

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Lungenentzündung und systemische Effekte von Feinstaubbelastung

Paul J.A. Borm, Karim Bagate, James Justus Meiring

Arbeitsbereich Partikelforschung, Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

Förderkennzeichen: BWB 20018

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit
Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert.

Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 WIRKUNG VON LUFTVERUNREINIGUNGEN AUF DIE GESUNDHEIT	5
1.2 KARDIOVASKULÄRE PM-WIRKUNGEN	5
1.3 MECHANISMEN DER KARDIOVASKULÄREN WIRKUNGEN VON PARTIKELN.....	8
1.4 STUDIENHYPOTHESE.....	9
2. ZIELE DES FORSCHUNGSVORHABENS	12
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 PARTIKELINSTILLATION AND -TRANSLOKATION IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLUNGE.....	13
3.2 UNTERSUCHUNGEN AM ISOLIERTEN HERZEN NACH LANGENDORFF	18
3.3 PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN AORTENRINGEN.....	20
3.4 UNTERSUCHUNGEN AN ZELLKULTUREN	22
4. ERGEBNISSE	23
4.1 TRANSLOKATION VON NANOPARTIKELN IN DER BEI UNTERDRUCK BEATMENTEN ISOLIERT PERFUNDIERTEN LUNGE.....	23
4.2 TRANSLOKATION VON NANOPARTIKELN BEI ÜBERDRUCKVENTILATION.....	27
4.3 ENTZÜNDUNG UND SYSTEMISCHE EFFEKTE EINER INTRATRACHEALEN GABE VON ENDOTOXIN ODER VON STAUBPROBEN (EHC93) BEI SPONTAN HYPERTENSIVEN RATTEN (SHR)	29
4.4 HERZLEISTUNG BEI PM-BEHANDELTEN SH-RATTEN NACH ISCHÄMISCHER SCHÄDIGUNG	33
5. DISKUSSION	40
5.1 TRANSLOKATIONSUNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLUNGEN	40
5.2 ENTZÜNDUNG UND SYSTEMISCHE EFFEKTE DER INTRATRACHEALEN VERABREICHUNG VON ENDOTOXIN ODER STAUBPROBEN (EHC-93).....	46
5.3 HERZLEISTUNG IN PM-BEHANDELTEN SH-RATTEN NACH ISCHÄMISCHER SCHÄDIGUNG.....	50
6. SCHLUSSFOLGERUNG.....	52
7. DANKSAGUNG.....	53
8. LITERATUR.....	54

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACh	Azetylcholin
ALP	Alkalische Phosphatase
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CF	Koronarfluss (Coronary flow)
CFSE	carboxyfluorescein diacetatsuccinimydyl ester (fluoreszierender Farbstoff)
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CGRP	calcitonin gene-related peptide
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen
COX-2	Zyklooxygenase-2
CPC	condensation particle counter (Kondensationspartikelzähler)
DEP	Dieselrußpartikel
DMPS	differential mobility particle sizer
DMSO	Dimethylsulfoxid
dp/dt_{max}	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
DTPA	Diethylene triamine pentaacetic acid (Diäthylentriaminpentaazetylsäure)
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
eNOS	endotheliale Stickstoffoxid-Synthase
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GSH	Gutathion
HBS	Hepes Buffered saline
HBSS	Hank's balanced salt solution (Hank-Lösung)
HR	Herzfrequenz (heart rate)
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPL	isoliert perfundierte Rattenlunge
Ir-UFP	ultrafeine Iridium-Partikel
LPS	Lipopolysaccharid
LVDP	linksventrikulär entwickelter Druck
MEPE	Motorradrußpartikelextrakt
MLCK	Proteinkinase (Myosin Light Chain Kinase)
MPO	Myeloperoxidase
NO	Stickstoffmonoxid
PAR-1	Proteinase activated receptor-1
pGC	membranständige Guanylatzyklase (particular guanylate cyclase)
Phe	Phenylephrin

PM	particulate matter (= Partikel)
PMA	Phorbolmyristatazetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Leukozyten
ROFA	Flugasche (residual oil fly ash)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sGC	lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase)
SH-Ratten	spontan hypertensive Ratten
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
SNP	Nitroprussid-Natrium
^{99m} Tc-DTPA	^{99m} Technetium-markiertes DTPA
TSP	atmosphärischer Feinstaub (total suspended particles)
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
UFP	ultrafeine Partikel

1. Einleitung

1.1 Wirkung von Luftverunreinigungen auf die Gesundheit

Zahlreiche epidemiologische Studien haben gefunden, dass Luftverunreinigungen bei Personen mit respiratorischen Erkrankungen zu einem Anstieg der Morbidität und Mortalität führt [Übersicht: Pope et al. 2004]. Lokale Luftverunreinigung war bei Anwohnern mit Asthma und anderen Erkrankungen der Atemwege oder des Herz-Kreislaufsystems mit gesundheitlichen Beeinträchtigungen verbunden. Zudem vermutet man, dass Partikel (PM) bei der Entstehung von Lungenkrebs eine Rolle spielen [Abbey et al. 1999; Pope et al. 2002]. Kinder scheinen besonders empfindlich zu sein; als gesundheitliche Effekte bei Kindern wurden Notarztbesuche, verpasste Schultage und Bronchitis beobachtet [Übersicht: Brunekreef & Holgate, 2002]. Epidemiologische Studien haben durchgehend einen Zusammenhang der genannten adversen Effekte bei empfindlichen Teilen der Bevölkerung mit leichten Anstiegen der PM-Konzentrationen gefunden. Mit einer kurzen zeitlichen Verzögerung von ein bis zwei Tagen wurden nach einem Anstieg der Partikelbelastung folgende Effekte beobachtet: (1) ein Ansteigen der allgemeinen Mortalität, (2) signifikante Zunahme von Asthmaanfällen und des Gebrauchs von Medikamenten gegen Asthma, (3) Anstieg von Todesfällen bei COPD-Patienten, (4) Verschlimmerung von chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (COPD), (5) Anstieg von Todesfällen und stationären Aufnahmen bei Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen. Die mit einem Anstieg der PM-Konzentrationen verbundenen kardiovaskulären Effekte sind gut dokumentiert: Panel-Studien haben Zusammenhänge zwischen erhöhten Partikelkonzentrationen und Herzinfarkt, erhöhter Herzfrequenz sowie erniedrigter Herzfrequenz-Variabilität gefunden. In Kammerexperimenten mit freiwilligen Probanden, die gegenüber konzentrierten Außenluftstäuben exponiert wurden, wurden mit steigender Belastung vermehrte Lungenentzündung und veränderte Durchmesser der Oberarmarterie beobachtet [Brook et al. 2002].

Tabelle 1.1: Geschätzte Wirkungen eines Anstiegs der jährlichen PM_{2,5}-Konzentration auf das adjustierte relative Mortalitätsrisiko (RR) bei bestimmten Erkrankungen (Quelle: [Pope 2002])

Todesursache	1979-1983	1999-2000	Durchschnitt
Alle Ursachen	1.04 (1.01-1.08)	1.06 (1.02-1.10)	1.06 (1.02-1.11)
Herz-Kreislaufkrank.	1.06 (1.02-1.10)	1.08 (1.02-1.14)	1.09 (1.03-1.16)
Lungenkrebs	1.08 (1.01-1.16)	1.13 (1.04-1.22)	1.14 (1.04-1.23)
Alle anderen Ursachen	1.01 (0.97-1.05)	1.01 (0.97-1.06)	1.01 (0.95-1.06)

1.2 Kardiovaskuläre PM-Wirkungen

Erkrankungen des Herzens und des Blutgefäßsystems sind sowohl in Europa als auch in den Vereinigten Staaten von Amerika die Haupttodesursache. Erkrankungen der Blutgefäße sind die wichtigste Ursache vorzeitiger Invalidität und Todesfälle. Herzinfarkte und Schlaganfälle sind offensichtliche Folgen geschädigter Arterien und gesteigerter Blutgerinnung. Die epidemiologische Forschung hat sich mit etlichen möglichen Folgen und Endpunkten kardiovaskulärer Erkrankungen beschäftigt. Dazu gehören die Mortalität an allen Todesursachen und Endpunkte, die für kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität spezifisch sind, einschließlich akute Todesfälle nach Krankenhausentlassung, akuter Herzinfarkt, Schlaganfall, kongestive Herzinsuffizienz, peripher arteriosklerotische Gefäßerkrankungen, angeborene Herzerkrankungen und Kardiomyopathie. In den USA leiden etwa 11,2 Millionen Menschen an ischämischen Herzerkrankungen und 1,5 Millionen erleiden jedes Jahr einen akuten Herzinfarkt. Es wird geschätzt, dass ein Drittel der Bevölkerung irgendeine Form von Bluthochdruck hat, und die Ursache ist in 90 bis 95 % der Fälle unbekannt.

Das erhöhte Risiko für die genannten kardiovaskulären Ereignisse als Folge erhöhter PM-Konzentrationen wird nun mehr und mehr durch epidemiologische und Panel-Studien belegt [z.B. Peters et al. 2004]. Zu den aus neueren Studien bekannten kardiovaskulären Effekten gehören Störung der Aktivität des autonomen Nervensystems [Pope 1999], arterielle Vasokonstriktion [Brook 2002, Nurkiewicz et al. 2004] und Relaxation [Bagate et al. 2004], Herzrhythmusstörungen bei Patienten mit Defibrillatoren [Peters 2000], Ereignisse wie Herzinfarkt [Peters et al. 2001, 2004], die eine stationäre Behandlung erforderlich machten, sowie Verschlimmerung von ST-Segment-Veränderungen in experimentellen Herzinfarkt-Modellen [Godleski 2000].

Tabelle 1.2: Übersicht über kardiovaskuläre Wirkungen von PM beim Menschen

beobachteter Effekt	Studienbedingungen	Quelle
Vasokonstriktion	In vivo Messung des Durchmessers der Oberarmarterie (PM _{2.5} + O ₃), 25 freiwillige Probanden	Urch et al. 2004 Brook et al. 2002
Blutdruck	Wirkung von Umweltstäuben auf Herzfrequenz und Blutdruck bei Patienten aus drei Städten	Ibald-Mulli et al. 2004
Herzfrequenz-Variabilität	Konzentrierte grobe Umweltpartikel (Ganzkörperexposition), Asthmatiker und gesunde freiwillige Probanden	Gong et al. 2004 Chan et al. 2004 Ghio & Huang 2004 Devlin et al. 2003
Herzrhythmusstörungen	Außenluftverunreinigungen; Patienten mit implantierbaren Defibrillatoren	Vedal et al 2004 Rich et al 2004
Herzinfarkt	Exposition gegenüber Verkehr und Auslösung von Herzinfarkt	Peters et al. 2004 , 2001
Arteriosklerose	Langzeitexposition gegenüber Umweltfeinstäuben (PM bis 2,5 µm)	Künzli et al. 2005

Bei den meisten chronischen Herzerkrankungen ist der Herzmuskel schlecht durchblutet. Ursachen sind arteriosklerotische Plaques in den Herzgefäßen und die Akkumulation von Blutplättchen, Leukozyten und anderen Ablagerungen, die den Blutstrom zum Herzmuskel blockieren. Es wird postuliert, dass Substanzen in Partikeln, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) zum Entstehen von Herzerkrankungen beitragen, indem sie die endotheliale Barriere im Gefäßsystem schädigen, Leukozyten und Blutplättchen aktivieren und die Bildung arteriosklerotische Plaques auslösen und eine Entzündungsreaktion stimulieren [Curfs et al. 2004]. Die Kinetik und Absorption von PAH nach Inhalation von Partikeln oder nach Aufnahme von PAH über die Nahrung kann jedoch total unterschiedlich sein, und daher benötigt man zur Risikoabschätzung weitere Untersuchungen. Ein anderer wohlbekannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist der Bluthochdruck. Obwohl in verschiedenen experimentellen Modellen gezeigt werden konnte, dass Partikel die akute Gefäßkontraktion [Batalha et al. 2002; Brook et al. 2002; Nurkiewicz et al. 2004] und Gefäßerweiterung [Bagate et al. 2004] beeinflussen, ist immer noch unbekannt, ob dies auch einen Einfluss auf den Blutdruck insgesamt hat [Wichers et al. 2004] und wie das bei später auftretenden kardiovaskulären Ereignissen eine Rolle spielt.

Eine systemische Entzündung wird ebenfalls als Motor oder Katalysator vieler adverser kardiovaskulärer Effekte angesehen. Es gibt Hinweise, dass Partikelexposition bei Menschen zu systemischer Entzündung führen kann; das zeigt sich zum Beispiel durch erhöhte Werte für C-reaktives Protein, Blutleukozyten und -plättchen, Fibrinogen und verstärkte Plasmaviskosität [Seaton et al. 1995, Peters et al. 1997, Ghio & Devlin 2001]. Eine systemische Entzündung ist ebenfalls im Hinblick auf die Arteriosklerose relevant, die dem akuten Herzsyndrom zugrunde liegt, welches die Hauptursache kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität ist. Arteriosklerotische Plaques sind die Folge eines entzündlichen Prozesses, der durch einen endothelialen Schaden ausgelöst wird und bei dem systemische Entzündungsmarker produziert werden, die Risikofaktoren für myokardiale und cerebrale Infarkte sind [Libby 2002]. Wiederholte Exposition gegenüber Partikeln kann durch zunehmende systemische Entzündung die vaskuläre Entzündung verschlimmern und die Ausbildung oder das Zerschneiden arteriosklerotischer Plaques fördern. Daher vermutet man, dass Entzündungen in der Lunge sowohl die lokalen pulmonalen als auch die systemischen kardiovaskulären Effekte von Partikeln erklären können [Donaldson et al. 2003]. Dieses Konzept ist in Abbildung 1.1. dargestellt.

Neben Partikeln wurden auch Kohlenmonoxid, Ozon, NO_x und SO_2 mit einem Ansteigen der Rate an Krankenhauseinweisungen und Mortalität infolge von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [Pope 2004, Pope 2002; Samet 2000]. Es wurde eine Korrelation zwischen der Luftverunreinigung durch Schwebstaub und SO_2 und einem Anstieg des Blutdrucks beobachtet, und dies konnte mit einer Veränderung der kardiovaskulären autonomen Kontrolle in Beziehung gesetzt werden [Ibald-Mulli et al. 2001]. Es wurde gezeigt, dass Kohlenmonoxid beim Menschen zu einer Verschlimmerung kardiovaskulärer Erkrankungen führt. Die Untersuchungen, in denen eine Verringerung des Durchmessers der Oberarmarterie beim Menschen nach Exposition gegenüber CAPS ($153 \mu\text{g}/\text{m}^3$) gemessen wurden, erfolgten in Anwesenheit von Ozon (120 ppb). Daher kann ein Zusammenwirken oder ein direkter Einfluss von Ozon nicht ausgeschlossen werden [Brook et al. 2002].

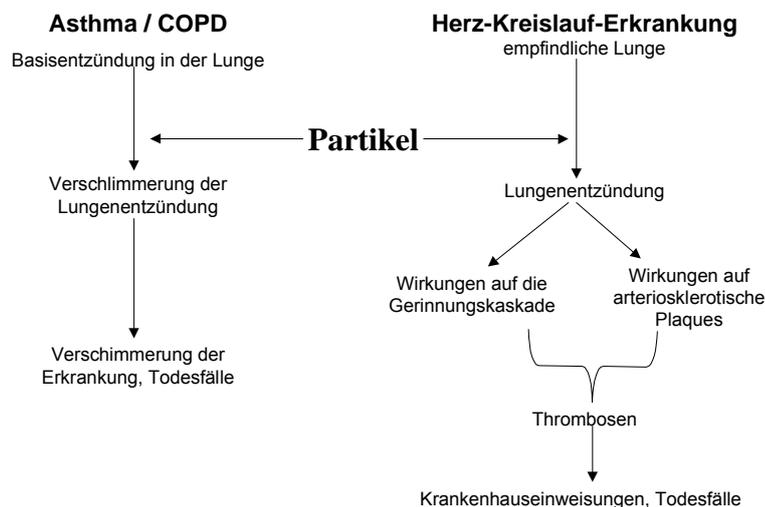


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Entzündung als Schlüsselereignis bei der Wirkung von inhalierten Partikeln auf Atemwege und Herz-Kreislaufsystem. Nach Donaldson et al. [2003]

1.3 Mechanismen der kardiovaskulären Wirkungen von Partikeln

Wie im vorausgehenden Kapitel dargestellt, vermutet man heute, dass die Entzündung einer der Mechanismen ist, die pulmonale und systemische Wirkungen von inhalieren Partikeln miteinander verbinden. Dieses Konzept ist biologisch plausibel. Neuere Studien haben jedoch den Schluss nahe gelegt, dass auch alternative parallele Wege eine Rolle spielen können. Diese Mechanismen werden in den folgenden Absätzen kurz dargestellt, wobei zwischen direktem und indirektem Weg unterschieden wird. Die Entzündung gehört, wie in Abbildung 1.1 dargestellt ist, zum indirekten Weg.

1.3.1 Der indirekte Weg

Mögliche indirekte Wirkungen von PM können auf dem Weg über pulmonalen oxidativen Stress und Entzündung auftreten (siehe Abb. 1.1). Dies könnte in der Folge zu einer systemischen Entzündung führen, die Blutgerinnungssignalwege aktivieren [Nemmar et al. 2003, Ghio & Devlin 2001], die meisten vaskulären Funktionen beeinträchtigen [Bagate et al. 2004; Nurkiewicz et al. 2004] und die Arteriosklerose verstärken kann [Suwa et al. 2002]. Toxikologische Untersuchungen haben gezeigt, dass oxidativer Stress ein zentraler Mechanismus ist, der für die inflammatorischen Effekte von PM, die zu Lungenreaktionen führen, verantwortlich sein kann [Oberdörster et al. 2005, Donaldson et al. 2003]. Andererseits ist bekannt, dass Entzündungen die Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies in der Lunge verstärken und dadurch persistenten oxidativen Stress verursachen. Partikel enthalten verschiedene Komponenten, die oxidativen Stress auslösen können, wenn die Partikel auf der Lungenoberfläche abgelagert werden. Dazu gehören Übergangsmetalle, Nanopartikel, organische Verbindungen und Endotoxin. Seaton et al. [1995] haben die Vermutung geäußert, dass Feinstaubbelastungen der Luft alveoläre Entzündungen auslösen können, was zur Freisetzung möglicherweise schädlicher Zytokine, zu verstärkter Blutgerinnung und systemischer Entzündung führen kann, die wiederum bestehende kardiovaskuläre Probleme verschlimmern kann. Spätere Untersuchungen an Menschen, die gegenüber Dieselrußpartikeln exponiert wurden [Salvi et al. 1999] oder denen PM_{2,5} bronchial instilliert wurde [Ghio et al. 2001; Schaumann et al. 2004] zeigten eine deutliche Entzündungsreaktion in der Lunge der gesunden Probanden. Sowohl beim Menschen als auch in Untersuchungen am Versuchstier wurden als Reaktion auf eine Partikelexposition eine verstärkte Migration unreifer polymorphkerniger Granulozyten (PMN) aus dem Knochenmark in das Blut sowie eine Erhöhung der Blutzytokine beobachtet [Suwa et al. 2002, van Eeden et al. 2001].

Ein alternativer Mechanismus für indirekte Partikelwirkungen besteht in der Aufnahme ultrafeiner Partikel durch das Riechepithel, das im oberen Nasalraum gelegen ist. Diese dünne epitheliale Schicht bietet eine Abkürzung für Partikel, um aus dem Nasenraum in das Gehirn einzudringen. Die Existenz dieses Weges konnte von Oberdörster et al. [2004] nachgewiesen werden, indem die Autoren ¹³C-Isotope in ultrafeinen Rußpartikeln und ultrafeine Gold- und MnO₂-Partikel [Oberdörster et al. 2004, ATS Abstract] benutzten. Diffusionsprozesse beherrschen die Deposition ultrafeiner inhalierter Partikel im Atemtrakt. Pathologische Untersuchungen von Calderon-Garciduenas et al. an Versuchstieren [2002] und an Menschen [2004], die in hochbelasteten Regionen lebten, sprechen dafür, dass eine beträchtliche Menge dieser ultrafeiner Partikel ins Gehirn eindringt. Des Weiteren weisen diese und andere Studien [Campbell et al. 2004] darauf hin, dass translozierte Nanopartikel zu einer verstärkten Expression inflammatorischer Mediatoren, wie COX-2 [Calderon-Garciduenas et al. 2004] sowie zu erhöhten Konzentration von IL-1 und TNF-α im Gehirn [Campbell et al. 2005] oder zu einer Abnahme dopaminergener Neuronen führen. Es ist noch zu klären, ob und wie diese Geschehnisse im Zentralnervensystem periphere und systemische Funktionen beeinflussen können.

1.3.2 Direkte Wege kardiovaskulärer Partikelwirkungen

Bei den biologischen Mechanismen, über die Luftverunreinigungen mit Herzerkrankungen verbunden sind, können auch direkte Wirkungen von Luftverunreinigungen auf das Herzkreislaufsystem, auf Lungenrezeptoren und das Blut und/oder indirekte Effekte wie pulmonaler oxidativer Stress und Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Theoretisch können direkte Effekte auftreten, wenn Partikel oder Wirkstoffe durch das Lungenepithel in den Blutkreislauf eintreten und das Herz oder das Gefäßsystem erreichen. Dies könnte zum Beispiel bei der ultrafeinen Partikelfraktion und/oder löslichen Bestandteilen von Partikeln der Fall sein. Des Weiteren könnten Partikel oder deren Bestandteile pulmonale Rezeptoren aktivieren, die eine direkte Verbindung zur autonomen Innervation des Herzens haben [Übersicht: Widdicombe 2003]. Dieses Phänomen wurde für andere Luftverunreinigungen wie SO₂ beschrieben [Tunnicliffe et al. 2001]. Das autonome Nervensystem kann auch Veränderungen der Blutviskosität, der Herzfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität verstärken und so die Wahrscheinlichkeit von Herztod erhöhen [Nolan 2005]. Bisher wurden jedoch nur wenige Beweise dafür gefunden, dass Partikel solche Wege wirklich benutzen. Andererseits haben in vitro Studien gezeigt, dass Partikel oder Partikelbestandteile, wie zum Beispiel Metalle und PAH, die autonome Regulation in Präparaten wie Aortenringen, Mesenterialadern [Bagate et al. 2004] und isolierten Herzmuskeln [Sakakibara et al. 1994] beeinflussen. Diese direkten Wirkungen von Luftverunreinigungen liefern eine theoretische Erklärung für das Auftreten von raschen kardiovaskulären Antworten, wie eine gesteigerte Rate von Herzinfarkten nach einer mehrstündigen Teilnahme am Straßenverkehr [Peters et al. 2004]. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Effekt wirklich auftritt, hängt jedoch von einer Translokation von Partikeln und deren Bestandteilen in den Blutkreislauf ab.

Wie bereits dargelegt, kann die ultrafeine Partikelfraktion die epitheliale Barriere durchschreiten und in das Lungen-Interstitium gelangen. Partikel unterliegen im Interstitium nicht der Clearance, und so wächst die Dosis an [Ferin et al. 1992; Nikula 1997, Borm & Kreyling 2004]. Im Interstitium können Nanopartikel Zellen aktivieren, die zu Entzündungen im Interstitium führen. Die Partikel im Interstitium sind dem Blut sehr nahe, und es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Nanopartikel ins Blut gelangen können. Es konnte gezeigt werden, dass Dieselrußpartikel, Technetium-markierte Rußpartikel [Nemmar 2002], ultrafeine Iridiumpartikel [Kreyling et al. 2002], nanokolloidale Albuminpartikel [Nemmar et al. 2004] und radioaktiv markierte Latexnanopartikel [Brooking et al. 2001] nach Inhalation in den Blutstrom gelangen können. Wenn sich dies auch für Nanopartikel aus der Umwelt bestätigen lässt, dann können wir postulieren, dass Nanopartikel im Blut mit Endothelzellen und Blutgerinnungsproteinen interagieren und so die Thrombogenese verstärken können. Zusätzlich könnten sie direkt auf das Endothel, das die arteriosklerotischen Plaques überlagert, einwirken und sogar in diese Plaques eindringen. Dies könnte zu einer Aktivierung von Zellen in den Plaques führen und das Wachstum und das Zerschneiden der Plaques fördern und so zum akuten koronaren Syndrom beitragen. Der Mechanismus, über den Nanopartikel ihren Weg durch die Zellmembran finden (transzellulärer Transport), ist noch unbekannt, aber aufgrund ihrer Partikelgröße ist es möglich, dass sie nicht den normalen Weg der Endozytose benutzen. Andererseits können Aggregate primärer Partikel leicht Durchmesser (> 200 nm) erreichen, die für die Endozytose zugänglich sind. Neben der Endozytose kommen als mögliche Aufnahmewege auch Caveolae oder Clathrin-beschichtete Vertiefungen, Pinozytose oder adhäsive Interferenz infrage [Gumbleton, 2001].

1.4 Studienhypothese

Obwohl die Partikeltranslokation ein direkter Mechanismus für die systemische Wirkung der (ultrafeinen) Partikelfraktion ist, muss man berücksichtigen, dass die parazelluläre Translokation von der Permeabilität verschiedener Lungenbarrieren abhängig ist. Diese kann wiederum in hohem Maße von den Partikeleigenschaften abhängen wie auch von

Prozessen, wie oxidativer Stress und Entzündung, welche die Permeabilität verstärken oder verschlechtern können. Dieses Konzept ist in Abbildung 1.2 dargestellt und wird im restlichen Teil dieses Abschnitts ausführlich behandelt mit speziellem Schwerpunkt auf der Permeabilität der zwei Hauptbarrieren für die Partikeltranslokation, d.h. das Lungenepithel und das vaskuläre Endothel.

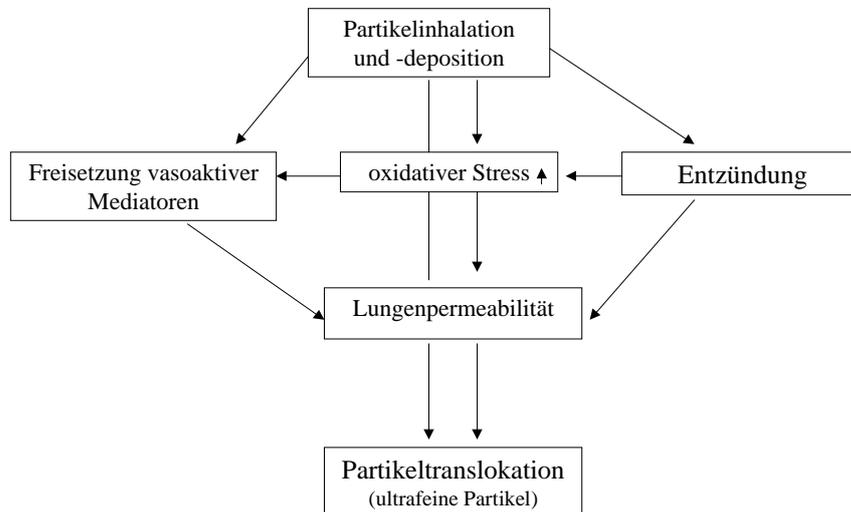


Abb. 1.2: Schematische Darstellung partikel-induzierter Prozesse in der Lunge wie oxidativer Stress, Entzündung und Freisetzung vasoaktiver Substanzen (z.B. Histamin), die auf die epitheliale und endotheliale Permeabilität einwirken können. Es wird vermutet, dass die Permeabilität bei der Translokation ultrafeiner Partikel eine entscheidende Rolle spielt.

1.4.1. Lungenpermeabilität als entscheidender Faktor bei der Partikeltranslokation

Die Lungenpermeabilität kann von verschiedenen Perspektiven aus und mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Zu den konventionellen Methoden zur Bestimmung der Lungenpermeabilität gehören die Translokation von kleinen und schweren Substanzen mit radioaktiver Markierung (DTPA, ^{13}C), konventionellen Farbstoffen, die Transmigration von Neutrophilen und die Migration von Nanopartikeln aus dem Blutstrom [Heckel et al. 2004]. Spezifischere Messungen der Permeabilität der Lungenkapillaren sind durch zeitweisen Verschluss in Lungenperfuisionsmodellen möglich [Hamoir et al. 2003; Uhlig & Wollin 1994]. Da der Mechanismus der Partikeltranslokation bis heute ungeklärt ist, ist eine objektive Auswahl der verfügbaren Methoden nicht möglich. Jede Partikel, die die pulmonale Barriere überschreitet, muss den respiratorischen Schleim, die mukoziliäre Clearance, das Alveolarepithel, die Basalmembran, pulmonale Verteidigungsenzyme, interstitielle Leukozyten und Makrophagen und endlich das Endothel passieren. Wir gingen in unseren Untersuchungen davon aus, dass zwei Hauptbarrieren (d.h. das Lungenepithel und die vaskuläre Endothelschicht) das Ausmaß der Partikeltranslokation in die Lunge bestimmen. Diese Barrieren können durch zwei verschiedene Mechanismen, einschließlich transzellulärer und parazellulärer Transport, überwunden werden. Wie in Abb. 1.2 dargestellt, können durch Partikelinhalation und –deposition oxidativer Stress, Entzündung und eine mögliche lokale Freisetzung vasoaktiver Mediatoren induziert werden, und diese Prozesse können wiederum indirekt die Translokation der ultrafeinen Fraktion beeinflussen.

1.4.2 Epitheliale Auskleidung und Lungenpermeabilität

Das Lungenepithel steht im direkten Kontakt mit der Umwelt, dadurch ist die der Luft ausgesetzte Epitheloberfläche der Lunge empfindlich für die Wirkung von oxidativem Stress [MacNee 2001]. Ultrafeine Partikel sind in der Lage, tief in den Atemtrakt einzudringen, und infolge ihrer im Vergleich zu großen Partikeln großen Oberfläche verursachen sie eine stärkere Entzündungsreaktion in der Lunge [Oberdörster et al. 2005]. Eine chronische Exposition gegenüber verschiedenen Typen mineralischer Stäube könnte zu Entzündungsreaktionen in der Lunge führen. Partikel könnten Alveolarmakrophagen aktivieren und Leukozyten primen, was zu einer verstärkten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führen kann. Partikeln könnten auch selbst Radikale enthalten. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können Gewebeschäden verursachen. Bei chronischen Rauchern tritt eine erhöhte epitheliale Permeabilität mit Veränderungen der Antioxidantien in den Atemwegen wie zum Beispiel Glutathion auf. Diese oxidative Belastung der Lunge wird weiter durch die Freisetzung aktivierter neutrophiler Zellen und Makrophagen in den Alveolarraum verstärkt [MacNee 2001].

1.4.3 Endothelschicht und Lungenpermeabilität

Ein Drittel der endothelialen Zellen des Körpers befinden sich im Gefäßsystem der Lunge; sie erhalten so den gesamten Blutstrom des Herzens und stellen deshalb ein Zielorgan dar. Der maximale Durchmesser der Tight Junctions zwischen alveolaren Typ-I-Zellen beträgt 0,6 nm, aber endotheliale Junctions erlauben das Passieren größerer Moleküle zwischen 4 und 6 nm [Agu et al 2001]. Es wird vermutet, dass Surfactant bei der Partikeltranslokation eine wesentliche Rolle spielt [Geiser et al. 2003]. Partikel, die bis in die Alveolen gelangen, werden zum großen Teil entweder durch Proteasen abgebaut oder durch Alveolarmakrophagen entfernt. Die Makrophagen der Lunge setzen auch Peroxidasen, Entzündungsmediatoren und immunmodulierende Mediatoren sowie andere Moleküle als Teil der körpereigenen Abwehr frei. Ultrafeine Partikel können jedoch in der das Epithel auskleidenden Flüssigkeit dispergieren, so dass die Lunge eine Dosis einzelner Partikel erhält [Donaldson et al. 2001]. Außer in Gefäßen von Organen, wie der Leber, der Nebennierenrinde und des Knochenmarks, wo das Endothel ziemlich große Poren aufweist, stellt das Endothel eine selektive Barriere zwischen Blut und Gewebe dar. Man vermutet, dass Entzündungsmediatoren zu einem Undichtwerden der Gefäße führen oder Lücken zwischen den Endothelzellen verursachen, was dazu führt, dass Stoffe aus dem Blut oder Plasmaproteine das Epithel überwinden können. Diese Steigerung der endothelialen Permeabilität kann es Elementen aus dem Blut erleichtern, an Stellen zu gelangen, an denen sie schädigen können. Die Aktivierung endothelialer Zellen durch Thrombin spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Gefäßschäden und Gewebeentzündungen. Eine Zunahme von Thrombin verursacht erhöhte Gefäßpermeabilität und Wassergehalt in der Lunge [Lum et al. 1994]. Man vermutet, dass Thrombin diese Wirkung durch Aktivierung von an G-Protein gebundenes PAR-1 (Proteinase-activated-receptor-1) in der Endothelzelloberfläche bewirkt. Die Steigerung des intrazellulären Ca^{++} -Signalling spielt beim Mechanismus der gesteigerten Endothelpermeabilität nach Aktivierung von PAR-1 die kritische Rolle [Sandoval et al 2001]. Die Zunahme von Thrombin bei der Permeabilität konnte durch Blockierung des Ca^{++} -Influx in Endothelzellen verhindert werden. Ein anderer Entzündungsmediator ist TNF α ; seine Wirkungen konnten klar bei Entzündung und Sepsis nachgewiesen werden, bei denen die Endothelzellen das Hauptzielorgan dieses Zytokins sind [Holmes et al, 2003]. Eine Zunahme der ROS-Produktion in Endothelzellen kann wichtige endotheliale Funktionen wie den Stickoxid- und COX-Weg stören [Kojda et al. 1999].

2. Ziele des Forschungsvorhabens

Primäres Ziel dieses Forschungsvorhabens war es zu untersuchen, ob sich die in epidemiologischen Studien beobachteten kardiovaskulären Effekte von Umweltstäuben mit einer Verlagerung (Translokation) ultrafeiner Partikel erklären lassen. Zu diesem Zweck wurde die Translokation radioaktiv markierter Modell-Nanopartikel (^{192}Ir -Aerosol, 18 nm) an der isoliert perfundierten Rattenlunge untersucht. Zusätzlich wurden im Tiermodell Außenluftstäube verabreicht, um die Wirkungen auf kardiovaskuläre Funktionen mittels Perfusion des Herzens nach Langendorff zu untersuchen. Das zweite Ziel des Projektes war es, die Rolle der Lungenpermeabilität bei der Partikeltranslokation und den Einfluss von Entzündungen in der Lunge auf diese Prozesse zu klären. Hierzu wurde ebenfalls das Modell der isoliert perfundierten Lunge mit Behandlungen zur Modifizierung der Permeabilität (Histamin) und/oder der Entzündungsreaktion (PMN) eingesetzt. Für die Untersuchungen wurden sowohl Modellpartikel (^{192}Ir -aerosol, 18 nm) als auch Umweltstäube (EHC-93) verwandt. Den Untersuchungen liegt die in Abb. 2.1 dargestellte Hypothese zugrunde, dass Partikel durch das Lungenepithel translozieren und kardiovaskuläre Funktionen direkt beeinträchtigen können. Andererseits ist es möglich, dass Partikel auch Entzündungen auslösen und auf diesem Wege die Lungenpermeabilität sowohl für Partikel als auch für vasoaktive Mediatoren beeinflussen.

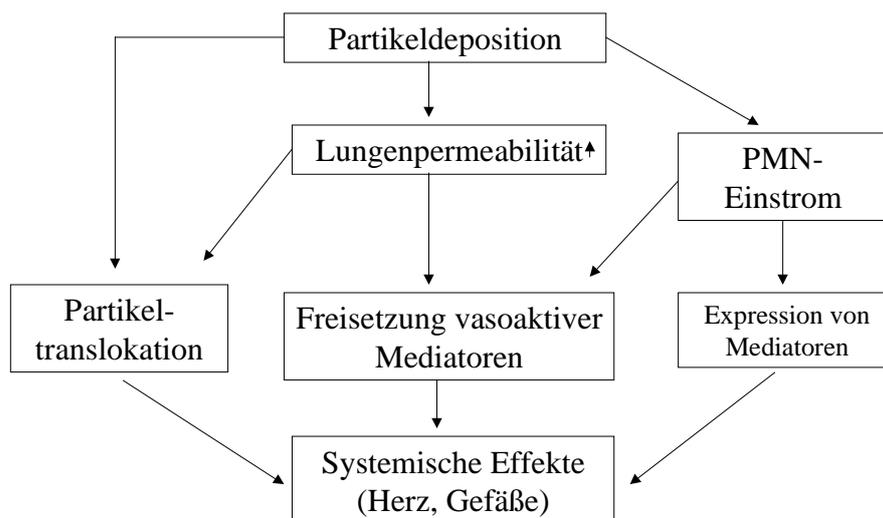


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Mechanismen, von denen angenommen wird, dass sie bei partikelinduzierten systemischen Wirkungen eine Rolle spielen. Das Schema zeigt, dass Partikel durch das Lungenepithel translozieren und kardiovaskuläre Funktionen direkt beeinflussen können. Andererseits können Partikel Entzündungen auslösen, was die Permeabilität der Lunge sowohl für Partikel als auch für vasoaktive Mediatoren verändert.

3. Material und Methoden

3.1 Partikelinstillation and -translokation in der isoliert perfundierten Rattenlunge

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge (IPL) ist ein gut etabliertes experimentelles Modell, das in der Vergangenheit u.a. zur Untersuchung von hämodynamischen Parametern [Fisher 1985], der hypoxischen Vasokonstriktion [Emery et al. 2003, Chlopicki et al. 2002], der Wirkung von Histamin oder von Arachidonsäuremetaboliten [Russell et al. 1994] sowie von Umweltschadstoffen [Bond & Mauderly, 1984] eingesetzt wurde. Bei der Untersuchung des Metabolismus der Lunge und der Wirkung exogener Stoffe bietet das Modell viele Vorteile gegenüber anderen Methoden: Die IPL ist weniger kompliziert als Ganztiersversuche, gleichzeitig bleiben Funktionsfähigkeit und Struktur des Organs weitgehend erhalten. Anders als beim intakten Tier ist es in Perfusionsexperimenten möglich, Parameter wie Perfusionsgeschwindigkeit, Atemzugvolumen und Beatmungsdruck zu regulieren und durch Überwachung von Parametern wie Resistance, Compliance, Blutgasen und Ödembildung die Lungenreaktion auf exogene Reize unmittelbar zu erfassen [Uhlig, 1998]. Im Hinblick auf Entzündungsreaktionen ist es beim Einsatz der IPL von besonderem Vorteil, dass es durch Verwendung eines zellfreien Perfusates möglich ist, die Entzündung zu kontrollieren und Verfälschungen durch die Aufnahme von Partikeln in Leukozyten oder andere Zellen zu vermeiden. Die Perfusion an der ILP kann sowohl druck- als auch flusskonstant erfolgen, wobei Letzteres eher der Situation *in vivo* entspricht. Zudem können zwei unterschiedliche Arten der Beatmung eingesetzt werden, d.h. die IPL kann sowohl mit Überdruck als auch mit Unterdruck beatmet werden. Die Unterdruckventilation wird als vorteilhafter angesehen, da sie den *in vivo* vorliegenden Bedingungen ähnlicher ist und es dabei zu weniger Ödembildung und besserer Herzleistung kommt als bei der Überdruckventilation. Andererseits hat die IPL auch ihre Grenzen, da das Modell nur für kurze Zeit einsetzbar ist, denn die Lungenmechanik verschlechtert sich nach einiger Zeit. Eine weitere Einschränkung liegt darin, dass die IPL weder über Neuroregulation noch über Lymphdrainage verfügt, was die Lungenfunktion beeinträchtigen kann. Wir betrachteten die IPL als geeignetes Modell für unsere Versuche zur Partikeltranslokation, da die IPL in der Literatur bereits zur Abschätzung der Aufnahme aerosolförmiger Arzneimittel [Niven & Byron 1988, Niven et al. 1990] und der Absorption synthetischer Polypeptide [Niven et al. 1990] diente. In diesen Studien ging es um eine systemische Medikation mit Makromolekülen.

3.1.1 Versuchstiere und Präparation der Rattenlunge

Wir verwendeten gesunde, männliche Wistar-Kyoto-Ratten im Alter von 17 Wochen. Die Isolation der Lungen erfolgte nach der Methode von Uhlig [1998]. Das genaue Vorgehen und die Versuchsanordnung wurden von uns kürzlich beschrieben [Meiring et al. 2005]. Vor Operationsbeginn wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (50 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Heparin (500 IU) wurde in die Schwanzvene injiziert, um eine intraoperative Blutgerinnung zu verhindern. Anschließend erfolgten die Darstellung der Trachea, eine Tracheotomie und die Einbindung eines Katheters. Nach transabdominaler Eröffnung des Diaphragmas wurde die Lunge umgehend über den Trachealkatheter ventiliert. Nach einer tiefen intraperitonealen Anästhesie mit Ketamin (100 mg/100g Körpergewicht) und Xylazin (0,5 mg/100g Körpergewicht) wurden die Tiere durch Öffnung der Bauchorta entblutet. Nach der Thorakotomie wurde ein Katheter durch eine Inzision in der rechten Herzkammer in den *Truncus pulmonalis* platziert. Der Katheter wurde fixiert und die Lunge sofort mit kalter PBS-Lösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung) perfundiert. Anschließend wurde, die linke Herzkammer vollständig abgetrennt und der linke Vorhof breit inzidiert. Zum Anschluss der Lunge an den Kreislauf der IPL wurden sowohl der *Truncus pulmonalis* als auch das linke Atrium kanüliert und noch *in situ* mit dem Perfusionsmedium perfundiert. Anschließend wurden Lunge und Trachea en bloc präpariert, in die künstliche Thoraxkammer eingebracht und die eigentliche Perfusion gestartet.

3.1.2. Beschreibung des Perfusionssystems

Für die Perfuptionsversuche wurden Perfusionserät (IPL-4401) und Software der Firma FMI GmbH, Oberbach, genutzt. Zusätzlich wurde von der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit eine Unterdruckkammer gebaut. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Software ermöglichte die konstante Aufzeichnung des pulmonalen Blutdrucks. Das Medium-Reservoir, die Ventilationskammer und die Perfuptionswege wurden durch ein rezirkulierendes Wasserbad bei einer konstanten Temperatur von 37 °C gehalten. Das Perfuptionsmedium wurde aufgrund seines umfangreichen Gebrauchs bei der Perfuption isolierter Organe ausgewählt. Es bestand aus einem modifizierten Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (der pH-Wert betrug 7,4) folgender Zusammensetzung: NaCl 118 mM; KCl 5,9 mM; CaCl₂ 2,5 mM; MgSO₄ 1,2 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 24,9 mM; Glukose 11,1 mM und wurde im Verhältnis 1:1 mit Haemacell-Lösung (Hoechst Marion Roussel) gemischt.

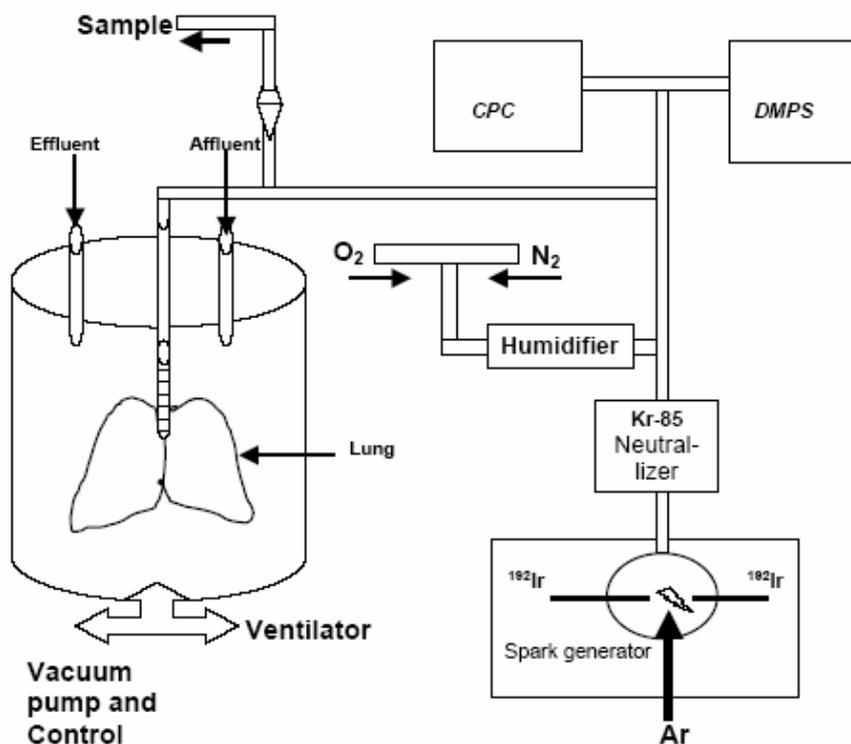


Abb. 3.1: Aufbau des in der Studie eingesetzten experimentellen Lungenperfuptionsystems. Die ultrafeinen mit ¹⁹²Ir radioaktiv markierten Iridium-Partikel (Ir-UFP) wurden in einem Funken-Generator (Spark generator) hergestellt. Am Ausgang des Funken-Generators wurde das Aerosol durch eine radioaktive ⁸⁵Kr-Quelle quasi neutralisiert. Das Aerosol wurde mit Stickstoff und Sauerstoff verdünnt und so eingestellt, dass ein Sauerstoffgehalt von 20% und eine relative Luftfeuchte von 50-60% erreicht wurden. Die Größenverteilung und Anzahl der Partikel wurde mittels DMPS (differential mobility particle sizer) bzw. CPC (condensation particle counter) überwacht. Die Radioaktivität des Aerosols wurde kontinuierlich gemessen. Die Lungen wurden mit einer Perfuptionsrate von 5 ml/min und einem Schlagvolumen von 10 ml perfundiert. Die Beatmungsfrequenz wurde bei 65 Atemzügen pro Minute gehalten.

Der Puffer wurde vorgewärmt und mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast, wobei die Strömungsrate niedrig genug war, um größere Schaumbildung im Medium zu vermeiden. Bevor das durch das System fließende Medium die Lungen erreichte, wurden eventuell gebildete Blasen

abgefangen; der pH-Wert wurde während des gesamten Experiments aufgezeichnet. Die Beatmungsfrequenz wurde konstant bei 65 Atemzügen pro Minute gehalten. Der maximale Unterdruck in der Kammer lag bei -1.5 kPa. Es wurden Atemzugvolumen von 3 bis 4 ml erreicht. Alle vier Minuten wurden die Lungen durch Anwendung eines Unterdrucks von -2.5 kPa in der Kammer geweitet. Die optimalen Perfusionseinstellungen lagen bei einer Perfusionsrate von 5ml/min und einem pH-Wert des Mediums von 7,4 vor. Der Perfusionsdruck war nicht konstant, wurde aber zwischen 10 und 14 kPa gehalten.

In einem zweiten Schritt wurde ein Rezirkulierungsmodus gewählt, um ein physiologischeres Modell für oxidativen Stress (zirkulierende PMN) zu verwenden. Als neues Perfusionsmedium wurde ein filtrierter modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer folgender Zusammensetzung eingesetzt: NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 2,5 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 13 mM; 0,1 % Glukose, 0,3 % HEPES und 2 % Albumin (Serva, Heidelberg). Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde vorgewärmt und mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast, wobei die Strömungsrate niedrig genug war, um größere Schaumbildung im Medium zu vermeiden. Bevor das durch das System fließende Medium die Lungen erreichte, wurden eventuell gebildete Blasen abgefangen; der pH-Wert wurde während des gesamten Experiments aufgezeichnet. Nach einer Einstellungsphase von 15 Minuten wurde mit PMN (1*10⁶ Zellen /ml) angereichertes Perfusat eingesetzt.

3.1.3.. Partikelherstellung und Exposition

Aerosole ultrafeiner mit ¹⁹²Ir radioaktiv markierter Iridium-Partikel (Ir-UFP) wurden in einem Funken-Generator (Spark generator) hergestellt. Die Größenverteilung und Anzahl der Partikel wurde mittels DMPS (DMPS 3070, TSA instruments) bzw. CPC (CPC 3022A, TSI Instruments) überwacht. Die angestrebte Größenverteilung der Ir-UFP lag bei einem mittleren Durchmesser von 17 bis 20 nm (geometrische Standardabweichung 1,6) bei einer Partikelkonzentration von 10⁷ cm⁻³. Bei einem Atemzugvolumen von 3-4 cm³ und einer Atemfrequenz von 65/min lagen die geschätzte Partikeldosis unter diesen Bedingungen bei 180 µg/m³ und die deponierte Dosis bei ca. 3 µg/Stunde.

3.1.4. Ermittlung der ¹⁹²Ir-UFP-Translokation

Die Radioaktivität wurde sowohl in den Perfusatproben als auch in den Herz-Lungen-Präparaten mit einem Gamma-Spektrometer bestimmt. Bei jenen Proben, die auf ^{99m}Tc-DTPA-Permeabilität untersucht wurden (siehe 3.1.6), erfolgte die Bestimmung der ¹⁹²Ir-Aktivität nachdem die ^{99m}Tc-Aktivität abgeklungen war. Die Messungen der Aktivität beider Isotope wurden im Hinblick auf Abfall und Hintergrundwerte der Radioaktivität korrigiert. Die ¹⁹²Ir-Aktivität in den Perfusatproben wurde als Bruchteil der insgesamt im Perfusat und im Herz-Lungen-Block gefundenen Aktivität angegeben.

3.1.5. Versuchsablauf

Nach einer 15minütigen Stabilisierungsphase, in der die isolierten Lungen bereits beatmet und perfundiert wurden, begann das Experiment mit der Inhalation eines frisch hergestellten [Kreyling et al. 2002] Aerosols ultrafeiner, radioaktiv markierter Iridiumpartikel (¹⁹²Ir-UFP). Die intratracheale Instillation von ^{99m}Tc-DTPA oder andere Instillationen starteten ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Das Perfusat wurde kontinuierlich gesammelt, und die Probenahme erfolgte in 15-Minuten-Intervallen. Folgende Behandlungen wurden untersucht:

- Gruppe 1:** Kontrollgruppe, nur Inhalation von ^{192}Ir -UFP-Aerosol über 120 Minuten;
Gruppe 2: Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, 500 μl H_2O_2 als Bolus (0.5 mM), Inhalation von ^{192}Ir -UFP-Aerosol über 120 Minuten;
Gruppe 3: Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, kontinuierliche Perfusion von Histamin in einer Konzentration von 10 μM über 2 Stunden, Inhalation von ^{192}Ir -UFP-Aerosol über 120 Minuten;
Gruppe 4: Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA und 500 μl Histamin (Bolus) Instillation in einer Konzentration von 10 mM, Inhalation von ^{192}Ir -UFP-Aerosol über 120 Minuten;
Gruppe 5: Instillation of 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA.

Für jede Gruppe wurden 3-4 Tiere eingesetzt. Der Versuchsablauf ist in Abb. 3.2 dargestellt.

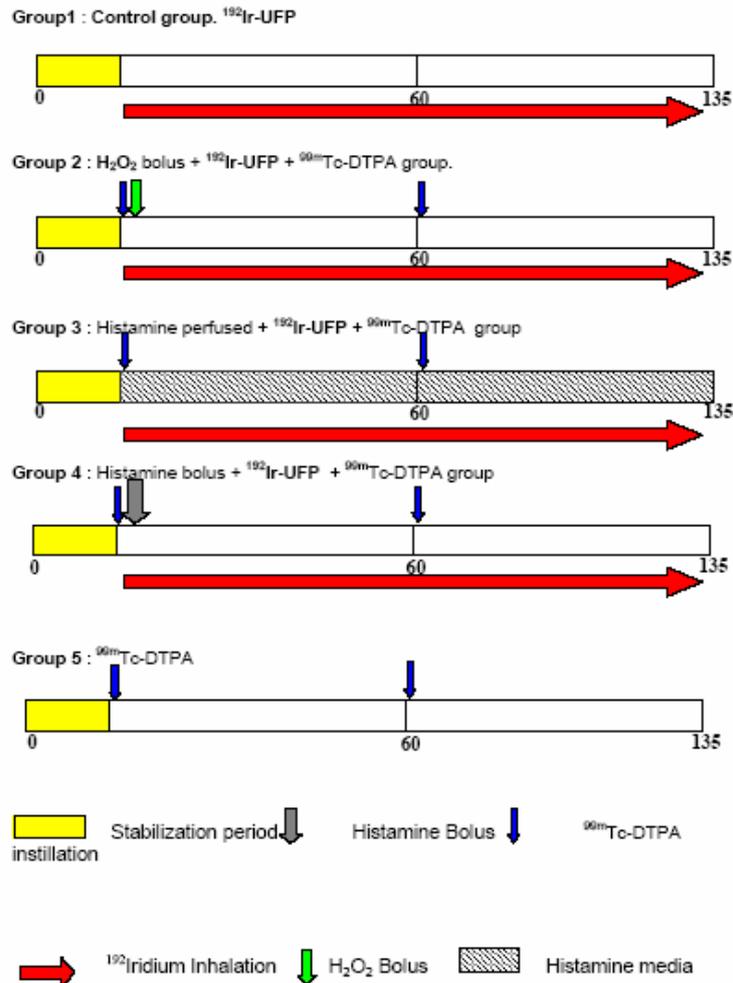


Abb. 3.2

Versuchsablauf der Experimente mit isoliert perfundierten Rattenlungen: Alle Perfusionen erfolgten bei Unterdruckventilation. Nach einer 15minütigen Stabilisierungsphase, in der die isolierten Lungen bereits beatmet und perfundiert wurden, begann das Experiment mit der Inhalation eines frisch hergestellten ^{192}Ir -UFP-Aerosols. Die intratracheale Instillation von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA oder andere Instillationen starteten ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Das Perfusat wurde kontinuierlich gesammelt, und die Probenahme erfolgte in 15 Minuten-Intervallen. Folgende Behandlungen wurden untersucht: **Gruppe 1:** Kontrollgruppe, nur ^{192}Ir -UFP-Inhalation über 120 min; **Gruppe 2:** Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, 500 μl H_2O_2 Bolus (0,5 mM), ^{192}Ir -UFP-Inhalation über 120 min; **Gruppe 3:** Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA, kontinuierliche Perfusion mit Histamin (10 μM) über 2 Stunden, ^{192}Ir -UFP-Inhalation über 120 min; **Gruppe 4:** Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA und Instillation von 500 μl Histamin als Bolus in einer Konzentration von 10 mM, ^{192}Ir -UFP-Inhalation über 120 min; **Gruppe 5:** Instillation von 50-100 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA. Für jede Gruppe wurden drei bis vier Tiere eingesetzt.

3.1.6. Bestimmung der Lungenpermeabilität

^{99m}Techne-^{99m}Tc-markiertes DTPA (^{99m}Tc-DTPA; DRN 4362 TechneScan-DTPA, Malinckrodt Medical BV, NL) wurde zur Bestimmung der Lungenpermeabilität eingesetzt. Das gefriergetrocknete DTPA-Pulver wurde in 10 ml steriler Kochsalzlösung mit ^{99m}Tc-Aktivität gelöst, die aus einem ^{99m}Tc-Generator eluiert wurde. Die Lösungen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann intratracheal instilliert. Das instillierte Volumen betrug 50-100 µL bei einer DTPA-Konzentration von 120-250 µg und einer ^{99m}Tc-Aktivität von 5-10 MBq. Die Permeabilität für ^{99m}Tc-DTPA wurde durch Messung der Aktivität im Herz-Lungen-Block und in den Perfusatproben bestimmt. Die ^{99m}Tc-Radioaktivität wurde ebenfalls mit einem Gamma-Spektrometer bestimmt. Da die ^{99m}Tc-Aktivität mindestens eine Größenordnung höher gewählt wurde als die ¹⁹²Ir-Deposition in den Lungen, war die von ¹⁹²Ir ausgehende Strahlungsinterferenz zu vernachlässigen.

3.1.7. Präparation der PMN

Humane polymorphkernige Leukozyten (PMN) wurden frisch aus dem venösen Blut freiwilliger Probanden isoliert (S-Monovette, 1,6 mg EDTA/ml Blut, Sarstedt). Die Vorbereitung der PMN beinhaltete die Sedimentation, Lymphoprep (Nycomed) Dichtezentrifugation bei 1500 rpm und osmotische Lyse der Leukozyten in einem Puffer (155 µM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ and 1 µM EDTA). Alle Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt, um eine vorzeitige Aktivierung der PMN während der Isolierung zu vermeiden. Die PMN wurden zweimal gewaschen und in Hanks-Lösung (Hank's balanced salt solution, HBSS) suspendiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mittels Trypan-Blau-Ausschlusstest bestimmt; die PMN-Präparationen waren zu 96 % lebensfähig. Die PMN wurden mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE markiert, indem sie 15 Minuten lang in HBSS mit einem CFSE-Gehalt von 1 µM inkubiert wurden. Anhaftender Farbstoff und nicht lebensfähige Zellen wurden mittels Waschung und Zentrifugation entfernt. Alle Bestimmungen fanden vor der Perfusion statt.

3.1.8. Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz in PMN

Unbehandelte oder mit CFSE markierte PMN wurden mit Phorbolmyristatazetat (PMA) oder Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) angeregt und die Freisetzung von Superoxidradikalen mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz gemessen. Die PMN wurden wie oben (Abschnitt 3.1.6) beschrieben isoliert und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Hanks-Lösung suspendiert. Zu 10 000 µl der PMN-Suspension wurden 100 µl Lucigenin (5×10^{-4} M) zugefügt. PMA (100 ng/ml) diente als Positivkontrolle. Die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz wurde über 40 Minuten bei 37°C im Luminometer (Multi.Bioluminat, Berthold) gemessen. Alle stimulierenden Substanzen und die entsprechenden Kontrollen wurden parallel getestet und die Experimente 4mal wiederholt.

3.1.9. Chemotaxis von PMN

PMN wurden wie unter 3.1.6 beschrieben aus Vollblut isoliert. Die Chemotaxis sowie die unspezifische Wanderung der Zellen wurden in einer 96-Well-Boyden-Mikrochemotaxis-kammer (Neuroprobe Inc., Bethesda, MD, USA) vor der Perfusion bestimmt. Wir benutzten Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 3 µm. In unteren Teil der Platten gaben wir HBSS, fMLP (10^{-6} , 20^{-6} und 30^{-6} M) oder IL-8 (10^{-9} , 10^{-10} und 10^{-11} g/ml). Die mit PBS vorbehandelten oder mit CFSE angefärbten PMN wurden in Teil der Platten der Kammer gegeben. Jede Behandlung wurde dreimal getestet. Die Kammer wurde 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kammer geöffnet, der Filter entfernt und getrocknet und die Neutrophilen fixiert und gefärbt. Diejenigen PMN, die auf den Filter saßen und in das Filter eingewandert waren (Adhäsion und Migration) wurden mit einem

Mikroplattenleser (Labsystems–MultiSkan Ascent) bei einer Absorption von 550 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche Absorptionswerte angegeben, von denen die Hintergrundabsorptionswerte der Filter allein abgezogen worden waren.

3.1.10. Gewebepräparation und Mikroskopie

Sofort nach Beendigung der Lungenperfusion wurden die mit radioaktiven Partikeln behandelten Lungen bei Raumtemperatur und einem Luftdruck von 3,5 kPa getrocknet; anschließend erfolgte die Bestimmung der Partikelverteilung. Für histopathologische Untersuchungen wurden nur Lungen verwendet, die mit nicht-radioaktiven Iridiumpartikeln behandelt worden waren. Nach dem Experiment wurden zur Fixierung des Präparates die Trachea und die Pulmonalvene mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2, 340 mOsm) perfundiert. Anschließend wurde die ganze Lunge für 2 Stunden bei Raumtemperatur in die gleiche Fixierungslösung getaucht. Von jedem Tier wurden zwei Scheiben der rechten und linken caudalen Lungenlappen in Parafin eingebettet und davon wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hematoxylin and Eosin gefärbt. Kleine Mengen des linken Lungenlappens einer Untergruppe von 7 Tieren wurden in Epon® eingebettet, und Semidünnschnitte (1 µm) wurden mit Toluidinblau gefärbt.

3.1.11. Biochemische Analyse der Perfusatproben

Die Perfusatproben wurden vor der Bestimmung der Mediatoren Angiotensin converting enzyme (ACE), Alkalische Phosphatase (ALP) und Myeloperoxidase (MPO) bei -20°C gelagert. ACE wurde nach der Methode von Maguire und Price [1985] gemessen (ACE-Stadard von Bühlmann Laboratories AG, CH). Die Bestimmung der ACE-Aktivität erfolgte durch photometrische Messung der Hydrolyse von N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-Phenyl-alanyl-Glycyl-Glycyl (FAPGG) bei 37°C mittels eines Spektrophotometers (Beckmann DU 640). Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase wurde ein Kit der Firma Merck (Cat no. 104019990314) verwendet; die Messungen erfolgten bei 25°C mit einem Beckman DU 640 Spektrophotometer. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Assay (BCA = Bicinchoninsäure) [Smith et al 1985]. Die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) – ein Marker der Neutrophilenaktivierung – wurde nach der Methode von Klebanoff et al. [1984] wie in früheren Arbeiten beschrieben [Knaapen et al. 2002a] bestimmt: Dazu wurden 200 µl der Probe zu 800 µl der frisch zubereiteten MPO-Testlösung (19,2 µl Guaiakol; 10,76 ml H_2O ; 1,2 ml von 0,1M Natriumphosphatpuffer und 40 µl von 0,1 µM H_2O_2) gegeben. Die Bildung von Tetraguajakol wurde über 5 Minuten spektrophotometrisch (Beckmann DU 640) bei 470 nm gemessen, und die Veränderung der optischen Dichte pro Minute vom Ausgangswert berechnet. Die MPO-Aktivität wurde in mU/ml angegeben.

3.2 Untersuchungen am isolierten Herzen nach Langendorff

3.2.1. Allgemeine Beschreibung

Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff ist ein geeignetes Modell, um die direkten und indirekten Wirkungen von Umweltstäuben auf das Herz zu untersuchen. Das isolierte Herz kleiner Säuger ist ein sehr gut reproduzierbares Präparat, das schnell und in großer Zahl untersucht werden kann [Vork et al. 1993]. Das Präparat ist relativ billig und ermöglicht es, ein breites Spektrum biochemischer, physiologischer, morphologischer und pharmakologischer Parameter zu kontrollieren oder zu messen. Zu den Vorteilen des isoliert perfundierten Herz-Modells gehört es, dass die Messungen in Abwesenheit störender Einflüsse anderer Organe, des Blutkreislaufs oder zirkulierender neurohormonaler Faktoren erfolgen können [Schunkert et al. 1995]. Ein weiterer Vorteil des Präparates ist, dass die Experimente auch bei Ereignissen fortgeführt werden können, die normalerweise das

Überleben im in vivo Experiment gefährden, wie z.B. bei einem durch Infarkt ausgelösten Verlust der Pumpfunktion [Schwartz et al. 1993], Herzstillstand [Ejike et al. 2004] oder Arrhythmien [Valentin et al. 2004]. Das isolierte Herz lässt sich über mehrere Stunden funktionsfähig erhalten; das Präparat verschlechtert sich aber mit der Zeit. Das Rattenherz ist am besten charakterisiert und wird für komplexere Perfusionspräparate am häufigsten eingesetzt. Es ist gut handhabbar und seine Größe erlaubt intraventrikuläre Aufzeichnungen. Allerdings beschränkt die kurze Dauer des Aktionspotentials seine Eignung für Untersuchungen von Arrhythmien erzeugenden oder verhindernden Substanzen. Beim Herz-Präparat nach Langendorff wird die Aorta über eine Kanüle mit einem Reservoir verbunden, das die mit Sauerstoff angereicherte Perfusionsflüssigkeit enthält. Die Perfusionsflüssigkeit wird retrograd, d.h. entgegen der physiologischen Flussrichtung des Blutes, die Aorta abwärts entweder bei konstanter Durchflussgeschwindigkeit, z.B. über eine Infusionspumpe, oder konstantem hydrostatischem Druck (üblicherweise im Bereich von 60 bis 100 mmHg) eingeleitet. Sobald das Herz mit der Kanüle verbunden und die Perfusion eingeleitet ist, beginnt die Kontraktion des Herzmuskels und der reguläre Herzrhythmus. Nach einer Stabilisierungsphase von etwa 10 Minuten können die Messungen am Präparat erfolgen.

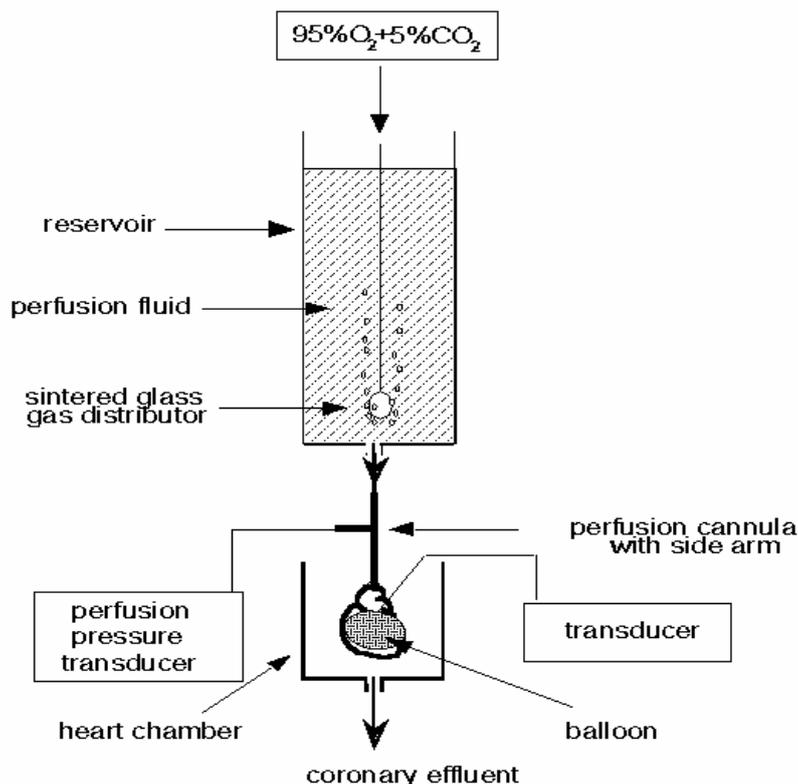


Abb. 3.3
Versuchsaufbau des isolierten Herzmodells nach Langendorff

3.2.2. Versuchstiere, Präparation und experimentelles Protokoll

Wir verwendeten spontan hypertensive männliche Ratten (SHR/NHsd) im Alter von 11 bis 12 Wochen mit einem Gewicht von 250-350 g aus der Zuchtanstalt von Harlan (Indianapolis, Indiana, USA). Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen bei konstanter Raumtemperatur mit einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (SSP-Tox Standardfutter, Hope Farms, Woerden, NL). Die Instillation der Partikel

(EHC-93, 10 mg/kg Körpergewicht in einer Konzentration von 5 mg/ml), von LPS (350 Endotoxineinheiten pro Tier, 0,5 ml) oder Kochsalzlösung (2ml/kg Körpergewicht) erfolgte über eine in die Trachea eingebrachte Kanüle. Zuvor waren die Tiere kurz durch Inhalation von 4% Halothan betäubt worden.

Vier Stunden nach den jeweiligen Instillationen wurden die Tiere durch i.p. Injektion (1 ml/kg Körpergewicht) einer Mischung von Ketamin (100 mg/ml) und Rompun (20 mg/ml) im Verhältnis 10:4 anästhesiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass diese Anästhesierung keinen Einfluss auf die Herzfunktionen hat. Nach Öffnung des Thorax wurde durch eine Kanüle kalte (4 °C) Krebs-Ringer-Lösung in die Aorta injiziert. Das Herz wurde schnell entnommen und sofort für die retrograde Perfusion nach Langendorff mit auf 37°C angewärmter, mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begaster modifizierter Krebs-Ringer-Lösung (NaCl 118 mM; KCl 5,9 mM; CaCl₂ 2,5 mM; MgSO₄ 1,2 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 24,9 mM; Glukose 11,1 mM; pH = 7,4) durchströmt.

3.3.3. *Wirkungsparameter und Pathologie*

Durch einen im linken Ventrikel gelegenen mit destilliertem Wasser gefüllten Latexballon, der über einen Katheter mit einem Druckmesssystem (SPECTRAMED TNF-R Becton-Dickinson) gekoppelt war, wurde der linksventrikuläre Druck (LVDP) gemessen. Die Aufzeichnung des LVDP und der Herzfrequenz (HR) erfolgte mit einem Graphtec Linear Recorder Mark 8, Type WR 3500 (Hugo Sachs Electronic), der mit einem Differenzierungsverstärker (DC Bridge amplifier DBA 660, Hugo Sachs Electronic) und einem Herzfrequenzmodul (HRM 669 Hugo Sachs Electronic) ausgestattet war. Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) wurde anhand der aufgezeichneten Parameter berechnet. Der ventrikuläre diastolische Druck wurde auf 5 bis 10 mmHg eingestellt. Der Koronarfluss wurde durch Messung des Volumens der das koronare System verlassenden Perfusatsflüssigkeit ermittelt und betrug zwischen 8 und 10 ml/min.

Zur Untersuchung der Wirkung einer Ischämie wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden allen Herzen 30 Minuten lang ins Gleichgewicht gebracht. Durch Verschluss der Koronararterie wurde eine 35minütige ischämische Phase ausgelöst. Darauf folgte bei allen Gruppen eine Reperfusion über 120 Minuten. Andere Experimente am isolierten Herzen wurden ohne vorherige Ischämie an Herzen von mit Kochsalzlösung vorbehandelten SH-Ratten durchgeführt. In diesen Versuchen wurden die wasserlösliche Partikelfraktion oder ZnSO₄ als Hauptmetall in unseren Partikelproben durch Kurzzeitinfusion getestet. Vor Infusion der Testlösungen gab es eine vergleichbare Periode zur Gleichgewichtseinstellung. Mit Haematoxylin-Eosin (5 µm) gefärbte Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch (Olympus BX40, WIB-Filter) ausgewertet, um ischämische und normale Regionen des Herzens anhand ihres Autofluoreszenzmusters zu identifizieren [Osornio & Ossa 1983]. Dem Auswertenden war nicht bekannt, welchen Versuchsbedingungen die Ratten unterzogen worden waren. Ischämische Regionen wurden in der linken und rechten Herzkammer mit entsprechender subendocardialer, subepicardialer oder transmuraler Lage gefunden. Die Ausdehnung der ischämischen Areale wurde als Prozentsatz des betreffenden histologischen Schnittes angegeben und wie folgt eingestuft: 0 = keine Ischämie; ± = < 5%; + = 6 – 20%; ++ = 21 – 35%; +++ = 36 -50%; ++++ = > 50%.

3.3 Pharmakologische Untersuchungen an isolierten Aortenringen

3.3.1. *Versuchstiere*

Wir verwendeten männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensive Ratten (SHR) im Alter von 13 bis 15 Wochen aus der Zuchtanstalt von Harlan Charles River (Deutschland). Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen bei konstanter Raumtemperatur mit

einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (SSP-Tox Standardfutter, Hope Farms, Woerden, NL). Die Anästhesierung der Tiere erfolgte durch i.p. Injektion (1 ml/kg Körpergewicht) einer Mischung von Ketamin (100 mg/ml) und Rompun (20 mg/ml) im Verhältnis 10:4.

3.3.2. *Präparation der Gefäße*

Die Brustorta wurde schnell entfernt und in kalte, modifizierte Krebs-Ringer-Lösung (NaCl 118 mM; KCl 5,9 mM; CaCl₂ 2,5 mM; MgSO₄ 1,2 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 24,9 mM; Glukose 11,1 mM; pH = 7,4) gegeben. Nachdem die Aorta von Fett und Bindegewebe befreit worden war, wurde sie in 2-3 mm lange Stücke geschnitten. Dabei wurde besonders darauf geachtet, das Endothel nicht zu beschädigen. Für Versuche, in denen das Endothel der Aortenringe entfernt wurde, wurden die Aortenringe umgewendet und leicht an einem Papiertaschentuch gerieben. Die Aortenringe wurden zwischen zwei Haken in einem Organbad (10 ml) ausgebreitet, das mit 37°C warmem mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begastem modifiziertem Krebs-Puffer gefüllt war, und mit einer Ruhespannung von 1,5 g vorgespannt; Veränderungen der Kontraktionskraft wurden mittels eines isometrischen Kraftaufnehmers (Harvard Apparatus, Inc. Holliston, Ma., USA) aufgezeichnet, der mit einem Computer verbunden war. Vor dem Start der Experimente ruhte das Präparat etwa 60 Minuten lang, wobei die Krebs-Lösung viermal gewechselt wurde. Danach wurden die Ringe mit KCl (80 mM) für 2 Minuten angeregt und anschließend dreimal im Abstand von 5, 10 und 15 Minuten gewaschen. Nach der dritten Waschung wurde die Ruhespannung wieder eingestellt. Die KCl-Behandlung und Waschung wurden wiederholt.

3.3.3. *Evaluation der gefäßerweiternden Wirkung*

Kumulierte Dosis-Wirkungskurven mit Staubsuspensionen (EHC-93), partikelfreiem Filtrat (10 µg/ml bis 100 µg/ml), CuSO₄ oder ZnSO₄ (10 – 100 µM) wurden nach Präkontraktion mit Phenylephrin (0,2 µM) bestimmt.

Die endothelabhängige Gefäßerweiterung wurde mit Carbachol (10 µM) nach der Dosis-Wirkungskurve für EHC untersucht, um die Funktionsfähigkeit des Endothels zu überprüfen. Alle Experimente fanden in Gegenwart von Diclofenac (100 µM) statt, dem unspezifischen Cyclooxygenase-Inhibitor, um eine Beteiligung von Prostaglandin an der Reaktion auf die Partikelexposition zu vermeiden. Eine Beteiligung rezeptor-abhängiger Wege wurde durch Anwendung von Capsaizepin (100 µM), einem unspezifischen Capsaicinrezeptor-Antagonisten, sowie Pyloramin (10 µM) und Cimetidin (10 µM), den Antagonisten von Histamin-H1- bzw. -H2-Rezeptoren, untersucht. Die Rolle von NO-cGMP wurde durch Verwendung von NS2028 (10 µM), einen spezifischen Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase untersucht, und die Beteiligung von Zytochrom-P450-Epoxigenase mit 17-ODYA (10 µM), einem unspezifischen Inhibitor dieses Enzyms. Die Rolle von Hyperpolarisationsfaktoren wurde durch Verwendung einer depolarisierenden Lösung von KCl (40 µM) getestet, um eine Vorkontraktion der Aortenringe zu induzieren. Die jeweiligen Antagonisten und Inhibitoren wurden 15 Minuten vor der durch EHC-93 und lösliche Metalle induzierten Relaxation dem Bad zugefügt. Die gefäßerweiternde Wirkung wurde beim Maximum der Dosis-Wirkungsbeziehung ausgewertet. Die Ergebnisse werden als prozentuelle Aufhebung der durch Phenylephrin oder KCl induzierten Präkontraktion angegeben.

3.3.4. *Bestimmung der löslichen Guanylatzyklase*

Menschliche lösliche Guanylatzyklase wurde aus plättchenreichem Blutplasma gewonnen [Kojda & Noack 1993; Weber et al. 2001]. Die spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase wurde aufgrund der durch das Enzym katalysierten Bildung von

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{cGMP}$ aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bestimmt [Schultz und Böhme 1984]. Dazu wurde lösliche Guanylatzyklase aus der Diethylaminofraktion (20-40 μg Protein) mit 100 μl Triethanolamin-Puffer (50 mM, pH 7,4, 37°C) folgender Zusammensetzung gegeben: 5 nM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (0,4 μCi), 100 μM GTP, 1 mM cGMP, 1 mM 3-Isobutylmethylxanthin, 1 mM MgCl_2 und 1 mM DTT in Gegenwart von 500 μM S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) oder Vehikelkontrolle (0,25% DMSO). Um Dosis-Wirkungskurven für SNAP und PM zu erstellen, enthielten die Proben unterschiedliche Konzentrationen dieser Stoffe bzw. DMSO, die bei den Ergebnissen angegeben werden.

3.4 Untersuchungen an Zellkulturen

3.4.1. Calciumimaging in Cardiomyocyten

Herzmuskelzellen (H9c2-Zellen von European cell collection) wurden in befeuchteter Luft (5% CO_2) bei 37°C in modifiziertem Dulbecco-Medium kultiviert, das mit 10% fetalem Rinderserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 1 mM Pyruvat ergänzt wurde. Für die Imaging-Experimente wurden die Zellen auf mit Poly-D-Lysin beschichtete Objektträger gegeben. Die Zellen wurden 3 bis 5 Tage wachsen gelassen für die Untersuchungen an Myoblasten (subkonfluente Kulturen). Vor der Beladung mit fluoreszierenden Farbstoffen wurden die Zellen 30 Minuten lang mit Medium (2% Rinderserumalbumin/ extrazelluläres Medium) inkubiert, das aus 121 mM NaCl, 5 mM NaHCO_3 , 10 mM Na-HEPES, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM Glukose und 2% Rinderserumalbumin (pH 7,4; 37°C) bestand [Pacher et al. 2000, 2001; Szalai et al. 2000]. Zur Fluoreszenzmessung des intrazellulären Kalziums wurden die auf den Objektträgern gewachsenen Zellen zweimal mit HBS gewaschen und 30 Minuten bei 37°C in HBS (pH 7,3) inkubiert, das 1 μM des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-Acetomethylester enthielt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 4 ml HBS gewaschen, auf ein Inversionsmikroskop (Zeiss Axiovert) gebracht und weitere 5 Minuten gewaschen, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Mittels digitaler Imaging-Fluoreszenzmikroskopie (Photon Technology International, New Jersey, USA) wurde die Fluoreszenz von 6 bis 8 Zellen gleichzeitig aufgezeichnet wie von Bickmeyer et al. [1998] beschrieben. Die Experimente mit Zn^{++} -Lösungen oder der löslichen Partikelfraktion wurden jeweils mit 7 bis 12 verschiedenen Zellen durchgeführt; pro Experiment wurden insgesamt 35-100 Zellen betrachtet.

Um zu prüfen, ob die löslichen Partikelbestandteile einen direkten Effekt auf den Herzmuskel haben können, untersuchten wir die Kalziumaufnahme der isolierten Herzmuskelzellen nach Stimulation mit 50 μM KCl (rezeptorunabhängig) bzw. mit 100 μM ATP (rezeptorabhängig). Die Lösungen wurden in zwei Perioden getestet, die durch ein 30minütiges Intervall getrennt waren, in dem partikelfreies Filtrat (1-50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) oder ZnSO_4 (50 μM) eingesetzt wurden, um die Fähigkeit der Herzmuskelzellen zur Modifizierung des Kalziumeinstroms zu überprüfen. Die Wirkung der löslichen Partikelbestandteile auf den intrazellulären Kalziumeinstrom wurde mit Thapsigargin (1 μM) bestimmt und der Effekt auf den extrazellulären Kalziumeinstrom mit dem Kalziumkanal-Antagonisten Dihydropyridin Bayk 8344 (1-5-10 μM).

4. Ergebnisse

4.1 Translokation von Nanopartikeln in der bei Unterdruck beatmeten isoliert perfundierten Lunge

4.1.1. Partikelverteilung und -deposition

In der ersten Versuchsreihe wurde die Verteilung der ultrafeinen Iridium-Partikel (^{192}Ir -UFP) anhand der Radioaktivität in der Lunge gemessen. Eine Beeinträchtigung der Lungenleistung konnte aufgrund der steigenden Aufblashäufigkeit zur Erhaltung des Atemvolumens beobachtet werden, ließ sich aus Strahlensicherheitsgründen bei der Unterdruckbelüftung jedoch nicht quantifizieren. In einem Experiment, bei dem die gleiche Ausrüstung unter Überdruck eingesetzt wurde, veränderten sich das Atemvolumen und der Atemdruck über die zwei Stunden Dauer der Perfusion nicht. Die Partikelgrößenverteilung im inhaliierten Aerosol war gut reproduzierbar, und der mittlere Durchmesser (count median diameter, CMD) der Teilchen betrug 16 – 18 nm (Abb. 4.1). Die geometrische Standardabweichung betrug 1,6. Die Partikeldeposition in den isoliert-perfundierten Lungen wurde mit derjenigen bei parallel dem gleichen Aerosol exponierten Versuchstieren verglichen und zeigte eine ähnliche homogene Verteilung mit etwas geringerer Deposition (diese Daten sind nicht dargestellt).

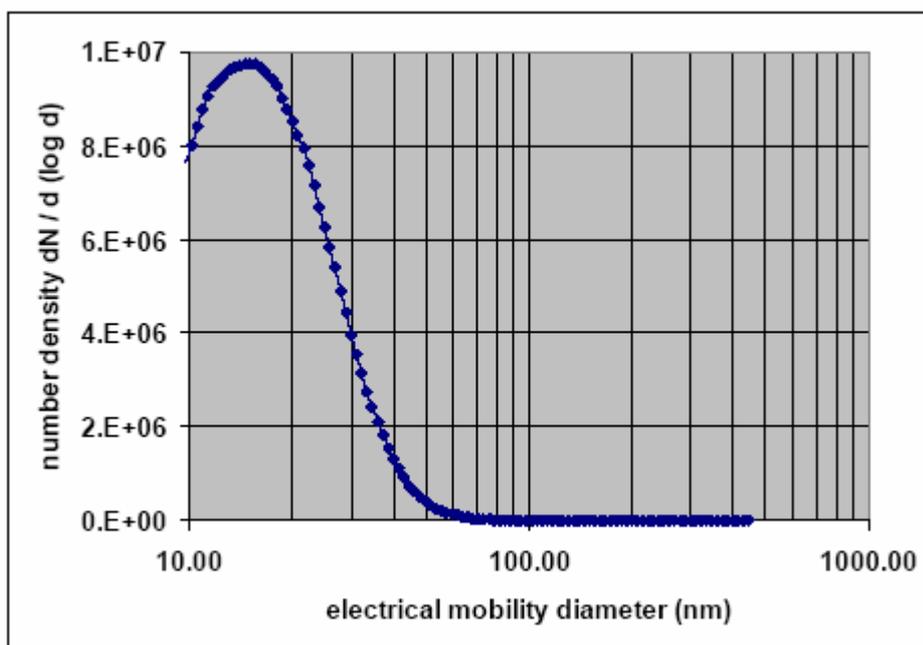


Abb. 4.1: Die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung in einem typischen Perfusionsexperiment über die gesamte Expositionszeit von 120 Minuten zeigt einen mittleren Durchmesser (count median diameter, CMD) von 16,9 nm (GSD = 1,6. Aerosolkonzentration $4,45 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$, SD $0,13 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$).

4.1.2. Translokation ultrafeiner Partikel nach modifizierter Permeabilität

In einer umfangreichen Reihe von Perfusionen zeigte sich bei Kontrollungen keine Translokation von ^{192}Ir -UFP; die Varianz zwischen den verschiedenen Perfusionen liegt unter 5 % (Abb. 4.2). Mit verschiedenen Behandlungen wurde dann untersucht, welche Rolle die epitheliale und die endotheliale Permeabilität bei der Partikeltranslokation spielen. Zunächst wurde durch Hyperblähung das Atemvolumen pro Minute verdoppelt; dies führte jedoch nicht zu einer verstärkten Translokation der Nanopartikel (Daten sind nicht dargestellt). Eine

initiale Bolusinjektion von H_2O_2 in die Trachea der IPL zum Erreichen einer Endkonzentration von 0,5 mM führte 60 Minuten nach der Inhalation des radioaktiven Aerosols zum Beginn einer Partikeltranslokation. Zwischen der Kontroll- und der H_2O_2 -Gruppe wurde 90, 105 und 120 Minuten nach Beginn der Inhalation ein signifikanter ($P < 0,05$, Mann-Whitney U-Test) Unterschied in der partikelbedingten Radioaktivität im Perfusat festgestellt (Abb. 4.2). Zu Zeitpunkten unterhalb von 60 Minuten waren die Unterschiede zwischen den unbehandelten Lungen nur von grenzwertiger Signifikanz ($P < 0,1$; Mann-Whitney-Test). Die Varianz zwischen den Perfusionen bei der H_2O_2 -Gruppe war wesentlich höher als bei der Kontrollgruppe. Es zeigte sich jedoch bei den Experimenten mit den mit H_2O_2 vorbehandelten Lungen ein ähnlicher Trend in allen Perfusionen. Erhöhte Radioaktivität im Perfusat wurde nur jenseits der Perfusionszeit von 60 Minuten gefunden. Eine vergleichbare Translokation bzgl. des Zeitprofils wurde bei Lungen in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Histamin in der vaskulären Perfusionsflüssigkeit beobachtet (Abb. 4.2). Unter diesen Versuchsbedingungen ließ sich jedoch nur nach 120 Minuten Perfusionszeit ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrolllungen feststellen. Andererseits wurde bei den Lungen, die durch Injektion eines Histaminbolus behandelt wurden, keine durch ^{192}Ir -UFP bedingte Radioaktivität im Perfusat nachgewiesen.

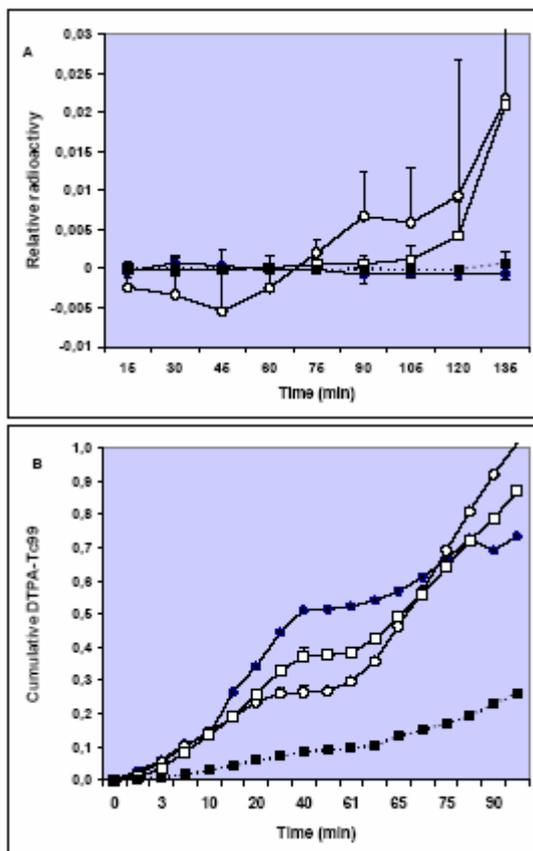


Abb 4.2

Translokation von ^{192}Ir -UFP (oberes Bild, A) und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (unteres Bild, B) ins Perfusat isoliert perfundierter Rattenlungen als Anteil der abgelagerten Dosis für inhalierte Partikel und als Anteil der instillierten Dosis für DTPA. Es wurden sowohl Kontrolllungen (●) als auch Lungen eingesetzt, die in situ behandelt wurden mit H_2O_2 Bolus 0,5 mM (○), Histamin ($1 \mu\text{M}$) im Perfusat (□) oder 0,5 mM in die Lunge instilliert (■).

Eine Stabilisierungsperiode von 15 Minuten erfolgte vor jeder Behandlung, und die Probensammlung erfolgte alle 15 Minuten zur Bestimmung der Translokation und der Lungenmarker. Die Werte im oberen Bild stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei bis vier Experimenten dar; die Werte im unteren Bild stellen nur die Mittelwerte von drei bis vier Experimenten dar und geben nur einen Trend an.

Interessanterweise ist die Kinetik der Translokation von DTPA (Abb. 4.2) und ultrafeinen Iridiumpartikeln sehr unterschiedlich. Während die Iridiumpartikel erst nach 60 Minuten Inhalationsdauer im Perfusat ansteigen, lässt sich DTPA innerhalb weniger Minuten nach der intratrachealen Instillation im Perfusat messen. Andererseits lässt sich die Wirkung von H_2O_2 und Gefäßhistamin auf die Partikeltranslokation auch in der DTPA-Clearance nachweisen (Abb. 4.2). Wenn auch nicht signifikant, verursachten beide Behandlungen nach einer Stunde eine tendenziell höhere Translokationsrate von DTPA, was auch für die Translokation von ^{192}Ir -UFP beobachtet wurde. Die Injektion eines Histaminbolus mit einer Endkonzentration im Lumen von 0,5 mM verursachte eine beträchtliche Verlangsamung der DTPA-Permeabilität (Abb. 4.2) und zeigte keine Wirkung auf die Translokation von ^{192}Ir -UFP.

4.1.3. Biomarker epithelialer und endothelialer Schädigung

Als Marker einer Schädigung von Typ-II-Zellen wurde die alkalische Phosphatase (ALP) in Kontroll- und vorbehandelten Lungen gemessen. Im Perfusat der Kontrolllungen und der mit H_2O_2 vorbehandelten Lungen ließ sich nach Exposition gegenüber ultrafeinen ^{192}Ir -Partikeln kein signifikanter Unterschied in der ALP-Aktivität (15 – 135 Minuten) feststellen (Abb. 4.3). In den mit Gefäßhistamin perfundierten ILP wurde nach 15 und 30 Minuten eine signifikant niedrigere ALP-Aktivität gemessen als nur nach Inhalation von ^{192}Ir -UFP. Zu allen späteren Messzeitpunkten zeigte sich kein Unterschied zu den Kontrolllungen (Abb. 4.3.). Auch die Gruppe, die Histamin als Bolus erhalten hatte, zeigte keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Zur Abschätzung des endothelialen Schadens wurde Angiotensin Converting Enzyme (ACE) im Lungenperfusat gemessen (Abb. 4.3). Zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen, denen H_2O_2 , Histamin im Perfusat oder Histamin als Bolus in die Trachea appliziert wurde, wurden keine signifikanten Unterschiede der ACE-Aktivität gefunden (ANOVA, post-hoc Tukey und Mann Whitney-Test). Um zu überprüfen, ob die Wirkung von H_2O_2 durch die Freisetzung von Histamin vermittelt wurde, haben wir die Histaminkonzentration im Perfusat der mit H_2O_2 behandelten Lungen gemessen, konnten jedoch keinen Unterschied zu den Perfusaten der Kontrollen feststellen. Auch die totale Proteinmenge als Maß für die Lungenpermeabilität war bei den unterschiedlich behandelten Gruppen vergleichbar.

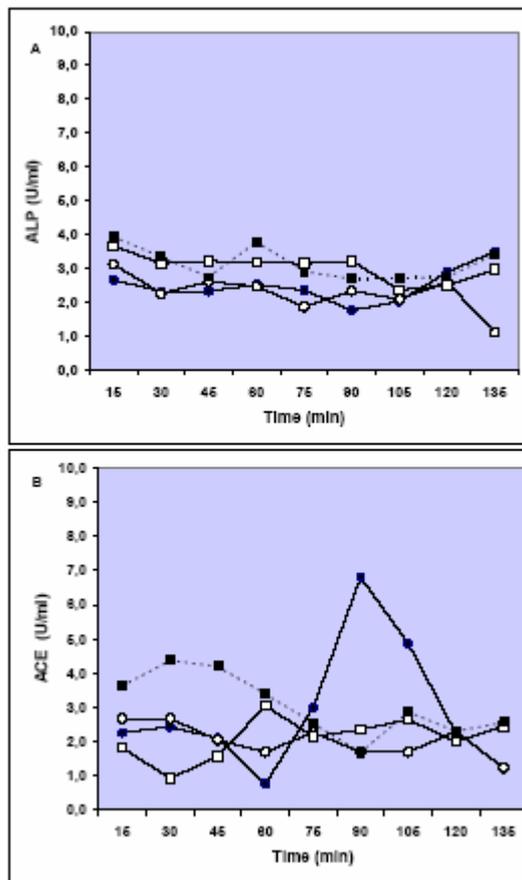


Abb. 4.3

Freisetzung von alkalischer Phosphatase (A) und Angiotensin Converting Enzyme (B), gemessen im Lungenperfusat während und nach der Partikelinhalation und verschiedenen Behandlungen. Es wurden sowohl Kontrolllungen (●) als auch Lungen, die mit H_2O_2 (○), Histamin (10 μ M) im Perfusat (□) oder als Bolus in sie Lunge injiziert (■) behandelt wurden. Die Werte stellen den Mittelwert von drei bis vier Experimenten dar.

4.1.4. Lungenmorphologie

Die Ergebnisse der histopathologischen Analysen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und in Abbildung 4.4 dargestellt. Insgesamt finden sich beträchtliche Schädigungen am Ende der Perfusionsexperimente, es gibt jedoch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen. Bei allen Gruppen wurden subepitheliale Rundzellinfiltration und interstitielle Dilatation mit moderater bis schwerer Ödembildung beobachtet. Gelegentlich wurden

alveolare Dilatation, alveolare Entzündung und Flüssigkeit im Alveolarlumen gefunden. Das Verfahren der in vitro Perfusion könnte die Ursache für die perivaskuläre und peribronchiale Dilatation in allen Lungen sein. H₂O₂ könnte direkt für die epithelialen Schäden in den proximalen Bronchien der mit H₂O₂ instillierten Gruppen verantwortlich sein.

Tabelle 4.1: Morphologische Auswertung der Rattenlungen nach 2-stündiger Perfusion und Inhalation von Ir-UFP. Die Lungenschnitte wurden mit HE oder Toluidinblau gefärbt. Zu den untersuchten Lungenregionen gehörten der Bronchialbereich, die Blutgefäße und der Alveolarraum.

Behandlung	Bronchialbereich	Blutgefäße	Alveolarraum
Kontrolle	Subepitheliale Rundzellinfiltration, interstitielle Erweiterung	interstitielle Erweiterung	peripher geringe alveoläre Erweiterung
Wasserstoffperoxid	Abschuppung der Epithelschicht, teilweise Zerstörung der subepithelialen Struktur	moderate bis schwere interstitielle Erweiterung	
Histamin im Perfusat	Subepitheliale Rundzellinfiltration, interstitielle Erweiterung	moderate bis schwere interstitielle Erweiterung	peripher alveoläre Erweiterung
Histamin (Bolus)	Subepitheliale Rundzellinfiltration, interstitielle Erweiterung	moderate bis schwere interstitielle Erweiterung	herdartige alveoläre Erweiterung, ödematöse Flüssigkeit im Alveolarlumen

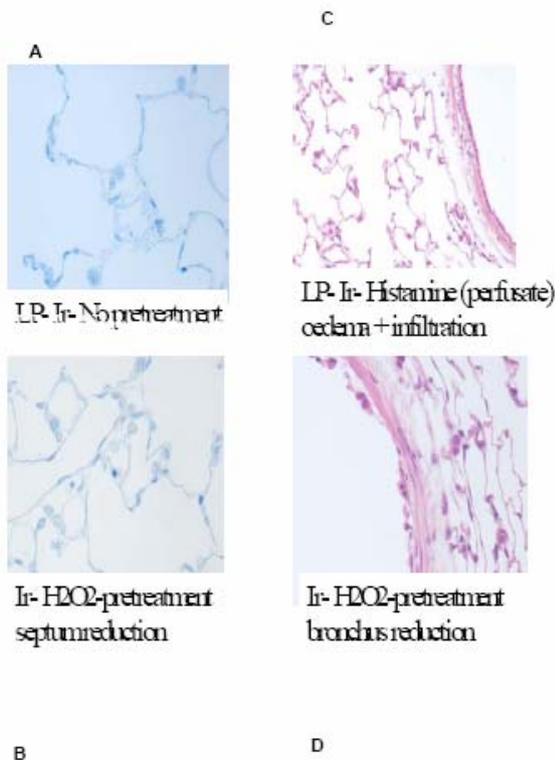


Abb. 4.4
Beispiele für histopathologische Läsionen in Lungen nach zweistündiger Perfusion und Inhalation von nicht radioaktiven Iridiumpartikeln: Kontroll-lunge (A); Lunge, die mit einem H₂O₂-Bolus im Lumen vorbehandelt wurde (B, D) und eine Septum- und Bronchus-Reduktion zeigt; mit Histamin perfundierte Lunge (C), die Ödem-bildung und Infiltration aufweist.

4.2 Einfluss von oxidativem Stress durch Gabe von PMN

Die oben genannten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Modifikation der epithelialen und endothelialen Permeabilität eine gute Methode ist, um die Translokation ultrafeiner Partikel zu verstärken. Daher wurde ein physiologischeres Modell entwickelt, in dem die Lungen durch im Perfusat zirkulierende Neutrophile oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Nach einer Stabilisationszeit von 15 Minuten wurden die Lungen verschiedenen experimentellen Bedingungen ausgesetzt. Die Experimente bestanden aus den folgenden Gruppen:

- Kontrollgruppe mit Instillation von destilliertem Wasser nach 15 Minuten,
- Histaminperfusat mit intratrachealer Instillation von radioaktiv markierten Iridiumpartikeln,
- Normale intratracheale Instillation radioaktiver Iridiumpartikel,
- PMN-angereichertes Medium mit intratrachealer Instillation von radioaktiv markierten Iridiumpartikeln,
- PMN-angereichertes Medium mit fMLP (Neutrophilen-Aktivator) und Instillation von radioaktiv markierten Iridiumpartikeln,
- Histamin- und PMN-angereichertes Perfusat mit Instillation von radioaktiv markierten Iridiumpartikeln.

Außer bei den Kontrollen wurden die radioaktiven Iridiumpartikel nach 15 Minuten instilliert. Zur Bestimmung der Mediatorfreisetzung wurde das Perfusat alle 15 Minuten gesammelt, die Startkonzentration an PMN im Medium bestand aus 1×10^6 Zellen/ml.

4.2.1 Einfluss der Anfärbung auf die PMN-Funktion

Die Einflüsse von Aufbewahrungszeit und Temperatur auf die Funktion der Neutrophilen wurde anhand von zwei vitalen Funktionen der Zellen bestimmt, d.h. der Produktion oxidativer Sauerstoffspezies (ROS) und der Migration. Zur Bestimmung der optimalen CFSE-Konzentration wurden zunächst PMN-Suspensionen von verschiedenen Personen mit steigenden CFSE-Konzentrationen (0-1 μM) inkubiert. Sowohl die spontane als auch die PMA-induzierte ROS-Produktion wurde bis zu 1 μM CFSE leicht beeinträchtigt (Abb. 4.5), während die Fluoreszenz nicht anstieg. Weitere Experimente wurden deshalb mit PMN durchgeführt, die mit 0,1 μM CFSE vorbehandelt wurden. Die ROS-Produktion in Suspensionen isolierter neutrophiler Zellen wurde nach Vorbehandlung der PMN mit CFSE und Lagerung bei entweder 4°C oder 37°C bestimmt. Die bei 37°C gelagerten Neutrophilen zeigten im Vergleich zu den bei niedrigerer Temperatur gelagerten Zellen eine höhere spontane und PMA-induzierte ROS-Produktion. Andererseits zeigten PMN bei Lagerung über zwei Stunden bei 37°C einen schnellen Abbau von Funktionen im Vergleich zu den bei 4°C gelagerten Zellen, und zwar sank bei Lagerung bei 37°C über zwei Stunden die spontane ROS-Produktion um 50 % und die PMA-stimulierte ROS-Produktion um mehr als 70 %. Das Experiment ermöglicht es, die Neutrophilenfunktion während einer zweistündigen Perfusion der isoliert perfundierten Lungen bei 37°C abzuschätzen. Die bei 4°C gelagerten PMN zeigten keinen signifikanten Abfall der ROS-Produktion; daher wurden die PMN-Suspensionen mit Eis gekühlt, bevor sie in die IPL injiziert wurden. Beim Vergleich des Migrationsverhaltens markierter PMN gegenüber unmarkierten PMN zeigten die unbehandelten PMN mit verschiedenen Aktivatoren eine Migration, aber die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung mit fMLP und IL-8 zeigte einen inversen Verlauf, was auf einen maximalen Effekt bei niedrigen Konzentrationen hinweist. Die unmarkierten PMN zeigten mit IL-8 und fMLP eine ähnliche Reaktion.

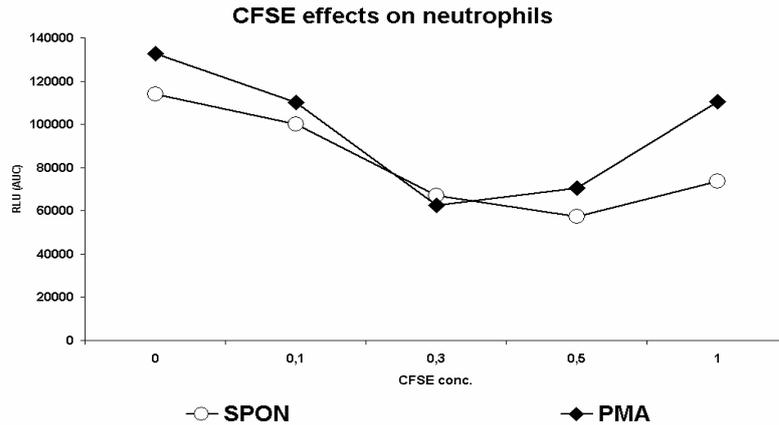


Abb. 4.5: Wirkung der Vorbehandlung mit CFSE auf die Funktion von Neutrophilen, gemessen anhand der spontanen und PMA-induzierten ROS-Produktion.

4.2.2. PMN-Funktion im isoliert-perfundierten Lungensystem

Um den Aktivierungszustand der PMN nach Injektion in das Lungenperfusionssystem zu überprüfen, haben wir den Proteingehalt und die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) im Perfusat gemessen. Kontrollexperimente (keine Partikelinhalation) zeigten keine feststellbare MPO-Aktivität von endogenen PMN in der Rattenlunge. Nach Injektion von PMN in das Perfusat (bis 10^6 Zellen/ml) wurde eine ständige Zunahme von MPO beobachtet. Die MPO-Aktivität stieg nach der Perfusion mit PMN. Die Neutrophilen blieben für den Rest des Experimentes aktiv. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die PMN voll aktiviert waren. Die MPO-Aktivität wurde auch genutzt, um die Aktivierung von PMN während der Partikelinstillation in der isoliert perfundierten Lunge zu messen. Die Iridium/PMN/fMLP-Gruppe zeigte eine höhere MPO-Freisetzung im Vergleich zu anderen Gruppen. Als Maß für endotheliale Schäden haben wir das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in den Perfusionsproben bestimmt. Es wurde kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt. Dasselbe traf für die alkalische Phosphatase zu, die ein Marker für einen epithelialen Schaden ist. Die Proteinfreisetzung war in allen Gruppen ähnlich.

4.2.3. Translokation ultrafeiner Partikel

Um zu untersuchen, ob ultrafeine Iridiumpartikel die epitheliale/endotheliale Barriere der Lunge durchschreiten können, wurden die Partikel 15 Minuten nach Stabilisierung der IPL instilliert. Die Translokation wurde durch Bestimmung der Radioaktivität in den Perfusatproben zu verschiedenen Zeitintervallen ermittelt. In keiner der behandelten Gruppen, die mit PMN, fMLP und Histamin behandelten Gruppen eingeschlossen, wurde Radioaktivität im Perfusat gefunden. Um zu überprüfen, ob die Partikel nach Translokation reabsorbiert werden können, wurden eine Dosis ^{192}Ir -UFP ins Perfusat injiziert, jedoch fast vollständig wiedergefunden. Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die Rolle der epithelialen und endothelialen Integrität sowie eines Einstroms von Neutrophilen auf die Partikeltranslokation zu bestimmen. Die Abb. 4.6 zeigt die Radioaktivität in den Lungen und im Perfusat. Eine besondere Versuchsreihe wurde durchgeführt um festzustellen, ob die Lunge ^{192}Ir -UFP aus dem Blutkreislauf aufgenommen hat. Der Grund dafür war, dass in diesen Experimenten das Medium rezirkulierte, und wir wollten ausschließen, dass translozierte Partikel in der Lunge nach Rezirkulation festgehalten werden können. Es ließ sich jedoch keine Absorption von Iridiumpartikeln in der Lunge nachweisen.

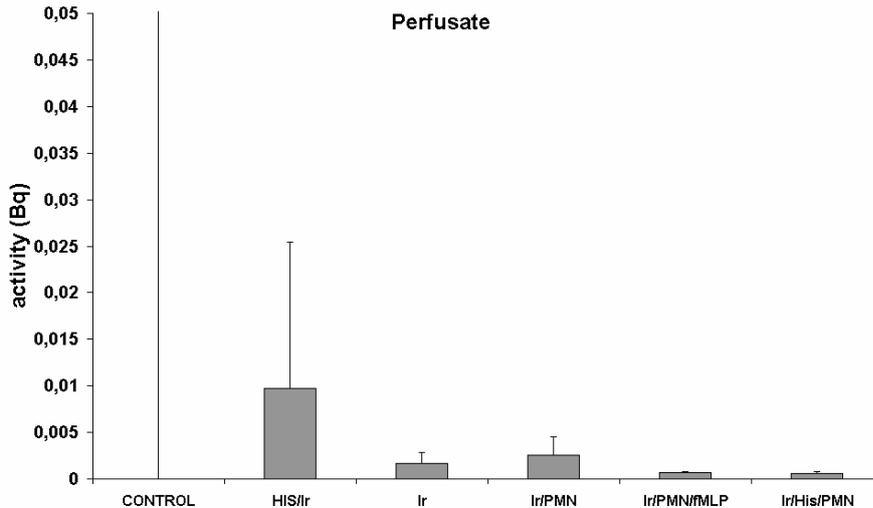


Abb. 4.6: Radioaktivität gepoolter Perfusate (Bq/ml) nach intratrachealer Inhalation von ^{192}Ir -UFP bei gleichzeitiger Perfusion mit Histamin (Positivkontrolle) und Kombinationen von PMN mit oder ohne Aktivierung mit fMLP. Die Daten zeigen gegenüber der Behandlung mit ^{192}Ir -UFP allein keine verstärkte Partikeltranslokation.

4.3 Entzündung und systemische Effekte einer intratrachealen Gabe von Endotoxin oder von Staubproben (EHC93) bei spontan hypertensiven Ratten (SHR)

4.3.1 Entzündungsreaktion in der Lunge bei SHR

Als Biomarker für eine Entzündungsreaktion in der Lunge diente die Neutrophilenzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF). Bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) führte bereits die Instillation von Kochsalzlösung zu einem Einstrom von PMN (5% PMN nach 4 Stunden; 15% PMN nach 24 Stunden). In Vorstudien hatten wir festgestellt, dass SHR-Ratten höhere PMN-Spiegel aufwiesen als Kontrollratten (WKY). Sowohl die Instillation von Partikeln (EHC-93, 10 mg/kg Körpergewicht) als auch von LPS (350 EU/Tier) verursachte einen verstärkten PMN-Einstrom, der den durch Instillation von Kochsalzlösung erzielten Effekt deutlich überschritt und nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt war. In beiden Fällen wurde der maximale PMN-Prozentsatz von 75% (EHC-93) bzw. 55% (LPS) 24 Stunden nach der Instillation erreicht (Abb. 4.7). Nach 48 Stunden nahmen die Zellzahlen und der PMN-Prozentsatz wieder ab. Die hier eingesetzten Partikel enthalten wenig wasserlösliches LPS (3,6 EU/mg), was mit der eingesetzten Dosis von 9 EU/Tier bei 10 mg/kg übereinstimmt. Nichtsdestotrotz waren die Wirkungen ausgeprägter als wenn reines LPS mit einer Dosis von 350 EU/Tier verwendet wurde. Wir vermuten daher, dass der Partikeleffekt nicht auf der Wirkung von LPS beruht.

4.3.2 Rezeptor-abhängige Gefäßerweiterung durch Azetylcholin

In Aortenringen induzierte Azetylcholin (ACh) eine dosisabhängige Gefäßerweiterung (Abb. 4.8). Diese Reaktion begann bei einer Konzentration von 1 nM, erreichte bei 30 nM ein Maximum und wurde bei höheren Konzentrationen unübersichtlich, wenn die gefäßverengende Komponente die Relaxation teilweise verhinderte. Die Vasokonstriktion wird mit der Aktivierung von muskarinergen Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur erklärt, was sich durch Einsatz von Aortenringen ohne Endothel bestätigen ließ, die nur den gefäßverengenden Effekt von Azetylcholin bei wesentlichen niedrigeren Konzentrationen zeigten. Die Exposition von SHR-Ratten gegenüber Partikeln und LPS führte zu einem

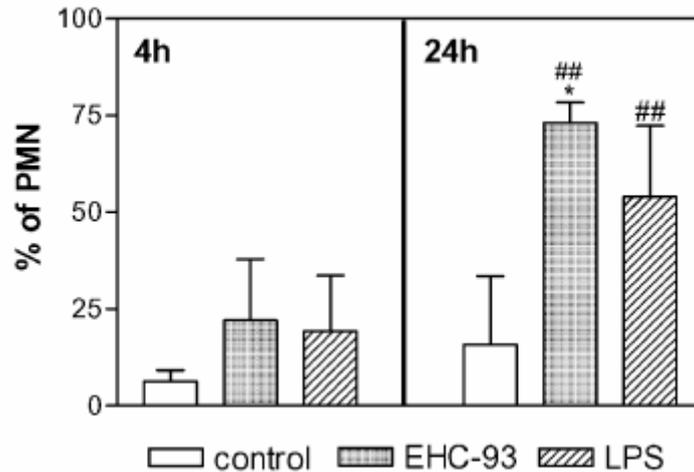


Abb. 4.7: Durch Partikel und Endotoxin induzierte Entzündung in der Rattenlunge. Vier und 24 Stunden nach der Partikel-Instillation wurden die rechte Lunge gewaschen und Zytospins für die Analyse der Zelldifferenzierung vorbereitet. Die Säulen geben die Mittelwerte und den Standardfehler des Mittelwertes von 5 Tieren pro Gruppe an. Die statistische Analyse erfolgte durch Ein- oder Zwei-Wege-Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Student–Newmann–Keuls–Test für multiple Vergleiche. *P < 0,05 vs. Kontrolle; ###P < 0,01, 4 vs. 24 Std. für jede Behandlung.

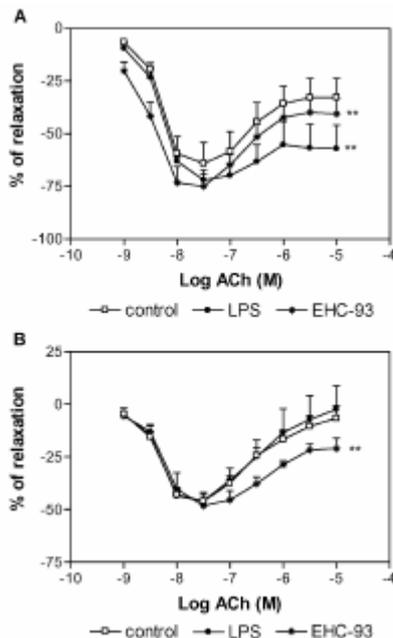


Abb. 4.8:

Konzentrationsabhängige Relaxation der Aorta von SHR durch Azetylcholin (ACh). Kumulative ACh-Konzentrationen (1 nM – 10 μM, n = 5) wurden Aortenringen zugegeben, die zuvor mit Phenylephrin (0,2 μM) vorkontrahiert wurden. Den Ratten wurden Partikel (EHC93, 10 mg/kg Körpergewicht), LPS (350 EU/Tier) oder Kochsalzlösung (0,5 ml) 4 Std. (A) bzw. 24 Stunden (B) vor der Autopsie instilliert. Die Reaktionen sind dargestellt als Prozentsatz der Aufhebung der durch Phenylephrin induzierten Vorkontraktion. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes von 5 Einzelexperimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Student–Newmann–Keuls–Test für multiple Vergleiche. **P < 0,01 vs. Kontrolle

signifikanten Anstieg der ACh-induzierten Gefäßerweiterung im Vergleich mit Kochsalz-behandelten Kontrolltieren (Abb. 4.8). Der deutlichste Effekt wurde vier Stunden nach der Partikelinstillation beobachtet. Partikel und LPS schwächten auch die durch Azetylcholin verursachte Vasokonstriktion in Aortenringen ab. 24 Stunden nach der Instillation war die ACh-induzierte Gefäßerweiterung niedriger als 4 Stunden nach der Instillation (EC₅₀ PM = 5,6 F 0,2 und Emax PM = 50%). Dies wurde für alle Gruppen einschließlich der Kontrollen beobachtet (Abb. 4.8). Anders als 4 Stunden nach der Instillation konnte LPS nach 24 Stunden keine Steigerung der ACh-induzierten Relaxation bewirken. Zu diesem Zeitpunkt induzierte LPS nur noch geringfügige Veränderungen in der zweiten Phase der ACh-

induzierten Reaktion, was sich durch die Wirkung von LPS auf die durch Phenylephrin induzierte Gefäßverengung bestätigen ließ.

Eine rezeptorunabhängige Gefäßerweiterung wurde durch Nitroprussid-Natrium (SNP) ausgelöst. SNP induzierte bei Kochsalz-instillierten Ratten eine konzentrationsabhängige Gefäßerweiterung mit einer EC₅₀ von 95,7 nM. Die Reaktion auf SNP war vier Stunden nach der Instillation von Partikeln deutlich gesteigert PM (EC₅₀ = 71,9 F 0,5 vs. 95,7 nM bei Kontrollen; Emax = 90,3% vs. 83,7% bei Kontrollen) (Abb. 4.9). 24 Stunden nach der Instillation ließ sich im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten Kontrollen kein Unterschied in der Gefäßerweiterung feststellen. Durch Instillation von LPS wurde die SNP-induzierte Vasorelaxation weder nach 4 Stunden noch nach 24 Stunden verändert. Interessanterweise war der Unterschied in der Reaktion zwischen der Vasorelaxation zu verschiedenen Zeitpunkten nach PM-Instillation bei den Aortenringen nach Entfernung des Endothels nicht länger feststellbar (Abb. 4.9C).

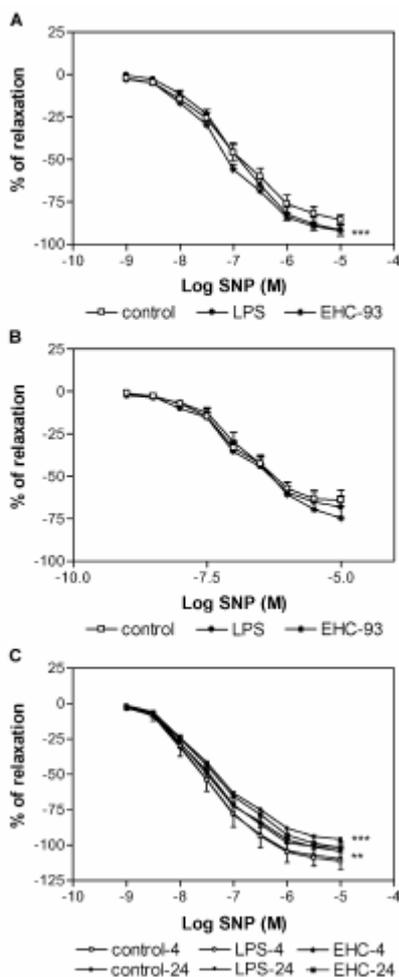


Abb. 4.9:

Konzentrationsabhängige Relaxation der Aorta von SHR-Ratten durch den NO-Donor SNP. Kumulative SNP-Konzentrationen (1 nM - 10 µM, n=5) wurden zu den Aortenringen hinzugefügt, die zuvor mit Phenylephrin (10 AM) vorkontrahiert worden waren. Vier Stunden (A) bzw. 24 Stunden (B) vor der Autopsie waren den Ratten PM (EHC-93, 10 mg/kg Körpergewicht), LPS (350 EU/Tier) oder Kochsalzlösung (0,5 ml) instilliert worden. Das in Bild C dargestellte Experiment wurde mit Aortenringen ohne Endothel durchgeführt. Die Reaktionen sind als Prozentsatz der Umkehrung der durch Phenylephrin induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes von 5 Einzelerperimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student–Newmann–Keuls-Test für multiple Vergleiche. (A) ***P < 0,001, PM vs. Kontrolle; (C) **P < 0,001, 4 vs. 24 Std. für jede Kontrolle; ***P < 0,01, 4 vs. 24 Std. für LPS.

4.3.3 Durch Phenylephrin ausgelöste Rezeptor-abhängige Vasokonstriktion

Die durch Phenylephrin induzierte Gefäßverengung war konzentrationsabhängig. Anders als bei der Relaxation konnte kein signifikanter Effekt von LPS oder PM in den vier Stunden nach der Instillation beobachtet werden, und zwar weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Endothel (die Daten werden nicht gezeigt). Nach 24 Stunden zeigte die LPS-behandelte Gruppe eine Rechtsverlagerung der Kurve, was einen signifikanten Anstieg der EC₅₀ im

Vergleich zur Kontrollgruppe (EC₅₀ = 65,0 vs. 43,3 nM für die Kontrolle) bedeutet, aber auch im Vergleich mit der PM-behandelten Gruppe mit und ohne Endothel.

4.3.3 KCl-induzierte rezeptorunabhängige Vasokonstriktion

Die hohe KCl-Konzentration (80 mM) führte zu einer starken Vasokonstriktion der Aortenringe, wobei sich die exponierten Gruppen vier Stunden nach der Instillation nicht signifikant voneinander unterschieden. Nach 24 Stunden war die rezeptorunabhängige Kontraktion bei der mit LPS behandelten Gruppe vermindert. Diese Abnahme der Kontraktion wurde signifikant ($p < 0,01$), wenn das Endothel entfernt worden war. Die systemische Kontraktion durch die löslichen Metalle Kupfer, Zink und Vanadium wurde bei mit Kochsalzlösung und Feinstaub (EHC-93) behandelten Tieren untersucht. Bei den mit Kochsalz behandelten Tieren unterschieden sich die Metallkonzentration im Blut vor und nach der Instillation der drei untersuchten Metalle nicht signifikant voneinander. Dagegen waren bei den mit EHC-93 behandelten Ratten die Zink- und Vanadiumkonzentrationen im Blut nach einer und vier Stunden nach der Instillation signifikant erhöht und erreichten 24 Stunden nach der Instillation wieder normale Konzentrationen (Abb. 4.10). Die Kupferkonzentration im Blut war ebenfalls nach einer und vier Stunden erhöht, allerdings war die Differenz im Vergleich zu den Konzentrationen vor der Instillation nicht statistisch signifikant.

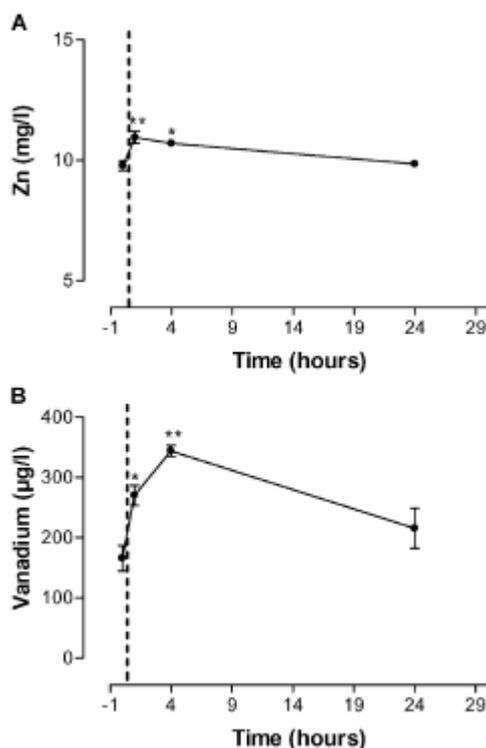


Abb. 4.10.

Metallkonzentration nach Instillation eines Umweltstaubes (EHC-93). Den Ratten wurde PM (EHC-93; 10 mg/kg Körpergewicht) oder Kochsalz instilliert. Die Blutproben wurden vor und nach der Instillation gewonnen, um die Metalle Zink (A) und Vanadium (B) zu analysieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes von mindestens zwei Tieren pro Messpunkt angegeben.

Die statistische Analyse erfolgte mittels Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche. **P < 0.01 vs. Kontrolle (Metallkonzentration vor der Instillation).

4.3.5 Durch PM und Modellpartikel induzierte Gefäßerweiterung

Kumulative Konzentrationen (10 – 100 µg/ml) von PM und Modellpartikeln (Carbon black), die mit Vanadium (CB-V) bzw. Eisen (CB-Fe) beschichtet waren, induzierten eine dosisabhängige Gefäßerweiterung in der Rattenaorta (Abb. 4.11). Diese Reaktion begann bei der niedrigsten Konzentration (10 µg/ml) und hatte bei der höchsten Konzentration

(100 µg/ml) den Maximaleffekt noch nicht erreicht. Die CB-V-induzierte Relaxation war durchweg höher als die PM- und CB-Fe-induzierte, jedoch waren die Unterschiede unter den verschiedenen Partikeln nicht signifikant. Die nichtlineare Regressionsanalyse zeigte für alle getesteten Partikel die gleiche effektive Konzentration ($EC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$).

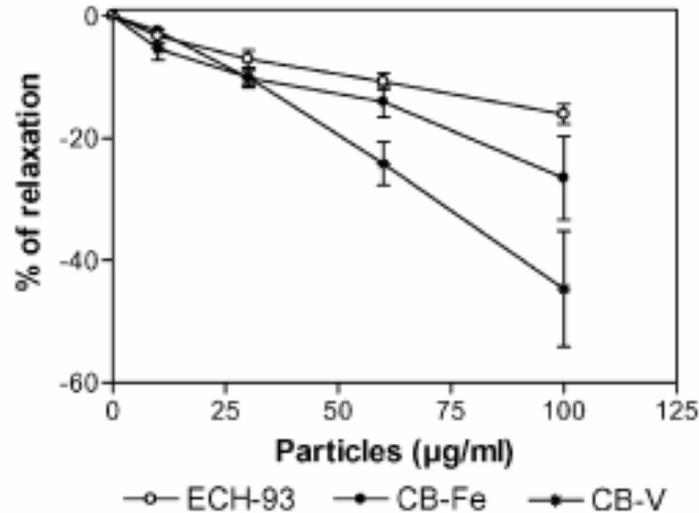


Abb. 4.11. Konzentrationsabhängige Relaxation der Rattenaorta durch EHC-93 und Modellpartikel. Kumulative Konzentrationen von EHC-93 und von mit Vanadium (CB-V) bzw. Eisen (CB-Fe) beschichteten Modellpartikeln, wurden zu Aortenringen gegeben, die zuvor mit Phenylephrin (0,2 µM) kontrahiert worden waren. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Reversion der durch Phenylephrin induzierten Kontraktion angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

4.4 Herzleistung bei PM-behandelten SH-Ratten nach ischämischer Schädigung

4.4.1 Wirkung der Vorbehandlung auf Basis-Parameter des isoliert-perfundierten Herzens

In Tabelle 4.2 ist die Ausgangsleistung der Herzen von spontan hypertensiven (SH) Ratten nach Exposition gegenüber PM oder LPS im Vergleich zu Kochsalzlösung dargestellt. Nach Partikelexposition wurde ein leichter Anstieg des Konorarflusses und der Herzfrequenz (HR) festgestellt. Dagegen wurde vier Stunden nach der Instillation ein signifikanter Abfall des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) beobachtet. Auch LPS führte zu einer Abnahme des LVDP, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Nach 120 Minuten Perfusionsdauer wurden keine pathologischen Abnormitäten in den Herzen gefunden.

Tabelle 4.2 : Physiologische Basisparameter isoliert perfundierter Herzen vier Stunden nach der Instillation vor der ischämischen Periode

		Koronarfluss (ml/min)	Herzfrequenz (bpm)	LVDP (mmHg)
4 Std.	n			
Kochsalz	5	9,8 ± 1,6	246 ± 15,4	115,6 ± 7,9
PM	5	10,8 ± 2,1	260 ± 30,0	78,3 ± 10,9*
LPS	5	10,6 ± 1,5	274,6 ± 20,0	97,8 ± 7,9

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (± SEM) von jeweils fünf einzelnen Experimenten angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche. * p < 0,05 vs. Kochsalzkontrolle.

4.4.2 Wirkung von Vorbehandlung und Mangel durchblutung auf die Herzfunktion

Isolierte Herzen von SH-Ratten wurden 35 Minuten lang durch arteriellen Verschluss einer Ischämie unterzogen. Anschließend wurde der Verschluss wieder aufgehoben und die normale retrograde Perfusion für 120 Minuten wieder aufgenommen. Während der Perfusionszeit wurden physiologische Parameter aufgezeichnet. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Erholung des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) zwischen den mit Kochsalz behandelten und den gegenüber PM oder LPS exponierten Ratten beobachtet (Abb. 4.12). Nach einem anfänglichen Abfall um 50% des Ausgangswertes und Wiederherstellung auf 90% des Ausgangswertes innerhalb von 60 Minuten nach Aufhebung des Gefäßverschlusses blieb der LVDP für den Rest der Perfusionszeit mehr oder weniger konstant. Nach Exposition gegenüber PM und LPS zeigte das isolierte Herz im Vergleich mit den mit Kochsalz behandelten Tieren eine deutlich reduzierte Fähigkeit, nach Aufhebung des Gefäßverschlusses wieder die Ausgangswerte zu erreichen (Abb. 4.12). In beiden Fällen sank der LVDP auf 50 mmHg nach dem Gefäßverschluss und blieb bis zum Ende der Perfusionsperiode auf dieser Höhe. Kein signifikanter Effekt des Gefäßverschlusses oder der Exposition gegenüber PM und LPS zeigte sich für die Herzfrequenz; sie blieb über alle Zeitpunkte und Behandlungen unverändert (Tab. 4.3). Eine völlig unterschiedliche Wirkung wurde für den Koronarfluss beobachtet: Nach Auflösung des Gefäßverschlusses kehrte der Koronarfluss wieder zu den Ausgangswerten zurück, nachdem sowohl in Kochsalz- als auch in LPS-behandelten Ratten eine graduelle Verminderung des Koronarflusses während der Perfusionsperiode beobachtet wurde. Andererseits zeigten die Herzen der PM-behandelten SH-Ratten eine komplette Wiederherstellung des Koronarflusses und überhaupt keine allmähliche Abnahme (Tab. 4.3).

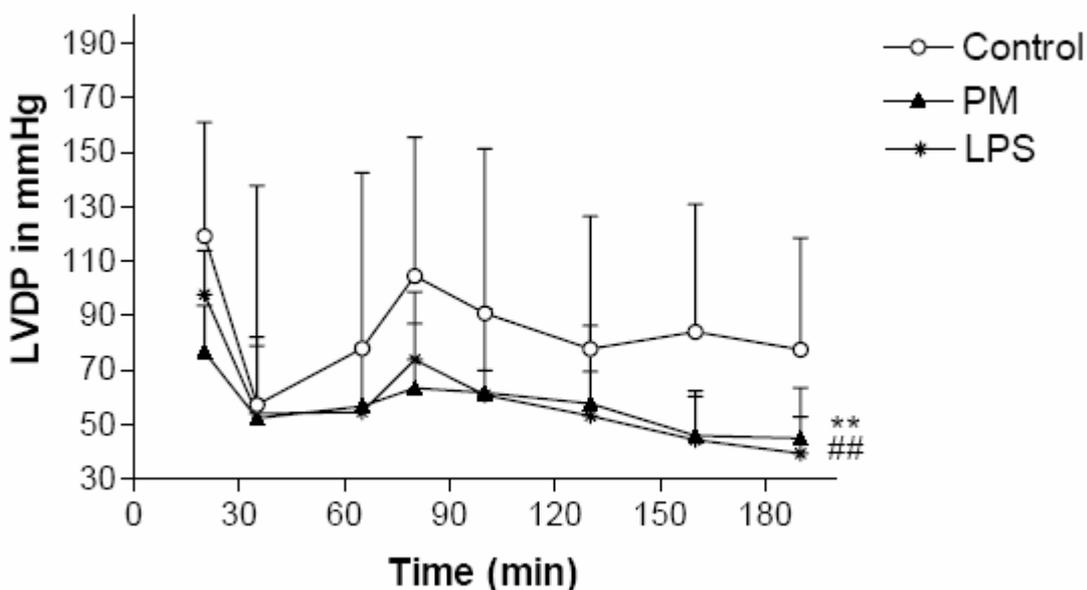


Abb. 4.12. Linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP) in isolierten Rattenherzen vier Stunden nach Vorbehandlung mit Kochsalzlösung (Kontrolle), Partikeln (PM) oder Lipopolysaccharid (LPS), gefolgt durch die Gefäßverschluss- und Reperusionsperiode. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (\pm SEM) von jeweils fünf einzelnen Experimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche.

4.4.3. Histopathologische Untersuchungen

Am Ende der Perfusionen wurde in etlichen Herzen eine histopathologische Bewertung ischämischer Schäden durchgeführt. Hinsichtlich des mittleren Schweregradindex (0 = keine Ischämie; 1 ≤ 5%; 2 = 6-20%; 3 = 21-35%; 4 = 36-50%; 5 ≥ 50%) wurde zwischen den mit Kochsalz behandelten (SI = 2,33 ± 1,89) und den PM-exponierten (SI = 2,33 ± 1,53) oder den mit LPS (SI = 1,75 ± 1,06) behandelten SH-Ratten kein Unterschied gefunden. Der ischämische Schaden war im linken Ventrikel am ausgeprägtesten, insbesondere in der freien Wand stärker als im Septum, aber es gab keinen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Expositionen (Abb. 4.13).

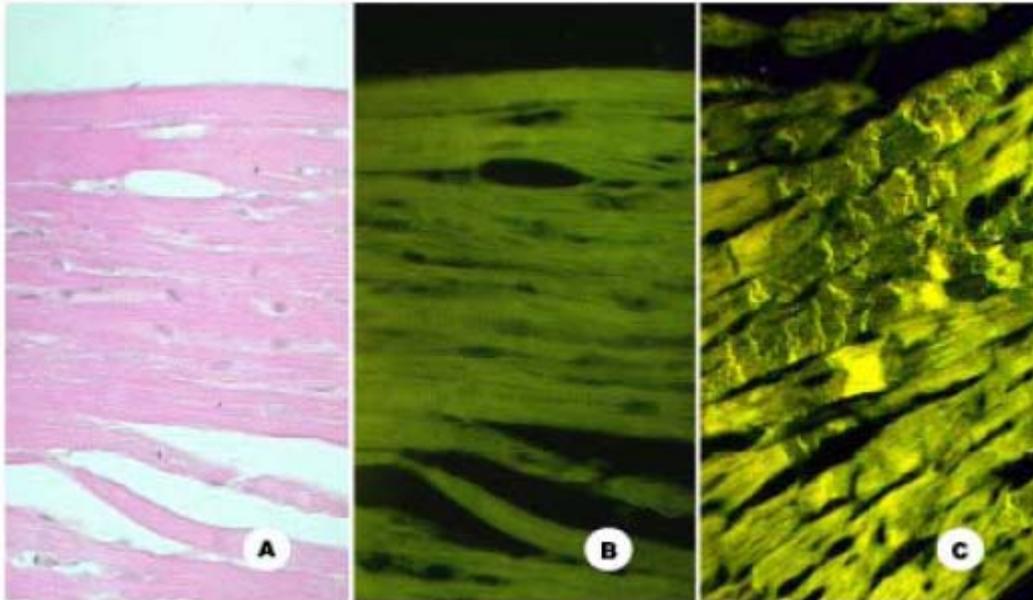
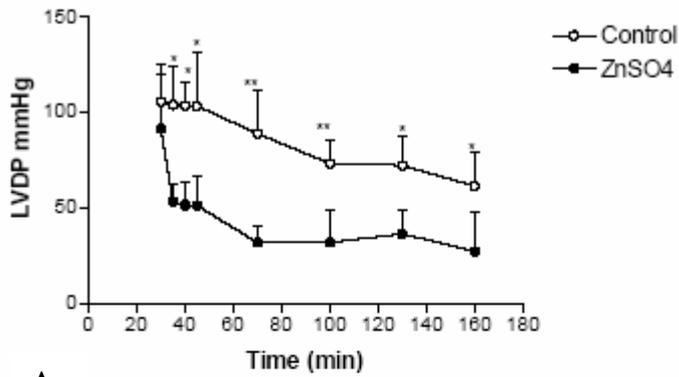


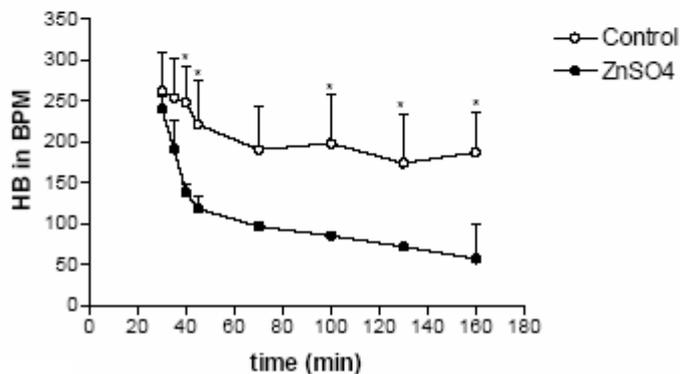
Abb. 4.13: Histologisches Erscheinungsbild des Rattenmyokards von Kontrollen (A und B) und nach Gefäßverschluss (C). Normale Histologie mittels Hämatoxylin-Eosin(H&E)-Färbung (A) ergab unter UV-Licht eine grüne Autofluoreszenz (B), während frühe ischämische Schäden durch Fluoreszenz-Lichtmikroskopie durch eine typische gelbliche Autofluoreszenz (C) identifiziert wurden. Ischämische Kontraktionsbanden waren ein bekanntes Charakteristikum. Zwischen den Kontrolltieren und den behandelten Tieren zeigten sich keine Unterschiede in den ischämischen Veränderungen. (H&E, 400x).

4.4.4. Einfluss der Perfusion mit Zinksulfat auf die Herzleistung

Um zu prüfen, ob lösliche Metalle in der Lage sind, Wirkungen auf die Herzleistungen auszulösen, wie sie *in vivo* nach Behandlung mit PM beobachtet wurden, wurde Zinksulfat (10 µM ZnSO₄) durch die Perfusionslösung mit 0,1 ml/Minute in die Herzen perfundiert, um innerhalb von 10 Minuten eine Endkonzentration von 10 µM zu erreichen (Abb. 4.14). Danach wurde dem System eine Zn⁺⁺-freie Lösung zugefügt, um Zn⁺⁺ wieder aus der Perfusionskammer zu entfernen. Die Infusion von Zn⁺⁺ führte zu einer raschen Abnahme des linksventrikulär entwickelten Drucks (LVDP) und der Herzfrequenz (Abb. 4.14 A, B). Die aus den vorausgehenden Parametern berechnete maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) war ebenfalls signifikant vermindert. Die Beeinträchtigung der Herzfunktion, gemessen anhand des LVDP und der Herzfrequenz, begann sofort nach der Infusion von Zn⁺⁺ und blieb während der gesamten Perfusionszeit unverändert, selbst wenn keine Zinkionen mehr im Perfusat vorhanden waren (Abb. 4.14 A).



A



B

Abb- 4.14.

Wirkung von $ZnSO_4$ ($10 \mu M$) auf Herzfunktionen von SH-Ratten. (A) LVDP, (B) Herzfrequenz. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (\pm SEM) von jeweils fünf einzelnen Experimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

4.4.5 Wirkung von PM-Filtraten auf die Ca^{++} -Aufnahme in Herzmuskelzellen

Um zu prüfen, ob die Effekte der Vorbehandlung auf die Herzfunktion auf einer direkten Wirkung der löslichen Staubkomponenten auf den Herzmuskel beruhen, wie es für die Aorta beobachtet wurde [Bagate et al. 2004 a,b], untersuchten wir die Kalziumaufnahme in isolierten Cardiomyozyten. Die isolierten Herzmuskelzellen wurden mit dem Farbstoff Fura-2 beladen, und die Kalziumaufnahme wurde nach Stimulation mit KCl (rezeptorunabhängig) oder mit ATP (rezeptorabhängig) untersucht. Die Behandlung mit KCl ($50 \mu M$) führte zu einer Depolarisation der Zellmembran, was einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration vor allem durch Einstrom aus dem Extrazellulärraum zur Folge hatte. Die Höhe des Kalziumeinstroms war gleich, wenn die Stimulation nach 30 Minuten wiederholt wurde (Abb. 4.15 A). ATP ($100 \mu M$) induzierte ebenfalls einen Anstieg des intrazellulären Kalziums über die Aktivierung seines Rezeptors. Der Kalziumeinstrom war auch bei der Wiederholung der Stimulation nach 30 Minuten gleich (Abb. 4.15 B). Die Zugabe von PM-Filtrat in Konzentrationen zwischen 1 und $100 \mu g/ml$ nach dem ersten Stimulus führte zu einem Anstieg der Ausgangswerte des intrazellulären Kalziumspiegels. Nefedipin ($2 \mu M$), ein Kalziumkanalantagonist, inhibierte den Ausgangswert des Kalziumeinstroms, der durch PM ($100 \mu g/ml$) ausgelöst wurde (Abb. 4.16) ebenso wie den durch KCl ausgelösten. Als Positivkontrolle in diesem Experiment benutzten wir den Kalziumkanalagonisten BayK ($5 \mu M$), und wir fanden, dass Nefedipin ($2 \mu M$) auch die durch BayK induzierte Kalziumaufnahme in Kardiomyozyten inhibierte.

A

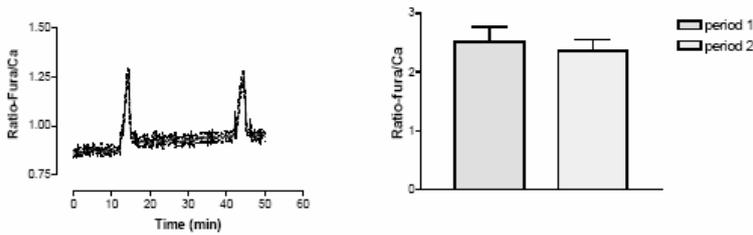


Abb 4.15.

Durch KCl (50 μ M) (A) und ATP (100 μ M) (B) ausgelöster Kalziueinstrom in Herzmuskelzellen (H9C2 Zellen). Links: typische Aufzeichnung (Mittelwert von 7-12 Einzelzellen). Rechts: Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (\pm SEM) von (5-17) Einzelexperimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels paired student Test.

B

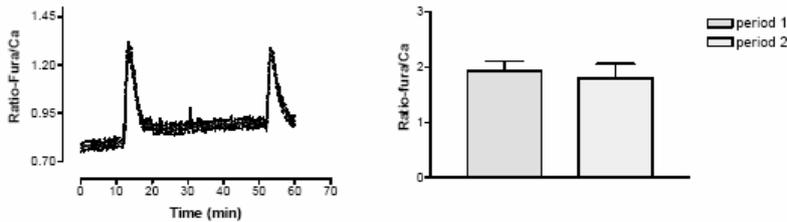
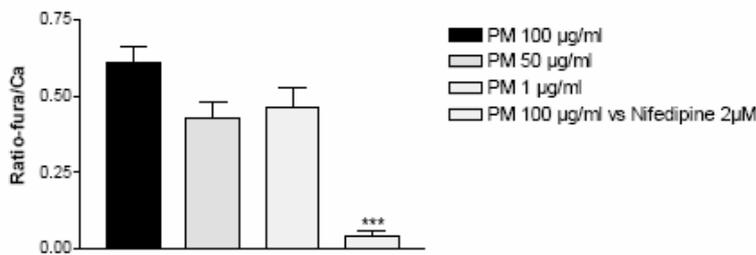


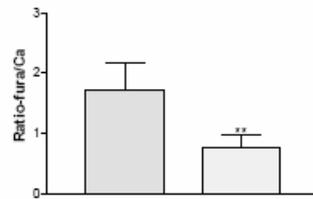
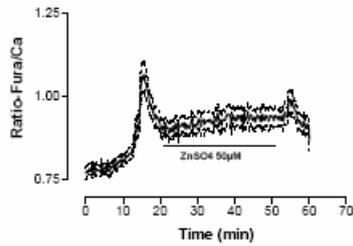
Abb. 4.16.

PM-Filtrat (1-50-100 μ g/ml) induzierte einen dosisabhängigen Kalziueinstrom in Herzmuskelzellen (H9C2-Zellen). Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (\pm SEM) von (5-9) Einzelexperimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

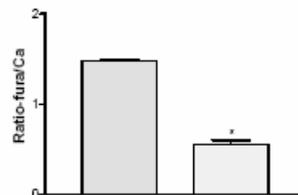
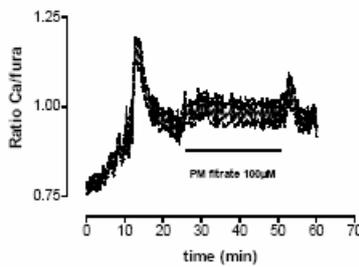


4.4.6 Wirkung von PM-Filtrat auf den intrazellulären Kalziueinstrom in Herzmuskelzellen

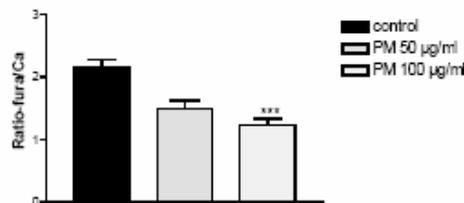
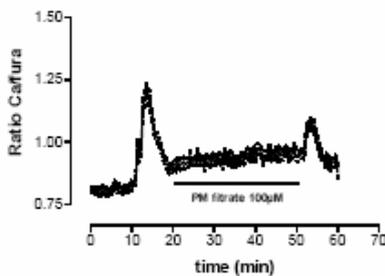
Bei Applikation nach dem ersten Stimulus reduzierten sowohl Partikelfiltrat als auch Zinkionen (Zn^{++}) den Kalziueinstrom auf den zweiten Stimulus entweder durch ATP oder KCl (Abb. 4.17). Tatsächlich wurde der Kalziueinstrom auf eine zweite Stimulation mit KCl oder ATP durch Zn^{++} in einer Konzentration von 50 μ M vollständig unterdrückt ($p < 0,01$) (Abb. 4.17 A). Partikelfiltrat bewirkte einen Abfall des Kalziueinstroms durch KCl und ATP. Dieser Effekt wurde bei einer Partikelfiltrat-Konzentration von 100 μ M signifikant ($p < 0,05$ für ATP und $p < 0,01$ für KCl) (Abb. 4.17 B; C).



A



B



C

Abb. 4.17.

ZnSO₄ (50 µM) und PM-Filtrat (50-100 µg/ml) inhibierten den durch (A) KCl (50 µM) und (B, C) ATP (100 µM) induzierten Kalziumeinstrom in Herzmuskelzellen (H9C2-Zellen). Links: typische Aufzeichnung der Mittelwerte von 7-12 Einzelzellen; Rechts: Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (± SEM) von 5 bis 15 Einzelerperimenten für jeden Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche oder mittels paired student test. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 versus Kontrolle.

4.4.7. Welche Ca-Quellen werden durch PM-Filtrat beeinflusst?

Um den Wirkungsmechanismus von PM hinsichtlich der Kalziumaufnahme aus dem Extrazellulärraum oder des Blockierens der intrazellulären Ca-Freisetzung zu klären, haben wir Kalziumimaging-Experimente mit dem Dihydropyridin-Agonisten BayK 8344 oder mit Thapsigargin als intrazellulärem Kalzium-ATPase-Blocker durchgeführt. Zwei Minuten vor der Reizung der Zellen mit Thapsigargin, was normalerweise zu einer explosionsartigen Freisetzung von intrazellulärem Kalzium führt, wurde das Medium durch ein kalziumfreies Medium ersetzt, das mit 1 µM EGTA supplementiert wurde, um den Einstrom von extrazellulärem Kalzium zu verhindern. BayK (5 µM) induzierte einen Kalziumeinstrom in die Herzmuskelzellen, der durch PM-Filtrat in Konzentrationen von 1 bzw. 50 µg/ml inhibiert wurde (p < 0,05 bzw. p < 0,01, Abb. 4.18 links). Dagegen konnte PM-Filtrat (100 µg/ml) den Kalziumeinstrom aus den intrazellulären Speichern, der durch Thapsigargin (2 µM) ausgelöst wurde, nicht verhindern (Abb. 4.18 rechts). Das zeigt, dass Kalziumkanäle durch Komponenten im PM-Filtrat beeinträchtigt werden und der Einstrom aus dem Extrazellulärraum verhindert wird.

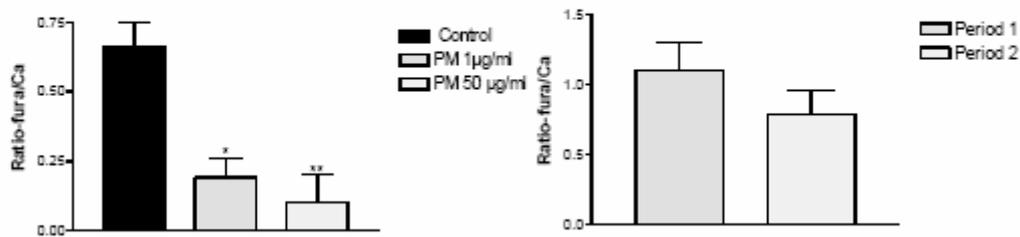


Abb. 4.18. Wirkung von PM (1-50-100 µg/ml) auf den durch Bayk 8344 (5 µM, rechts) und Thapsigargin (2 µM, links) induzierten Kalziumeinstrom in Herzmuskelzellen. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (\pm SEM) von 5-9 Einzelexperimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche oder mittels paired student test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus Kontrolle.

Tabelle 4.3: Wirkung der Instillation von Partikeln (PM) und LPS auf physiologische Parameter (A: Koronarfluss, B: Herzfrequenz, C: LVDP) während der Reperfusion des isoliert perfundierten Herzens

A		Koronarfluss (ml/mim)		
4 Std.	n	5 min	60 min	120 min
Kochsalz	5	7,9 \pm 1,0	5,8 \pm 0,9	4,8 \pm 0,6
PM	5	10,2 \pm 2,1	9,9 \pm 2,5	11,2 \pm 3,7*
LPS	5	7,7 \pm 1,5	5,6 \pm 0,7	4,5 \pm 0,9

B		Herzfrequenz (bpm)		
4 Std.	n	5 min	60 min	120 min
Kochsalz	5	298 \pm 34,3	304 \pm 25,0	242 \pm 18,5
PM	5	273 \pm 14,0	274 \pm 20,6	273 \pm 31,9
LPS	5	250,6 \pm 27,2	248 \pm 32,6	242 \pm 10,7

C		LVDP (mmHg)		
4 Std.	n	5 min	60 min	120 min
Kochsalz	5	103,2 \pm 11,0	75,6 \pm 10,3	72 \pm 9,0
PM	5	63,3 \pm 25*	57,7 \pm 20*	45 \pm 13,1*
LPS	5	73,8 \pm 6,6*	53,2 \pm 8,1*	39,4 \pm 6,7*

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte (\pm SEM) von jeweils fünf einzelnen Experimenten pro Messpunkt angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Zweifache-Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Student-Newmann-Keuls-Test für multiple Vergleiche. * $p < 0,05$ vs. Kochsalz.

5. Diskussion

Eine Exposition gegenüber Stäuben in der Umwelt wurde in epidemiologischen Studien mit gesundheitsschädlichen Wirkungen in Zusammenhang gebracht [Pope et al. 2002]. Diese Studien schätzten, dass ein Anstieg von $PM_{2.5}$ um $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zu einem Anstieg der Mortalität um 1,4 % führt, während respiratorische Erkrankungen wie Bronchitis oder die Verschlimmerung von Asthma um 4 % ansteigen [WHO 1999]. Es gibt verschiedene Hypothesen, aber es ist noch kein klarer biologischer Mechanismus oder Weg erkennbar, der die gesundheitlichen Wirkungen, die in epidemiologischen Studien beobachtet wurden, erklären kann. Verschiedene toxikologische und epidemiologische Befunde weisen darauf hin, dass die feine ($PM_{2.5}$) und ultrafeine ($PM_{0.1}$) Partikelfraktion für diese gesundheitsschädlichen Effekte verantwortlich ist; es gibt jedoch hierüber noch keine Einigung [Oberdörster et al. 1994; Wichmann et al. 2000]. Die aktuelle Meinung ist, dass mehr als eine Komponente zu den gesundheitlichen Effekten atmosphärischer Stäube führt [Donaldson et al. 2003; Dreher 2000].

In dieser Studie haben wir uns auf eine spezifische Partikelkomponente konzentriert, und zwar die ultrafeine Partikelfraktion, sowie auf einen spezifischen Wirkungsmechanismus dieser Partikel, d.h. die pulmonale Translokation. Die Bedeutung von Nanopartikeln für pulmonale inflammatorische Wirkungen wurde weitgehend nachgewiesen (Übersicht in: [Oberdörster 2001; Donaldson 2003]); es wurden jedoch kaum Studien durchgeführt, um ihre potentielle Rolle im Hinblick auf kardiovaskuläre Effekte zu klären. In jenen Studien wurde der Hinweis gewonnen, dass die Translokation von Nanopartikeln in den Blutkreislauf ein Mechanismus ist, der die Herzfunktion, die Gefäßkontraktion [Bagate et al. 2004; Nurkiewicz 2004], die Blutgerinnung [Nemmar 2003] oder die Destabilisierung von Plaques [Suwa et al. 2002; Künzli et al. 2005] direkt beeinflussen kann. Sowohl die Mechanismen der Translokation als auch die Partikeleigenschaften müssen jedoch noch geklärt werden. Daher haben wir uns daran gemacht, die pulmonale Translokation von Nanopartikeln als ein Mechanismus, der die kardiovaskulären Wirkungen von Partikeln erklären könnte, zu untersuchen. Das Ziel dieser Studie war es also, die Bedeutung der Partikeltranslokation und die Relevanz der Lungenentzündung oder der Lungenpermeabilität in diesem Prozess zu klären. In den ersten beiden Teilen (4.1 und 4.2) beschreiben wir das Ergebnis von Untersuchungen, die mit Modellnanopartikeln an der isoliert perfundierten Lunge (IPL) unter verschiedenen experimentellen Ansätzen durchgeführt wurden. Während im ersten Teil (4.1) die Exposition via Inhalation von Nanopartikeln bei Unterdruck-Ventilation der IPL erfolgte, setzten wir im zweiten Teil (4.2) die intratracheale Instillation bei Überdruck-Ventilation ein. In beiden Ansätzen wurden die gleichen Modellpartikel (^{192}Ir -Aerosol, 18 nm) verwendet, mit experimentellen Ansätzen zur Modifizierung der endothelialen Permeabilität (Histamin), der epithelialen Permeabilität (Wasserstoffperoxid) und der Entzündung (PMN im Perfusat). Anschließend untersuchten wir (in den Teilen 4.3 und 4.4) die Wirkung von Umweltpartikeln (EHC-93) auf kardiovaskuläre Funktionen und verglichen sie mit der Wirkung von Endotoxin, das als Referenz diente, um nur eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Sowohl die Partikel als auch LPS wurden *in vivo* instilliert, und die Herzleistung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Instillation *ex vivo* nach Auslösung eines ischämischen Insults, der einen Herzinfarkt *in vivo* nachahmen sollte, gemessen. Zusätzliche Untersuchungen von Biomarkern im Plasma und an isolierten Herzmuskelzellen wurden durchgeführt, um die Rolle von Übergangsmetallen bei den beobachteten Effekten zu klären.

5.1 Translokationsuntersuchungen an isoliert perfundierten Rattenlungen

Der Zweck dieser Untersuchungen war es, die Rolle der epithelialen und endothelialen Barriere bei der Translokation von Nanopartikeln durch die Lunge in den systemischen Blutkreislauf zu untersuchen. Wir haben dazu die isoliert perfundierte Lunge unter zwei verschiedenen Bedingungen eingesetzt. Zunächst belüfteten wir die IPL unter Unterdruck, danach unter Überdruck; in beiden Fällen erfolgte dies in Kombination mit Behandlungen *ex*

vivo zur Modifizierung der Lungenpermeabilität. Die Translokation der Iridiumpartikel wurde anhand der Radioaktivität der Partikel selbst, nicht durch eine angeheftete radioaktive Markierung bestimmt.

5.1.1. Unterdruckventilation

In den bei Unterdruck ventilierten isoliert perfundierte Lungen wurde keine Translokation der ultrafeinen Iridiumpartikel (^{192}Ir -UFP, 17 bis 20 nm) festgestellt. Wurden die Lungen jedoch *in situ* mit Histamin auf der endothelialen Seite (1 μM) oder mit H_2O_2 (0,5 nM) im Alveolarlumen vorbehandelt, dann fanden sich nach einer Zeit von 60 Minuten geringe Mengen Radioaktivität im einmal durchgelaufenen Perfusat. Obwohl die Kinetiken der Translokation von DTPA und von Partikeln unterschiedlich waren, verursachten die *in situ* Behandlungen mit Histamin und H_2O_2 in beiden Fällen gleich laufende Wirkungen bei Abwesenheit einer biochemischen Evidenz für epitheliale und endotheliale Schäden. Durch H_2O_2 wollten wir einen oxidativen Stress induzieren, der auch durch Partikelinhalation in der Lunge sowohl durch direkte Radikalbildung durch Partikelbestandteile als auch indirekt durch Rekrutierung von Entzündungszellen entsteht. Oxidativer Stress gilt als zentraler hypothetischer Mechanismus für die schädigenden Wirkungen von Partikeln, einschließlich ultrafeinen Partikeln [Donaldson et al. 2003]. In Versuchen mit normalen freiwilligen Probanden haben wir bereits gezeigt, dass die oxidative Kapazität von intratracheal instillierten PM die auftretende bronchiale Entzündungsreaktion vorhersagen kann [Schaumann et al. 2004]. Bereits vorher hatten Rahman et al. [2001] nachgewiesen, dass oxidativer Stress und GSH-Depletion die Lungenpermeabilität verändern kann, wodurch größeren Partikeln die Passage durch das Lungenepithel in das Interstitium ermöglicht wird. Dieses Konzept wird durch unsere Experimente unterstützt, in denen wir eine hohe Konzentration von H_2O_2 (5 mM) als Bolusinjektion in die Lunge einsetzten, um eine Endkonzentration von 0,5 mM zu erzielen [Meiring et al. 2005]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die die Lunge auskleidende Flüssigkeit von COPD-Patienten bis zu 5 μM H_2O_2 enthält [De Benedetto et al. 2000]. Obwohl dieses Modell selbstverständlich nicht alle Bedingungen einer Entzündungsreaktion erfüllt, sind ähnliche Modelle in anderen *ex vivo* Untersuchungen der Permeabilität eingesetzt worden [Habib & Clements 1995; Hulsmann et al. 1996]. An isoliert-perfundierte Rattenlungen wurde gezeigt, dass eine niedrige Konzentration von H_2O_2 (0,25 mM) im Perfusat die kapillare Permeabilität in Abwesenheit von Lipidperoxidation erhöht [Habib & Clements 1995]. Eine kurzzeitige Behandlung des Epithels menschlicher Atemwege mit H_2O_2 (100 mM) führte zu einem sechsfachen Anstieg der Translokation von ^{111}In -DTPA, was mit einer Öffnung von parazellulären Wegen erklärt wurde [Hulsmann et al. 1996]. In unserer Studie gehen wir davon aus, dass eine endgültige luminare Konzentration von 0,5 mM H_2O_2 erreicht wurde, und wir fanden sowohl eine erhöhte Translokation von ^{192}Ir -UFP als auch eine tendenziell erhöhte Translokation von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA mit einer Verzögerung von etwa 60 Minuten. Es ließ sich jedoch kein zeitlicher Zusammenhang zwischen beiden Markern der Translokation erkennen, was die Vermutung nahe legt, dass sie auf unterschiedlichen Wegen ablaufen.

Weitere Einzelheiten über die Translokationsroute von ^{192}Ir -UFP in der Lunge liefern die Untersuchungen, in denen Histamin sowohl über das Lumen als auch durch das Mikrogefäßsystem verabreicht wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass Histamin im Perfusat in sehr niedrigen Konzentrationen (1 μM) sowohl eine gesteigerte Translokation von Partikeln als auch mit einer Verzögerung von ca. 60 Minuten ein Eindringen von ^{99}Tc -DTPA in die Lunge bewirkte (Abb. 4.3). Andererseits führte die Gabe von Histamin als Bolus in das Lumen (0,5 mM) nicht zu einer verstärkten Translokation von ^{192}Ir -UFP und sogar zu einem geringfügig verminderten Eindringen von ^{99}Tc -DTPA. Histamin ist ein sehr potenter vasoaktiver und bronchialer Mediator, von dem gezeigt wurde, dass es sowohl an lokalen als auch systemischen Effekten von Dieselrußpartikeln beteiligt ist [Nemmar et al. 2003]. Erstens ist Histamin nach Mastzelldegranulation der Hauptmediator der bronchialen Konstriktion, die bei allergischen Reaktionen der Atemwege beobachtet wird [Nadel &

Barnes 1984]. Diese Konstriktion erklärt wahrscheinlich die in unseren Experimenten beobachtete Verminderung der Clearance von ^{99}Tc -DTPA nach Injektion eines Histaminbolus in die Trachea. Der andere Versuchsansatz, in dem vaskuläres Histamin eingesetzt wurde, ist relevant, da gezeigt wurde, dass Histamin nach Partikelinstillation in der isoliert perfundierten Kaninchenlunge *ex vivo* [Nemmar et al. 1999] sowie bei Hamstern *in vivo* [Nemmar et al. 2003] und in gesunden freiwilligen Probanden [Salvi et al. 1999] ansteigt. Wir vermuten, dass Histamin in niedrigen Konzentrationen (10^{-6} M) in unserem System die endotheliale Permeabilität erhöht und eine Zunahme des interzellulären Transports von ^{192}Ir -UFP im Interstitium durch das Endothel ins Perfusat ermöglicht. Ein ähnlicher Effekt von vaskulärem Histamin (10^{-4} M) wurde kürzlich bei isoliert perfundierten Kaninchenlungen beobachtet [Nemmar et al. 2005]. In dieser Studie translozierten Latexpartikel (24 – 190 nm) aus dem Gefäßraum in das Lumen, was durch nachfolgende bronchoalevolare Lavage festgestellt wurde. Das Ausmaß der reversen Translokation lag bei 2,5 % der verabreichten Dosis innerhalb der zweistündigen Perfusion. Unter normalen physiologischen Bedingungen wurde in der Kaninchenlunge keine Translokation von Latexpartikeln unterschiedlicher Größe (24–190 nm) und Oberflächenchemie (Carboxylat versus Amin) und Ladung beobachtet. Auch in unseren Untersuchungen translozierten 18 nm große Iridiumpartikel nicht durch die Rattenlungenbarriere, obwohl die eingesetzte Unterdruckventilation beträchtliche Schäden im Lungengewebe verursachte.

Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Translokation ultrafeiner Partikel in der Lunge auf verschiedenen Wegen erfolgt. Unter den verschiedenen Aufnahmewegen können wir zwischen Transzytose und para(inter)zellulärem Transport unterscheiden. Geys et al [2006] legten dar, dass radioaktiv markierte Tracer wie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA die epitheliale Barriere durch interzelluläre Junctions passieren. Da die Kinetik der Translokation von DTPA und ^{192}Ir -UFP in unbehandelten Lungen so unterschiedlich ist, vermuten wir, dass ^{192}Ir -UFP über eine andere Route transportiert werden. Tatsächlich könnten ultrafeine Partikel andere Wege der Transzytose wie clathrinbeschichtete Vertiefungen, Pinozytose und als Caveolae bezeichnete unbeschichtete Vertiefungen nutzen. Aus den Untersuchungen von Gumbleton [2001] kann man schließen, dass die Caveolae der wahrscheinlichste Aufnahmeweg für die in unserer Studie eingesetzten ^{192}Ir -UFP (18 nm) sind.

Die Alveolarepithelzellen, die 95% der Lungenoberfläche ausmachen, haben eine Zelldicke von 400 nm und etwa 600.000 bis 900.000 Caveolae, die 50 bis 60 nm weit sind. Eine so hohe Anzahl möglicher Transporteinheiten lässt uns vermuten, dass Nanopartikel, die kleiner als 60 nm sind, rasch aufgenommen werden und durch die epitheliale Zellschicht transportiert werden können. Kürzlich zeigten Kato et al. [2003], dass Lezithin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen (240 nm) sowohl in Alveolarepithelzellen vom Typ I und Typ II als auch in das Kapillarlumen aufgenommen werden. Es wurde vermutet, dass sich diese Latexkügelchen via Transzytose aus den Alveolarepithelzellen in das Kapillarlumen bewegen. Kapp et al. [2004] fanden intrazelluläre Cluster von Titandioxidpartikeln (TiO_2 , 29 nm), die nadelscharfe Partikel oder abgerundete Partikel bildeten. Dies kann die relativ geringe und unterschiedliche Translokation erklären, die in anderen früheren *in vivo* Studien beobachtet wurde (Übersicht: [Oberdörster et al. 2005]). Wir haben daher Histamin eingesetzt, um die transepitheliale Passage zu modifizieren bzw. zu erleichtern und fanden tatsächlich, dass sich dadurch die Translokation von ^{192}Ir -UFP in das Perfusat verstärkte. Wir können jedoch nicht zwischen Transzytose und parazellulärem Transport ins Endothel unterscheiden. Wir vermuten, dass die lange Verzögerung (60 Minuten) vor Beginn der Passage durch die Tatsache verursacht ist, dass zunächst durch epitheliale Passage der ^{192}Ir -UFP in der Lunge eine interstitielle Beladung aufgebaut werden muss. Die in unseren Untersuchungen eingesetzten Methoden und die Untersuchung von Nemmar et al. [2005] erlauben es nicht abzuschätzen, ob die Translokation durch primäre Partikel oder Aggregate erfolgte.

Durch die in unserer Studie eingesetzte Inhalation wurde sichergestellt, dass einzelne ultrafeine Partikel in der Alveolarregion deponiert wurden und nahezu keine Agglomeration auf dem Epithel wegen der Alveolaroberfläche und der Anzahl der deponierten Partikel erfolgte. Bei der vaskulären Injektion werden jedoch Aggregate gebildet, wenn dieser Prozess nicht durch Oberflächenmodifikation verhindert wird. Es ist daher möglich, dass die von Nemmar et al. [2005] beobachtete Translokation auf einer Aggregatbildung oder einer Erleichterung durch Phagozytosezellen beruht, dies ist jedoch in unserer Studie nicht der Fall. In dieser Hinsicht haben die Untersuchungen von Heckel et al. [2004] gezeigt, dass 4 nm große Goldpartikel wirklich Membranen passieren und das Lumen als Einzelpartikel erreichen. Der Unterschied zwischen 4 und 20 nm großen Partikeln kann jedoch riesig sein, da 4 nm große Goldpartikel nicht vom retikuloendothelialen System erkannt werden.

Unsere Ergebnisse mögen wegen einer Anzahl von Faktoren, die mit dem Design und der Durchführung unserer Experimente verbunden sind, kritisiert werden. Zuerst muss berücksichtigt werden, dass isolierte und perfundierte Lungen keine physiologischen Bedingungen darstellen, weil zum Beispiel der Lymphfluss verändert, die bronchiale Perfusion unterdrückt und die autonome Innervation unterbrochen sind und keine Blutzellen (einschließlich Entzündungszellen) im Perfusat vorkommen. Die künstliche Perfusion der isolierten Lungen unter Unterdruck ähnelt jedoch respiratorischen Bedingungen, und die Dauer des Experimentes wurde auf maximal zwei Stunden beschränkt, um einen übermäßigen Abfall der Funktion des Organs zu vermeiden. Wenn man das berücksichtigt, ist der Mangel an begleitenden physiologischen Messungen bei der Unterdruckventilation das Hauptmanko unserer Daten. Der offensichtliche Grund dafür ist, dass angesichts des Gebrauchs radioaktiver ^{192}Ir -UFP aus Strahlungssicherheitsgründen keine Einbeziehung von Messgeräten zugelassen wurde, da sie zu einem offenen System und zur Emission radioaktiver Partikel hätten führen können. Wir haben versucht, diesen Mangel an Know-how durch Messung biochemischer Schadensindices im Perfusat und durch Durchführung histologischer Untersuchungen der Lungen nach dem Experiment zu kompensieren. Es konnte keine ausgeprägte Lungenschädigung bei Kontrollbedingungen oder nach *in situ* Behandlung der Hauptlungenbarrieren beobachtet werden. Die Freisetzung von ALP und ACE als Biomarker der epithelialen und endothelialen Integrität war während der Perfusion nicht erhöht und stimmt mit der geringen Translokation ^{192}Ir -UFP nach der einstündigen Verzögerung überein. Obwohl die mikroskopische Analyse in Lungenbereichen eine Abschuppung der epithelialen Schicht bei den *in situ* mit H_2O_2 behandelten Lungen zeigte, unterschieden sich die ALP-Spiegel im Perfusat nicht von denen der Kontrollgruppen. Die experimentellen Bedingungen beeinträchtigten auch die Integrität der endothelialen Schicht nicht, da sich die ACE-Konzentration im Perfusat während der Perfusion nicht veränderte. Am Ende des Experimentes wurden jedoch in den meisten Lungen Ödeme mikroskopisch als interstitielle Erweiterung beobachtet. Die Ödembildung beruht auf einer mangelnden Ausgewogenheit zwischen transvaskulärer Flüssigkeitsfiltration und Clearance. Auch ein Übermaß an Flüssigkeit verursacht eine Überhydratation des Interstitiums, was von einer Anreicherung von Ödemflüssigkeit im lockeren Bindegewebe begleitet ist. Man könnte einwenden, dass Ödeme die Translokation von ^{192}Ir -UFP aus dem Lumen über das Interstitium durch das Endothel beeinflussen könnten. In der Tat zeigte eine neuere Studie, in der kolloidale Goldpartikel (4 nm) intravenös in Kaninchen injiziert wurden, dass ein geringer, aber signifikanter Prozentsatz (7%) der ultrafeinen Partikel von endothelialen und epithelialen Zellen der Lunge aufgenommen wurde [Heckel et al. 2004]. Nach Infusion von LPS, was ein mildes Lungenödem verursachte, war der transendotheliale Transport auf das 5fache verstärkt, während eine signifikante Menge der Goldpartikeln im Interstitium (14 %) akkumulierte und sogar die Alveolen (11 %) erreichte. Obwohl dies eine mögliche Beeinflussung durch die Ödeme in unserer Studie nahe legt, sollte man sich darüber im Klaren sein, dass in der oben genannten Studie das Ödem bereits zu Beginn vorlag und die Translokation in eine andere Richtung erfolgte. Trotzdem halten wir einen Einfluss des Ödems auf die Partikeltranslokation in unserer Studie für unwahrscheinlich, da keine ^{192}Ir -

UFP-Translokation bei der Kontrollgruppe und nach Verabreichung eines Histaminbolus bis zu zwei Stunden nach Beginn der Inhalation beobachtet wurde.

Die minimale Translokation der ^{192}Ir -UFP im isolierten Lungenperfusionssystem stimmt mit unseren früheren Befunden *in vivo* überein [Kreyling et al. 2002], in denen Ratten die gleichen Partikel in ähnlicher Dosis inhalierten. Andere Studien berichten jedoch sehr verschiedene Mengen und Kinetiken der Translokation. Nemmar et al. [2002] untersuchten die Partikeltranslokation nach intratrachealer Instillation ultrafeiner Partikeln bei Hamstern *in vivo* und beobachteten eine rasche Translokation (3% innerhalb von 5 Minuten) von 80 nm großen Albuminpartikeln, die mit ^{99}Tc beschichtet waren, aber nach 15 Minuten wurde keine Translokation beobachtet. Andererseits konnte dieselbe Gruppe keine Translokation von Latexpartikeln (24-190 nm) in isoliert perfundierten Kaninchenlungen unter Überdruckventilation feststellen [Nemmar et al. 2005]. Die Oberflächenchemie beeinflusste diesen Prozess nicht. In einem ähnlichen Versuchsansatz, in dem fluoreszierende Latexkügelchen und Überdruckventilation eingesetzt wurden, fanden wir keine Partikeltranslokation. Dagegen beobachteten Brooking et al. [2001] bei Ratten während der nasalen Inhalation von Latexpartikeln (50 -250 nm) einen kontinuierlichen Anstieg der Translokation mit der Zeit bis zu 180 Minuten. Letztere Studie hob die Bedeutung der Partikelgröße hervor, da die kleinsten ultrafeinen Partikel höhere Aufnahmezeiten aufwiesen als die größeren Partikel. Zudem zeigte sie, dass die Partikeloberflächenchemie ein wichtiges Charakteristikum ist [Brooking et al. 2001].

5.1.2. Überdruckventilation mit isolierten PMN in der Lungenperfusionatflüssigkeit

Der nächste Schritt im Laufe dieses Projektes war es, ein physiologischeres Modell mit Einstrom von PMN in der isoliert perfundierten Lunge aufzubauen, um zu untersuchen, ob der PMN-Einstrom die Translokation von ^{129}Ir -UFP erleichtert. Eine besondere Herausforderung war es zu prüfen, ob die Translokationsrate durch die entzündliche Aktivierung von Neutrophilen im Perfusionsmedium gegenüber der in unserer vorausgehenden Studie angewandten intratrachealen Gabe von H_2O_2 (Abschnitt 4.1) [Meiring et al. 2005] gesteigert werden kann. Die mit CFSE markierten PMN waren ein gutes Werkzeug, um das Modell zu etablieren, das es ermöglicht die PMN im Lungengewebe und die Aktivierung durch Marker wie MPO im Perfusat sichtbar zu machen. Ähnlich wie in unserer vorausgehenden Studie wurde keine Translokation von ^{129}Ir -UFP (18 nm) in normalen isoliert perfundierten Lungen beobachtet. Auch in den mit Histamin auf der Endothelseite (1 μm) oder H_2O_2 (0,5 nM) vorbehandelten Lungen wurde keine Translokation festgestellt. Dieser Befund steht im Widerspruch zu unseren vorausgehenden Experimenten (Abschnitt 4.1) in der bei Unterdruck ventilierten Lunge, in denen wir eine signifikante Translokation von Iridiumpartikeln nach Vorbehandlung mit Histamin und H_2O_2 fanden. Wir halten dieses Modell jedoch für geeignet, weitere entzündliche Reaktionen, die durch PMN vermittelt werden, in der Lunge zu untersuchen. Wir etablierten daher ein Modell zur Untersuchung von Entzündungen an der isoliert perfundierten Lunge.

Isolierte menschliche PMN wurden in Studien an der isoliert perfundierten Lunge eingesetzt, um die Wirkung von Schäden durch Ischämie/Reperfusion in der Lunge zu untersuchen [Lu et al. 1997] sowie zur Untersuchung der Akkumulation von Neutrophilen und der Ödembildung [Guidot et al. 1996]. Das Modell hat ein großes Potential und kann eine Menge Informationen über die Wechselwirkung von PMN mit der Lunge liefern. Von Anfang an war es wichtig festzustellen, ob die PMN dauerhaft markiert oder unmarkiert sind. Die Ergebnisse zeigten, dass die PMN für die Dauer des Experimentes stabil und lebensfähig sind, wenn sie vorher auf Eis gehalten werden. Die Markierung der PMN erlaubte es uns, die Zellen, nachdem sie sich in der Lunge festgesetzt hatten, sichtbar zu machen. Ein weiterer Grund für die Markierung war die Quantifizierung; dies erwies sich jedoch als schwierig, da die PMN über die ganze Lunge verteilt wurden, und man hätte viele Schnitte auswerten müssen, um die Anzahl der Neutrophilen genau zu bestimmen. Zudem verursachte die Lungenstruktur

eine beträchtliche Autofluoreszenz. Eine möglicherweise unspezifische Festsetzung von Neutrophilen wie das Anheften von Neutrophilen am Schlauchmaterial wurde abgeschätzt, indem das Medium durch das Schlauchmaterial über die gleiche Zeit lief wie im Experiment. Dabei wurde keine Anheftung der Zellen beobachtet. Durch Messung der Aktivität von MPO konnten wir abschätzen, ob PMN in der Lunge unter Kontrollbedingungen aktiviert wurden. Hierbei zeigte sich jedoch keine bestimmbar MPO. Die Aktivierung von MPO hatte keine Auswirkung auf die ACE-Freisetzung. Es wurde vermutet, dass die Aktivierung von neutrophilen Zellen infolge der Freisetzung von H_2O_2 in der Lunge zu einem endothelialen Schaden führen würde. Wir konnten jedoch kein H_2O_2 im Perfusat messen und nahmen daher an, dass auch kein endothelialer Schaden vorlag. Die meisten Lungen in der PMN-Gruppe wiesen kein erkennbares Ödem auf.

Die isolierten Lungen wurden verschiedenen *ex vivo* Behandlungen mit entweder H_2O_2 , Histamin, isolierten menschlichen Neutrophilen in Abwesenheit oder Anwesenheit von fMLP unterzogen. Unser Ziel war es, mit diesen unterschiedlichen Behandlungen gewisse physiologische Zustände nachzuahmen, die adverse Effekte infolge von Partikelinhalation begleiten. Durch Anwendung von H_2O_2 wollten wir oxidativen Stress induzieren, der auch bei Partikelinhalation in der Lunge sowohl durch direkte Radikalbildung durch Partikelbestandteile als auch indirekt durch Rekrutierung von Entzündungszellen verursacht wird [Übersicht: Knappen et al. 2004]. Oxidativer Stress gilt als der bevorzugte zentrale hypothetische Mechanismus der adversen Wirkungen von Partikeln, einschließlich ultrafeiner Partikel [Donaldson et al. 2003]. Früher nahmen Donaldson et al. [2001] an, dass oxidativer Stress und Glutathion-Depletion die Lungenpermeabilität beeinflussen können, sodass größere Partikel über das Lungenepithel in das Interstitium passieren können. Dieses Konzept wird durch unsere früheren Experimente im selben System, in dem eine hohe Konzentration von H_2O_2 (5 mM) als Bolus in die Lunge injiziert wurde, um eine Endkonzentration von 0,5 mM zu erzielen [Meiring et al. 2005] bestätigt. In diesem Modell diente die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Zellen als physiologische Quelle von ROS und inflammatorischen Mediatoren. Die Rekrutierung neutrophiler Zellen ist durch drei Schritte charakterisiert, und zwar das Anhaften, die Passage in das Gewebe und die Migration [Sibille & Marchandise 1993; Strieter et al 1993]. Man vermutet auch, dass Entzündungsmediatoren in den Gefäßen durchlässige Stellen oder Lücken zwischen endothelialen Zellen verursachen, was zu einem Übergang von Blutelementen oder Plasmaproteinen durch das Endothel führt. Überraschenderweise führten in unserer Untersuchung jedoch sogar aktivierte PMN im Perfusat nicht zu einer Erleichterung der Partikeltranslokation. Dieser Befund ist ein weiterer in der ganzen Reihe widersprüchlicher toxikologischer Daten, die es darüber gibt, dass Partikel aus der Lunge in den Blutkreislauf [Nemmar et al. 2001, Kreyling et al. 2002, Oberdörster et al. 2004] und auch vom Blut in das Lungenlumen [Heckel et al. 2004] translozieren. In allen diesen Untersuchungen wurden *in vivo* Modelle eingesetzt. In den meisten Fällen war die Translokation gering, was dafür sprechen könnte, dass eine Partikeltranslokation durch eine Reihe von Barrieren in der Lunge verhindert wird. Nach Deposition im pulmonalen System kommen die Partikel mit Surfactant und Makrophagen in Berührung und müssen die epitheliale Barriere, das Interstitium und die Endothelschicht durchqueren, um die Blutkapillaren zu erreichen.

Gegenüber den in Abschnitt 4.1 beschriebenen früheren Untersuchungen an der IPL haben wir verschiedene Bedingungen verändert: Erstens wählten wir einen oxidativen Stress, der mehr den Bedingungen in der Realität entspricht und nutzten dazu den Einstrom aktivierter neutrophiler Zellen in die Lunge. Zweitens wurde die IPL unter Überdruck beatmet anstatt bei Unterdruck. Der Hauptgrund für diese Änderung war, die Bildung von Ödemen zu minimieren, was bei der Überdruckventilation ein sehr großes Problem ist. Ein paar Hyperventilierungsrunden wurden durchgeführt, um den Kollaps der Kapillaren zu verhindern. Eine weitere Variable war das Medium, wofür wir Krebs-Henseleit-Puffer, ergänzt mit HEPES und Albumin, einsetzten. Dass die Neutrophilen aktiviert sind, konnten wir anhand der Freisetzung von MPO und ROS sowie reger Chemotaxis (*in vitro*) nachweisen. In dieser

Studie wurden ^{129}Ir -UFP aus einer frisch zubereiteten Suspension des Aerosols, das in Wasser eingeleitet wurde, instilliert. Auch wenn die Instillation eine ähnliche Dosis verwendet, ist die Dosis-Rate wesentlich höher, was gewöhnlich zu einem rascheren Einstrom inflammatorischer Zellen führt. Dennoch führte die Instillation von $80\ \mu\text{g}\ ^{129}\text{Ir}$ -UFP nicht zu einer verstärkten Aktivierung von PMN oder zur Translokation wie zuvor beobachtet. Die Adhäsion und Aktivierung der PMN hatte keine Translokation von ^{129}Ir -UFP zur Folge wie zuvor bei Injektion eines H_2O_2 -Bolus (Abschnitt 4.1). Andererseits zeigten die in dieser Studie eingesetzten Positiv-Kontrollen ($1\ \mu\text{M}$ Histamin im Perfusat) ebenfalls keine Translokation von ^{129}Ir -UFP. Das spricht dafür, dass der Wechsel zur Überdruckventilation die Hauptursache für die inkongruenten Ergebnisse ist. Die Instillation der Partikel könnte auch dazu beigetragen haben, dass wir dieses Mal keine Translokation beobachteten. Ultrafeine Partikel könnten in der Suspension Konglomerate bilden und so die Translokation von ^{129}Ir -UFP in den systemischen Blutkreislauf verhindert werden. In unserer vorigen Studie erfolgte die Exposition als Inhalation über zwei Stunden, was die Translokation erleichtert haben könnte, da die Dosis über die Zeit weit geringer ist, als bei der Instillation. Es sind eindeutig mehr Arbeiten erforderlich, um diese Fragen zu klären. Obwohl unsere Befunde keine quantitativen Schlussfolgerungen über den genauen Mechanismus und die Bedeutung der systemischen Translokation ultrafeiner Partikel für die schädlichen Partikelwirkungen erlauben, können wir bestätigen, dass ultrafeine Partikel von der Lunge in den Blutkreislauf translozieren können, wenn man die isoliert perfundierte Rattenlunge einsetzt. Die Permeabilität der Lungenbarriere für ultrafeine Partikel scheint sowohl auf epithelialer als auch auf endothelialer Ebene kontrolliert zu werden, und Bedingungen, die diese Barrierenfunktion beeinträchtigen, wie zum Beispiel eine Entzündung, können die Translokation von Partikeln beeinflussen. Die Bedingungen, unter denen dies auftritt, entsprechen den Bedingungen, die bei erkrankten, empfindlichen Personen, einschließlich Asthmatikern und COPD-Patienten, vorliegen.

5.2 Entzündung und systemische Effekte der intratrachealen Verabreichung von Endotoxin oder Staubproben (EHC-93)

In Anbetracht des geringen Ausmaßes der Translokation in der IPL wurde entschieden, kardiovaskuläre Mechanismen in einem *in vivo* Modell zu untersuchen und dadurch zu versuchen, systemische Wirkungen sowohl mit der Entzündung (als die Lungenpermeabilität bestimmender Faktor) als auch mit der Partikelzusammensetzung in Beziehung zu setzen. Zweck dieser Substudie war es, die Mechanismen der Schädigung vaskulärer Funktionen durch Partikel- oder LPS-Instillation in spontan hypertensiven (SH) Ratten aufzuklären. Der Einsatz der SH-Ratten ist dadurch begründet, dass man der Ansicht ist, dass Personen mit Hypertonie und kardiovaskulären Erkrankungen ein höheres Risiko für die Wirkung von Umweltstäuben sowie Tabakrauchexposition aufweisen [Sugiyama et al. 1998; Wilkes & Evans 1999]. SH-Ratten sind durch einen hyperaktiven Sympathikus und eine verminderte Expression der endothelialen Stickstoffoxid-Synthase (eNOS) in der Aorta charakterisiert [Safar et al. 2001]. Zudem vermutet man, dass eine Partikelexposition eine systemische thrombogene Reaktion hervorruft, die bei der Ratte von Entzündungen in der Lunge und oxidativem Stress begleitet sind. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktionen in SH-Ratten bedeutender sind als in Wildtyp-Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) [Kodavanti et al. 2000]. Daher werden SH-Ratten als nützliches Modell zur Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass PM und LPS einen vorübergehenden Effekt auf die Gefäßerweiterung der Rattenaorta haben, der nach zwei Stunden maximal ist. Diese Wirkung fällt zeitlich mit dem Blutkonzentrationsprofil von Übergangsmetallen zusammen, die den Gefäßtonus beeinflussen. Andererseits erreicht die Lungenentzündung nach 24 Stunden ihr Maximum und fällt zeitlich mit einer Beeinträchtigung der Vasorelaxation zusammen.

Diese Studie ergänzt unsere frühere Beobachtung [Bagate et al. 2004; Knaapen et al. 2001], dass Umweltpartikel einen direkten Einfluss auf den Gefäßtonus *in vitro* ausüben. Unsere

Untersuchung zeigt, dass sowohl PM als auch LPS einen akuten vorübergehenden Effekt auf die rezeptorabhängige Vasorelaxation in der Rattenaorta haben. Beide Behandlungen schwächten auch die durch Azetylcholin ausgelöste Vasokontraktion in den von der Eptihelschicht befreiten Aortenringen ab, was nahe legt, dass der Effekt von Partikeln direkt auf das Muskelgewebe einwirkt. Eine durch Partikel ausgelöste Vasorelaxation wurde schon in mehreren Studien demonstriert [Cheng & Kang 1999; Kang & Cheng 1997]. Unsere früheren *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass PM eine Erschlaffung sowohl in Leitungs- als auch in Widerstandsgefäßen auslöst [Bagate et al. 2004; Knaapen et al. 2001]. In der vorliegenden Studie war PM während der Experimente im Bad nicht vorhanden. Daher wird vermutet, dass die durch Partikel oder translozierte Partikelkomponenten induzierten Effekte auf der Freisetzung von aktiven Mediatoren aus der Lunge beruhen. Diese Effekte müssen persistent sein, wenn man die extensive Wasch- und Stabilisierungsperiode der *in vitro* Präparationen in Betracht zieht.

Obwohl wir keine Rezeptorantagonisten einsetzten, um den PM-Effekt zu blockieren, könnten unsere Ergebnisse durch drei Hypothesen erklärt werden: Erstens könnten Partikel reizerzeugende Rezeptoren wie Capsaicin, Substanz P und CGRP-Rezeptoren aktivieren [Veronesi et al. 1999, 2000] oder Capsaicin-sensitive sensorische Nerven stimulieren, die im kardiovaskulären System weitverbreitet sind. Beide Wege führen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration und stimulieren eNOS in endothelialen Zellen, welches wiederum NO freisetzt, das die Capsaicin-Wirkung vermitteln könnte [Vass et al. 1996]. Die Aktivierung des Capsaicin-Rezeptors kann auch durch Öffnung von langsamen nicht inaktivierenden Kaliumkanälen der glatten Gefäßmuskulatur eine Relaxation induzieren [Yeon et al. 2001]. Zweitens konnte gezeigt werden, dass Motorradrußpartikelextrakt (MEPE) die Produktion von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) in glatten Gefäßmuskeln verhindert [Cheng & Kang 1999]. Dieses kann als ein sekundärer Botenstoff wirken, der die Kalziumfreisetzung aus internen Speichern durch IP3-Rezeptoren auslöst und die Kontraktion glatter Gefäßmuskeln induziert. Ein Teil der zunehmenden Erschlaffung durch PM kann durch diesen inhibitorischen Effekt erklärt werden. Drittens sind LPS und PM in der Lage, Entzündungen auszulösen und verschiedene Mediatoren hochzuregulieren, wie die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) in der Lunge und im vaskulären Gewebe [Kodavanti et al. 2002a; Moreau et al. 2002]. Selbst wenn die Lungenentzündung in unserer Studie erst 24 Stunden nach der Partikelinstillation maximal war, vermuten wir, dass vier Stunden nach der Instillation die frühe Phase der Entzündung mit Freisetzung und Aufregulation verschiedener Mediatoren der Vasorelaxation und vaskulären Permeabilität (Kinine, Histamin, Prostaglandin E, Zytokine, iNOS) bereits abläuft [Schorderet et al. 1992]. Da das Experiment *ex vivo* erfolgte, kann die gesteigerte Relaxation durch die aufregulierten Mediatoren (iNOS) oder in den Interzellulärraum freigesetzte Mediatoren (Prostaglandin E) erklärt werden. Da NO der hauptsächliche intrazelluläre Botenstoff der durch Azetylcholin induzierten Erschlaffung der Aorta ist, kann die Aufregulation von iNOS durch PM die Azetylcholin-Antwort potenzieren. Da unser Tiermodell hypertensiv ist, legt dies eine zugrunde liegende Entzündung nahe, die durch PM und LPS schnell überaktiviert werden kann.

Dass durch die Vorbehandlung mit PM sowohl die rezeptorabhängige als auch die rezeptorunabhängige Vasorelaxation zunahm, weist auf die Beteiligung eines gemeinsamen Mechanismus in beiden Systemen hin, und zwar die NO/cGMP-Signalkaskade. Da jedoch nur die Vorbehandlung mit PM (und nicht mit LPS) in der Lage war, die SNP-induzierte Relaxation zu verändern, legt dies einen anderen Mechanismus nahe als über endotheliales NO. Da die eingesetzten Partikel kaum wasserlösliches LPS (9 EU/Tier) enthalten [Schins et al. 2004] und die Wirkungen ausgeprägter sind als wenn LPS (350 EU/Tier) eingesetzt wird, vermuten wir, dass die Wirkung von PM nicht durch LPS vermittelt wird. Der niedrige PAH-Gehalt des Staubes EHC-93 (Gesamt-PAH: 13,3 Ag/g) und der Gebrauch von Wasser als Lösungsmittel sprechen zudem nicht dafür, dass PAH in unseren Befunden eine Rolle spielen. Andererseits enthalten PM Übergangsmetalle wie Vanadium, Kupfer, Zink und

Eisen, von denen bekannt ist, dass sie rasch ins Blut übertreten und dort vier Stunden nach der Instillation von Flugaschepartikeln (ROFA) höhere Konzentrationen erreichen und die Herzfunktion beeinflussen [Dreher et al. 1997; Watkinson et al. 2001]. Bei einer Staubdosis (EHC-93) von 10 mg/kg Körpergewicht bei Ratten schätzen wir die Eisenkonzentration im Plasma auf 0,7 μM , ausgehend von einem Eisengehalt von 15 mg/g Partikel bei 1% Wasserlöslichkeit [Vincent et al. 1997]. Andere Elemente wie Kupfer und Vanadium erreichten vier Stunden nach der Instillation Plasmaspiegel von 70 bzw. 62 $\mu\text{g/l}$. Unsere *in vitro* Experimente zeigten, dass sowohl PM als auch zwei künstliche Partikel, die mit löslichen Vanadium(V)- und Eisen(II)-Salzen beschichtet waren, bei Endkonzentrationen zwischen 4–20 μM Fe^{2+} bzw. 10–40 μM V^{5+} ebenfalls eine Relaxation der Aortenringe induzierten. Bereits früher konnten wir zeigen, dass die löslichen Staubkomponenten in Aortenringen eine Erschlaffung auslösten, aber die Eisenchelat bildende Substanz Desferoxamin hatte keinen Einfluss auf diese Relaxation [Knaapen et al. 2001]. Unsere aktuellen Daten weisen darauf hin, dass andere lösliche Metalle wie Vanadium und Zink bei diesem Effekt eine Rolle spielen könnten, da sie mit Desferoxamin keine Chelate bilden. In dieser Studie haben wir uns auf Zink und Kupfer konzentriert, da von ihnen berichtet wird, dass sie eine wichtige Rolle bei den negativen Partikelwirkungen spielen [Kodavanti et al. 2002b]. Tatsächlich zeigt die Reaktion zum Zeitpunkt vier Stunden einen Zusammenhang mit der Kinetik löslicher Metalle. Es ist bekannt, dass Zink und Kupfer eine Relaxation induzieren, indem sie spannungsabhängige Kanäle in der glatten Gefäßmuskulatur inhibieren [Ma & Li 1989; Yang et al. 2001]. Von Kupfersulfat wurde berichtet, dass es eine NO-abhängige Erschlaffung in der Rattenaorta bewirkt [MacKenzie et al. 1999]. Die Zunahme der Relaxation kann auch durch andere Metalle wie Magnesium induziert werden, das in den meisten wie auch in den von uns eingesetzten Partikeln reichlich vorhanden ist. Es wurde berichtet, dass Magnesium eine endothelabhängige Gefäßerweiterung von Blutgefäßen und eine Blutdrucksenkung bewirkt [Yang et al. 2000]. Tatsächlich benötigen sowohl die membranständige Guanylatzyklase (pGC) als auch die lösliche Isoform der Guanylatzyklase (sGC) divalente Kationen als Substratkofaktoren und allosterische Modulatoren, um eine maximale katalytische Aktivität auszuüben [Waldman & Murad, 1987]. Wenn Magnesium und Mangan als kationische Substratkofaktoren eingesetzt werden, weisen sGC und pGC fundamentale katalytische Aktivitäten auf, die vollständig sensitiv für Liganden sind [Lucas et al. 2000]. Zusammen genommen ermöglichen es uns diese Daten zu verstehen, wie lösliche Metalle bei der zunehmenden Gefäßerschlaffung eine Rolle spielen könnten.

Obwohl *in vitro* Studien zeigten, dass einige Metalle in Wasser nahe zu unlöslich sind, bietet die Lungenumgebung eine Reihe Chelat bildender Verbindungen einschließlich Zitrat, Laktat und Proteine, von denen gezeigt werden konnte, dass sie die Extraktion verschiedener Metalle aus Partikeln erleichtern [Smith und Aust 1997; van Maanen et al. 1999]. Zusammen mit den oben erwähnten Daten weist dies darauf hin, dass verschiedene Metalle rasch in das Blut gelangen und vorübergehende Effekte durch Beeinflussung der sGC im Muskelgewebe ausüben können. Der Beweis hierfür ist jedoch noch nicht erbracht, und dieser Mechanismus muss weiter untersucht werden. Mehrere Studien haben eine Beeinträchtigung der durch Azetylcholin ausgelösten endothelabhängigen Erschlaffung der Brustorta der Ratte nach Vorbehandlung mit Dieselrußpartikeln und Motorradrußpartikelextrakt (MEPE) gezeigt [Cheng & Kang 1999, Ikeda et al. 1995]. Obwohl die experimentellen Bedingungen sich von denen in unserer Studie unterscheiden, beobachteten wir 24 Stunden nach der Instillation ebenfalls eine signifikante Verminderung der endothelabhängigen und -unabhängigen Relaxation im Vergleich zur Situation nach vier Stunden. Es ist bekannt, dass Partikel und ihre löslichen Komponenten die Freisetzung verschiedener reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, die an Zellschäden beteiligt sind, induzieren [Knaapen et al. 2000; 2002]. Obwohl oxidativer Stress in der Frühphase der Entzündung stattfinden kann, wird keine Beeinträchtigung der Relaxation beobachtet, vielleicht infolge von antioxidativer Protektion. Eine Inkubation der Rattenaorta mit MEPE löste nur 18 Stunden danach eine Steigerung der Vasokonstriktion durch ROS aus [Tzeng et al. 2003]. Wir vermuten, dass ein

Redoxzyklus durch Chinone in den Extrakten zur Bildung von ROS beitragen kann und dass dies die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) aktivieren kann, die Kontraktion zu verstärken.

Es wurde gezeigt, dass eine kontinuierliche Bildung von Peroxynitrit die Aktivität von sGC senkt und die Vasorelaxation beeinträchtigt [Weber et al. 2001]. Die durch SNP ausgelöste Verminderung der Relaxation verschwand nach Entfernung des Endothels in der Partikelinstillationsgruppe. Das weist darauf hin, dass die Beeinträchtigung mit einem Konstriktionsfaktor verbunden ist, der vom Endothel freigesetzt wird. Hierbei könnten verschiedene Kandidatenmediatoren eine Rolle spielen. Erstens wurde beschrieben, dass der Bradykinin B1-Rezeptor in verschiedenen glatten Muskelpräparationen als Reaktion auf Schädigung, Entzündung, Zytokine und LPS hochreguliert wird [Marceau 1995, Marceau et al. 1998]. Es ist wohlbekannt, dass diese Rezeptoraktivierung eine Vasokonstriktion induziert [Bagate et al. 1999]. Da verschiedene Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems auf Gefäßebene vorkommen, vermuten wir, dass die Freisetzung von Kininen oder ihrer Metaboliten und die Aktivierung aufregulierter B1-Rezeptoren die Vasorelaxation abschwächen. Ein weiterer wohlbekannter, vom Endothel abgeleiteter Vasokonstriktionsfaktor, der an der systemischen Wirkung von PM beteiligt ist, ist Endothelin. Bei Tieren, die gegenüber PM allein oder in Kombination mit Ozon exponiert wurden, wurde ein Anstieg des Plasmaendothelins beobachtet [Bouthillier et al. 1998]. Es ist ebenfalls bekannt, dass PM in pulmonalen Arterien eine Vasokonstriktion induziert [Batalha et al. 2002] sowie in menschlichen Oberarmarterien [Brook et al. 2002] eine Gefäßerschaffung auslöst. Der dritte Kandidatenmediator könnten von Cyclooxygenase-2 (COX-2) abgeleitete Produkte wie Thromboxan-A₂ (TXA₂) sein. ROFA induziert die Expression von COX-2 in Epithelzellen der menschlichen Atemwege [Samet et al. 2000]. Eine Steigerung der COX-2-Expression durch die Lunge könnte zu systemischer Entzündung und nachfolgender Produktion von TXA₂ führen, das die Vasorelaxation beeinträchtigen kann.

In Gegensatz zur Gefäßerschaffung beeinflusste PM die rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Vasokonstriktion nicht. Frühere Experimente, in denen die Aorta *in vitro* mit Außenluftstaub (TSP) präinkubiert wurde, führten zu einer Rechtsverlagerung der Dosis-Wirkungskurve der PHE-induzierten Vasokonstriktion [Knaapen et al. 2001]. Cheng und Kang [1999] zeigten ebenfalls *in vitro* eine Inhibition der rezeptorabhängigen Vasokonstriktion durch Motorradrußpartikelextrakte. Dieser Unterschied könnte darauf beruhen, dass Partikel oder ihre Komponenten *in vitro* eine direkte Relaxation induzieren, was zu einem funktionellen Antagonismus und einer Rechtsverlagerung der Dosis-Wirkungskurve führt. Im vorliegenden Versuchsansatz wird die Aorta herausgeschnitten und in einer partikelfreien Charge gegenüber Phenylephrin exponiert, um die normale Kontraktion auszulösen. Eine gradlinige Interpretation unserer Befunde würde eine Vasorelaxation voraussetzen, zumindest in der Frühphase nach der Partikelinstillation. Das steht im Widerspruch zu den *in vivo* Studien, die eine Vasokonstriktion von Lungen- und Oberarmarterien beobachten [Batalha et al. 2002, Brook et al. 2002].

Die Partikelwirkungen könnten über direkte und indirekte Wege erfolgen und letzterer Mechanismus könnte die Freisetzung von Konstriktionsfaktoren wie Endothelin aus der Lunge in das Plasma nach Partikelexposition involvieren [Bouthillier et al. 1998]. Es ist auch bekannt, dass PM eine Änderung der autonomen Kontrolle des kardiovaskulären Systems induzieren [Ibad-Mulli et al. 2001] und eine Gefäßverengung verursachen könnten, indem sie auf das zentrale Nervensystem (ZNS) wirken. Kürzlich wurde vermutet, dass ultrafeine Partikel aus dem oberen Respirationstrakt entlang der olfaktorischen Nerven bis in den Riechkolben des Gehirns transportiert werden können [Oberdörster & Utell 2002]. Die Deposition von Mangan enthaltene Partikeln in diesem Teil des Gehirns nach nasaler Administration ist mit Wirkungen in den Astrozyten verbunden [Henriksson & Tjälve 2000]. Ob solch eine Wirkung zu einem Anstieg der Freisetzung von Katecholaminen führen kann, muss noch untersucht werden, ein solcher Effekt auf die sympathische Innervation könnte

jedoch für die in früheren Studien beobachtete Vasokonstriktion verantwortlich sein [Batalha et al. 2002; Brook et al. 2002].

Letztendlich zeigen unsere Daten, dass die Instillation von PM und LPS einen vorübergehenden Effekt auf die Vasorelaxation der Rattenaorta hat, der nach vier Stunden maximal ist. Diese Partikelwirkung fällt zeitlich nicht nur mit dem Blutkonzentrationsprofil der Übergangsmetalle, sondern auch mit der frühen Phase der Entzündung zusammen. Wie unsere mit LPS erzielten Ergebnisse zeigen, hat die Entzündung einen Einfluss auf den Gefäßtonus. Andererseits erreicht die pulmonale Entzündung nach 24 Stunden ein Maximum und fällt zeitlich mit der Beeinträchtigung der Gefäßerschaffung zusammen. Die vorliegenden Daten erlauben es nicht, zwischen den möglichen Mechanismen zu unterscheiden, sie weisen jedoch darauf hin, dass sowohl direkte Effekte von Metallen als auch Entzündungen eine Rolle spielen.

5.3 Herzleistung in PM-behandelten SH-Ratten nach ischämischer Schädigung

Zweck dieser Substudie war es, die Beeinträchtigung der Herzfunktion durch Umweltstäube bei SH-Ratten zu untersuchen. Die in Abschnitt 4.4 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine Vorbehandlung von SH-Ratten mit Umweltpartikeln und LPS die Fähigkeit des isolierten Herzens, sich von einem durch Koronarverschluss ausgelösten ischämischen Insult zu erholen, beeinträchtigt, obwohl zum Ende des Experimentes kein Unterschied in der pathologischen Schädigung beobachtet wurde. Die verminderte Erholung wurde zu einem Zeitpunkt vier Stunden nach der Exposition beobachtet und scheint durch die löslichen Komponenten der Partikelpräparation verursacht zu sein. Zink (Zn^{++}), das wichtigste lösliche Metall in den eingesetzten Partikeln, bewirkte auch eine Depression des LVDP, der Herzfrequenz und der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/Dt_{max}). Nach zehnmütiger Infusion mit Zn^{++} war die Herzleistung dramatisch vermindert und erholte sich nicht von der induzierten Depression. Aufgrund experimenteller Studien an Herzmuskelzellen kommen wir zu dem Schluss, dass die Störung der Herzfunktion durch PM durch einen Einfluss der bioverfügbaren Metalle in den Partikeln auf die Kalziumhomöostase verursacht wird.

Herzinfarkte gehen mit myokardialen ischämischen Schäden einher, wie in epidemiologischen Studien beobachtet wurde [Peters et al. 2004]. Eine Mangel durchblutung des Herzmuskels hat elektrische Instabilität und letale Arrhythmien zur Folge [Ghuran & Camm 2001; Brugada 2001]. Die myokardiale Ischämie führt auch zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran, was sowohl die Depolarisation und Repolarisation stört und zur kardialen Instabilität führt, was im klinischen Szenario wiederum zum akuten Herztod führen kann. Wir vermuteten, dass eine Präexposition gegenüber PM die Kapazität des Herzens, sich von einer Mangel durchblutung zu erholen, beeinträchtigen kann, und setzten ein *ex vivo* isoliertes Rattenherzmodell ein, um die Erholung der Herzen der zuvor präinstillierten SH-Ratten nach einem Koronarverschluss zu untersuchen. In dieser Studie wurden SH-Ratten eingesetzt, weil sie als Modell für menschliche kardiovaskuläre Erkrankungen gelten und diese Subpopulation die Hauptrisikogruppe für die Wirkung von Umweltstäuben ist [Pope et al. 2004]. SH-Ratten sind ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung systemischen Bluthochdrucks und damit verbundenen Herzerkrankungen. Zudem wurde berichtet, dass die kardialen Effekte von PM in SH-Ratten stärker sind als in Wistar-Kyoto-Ratten [Kodavanti et al. 2000, 2002a].

Anhand ihrer Hauptbestandteile können Partikel in verschiedene Fraktionen aufgeteilt werden, zum Beispiel in die organische Fraktion (die polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe enthält), die anorganische Fraktion (enthält Sulfat, Nitrat, Ammonium und Metalle) und die biologische Fraktion, die Bakterienbestandteile enthält [Dreher et al. 2000]. Es ist nicht geklärt, welche dieser Partikelbestandteile an den in epidemiologischen Studien beobachteten kardiovaskulären Effekten beteiligt sind. Die intratracheale Instillation

verschiedener PM führte zu einem Einstrom von PMN in die Rattenlunge [Bagate et al. 2004a, Kodavanti et al. 2003], und diese Entzündung wurde mit den löslichen Übergangsmetallen in Zusammenhang gebracht [Dreher et al. 1997; Kodavanti et al. 2002b]. Obwohl die löslichen Metalle eine Hauptrolle zu spielen scheinen, erlauben die aktuellen Untersuchungen es nicht, zwischen einem indirekten Effekt der Entzündung und einem direkten Effekt bioverfügbarer Metalle oder translozierter Nanopartikel zu unterscheiden. Es wurde berichtet, dass sowohl Partikel als auch LPS-Instillation zu einer Entzündung in der Lunge führen (vergleiche Abb. 4.7, Abschnitt 4.3). Die Entzündung könnte eine Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Endothelin durch die Lunge induzieren, das ins Blut abgegeben werden und Störungen der Herzfunktionen verursachen kann [Prasad et al. 1991]. Diese Erklärung ist wiederum unwahrscheinlich, da unsere früheren Arbeiten (Abschnitt 4.3) gezeigt haben, dass die Lungenentzündung 24 Stunden nach der Instillation ihr Maximum erreicht, also dann, wenn keine kardialen Effekte mehr zu erkennen sind.

Unsere früheren Untersuchungen im selben Tiermodell haben gezeigt, dass nach intratrachealer Instillation von urbanen PM die Plasmakonzentrationen von löslichen Metallen vier Stunden nach der Instillation am höchsten waren (Abb. 4.10; Abschnitt 4.3). Interessanterweise wurde die verminderte Erholung von der Mangeldurchblutung vier Stunden, nicht jedoch 24 Stunden nach der Instillation beobachtet. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass lösliche Metalle an der Beeinträchtigung der Herzfunktion beteiligt sein könnten, und würde mit den aktuellen epidemiologischen Befunden übereinstimmen, in denen sich der stärkste Zusammenhang zwischen dem Beginn eines Herzinfarktes und einer Exposition gegenüber Verkehr ein bis zwei Stunden nach der Exposition zeigte [Peters et al. 2004]. Die Rolle der biologischen Partikelfractionen kann jedoch nicht vernachlässigt werden, da in mit LPS vorbehandelten Ratten ebenfalls eine Verminderung des LVDP beobachtet wurde. Da jedoch die LPS-Konzentration in unserer PM-Präparation auf 4 EU/mg [Schins et al. 2004] geschätzt wurde, war die LPS-Menge in den eingesetzten Partikeln (EHC-93) wesentlich geringer als die 350 EU Endotoxin, die für die Vorbehandlung der Ratten in unserem Experiment verwendet wurden. Daher sehen wir die Rolle der biologischen Fraktion als sehr gering an, selbst wenn sie an den Wirkungen mitbeteiligt sein könnte.

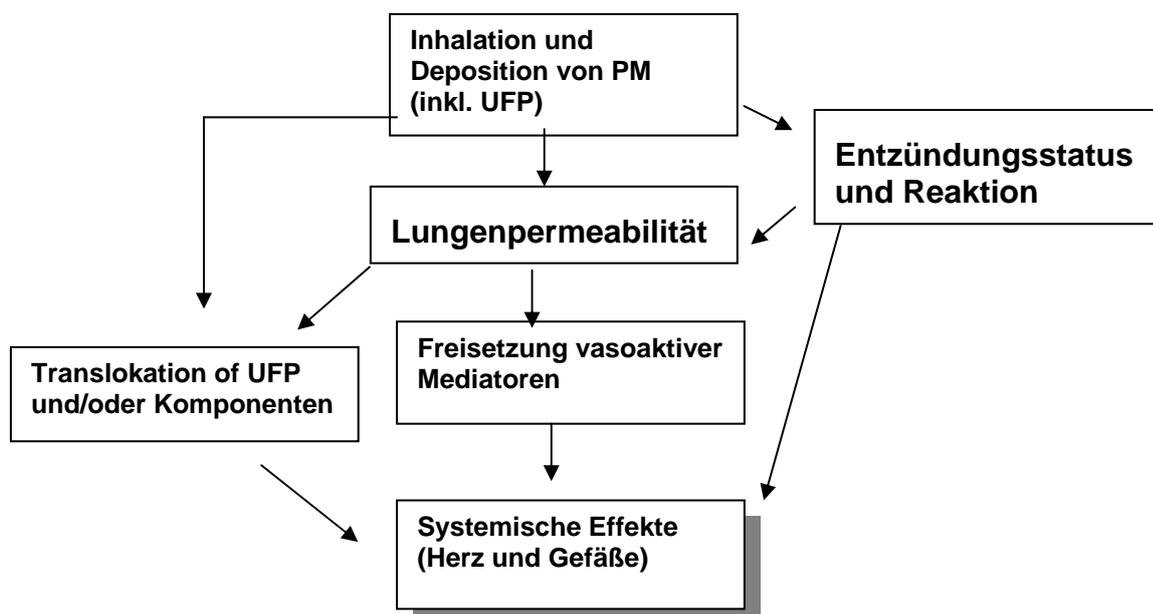
Die Rolle löslicher Metalle, insbesondere Zink, bei den kardiovaskulären Effekten von PM hat sich in mehreren Studien gezeigt [Kodavanti et al. 2002a,b; 2003; Bagate et al. 2004a,b]. Der Mechanismus, durch den Partikel und ihre löslichen Bestandteile eine Störung der Herzfunktion bewirken, ist jedoch nicht gut verstanden. Es ist bekannt, dass Kalzium eine Schlüsselrolle in der Herzkontraktion spielt, und daher untersuchten wir, ob die PM-Effekte auf das Herz auf einer Störung der Kalziumhomöostase beruhen. Einerseits ist noch unklar, ob die Beeinträchtigung der Kalziumhomöostase mit der Störung intrazellulärer Speicher oder des extrazellulären Kalziumeintritts verbunden ist. Andererseits ist die Wirkung löslicher Metalle auf den rezeptorabhängigen Kalziumeinstrom auch nicht bewiesen. Letzteres wurde anhand des ATP-induzierten Kalziumeinstroms untersucht, der durch in Kardiomyozyten vorhandenen purinergen Rezeptoren vermittelt wird [Mubagwa & Flameng 2001]. Die lösliche Partikelfraktion und Zinksulfat inhibierten den Kalziumeinstrom, der durch ATP, aber auch durch KCl ausgelöst wurde, von dem bekannt ist, dass es den Kalziumeinstrom durch rezeptorunabhängige Prozesse induziert, wie Depolarisation und Öffnung von Kalziumkanälen. Unsere Ergebnisse belegen einen Effekt von Zn^{++} sowie der löslichen Partikelfraktion und sprechen für eine Wirkung der löslichen Metalle auf Kalziumkanäle und ATP-Rezeptorkanäle. Wir bestätigten frühere Beobachtungen, dass lösliche Metalle den Kalziumeintritt aus dem extrazellulären Medium inhibieren, indem wir Thapsigargin, ein Inhibitor der Kalzium-ATPase auf das endoplasmatische Retikulum, sowie Bayk 8443, ein Dehydropyridinrezeptor-Agonist, einsetzten. Beide Substanzen induzierten einen Kalziumeinstrom aus dem intrazellulären Speicher bzw. aus dem Extrazellulärraum. Zn^{++} und PM-Filtrat konnten den intrazellulären Kalziumeinstrom, der durch Thapsigargin ausgelöst wurde,

nicht inhibieren. Dagegen hoben sie den extrazellulären Kalziumeinstrom, der durch den Dehydropyridinagonisten BAYK 8443 ausgelöst wurde, vollständig auf.

Insgesamt tragen diese Ergebnisse weiter zum Verständnis bei, wie partikuläre Luftverunreinigungen zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von Personen führen, die an bestehenden Herzerkrankungen leiden [Peters et al. 2004; Pope et al. 2004]. Abgesehen von der Ausübung direkter Effekte auf das Herz, weisen unsere Untersuchungen an diesem empfindlichen Tiermodell darauf hin, dass die Erholung von einer myokardialen Ischämie nach einer vorherigen PM-Exposition vermindert ist. Obgleich der genaue Mechanismus und die Natur der verantwortlichen Bestandteile noch weiter untersucht werden müssen, sollten lösliche Metalle in Partikeln im Hinblick auf ihre Wirkung auf Kalziumkanäle in isolierten Herzmuskelzellen weiter im Auge behalten werden.

6. Schlussfolgerung

Obwohl unsere Untersuchungen keine quantitativen Schlussfolgerungen über den genauen Mechanismus und die Bedeutung der systemischen Translokation ultrafeiner Partikel als Mechanismus für die adversen Wirkungen von PM erlauben, haben wir bestätigt, dass ultrafeine Partikel aus der Lunge in den Blutkreislauf gelangen können. Die Permeabilität der Lungenbarriere für ultrafeine Partikel scheint sowohl auf epithelialer als auch auf endothelialer Ebene kontrolliert zu werden, und Bedingungen, die diese Barrierefunktion stören, wie zum Beispiel eine Entzündung, können die Translokation von ultrafeinen Partikeln beeinflussen. Die Voraussetzungen, unter denen dies auftritt, sind mit den Bedingungen vergleichbar, die bei erkrankten, empfindlichen Personen, Asthmatiker und COPD-Patienten eingeschlossen, vorliegen. Neben der Translokation von Nanopartikeln in den Blutstrom müssen jedoch verschiedene andere Mechanismen bei der Verursachung systemischer Effekte in Betracht gezogen werden. In der Tat zeigte in dieser Studie die Vorbehandlung von normalen und SH-Ratten, dass sowohl Entzündungsmediatoren (die von der Lunge freigesetzt werden) und lösliche Partikelbestandteile (Metalle) in der Lage sind, indirekt die kardiale und vaskuläre Funktion über verschiedene Mechanismen zu beeinflussen. Die relative Bedeutung dieser Mechanismen hängt in starkem Maße von den proinflammatorischen Bedingungen der Person ab, welche sowohl die kardiovaskuläre Empfindlichkeit als auch die Lungenpermeabilität bestimmen. Letztere ist ein wesentlicher Punkt in der Translokation von ultrafeinen Partikeln (in dieser Studie) und wahrscheinlich auch von Partikelbestandteilen wie Übergangsmetalle. Diese Vorstellung ist im Schema unten dargestellt:



7. DANKSAGUNG

Die Autoren danken Dr. Doris Höhr und Erich Jermann für ihre technische Unterstützung während der Anfangsphase des Projektes und Dr. Roel Schins für seine wertvollen Anregungen während der Beendigung der Studie. Die Lungenperfusionsuntersuchungen wären ohne die Expertise, technische Unterstützung und Kenntnisse von Dr. Wolfgang Kreyling und Manuela Semmler von der GSF in München nicht möglich gewesen. Wir sind ihnen für ihren Beitrag sehr dankbar, obwohl sie nicht Teil des Originalprojektes waren. Ein entsprechender Dank gilt Dr. Flemming Cassee und Dr. Miriam Gerlofs für die Durchführung der Instillationen und Untersuchungen mit PM und LPS am RIFM in Bilthoven, Niederlande. Wir danken Ton van de Kuil, John F. Boere, Daan Leseman, Jan Boos und Jan Dormanns für ihre technische Unterstützung bei den Tierversuchen. Des Weiteren danken wir Dr. Wim Vleeming für die Bereitstellung seines Labors und seiner Ausrüstung zur Durchführung der *ex vivo* Studien am Herzen der Ratte.

Abschließend möchten die Autoren Dr. Urmila Kodavanti und Alvaro Osornio-Vargas für ihre unabhängige Bewertung der Herzschiädigung in unseren Studien danken. Wir danken Dr. Abraham Nyska vom National Institute of Environmental Health Science (Research Triangle Park, NC) für die pathologische Beurteilung der H&E-Schnitte. Des Weiteren danken wir Ursula Conrad und Irene Naleway, Abteilung für Neuro- und Verhaltenstoxikologie des MIU, für ihre technische Unterstützung bei den Kalziummessungen. Last but not least bedanken wir uns bei Dr. Katharina Beyen (IUF) für die Übersetzung dieses Berichtes aus dem Englischen ins Deutsche.

8. LITERATUR

Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, Yang JX. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 159(2):373-82, 1999.

Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol.* 20(2):131-47, 2000.

Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res.* 2(4):198-209. Review, 2001

Bagate K, Meiring JJ, Gerlofs-Nijland ME, Vincent R, Cassee FR, Borm PJA. Vascular effect of ambient particulate matter instillation in spontaneous hypertensive rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 197: 29-39, 2004a.

Bagate K, Meiring JJ, Cassee FR, Borm PJA. The effect of particulate matter on resistance and conductance vessels in rat. *Inhal. Tox.* 16: 431-436, 2004b.

Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect* 110: 1191-7, 2002.

Bayat S, Grimbert F. Experimental and clinical measurement of pulmonary edema. In: Uhlig S, Taylor A.E. eds. *Methods in Pulmonary Research.* Basel: Birkhäuser Verlag; 161-229, 1998.

Bernard A, Hermanus C, Van Houte G. Transient increase of serum Clara cell protein (CC16) after exposure to smoke. *Occup Environ Med* 54 (1):63-65, 1997.

Bickmeyer U, Weinsberg F, Müller E, Wiegand H. Blockade of voltage-operated calcium channels, increase in spontaneous catecholamine and elevation of intracellular calcium levels in bovine chromaffin cells by the plant alkaloid tetrandrine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375: 441-445, 1998.

Bond JA, Mauderly JL: Metabolism and macromolecular covalent binding of [14C]-1-nitropyrene in isolated perfused and ventilated rat lungs. *Cancer Res* 44 (9): 3924-3929, 1984.

Borm PJ, Schins RP, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int J Cancer* 110:3-14, 2004.

Borm PJA, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled Nanoparticles- potential implications for drug delivery. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology* 4: 521-531, 2004.

Bouthillier L, Vincent R, Goegan P, Adamson IY, Bjarnason S, Stewart M, Guenette J, Potvin M, Kumarathasan P. Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol* 153: 1873-84, 1998.

Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation* ; 105: 1534-36, 2002.

Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J Drug Target.* 9(4): 267-79, 2001.

- Brugada P. Residual myocardial ischaemia as a contributor to electrical instability after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 22:1845-6, 2001.
- Bunderson M, Coffin JD, Beall HD. Arsenic induces peroxynitrite generation and cyclooxygenase-2 protein expression in aortic endothelial cells: possible role in atherosclerosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 11 –18, 2002.
- Brunekreef B, Holgate ST: Air pollution and health. *Lancet* 360 (9341):1233-1242, 2002.
- Calderon-Garciduenas L; Reed W; Maronpot RR; Henriquez-Roldan C; Delgado-Chavez R; Calderon-Garciduenas A; Dragustinovis I; Franco-Lira M; Aragon-Flores M; Solt AC; Altenburg M; Torres-Jardon R; Swenberg JA. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol.* 32(6), 650-658, 2004.
- Campbell A, Oldham M, Becaria A et al. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology* 26: 133-140, 2005.
- Campen MJ, McDonald JD, Gigliotti AP, Seilkop SK, Reed MDBenson JM. Cardiovascular effects of inhaled diesel exhaust in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Toxicol.* 3:353-361, 2003.
- Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol.* 146 :180-8, 1997.
- Cassee FR, Boere AJF, Bos J, Fokkens PHB. Effects of diesel exhaust enriched concentrated PM2.5 in ozone preexposed or monocrotaline-treated rats. *Inhal Tox* 14: 721-743, 2002.
- Chan CC, Chuang KJ, Shiao GM, Lin LY: Personal exposure to submicrometer particles and heart rate variability in human subjects. *Environ Health Perspect* 112 (10): 1063-1067, 2004.
- Cheng YW, Kang JJ: Inhibition of agonist-induced vasoconstriction and impairment of endothelium-dependent vasorelaxation by extract of motorcycle exhaust particles in vitro. *J Toxicol Environ Health A.* 57(2):75-87, 1999.
- Chlopicki S, Bartus JB, Gryglewski RJ: Hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated blood-perfused rat lung; modulation by thromboxane A2, platelet-activating factor, cysteinyl leukotrienes and endothelin-1. *Pol J Pharmacol* 54 (5): 433-441, 2002.
- Curfs DM, Lutgens E, Gijbels MJ, Kockx MM, Daemen MJ, van Schooten FJ. Chronic exposure to the carcinogenic compound benzo[a]pyrene induces larger and phenotypically different atherosclerotic plaques in ApoE-knockout mice. *Am J Pathol.* 164(1):101-8, 2004.
- De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, Spacone A, Formisano S, Cocco R, Sanguinetti CM. Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. *Monaldi Arch Chest Dis.* 55(3):185-8, 2000.
- Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W: Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J Suppl.* 40: 76s-80s. 2003.
- Dick CA, Singh P, Daniels M, Evansky P, Becker S, Gilmour MI. Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter. *J Toxicol Environ Health A.* 12;66(23):2193-2207, 2003.

Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med.* 329(24):1753-9, 1993.

Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect.* 4:523-7, 2001.

Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med.* 1; 34(11):1369-82, 2003.

Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, Ghio AJ, Costa DL. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health* 50: 285-305, 1997.

Dreher KL. Particulate matter physicochemistry and toxicology: in search of causality-a critical perspective. *Inhal. Toxicology* 12 : 45-57, 2000.

Ejike JC, Arakaki LS, Beard DA, Ciesielski WA, Feigl EO, Schenkman KA. Myocardial oxygenation and adenosine release in isolated guinea pig hearts during changes in contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288 (5): H2062-7, 2005.

Emery CJ, Teng GQ, Liu X, Barer GR: Vasoreactions to acute hypoxia, whole lungs and isolated vessels compared: modulation by NO. *Respir Physiol Neurobiol*134(2): 115-129, 2003.

Ermert M, Merkle M, Mootz R, Grimminger F, Seeger W, Ermert L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L1195– L1203, 2000.

Ferin J, Oberdorster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5:535-42, 1992.

Fischbach F, Zawta B. Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. *Klin Lab.* 38:555-61, 1992.

Fisher AB, Dodia C, Chander A: Beta-adrenergic mediators increase pulmonary retention of instilled phospholipids. *J Appl Physiol* 59 (3): 743-8, 1985.

Fisher AB, Dodia C, Chander A: Energy dependence of lung phosphatidylcholine biosynthesis studied with CO hypoxia. *Am J Physiol* 249 (1 Pt 1): E89-93, 1985.

Geiser M, Schurch S, Gehr P. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *Appl Physiol.* 94(5):1793-801, 2003.

Geys J, Coenegrachts L, Vercaemmen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B, Hoet PH. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicol Lett.* 160(3): 218-226, 2006.

Ghio AJ, Devlin RB. Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 164(4):704-8, 2001.

Ghio AJ, Huang YC: Exposure to concentrated ambient particles (CAPs): a review. *Inhal Toxicol* 16 (1): 53-59, 2004.

- Ghuran AV, Camm AJ. Ischaemic heart disease presenting as arrhythmias. *Br Med Bull.* 59:193-210, 2001.
- Godleski JJ, Verrier RL, Koutrakis P, Catalano P, Coull B, Reinisch U, Lovett EG, Lawrence J, Murthy GG, Wolfson JM, Clarke RW, Nearing BD, Killingsworth C. Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. *Res Rep Health Eff Inst* 9: 5-88, 2000.
- Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 101(11):1267-73, 2000.
- Gong H Jr, Linn WS, Terrell SL, Clark KW, Geller MD, Anderson KR, Cascio WE, Sioutas C: Altered heart-rate variability in asthmatic and healthy volunteers exposed to concentrated ambient coarse particles. *Inhal Toxicol* 16 (6-7): 335-343, 2004.
- Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 6, 854–857, 1995.
- Guidot DM, Hybertson BM, Kitlowski RP, Repine JE. Inhaled NO prevents IL-1-induced neutrophil accumulation and associated acute edema in isolated rat lungs. *Am J Physiol.* 271(2 Pt 1):L225-229, 1996.
- Gumbleton M. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv Drug Deliv Rev.* 49(3):281-300, 2001.
- Habib MP, Clements NC. Effects of low-dose hydrogen peroxide in the isolated perfused rat lung. *Exp Lung Res.* 21:95-112, 1995.
- Hamoir J, Nemmar A, Halloy D, Wirth D, Vincke G, Vanderplasschen A, Nemery B, Gustin P. Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol Appl Pharmacol.* 190:278-85, 2003.
- Hearse DJ, Erol C, Robinson LA, Maxwell MP, Braimbridge MV. Particle induced coronary vasoconstriction during cardioplegic infusion. Characterization and possible mechanisms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 89, 428-38, 1985.
- Heckel K, Kiefmann R, Dorger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(4):L867-78, 2004.
- Henriksson J, Tjälve H. Manganese taken up into the CNS via the olfactory pathway in rats affects astrocytes.. *Toxicol. Sci* 55: 392-398, 2000.
- Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med.* 159(2):646-78, 1999.
- Hoek G, Dockery DW, Pope A, Neas L, Roemer W, Brunekreef B. Association between PM10 and decrements in peak expiratory flow rates in children: reanalysis of data from five panel studies. *Eur Respir J.* 11(6):1307-11, 1998.
- Hoek, G, Brunekreef, B, Goldbohm, S, Fischer, P, Van den Brandt, PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 360, 1203– 1209, 2002.

- Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 124(3): 1103-1115, 2003.
- Hulsmann AR, Raatgeep HR, den Hollander JC, Bakker WH, Saxena PR, de Jongste JC. Permeability of human isolated airways increases after hydrogen peroxide and poly-L-arginine. *Am J Respir Crit Care Med.* 153(2):841-6, 1996.
- Ibald-Mulli A, Stieber J, Wichmann HE, Koenig W, Peters A: Effect of air pollution on blood pressure : A population-Based Approach *Am J Public Health* 91: 571-577, 2001.
- Ibald-Mulli A, Timonen KL, Peters A, Heinrich J, Wolke G, Lanki T, Buzorius G, Kreyling WG, de Hartog J, Hoek G, ten Brink HM, Pekkanen J: Effects of particulate air pollution on blood pressure and heart rate in subjects with cardiovascular disease: a multicenter approach. *Environ Health Perspect* 112 (3): 369-377, 2004.
- Ikeda M, Suzuki M, Watarai K, Sagai M, Tomita T. Impairment of endothelium-dependent relaxation by diesel exhaust particles in rat thoracic aorta. *Jpn. J. Pharmacol.* 68, 183– 189, 1995.
- Kang JJ, Cheng YW. Polycyclic aromatic hydrocarbons-induced vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelium of rat aorta. *Toxicol Lett.* 93: 39-45, 1997.
- Kapp N, Kreyling W, Schulz H, Im Hof V, Gehr P, Semmler M, Geiser M. Electron energy loss spectroscopy for analysis of inhaled ultrafine particles in rat lungs. *Microsc Res Tech.* 63(5): 298-305, 2004.
- Kato T, Yashiro T, Murata Y, Herbert DC, Oshikawa K, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y. Evidence that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries. *Cell Tissue Res.* 311(1): 47-51, 2003.
- Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H: Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Meth Enzymol* 105 399-403, 1984.
- Knaapen AM, Schins RP, Steinfartz Y, Dunemann L, Borm PJ. Ambient particulate matter induce oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Inhalation Toxicol.* 12 (Suppl 3), 125– 132, 2000.
- Knaapen AM, den Hartog GJ, Bast A, Borm PJ. Ambient particulate matter induces relaxation of rat aortic rings in vitro. *Hum Exp Toxicol* 20, 259-65, 200.
- Knaapen AM, Schins RPF, Polat D, Becker A, Borm PJA. Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 234/235, 143-151, 2002a.
- Knaapen AM, Shi T, Borm PJ, Schins RP. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234/235, 317–326, 2002b.
- Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and Lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* 109: 799-809, 2004.
- Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Watkinson WP, Campen MJ, Winsett DW, Richards JR, Crissman KM, Hatch GE, Costa DL. The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular disease: evidence of exacerbated cardiopulmonary injury and oxidative stress from inhaled emission particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol* 164, 250-63, 2000.

Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Hauser R, Christiani DC, McGee J, Richards JR, Costa DL. Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J Toxicol Environ Health* 65, 1545-69, 2002a.

Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Hauser R, Christiani DC, Samet JM, McGee J, Richards JH, Costa DL. Pulmonary and systemic effects of zinc-containing emission particles in three rat strains: multiple exposure scenarios. *Toxicol Sci.* 70:73-85, 2002b.

Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R, Christiani DC, Nyska A. Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci.* 71 :237-45, 2003.

Kojda G, Noack E: Nitric oxide liberating, soluble guanylate cyclase stimulating and vasorelaxing properties of the new nitrate-compound SPM 3672. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(1): 103-11, 1993.

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 43(3): 562-71, 1999.

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdorster G, Ziesenis A. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A.* 65:1513-30, 2002.

Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN: Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect.* 113 (2): 201-206, 2005.

Lambert AL, Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Enhanced allergic sensitization by residual oil fly ash particles is mediated by soluble metal constituents. *Toxicol Appl Pharmacol.* 165: 84-93, 2000.

Leach L, Eaton BM, Westcott ED, Firth JA. Effect of histamine on endothelial permeability and structure and adhesion molecules of the paracellular junctions of perfused human placental microvessels. *Microvasc Res.* 50(3): 323-37, 1995.

Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho O, Repine AJ, Repine JE. Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L75-L80, 2000.

Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111:455– 60, 2003.

Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 (6917): 868-74, 2002.

Libby P: The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol.* 46(7): 1225-1228, 2005.

Lu YT, Hellewell PG, Evans TW: Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure. *Am J Physiol* 273 (1 Pt 1): L46-54, 1997.

- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 52: 375-414, 2000.
- Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol.* 267 (3 Pt 1): L223-41, 1994.
- Ma X, Li X.. Effects of zinc sulfate on isolated vascular smooth muscles. *Yaoxue Xuebao* 24, 786– 788, 1989.
- Ma XL, Gao F, Nelson AH, Lopez BL, Christopher TA, Yue TL, Barone FC. Oxidative inactivation of nitric oxide and endothelial dysfunction in stroke-prone spontaneous hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 879–885, 2001.
- MacKenzie A, Filippini S, Martin W. Effects of superoxide dismutase mimetics on the activity of nitric oxide in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 127, 1159-64, 1999.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 429(1-3): 195-207, 2001.
- Maguire GA, Price CP. A continuous monitoring spectrophotometric method for the measurement of angiotensin-converting enzyme in human serum. *Ann Clin Biochem.* (Pt 2): 204-10, 1985.
- Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 30, 1–26, 1995.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50, 357–358, 1998.
- Meiring JJ, Borm PJ, Bagate K, Semmler M, Seitz J, Takenaka S, Kreyling WG. The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Part Fibre Toxicol* 2 (1): 3, 2005.
- Minami M, Endo T, Hamaue N, Hirafuji M, Mori Y, Hayashi H, Sagai M, Suzuki AK. Electrocardiographic changes induced by diesel exhaust particles (DEP) in guinea pigs. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 105, 67-76, 1999.
- Moreau R, Barriere E, Tazi KA, Lardeux B, Dargere D, Urbanowicz W, Poirel O, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, Bernuau D, Lebrec D. Terlipressin inhibits in vivo aortic iNOS expression induced by lipopolysaccharide in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 36, 1070-1078, 2002.
- Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res.* 52(1):25-39, 2001.
- Mullin JM, Snock KV. Effect of Tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer Research* 50 (7): 2172-6, 1990.
- Nadel JA, Barnes PJ. Autonomic regulation of the airways. *Annu Rev Med* 35, 451-467, 1984.
- Nemmar A, Delaunois A, Nemery B, Dessy-Doize C, Beckers JF, Sulon J, Gustin P. Inflammatory effect of intratracheal instillation of ultrafine particles in the rabbit: role of C-fiber and mast cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 160(3): 250-61, 1999.

- Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:1665-1668, 2001.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105:411-414, 2002.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Dinsdale D, Smith T, Xu H, Vermeylen J, Nemery B. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir. Crit Care Med.* 166: 998-1004, 2002.
- Nemmar A, Nemery B, Hoet PH, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters: role of histamine. *Am J Respir Crit Care Med.* 168(11): 1366-72, 2003.
- Nemmar A, Hoet PH, Vermeylen J, Nemery B, Hoylaerts MF. Pharmacological stabilization of mast cells abrogates late thrombotic events induced by diesel exhaust particles in hamsters. *Circulation* 110:1670-7, 2004.
- Nemmar A, Hamoir J, Nemery B, Gustin P. Evaluation of particle translocation across the alveolo-capillary barrier in isolated perfused rabbit lung model. *Toxicology* 208(1): 105-113, 2005.
- Nikula KJ, Avila KJ, Griffith WC, Mauderly JL. Sites of particle retention and lung tissue responses to chronically inhaled diesel exhaust and coal dust in rats and cynomolgus monkeys. *Environ Health Perspect.* 105, Suppl 5: 1231-1234, 1997.
- Niven RW, Byron PR: Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. II. Effect of surfactants on absorption of fluorescein. *Pharm Res* 7(1): 8-13, 1990.
- Niven RW, Rypacek F, Byron PR: Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. III. Absorption of several peptidase-resistant, synthetic polypeptides: poly-(2-hydroxyethyl)-aspartamides. *Pharm Res* 7 (10): 990-4, 1990.
- Nolan RP, Kamath MV, Floras JS, Stanley J, Pang C, Picton P, Young QR: Heart rate variability biofeedback as a behavioral neurocardiac intervention to enhance vagal heart rate control. *Am Heart J* 149(6): 1137, 2005.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Castranova V, Boegehold MA. Particulate matter exposure impairs systemic microvascular endothelium-dependent dilation. *Environ Health Perspect.* 112(13):1299-1306, 2004.
- Oberdörster G, Galein RM, Ferin J, Weiss, B: Association of acute air pollution and acute mortality: Involvement of ultrafine particles? *Inhal. Toxicol.* 7, 111-124. 1994.
- Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 1-8, 2001.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A.* 65:1531-43, 2002.
- Oberdörster G, Utell MJ. Ultrafine Particles in the Urban Air: To the Respiratory Tract-And Beyond? *Environ Health* 110: A440-441, 2002.

- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 16: 437-45, 2004.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J: Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 113 (7): 823-839, 2005.
- Oortgiesen M, Veronesi B, Eichenbaum G, Kiser PF, Simon SA. Residual oil fly ash and charged polymers activate epithelial cells and nociceptive sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 8:L683-95, 2000.
- Osornio AR, Ossa Gómez LJ. Diagnóstico histológico temprano del infarto del miocardio por autofluorescencia. Una evaluación en humanos y en animales de experimentación. *Arch Inst Cardiol Méx,* 53: 477-483, 1983.
- Pacher P, Csordas P, Schneider T, Hajnoczky G: Quantification of calcium signal transmission from sarco-endoplasmic reticulum to the mitochondria. *J Physiol.* 529 Pt 3: 553-564, 2000.
- Pacher P, Kohegyi E, Kecskemeti V, Furst S: Current trends in the development of new antidepressants. *Curr Med Chem* 8(2): 89-100, 2001.
- Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 349:1582-7, 1997.
- Peters A, Perz S, Doring A, Stieber J, Koenig W, Wichmann HE. Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am. J. Epidemiol* 150 :1094-1098, 1999.
- Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA, Allen G, Monahan K, Dockery DW. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 11, 11-17, 2000.
- Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA: Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103 (23): 2810-2815, 2001.
- Peters A, von Klot S, Heier M, Trentinaglia I, Hormann A, Wichmann HE, Lowel H. Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Study Group. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 351(17): 1721-30, 2004.
- Pope CA, III, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas GM, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am.Heart J.* 138: 890-899, 1999.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287(9): 1132-41, 2002.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation.* 109: 71-7, 2004.
- Prasad K, Lee P, Kalra J. Influence of endothelin on cardiovascular function, oxygen free radicals, and blood chemistry. *Am Heart J.* 121: 178-87, 1991.
- Rahman I, Mulier B, Gilmour PS, Watchorn T, Donaldson K, Jeffery PK, MacNee W. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. *Biochem Pharmacol.* 62(6): 787-94, 2001.

- Rich KE, Petkau J, Vedal S, Brauer M: A case-crossover analysis of particulate air pollution and cardiac arrhythmia in patients with implantable cardioverter defibrillators. *Inhal Toxicol.* 16 (6-7): 363-72, 2004.
- Royston BD, Webster NR, Nunn JF. Time course of changes in lung permeability and edema in the rat exposed to 100 % oxygen. *J.Appl. Physiol.* 69:1532-1537, 1990.
- Russell PC, Wright CE, Barer GR; Howard P: Histamine induced pulmonary vasodilatation in the rat: site of action and changes in chronic hypoxia. *Eur Respir J* 7(6): 1138-44, 1994.
- Safar M, Chamiot-Clerc P, Dagher G, Renaud JF. Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38, 1416– 142, 2001.
- Sakakibara M, Minami M, Endo T, Hirafuji M, Murakami S, Mori Y, Sagai M. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP) on isolated cardiac muscle of guinea pigs. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 86 : 99-110, 1994.
- Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 159(3):702-9, 1999.
- Samet JM, Ghio AJ, Costa DL, Madden MC. Increased expression of cyclooxygenase 2 mediates oil fly ash-induced lung injury. *Exp Lung Res.* 26:57-69, 2000.
- Sandoval R, Malik AB, Naqvi T, Mehta D, Tiruppathi C. Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280(2):L239-47, 2001.
- Schaumann F, Borm PJ, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RP, Luettig B, Hohlfeld JM, Heinrich J, Krug N. Metal-rich Ambient Particles (PM_{2.5}) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 170(8):898-903, 2004.
- Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol.* 195(1):1-11, 2004.
- Schorderet, M., et al. Pharmacologie, Des Aspects Fondamentaux Aux Applications Therapeutiques. Frison-Roche Slatkine, Paris, 1992.
- Schultz G, Böhme E: Guanylate cyclase. In: Bermeyer, H.U.(Ed.) *Methods of Enzymatic Analysis.* Verlag Chemie, Weinheim, pp.379 –389, 1984.
- Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G, Lorell BH. Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circ Res.* Mar;76(3):489-97, 1995.
- Schwartz J, Morris R. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am J Epidemiol.* 142: 23-35, 1995.
- Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345: 176–78, 1995.
- Sibille Y, Marchandise FX: Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur Respir J* 6(10):1529-1543, 1993.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using icinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85, 1985.

Smith KR, Aust AE. Mobilization of iron from urban particulates leads to generation of reactive oxygen species in vitro and induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 828–834, 1997.

Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F, Donaldson K. Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J.* 15:297-303, 2000.

Strieter RM, Lukacz NW, Standiford TJ, Kunkel SL: Cytokines. 2. Cytokines and lung inflammation: mechanisms of neutrophil recruitment to the lung. *Thorax* 48(7): 765-769, 1993.

Sugiyama S, Kugiyama K, Ohgushi M, Matsumura T, Ota Y, Doi H, Ogata N, Oka H, Yasue H. Supersensitivity of atherosclerotic artery to constrictor effect of cigarette smoke extract. *Cardiovasc. Res.* 38, 508–515, 1998.

Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 39(6): 935-42, 2002.

Szalai G, Csordas G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnoczky G: Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem* 275(20):15305-13, 2000.

Tunnicliffe WS, Hilton MF, Harrison RM, Ayres JG. The effect of sulphur dioxide exposure on indices of heart rate variability in normal and asthmatic adults. *Eur Respir J.* 17(4): 604-608, 2001.

Tzeng HP, Yang RS, Ueng TH, Lin-Shiau SY, Liu SH. Motorcycle exhaust particulates enhance vasoconstriction in organ culture of rat aortas and involve reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 75, 66–73, 2003.

Uhlig S: The isolated perfused lung. In: Uhlig S, Taylor AE (Hrsg.): *Methods in Pulmonary Research*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, S.29-55, 1998.

Urch B, Brook JR, Wasserstein D, Brook RD, Rajagopalan S, Corey P, Silverman F: Relative contributions of PM_{2.5} chemical constituents to acute arterial vasoconstriction in humans. *Inhal Toxicol.* 16 (6-7): 345-52, 2004.

Valentin JP, Hoffmann P, De Clerck F, Hammond TG, Hondeghem L: Review of the predictive value of the Langendorff heart model (Screenit system) in assessing the proarrhythmic potential of drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49(3): 171-181, 2004.

Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). *Am J Respir Crit Care Med* 164, 826-30, 2001.

van Maanen JM, Borm PJ, Knaapen A, van Herwijnen M, Schilderman PA, Smith KR, Aust AE, Tomatis M, Fubini B. In vitro effects of coal fly ashes: hydroxyl radical generation, iron release, and DNA damage and toxicity in rat lung epithelial cells. *Inhalation Toxicol.* 11, 1123– 1141, 1999.

Vass Z, Brechtelsbauer PB, Nuttall AL, Miller JM. Nitric oxide mediates capsaicin-induced increase in cochlear blood flow. *Heart Res.* 100, 114– 119, 1996.

- Vedal S, Rich K, Brauer M, White R, Petkau J: Air pollution and cardiac arrhythmias in patients with implantable cardioverter defibrillators. *Inhal Toxicol.* 16 (6-7): 353-62. 2004.
- Veronesi B, Oortgiesen M, Carter JD, Devlin RB. Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human, bronchial epithelial cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 106– 115, 1999.
- Veronesi B, Oortgiesen M, Roy J, Carter JD, Simon SA, Gavett SH. Vanilloid (capsaicin) receptors influence inflammatory sensitivity in response to particulate matter. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 66– 76, 2000.
- Vincent R, Bjarnason SG, Adamason IYR, Hedgecock C, Kumurathasan P, Guenette J, Potvin M, Goegan P, Bouthillier L. Acute pulmonary toxicity of urban particulate matter and ozone. *Am J Physiol* 151: 1564-1570, 1997.
- Vincent R, Kumurathasan P, Goegan P, Bjarnason SG, Guenette J, Bertube D, Adamason IY, Desjardins S, Burnett RT, Miller FJ, Battistini B. Inhalation toxicology of urban ambient particulate matter: acute cardiovascular effects in rats. *Res Rep Health Eff Inst.* 104: 5-62, 2001.
- Vork MM, Glatz JF, Surtel DA, Van der Vusse GJ: Release of fatty acid binding protein and lactate dehydrogenase from isolated rat heart during normoxia, low-flow ischemia, and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 71(12): 952-858, 1993.
- Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39, 163–196, 1987.
- Watkinson WP, Campen MJ, Nolan JP, Costa DL. Cardiovascular and systemic responses to inhaled pollutants in rodents: effects of ozone and particulate matter. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 4), 539– 546, 2001.
- Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radical Biol. Med.* 31, 1360– 1367, 2001.
- WHO: Health Risk of Particulate Matter from Long range transboundary Air Pollution. World health Organization, De Bilt (NL), pp. 56, 1999.
- Wichers LB, Nolan JP, Winsett DW, Ledbetter AD, Kodavanti UP, Schladweiler MC, Costa DL, Watkinson WP. Effects of instilled combustion-derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part I: Cardiovascular responses. *Inhal Toxicol.* 16: 391-405, 2004.
- Wichmann HE, Spix C, Tuch T, Wolke G, Peters A, Heinrich J, Kreyling WG, Heyder J. Daily mortality and fine and ultrafine particles in erfurt, germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst.* 98: 5-86; discussion 87-94, 2000.
- Widdicombe JG. Neural pathways in allergy and asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 16(1): 23-30, 2003.
- Wilkes S, Evans A. A cross-sectional study comparing the motivation for smoking cessation in apparently healthy patients who smoke to those who smoke and have ischaemic heart disease, hypertension or diabetes. *Fam. Pract.* 16, 608– 610, 1999.
- Yang WM, Shen ZQ, Chen ZH, Li L, Peng F, Liu WP. Effect of copper aspirinate on contraction of isolated rabbit aorta strips. *Acta Pharmacol.* 22, 121– 124, 2001.

Yang ZW, Gebrewold A, Nowakowski M, Altura BT, Altura BM. Mg(2+)-induced endothelium-dependent relaxation of blood vessels and blood pressure lowering: role of NO. *Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* 278, R628–R6239, 2000.

Yeon D, Kwon S, Lee Y, Leem J, Nam T, Ahn D. Capsaicin-induced relaxation in rabbit coronary artery. *J. Vet. Med. Sci.* 63 (5): 499-503, 2001.