.

Weijers, E.P., Khlystov, A.Y., Kos, G.P.A., Erisman, J.W. (2004).

Variability of particulate matter concentrations along roads and motorways determined by a moving measurement unit.
Atmospheric Environment 38: 2993-3002.

Weissmann, N., Kuzkaya, N., Fuchs, B., Tiyerili, V., Schafer, R.U., Schutte, H., Ghofrani, H.A.S., Schermuly, R.T., Schudt, C., Sydykov, A., Egemnazarow, B., Seeger, W., Grimminger, F. (2005).

Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy.
Respir Res 6: 86.

Westedt, U., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K., Kalinowski, M., Alfke, H., Kissel, T. (2002).

Deposition of nanoparticles in the arterial vessel by porous balloon catheters: localization by confocal laser scanning microscopy and transmission electron microscopy.
AAPS Pharm Sci 4: E41.

WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide (2005).

Global update 2005.

Wichmann, H.E., Peters, A. (2000).

Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure.
Philos Trans R Soc A 358: 2751-2769.

Wiechert, S., El-Armouche, A., Rau, T., Zimmermann, W.H., Eschenhagen, T. (2003).

24-h Langendorff-perfused neonatal rat heart used to study the impact of adenoviral gene transfer.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 285(2): H907-914.

Wold, L.E., Simkhovich, B.Z., Kleinman, M.T., Nordlie, M.A., Dow, J.S., Sioutas, C., Kloner, R.A. (2006).

In vivo and *in vitro* models to test the hypothesis of particle-induced effects on cardiac function and arrhythmias.

Cardiovasc Toxicol 6(1): 69-78.

Wolska, B.M., Lewartowski, B. (1991).

Calcium in the in situ mitochondria of rested and stimulated myocardium.

J Mol Cell Cardiol 23: 217-226.

Yu, J.G., Huang, K.L., Yang, Q.Q., Liu, S.Q., Tang, J.C. (2008).

Progress in the research of carbon nanotubes as drug carriers.

Yao Xue Xue Bao 43(10): 985-91.

Zervos-Kopp, J. (2006).

Anatomie, Biologie und Physiologie.

Thieme, Stuttgart, Auflage 1.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Maßeinheit für elektrische Stromstärke
Abb.	Abbildung
ADC	Analog Digital Converter
BPM	beats per minute (Schläge pro Minute)
BSA	Bovine Serum Albumine / Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
CNTs	carbon nanotubes
dest.	destilliert
d	Tage (days)
Da	Dalton
deion.	deionisiert
DETC	Kupferchelator Diethyldithiocarbamat
DF	Eisenchelator Deferoxamin
d.h.	das heißt
E ₃₈₀	Extinktion bei 380 nm
EKG	Elektrokardiogramm
<i>et al.</i>	und andere
g	Gramm
GfG	Graphitfunkengenerator
h	Stunde(n)
HF	high frequency
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRV	Herzratenvariabilität
H ₂ O	Wasser
Hz	Hertz
i.d.R.	in der Regel
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert(e)

l	Liter
LF	low frequency
Lsg.	Lösung
m	Meter
M	molar
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
mV	Millivolt
MWNTs	multiple wall nanotubes
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
MQ-H ₂ O	Millipore-Wasser
OD _x	optische Dichte bei x nm
P90	Printex 90
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
sog.	so genannte(n)
SWNTs	single wall nanotubes
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UFP	ultrafeine Partikel
U/min.	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt, Maßeinheit für elektrische Spannung

var.	variabel
vLF	very low frequency
WB	Wasserbad
w/v	Gewicht / Volumen
x	„mal“
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Ω	Ohm, Maßeinheit für elektrischen Widerstand

Außerdem wurden die Symbole der chemischen Elemente verwendet.

Größeneinheiten:

M	10^6 , mega-
k	10^3 , kilo-
c	10^{-2} , centi-
m	10^{-3} , milli-
μ	10^{-6} , micro-
n	10^{-9} , nano-
p	10^{-12} , pico-
f	10^{-15} , femto-

Danksagung

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. R. Nießner möchte ich mich für die Vertretung meiner Arbeit an der TU München und die sehr gute Betreuung während dieser Arbeit vielmals bedanken. Die Diskussionen mit ihm und sein tief greifendes Wissen auf diesem Gebiet waren mir eine große Hilfe.

Herrn Univ.-Prof. Dr. M. Göttlicher, Leiter des Instituts für Toxikologie am Helmholtz Zentrum München, gilt mein großer Dank für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes in seinem Institut, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine hilfreichen Diskussionsbeiträge und die Übernahme der Zweitkorrektur.

Aufs herzlichste danken möchte ich Herrn Dipl.-Phys. A. Stampfl für die Überlassung des interessanten Themas, die äußerst engagierte Betreuung meiner Arbeit und für die vielen hilfreichen Ratschläge und Hilfestellungen während meiner Laborarbeit. Das persönliche Engagement und seine menschliche Art waren mir stets eine sehr große Hilfe und Vorbild.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Mitarbeiterinnen dieser Arbeitsgruppe, Frau M. Ellendorff und Frau H. Ferron, für die Hilfsbereitschaft bei experimenteller Durchführung, Auswertung und beim Korrekturlesen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Schulz und Herrn Dr. W. Kreyling bedanke ich mich für die Bereitstellung der ultrafeinen Modellpartikel.

Für das hervorragende Arbeitsklima und die geleistete Hilfe möchte ich mich auch sehr herzlich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Toxikologie bedanken.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit stets unterstützt und motiviert haben. Besonderer Dank geht dabei an meinen Freund, meinen Bruder und an Tine, die mir in vielen Dingen immer hilfreich zur Seite standen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Melanie Maier

München, den 05. August 2009