

Lehrstuhl für Analytische Chemie der TU München,
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
und
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg,
Institut für Toxikologie

Wirkung ultrafeiner Modellpartikel auf das isolierte Langendorff-Herz von Meerschweinchen

Roman Radykewicz

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher, i. R.

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

Die Dissertation wurde am 27 Juni 2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22 August 2007 angenommen.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. R. Nießner danke ich sehr herzlich für die Vertretung meiner Arbeit an der Technischen Universität München. Seine guten Ratschläge, sowie seine tief greifenden Kenntnisse der Materie haben mir geholfen, auch in schwierigen Situationen den roten Faden bei der Erstellung dieser Arbeit nicht zu verlieren.

Weiter möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. M. Göttlicher, Leiter des Instituts für Toxikologie der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH), für die in seinem Institut gewährten Arbeitsmöglichkeiten meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Phys A. Stampfl für dieses brandaktuelle und sehr interessante Thema. Ebenso dankbar bin ich für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen. Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, Frau M. Ellendorff und Frau H. Ferron, für Rat und Tat bei der experimentellen Durchführung und Auswertung.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H. Schulz und Herrn Dr. W. Kreyling (Institut für Inhalations Biologie) für die Überlassung der ultrafeinen Modellpartikel. Sowie Dr. Andreas Stocker aus dem Institut für Ökologische Chemie der GSF für die HPLC-Messungen der Katecholamine. Des weiteren gilt mein Dank Dr. P. Reitmeir (Institut für Gesundheitsökonomie der GSF) für die statistische Auswertung und Dr. G. Matuschek (Institut für Ökologische Chemie der GSF) für die Überlassung der Daten der Staubprobenanalysen.

Abschließend danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Toxikologie der GSF für die geleistete Hilfe und die freundliche Aufnahme, sowie das angenehme Arbeitsklima.

1. Einleitung	1
1.1. Schwebstoffe sind Luftverschmutzung	1
1.2. Definition ultrafeiner Teilchen	2
1.3. Erfolge der Umweltpolitik	2
1.4. Partikeldeposition im Respirationstrakt	4
1.5. Epidemiologische Zusammenhänge	5
1.6. Ziel dieser Arbeit	8
1.7. Überlegungen zur Modellpartikelwahl	9
1.8. Die Wahl des Modellorganismus	12
1.9. Das Herz	13
1.9.1. Die Herzkranzgefäße	13
1.9.2. Die Phasen der Herzaktion (Herzzyklus)	14
1.9.3. Das Reizleitungssystem	15
1.9.4. Das elektrische Signal der Reizleitung	17
1.9.5. Die Messbarkeit der Reizleitung	18
1.9.6. Der EKG-Aufbau	18
1.9.7. Die EKG-Ableitung	20
1.10. Datenaufnahmeprogramme	21
1.10.1. Labview	22
1.10.2. Powerlab	23
1.11. Katecholamine	26
1.12. Vergleich Partikelsuspensionen - umweltrelevante Partikelexpositionen	27
1.12.1. Abschätzung der Belastung nach Masse des EU-Grenzwerts	27
1.12.2. Abschätzung der realen Belastung mit gemessenen Partikelzahlen	29
1.12.3. Grenzen der Abschätzungen	30
2. Ergebnisse	31
2.1. Größenverteilung suspendierter Partikel	31
2.1.1. Herstellung einer ultrafeinen Partikelsuspension	31
2.1.2. Abschätzung der Partikelanzahl	32
2.1.3. Erstellung der Kalibrierkurve	37
2.2. Der Aufbau der modifizierten Langendorff-Apparatur	40
2.2.1. Die Lichtschranke für die Nachfüllautomatik	41
2.2.2. Der Tropfenzähler	42
2.2.3. Die Schaumbremse	42

2.3.	Datenverarbeitung mit Labview	43
2.3.1.	Datenerfassungsprogramm	43
2.3.2.	Herzfrequenzberechnungsprogramme	47
2.3.3.	Sonstige (eigene) Hilfsprogramme	53
2.4.	Auswertung der Langendorff-Experimente	54
2.4.1.	Einfluss der Modellpartikel auf die Herzfrequenz	56
2.4.2.	Materialabhängige Betrachtung der Herzfrequenzänderungen	62
2.4.3.	Arrhythmien	64
2.5.	Katecholamine	67
2.6.	Das Zetapotential	70
3.	Diskussion	71
3.1.	Langendorff-System	71
3.2.	Die verschiedenen Parameter des EKG	72
3.2.1.	Die Herzfrequenz	72
3.2.2.	Arrhythmien	74
3.3.	Katecholamine	76
3.4.	Messungen des Zetapotentials	77
3.5.	Vergleich zwischen Teilchenanzahl und Teilchenoberfläche	80
3.6.	Verschiedene Wirkorte der Partikel	84
4.	Zusammenfassung	85
5.	Verwendete Abkürzungen:	86
6.	Material & Methoden	88
6.1.	Geräte	88
6.2.	Material	89
6.2.1.	Chemikalien	90
6.3.	Lösungen	91
6.3.1.	Krebs- Henseleit-Bicarbonat (KHB)-Puffer	91
6.3.2.	Herzperfusionslösung	92
6.3.3.	Phosphate buffered saline (PBS)-Puffer (pH 7,4)	92
6.3.4.	Heparin Stamm-Lösung	92
6.3.5.	Natriumdisulfit-Lösung	93
6.4.	Methoden	93
6.4.1.	Partikelsuspension	93

6.4.2.	Vorbereitung der Langendorff-Apparatur	93
6.4.3.	Herzpräparation	94
6.5.	Modellsystem Langendorff-Herz	96
6.5.1.	Versuchsablauf	97
6.6.	Analyse von Katecholaminen aus Blut und Perfusionslösungen	100
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	103

1. Einleitung

Saubere Luft ist für uns alle sehr wichtig und daher ein schützenswertes Gut. Durch die Industrialisierung ist dieses gefährdet. Laut WHO (World Health Organisation) [WHO 14. April 2005 Berlin] sterben weltweit jährlich zwei Millionen Menschen an den Folgen der Luftverschmutzung.

1.1. Schwebstoffe sind Luftverschmutzung

Die Luftschadstoffe setzen sich hauptsächlich aus Schwefeldioxid, Stickoxiden, Ozon und Schwebstaub zusammen. Der Staub wird entweder nach Größe oder Staubart geordnet (Abb. 1). Der Größe nach wird er in Grobstaub, Feinstaub und ultrafeine Teilchen unterteilt.

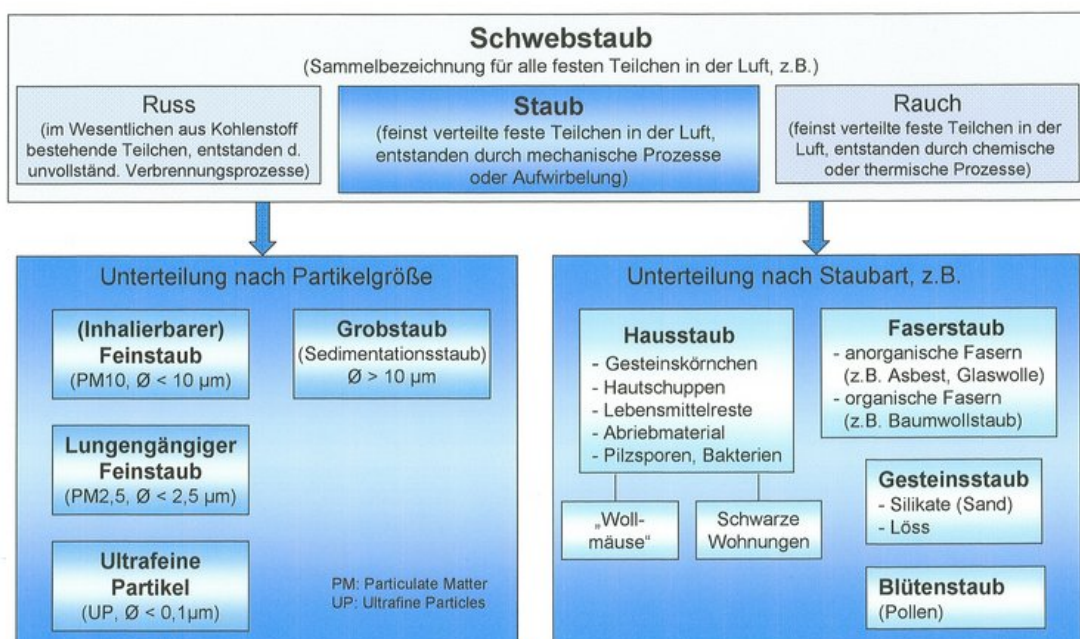


Abb. 1: Aufteilung der festen Luftverschmutzungsbestandteile, nach Partikelgröße (links) und nach Staubart (rechts); [© Wikipedia Bild-GFDL]

Die Staubart wird entweder nach der Herkunft (z.B. Haus-, Industrie- und Erosionsstaub), dem Inhalt (organisch und anorganisch) oder der Form (z.B. Faserstaub) unterschieden. Staub beinhaltet auch wasserlösliche Teilchen und feste Partikel, die an ihrer Oberfläche lösliche Substanzen gebunden haben (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie z.B. Benzole).

Die wichtigsten ortsfesten Quellen sind Verbrennungsanlagen zur Energiegewinnung, Abfallverbrennung, Hausbrand und Industrieprozesse (z.B. Stahlerzeugung und Sinteranlagen). Zu den mobilen Hauptquellen zählen vor allem die Abgase des Straßenverkehrs, aber auch der Abrieb von Bremsbelägen, Reifen und Kupplungsbelägen [Umweltbundesamt 2005].

1.2. Definition ultrafeiner Teilchen

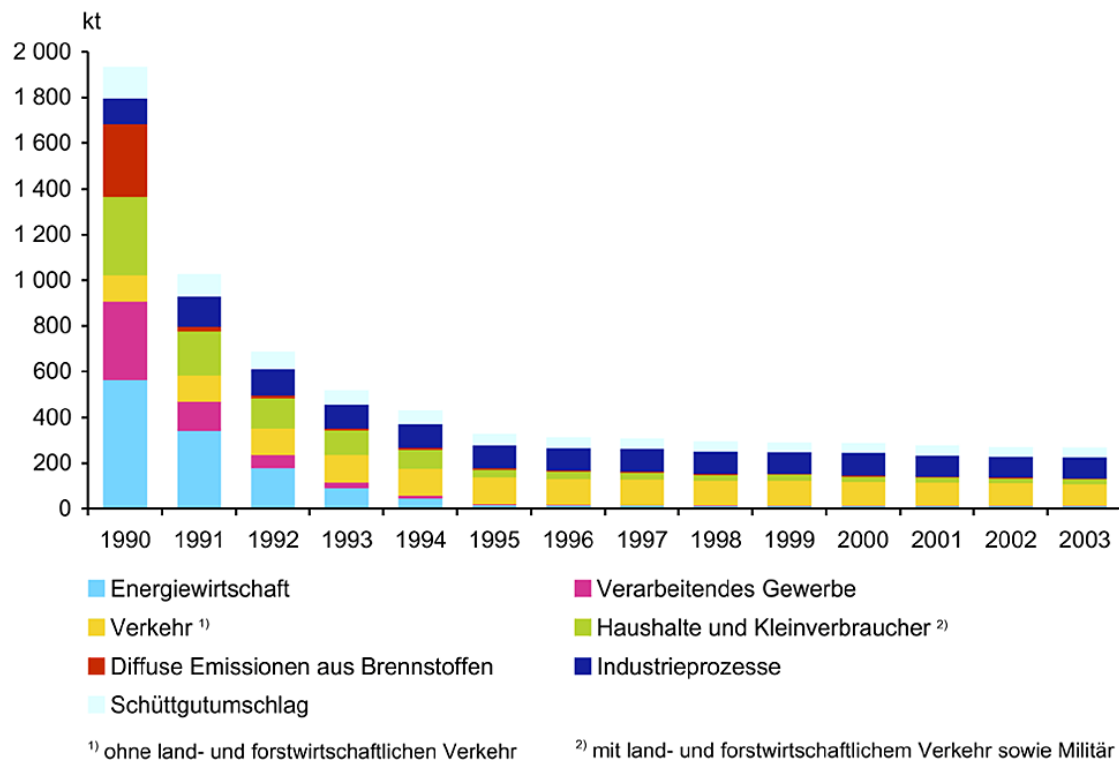
Als ultrafeine Teilchen (UFT) werden Partikel bezeichnet, deren aerodynamischer Durchmesser kleiner als 100 nm ist.

Die künstlich hergestellten ultrafeinen Teilchen der Nanotechnologie, „Nanoteilchen“ genannt, fallen zum Teil auch in diese Kategorie. Damit auch Nanotubes (Röhrchen mit einem Durchmesser bis zu 100 nm, aber variabler Länge größer 100 nm) in diese Gruppe mit einbezogen werden können, wurde die Definition der Nanoteilchen dahingehend geändert, dass nur noch eine Dimension unter 100 nm sein muss [Oberdörster G. et al. 2005].

1.3. Erfolge der Umweltpolitik

Mit verschiedenen Methoden wurde im Lauf der letzten Jahre der Schadstoffausstoß drastisch reduziert. Wie die Grafik (Abb. 2) des Umweltbundesamtes Deutschlands zeigt, wurde der Gesamtmassenausstoß an Schwebstaub innerhalb von 13 Jahren auf fast ein Zehntel gesenkt.

Staub-Emissionen in Deutschland nach Quellgruppen



Quelle: Umweltbundesamt 2005 – eigene Zusammenstellungen

Abb. 2: Ausstoß an Staub in Deutschland in kt/Jahr; [© 2005 Umweltbundesamt]

Bei den Maßnahmen zur Schadstoffreduktion wird allerdings nur die Gesamtmasse aller Partikel, nicht aber deren Qualität berücksichtigt. Es wird weder der Größe, der chemischen Zusammensetzung noch der Form der einzelnen Partikel Rechnung getragen.

Wie sich Prof. Dr. J. Heyder gegenüber der Zeitung „Die Zeit“ [Schuh H. 04.05.2005] zur Diskussion der Feinstaubproblematik geäußert hat, wird bei den Maßnahmen zur Schadstoffreduktion der falsche Schwerpunkt gesetzt:

„Ein Partikel von 8 Mikrometer Durchmesser wiegt genauso viel und wäre nach dem heutigen Massestandard genauso gefährlich wie 512 Millionen ultrafeine Partikel mit 0,01 Mikrometern.“

Obwohl der Gesamtmassenausstoß an Staub in Deutschland stark reduziert wurde, ist trotzdem die absolute durch den Verkehr ausgestoßene Gesamtmasse seit 1995,

wie zu sehen in der Grafik (Abb. 2), weitgehend gleich geblieben.

Eine Studie des Euro IV Motors im Vergleich zum Euro III zeigt eine deutliche Reduktion der Gesamtmasse bei gleichzeitiger Verschiebung des Maximums der gezählten Partikel hin zu kleineren Teilchen [Jacob E. et al. 2003]. Trotzdem bleibt der Euro IV Motor bei der Anzahl der ultrafeinen Teilchen unter dem Ausstoß eines Euro III Motors.

Der Verbesserung der einzelnen Motoren wird hier durch eine Erhöhung der zugelassenen Fahrzeuge (Statistisches Bundesamt Deutschland: Anstieg ca. 500 000 pro Jahr) entgegengewirkt.

Da der einzelne Motor eine deutlich geringere Staubemission aufweist, aber auch kleinere Teilchen emittiert, ergibt sich bei einem insgesamt gleich bleibenden Gesamtausstoß eine stark ansteigende Zahl an ultrafeinen Teilchen.

1.4. Partikeldeposition im Respirationstrakt

Beim Atmen gelangt auch Staub in die Atemwege. Er dringt je nach Größe unterschiedlich weit in die Lunge ein (Abb. 3). Die Belastung ist abhängig von der Staubablagerung in der Lunge. In der Abbildung sind Eindringtiefe und Deposition nebeneinander gestellt. Die einzelnen Farben bedeuten:

Grün: In den oberen Atemwegen und der Luftröhre bleiben vorwiegend große Partikel hängen. Sie werden meist abgehustet.

Gelb: In die großen Bronchialäste gelangen weniger Partikel, auch hier werden überwiegend große Teilchen abgelagert.

Blau: In den feineren Lungenästen nimmt der Anteil der ultrafeinen Partikel deutlich zu.

Rot: In den feinsten Verästelungen und in den Lungenbläschen findet sich die größte Partikelfracht. Dabei dominieren die ultrafeinen Partikel. Aus den Lungenbläschen können Partikel ins Gewebe und sogar in die Blutbahn eindringen.

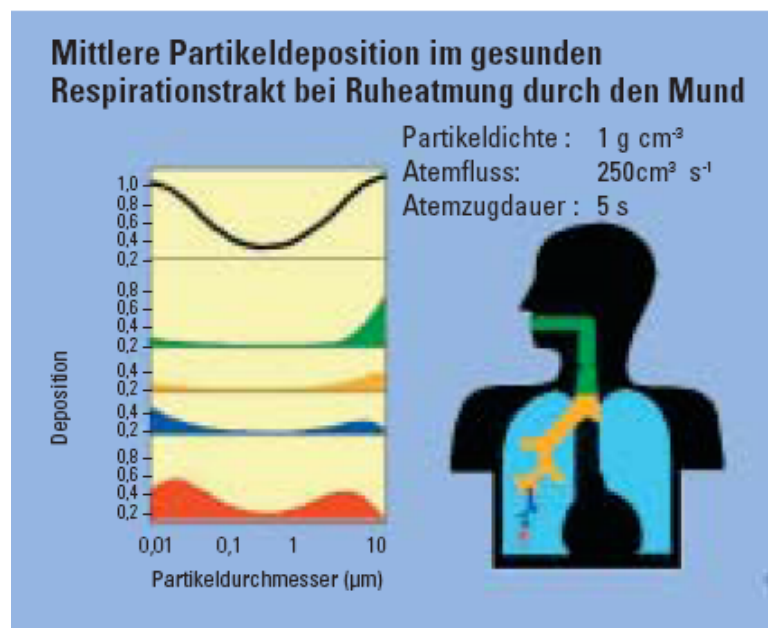


Abb. 3: Partikeleindringtiefe in Abhängigkeit der Teilchengröße; [© Prof. Dr. J. Heyder GSF]

1.5. Epidemiologische Zusammenhänge

Der schädliche Einfluss der Staubbelastung auf die Gesundheit konnte in mehreren epidemiologischen Studien belegt werden. Im Folgenden werden die Probleme an drei beispielhaften Studien verdeutlicht.

Als das Stahlwerk in Utah Valley Ende der 80er Jahre vorübergehend geschlossen wurde, ging die Staubbelastung in der Region um die Hälfte zurück. Nach der Wiedereröffnung stieg die Belastung wieder an. Während der Stilllegung sanken die Krankenhauseinweisungen auf ein Drittel ab. Nach Wiederaufnahme des Betriebs stiegen diese wieder ungefähr auf den vorhergehenden Wert an. [Pope CA. 3rd 1989].

Eine Studie in Erfurt im Winter 1991/1992 zeigte, dass bei Probanden an Tagen mit erhöhten Konzentrationen an feinen Teilchen und UFT eine Verminderung der Lungenfunktion festgestellt werden konnte. Diese Beeinträchtigung korrelierte jedoch nicht mit Teilchen größer $0,5 \mu\text{m}$, sondern die Symptome hingen stärker mit der Anzahl der ultrafeinen Partikel zusammen als mit der Masse der feinen Teilchen [Peters A. et al. 1997].

In der ULTRA Studie, die in Erfurt, Finnland und den Niederlanden durchgeführt wurde, ergab sich eine Abhängigkeit der Mortalität bei Herz-Kreislauf- und Lungenerkrankungen mit ultrafeinen und feinen Teilchen. Es zeigte sich eine mittlere Verzögerung zwischen UFT-Belastung und erhöhter Todesursache durch Atemwegserkrankungen von einem Tag und bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen von vier Tagen [Ibald-Mulli A. et al. 2002].

Zum besseren Verständnis dieser epidemiologischen Zusammenhänge wurden vielfältige Untersuchungen an Probanden und Tieren vorgenommen.

Zum Beispiel traten bei Ratten, die mit gesammelten Staubproben aus dem Utah Valley Stahlwerk instilliert wurden, Entzündungen in der Lunge auf. Zusätzlich trat bei 50 % der Tiere eine erhöhte Empfindlichkeit für Acetylcholin auf [Dye JA. et al. 2001].

Bei Experimenten mit Probanden, die ebenso mit diesen Proben instilliert wurden, fand man verschiedenartige Entzündungseffekte in den tieferen Lungenschichten. Unterschiede in der Wirkung von Staubproben aus der Zeit, während das Stahlwerk geöffnet war, zu denen aus dem Schließungszeitraum, wiesen darauf hin, dass die Zusammensetzung des Staubes eine relevante Rolle spielte [Ghio AJ. 2004].

Bei Tierexperimenten, die das Herz-Kreislaufsystem von alten Mäusen als Schwerpunkt hatten, wurde festgestellt, dass die Herzfrequenz nach Inhalation von elementarem Kohlenstoffstaub signifikant sank [Tankersley CG. et al. 2004].

Die oben genannten Studien zeigen, dass Staub eine gesundheitsschädigende Wirkung auf die Lunge und das Herz-Kreislaufsystem hat. Dabei hat die Anzahl der Teilchen eine größere Bedeutung als ihre Masse. Ebenso scheint das Material der Teilchen eine Rolle zu spielen, wobei selbst reiner Kohlenstoff bereits eine Wirkung entfaltet.

Trotz dieser Studien ist noch unklar, wie diese Wirkung der UFT auf das Herz zustande kommt.

Die drei wahrscheinlichsten Hauptursachen für kardiovaskuläre Erkrankungen können Entzündungen in der Lunge, metabolische Reaktionen, vor allem in der Leber, oder direkte Effekte am Herzen sein [Donaldson K. et al. 2004].

In mehreren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass eingeatmete UFT zum Teil in der Lunge verbleiben und ein Teil der dort abgelagerten Teilchen auch in die Blutbahn gelangt. Hierbei spricht man von Translokation der Teilchen. Über den prozentualen Anteil der translozierten Teilchen werden sehr unterschiedliche Angaben gemacht. Diese reichen von 0,5 %, 1-2 % und 7 % bis maximal 50 %. Die UFT sind auch in den verschiedenen Zielorganen wie Herz, Leber und Gehirn nachweisbar [Oberdörster G. et al. 2002, Brown JS. et al. 2002, Nemmar A. et al. 2001, Kreyling W.G. et al. 2002].

Neben der Frage, wie gut ultrafeine Teilchen das Lungenepithel durchdringen können, ist es ebenso wichtig zu klären, wie lange die Teilchen im Körper verweilen. Untersuchungen mit ultrafeinen Iridium-Partikeln zeigten eine lange biologische Halbwertszeit. Diese lag bei $98 (\pm 6,7)$ Tagen [Semmler M. et al. 2004].

Dies bedeutet, dass es in Regionen mit hoher Teilchenzahlbelastung (100 000 Partikel/Kubikzentimeter) [Stephenson T. 2006] auch bei niedrigen Translokationsraten auf Grund der langen Verweildauer im Körper (low clearance) zu einer starken Belastung der inneren Organe kommen kann.

1.6. Ziel dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die vermehrten Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die Epidemiologen mit einer erhöhten Belastung durch ultrafeine Partikel korrelieren konnten, durch eine direkte Wirkung von UFP auf das Herz erklärt werden können.

Dazu soll der Einfluss von verschiedenen ultrafeinen Modellpartikeln, die sich nur in wenigen physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden, in mehreren Konzentrationen auf das isolierte Herz untersucht werden.

Auf den Zeitverlauf der Herzfrequenz und pathologische Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) soll besonderes Augenmerk gelegt werden.

1.7. Überlegungen zur Modellpartikelwahl

Die Arbeit von Ghio AJ. 2004 zeigte, dass die Zusammensetzung der UFT von Bedeutung ist. Deswegen wurden Modellpartikel mit definierter Größe und ohne, bzw. mit geringen Verunreinigungen an der Oberfläche gewählt, damit eine eventuell auftretende Wirkung von möglichst wenigen Parametern abhängt. Bei der Verwendung von Umweltstäuben können noch viele weitere Reaktionen durch an der Oberfläche gebundene, eventuell lösliche Substanzen, wie z.B. Schwermetalle, Benzole oder andere organische Verbindungen, hervorgerufen werden [Donaldson K. et al. 2001].

Die Vielfältigkeit der Zusammensetzung ist beispielhaft an den in Hettstett gesammelten Staubproben (Tabellen 1 und 2) dargestellt. Die Messungen für die Tabellen 1 und 2 wurden von Dr. G. Matuschek vom Institut für Ökologische Chemie der GSF mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), optischer Emissionsspektrometrie (OES) und Ionenchromatographie (IC) durchgeführt. Hierbei ist aber zu bedenken, dass es durch die Aufarbeitung zu Verfälschungen kommen kann [Wittmaack K. et al. 2005]. Die Proben wurden mit einem Impaktor gesammelt und später mittels Ultraschall wieder vom Filter in wässrige Suspensionen überführt.

Von einigen dieser Elemente sind schädliche Einflüsse auf das Herz bekannt. Die Metalle Arsen, Blei und Cadmium wirken z.B. auf das Myokard. Arsen führt zu Mikrofragmentierung der Myokardfasern, Blei wirkt auf die Koronargefäße und Cadmium vermindert die Kontraktionskraft des Herzens indem der Calciumeinstrom gehemmt wird.

Cadmium und Blei schädigen auch speziell das System der Erregungsbildung und Erregungsleitung, dabei hemmt Cadmium die Erregungsleitung im AV-Knoten [Greim H. 1996].

Element (Messmethode)	Konzentration [ng/100µg]
Al (ICP-MS)	68,8
As (ICP-MS)	4,92
B (OES)	172
Ba (ICP-MS)	16,0
Ca (OES)	495
Cd (ICP-MS)	3,68
Cr (ICP-MS)	2,89
Cu (ICP-MS)	153,4
Fe (ICP-MS)	148,6
K (ICP-MS)	1359
Mg (ICP-MS)	338,7
Mn (ICP-MS)	13,86
Mo (ICP-MS)	2,81
Na (ICP-MS)	3221
Ni (ICP-MS)	14,9
Pb (ICP-MS)	75,4
Sb (ICP-MS)	4,57
Se (ICP-MS)	3,32
Sn (ICP-MS)	1,93
V (ICP-MS)	10,27
Zn (ICP-MS)	538
F ⁻ (IC)	48,1
Cl ⁻ (IC)	3185
SO ₄ ²⁻ (IC)	26264
NO ₃ ⁻ (IC)	19208
PO ₄ ³⁻ (IC)	123
Li ⁺ (IC)	12,9
Na ⁺ (IC)	3386
NH ₄ ⁺ (IC)	7497
K ⁺ (IC)	1357
Mg ²⁺ (IC)	318
Ca ²⁺ (IC)	254

Tab.1: Liste der, in der Staubprobe aus Hettstett am häufigsten gefundenen Stoffe
[Dr. G. Matuschek GSF unveröffentlichte Daten nach persönlicher Korrespondenz]

Stoffname	Konzentration [ng/ml]
Naphthalin	31,12
Fluoren	2,16
Phenanthren	18,12
Anthracen	2,95
Pyren	33,62
Benz[a]anthracen	14,95
Chrysen	23,57
Benzo[b]fluoranthen	32,72
Benzo[k]fluoranthen	16,51
Benzo[a]pyren	22,35
Dibenz[a,]anthracen	2,02
Benzo[g,h,i]perylen	32,82
Indeno[1,23-cd]pyren	26,56

Tab. 2: Organische Kohlenstoffverbindungen, die im Hettstettstaub nachgewiesen werden konnten [Dr. G. Matuschek GSF unveröffentlichte Daten nach persönlicher Korrespondenz]

Wenn die Arbeitshypothese richtig ist, dass ultrafeine Teilchen per se Einfluss auf das kardiovaskuläre System haben, sollte die Wirkung von der Anzahl der Partikel und eventuell von der Partikelgröße, der Oberfläche und dem Partikelmaterial abhängig sein [Oberdörster G. 1996]. Die verwendeten Modellpartikel stammten jeweils aus einer Charge und waren in ausreichender Menge vorhanden.

Als Modellpartikel wurde zunächst Printex 90 (P 90) verwendet, ein anorganischer Kohlenstoffpartikel mit einem primären Teilchendurchmesser von 14 nm, das einen äußerst geringen organischen Kohlenstoffanteil (<1 %) hat. Dadurch unterscheidet es sich von in der Luft vorhandenen Kohlenstoffteilchen, an denen immer organische Rückstände gebunden sind, die durch eine unvollständige Verbrennung entstehen.

Weiterhin wurde dann die Wirkung von Titandioxid (TiO₂) und Siliziumdioxid (SiO₂) untersucht.

Diese Modellpartikel unterscheiden sich von Printex 90 nicht nur im Material, sondern auch in der Primärpartikelgröße. Sie haben einen um ca. 7 nm größeren (TiO_2) bzw. kleineren (SiO_2) Durchmesser.

Des Weiteren hat SiO_2 eine fast doppelt so große spezifische Oberfläche und TiO_2 nur ein Fünftel der spezifischen Oberfläche von Printex 90.

In der folgenden Tabelle sind die physikalischen Parameter der verwendeten Modellpartikel zusammengefasst.

Name	primärer Teilchendurchmesser [nm]	spezifische Oberfläche [m^2/g]	Dichte [g/cm^3]
SiO_2	7	400	2,32
Printex 90	14	272	1,6
TiO_2	20	50	4,26

Tab. 3: Parameter der verwendeten ultrafeinen Modellpartikel

1.8. Die Wahl des Modellorganismus

Für die Untersuchungen wurden isolierte Herzen von Meerschweinchen verwendet.

Diese haben große Vorteile:

Die Größe der Herzen von Meerschweinchen und Ratten erleichtert im Vergleich zu Mäuseherzen die Präparation, das Anbringen der Perfusionskanüle und der EKG-Elektroden.

Auf Grund intensiver Studien im pharmakologischen Bereich ist es möglich, am Meerschweinchen gewonnene Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen. Dabei ist trotzdem zu beachten, dass Unterschiede bestehen. Das Meerschweinchenherz hat zum Beispiel im Gegensatz zum menschlichen Herzen keinen schnellen Kaliumkanal (I_{to} = „transient outward“ Strom) für die frühe Repolarisation. An dieser Stelle haben Meerschweinchen nur die Kaliumkanäle I_{Kr} und I_{Ks} (delayed rectifier Kaliumkanäle) [Zwermann L. 2005]. Der schnelle Kaliumkanal ist beim Menschen, zu Beginn der Repolarisation, nur kurz aktiv. Seine Funktion wird beim Meerschweinchen von den anderen Kanälen übernommen.

Trotz dieser Unterschiede ist das Elektrokardiogramm (EKG) des Meerschweinchens dem des Menschen sehr ähnlich. Im Gegensatz zu anderen Nagern besitzt es eine ST-Strecke, d.h. die T-Welle folgt nicht direkt auf den QRS-Komplex. Für spätere Versuche an der Ratte muss dies bei einem Vergleich der durch UFT hervorgerufenen EKG-Änderungen berücksichtigt werden.

1.9. Das Herz

Im Mittelpunkt des Blutkreislaufs steht das Herz als Pumpe, die für den Transport des sauerstoffreichen Blutes in den Körper und den Rücktransport des sauerstoffarmen Blutes zur Lunge sorgt.

Man kann das Herz in zwei funktionelle Teile gliedern, das rechte und das linke Herz. Rechtes und linkes Herz bestehen jeweils aus Vorhof und Kammer.

Das sauerstoffarme, venöse Blut gelangt über die obere und untere Hohlvene in den rechten Vorhof (Atria). Die rechte Kammer (rechter Ventrikel) leitet das Blut aus dem rechten Vorhof, von dem sie durch eine Herzklappe (Valva atrioventricularis dextra) getrennt ist, über die Lungenarterie weiter zur Lunge. Über die Lungenvene gelangt das mit Sauerstoff angereicherte Blut aus der Lunge in den linken Vorhof. Die linke Herzkammer (linker Ventrikel) pumpt das Blut über die Aorta in den Körperkreislauf und ist somit entscheidend für die Pumpleistung des Herzens.

1.9.1. Die Herzkranzgefäße

Die Herzkranzgefäße sind die Blutgefäße zur Eigenversorgung des Herzmuskels. Es sind zwei Arterien, die von der Aorta in Höhe der Aortenklappe (Valva aortae) abzweigen. Die linke Arterie (Aorta coronaria sinistra) versorgt die Herzvorderwand und Herzseitenwand. Sie teilt sich in zwei Hauptäste (Ramus circumflexus und Ramus interventricularis anterior), diese verzweigen sich weiter in kleine Herzkranzgefäße. Die rechte Arterie (Aorta coronaria dextra) versorgt neben der rechten Hinterwand auch den Sinus- und den Atrioventrikularknoten. Sie hat nur einen Hauptast (Ramus

interventricularis posterior). Dieser verzweigt sich ebenso wie die linke Arterie in feine Kapillaren. Die Koronarvenen münden in den rechten Vorhof.

Das Herz benötigt zur Deckung seines Eigenbedarfs etwa 5-10 % des Blutes, das bei einem Herzschlag in den Körper gepumpt wird [Cordula]. Die Tatsache, dass die Versorgungsgefäße des Herzens direkt am Beginn der Aorta abzweigen, macht man sich bei dem Langendorff-Experiment zu Nutze. Man befestigt das Herz mit der Aorta an der Apparatur und durchströmt es durch diese, wodurch es rückwärts perfundiert wird. Da die Versuchslösung gegen die Aortenklappe drückt und diese deswegen geschlossen ist, können Herzkammern und Vorhöfe über diesen Weg nicht gefüllt werden. Die Herzkranzgefäße werden jedoch in richtiger Richtung mit der Perfusionslösung durchströmt. Sobald die Perfusionslösung wieder aus den Koronarvenen, die in den rechten Vorhof münden, austritt, wird dieser gefüllt und somit auch die rechte Hauptkammer. Der linke Vorhof und die linke Hauptkammer bleiben leer.

1.9.2. Die Phasen der Herzaktion (Herzzyklus)

Ein Herzzyklus, mit dem das Blut in den Körper- und Lungenkreislauf gepumpt wird, umfasst zwei Phasen, eine Kontraktionsphase (Systole) und eine Erschlaffungsphase (Diastole).

Die Kontraktion des Herzens wird Systole genannt. Sie unterteilt sich in zwei Phasen:

- Isovolumetrische Anspannungszeit,
- Austreibungszeit.

In der isovolumetrischen Anspannungszeit kontrahiert das Herz und baut den Druck in der Herzkammer auf, ohne das Blut auszutreiben. Während dieser Phase sind alle Herzklappen geschlossen. In der Austreibungszeit kommt es zum Auspressen des Blutvolumens, sowohl von der rechten Kammer in die Lunge durch die Pulmonalarterie, als auch von der linken Kammer in die Aorta. Dabei sind Pulmonal- und Aortenklappe (Taschenklappen) geöffnet. Die Öffnung der Taschenklappen erfolgt, wenn der Druck im Ventrikel den Druck in der Aorta bzw. Pulmonalarterie übersteigt.

Die Erschlaffung des Herzens bezeichnet man als Diastole. Sie unterteilt sich in die folgenden Phasen:

- Isovolumetrische Entspannungszeit,
- Füllungszeit.

Während der isovolumetrischen Entspannungszeit erschlafft der Herzmuskel ohne sich mit Blut zu füllen. Während dieser Phase sind alle Herzklappen geschlossen. In der anschließenden Füllungszeit fließt Blut aus den Vorhöfen in beide Kammern, wobei die Vorhöfe dies erst am Ende der Phase durch eine aktive Kontraktion unterstützen. Die Öffnung der Segelklappen zwischen Vorhof und Hauptkammer erfolgt, wenn der Druck im Ventrikel den Vorhofdruck unterschreitet. Während der Systole füllen sich die Vorhöfe. In den rechten fließt Blut aus der oberen und der unteren Hohlvene, in den linken aus der Lungenvene.

1.9.3. Das Reizleitungssystem

Das Herz besitzt ein eigenes autonomes Erregungszentrum, den Sinusknoten, und ein Reizleitungssystem. Die Impulse, die für die Kontraktionen des Herzmuskels notwendig sind, entstehen im Sinusknoten, der am rechten Vorhof an der Einmündung der oberen großen Hohlvene liegt. Daher kann sich das Herz unter geeigneten Bedingungen auch außerhalb des Körpers kontrahieren. Schlagfrequenz und Kontraktionsstärke werden im intakten Organismus durch Sympathikus und Parasympathikus des vegetativen Nervensystems reguliert.

Zum Reizleitungssystem gehören mehrere Strukturen, die im Herzen selbst liegen (Abb. 4). Beim Meerschweinchen generiert der Sinusknoten 230-380 Impulse pro Minute. Vom Sinusknoten kommend werden die Signale über den Vorhof zum AV-Knoten weitergeleitet. Der AV-Knoten (Atrioventrikularknoten) befindet sich in der Wand des rechten Vorhofs an der Vorhof-Kammer-Grenze. Er sammelt die vom Sinusknoten kommenden Impulse und leitet sie an die beiden His'schen Bündel weiter. Bei einem Ausfall des Sinusknoten kann der AV-Knoten die Impulsgebung des Herzens übernehmen, aber mit geringerer Frequenz. Das His'sche Bündel ist ein in der Kammerscheidewand verlaufendes Faserbündel, das sich in zwei Stränge aufteilt, die jeweils zu einer der Kammern führen. Dort werden die Signale über die Purkinje-

Fasern weitergeleitet. Die Purkinje-Fasern sind die Ausläufer des His'schen Bündels und übertragen die Erregungsimpulse an die Muskulatur der Kammern.

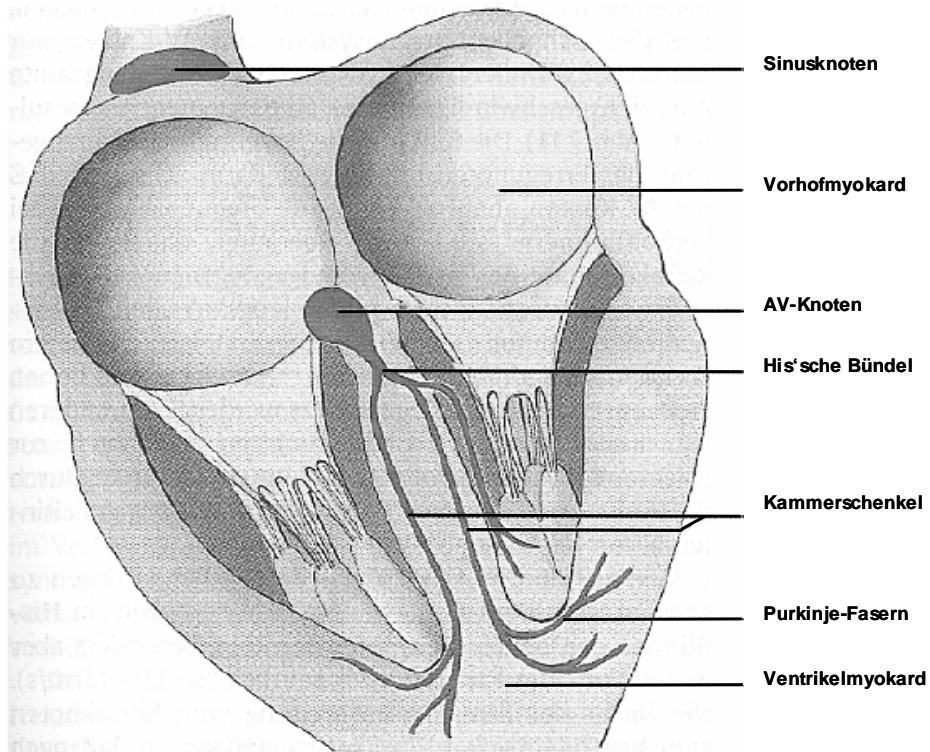


Abb. 4: Schematische Darstellung des Reizleitungssystems im Querschnitt
[© Scheunert/Trautmann: Lehrbuch der Veterinärphysiologie]

1.9.4. Das elektrische Signal der Reizleitung

Die Zellen des Reizleitungssystems übertragen ihre Signale mittels einer Abfolge von Depolarisationen und Repolarisationen. Diese Mechanismen lassen sich durch ihre elektrischen Impulse messen (Abb. 5).

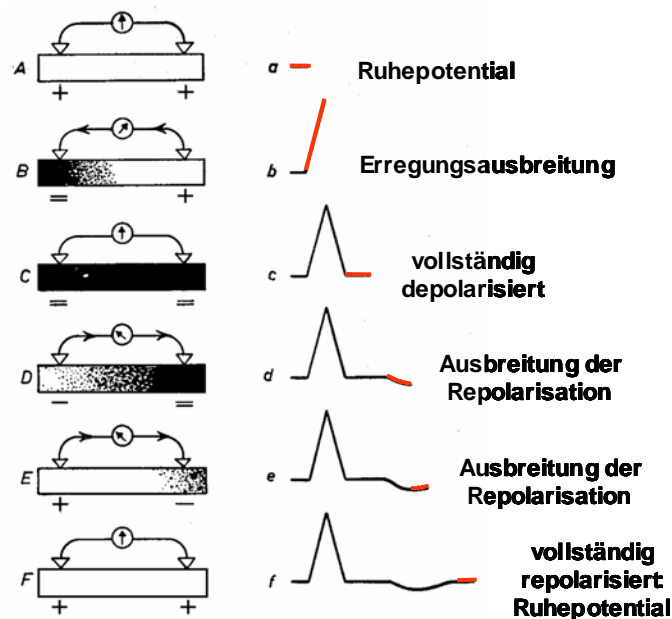


Abb. 5: Verlauf der Erregungsausbreitung in einer einzelnen Zelle

[© Scheunert/Trautmann: Lehrbuch der Veterinärphysiologie]

Zu Beginn ist die Zelle in Ruhe und damit intern im elektrischen Gleichgewicht (a). Ein Messgerät zeigt zu diesem Zeitpunkt keinen Ausschlag, auch isoelektrische Linie genannt. Bei eingehendem Reiz fängt die Zelle an, sich elektrisch zu laden, d.h. sich zu depolarisieren (b). Dies wird durch einströmende Na^+ -Ionen aus der extrazellulären Matrix erreicht. Hierbei wird ein Ausschlag gemessen. Nach Abschluss der Depolarisation ist ein neues Gleichgewicht auf einem höheren Niveau erreicht (c). Das erreichte Gleichgewicht wird am Messgerät auf der isoelektrischen Linie dargestellt. Ausströmende K^+ -Ionen leiten die Repolarisation ein (d). Hierbei werden elektrische Ladungen in Gegenrichtung zu (b) übertragen und erzeugen einen Messausschlag mit umgekehrten Vorzeichen. Dieser Vorgang dauert länger als der Na^+ -Einstrom, weswegen die Messlinie einen längeren aber nicht so starken

Ausschlag anzeigt (e). Nach Beendigung der Repolarisation hat die Zelle ihr Ruhepotential wieder erreicht und nützt die Zeit bis zum nächsten Reiz, um die Ionen mit einer gekoppelten Natrium-Kalium-Pumpe auszutauschen und dadurch die Ausgangsbedingungen wieder herzustellen (f).

1.9.5. Die Messbarkeit der Reizleitung

Die Reizleitung kann über elektrische Signale gemessen und dargestellt werden. Um an diese Informationen zu gelangen, bedarf es Elektroden, die im elektrischen Kontakt mit dem Reizleitungssystem stehen.

Der menschliche Körper stellt ein leitfähiges Medium dar, weil der extrazelluläre Elektrolyt ein zusammenhängendes System ist. Das extrazelluläre Medium leitet die im Herzen erzeugten Ströme in den Körper weiter und erzeugt damit eine an beliebiger Stelle im Medium messbare Spannung, von dem man bei geeigneter Anbringung der Messsonden einen interpretierbaren Potentialunterschied - das EKG - abgreifen kann. Im Allgemeinen werden diese Signale nicht invasiv, sondern an der Hautoberfläche gemessen.

Neben dem Herzen erzeugen auch Skelettmuskeln messbare Signale. Daher muss der Proband bei der EKG-Messung ruhig liegen, um diese Störsignale zu minimieren.

1.9.6. Der EKG-Aufbau

Die Elektrokardiographie registriert die bei jeder Herzkontraktion auftretenden elektrischen Aktionsströme des Herzmuskels als Funktion der Zeit [Csapo G. 1980], wie in der graphisch idealisierten Darstellung in Abb. 6 zu sehen ist.

Man teilt das EKG in drei Hauptbereiche ein:

Die P-Welle stellt die nacheinander folgende Aktivierung der Vorhöfe (Atria) dar (Depolarisation). Die PQ-Zeit ist die Überleitungszeit zum Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), die Verzögerung, die bei der Weiterleitung des Signals an die Hauptkammer entsteht.

Der QRS-Komplex zeigt die Depolarisation der linken und rechten Hauptkammer. Die Q-Zacke entsteht durch die Erregung des Septums (Herzscheidewand), die R-Zacke durch die symmetrische Kontraktion der Hauptkammer. Der Beginn der ST-Zeit ist das Ende der Kammererregung.

Die T-Welle stellt dann den Abschluss eines Herzzyklus mit der Repolarisation der Hauptkammer (der Entspannungsphase) dar.

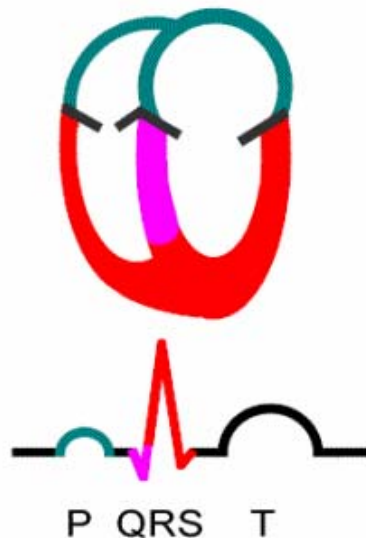


Abb. 6: Idealisiertes EKG mit farblicher Kennzeichnung der entsprechenden Regionen im Herzen
[© 1999 Dr. Stehle, aus Skript zur Vorlesung]

Weiterhin gibt es eine U-Welle, die durch die Repolarisation der Vorhöfe entsteht. Dieses Signal ist jedoch auf Grund der geringen Masse der Vorhöfe so schwach, dass es sich nicht von der T-Welle abhebt. In seltenen Fällen ist ein T- und U-Wellen Komplex zu erkennen. In diesem Fall ist die Amplitude der T-Welle so klein, dass die U-Welle sichtbar wird. Dies kann ein Hinweis auf eine Hypokaliämie sein.

Das EKG sagt über die eigentliche Kraft oder Leistungsfähigkeit des Herzens nichts oder nur indirekt etwas aus. Das EKG ist jedoch für die Diagnose von Herzrhythmusstörungen, Überlastungen einzelner Herzabschnitte und bei Herzinfarkten ein wichtiges Hilfsmittel. Zusätzlich können mit Hilfe des EKGs der Herzmuskelzustand (z.B. Herzmuskeldickenzunahme), der Zustand der Vorhöfe oder auch eine Herzbeutelentzündung sowie Sauerstoffmangelzustände oder Stoffwechselstörungen im Herzen untersucht werden [Csapo G. 1980].

1.9.7. Die EKG-Ableitung

An dem verwendeten EKG-Verstärker (Hugo Sachs GmbH, March-Hugstetten/Deutschland) stehen sechs verschiedene Ableitungen zur Verfügung, die aus drei Ableitungselektroden und einer Referenzelektrode gewonnen werden. Drei Ableitungen entsprechen denen nach Einthoven und drei denen nach Goldberger (Abb. 7). Da der verwendete A/D-Wandler nur acht Eingangskanäle hat, konnten neben dem Druck, der Temperatur und dem Tropfenzähler, nur fünf der möglichen Ableitungen kontinuierlich aufgezeichnet werden.

Solange nicht bekannt ist, ob und welche Effekte auftreten können, ist es wichtig, verschiedene Ableitungen aufzuzeichnen, da jede Ableitung einen anderen Teil des Herzens besonders gut abbildet. Bei der Ableitung I nach Einthoven wird das Signal der Vorhöfe besonders gut dargestellt. Die Ableitungen II und III erfassen hauptsächlich den Ventrikel.

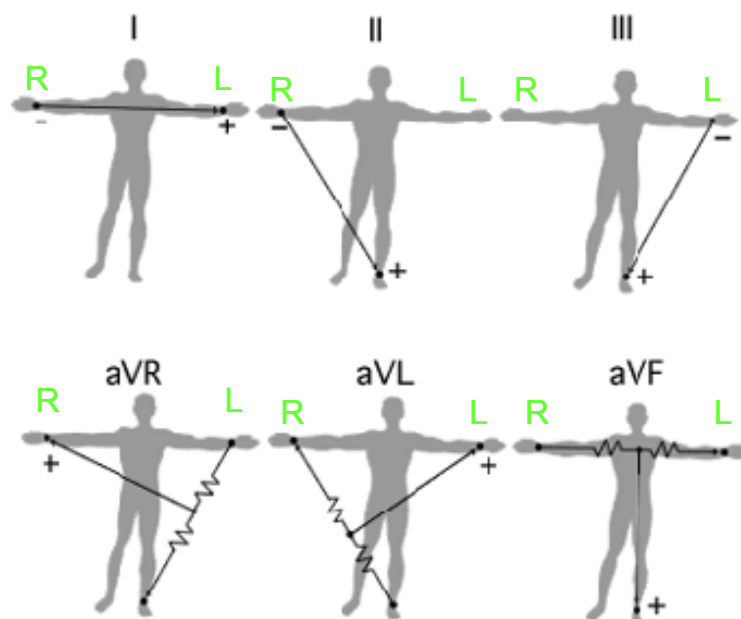


Abb. 7: Schematische Lage der Elektroden nach Einthoven (obere Reihe) und Goldberger (untere Reihe); EKG-Ableitung beim Menschen; [© Urban Frank aus Nobleprize.org]

Der Arzt Willem Einthoven stellte sich bei seiner Ableitung ein Dreieck vor, in dessen Mitte das Herz liegt. Die beiden Arme und der linke Fuß stellen dabei die Ecken des Dreiecks dar.

Da wir bei einem isolierten Herz nicht mehr von den Extremitäten ableiten können, leiten wir das EKG so ab, dass das Herz in der idealisierten Mitte des Dreiecks liegt. Die Elektroden für die Arme liegen links und rechts knapp unter den Vorhöfen am Herzen an, die Elektrode für den linken Fuß an der Herzspitze. Die Referenzelektrode, die bei der Ableitung nach Einthoven am rechten Fuß angebracht ist, wurde in diesem Experiment im Medium, welches das Herz versorgt, drei Zentimeter vor dem Herzen angebracht. Die Referenzelektrode wird benötigt um ein Bezugspotential herzustellen. Durch den Versuchsaufbau ist die Lage des Herzens vorgegeben. Schlüsse, die aus den Lageinformationen gezogen werden könnten, sind somit nicht zulässig.

1.10. Datenaufnahmeprogramme

Um herauszufinden, ob ultrafeine Teilchen einen direkten Einfluss auf die Herzfunktion nehmen, muss das EKG kontinuierlich über einen langen Zeitraum aufgezeichnet und analysiert werden. Die Datenerfassung wurde mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt. Zu Beginn meiner Arbeit gab es keine Software auf dem Markt, welche die benötigten Anforderungen erfüllte. Daher wurde von mir mit Labview, einer Software von „National Instruments“, ein Datenerfassungsprogramm und ein Programm zur Herzfrequenz-Analyse entwickelt. Später sollte die Herzratenvariabilität (HRV) bestimmt werden, um zu sehen, ob die beobachteten Wirkungen ultrafeiner Teilchen auf die Herzrate und das EKG trotz der abgetrennten Nervenenden auch bei der Analyse der HRV sichtbar würden. Dafür war jedoch die Samplerate des selbst entwickelten Datenerfassungsprogramms zu gering. Deswegen wurde das zwischenzeitlich stark verbesserte Datenerfassungs- und Auswertungsprogramm Powerlab Charts (Version 5.2.2) (AD Instruments GmbH, Spechbach/Deutschland) mit der Zusatzsoftware zur Analyse der HRV verwendet.

Der große Vorteil dieser Software liegt darin, dass die höhere Abtastrate das EKG-Signal besser darstellen lässt und somit Veränderungen leichter und eventuell früher festzustellen sind. Für die Auswertung können auch zusätzlich tierspezifische Parameter verwendet werden.

Generell erfolgt die Datenerfassung in drei Schritten. Das EKG-Signal des Herzens wird mit einem EKG-Verstärker (EGM Einthofen Goldenberger Module Typ 701 von Hugo Sachs, March-Hugstetten/Deutschland) erfasst, die analogen Signale werden digitalisiert (12 Bit) und auf einer Festplatte gespeichert (Abb. 8).

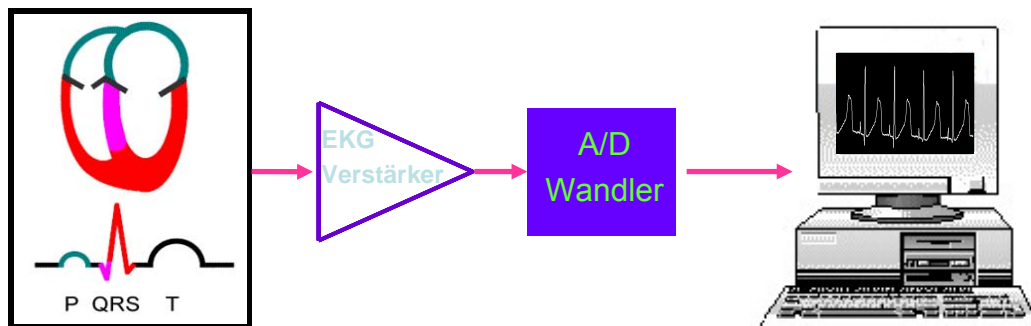


Abb. 8: Schematische Darstellung der Datenerfassung

1.10.1. Labview

Labview ist eine graphische Datenflussprogrammiersprache, die speziell darauf ausgelegt ist, mit einem A/D-Wandler kombiniert, Interaktionen zwischen Computer und analogen bzw. digitalen Ein- und Ausgängen zu koordinieren und die Messdaten abzuspeichern. Da es sich bei Labview um eine vollständige Programmiersprache handelt, ist es mit dieser auch möglich, online erfasste oder auch gespeicherte Messdaten von früheren Versuchen zu bearbeiten, auszuwerten und graphisch darzustellen. Der A/D-Wandler befindet sich auf einer Computersteckkarte und ist mit einer externen Box verbunden, auf der die analogen und digitalen Ein- und Ausgänge mit BNC-Buchsen verbunden sind. Mittels Labview wurde ein spezielles Datenerfassungsprogramm für die Versuche mit Langendorff-Herzen entwickelt.

1.10.2. Powerlab

Da die Aufzeichnungsrate von 200 Hz für die Analyse der Herzratenvariabilität (HRV) und der Frequenzbänder (der Herzfrequenz) zu gering und eine Erhöhung der Abtastrate aus programmiertechnischen Gründen nicht mehr möglich war, wurde das Datenerfassungssystem Powerlab in der neuen Version v 5.2.2 verwendet. Die Powerlab-Software steuert einen eigenen A/D-Wandler mit acht unabhängigen Kanälen und kann diese jeweils mit einer Samplerate von 1000 Hz abtasten. Das Datenerfassungsprogramm wurde noch mit zwei Programmmodulen zur Analyse des EKGs und der Herzratenvariabilität erweitert.

Im EKG-Analyse-Modul kann zwischen sechs verschiedenen voreingestellten Tierpezies (Maus, Ratte, Hase, Hund, Schwein, Meerschweinchen) und dem EKG des Menschen gewählt werden. Da die EKG-Erkennung auf einem Algorithmus beruht, der sowohl die EKG-Form als auch spezifische, artabhängige Zeitabstände zwischen den Elementen des EKG-Signals auswertet, muss für eine korrekte Auswertung die passende Spezies gewählt werden. Das Programm ermöglicht es, die Frequenz als Frequenz-Zeit-Diagramm oder als „scatter plot“ darzustellen. In Abbildung 9 sieht man den Frequenzverlauf eines Experiments wie er mit Powerlab dargestellt werden kann.

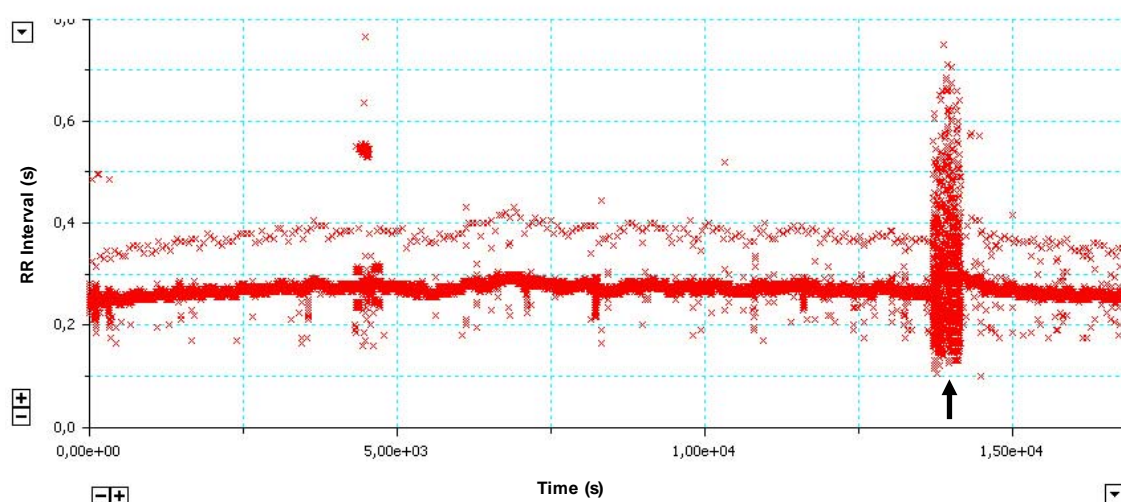


Abb. 9: Frequenz-Zeit-Diagramm; jeder Datenpunkt stellt ein RR-Intervall dar

In diesem Diagramm sieht man in der dicken Linie den Frequenzverlauf des Experiments. Im Verlauf dieses Experimentes sind gleichmäßig immer wieder deutlich längere RR-Intervalle aufgetreten, erkennbar an der dünnen darüber liegenden Linie. Kurz vor Ende des Experiments kam es zu Herzflattern, gemischt mit aussetzenden Herzschlägen (\uparrow). Diese Frequenzanalyse ist automatisiert und kann, von der Wahl der Spezies abgesehen, nicht beeinflusst werden. RR-Intervalle, die für eine Frequenzberechnung unerwünscht sind, können nur mit Hilfe des „scatter plots“ ausgeschlossen werden.

Der „scatter plot“ wird verwendet, um die einzelnen Herzschläge zu klassifizieren. Er stellt sie in zwei zusammenhängenden Diagrammen dar (Abb. 10). Jedes ‚x‘ stellt einen Herzschlag dar.

Im rechten Diagramm ist das RR-Intervall einem Formfaktor gegenübergestellt, der die Nähe zur idealen Form eines QRS-Komplexes wiedergibt. Mit dem rechten Diagramm können RR-Intervalle erkannt werden, die entweder von der Frequenz her oder von der Idealform eines Herzschlages stark abweichen. Je größer der Formfaktor (Y-Achse) ist, desto mehr weicht der QRS-Komplex von der Idealform ab.

Im linken Diagramm wird das isoelektrische Rauschen der Aktivität der entsprechenden R-Zacken gegenübergestellt. Beide Parameter beschreiben Störfrequenzen, die das EKG überlagern. Dabei steht die Aktivität für hochfrequentes Rauschen und das isoelektrische Rauschen für niedrigfrequente Störsignale.

Mit diesen beiden Diagrammen können somit „Ausreißer“ identifiziert und aussortiert werden. Dies umfasst nicht nur Artefakte, sondern auch ektopische Signale und Extrasystolen. Während die ersten beiden eher auf Grund der Aktivität und des isoelektrischen Rauschens ausgeschlossen werden können, gilt für die Extrasystolen hauptsächlich der Formfaktor. Für die Frequenzberechnung sollen alle, auch die Extrasystolen, ausgeschlossen werden, da sie die reale Herzfrequenz nur verfälschen. Alle RR Intervalle, die sich innerhalb des Rahmen befinden, sind als gut eingestuft und alle, die sich außerhalb befinden, werden für spätere Frequenz- und HRV-Berechnungen nicht herangezogen. Dies ist bei dem EKG-Analyse-Programm die einzige Möglichkeit, eine Auswahl der für die Berechnungen herangezogenen RR-Intervalle zu treffen.

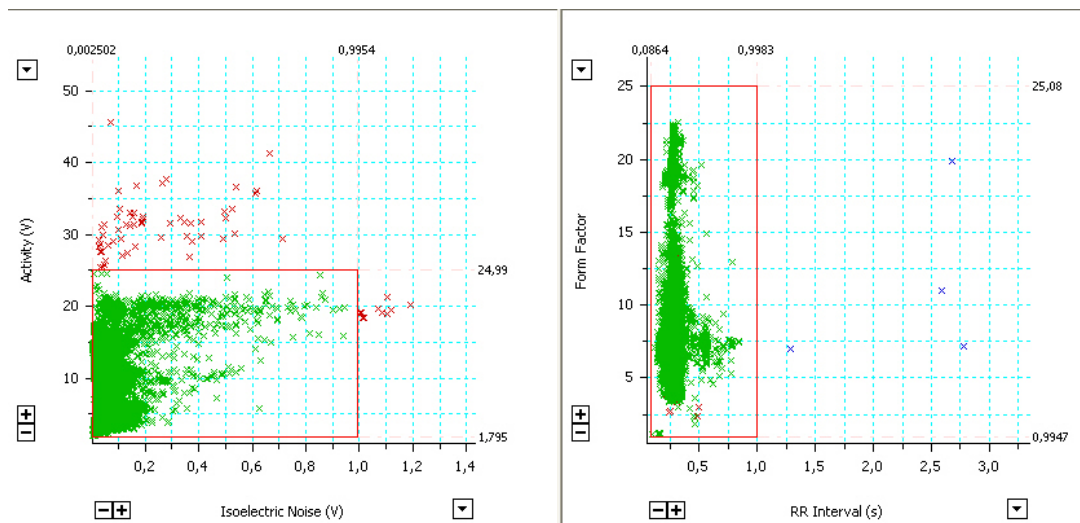


Abb. 10: „Scatter plot“ vom EKG-Analyse-Modul zur Klassifizierung der RR-Intervalle

Die Software des HRV-Moduls erkennt die R-Zacken als Messwerte über einem vom Benutzer festzulegenden Schwellenwert, analog zu dem von mir entwickelten Frequenzanalyseprogramm. Sollte die Amplitude der R-Zacken zu gering werden, um sie mit dem Schwellenwert noch eindeutig zu erfassen, kann die erste Ableitung (dU/dt) des Signals berechnet werden. Dadurch werden die Steigungen des Signals dargestellt. Da auch bei geringer Amplitude die R-Zacken die größten Steigungen haben, sind die Peaks, welche die R-Zacken repräsentieren, wieder deutlich höher als die anderen Elemente des EKG-Signals und können mit dem Schwellenwert eindeutig erfasst werden. Das HRV-Programm verwendet die gefundenen R-Zacken zur Berechnung der Frequenz, der HRV und der Frequenzbänder.

Dieses Auswertprogramm ermöglicht, Frequenzbereiche für normale, ektoische oder artefaktartige Frequenzen zu definieren. Dadurch können in der Analyse der HRV und der Frequenzbänder ektoische Signale und Artefakte ausgeschlossen werden. Bei ektoischen Frequenzen handelt es sich um solche, die ungewöhnlich langsam oder schnell sind, die aber natürliche Ursachen haben können. Artefakte liegen soweit außerhalb eines natürlichen Herzschlages, dass sie nur durch technische Störungen bei der Datenaufzeichnung entstanden sein können. Ektoische Frequenzen oder Artefakte wirken sich bei der Bestimmung der Herzrate nur gering aus. Die Analyse der Herzratenvariabilität jedoch erschweren sie sehr, da hier nur

geringe Variationen untersucht werden. Sie können das Ergebnis stark verfälschen.

1.11. Katecholamine

Unter dem Begriff Katecholamine werden eine Reihe von körpereigenen und künstlichen Stoffen zusammengefasst, die über die sympathischen Alpha- und Beta-Rezeptoren des Herz-Kreislaufsystems wirken. Körpereigene Katecholamine sind Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und Dopamin (D). Sie werden aus Tyrosin synthetisiert (Abb. 12).

Adrenalin steigert den Blutdruck und erhöht die Herzfrequenz. Noradrenalin steigert hauptsächlich den Blutdruck und nur ein wenig die Herzfrequenz. Dopamin wirkt positiv inotrop, d.h. es hat eine steigernde Wirkung auf die Leistungsfähigkeit des Herzmuskels.

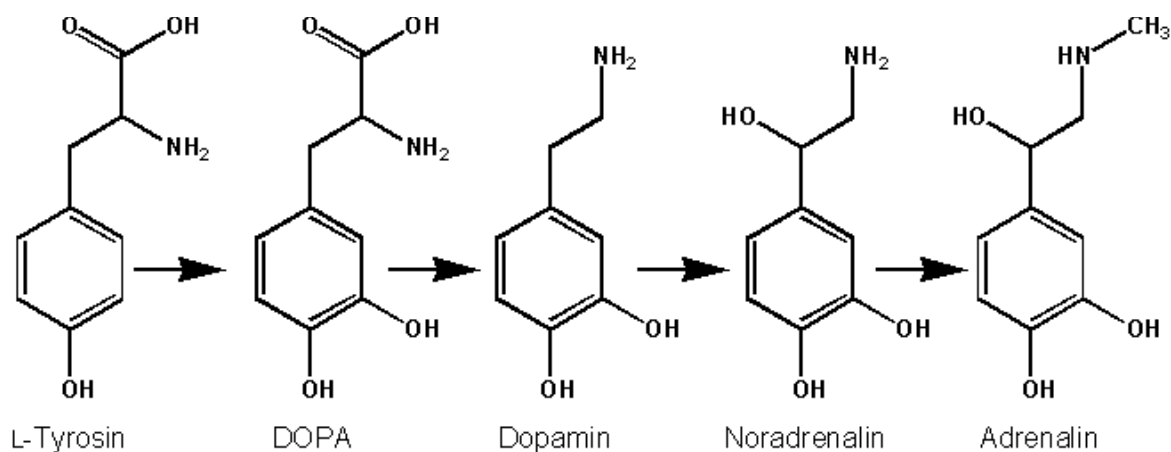


Abb. 12: Syntheseweg der drei körpereigenen Katecholamine A, NA und D

[© Wikipedia, David W.]

Alle drei Katecholamine sind in hohen Dosen arrhythmogen, d.h. sie können Arrhythmien bis hin zu Kammerflimmern hervorrufen. Des Weiteren ist es möglich, dass es auf Grund eines stark erhöhten Blutdruckes vermehrt zu Herzinfarkten und Hirnblutungen kommt.

Katecholamine werden aus der Nebennierenrinde oder lokal aus den Enden des sympathischen Nervensystems freigesetzt. Somit ist nicht auszuschließen, dass auch im isolierten Herzen Katecholamine freigesetzt werden können, da das sympathische Nervensystem das Herz gleichmäßig innerviert [Thews G. et al. 1989].

1.12. Vergleich Partikelsuspensionen - umweltrelevante Partikelexpositionen

Um die Experimente unter umweltnahen Bedingungen durchzuführen, ist es wichtig abzuschätzen, wie viele Teilchen ein Mensch unter Grenzwertbedingungen einatmet und wie viele Teilchen in den Blutkreislauf gelangen.

Es ist bekannt, dass 50 % der inhalierten ultrafeinen Teilchen im Alveolarbereich der Lunge abgelagert werden. Es gibt bereits verschiedene Arbeiten, die zeigen, wieviele der deponierten Teilchen auch wirklich in die Blutbahn und zu den Organen gelangen. Wenn man die Publikation von Oberdörster et al. 2002, in der eine Translokationsrate von 50 % beschrieben wird, unberücksichtigt lässt, liegen die publizierten Werte zwischen 0,5 und 7 % [Kreyling et al. 2002; Nemmar et al. 2001, Brown et al. 2002]. Für meine Abschätzungen habe ich eine Translokationsrate von 1 % angenommen. Es wurden zwei Abschätzungen vorgenommen, eine mit dem EU-Grenzwert, der als Masse/m³ definiert ist, und eine zweite nach den an stark frequentierten Straßen gemessenen Partikelzahlen.

1.12.1. Abschätzung der Belastung nach Masse des EU-Grenzwerts

Der aktuelle EU-Grenzwert für Feinstaub liegt bei 50 µg/m³.

Wenn während eines Tages 10m³ Luft geatmet werden, so werden 500 µg Staub eingeatmet. Unter der Annahme, dass 50 % des eingeatmeten Staubs in der Lunge deponiert werden und davon 1 % in die Blutbahn transloziert wird, ergibt dies 2,5 µg translozierte Gesamtmasse im Blut. Bei einem Menschen mit 6000 ml Blut bedeutet das, dass kumulativ an einem Tag eine fiktive Konzentration von 0,416 ng/ml erreicht wurde.

Berechnung der im Experiment verwendeten Masse aus der abgeschätzten Teilchenzahl von Printex 90-Suspensionen:

Masse eines Teilchens (m) = Volumen eines Teilchens (V_T) * Dichte (ρ)

$$V_T = \frac{4}{3} * r^3 * \pi$$

Massekonzentration (K) =

Anzahl (A)/Volumen der Suspension (V_S) * Masse eines Teilchens

$$K = \frac{A}{V_S} * \frac{4}{3} * r^3 * \pi * \rho$$

Konzentration (A/V)	$0,8 * 10^9$ Teilchen/ml
Gemessener Radius (r)	50 nm
Dichte (ρ)	$1,6 \text{ g/cm}^3$

$$K = \frac{0,8 * 10^9}{\text{ml}} * \frac{4}{3} * (50\text{nm})^3 * \pi * 1,6 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \approx 670 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

Die Massekonzentration in der Suspension der Printex 90 Teilchen, die im Experiment eingesetzt wurden, betrug 670 ng/ml.

Die niedrigste bei unseren Experimenten eingesetzte Konzentration ($0,8 * 10^9$ Teilchen/ml) von Printex 90 lag 1600 mal höher als im Blut eines Menschen zu erwarten waren, der für einen Tag Luft, die gerade am Grenzwert der EU lag, eingeatmet hatte.

In den aktuellen Veröffentlichungen variieren die Translokationsraten noch stark und

wurden mit verschiedenen Tracern bestimmt. Es besteht die Möglichkeit, dass die ermittelte Translokationsrate von 50 % [Oberdörster et al. 2002] wesentlich näher an der Realität liegt als die von mir angenommenen 1 %.

Neben der Translokationsrate hat im realem Umfeld die Clearance eine mindestens genauso bedeutende Rolle, da diese für eine kumulative Anreicherung der Teilchen im Gewebe verantwortlich ist. Diese biologische Halbwertszeit ist wahrscheinlich vom Material der ultrafeinen Teilchen abhängig. Wenn man die Untersuchung mit Iridiumpartikeln als Richtwert nimmt, liegt die Halbwertszeit der Lungenretention bei rund 100 Tagen [M. Semmler et al. 2004]. Wenn Staub allein in der Lunge eine hohe biologische Halbwertszeit hat, steigt bei einer gleich bleibenden Translokationsrate damit auch die Konzentration im Blut stark an. Somit nähern sich die experimentellen Bedingungen der Realität weiter an.

Mit dieser Konzentration waren aber bereits in kurzer Zeit Effekte sichtbar, die sich unter Umweltbedingungen über einen längeren Expositionszeitraum ergeben würden.

1.12.2. Abschätzung der realen Belastung mit gemessenen Partikelzahlen

Nach einer Untersuchung von Kaur setzt man sich bei einer Fahrt durch die Stadt London mit einem Taxi oder im Bus einer Partikelkonzentration von 100 000 ultrafeinen Teilchen/cm³ aus [Kaur S. et al. 2006].

Bei gleichen Atembedingungen wie bei der Masseabschätzung werden am Tag $1 \cdot 10^{12}$ ultrafeine Teilchen eingeatmet.

Unter denselben Annahmen wie oben erreichen die Teilchen im Blut eine Konzentration von $8,3 \cdot 10^5$ Teilchen/ml.

Im Vergleich zu dieser Belastung ist die in unserem Experiment eingesetzte niedrigste Konzentration ($8,0 \cdot 10^8$ Teilchen/ml) um den Faktor 963 (ca. 1000) höher. Bei einer höheren Translokationsrate (10 %) sinkt der Faktor auf 100.

Auch für diese Abschätzung gilt, wie für die vorausgehende, dass mit Berücksichtigung der Clearance und einer eventuell höheren Translokationsrate die experimentellen Bedingungen und die reale Belastung sich weiter annähern.

1.12.3. Grenzen der Abschätzungen

Aus den Feinstaubmessungen, die in verschiedenen Städten zur Grenzwertüberwachung durchgeführt werden, geht nicht hervor, wie groß der Anteil der UFT ist, da nur die Masse bestimmt wird. Zur Zeit wird noch diskutiert, ob die Masse oder die Größe der Teilchen der relevante gesundheitsschädliche Faktor ist. Wenn sich die Teilchengröße als Hauptfaktor herausstellt, ist meine erste Abschätzung in soweit zu hoch angesetzt, als dass wahrscheinlich nur ein geringerer Anteil der Gesamtmasse wirklich auf UFT zurückzuführen ist.

Beide Abschätzungen gehen anfänglich von einem unbelasteten Organismus aus und betrachten nur den Fall einer akuten Exposition. In der Realität haben wir aber eine Akkumulation an Staubpartikeln sowohl in der Lunge als auch im Blut. UFT weisen auf Grund ihrer schlechten Erkennung durch das Immunsystem eine hohe biologische Halbwertszeit auf.

Bis jetzt ist noch unklar, ob die beobachteten Gesundheitsschäden durch eine akute Spitzenbelastung mit UFT hervorgerufen werden oder ob sich diese in den Zielorganen akkumulieren und somit längerfristig Schäden verursachen können, obwohl die akute Belastung gering ist.

Alle in die Blutbahn translozierten Teilchen gelangen in das Herz. Von dem durch das Herz gepumpten Blut benötigt es 5-10 % zur eigenen Versorgung. Somit wird das gesamte Herz immer mit Partikeln durchströmt, die sich eventuell dort akkumulieren können, noch bevor sie von der Leber metabolisiert oder ausgeschieden werden können.

2. Ergebnisse

2.1. Größenverteilung suspendierter Partikel

2.1.1. Herstellung einer ultrafeinen Partikelsuspension

Teilchen, die im Herstellungsprozess noch ultrafein waren, neigen bei Kontakt miteinander zur Agglomeration. Dieser Effekt tritt besonders auf, wenn man versucht, diese Teilchen in Suspension zu bringen. Vor allem die hydrophoben Teilchen, aber auch hydrophile, die bereits vorher verklumpt sind, müssen mit großem Energieaufwand wieder von einander getrennt werden.

Zur Herstellung der Partikelsuspension wurden 1 mg Partikel in 5 ml Perfusionslösung eingewogen. Diese Suspension wurde mit der Mikrospritze einer Ultraschalllanze bei einer Eingangsleistung von ca. 40 Watt zweimal eine Minute beschallt, um entstandene Agglomerate aufzubrechen. Die Beschallungen wurden durch eine einminütige Pause getrennt. Während der ganzen Zeit befand sich die Probe in Eiswasser, um thermische Schäden am Rinderserumalbumin (BSA) zu verhindern. Die Partikelsuspension wurde nach dem beschallen erst durch einen 220-nm- und anschließend durch einen 100-nm-Spritzenvorsatzfilter gefiltert, um die noch vorhandenen großen Agglomerate abzutrennen.

Nach den Filtrationsschritten wurde die Größenverteilung der Partikel und deren Agglomerate in der Suspension mittels eines Particlesizers (Malvern HPPS) bestimmt und überprüft, ob nur Partikel und Agglomerate kleiner 100 nm Durchmesser darin enthalten waren (Abb. 13). Dieses Gerät strahlt Laserlicht in eine Küvette mit der Teilchensuspension und bestimmt die Teilchengröße durch Analyse des durch die Teilchen rückgestreuten Lichts. Je größer ein Teilchen ist, desto höher ist die Lichtintensität des rückgestreuten Lichts.

Hier kann man erkennen, dass die Probe nach dem beschallen ohne zu filtern noch Agglomerate mit einer Größe von mehr als 100 nm enthält. Nach dem Filtrieren sind diese nicht mehr nachweisbar. Das zur Stabilisierung der UFT verwendete BSA wird mit einem Radius von 3,5 nm gemessen. In diesem Diagramm ist auf der Ordinate die Lichtintensität dargestellt. Der BSA Peak ist nach dem Filtrieren größer als vorher, da die großen Agglomerate fehlen und dadurch die gesamte rückgestreute Lichtintensität von Printex 90 geringer geworden ist.

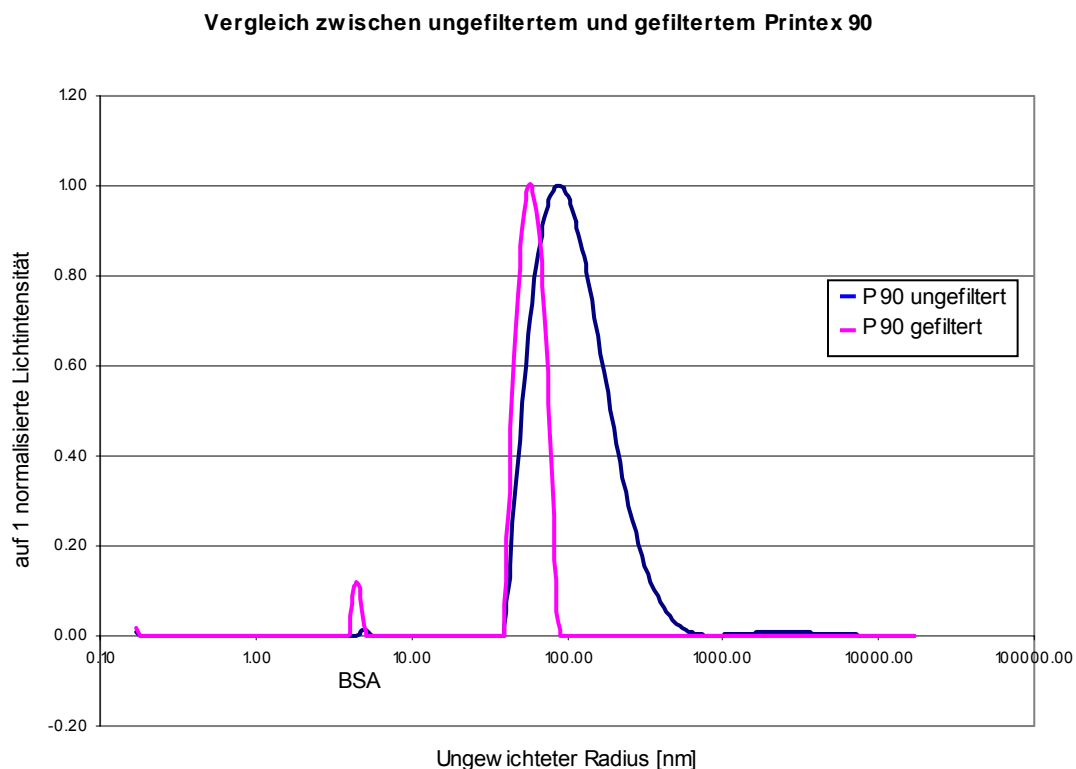


Abb. 13: Malvern Größenverteilungskurve mit einer ungefilterten (blau) und gefilterten (rosa) Suspension mit Printex 90

2.1.2. Abschätzung der Partikelanzahl

Auf Grund der Agglomeration der Teilchen in der Suspension und den dadurch nötigen Filtrationsschritten konnte nicht, wie in der Literatur üblich, die im Experiment eingesetzte Menge UFT über die Einwaage als mg/ml definiert werden. Daher entwi-

ckelten wir eine neue Methode zur Abschätzung der Anzahl der Teilchen, die nach der Filtration noch vorhanden waren.

Für Teilchen, deren Größe im Rayleigh-Bereich liegen, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Lichtintensität des rückgestreuten Lichts und dem Logarithmus des Durchmessers des Teilchens (Abbildung 14).

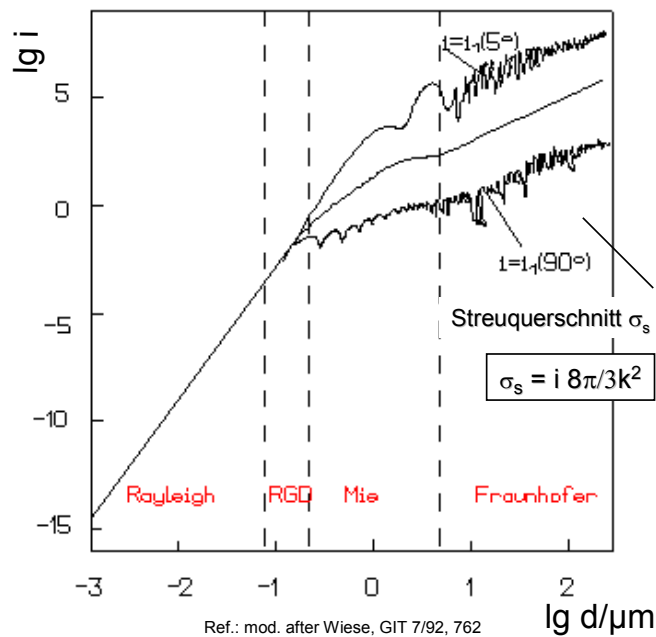


Abb. 14: Zusammenhang von Teilchendurchmesser und Lichtintensität

Da der Durchmesser ultrafeiner Teilchen im Rayleigh-Bereich liegt, nutzten wir diesen linearen Zusammenhang, um mittels Suspensionen aus Partikeln mit verschiedenen definierten Durchmessern das Verhältnis der Teilchenzahlen zu bestimmen, das zur gleichen Intensität des rückgestreuten Lichts führt.

Die Messungen wurden mit zertifizierten Latexpartikeln (Duke Scientific Corporation, Fremont Kalifornien/USA) mit definiertem Durchmesser und Angabe der Teilchenzahl/ml durchgeführt.

Bei den hier gezeigten Bestimmungen wurden Teilchensuspensionen mit derselben Anzahl von Latex-40-Teilchen mit so vielen Latex-100- bzw. Latex-200-Teilchen gemischt, so dass die beiden rückgestreuten Lichtintensitäten annähernd gleich waren. Für die Messungen mit Latex-60- und Latex-80-Teilchen wurden die oben ermittelten Teilchenmengen von Latex 100 und Latex 200 als Ausgangspunkt

genommen. Auch hier wurden analog Latex-60- und Latex-80-Partikel solange hinzu gegeben, bis die rückgestreuten Lichtintensitäten annähernd identisch waren. Um die Teilchensuspensionen auf den gewünschten Anteil zu verdünnen, wurde Millipore-Wasser verwendet. Die verwendeten Teilchenzahlen sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Messungen sind in den Abbildungen 15 a-d dargestellt.

Teilchen/ml	Latex 60	Latex 80	Latex 100	Latex 200
Latex 40: $2,56 \cdot 10^{15}$			$9,09 \cdot 10^{12}$	$4,09 \cdot 10^{11}$
Latex 100: $9,09 \cdot 10^{12}$	$2,11 \cdot 10^{14}$			
Latex 200: $4,09 \cdot 10^{11}$		$1,92 \cdot 10^{13}$		

Tab. 4: Teilchenzahlen: Paare, die eine annähernd gleiche Lichtintensität aufweisen

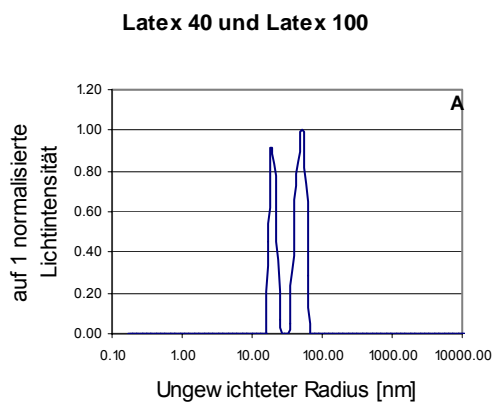


Abb. 15 a: Latex 40 und Latex 100

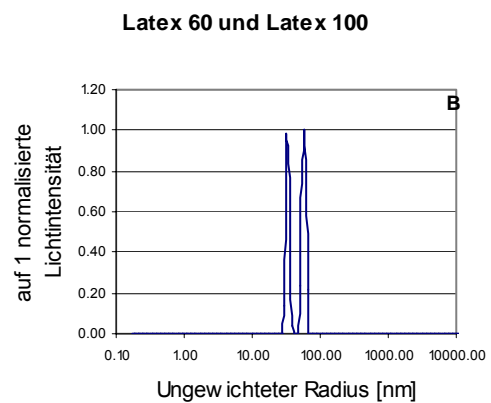


Abb. 15 b: Latex 60 und Latex 100

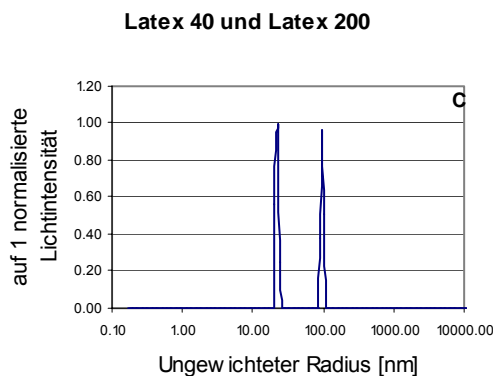


Abb. 15 c: Latex 40 und Latex 200

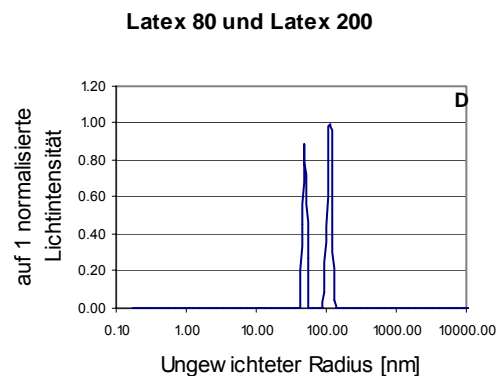


Abb. 15 d: Latex 80 und Latex 200

Wenn nun von diesen Messungen die Anzahl der Teilchen und ihre Größe in einem Diagramm dargestellt werden, ergibt sich auch bei unseren Bestimmungen der lineare Zusammenhang zwischen der Teilchengröße und der Anzahl der Teilchen (Abb. 16).

Dieser entspricht dem linearen Zusammenhang von Teilchendurchmesser und Lichtintensität im Rayleigh Bereich.

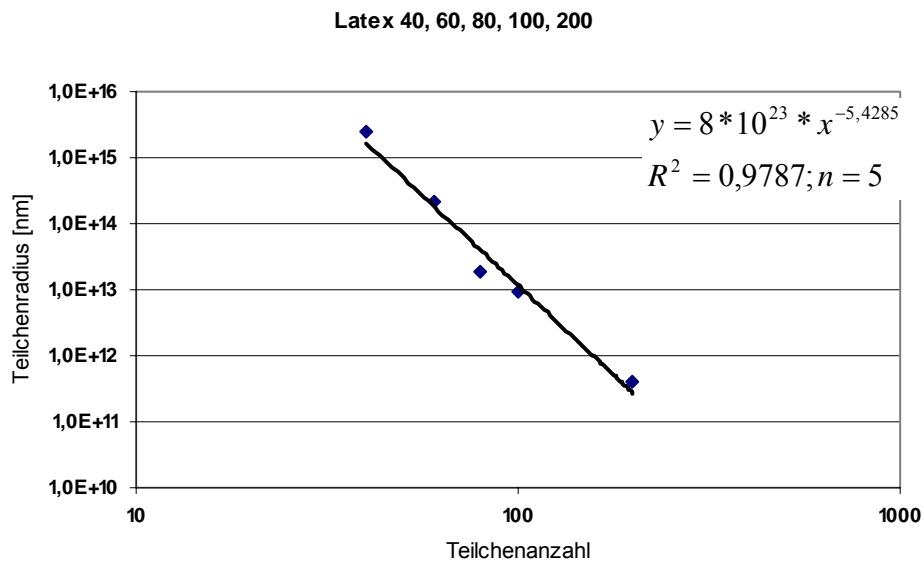


Abb. 16: Darstellung von Teilchenzahl und Teilchendurchmesser unserer Experimente mit Latexpartikeln in doppelt logarithmischer Darstellung

Auf Grund der linearen Beziehung von Rückstreulicht und Teilchengröße kann der Faktor, der den Unterschied in der Anzahl zweier verschieden großer Teilchen für gleiche Lichtintensität ergibt, berechnet werden.

Wir bestimmten den Faktor aus der Anzahl Latex-40- und Latex-100-Partikeln, die dieselbe Lichtintensität zeigten. Mit diesem Faktor und der bekannten Anzahl der Referenzpartikel konnte dann die unbekannte Anzahl von Teilchen mit bekannter Größe und identischer Lichtintensität berechnet werden. Für die Abschätzung der Teilchenzahl von UFT gaben wir der Teilchensuspension so viele Latex-40-Partikel zu, dass die Rückstreuintensitäten gleich waren und schätzten mit Hilfe dieses Faktors die unbekannte Menge von UFT-Agglomeraten mit 100 nm Durchmesser ab. Diese Bestimmungen führten wir für alle von uns verwendeten Teilchenarten durch.

$$Faktor = \frac{Latex40}{Latex100}$$

Es ist äußerst schwierig, eine Suspension von einem Gemisch aus Partikelarten mit verschiedenen Durchmessern herzustellen, die identische Lichtintensitätspeaks ergeben. Bei nicht identischen Lichtintensitäten muss die Gewichtung der einzelnen Peaks, die vom Malvern HPPS berechnet wird, als Korrekturfaktor hinzugenommen werden.

$$Gewichtungskorrektur = \frac{Latex40}{Latex100} * \frac{Latex100Gewichtung\% - Latex40Gewichtung\%}{100}$$

Wenn man diesen Gewichtungsfaktor zu der Formel hinzunimmt, bekommt man:

$$Faktor = \frac{Latex40}{Latex100} + Gewichtungskorrektur$$

bzw.:

$$Faktor = \frac{Latex40}{Latex100} + \frac{Latex40}{Latex100} * \frac{Latex100Gewichtung\% - Latex40Gewichtung\%}{100}$$

Dabei ergab sich ein Faktor von $3,5512 \cdot 10^2$ für Latex 40 zu Latex 100 Teilchen.

Mit diesem Faktor und einer nach Latex 100 umgeformten Formel können nun Printex 90 Teilchensuspensionen bei einer Größe von 100 nm Durchmesser abgeschätzt werden.

$$\text{unbekannte Teilchen}100 = \frac{\text{Latex40}}{\text{Faktor}} + \frac{\text{Latex40}}{\text{Faktor}} * \frac{\text{unbekGewichtung\%} - \text{Latex40Gewichtung\%}}{100}$$

Von den Suspensionen mit bekannter Anzahl von ultrafeinen Teilchen haben wir in einem Photometer den Extinktionswert bestimmt und daraus Kalibrierkurven für die von uns verwendeten Materialien erstellt.

Nur durch Bestimmung der Extinktion kann dann unter Verwendung dieser Kalibrierkurven sehr schnell die Teilchenzahl von Suspensionen bestimmt und durch Verdünnung die für das Experiment benötigte Teilchenzahl eingestellt werden.

2.1.3. Erstellung der Kalibrierkurve

Für jedes Partikelmaterial wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Hierzu wurde eine Partikelsuspension hergestellt. Mit einem Photometer wurde die Extinktion bestimmt und in einem Aliquot der Suspension mit dem Particlesizer (Malvern) die Anzahl der Teilchen nach der oben beschriebenen Methode ermittelt.

Daraufhin wurde dieselbe Suspension auf die Hälfte verdünnt, der Extinktionswert bestimmt und in einem Aliquot der Verdünnung die Teilchenabschätzung erneut vorgenommen. In den Abbildungen 17 a und b sind zwei exemplarische Teilchenbestimmungskurven von Latex 40 und Printex 90 bzw. Latex 40 und Titandioxid dargestellt.

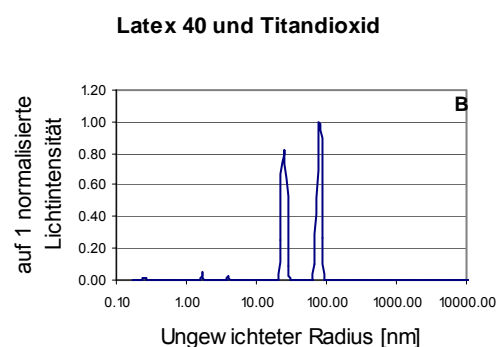
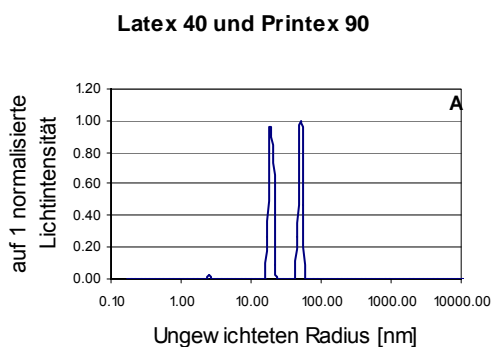


Abb. 17a: Latex 40 und Printex 90

Abb. 17b: Latex 40 und TiO₂

Diese Messungen wurden dreimal für jede Suspension wiederholt. Für jedes Material wurden sechs dieser Messreihen durchgeführt. Aus den Mittelwerten wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Mittels dieser Kalibrierkurve konnte dann sehr schnell die Teilchenzahlkonzentration einer Suspension nur durch die Bestimmung des Extinktionswertes abgeschätzt werden. Die für das jeweilige Experiment gewünschte Teilchenzahl wurde durch die entsprechende Verdünnung der Suspension erreicht.

Für Printex 90 ergab sich folgende Kalibrierkurve, bei der die Extinktion bei 380 nm die Abszisse und die Teilchenzahl/ml die Ordinate bildet (Abb. 18a).

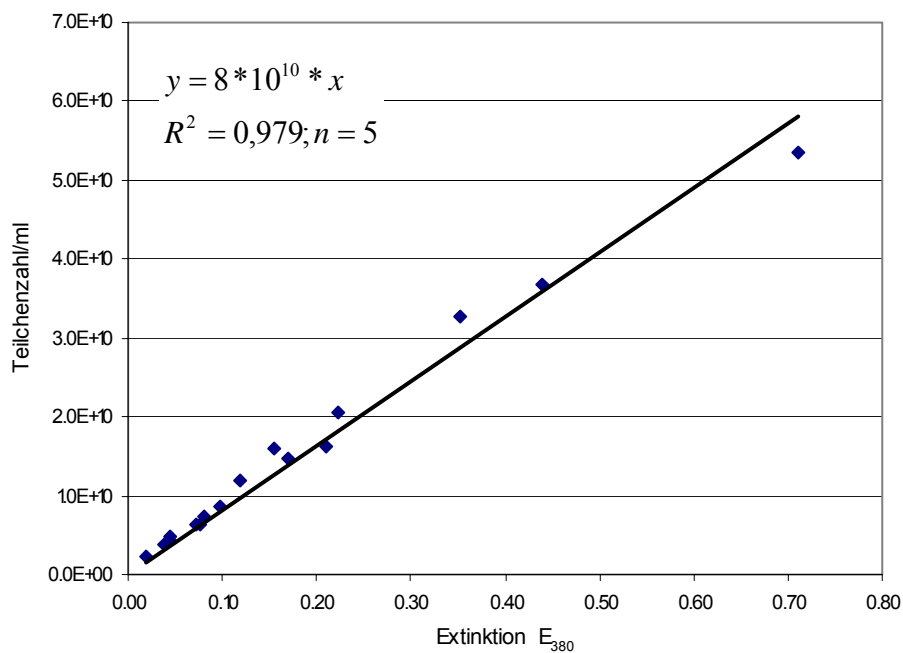


Abb. 18a: Kalibrierkurve für Printex 90 Agglomerate mit 100 nm Durchmesser

Da Titandioxid eine andere Extinktion bei 380 nm aufweist als Printex 90 wurde nach derselben Methode eine eigene Kalibrierkurve erstellt (Abb. 18b).

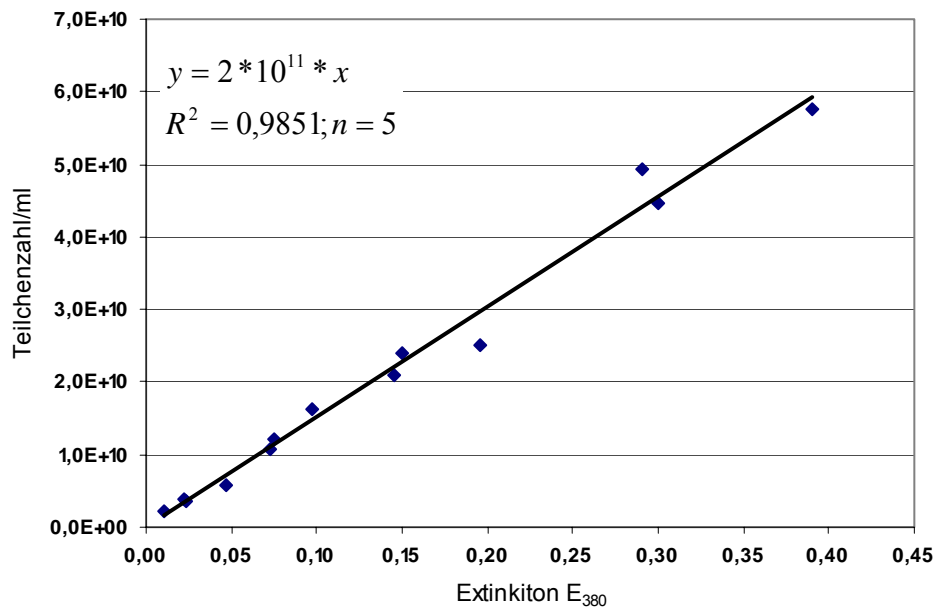


Abb. 18b: Kalibrierkurve für Titandioxid Agglomerate mit einem Durchmesser von 100 nm

Die beiden Regressionsgeraden der Kalibrierkurven für Printex 90 und Titandioxid sind mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,979 bzw. von 0,985 eine sehr gute Annäherung an den tatsächlichen Konzentrations-Extinktionsverlauf. Deswegen wurde für die Bestimmung der Anzahl der Teilchen aus der Extinktion die Geradengleichung der Regressionsgeraden verwendet (Tab. 5).

	Regressionsgeradengleichung
Printex 90	$y=8 \cdot 10^{10} \cdot x$
TiO ₂	$y=2 \cdot 10^{11} \cdot x$

Tab. 5: Formeln zur Berechnung der Teilchenkonzentration aus der Extinktion bei 380 nm

Siliziumdioxid ließ sich nur sehr schwer in Suspension bringen. Es war nur möglich $0,5 \cdot 10^9$ und $1 \cdot 10^9$ Teilchen/ml herzustellen. Da diese zwei Konzentrationen nur eine sehr geringe Extinktion aufwiesen, war es nicht möglich, eine Kalibrierkurve zu erstellen. Deswegen wurden diese Konzentrationen nur mit dem Malvern HPPS abgeschätzt.

2.2. Der Aufbau der modifizierten Langendorff-Apparatur

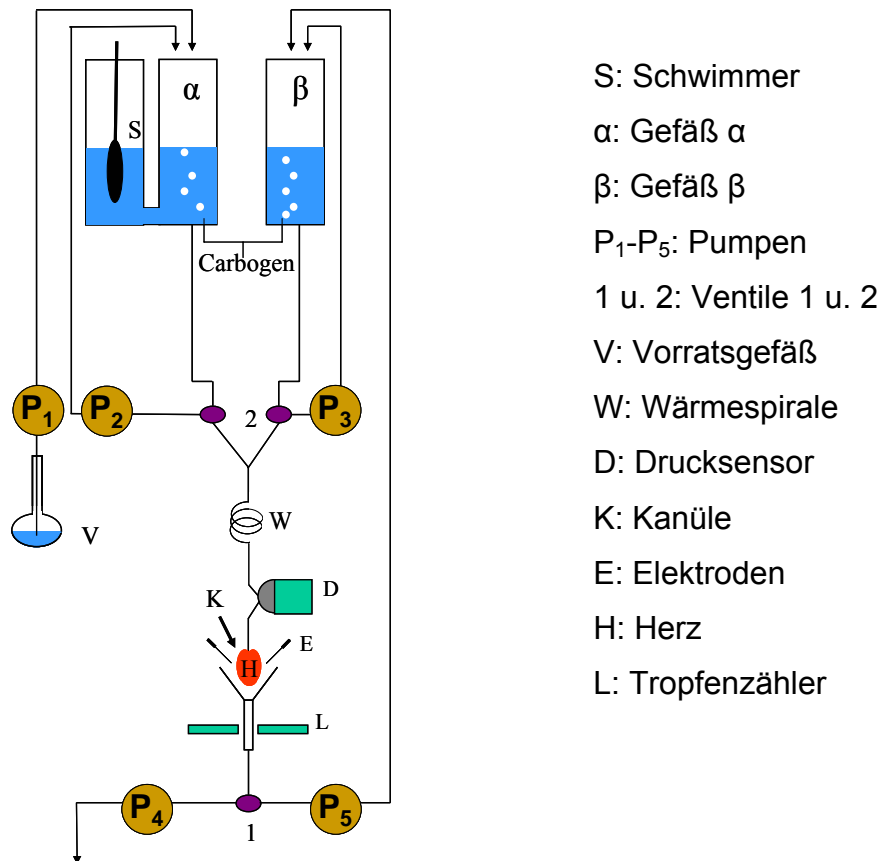


Abb. 19: Schematische Darstellung der verwendeten Langendorff-Apparatur

Abbildung 19 zeigt die verwendete, modifizierte Langendorff-Apparatur. Da Partikelsuspensionen nur in geringen Mengen herstellbar waren, konnten die Partikelsuspensionen nicht verworfen werden und mussten in das Vorratsgefäß zurückgepumpt werden. Die Anlage wurde mit zwei Perfusionswegen aufgebaut. Ein Gefäß (α) ist für die Lösung zum Auswaschen des Herzens und ein zweites (β) für die zirkulierende Lösung. In diesem (β) wurden dann die Partikel zugegeben. Beide Vorratsbehälter perfundierten das Herz mit einem artifiziiellen Blutdruck von 80 cm Wassersäule (hydrostatischer Druck). Eine Schlauchpumpe (P5) sorgte beim zweiten Perfusion-

weg für den nötigen Rücktransport der Nährlösungen. Pumpe 4 pumpte das Perfusat des Herzens während der Einlauf- und Auswaschphase in das Abfallgefäß. Während der Zirkulationsphase wurde mit dem Dreiwegeventil (1) auf den Perfusionskreislauf mit Pumpe 5 umgeschaltet. Pumpe 2 und Pumpe 3 ließen die Lösungen jeweils in dem gerade nicht im Experiment verwendeten Kreislauf α oder β zirkulieren, um sicherzustellen, dass die Leitungen immer mit sauerstoffgesättigter Lösung gefüllt waren. Ansonsten könnte es beim Umschalten auf den jeweils anderen Kreislauf zu einer Herzschiädigung durch sauerstoffverarmte Lösung kommen. Pumpe 1 wurde mittels einer Lichtschranke gesteuert und hielt das Niveau im Vorratsgefäß α konstant. Die Perfusionslösung wurde mittels zweier gegenläufig gekoppelter Dreiwegehähne (2) aus Kreislauf α oder β entnommen. Der nicht benutzte Kreislauf rezirkulierte. Anschließend wurde die Lösung in einer Wärmespirale (W) auf 37°C erwärmt und durchströmte dann das an der Kanüle K befestigte Herz (H). Ein Drucksensor (D) vor dem Herzen registrierte die durch die Kontraktion des Herzens hervorgerufenen Druckschwankungen. Die Vorratsgefäße beider Kreisläufe wurden mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

2.2.1. Die Lichtschranke für die Nachfüllautomatik

Der künstliche Blutdruck im Kreislauf β war stabil, da dort die Lösung nicht verbraucht, sondern konstant zirkuliert wurde.

Für den Kreislauf α ist dies nicht gegeben, da die Lösung verworfen wurde. Deswegen wurde eine über einen Schwimmer (S) gesteuerte Lichtschranke installiert, die die Pumpe 1 schaltet. Diese pumpte Perfusionslösung aus dem Vorratsgefäß V in das Gefäß α und hielt somit den Flüssigkeitsspiegel der Spüllösung konstant.

Ein Problem stellte jedoch die Schaumbildung in dem Vorratsgefäß dar, die durch die Durchströmung des BSA-haltigen Mediums mit Carbogen zustande kam. Auf Grund der Schaumbildung war der Schwimmer nicht auf der Lösungsoberfläche, sondern auf unterschiedlichen Höhen über dem gewünschten Schaltpunkt.

Daher wurde der Schwimmer (S) für die Lichtschranke nicht im selben Gefäß installiert, sondern in einem separaten, nicht durchströmten und parallel geschalteten Gefäß, das als kommunizierende Röhre den selben Flüssigkeitsspiegel hatte.

2.2.2. Der Tropfenzähler

Neben dem EKG und den Druckschwankungen des Perfusats, die durch die Kontraktionen des Herzens hervorgerufen werden, ist auch die Menge des Perfusats ein wichtiger Parameter für die Analyse der Herzfunktion. Um die Menge der das Herz durchströmenden Versuchslösung bestimmen zu können, wurde unter dem Trichter, der das Perfusat sammelte, eine Lichtschranke (L) angebracht. Die durch die Tropfen hervorgerufenen Lichtintensitätsänderungen wurden durch einen Phototransistor registriert, verstärkt und über den A/D - Wandler mittels der Powerlab Software auf einem Computer gespeichert. Danach konnte auf Grund der Tropfengröße von ca. 90 μ l und der Anzahl der aufgezeichneten Impulse pro Zeiteinheit der Perfusatsdurchsatz ermittelt werden. Die Lichtschranke arbeitete mit einem frequenzmoduliertem Infrarotsender, was diese weniger anfällig für fremde Lichtquellen machte.

2.2.3. Die Schaumbremse

Durch die Begasung der Perfusionslösung, die 1 % BSA enthält, mit Carbogen kam es zu einer intensiven Schaumbildung. Da der Schaum eine hohe Stabilität aufwies und nicht zerfiel, wäre während des Experiments die Lösung vollständig in Schaum umgewandelt worden. Daher wurde versucht, den Schaum aktiv abzubauen und als Lösung wieder zurück zu gewinnen. Dazu wurden in jedem Vorratsgefäß Plastiknetze angebracht, die die Schaumbläschen zum Platzen brachten.

2.3. Datenverarbeitung mit Labview

Mit der graphischen Datenflussprogrammiersprache Labview wurden zur Datenerfassung und Auswertung einige Programme geschrieben.

2.3.1. Datenerfassungsprogramm

Das erste von mir entwickelte Programm sollte den A/D-Wandler abfragen und die anliegenden Signale, nämlich EKG-Ableitungen, Druck und Temperatur, in einer Datei abspeichern.

In dem Flussdiagramm (Abb. 20) stellen die dicken Rahmen (1, 2, 3) Programmschleifen dar. Die kleinen Icons stehen für Rechenoperationen, die größeren für komplexere Funktionen, meist sogar für ganze Unterprogramme. Das Programm läuft von links nach rechts und von oben nach unten ab und folgt dabei den bunten Linien, die die einzelnen Rechenoperationen verbinden. Die Farbe der Linien gibt hierbei den Datentyp wieder (z.B. lassen blaue Linien nur ganze Zahlen als Parameter zu, während orange Linien reelle Zahlen akzeptieren). Daher spricht man bei dieser Art der Programmierung von einer graphischen Datenflussprogrammiersprache.

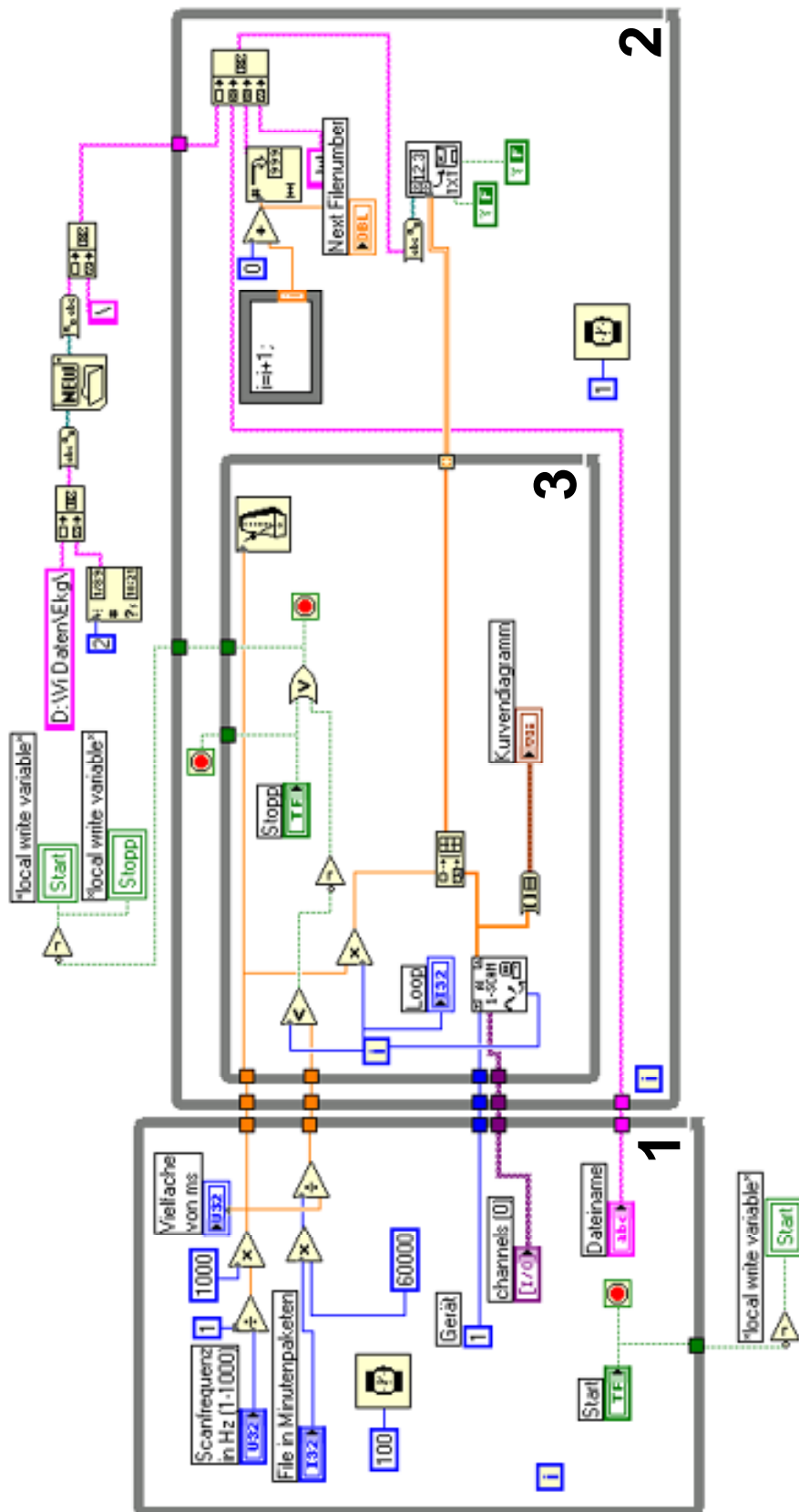


Abb. 20: Flußbild des Datenerfassungsprogramms

Das Datenerfassungsprogramm unterteilt sich in vier Hauptabschnitte:

- die Parameterübernahme vom Bildschirm
- die Datenabfrage vom A/D-Wandler
- die Darstellung der Daten auf dem Bildschirm
- die Datenspeicherung

Die linke Programmschleife (1) fragt die benötigten Parameter, die über die Tastatur eingegeben und auf dem Bildschirm dargestellt werden, und den „virtuellen Startknopf“ ab. Nach dem Betätigen des Startknopfes wird diese Schleife verlassen und mit dem eigentlichen Datenerfassungsprogramm (Schleife 2) begonnen. Die innere Schleife (3) digitalisiert bei jedem Durchlauf, die an den Eingängen anliegenden Spannungen, stellt diese in einem Kurvendiagramm auf dem Bildschirm dar und speichert die Werte in einem Array ab. Nach einer definierbaren Zeit werden mit dem nächsten Programmteil die Daten von diesem Array, unter dem bei der Parameter-eingabe vorgegebenen Namen, auf der Festplatte des Computers gespeichert und das Array gelöscht. An den Dateinamen wird noch zusätzlich eine, sich automatisch inkrementierende Zahl angehängt, damit jede Datei einen eindeutigen Namen erhält und keine Daten überschrieben werden. Diese inkrementierende Zahl bleibt auch bei einem Programmstopp erhalten. Erst beim Beenden des Programms und einem Neustart wird das Inkrement zurückgesetzt.

Als Datenerfassungszeit pro Datei wurde als Standardeinstellung eine Minute gewählt, um die spätere Handhabung der Messwerte zu erleichtern und einen Datenverlust bei einer Computerstörung zu reduzieren. Diese Zeit kann jedoch auf dem Bildschirm als Parameter geändert werden. Die Programmschleife (2) wird solange wiederholt, bis mit der Maus die Stopp-Taste auf dem Bildschirm gedrückt wird. Die Funktionen außerhalb der Schleifen werden bei Programmende ausgeführt. Die Funktion „local write variable“ dient dazu, alle benützten Schalter wieder in ihre Ausgangsstellung zu bringen, damit sie bei einem erneuten Programmstart wieder in die „on“ Stellung gebracht werden können. Einstellbare Parameter waren in diesem Programm die Anzahl der abzufragenden Eingangskanäle (maximal fünf), die Samplerrate, die Aufzeichnungsdauer für eine Datei, sowie der Dateiname.

In Abbildung 21 sieht man die Bildschirmdarstellung des Programms. Im oberen Bildschirmteil werden die erfassten Daten in Echtzeit dargestellt. In diesem Beispiel wur-

den nur zwei EKG-Ableitungen, weiß die I. Ableitung und rot die III. Ableitung nach Einthoven, der Druck (grün) und ein Markersignal (blau) für die einzelnen Phasen des Experiments aufgezeichnet. In einer weiterentwickelten Programmversion wurde zusätzlich noch das Signal des Tropfenzählers auf dem Bildschirm dargestellt. Die Bedienungsfläche des Datenerfassungsprogramms ist im unteren Viertel zu sehen. Hier können die Programmparameter und der Name der Datei, in der die Werte abgespeichert werden, vor dem Programmstart eingegeben werden.

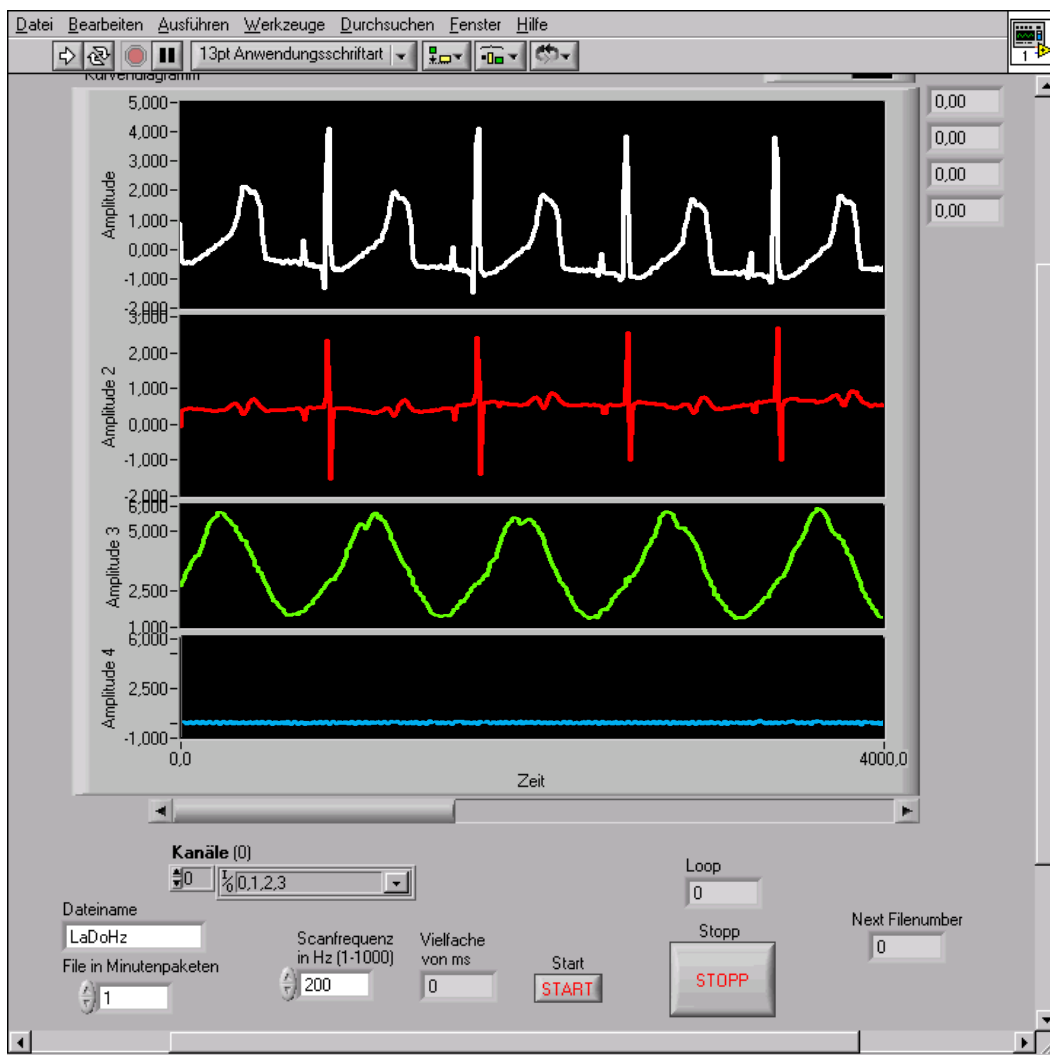


Abb. 21: Bedienungsfläche des Datenaufzeichnungsprogramms

Obwohl die Obergrenze der Digitalisierungsrate des verwendeten A/D-Wandlers (Typ PCI 6024E, National Instruments Germany GmbH, München/Deutschland) bei 1000 Hz pro Kanal liegt, ist es auf Grund der verwendeten Programmsubroutine, die die Datenabfrage steuert, nicht möglich, mit mehr als 200 Hz Signale aufzuzeichnen. Das EKG-Signal enthält auch Komponenten mit sehr steilen Flanken, wie den QRS-Komplex. Aus der Zeitdifferenz zwischen den Maxima der EKGs, den R-Zacken, wird die Herzfrequenz berechnet. Da der QRS-Teil nur eine Gesamtdauer von 10-15 ms hat, wird bei einer Digitalisierung des Signals alle 5 ms das Maximum und somit der Zeitpunkt der R-Zacke nicht mit genügender Zeitauflösung erfasst, um kleine Unterschiede der Zeit zwischen zwei Herzschlägen, der Herzratenvariabilität, zu registrieren.

Dies spielt jedoch beim isolierten Herzen keine Rolle, da die Verbindung zum Nervensystem unterbrochen ist. Somit stehen die regulatorischen Systeme, die normalerweise bei einer HRV-Analyse untersucht werden, nicht zur Verfügung. Für die Bestimmung der Herzfrequenz ist die Datenerfassungsrate von 200 Hz jedoch ausreichend, da sie hundert Mal höher als die Herzfrequenz liegt.

2.3.2. Herzfrequenzberechnungsprogramme

Zur Berechnung der Herzfrequenz wurden zwei Programme entwickelt.

Beide Programme lesen die einzelnen abgespeicherten Datenpakete nacheinander ein, bearbeiten sie und wechseln dann zum nächsten.

Das erste Programm nutzte die unterschiedlichen Anstiegssteilheiten der Komponenten des EKGs. Die QR- und RS-Flanken haben im EKG die größte Steigung. Die P-Welle hat eine ähnliche Dauer wie der QRS-Komplex, aber eine wesentlich kleinere Amplitude und daher eine geringere Steigung. Die T-Welle dauert im Vergleich zu diesen beiden sehr lange und hat daher eine noch geringere Steigung. Auf Grund dieser unterschiedlichen Steigungen und Amplituden konnte das Programm die R-Zacken eindeutig identifizieren, wahlweise mit der aufsteigenden oder mit der absteigenden Flanke. Aus dem Zeitintervall zwischen zwei R-Zacken wurde die Herzfrequenz bestimmt.

In Abbildung 22 sieht man die Oberfläche des automatischen Frequenzberechnungsprogrammes. In einem Kurvendiagramm ist das Ergebnis dargestellt. In den Eingabefeldern werden der Dateiname und die einzelnen Dateinummern angegeben, aus denen die Herzfrequenz berechnet werden soll.

Um auch bei einem schlechten Signal-Rauschverhältnis noch eine gute Erkennungsrate zu haben, war der Anstieg der Flanke der R-Zacke als Parameter „*Level it 1. EKG*“ zur Anpassung an das jeweilige EKG frei wählbar. Zusätzlich wurde ein Zeitfenster einprogrammiert, das nach dem erfolgreichen Erkennen einer R-Zacke für eine definierbare Zeit die Erkennung abschaltete. Dieser Wert wird im Feld „*Abstand Peaks*“ eingegeben. Da dieser Parameter mit der Herzfrequenz variiert, wurde auch er als frei wählbar programmiert. Hierbei ist aber zu bedenken, dass nur für einen bestimmten Zeitrahmen des Parameters das Programm richtig arbeitet. Wird diese Zeit zu groß gewählt, so werden die nächste oder sogar mehrere R-Zacken nicht erfasst. Aus den Einzelwerten der Zeitabstände der R-Zacken wurde dann das Mittel über einen Zeitraum von einer Minute ermittelt und daraus die Herzrate berechnet.

Um Messartefakte bei der Frequenzermittlung auszuschließen, wurden nur Änderungen kleiner 25 % zum vorhergehenden Wert zugelassen. Der große Vorteil dieses Programms ist die vollständige Automatisierung der Auswertung. Mit den wenigen Eingaben liefert es innerhalb von wenigen Minuten eine Aussage über den Verlauf der Herzfrequenz während des gesamten Experiments.

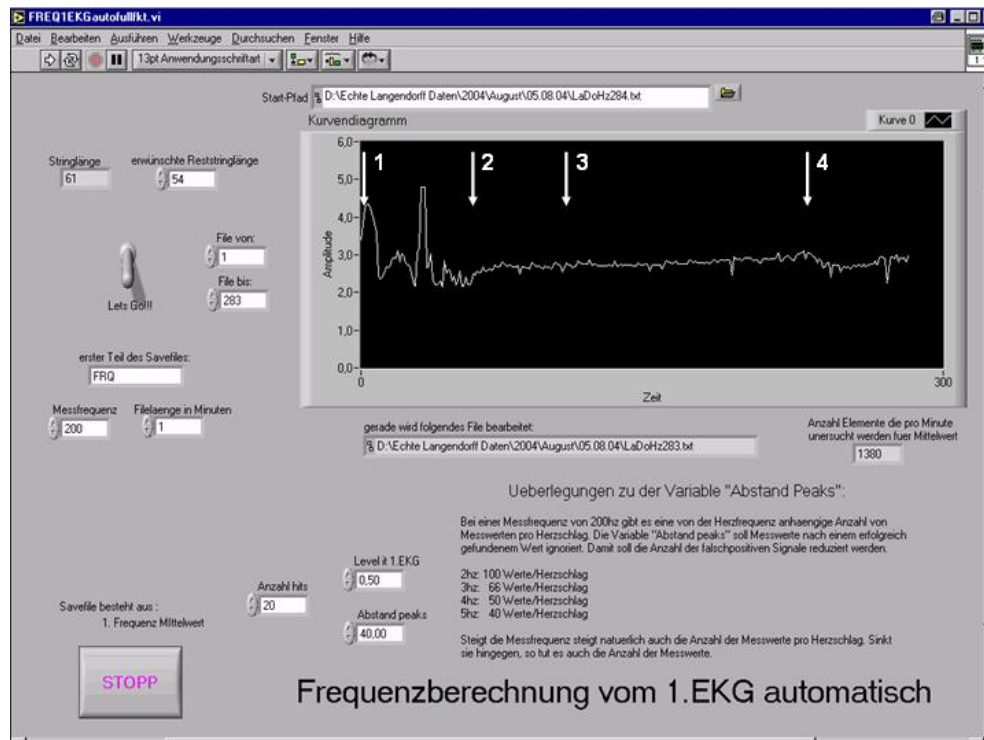


Abb. 22: Bedienungsfläche des ersten Programms

Dieses Programm ist nicht nur auf unsere Versuchsparameter zugeschnitten, es kann auch beliebige andere Experimente unterschiedlicher Länge und Abstraten auswerten. Um die Berechnung noch zu beschleunigen, wurde die Option hinzugefügt, nur eine vorwählbare Anzahl von R-Zacken pro Minute zu bestimmen und daraus die Herzrate zu berechnen. Das Programm sichert die berechneten Daten in einer Textdatei, damit diese in ein Tabellenkalkulationsprogramm importiert und graphisch dargestellt werden können.

Im Kurvendiagramm der Benutzeroberfläche (Abb. 22) sieht man die Auswertung eines typischen Experiments:

In der Auswaschphase schwankte die Herzfrequenz stark (Pfeil 1 bis 2), während der Zirkulation stabilisierte sie sich (Pfeil 2 bis 3). Anschließend stieg die Herzfrequenz durch den Einfluss der UFT (Pfeil 3 bis 4) und sank während der Auswaschphase ab (ab Pfeil 4).

Der große Vorteil dieses automatisierten Programms, abgesehen von der Geschwindigkeit, liegt in der besonderen R-Zacken-Erkennung. Wir konnten beobachten, dass sich das EKG unter Einfluss von UFT teilweise stark veränderte. Die Amplitude der

R-Zacke wurde kleiner und gleichzeitig stieg die der T-Welle an. Wenn die R-Zacken-Erkennung jedoch anders als in diesem Programm mittels eines Schwellenwerts arbeitet, d. h. Werte, die größer als der Schwellenwert sind, als R-Zacke definiert, kann dies zu Fehlern führen. Wenn die Amplitude der T-Welle diesen Schwellenwert übersteigt, wird sie ebenfalls als R-Zacke erkannt. Durch die Berechnung und Analyse der Steigungen der EKG-Komponenten in meinem Programm wird dies vermieden.

Das zweite von mir entwickelte Frequenzanalyseprogramm (Abb. 23 und 24) wurde auf die Detailanalyse hin optimiert. Dies ist vor allem nötig geworden, da es bei unseren lang laufenden Experimenten manchmal vorkam, dass durch die Herzbewegungen der Kontakt zu einzelnen Elektroden kurzzeitig unterbrochen war. Das erste Programm konnte eine solche Störung nicht bearbeiten und liefert in dieser Zeitspanne falsche Ergebnisse, die aber im Frequenzverlauf als solche erkannt werden konnten. Um diese Experimente nicht verwerfen zu müssen, konnte man diese Bereiche im Detail mit dem zweiten Programm untersuchen und eine EKG-Ableitung zur Auswertung wählen, die zu dem fraglichen Zeitpunkt ein gutes Signal liefert. Mit dem Programm 2 kann jedes Datenpaket, das während des Experimentes durch das Erfassungsprogramm abgespeichert wurde, einzeln analysiert werden. Pro Zeitfenster der gesicherten Daten kann der Benutzer einen Schwellenwert zur Bestimmung der R-Zacken festlegen. Das Programm definiert alle zusammenhängenden Werte über diesem Wert als eine R-Zacke und bestimmt die Zeitpunkte des Überschreitens und Unterschreitens. Daraus wird die Zeit zwischen diesen Werten berechnet, durch zwei dividiert und anschließend zu dem Wert des Überschreitens des Schwellenwerts addiert. Danach wird dieser Wert als Zeitpunkt des Auftretens der R-Zacke abgespeichert. Dies ist möglich, da das Signal symmetrisch ist. Hierfür ist es wichtig darauf zu achten, nur EKG-Teile mit diesem Programm auszuwerten, bei denen durch die UFT noch keine so starken Veränderungen verursacht wurden, dass andere EKG-Komponenten eine größere Amplitude als die R-Zacke bekommen haben, da sonst andere EKG-Elemente auch als R-Zacke interpretiert würden.

In Abb. 24 ist die Bildschirmdarstellung des Programms gezeigt. Es gibt auch hier die Option, die Herzrate als Mittel über einen einstellbaren Zeitraum darzustellen.

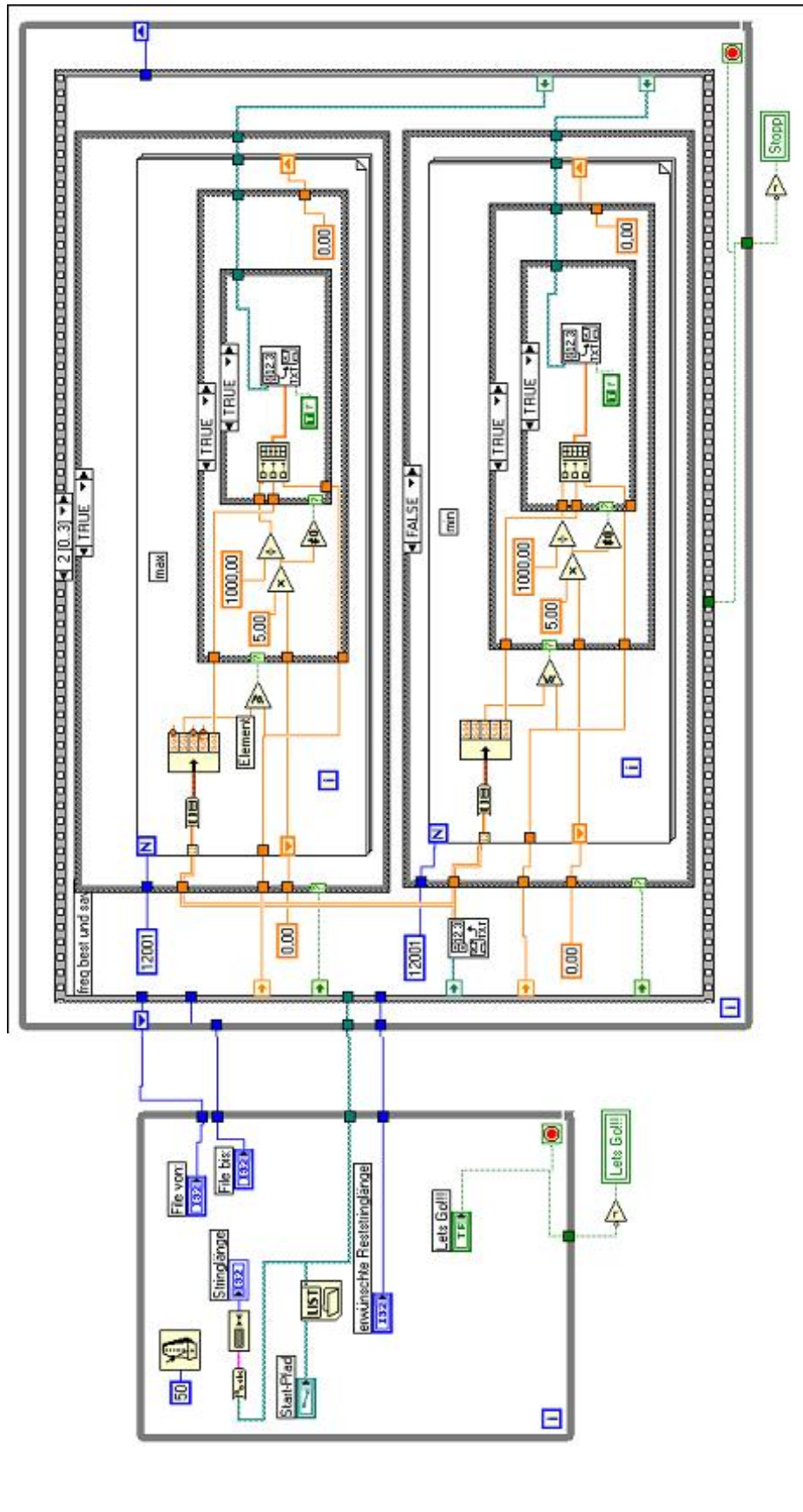


Abb. 23: Flußbild des zweiten Programms

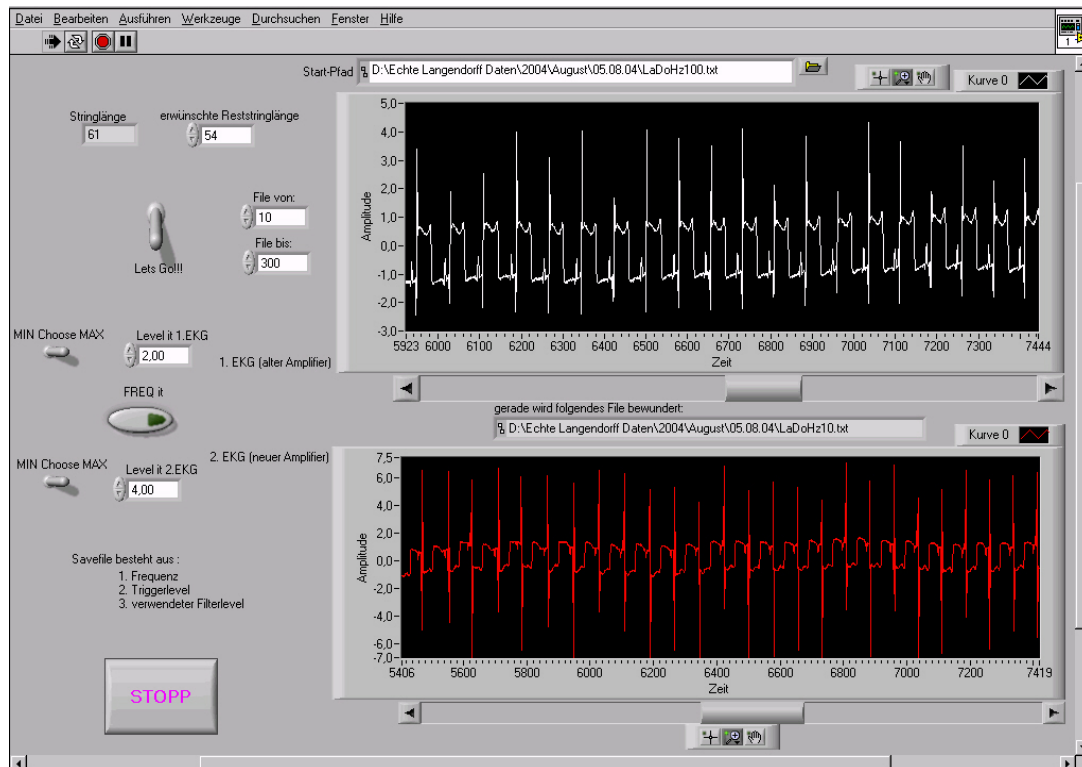


Abb. 24: Bildschirmdarstellung des zweiten Auswertprogramms

Im oberen Teil der Bedienfläche kann zu Beginn der Auswertung neben dem Experiment auch noch der Zeitrahmen (von/bis), in dem die Auswertung stattfinden soll, gewählt werden. Für die beiden EKGs können zwei unterschiedliche Schwellenwerte gesetzt werden, für das obere „*Level it 1.EKG*“ und für das untere „*Level it 2.EKG*“. Bei beiden Analysen kann mittels eines Schalters die Über- oder Unterschreitung des Schwellenwerts als Zählereignis bestimmt werden.

Die beiden Diagramme in Abbildung 24 stellen die gerade auszuwertenden EKG-Kurven dar. Die EKG-Kurven sind Ableitungen nach Einthoven, das weiße EKG ist Ableitung I und das rote EKG Ableitung III.

Für diese kann hier die Herzfrequenz gleichzeitig ausgewertet werden und somit ist bei Signalverlust eines EKGs die Herzfrequenz trotzdem bestimmbar. Zusätzlich fallen Unterschiede der EKG-Formen zwischen den verschiedenen Ableitungen optisch besser auf.

2.3.3. Sonstige (eigene) Hilfsprogramme

Es wurden noch weitere Utility Programme von mir mit Labview geschrieben, mit denen die Handhabung der großen Datenmengen erleichtert wurde (Datenzusammenfügungs-, Datenzerlegungsprogramme sowie ein Konvertierungsprogramm für Komma zu Punkt).

Wenn Experimente, die mit meinem Programm aufgezeichnet wurden, das in Labview programmiert wurde, mit dem kommerziellen Programm „Powerlab“ ausgewertet werden sollen, müssen die einzelnen Dateien zu einer Datei zusammengefasst werden. Dafür habe ich das Datenzusammenfügungsprogramm geschrieben. Das Konvertierungsprogramm, das Komma durch Punkt ersetzt, war notwendig, da wir sowohl englisch- als auch deutschsprachige Tabellenkalkulationsprogramme verwendet haben. Für kurze Auswertungen (Mittelwerte des ersten Frequenzanalyseprogramms) ist die Darstellung in MS Excel einfach und bequem. Wenn man aber eine detaillierte Analyse mit dem zweiten Programm durchführt, übersteigt die Datenmenge die von Excel unterstützte Zellenanzahl. Für die Darstellung der Ergebnisse des Auswertprogramms 2 verwendeten wir das Programm Sigmaplot (SYSTAT Software Inc.), das sehr viele Werte als Graphik darstellen kann. Mit Excel stößt man bei 65536 Zeilen an seine Grenzen, bei Sigmaplot haben wir diese auch mit unseren längsten Experimenten (155000 Zeilen) nicht erreicht. Dafür mussten aber die Daten auf die englische Notation konvertiert werden (Komma zu Punkt).

Mit den Datenzusammenfügungs- und Datenzerlegungsprogrammen ist es zum Beispiel möglich, das bei der Datenerfassung gewählte Zeitfenster nachträglich zu ändern. Dadurch ergaben sich vor allem für das zweite Auswertprogramm weitere Auswertmöglichkeiten. Im ersten Schritt war es nur möglich Mittelwerte der Herzrate über einen Zeitraum zu berechnen, der beim Abspeichern der Daten gewählt wurde. Das Auswertprogramm kann nur über die gerade eingelesene Datei mitteln. Durch das automatisierte Zusammenfügen und Zerlegen der abgespeicherten Daten war es möglich, den Zeitraum, über den gemittelt werden sollte, nachträglich zu ändern.

2.4. Auswertung der Langendorff-Experimente

Die Herzfrequenz aller Experimente wurde mit den eigenen Programmen und denen von „AD Instruments“ ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in einem Diagramm als Minutenmittelwerte dargestellt. Zu Beginn der Experimentreihe wurde mittels Kontrollversuchen überprüft und bestätigt, dass das Herz innerhalb des experimentellen Zeitrahmens stabil schlägt. In Abb. 25 ist ein solches Kontrollexperiment zu sehen.

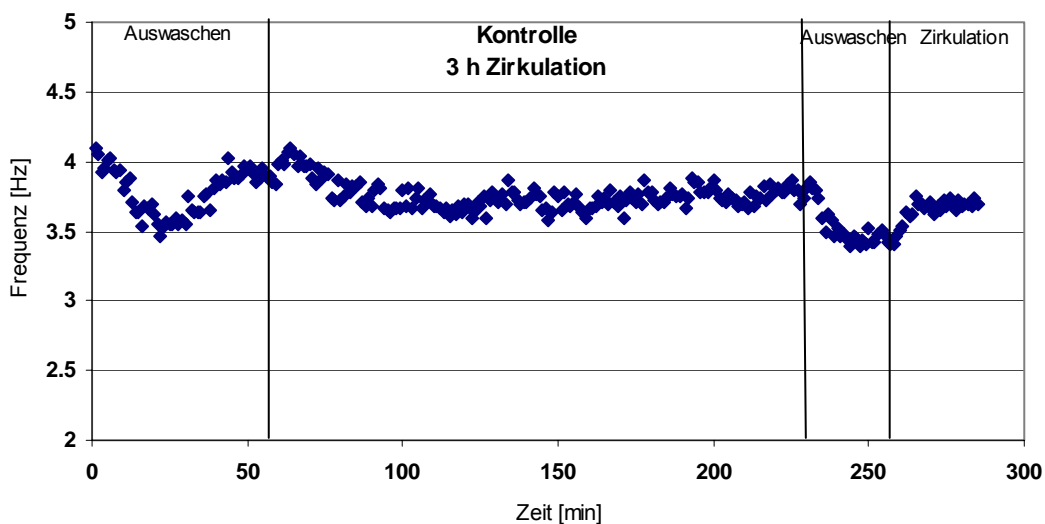


Abb. 25: Kontrollexperiment: 3 h Zirkulation ohne Teilchen

In Abb. 26 wird ein typischer Experimentverlauf gezeigt. Die Kontrollphase besteht aus der ersten Stunde der Zirkulation und wird als Referenz für die beiden anderen Phasen verwendet. Somit beinhaltet jedes Experiment seine eigene Kontrolle. Das Herz wird mit ultrafeinen Teilchen einer bestimmten Konzentration für eine Stunde durchströmt, anschließend für eine weitere Stunde mit der doppelten Teilchenzahl. Diese beiden Phasen werden im Folgenden „UFT 1“ und „UFT 2“ genannt.

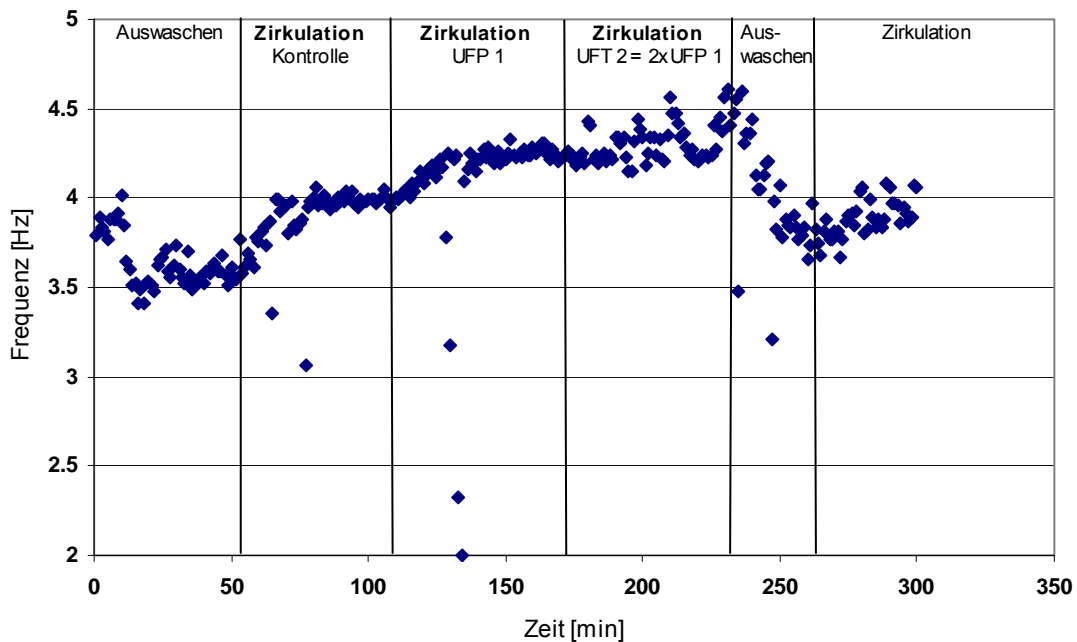


Abb. 26: Typischer Frequenzverlauf eines UFT-Experiments. Die Herzfrequenz ist als Minutenmittelwert dargestellt

Zur Berechnung der Herzfrequenzveränderungen wurde die Herzrate während der letzten zwei Minuten der Zirkulationsphase, der Phase 1 (1 Stunde Perfusion mit der Teilchenkonzentration UFT 1) und der Phase 2 (Perfusion mit der doppelten Teilchenkonzentration UFT 2 (= 2*UFT 1)) gemittelt. Zur statistischen Auswertung wurden diese Werte mittels eines gemischt linearen Multilevel-Regressionsmodells auf ihre Signifikanz gegenüber der Kontrolle hin untersucht. Diese Auswertung wurde dankenswerterweise von Dr. P. Reitmeir (GSF-Institut für Gesundheitsökonomie) durchgeführt.

2.4.1. Einfluss der Modellpartikel auf die Herzfrequenz

Zur Überprüfung der Hypothese, dass ultrafeine Teilchen einen direkten Einfluss auf das Herz ausüben, wurden mit Printex 90, Titandioxid und Siliziumdioxid Experimente mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Jedes dieser Experimente wurde sechsmal wiederholt.

Unter dem Einfluss der ultrafeinen Teilchen konnte ein Frequenzanstieg beobachtet werden. In Tabelle 6 sind die prozentualen Frequenzanstiege der Herzfrequenz für die verschiedenen Materialien und Konzentrationen aufgelistet.

Konzentration [Teilchen/ml]	Herzfrequenzanstieg in % nach einer Stunde durch		
	P 90	TiO ₂	SiO ₂
0,5*10 ⁹			4,0 ± 2,68
0,8*10 ⁹	2,05 ± 1,36	2,3 ± 1,4	
1,0*10 ⁹		2,45 ± 2,3	
1,6*10 ⁹	2,43 ± 1,38		
2,0*10 ⁹		5,96 ± 2,8	
4,0*10 ⁹	5,27 ± 2,03		

Konzentration [Teilchen/ml]	Herzfrequenzanstieg in % nach zwei Stunden durch		
	P 90	TiO ₂	SiO ₂
1,0*10 ⁹			7,0 ± 1,9
1,6*10 ⁹	4,32 ± 1,10	6,2 ± 1,75	
2,0*10 ⁹		4,1 ± 2,34	
3,2*10 ⁹	8,2 ± 2,20		
4,0*10 ⁹		13,7 ± 2,91	
8,0*10 ⁹	15,23 ± 2,61		

Tab. 6: Prozentualer Anstieg der Herzfrequenz nach einer und zwei Stunden unter Einfluss der verschiedenen Materialien und Konzentrationen

2.4.1.1. Printex 90

Mit steigender Konzentration an Printex-90-Teilchen nahm die Herzfrequenz zu. In Abbildung 27 sind die Frequenzanstiege nach einer Stunde Perfusion mit den Teilchen zusammengefasst. Hierbei war erst der Frequenzanstieg, der durch $4 \cdot 10^9$ Partikel/ml hervorgerufen wurde, signifikant gegenüber der Kontrolle. Wenn man nach einer Stunde jeweils die Teilchenkonzentration verdoppelte, waren die Anstiege deutlich stärker und alle signifikant gegenüber der Kontrolle (Abb. 28).

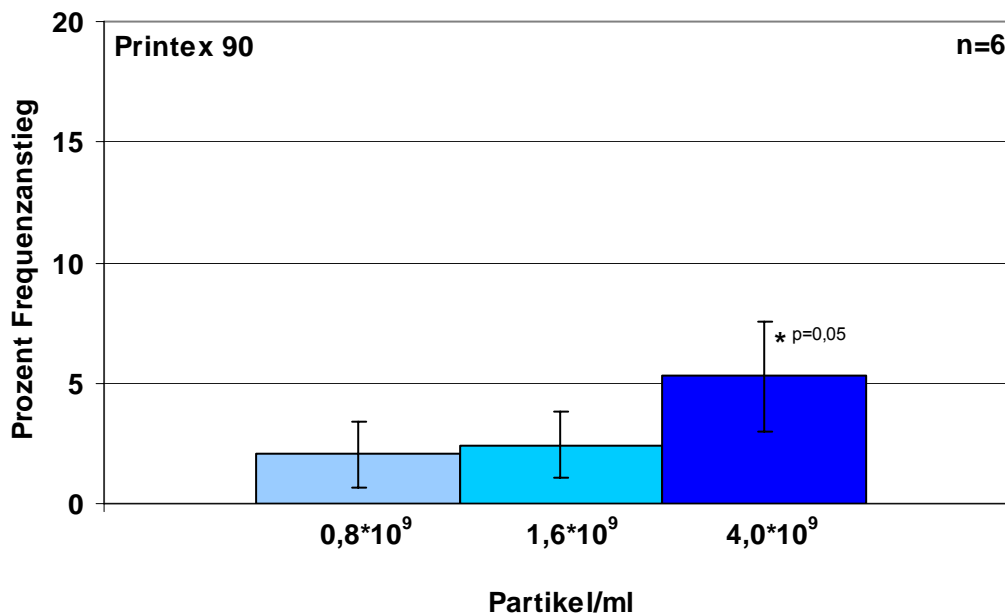


Abb. 27: Prozentuale Herzfrequenzsteigerung gegenüber der Kontrolle durch Printex 90 nach einer Stunde

(MW \pm SE; n=6); * signifikant gegenüber Kontrolle

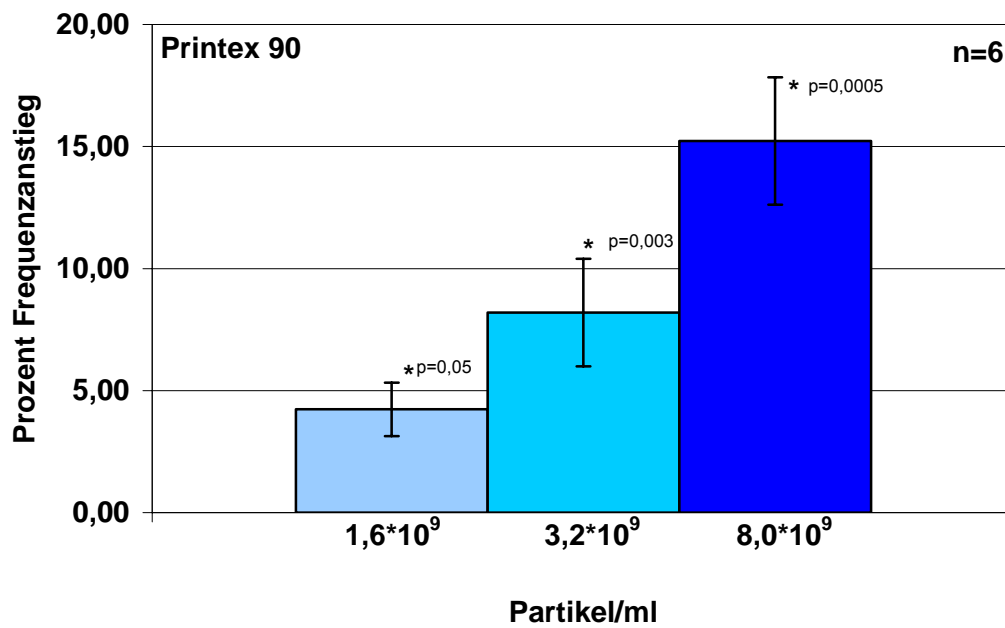


Abb. 28: Prozentuale Herzfrequenzsteigerung gegenüber der Kontrolle durch Printex 90 nach zwei Stunden, wobei während der ersten Stunde mit der halben Konzentration perfundiert wurde (MW ± SE; n=6); * signifikant gegenüber Kontrolle

Vergleich man den Frequenzanstieg, den $1,6 \cdot 10^9$ Teilchen/ml (UFT 1) nach einer Stunde bewirkten, mit dem, den die Teilchen (UFT 2) hervorriefen, wenn vorher für eine Stunde das Herz mit der halben Konzentration ($0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml) durchströmt wurde, so war unter dieser Bedingung der Anstieg fast doppelt so hoch (Abb. 29).

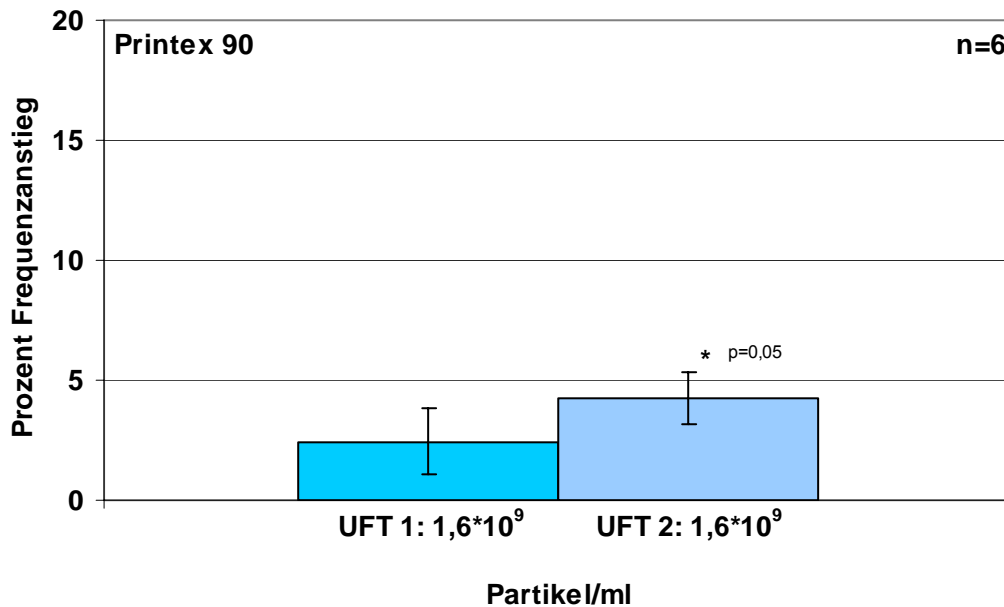


Abb. 29: Gegenüberstellung der Frequenzsteigerung zweier Experimentreihen;
Links: Frequenzerhöhung durch $1,6 \cdot 10^9$ Teilchen/ml Printex 90 nach 1 Stunde;
Rechts: Frequenzerhöhung durch diese Konzentration nach 2 Stunden, wobei in der ersten Stunde das Herz mit $0,8 \cdot 10^9$ Teilchen/ml perfundiert wurde;
(MW ± SE; n=6); * signifikant gegenüber Kontrolle

2.4.1.2. Titandioxid (TiO₂)

Analog zu Printex 90 wurde auch die Wirkung von Titandioxid-Teilchen mit drei verschiedenen Konzentrationen untersucht. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse dargestellt. Auch hier war die Frequenzerhöhung konzentrationsabhängig.

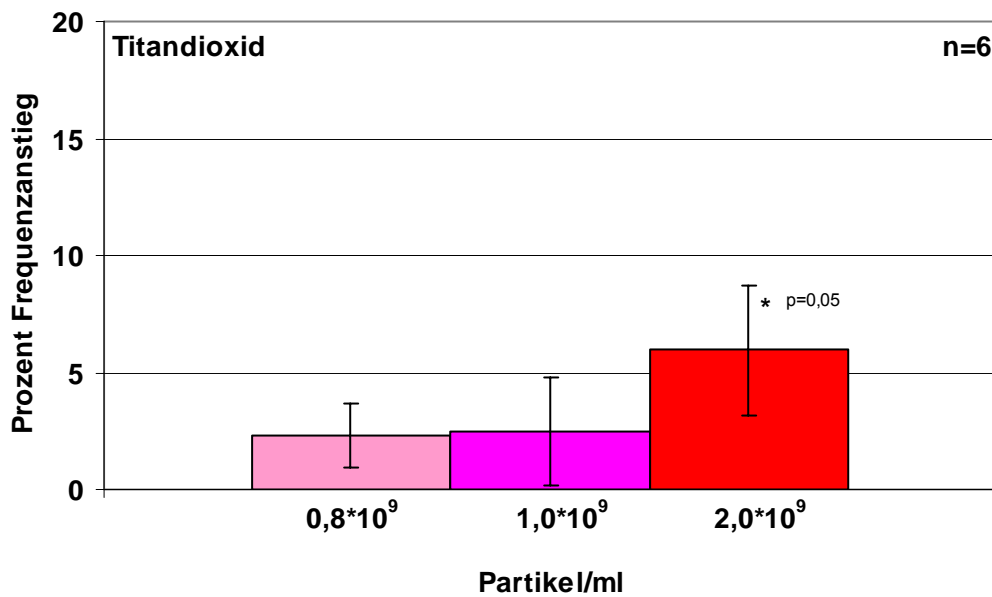


Abb. 30: Prozentuale Herzfrequenzsteigerung gegenüber der Kontrolle durch TiO₂ nach einer Stunde (MW ± SE; n=6); * signifikant gegenüber der Kontrolle

Wenn man die Frequenzveränderungen nach zweistündiger Perfusion mit TiO₂ Teilchen zusammenstellt (Abb. 31) fiel auf, dass der Anstieg bei der Konzentration 2,0*10⁹ Partikel/ml unter dem Anstieg der Konzentration 1,6*10⁹ Partikel/ml lag. Obwohl der Anstieg von 4,1 % signifikant gegenüber der Kontrolle ist, unterschied er sich nicht signifikant von den Ergebnissen mit 1,6*10⁹ Partikel/ml. Möglicherweise handelte es sich bei TiO₂ um eine zweiphasige Wirkung.

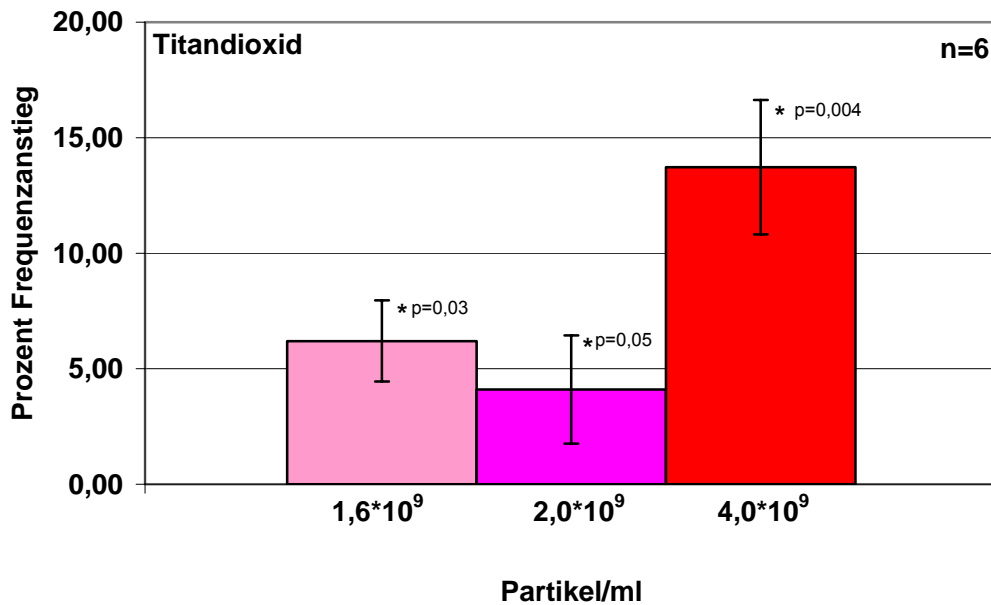


Abb. 31: Prozentuale Herzfrequenzsteigerung durch TiO_2 nach zwei Stunden gegenüber der Kontrolle (MW \pm SE; n=6); * signifikant gegenüber der Kontrolle

2.4.1.3. Siliziumdioxid (SiO_2)

SiO_2 war im Gegensatz zu Printex 90 und TiO_2 nur sehr schwer zu suspendieren. Dies gelang nur bis zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ Teilchen/ml. Daher wurden nur Versuche mit $0,5 \cdot 10^9$ und $1 \cdot 10^9$ Teilchen/ml durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^9$ Teilchen/ml ein Frequenzanstieg von 4 % und bei $1 \cdot 10^9$ Teilchen/ml ein Frequenzanstieg von 7 %, letzterer mit einer Signifikanz $p=0,003$ gegenüber der Kontrolle. Die Verwendung von anderen Detergenzien als BSA war nicht möglich, da die Experimentierlösung den physiologischen Bedingungen sonst nicht mehr genügt hätte.

2.4.2. Materialabhängige Betrachtung der Herzfrequenzänderungen

Die Experimente zeigten eindeutig, dass der Frequenzanstieg neben der Abhängigkeit von der Teilchenkonzentration auch materialabhängig war. Bei der kleinsten von mir verwendeten Konzentration von $0,8 \cdot 10^9$ Teilchen/ml stieg unter Einfluss von Printex 90 nach einer Stunde die Frequenz um 2,05 %, unter Einfluss von TiO_2 um 2,3 %. Der Frequenzanstieg durch Printex 90 war gegenüber dem durch TiO_2 um 0,25 % niedriger. Nach einer Stunde Perfusion mit $2 \cdot 10^9$ Teilchen/ml TiO_2 betrug der Frequenzanstieg 5,96 %, bei der doppelten Konzentration Printex 90 ($4,0 \cdot 10^9$ Teilchen/ml) jedoch nur 5,27 %. SiO_2 führte schon bei einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^9$ Teilchen/ml zu einem Anstieg von 4 %. Dies zeigt, dass für die Wirkung neben der Teilchenzahl auch das Material ein wichtiger Parameter ist.

Die Ergebnisse des Frequenzanstiegs nach der ersten Stunde in Abhängigkeit der Materialien und Konzentrationen sind in der Abbildung 32 zusammengefasst. Dabei wird deutlich, dass Siliziumdioxid den größten Frequenzanstieg bewirkt, gefolgt von Titandioxid und Printex 90.

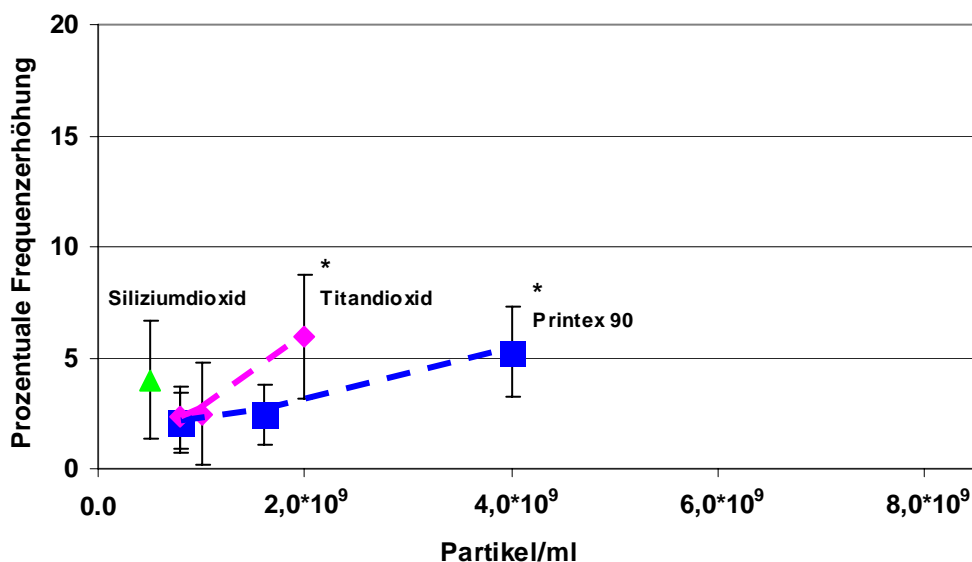


Abb. 32: Frequenzanstieg durch UFT 1 nach einer Stunde Perfusion in Abhängigkeit des Materials und der Partikelkonzentration ; (MW \pm SE; n=6); * signifikant gegenüber der Kontrolle

Nach zwei Stunden Perfusion, in der ersten Stunde jedoch nur mit der halben Konzentration, stieg unter dem Einfluss von P 90 innerhalb der zweiten Stunde die Herzfrequenz um 4,3 % gegenüber der Kontrolle, während dieselbe Teilchenzahl TiO_2 die Herzfrequenz um 6,3 % erhöhte. Bei höheren Konzentrationen ist die stärkere Wirkung von Titandioxid noch offensichtlicher. $4,0 \cdot 10^9$ Teilchen Titandioxid führten in etwa zu dem gleichen Frequenzanstieg wie $8,0 \cdot 10^9$ Partikel Printex 90. Diese Werte waren gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Die Frequenzerhöhungen innerhalb der zweiten Stunde ergaben dieselbe Reihenfolge der Wirksamkeit (Abb. 33) wie nach einer Stunde.

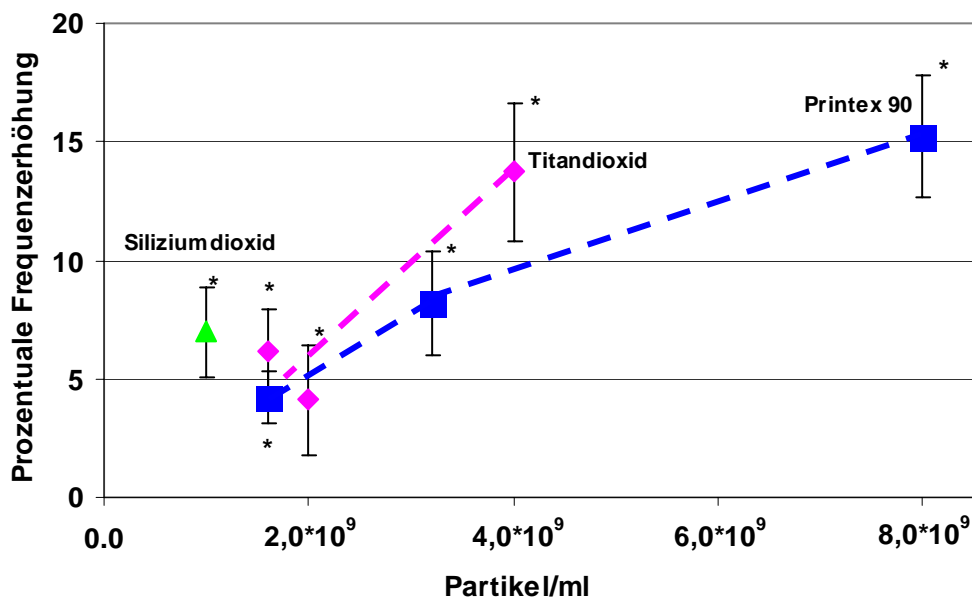


Abb. 33: Frequenzanstieg durch UFT 2 nach zwei Stunden in Abhängigkeit des Materials und der Partikelkonzentration gegenüber der Kontrolle. In der ersten Stunde wurde das Herz jeweils mit der halben Konzentration durchströmt. (MW ± SE; n=6); * signifikant gegenüber der Kontrolle

Diese Versuche zeigten eine verstärkte Wirkung der Teilchen nach zweistündiger Perfusion.

2.4.3. Arrhythmien

Unter Arrhythmien versteht man eine Störung der Reizbildung oder Reizleitung. Sie werden durch Unregelmäßigkeiten bei der Erregungsbildung im Sinusknoten, bzw. bei der Weiterleitung dieses Signals im Herzen ausgelöst.

Im Verlauf der Partikelexposition wurden verschiedene Typen von Arrhythmien beobachtet. Der Auftrittszeitpunkt der verschiedenen EKG-Veränderungen war von der Teilchenkonzentration und dem verwendeten Material abhängig. Gefunden wurden Extrasystolen, Erhöhungen und Absenkungen der ST-Strecken, QT-Verlängerungen und AV-Blocks.

Extrasystolen sind zusätzliche Herzschläge außerhalb des normalen Rhythmus.

ST-Strecken-Erhöhungen und -Absenkungen deuten auf einen Infarkt der Ventrikel hin. Auf einen Infarkt folgt immer eine Erhöhung der ST-Strecke.

Eine Senkung hingegen kann auf einen Infarkt hindeuten, muss es aber nicht, da ST-Senkungen unspezifisch sind. QT-Verlängerungen weisen auf eine Störung des Reizleitungssystems der Ventrikel hin. AV-Blöcke gibt es in drei verschiedenen Abstufungen, von einer leichten Störung der Reizleitung vom Sinusknoten zum AV-Knoten bis hin zur vollständigen Blockade der Reizleitung zwischen den beiden Knoten.

In den Abbildungen 34 (a-e) und 35 sind verschiedene Arrhythmien im Vergleich zu einem normalen EKG aus einer Kontrollphase gezeigt.

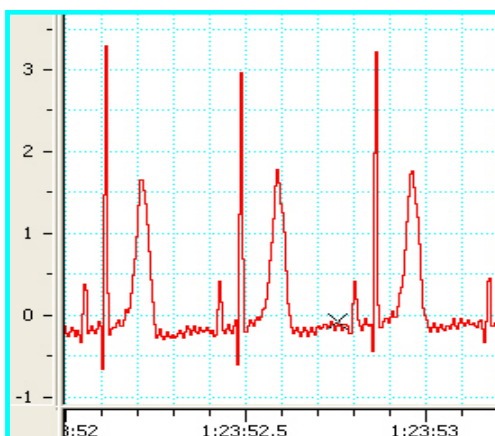


Abb. 34a: Normales EKG (Kontrolle)

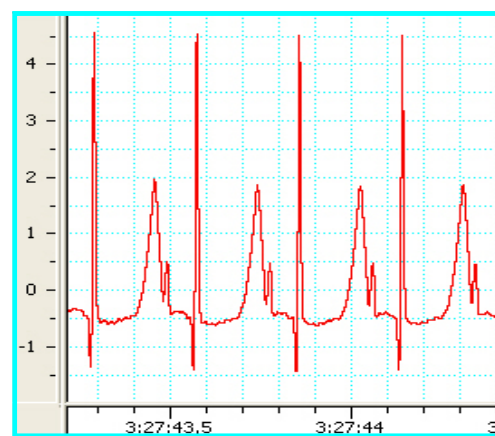


Abb. 34b: QT-Streckenverlängerung

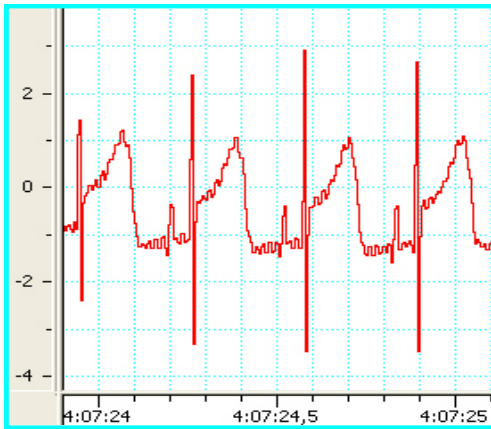


Abb. 34c: ST-Streckenerhöhung

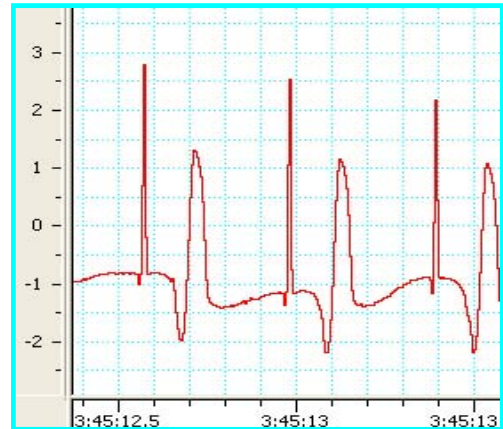


Abb. 34d: ST-Streckensenkung

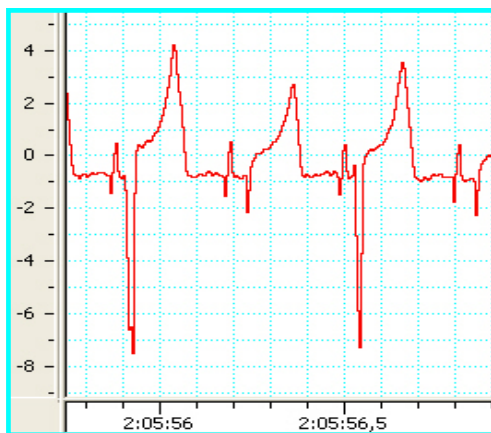


Abb. 34e: Extrasystole

In Abbildung 35 ist ein AV-Block dritten Grades dargestellt. Deutlich kann man die wandernde P-Welle sehen, die nicht mehr mit dem QRS-Komplex gekoppelt ist. Bei jedem Herzschlag kommt sie etwas früher als im vorhergehenden. Im dritten Herzschlag des unteren Bildes hat es den Anschein, als ob die P-Welle nicht vorhanden wäre. Hier ist davon auszugehen, dass sie zufällig mit dem QRS-Komplex zusammengefallen und somit nicht mehr als eigenständige Welle erkennbar ist.

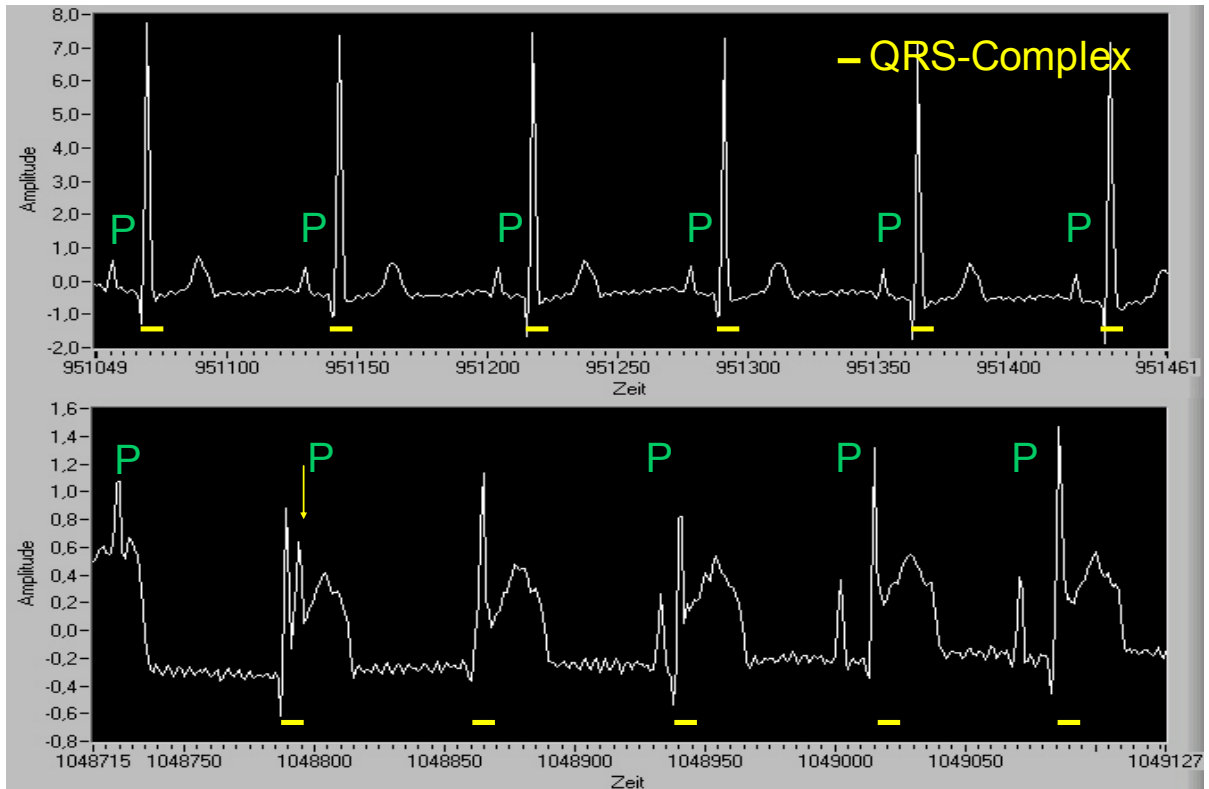


Abb. 35: EKG mit AV-Block dritten Grades (unten) im Vergleich zu einem normalen EKG (oben)

Diese Störungen sind regelmäßig einige Zeit nach Zugabe von UFT aufgetreten. Der Zeitpunkt war vom Material und der Konzentration der UFT abhängig, erfolgte aber immer erst nach einer Erhöhung der Herzfrequenz. Zuerst kam es zu einer ST-Streckenerhöhung. Bei vielen Experimenten trat deutlich später ein AV-Block auf. Wenn es zu einer Blockade kam, dann handelte es sich immer um einen AV-Block dritten Grades.

Extrasystolen waren mit den uns zur Verfügung stehenden Auswertprogrammen sehr schwer zu erkennen und zu klassifizieren. Bereiche, in denen die Software eventuelle Extrasystolen erkannte, wurden auf dem Bildschirm dargestellt und „per Auge“ analysiert. Sie traten zusammen mit der ST-Streckenerhöhung zwischen ein bis ein Dutzend mal hintereinander auf. Manchmal schienen sie auch die ST-Erhöpfung einzuleiten. QT-Verlängerungen und ST-Streckenerniedrigungen waren zu selten beobachtet worden, um sie einer Material- oder Konzentrationsabhängigkeit zuordnen zu können.

Die Verbesserung der Extrasystolenerkennung war auch ein Grund für die Anschaffung des ADI-Programms. Bei unseren Experimenten hat es sich aber in diesem

Punkt nicht als so effektiv wie erhofft herausgestellt.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 7) sind die Auftrittzeitpunkte der Arrhythmien (ST-Streckenerhöhung und AV-Block) nach der Zugabe von UFT zusammengefasst.

	ST-Strecken- erhöhung	AV-Block 3ten Grades
$0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml Printex 90	~2 h	nicht beobachtet
$1,6 \cdot 10^9$ Partikel/ml Printex 90	~2 h	nicht beobachtet
$4,0 \cdot 10^9$ Partikel/ml Printex 90	~1 h	~3h
$0,8 \cdot 10^9$ Partikel/ml TiO_2	~1 h	nicht beobachtet
$1,0 \cdot 10^9$ Partikel/ml TiO_2	~1 h	nicht beobachtet
$2,0 \cdot 10^9$ Partikel/ml TiO_2	~0,5 h	~2,5h
$0,5 \cdot 10^9$ Partikel/ml SiO_2	~1 h	~3h

Tab. 7: Beginn von ST-Streckenerhöhung und AV-Block 3ten Grades in Abhängigkeit der Belastung mit unterschiedlichen Materialien und Partikelkonzentrationen

2.5. Katecholamine

Die körpereigenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin haben eine steigernde Wirkung auf den Blutdruck und die Herzfrequenz (chronotrop). Dopamin wirkt positiv inotrop, d.h. es hat eine steigernde Wirkung auf den Herzmuskel.

Auf Grund der schnellen Frequenzzunahme unter Einfluss von UFT und der ebenso schnellen Frequenzabnahme beim Auswaschen der Partikel erstellten wir folgende Arbeitshypothese:

Der Anstieg der Herzrate wird auch am isolierten Herzen durch Katecholamine hervorgerufen. Diese werden aus Nervenenden im Herzen durch Einfluss der UFT freigesetzt.

Um dies zu überprüfen, wurden zu verschiedenen Zeiten des Experiments Proben der Versuchslösung entnommen und der Katecholamingehalt mittels High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) bestimmt.

Zusätzlich wurden diese Proben mit der Katecholaminkonzentration im Blut des

jeweiligen Versuchstiers verglichen. Die Proben wurden am Ende der Auswaschphase, Stabilisierungsphase (Kontrolle), UFT-Phase und am Ende des Experiments aus der Rezirkulationsphase entnommen. Bei der Katecholaminanalyse konnte Noradrenalin (NA) immer, Adrenalin (A) und Dopamin (D) hingegen nur vereinzelt nachgewiesen werden. Bei der Analyse des Noradrenalins wurde bei allen Experimenten festgestellt, dass am Ende der Auswaschphase meist keine oder nur sehr geringe Mengen Noradrenalin nachgewiesen werden konnten. Am Ende der Stabilisierungs-Phase war NA immer nachweisbar. Durch die Zugabe von ultrafeinen Teilchen stieg die NA-Konzentration an. Dieser NA-Anstieg blieb aber unter den im Tierblut gemessenen Werten. Diese Messungen wurden für uns von Dr. Stocker aus dem Institut für Ökologische Chemie der GSF durchgeführt.

Leider war auf Grund technischer Probleme bei der Probenaufbereitung und Lagerung, sowie der Analyse der Proben mittels HPLC und der daraus resultierenden starken Schwankungen der Wiederfindungsrate, die Bestimmung der NA-Konzentrationen nicht genau genug, um sie mit den Herzfrequenzanstiegen zu korrelieren. Bei den orientierenden Messungen der Perfusate zeigte sich jedoch ein deutlicher Anstieg von NA. Die in den folgenden Abbildungen dargestellten HPLC-Diagramme zeigen die Katecholaminkonzentrationen von Proben, die aus der Perfusionslösung am Ende der Kontrollperiode (Abb. 36) und nach 2 Stunden UFT-Perfusion (Abb. 37) eines Experiments genommen wurden. In diesen sind die Unterschiede der NA-Konzentration (Peak 1) zu sehen. Als Interner Standard (3) wurde 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA) verwendet.

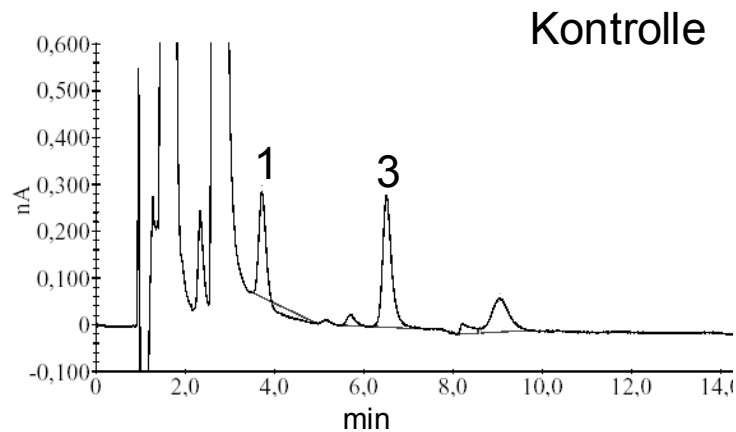


Abb. 36: Katecholamine in der Kontrollphase; Noradrenalin (1), Interner Standard (3)

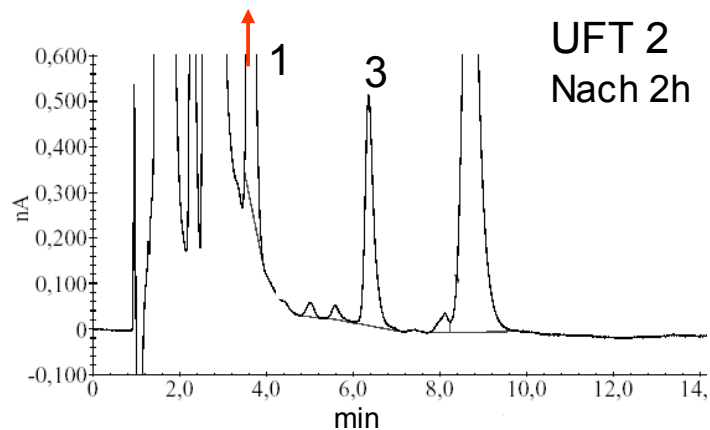


Abb. 37: Katecholamine nach zwei Stunden UFT-Belastung:
hoher Noradrenalinpeak (1) und Interner Standard (3)

Tabelle 8 zeigt die aus den Diagrammen berechneten Messwerte:

	Kontrolle [ng/ml]	UFT 2 [ng/ml]
NA	0,0099	0,0457

Tab. 8: NoradrenalinKonzentration am Ende der Zirkulationsphase und nach zwei Stunden Perfusion mit Printex 90 in einer Konzentration von $1,6 \cdot 10^9$ Teilchen/ml bei einem typischen Experiment

2.6. Das Zetapotential

Das Zetapotential ist ein Maß für die Oberflächenladung eines Teilchens und gibt somit Hinweise auf sein mögliches Verhalten und die Interaktionsmöglichkeiten mit dem umgebenden Medium. Die Zetapotentiale der von uns verwendeten Teilchen, die in Wasser suspendiert waren, wurden mit dem „Zetasizer“ der Firma Malvern bestimmt, den diese uns dankenswerter Weise für einen Tag zur Verfügung gestellt hat. Die Daten unserer ultrafeinen Teilchen in H₂O sind in Tab. 9 zusammengefasst.

	Zetapotential in H ₂ O bei pH 7 [mV]
Printex 90	17
TiO ₂	30
SiO ₂	-30
1 % BSA	-10

Tab. 9: Zetapotentiale der verwendeten UFT

SiO₂ hatte ein stark negatives Potential, wohingegen TiO₂ stark positiv war. Printex 90 war ebenfalls positiv.

Es wurden auch orientierende Versuche unternommen, das Zetapotential unserer ultrafeinen Partikel in physiologischem Puffer zu messen.

Dies ist jedoch sehr schwierig, da auf Grund der großen Ionenkonzentrationen die Messströme bis in den Milliamperebereich ansteigen. Bei Messungen in Wasser liegt der Messstrom im µA-Bereich. So konnten wir nur das Zetapotential der Teilchen in Wasser bestimmen. Die Messung mit den hohen Strömen muss noch optimiert werden.

3. Diskussion

Mit dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die verwendeten ultrafeinen Modellpartikel einen direkten Effekt auf ein isoliertes, perfundiertes Herz haben. Somit ist gezeigt, dass ein Teil der Wirkung von UFT direkt am Herzen stattfinden kann. Eine systemische Interaktion von Partikeln mit anderen Organen ist möglich und wahrscheinlich, aber nicht zwingend nötig, um die kardiovaskulären Erkrankungen zu erklären, die von den Epidemiologen einer erhöhten Partikelkonzentration in der Umwelt zugeordnet werden konnten.

Wahrscheinlich sind die kardiovaskulären Effekte aber immer eine Kombination aus direkten und indirekten Wirkungen der ultrafeinen Partikel.

Um die verschiedenen Effekte von einander trennen zu können, wären Experimente mit isolierten Herz-Lungen-Präparaten durchzuführen. Des Weiteren könnte es sehr aufschlussreich sein, die Wirkung von Metaboliten, die durch UFT in anderen isolierten Organen (z.B.: Lunge oder Leber) induziert wurden, auf isolierte Herzen zu untersuchen.

3.1. Langendorff-System

Das Langendorff-System ist seit seiner Einführung 1895 von Oskar Langendorff ein gut etabliertes System zum Studium isolierter Organe. Auch wenn, wie hier, einzelnen Modifikationen zur Anpassung an die Bedürfnisse durchgeführt werden, bleibt das Grundprinzip immer erhalten. Wie auch zum Beispiel bei Wold et al. 2006 der mit einer Langendorff-Apparatur den Einfluss von UFT auf den linksventrikulären Druck bei isolierten Rattenherzen untersucht hat. Er fand dabei, dass UFT eines Dieselmotors zu einer signifikanten Erhöhung des linksventrikulären und diastolischen Druck führten. Industriell hergestellte ultrafeine Dieselpartikel senkten den Druck. Gesammelte ultrafeine Partikelproben aus der Umgebungsluft bewirkten jedoch keine Veränderungen.

Auch er folgerte daraus, dass UFT einen direkten Einfluss haben und die Lunge als Mediator nicht benötigen.

In einer weiteren Arbeit [Bagate et al. 2006] wurden zu spontanem Bluthochdruck neigende Ratten mit UFT instilliert und anschließend das Verhalten der isolierten Herzen nach einer künstlich hervorgerufenen Ischemie in einer Langendorff-Apparatur untersucht. Dabei stellten sie fest, dass mit UFT behandelte Herzen einen niedrigeren linksventrikulären Druck haben und sich von der Ischemie langsamer und schlechter erholen als Herzen im Kontrollexperiment.

3.2. Die verschiedenen Parameter des EKG

3.2.1. Die Herzfrequenz

Eine sehr deutliche Aussage lieferte die Herzfrequenz selbst. Hier ist eine signifikante, von der Konzentration der UFT abhängige, Frequenzerhöhung nachweisbar. Sie ist auch vom Material der UFT abhängig und reversibel. Diese Wirkung kann mit verschiedenen Hypothesen erklärt werden.

- Eine Hypothese, wenn auch eine sehr unwahrscheinliche, ist eine Verstopfung der Kapillaren, durch die das Herz versorgt wird, mit UFT. Dies könnte zu einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel im Herzmuskel führen. Das Herz wiederum versucht diese Unterversorgung durch eine Erhöhung der Herzfrequenz zu kompensieren, bis es durch die Mehrbelastung und die Unterversorgung Schaden nimmt.

Gegen die Hypothese spricht, dass in diesem Fall im isolierten Herzen kein Regelkreis vorhanden ist, der die Sauerstoffunterversorgung erkennt und eine Erhöhung der Herzrate bewirkt. Weiterhin ist diese Erklärung problematisch, weil die Kapillaren an der engsten Stelle ca. 10 µm Durchmesser haben. Die größten im Experiment vorkommenden Agglomerate haben aber maximal einen Durchmesser von 100 nm. Damit bedürfte es theoretisch eines neuen Agglomerates aus mehr als 10000 kleineren Agglomeraten, um eine Kapillare an der dünnsten Stelle zu verstopfen. Das ist aber nur denkbar, wenn die Partikel wieder stark verklumpen würden.

Jedoch konnten selbst bei den Experimenten mit hohen Partikelkonzentrationen mit dem Partikelsizer keine großen Agglomerate zwischen 100 und 1000 nm in der Perfusionslösung während und nach dem Versuchen nachgewiesen werden. Auch in Kontrollproben von Puffern mit UFT haben sich in einem Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen keine größeren Agglomerate gebildet. Hier sollte noch einmal darauf hingewiesen werden, dass bei meinen Versuchen die Herzen mit Perfusionslösung durchströmt wurden, in der sich keine Blutbestandteile befanden, im Besonderen keine Erythrozyten und keine Blutplättchen. In vivo ist eine Interaktion der Partikel mit den Blutkörperchen und Blutplättchen nachgewiesen [Khandoga A. et al. 2004].

- Die Partikel können auf alle Zellen des Herzmuskels gleichsam wirken und dort z.B. den Energiehaushalt in den Mitochondrien oder die Kalziumregulation beeinflussen. Bei einer solch allgemeinen Störung des Herzmuskels ist aber ein ungleichmäßiges EKG-Signal zu erwarten. Es sollte dann relativ häufig Herzflattern (biphasische Undulation; ca. vier mal schneller als normal) und Kammerflimmern (ventrikuläre Tachyarrhythmie) auftreten, wenn viele einzelne Zellen anfangen würden, sich selbstständig zu kontrahieren.
- Die UFT können direkt am Erregungszentrum des Herzens, dem Sinusknoten wirken. Dort können die Partikel die spontane Depolarisation dieser speziellen Herzzellen beschleunigen und somit die Erregungsfrequenz des Herzens erhöhen. Dafür spräche, dass die Herzfrequenz bereits bald nach Zugabe der UFT ansteigt, die Herzrhythmusstörungen jedoch erst später nach längerer Belastung mit UFT auftreten. Experimente am isolierten AV-Knoten oder isolierten Sinus-Knoten könnten eventuell Aufschluss über eine zellenspezifische Interaktion der UFT geben.
- Die Partikel lösen eine vermehrte Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin an den Nervenenden des sympathischen Nervensystems im Herzen aus. Diese Katecholamine bewirken dann am Sinusknoten eine Frequenzerhöhung. Diese Hypothese wird durch den semi-quantitativen Nachweis von Katecholaminen in der Perfusionslösung des isolierten Herzen gestützt.

Die ersten beiden Hypothesen sind als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

Hypothese I:

Für eine Unterversorgung durch Verstopfung sind die Größenverhältnisse nicht gegeben. In vivo wäre es aber denkbar, dass durch eine vermehrte Aggregation von Blutplättchen die Belastung des Herzens noch verstärkt wird.

Hypothese II:

Es ist sehr unwahrscheinlich, dass es zu einer transienten Kontraktion des Herzens kommt, wenn sich alle Zellen willkürlich kontrahieren würden.

Somit sind nur die dritte und vierte Hypothese wahrscheinlich.

Wie in 2.5. gezeigt werden konnte, kommt es unter Einfluss von UFT auch zu einer erhöhten Konzentration von Katecholaminen. Diese könnten auch die später auftretenden Arrhythmien erklären. Weiterführende Experimente in der Arbeitsgruppe deuten stark darauf hin, dass die vierte Hypothese dem wahren Sachverhalt am nächsten kommt. Wenn durch UFT Katecholamine freigesetzt werden können, spricht auch nichts dagegen, dass diese das Reizleitungssystem allgemein beeinflussen können (Hypothese III).

3.2.2. Arrhythmien

Unter Arrhythmien (Herzrhythmusstörungen) versteht man eine Störung der normalen Herzschlagfolge. Sie werden durch Unregelmäßigkeiten bei der Erregungsbildung im Sinusknoten, bzw. bei der Weiterleitung dieses Signals im Herzen ausgelöst. Hier soll nur auf einen Teil der Herzrhythmusstörungen eingegangen werden, den Formveränderungen des EKGs.

Eine ST-Strecken-Erhöhung tritt normalerweise nach einem Infarkt auf. Ein Infarkt entsteht durch Absterben eines Teils des Herzgewebes. Die ST-Streckenerhöhung ist ein langfristiger Indikator, da sie erst einige Zeit nach einem Infarkt auftritt. In diesen Experimenten konnten langfristige Effekte nicht erfasst werden, da die Partikel nur zwei Stunden auf das Herz wirkten. Somit stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise die Partikel eine ST-Strecken-Erhöhung auslösen.

ST-Streckenerhöhungen ohne Infarktzeichen weisen auf eine schwere transmurale Ischämie hin [Csapo G. 1980]. Eine Ischämie (Blutleere) ist die Unterversorgung eines Organs mit Sauerstoff. Hält diese länger an, führt dies zum Absterben von Zellen (Infarkt).

Eine ST-Streckenerhöhung mit Zeichen eines Infarktes (Q-Zacke von >30 ms, QS-Komplex) weist auf eine Akinesie (fehlende Herzwandbewegung) oder Dyskinesie (falsche Herzwandbewegung), bzw. auf eine Ischämie im Randgebiet des alten Infarktes hin.

In unseren Experimenten fehlen die Zeichen eines Infarktes, aber eine Myokardischämie kann ein Vorbote eines selbigen sein. Um zu sehen, ob sich die ST-Streckenerhöhung zurückbildet, oder sie sich weiter zu einer echten Nekrose eines Infarktes entwickelt, sind die Experimentzeiten zu kurz.

Auffällig war, dass nur ein AV-Block dritten Grades beobachtet wurde, d.h. eine vollständige Blockade in der Signalüberleitung vom Sinusknoten zum AV-Knoten.

Es ist denkbar, dass auf Grund der Auswertung am Bildschirm ein AV-Block ersten Grades übersehen wird, da es sich bei ihm um eine geringe Verlängerung des PR-Intervalls handelt. Für einen AV-Block zweiten Grades, sowohl die „Mobitz I“, als auch die „Variante II“, ist ein plötzlicher Verlust des QRS-Komplexes charakteristisch und sollte somit, falls er nicht zu selten auftritt, miterfasst werden können. Die beiden Subvarianten unterscheiden sich durch den Ort der Blockade:

Die Unterbrechung befindet sich bei „Mobitz I“ auf Höhe des AV-Knotens, bei „Mobitz II“ distal davon.

Leider müssen die EKGs noch per Auge auf dem Bildschirm ausgewertet werden, da für eine automatisierte Erkennung von Arrhythmien, gerade wenn es sich um längere und kontinuierlich erfasste Daten handelt, kommerziell erhältliche Programme noch unzureichend für das Langendorff-EKG des Meerschweinchens sind. In den besten Programmen, die mir bekannt sind, können Arrhythmien nur auf Grund einer angelegten Bibliothek von bekannten Arrhythmien erfasst werden. Dort nicht abgespeicherte Arrhythmieformen werden von den Programmen nicht erkannt.

Im Laufe dieser Arbeit ist immer deutlicher geworden, dass durch die Analyse der Arrhythmien herausgefunden werden kann, wo und auf welche Weise die UFT im Herzen wirken. Da ein gezieltes Suchen nach Arrhythmien per Auge am Bildschirm sehr zeitaufwendig und mit Programmen nur unzureichend abgedeckt ist, wurde eine

Kooperation mit dem Institut für Biomathematik und Biometrie der GSF ins Leben gerufen. In dieser soll ein Programm entwickelt werden, das mittels Wavelet-Zerlegung alle anormalen Signale eines EKGs erfasst, diese klassifiziert und in einer Datenbank ablegt.

Mögliche Gründe für das Auftreten der Arrhythmien könnten entweder Störungen in den Erregungszentren, eine allgemeine Schädigung des Nervensystems im Herzen oder eine stark vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen sein.

3.3. Katecholamine

Die Katecholamine werden hauptsächlich in der Nebennierenrinde erzeugt. Zusätzlich setzen Gehirn und Nerven Katecholamine frei. Da in der Perfusionslösung des isolierten Herzens Katecholamine nachgewiesen wurden, müssen diese im Herzen selbst ausgeschüttet worden sein. Dies kann aus den dort befindlichen Enden der Nervenzellen geschehen, die vom Nervensystem kommen.

Die Analyse der Perfusionslösung mittels HPLC ergab, dass im Herz das Katecholamin Noradrenalin freigesetzt wurde. Die Analyse konnte jedoch nur qualitativ und semiquantitativ durchgeführt werden, so dass eine Korrelation zwischen UFT, Herzfrequenz und Noradrenalkonzentration nicht erstellt werden konnte. Diese orientierenden Katecholaminbestimmungen deuten auf eine vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin durch ultrafeine Partikel hin. Weiterführende Experimente der Arbeitsgruppe klären gerade, ob und in welchem Ausmaß die Katecholamine diese Effekte hervorrufen.

Dieser Anstieg an Katecholaminen kann auf drei verschiedenen Gründen beruhen oder aus einer Kombination daraus:

- Durch vermehrte Ausschüttung,
- durch reduzierten Abbau,
- durch Blockieren der Rückspeicherung.

Würde die Wirkung über eine reduzierte Rückspeicherung der Katecholamine in die Synapsen der Nervenenden zustande kommen, so dürfte nur ein geringer Anstieg von diesen in der Perfusionslösung registriert werden. Die Wirkung wäre durch eine erhöhte Verweildauer am und in der Nähe der Rezeptoren zu erklären. Diese Möglichkeit kann jedoch auf Grund des gefundenen Anstiegs der Noradrenalinkonzentration nach 2 h Einwirkung von UFT ausgeschlossen werden. Zur weiteren Klärung sollten noch genauere quantitative Katecholaminbestimmungen mit anderen Bestimmungskits durchgeführt werden.

Zusätzlich zu der Katecholaminbestimmung sollten bei weiteren Untersuchungen Versuche mit Betablockern durchgeführt werden. Betablocker wirken auf β -Rezeptoren und vermindern die durch Noradrenalin hervorgerufene Herzfrequenzerhöhung. Wird die durch UFT erhöhte Frequenz dann durch Zugabe dieser Substanz wieder verringert, so wäre dies ein wichtiges Indiz dafür, dass der Frequenzanstieg durch NA hervorgerufen wird. Sollte trotz Blockade der Beta-Rezeptoren der Frequenzanstieg weiterhin vorhanden sein, so ist diese Arbeitshypothese zu verwerfen. Man muss dann untersuchen, über welchen anderen Mechanismus die Partikel die Frequenzerhöhung hervorrufen können. Wahrscheinlich ist die Wirkung der Partikel vielfältiger und die erhöhte Ausschüttung von NA nur ein Teil der Wirkung. Somit wäre es denkbar, dass die Wirkung der Beta-Blocker nur zu einer Reduzierung des Frequenzanstiegs führt.

3.4. Messungen des Zetapotentials

Da unsere ultrafeinen Teilchen unterschiedlich starke Wirkungen entfalten und generell Interaktionen zwischen Partikel und Zelle nur auf Grund von Form, Material, angelagerten Stoffen oder der Ladung der Teilchen zustande kommen können, wird die Oberflächenladung der UFT, das Zetapotential eine wichtige Rolle spielen. Das Zetapotential ist das elektrische Potential an der Abscherschicht eines bewegten Partikels in Suspension. Durch die Bewegung werden die nur locker gebundenen Ionen abgeschert und das Partikel besitzt ein Potential. Andernfalls würden alle Ladungen durch Ionen des Mediums abgeschirmt werden. Mit dieser Ladung kann ein Partikel mit der Umgebung interagieren. Sie kann bestimmt werden, indem man die Bewe-

gungsgeschwindigkeit eines Teilchens in einem elektrischen Feld misst. Die Geschwindigkeit ist dann ein Maß für das Zetapotential.

Messungen, unter für die Partikel idealisierten Bedingungen, sind relativ einfach und liefern gute Werte. Dazu bedarf es einer geringen Ionenkonzentration und die zu messenden Partikel müssen zahlenmäßig überwiegen.

Um aber entscheiden zu können, ob mit dem Zetapotential die unterschiedlichen Wirkstärken der untersuchten Teilchen erklärt werden können, ist es wichtig, das Zetapotential im physiologischen Puffer zu bestimmen. Dies hat sich bei unseren ersten Experimenten als sehr schwierig herausgestellt, da die hohe Ionenkonzentration in der Lösung zu einem hohen Strom führt, was eine exakte Zetapotentialmessung beeinträchtigt.

Weiterhin sind die ultrafeinen Partikel durch die um den Faktor 10^8 häufiger vorkommenden BSA-Moleküle abgeschirmt.

Leider war die Zeit, für die das Leihgerät zur Verfügung stand, zu kurz, um die Messbedingungen an diese spezielle Problematik anzupassen.

Das Problem mit der sehr großen Anzahl von BSA-Molekülen könnte eventuell durch eine Messreihe gelöst werden, in der die eingesetzte Menge an BSA so lange reduziert wird, bis das Zetapotential der ultrafeinen Teilchen sichtbar wird, es aber noch nicht zu einer Agglomeration der Teilchen kommt. Es ist insgesamt davon auszugehen, dass die deutlich größeren UFT, zumindest Printex 90 und TiO_2 , auf Grund ihrer positiven Eigenladung eine mehr oder weniger feste Hülle aus BSA-Molekülen besitzen. Durch die Verringerung von BSA sollte im Idealfall ein Zustand erreicht werden, bei dem nur noch so wenig freies BSA in der Lösung enthalten ist, dass die zu untersuchenden UFT vermutlich mit einem von BSA leicht unterschiedlichem Potential messbar sein werden. Danach könnte man im Vergleich mit reinem BSA und reinen Partikeln abschätzen, in wieweit sich das Verhalten der Partikel bei höheren BSA-Konzentrationen verändern wird. Hier ist zu vermuten, dass in höheren BSA-Konzentrationen die Hülle um die Partikel dichter ist und weniger BSA-Moleküle dissoziieren.

Die unterschiedlichen Zetapotentiale könnten auch ein Grund sein, warum sich die verschiedenen Partikel unterschiedlich leicht in unseren Perfusionslösungen suspendieren lassen. Die 1 %ige BSA-Lösung, die selbst ein negatives Potential hat, kann

gut mit TiO_2 und P 90 interagieren, da diese ein positives Potential besitzen. So bleiben die Teilchen nach dem beschallen in Suspension ohne wieder zu verklumpen.

Bei SiO_2 wäre dies nicht so einfach möglich, da das Potential von SiO_2 ebenfalls negativ ist und eine Abschirmung der einzelnen SiO_2 -Partikel durch BSA ohne feste Bindung zustande kommen muss. Dies könnte eine Erklärung für die stärkere Agglomeration der SiO_2 -Partikel im Vergleich zu den anderen Teilchen sein.

Die stärkere Wirkung der SiO_2 -Partikel wäre aber auch erklärbar, wenn der Effekt durch eine Interaktion der Partikel mit den Zellen, vor allem mit der Zellmembran, hervorgerufen wird. Eine höhere absolute Ladung an der Partikeloberfläche oder eine höhere negative Ladung könnte die Interaktion mit den Herzzellen verstärken. Es ist auch denkbar, dass bei Nervenzellen der Kontakt der Partikel mit der Zelloberfläche zu einer Depolarisierung oder Hyperpolarisierung führt. Dies könnte zu einer Freisetzung von NA aus den Nervenden führen.

Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass UFT durch Anlagerung an die Zellmembranoberfläche spannungsabhängige Ionenkanäle aktivieren. Dabei würde ein höheres Potential eines Teilchens eine stärkere Wirkung auf den Kanal haben. Somit genügten weniger Partikel, um denselben Effekt hervorzurufen, wie Teilchen mit geringerem Zetapotential. Zur weiteren Klärung ist es notwendig, die Zetapotentiale der Modellpartikel in dem verwendeten physiologischen Puffer zu bestimmen.

3.5. Vergleich zwischen Teilchenanzahl und Teilchenoberfläche

Zur Zeit wird von den Wissenschaftlern, die sich mit UFT beschäftigen, diskutiert, ob die Teilchenmasse nicht eine viel zu ungenaue Angabe ist und ob die Teilchenanzahl für die Risikoabschätzung der UFT aussagekräftiger wäre.

Bei den bisher veröffentlichten Untersuchungen mit UFT wurden die Partikel eingewogen und der Versuchslösung zugegeben. Für eine Größenangabe wurden die Angaben des Herstellers verwendet, aber nie die Teilchengröße in der Suspension vermessen oder diese im Mikroskop betrachtet. Auf Grund unserer Methode zur Herstellung einer Suspension mit nur ultrafeinen Teilchen, bei der die großen Agglomerate und somit ein sehr großer Teil der abgewogenen Partikel entfernt wurden, ist es nicht mehr möglich, eine Masse anzugeben. Daher haben wir eine Methode zur Abschätzung der Teilchenzahl in der Suspension entwickelt. Über die Teilchenzahl kann dann die Masse berechnet werden.

Es stellt sich zudem die Frage, ob die reaktive Oberfläche der Teilchen für die Beschreibung der Wirkung von UFT nicht besser geeignet wäre. Bei der Bestimmung der Oberfläche treten allerdings einige Probleme auf.

Die spezifischen Oberflächen werden mit dem BET-Verfahren, nach Brunauer, Emmet und Teller [Brunauer S. et al. 1938] bestimmt. Bei dieser Methode wird gemessen, wieviel Absorbant (Gas, N_2 , Krypton u.ä. nicht korrosive Gase) an und in den Poren von Festkörpern bindet. Auf Grund der Menge des verbrauchten Gases kann dann auf die Oberfläche zurückgerechnet werden.

Die Teilchenhersteller geben die Oberfläche immer in Fläche pro Masse an. Wir können auf Grund unserer Abschätzung die Gesamtmasse der Teilchen berechnen und mittels der Herstellerangaben (Oberfläche/g) die Gesamtoberfläche der Teilchen in der Suspension abschätzen. Diese ist jedoch nur in erster Näherung richtig, da in der Experimentlösung viele Agglomerate <100 nm vorhanden sind. Da die Form der Agglomerate nicht bekannt ist, wissen wir nicht, um welchen Faktor die Oberfläche eines Primärteilchens bei der Agglomeration verringert wurde.

Hier ein Beispiel:

Unter der Annahme, dass ein TiO_2 -Partikel eine perfekte Kugelform besitzt, könnte die aktiv wirksame Oberfläche so berechnet werden.

Formelsammlung	
Dichte	$\rho = m/V$
Kugeloberfläche	$A_K = 4 * \pi * r^2$
Kugelvolumen	$V_K = 4/3 * r^3 * \pi$
Zylinderoberfläche	$A_Z = 2(r^2 \pi) + h * 2 * r * \pi$
Zylindervolumen	$V_Z = \pi * r^2 * h$

Tab. 10: Formelsammlung

Herstellerangaben zu ultrafeinen TiO_2 Primärteilchen:

Radius = 10 nm

Dichte $\rho = 4,26 \text{ g/cm}^3$

Oberfläche = $50 \text{ m}^2/\text{g} = 500000 \text{ cm}^2/\text{g}$

Berechnungen für ein TiO_2 Primärteilchen ($r = 10 \text{ nm}$):

$r = 10 \text{ nm} = 10 * 10^{-9} \text{ m} = 10 * 10^{-7} \text{ cm} = 1 * 10^{-6} \text{ cm}$

Kugeloberfläche: $A_K = 1,256 * 10^{-11} \text{ cm}^2$

Rechnet man die vom Hersteller angegebene Oberfläche/Masse, die mit dem BET-Verfahren bestimmt wurde, auf ein Teilchen um, dann ergibt sich für ein Primärteilchen:

Kugelvolumen (bei $r = 10 \text{ nm}$) = $4,188 * 10^{-18} \text{ cm}^3$

Masse = $1,784 * 10^{-17} \text{ g}$

Die so berechnete Oberfläche eines Primärteilchens beträgt $8,92 * 10^{-12} \text{ cm}^2$.

Das Verhältnis gemessene Oberfläche zu berechneter Oberfläche:

$$\frac{8,92 * 10^{-12} [cm^2]}{1,256 * 10^{-11} [cm^2]} = 0,71$$

Der gemessene Wert der Oberfläche auf ein Primärteilchen umgerechnet, unterscheidet sich nur um einen Faktor von ca. 0,7 vom berechneten Wert der Oberfläche eines Primärteilchens.

Will man jedoch die Oberfläche eines TiO_2 -Agglomerates berechnen, so ist dies nicht möglich, da die Teilchen sich zu unterschiedlichen Formen verbinden können.

Bei Titandioxid ist eine Rückrechnung der massenbezogenen Oberfläche auf die Primärteilchen möglich, da es einen dichten Kern hat. Printex 90 hat jedoch eine andere Struktur als TiO_2 . Printex 90 ist in Kugelschalen aufgebaut. Die Primärteilchen von Printex sind kugelförmig und wie Graphit aus Kohlenstoff-Sechsringschichten aufgebaut, die konzentrisch um den Teilchenmittelpunkt angeordnet sind. Zueinander weisen die Schichten aber eine unregelmäßige Verschiebung auf („turbostratische“ Struktur), der Schichtabstand ist im Gegensatz zu Graphit etwas größer (0,35 – 0,4 nm).

Daher wird bei Printex 90 häufig für die Berechnung eine geringere Dichte ($1,6 \text{ g/cm}^3$) als die des Kohlenstoffs ($2,3 \text{ g/cm}^3$) verwendet [Falbe J. et al. 1995].

Diese theoretischen Abschätzung der Oberfläche sind jedoch meiner Meinung nach für Aussagen zur Wirkung von Teilchen nicht verwendbar, solange die verschiedenen Formen der Aggregate nicht bestimmt werden können.

Die Vielfalt der Agglomerate ist in den nächsten Abbildungen zu sehen (Abb. 38).

Dr. Takenaka hat mir dankenswerterweise elektronenmikroskopische Aufnahmen von den beiden Kohlenstoffteilchen Printex 90 und Printex G zur Verfügung gestellt. Printex G hat einen primären Partikeldurchmesser von 47 nm. Die Teilchen unterscheiden sich in ihren Durchmessern, verhalten sich aber nach Aussage von Dr. Takenaka bei der Agglomeratbildung ähnlich.

Auf den ersten beiden Bildern sieht man deutlich, dass P 90 Teilchen ganz unterschiedlich große Agglomerate ausbilden. Ein Agglomerat von Printex G ist nicht ganz so fein verzweigt, bildet aber ähnliche Strukturen aus (Abb. 39).

An Hand dieser Bilder ist zu folgern, dass eine massenbezogene Oberflächenangabe auf Grund einer Primärpartikelgröße keinen Sinn ergibt.

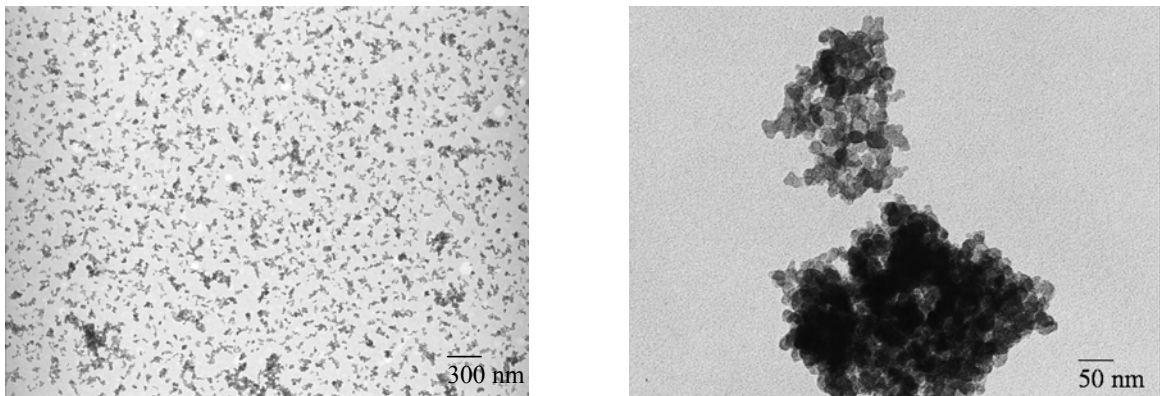


Abb. 38: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Printex 90; [© S. Takenaka]

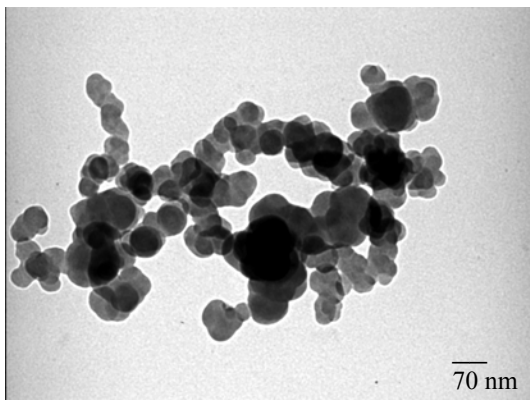


Abb. 39: Printex-G-Agglomerat; [© S. Takenaka]

Auch die Elektronenmikroskopie wird keine endgültige Aussage über das Agglomeratverhalten der Partikel in Lösung geben können. Es wäre denkbar, dass man die in der Lösung gebildeten Agglomerate im Elektronenmikroskop untersucht. Da die Proben zur Messung allerdings getrocknet werden müssen, ist davon auszugehen, dass die bestehenden Agglomerate dabei eventuell aufbrechen oder zusätzliche entstehen.

3.6. Verschiedene Wirkorte der Partikel

Ob die Herzfrequenzsteigerung nur durch die Katecholamincerhöhung bewirkt wird, kann zur Zeit noch nicht bewiesen werden. Auffällig ist aber, dass zusätzlich zu der Frequenzerhöhung später auch Arrhythmien auftreten. Der Zeitpunkt des Auftretens von Arrhythmien und die EKG-Änderungen sind ebenfalls von dem Partikelmaterial und von der Partikelkonzentration abhängig. Es liegt daher nahe zu postulieren, dass die Änderungen der EKG-Form wahrscheinlich durch eine direkte Wirkung der Partikel auf die Signalleitungen des Herzens hervorgerufen werden. Wenn die ultrafeinen Partikel an den Nervenenden des sympathischen und parasymphatischen Nervensystems wirken, so sollten sie auch die Nervenzellen der Signalgenerierung und -weiterleitung beeinflussen können. Es ist wahrscheinlich, dass die Partikel die Weiterleitung des Signals vom Sinusknoten zum Atrioventrikularknoten gänzlich unterdrücken können, da wir einen AV-Block dritten Grades beobachten. Dieser Effekt ist nicht durch einen Verschluss der Kapillaren oder durch mangelnde Energieversorgung zu erklären.

Es ist bekannt [Csapo G. 1980], dass Arrhythmien auch durch Katecholamine in höheren Konzentrationen ausgelöst werden können.

Bei unseren Experimenten kann eine hohe NA-Konzentration nicht die Arrhythmien hervorgerufen haben, da in der Auswaschphase die Noradrenalinkonzentration im Herzen wieder abnimmt, die Arrhythmien jedoch bestehen bleiben.

Die Arrhythmien könnten auch durch „kleine Infarktareale“ im Herzen, die durch UFT erzeugt wurden, hervorgerufen worden sein.

Dies würde erklären, warum die Arrhythmien während der Auswaschphase des Versuchs persistent bleiben.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von verschiedenen ultrafeinen Modellpartikeln (UFT) auf das isolierte Meerschweinchenherz untersucht, um zu klären, ob ultrafeine Partikel eine direkte Wirkung auf das isolierte Herz ausüben oder ob die von den Epidemiologen erhobenen Befunde über die Wirkung von UFT auf die kardiovaskuläre Mortalität durch inflammatorische und andere Effekte in der Lunge hervorgerufen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ultrafeine Teilchen am isoliert perfundierten Langendorff-Herz zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führen und nach längerer Einwirkdauer Arrhythmien hervorrufen. Diese Wirkungen waren von den verwendeten Materialien und deren Konzentration abhängig. Der Zeitpunkt des Auftretens von Arrhythmien war ebenfalls konzentrations- und materialabhängig. Bei der Analyse der Perfusionslösungen konnte ein Anstieg des Katecholaminlevels zwei Stunden nach Zugabe von UFT nachgewiesen werden.

Bis zum Abschluss meiner Arbeit war es nicht möglich, eine Abhängigkeit zwischen Frequenzanstieg und Katecholaminkonzentration zu finden, da die Bestimmung der Katecholamine nur semiquantitativ möglich war. Eine Optimierung der Messmethode wird in Zukunft genauere Analysen ermöglichen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die UFT einen direkten Einfluss auf das Herz ausüben. Somit sind weitere systemische Interaktionen nicht nötig, um die epidemiologischen Befunde zu erklären. Da die Wirkung am Herzen aber höchstwahrscheinlich durch die Stimulation der Nervenenden zustande kommt, ist davon auszugehen, dass die UFT in vivo vielfältige systemische Interaktionen bewirken, von denen auch einige zusätzlich auf das Herz wirken können.

Generell war mit der Etablierung dieses modifizierten Modells der Langendorff-Apparatur und den daraus gewonnenen Daten eine gute Grundlage geschaffen worden, mit der alle UFT und Nanoteilchen, die z.B. in der Medizin zum Einsatz kommen sollen, auf ihre toxischen Eigenschaften hin untersucht werden können.

5. Verwendete Abkürzungen:

A	Adrenalin
Abb.	Abbildung
ADC	Analog Digital Converter
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BNC	Stecker/Buchsen: mit einem Bajonettverschluss mit Gewinde
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
D	Dopamin
dest.	Destilliert
DHBA	Dihydroxybenzylamin
EKG	Elektrokardiogramm
g	Gramm
GSF	Gesellschaft für Umwelt und Gesundheitsforschung GmbH
h	Stunde
HF	high frequency
H ₂ O	Wasser
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRV	Herzratenvariabilität
IC	Ionenchromatographie
IS	interner Standard
konz.	konzentriert
l	Liter
LF	low frequency
Lsg	Lösung
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MQ-Wasser	Millipore-Wasser

MS	Massenspektrometrie
Mt	Maturba
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
MW	Mittelwert
NA	Noradrenalin
OES	optische Emissionsspektrometrie
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	phosphate buffered saline
P 90	Printex 90
rpm	rounds per minute (U/min.)
RT	Raumtemperatur (18° bis 25°C)
SE	standard error/ einfache Standardabweichung
sec	Sekunden
SiO ₂	Siliziumdioxid
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TiO ₂	Titandioxid
u	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UFT	ultrafeine Teilchen
U/min.	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
vLF	very low frequency
WB	Wasserbad
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Zudem wurden die Symbole der chemischen Elemente verwendet.

6. Material & Methoden

6.1. Geräte

AD-Wandler	Typ PCI 6024E	National Instruments /München
Biofuge	Biofuge 22R	Kendro/München
EKG-Verstärker	EGM Einthofen Goldengerber Module Typ 701	Hugo Sachs/March- Hugstetten
Feinwaagen	Feinwaage, Analysenwaage R 200 D	Sartorius AG/Göttingen Sartorius AG/Göttingen
HPLC	Dionex-IC Gerät	Dionex/Basel
Lichtquellen		Zeiss/Göttingen
Mikroskop		Zeiss/Göttingen
Malvern HPPS		Malvern/Herrenberg
Powerlab		AD Instruments GmbH /Spechbach
Schüttler	Infors-Type AJ 117	Infors AG/Bottmingen
Stereomikroskop		Zeiss/Göttingen
Ultraschalllanze	Brandson Sonifier	
Variopipetten	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf/Hamburg
Wasserbäder		GFL
Zentrifuge	Gyofuge RX 510 S	Kendro/München
Vortex	Heidolph Reax 2000	Janke & Kunkel IKA Labortechnik

6.2. Material

Clinrep Sample		Recipe/München
Preparation Säulen		
Einmalspritzen	1 ml, 10 ml	Becton Dickinson /Heidelberg
Poly Vials:	0,5ml, mit Vial Filtercaps	Dionex/Basel
Spritzenvorsatzfilter:		Millipore
	220µm Expressmembran (PES)	/Schwalbach
	100µm Durapore Membran (PVDF)	
Partikelmaterialien:		
Latex 20,40,80,100,200	20 nm, 40 nm, 80 nm, 100 nm, 200 nm Durchmesser	Duke Scientific Corporation, Fremont Kalifornien/USA
Printex 90 (P 90)	Kohlenstoff, 90 nm Durchmesser spezifische Oberfläche 272 m ² /g Dichte 1,6 g/cm ³ Gehalt an Metallen 0,02 Vol % organische Verunreinigungen 0,7 – 1,0 Vol %, Degussa, Frankfurt/Deutschland	
Siliziumdioxid (SiO ₂)	7 nm Durchmesser spezifische Oberfläche 400 m ² /g Dichte 2,32 g/cm ³ Degussa, Frankfurt/Deutschland	
Titandioxid (TiO ₂)	20 nm Durchmesser spezifische Oberfläche 50 m ² /g Dichte 4,26 g/cm ³ Degussa, Frankfurt/Deutschland	

6.2.1. Chemikalien

Kompakt Kit von Recipe (Probensäule für die Messung von Katecholaminen in Plasma, Elution Buffer, Washing Buffer, Sample Preparation Columns für Katecholamine, Interner Standard, Calibration Standard, Lyophilisierender Kalibrator)

Feinchemikalien wurden im pro analysis Qualitätsstandard von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

6.3. Lösungen

6.3.1. Krebs- Henseleit-Bicarbonat (KHB)-Puffer

Stammlösungen:

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

Gebrauchslösung 1 l:

	Anteil von Stammlösung	Endkonzentration
NaCl	100 ml	115,0 mM
KCl	10 ml	5,9 mM
CaCl ₂	5 ml	1,2 mM
MgSO ₄	10 ml	1,2 mM
NaHCO ₃	100 ml	25,0 mM

Zuerst werden 2 g Glucose pro Liter Gebrauchslösung eingewogen. Darauf werden die jeweils benötigten Anteile der Stammlösungen zugegeben. NaHCO₃ darf erst zugegeben werden, wenn die Gebrauchslösung bereits zur Hälfte mit destilliertem Wasser aufgefüllt ist, sonst besteht die Gefahr, dass NaHCO₃ ausflockt. Danach wird die Lösung mit MQ-Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Die Lösung wird für 15 min mit CO₂ begast, um den Puffer auf pH 7,4 einzustellen.

6.3.2. Herzperfusionslösung

Albumin verhindert die Agglomeration der Partikel und erzeugt zudem den nötigen osmotischen Druck, der das Aufquellen des Herzgewebes verhindert. Blut besteht zu etwa 50 % aus Proteinen. Die Hälfte dieser Proteine besteht aus Albumin.

Um konstante Versuchsbedingungen zu erhalten, müssen alle Versuchslösungen 1 % Bovine Serum Albumin (BSA) enthalten. Daher werden 10 g BSA auf einen Liter KHB zugegeben. Diese Lösung ist mindestens eine halbe Stunde bei 37°C vorzuwärmen und anschließend für weitere 15 min bei 37°C mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) zu begasen.

6.3.3. Phosphate buffered saline (PBS)-Puffer (pH 7,4)

	1 l
NaCl	7 g
Na ₂ HPO ₄	2,86 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g

Der pH-Wert wird mit HCl eingestellt.

Der PBS-Puffer wird nach Fertigstellung steril filtriert (200 nm).

6.3.4. Heparin Stamm-Lösung

Es werden steril 10 ml Heparin-Natrium (250 000 u) von Ratiopharm mit 40 ml sterilem PBS-Puffer verdünnt. Die daraus entstehende Stammlösung hat eine Konzentration von 5000 u/ml und muss im Kühlschrank bei 6° C gelagert werden.

6.3.5. Natriumdisulfit-Lösung

Für die Stabilisierung der Katecholamine werden 0,5g/l Natriumdisulfit in MQ-Wasser gelöst.

6.4. Methoden

6.4.1. Partikelsuspension

Es wird ein Milligramm der jeweiligen Partikel (Printex 90, Titandioxid, Siliziumdioxid) in ein Reagenzglas eingewogen. Dazu werden 5 ml der Herzperfusionslösung gegeben. Diese Suspension wird mit der Mikrospritze einer Ultraschalllanze mit einer Leistung von ca. 40 Watt zweimal für eine Minute, mit einer einminütigen Pause beschallt. Während der ganzen Zeit befindet sich das Reagenzglas in Eiswasser, um thermische Effekte zu verhindern.

Danach wird die Suspension erst mit einem 220-nm- und anschließend mit einem 100-nm-Spritzenvorsatzfilter gefiltert. In einem Photometer wird die Extinktion bei 380 nm der so gewonnenen Partikel-Stammlösung gemessen.

Diese Stammlösung kann dann anhand der Kalibrierkurve (siehe Kapitel 2.1.3) auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden.

6.4.2. Vorbereitung der Langendorff-Apparatur

Vor jedem Experiment musste die Langendorff-Apparatur gründlich mit destilliertem Wasser gespült werden. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde die Heizung des Wasserbades, mit dem die Perfusionslösungen vorgewärmt wurden, eingeschaltet. Die

Vorratsgefäße der Perfusionslösung wurden durch die Kanüle, an dem das Herz befestigt wird, mit warmer, sauerstoffgesättigter Lösung mittels einer Spritze befüllt. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen. Die Bläschen, die an den Kanten der Ventile und den Schlauchverbindern entstanden, waren durch sanftes Klopfen abzulösen und nach oben auszuspülen.

6.4.3. Herzpräparation

Es werden zwei Bechergläser und eine Präparationsschale mit warmer, sauerstoffgesättigter Perfusionslösung bereitgestellt. Dieser wird Heparin zugegeben, um das Gerinnen des Blutes im Herzen zu verhindern (1 ml Heparin Stamm-Lösung / 60 ml Perfusionslösung). Die Perfusionslösung in der Präparationsschale wird während der gesamten Präparationszeit mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

Das Meerschweinchen wird schnell mittels Genickbruch getötet. Anschließend wird die Kehle durchgeschnitten und das Tier durch sanften Druck auf den Brustkorb etwas ausgeblutet. Danach wird mit einem lateralen Schnitt knapp unter den Vorderläufen, sowie einem vertikalen Schnitt bis zum Halsansatz der Brustkorb geöffnet. Das Herz wird mit drei Fingern sanft gefasst und mit einer Schere an der Wirbelsäule entlang von den Blutgefäßen getrennt. Das Herz wird sofort in ein Becherglas mit warmer Perfusionslösung gegeben und dort ein paar Sekunden sanft massiert, um das Blut aus dem Herz zu spülen, bzw. das verbleibende Blut mit Heparin zu vermischen, um die Blutgerinnung zu verhindern. Dieser gesamte Vorgang sollte nicht länger als 45 Sekunden dauern. Anschließend wird das Herz kurz im zweiten Becherglas gewaschen, bevor es in die Präparationsschale gelegt wird. Im Folgenden werden nun die Lungenflügel und der Herzbeutel abpräpariert.

Anschließend wird die Aorta freigelegt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Aorta nicht gekürzt wird. Es sind dann die Aortenabzweigungen „Aorta carotis communis sinistra“ und die „Aorta subclavia sinistra“ zu sehen (Abb. 40). Hier wird die Aorta so durchtrennt, dass die Verzweigungen ebenfalls entfernt werden. Die Aorta wird an der Kanüle der Apparatur befestigt.

Dabei ist es sehr wichtig, darauf zu achten, dass keine Luftblasen in die Aorta gelangen. Dies wird dadurch erreicht, dass bereits beim Befestigen des Herzens Perfusi-

onslösung aus der Kanüle der Langendorff-Anlage tropft. Beim Präparieren und auch beim anschließenden Befestigen ist im Besonderen darauf zu achten, dass die Vorhöfe nicht beschädigt werden. Speziell beim Anbinden der Aorta an die Kanüle besteht die Gefahr, dass der rechte Vorhof mit eingeschnürt wird,

da die Vorhöfe des Meerschweinchenherzens asymmetrisch angeordnet sind und der rechte Vorhof sehr weit oben an der Aorta liegt.

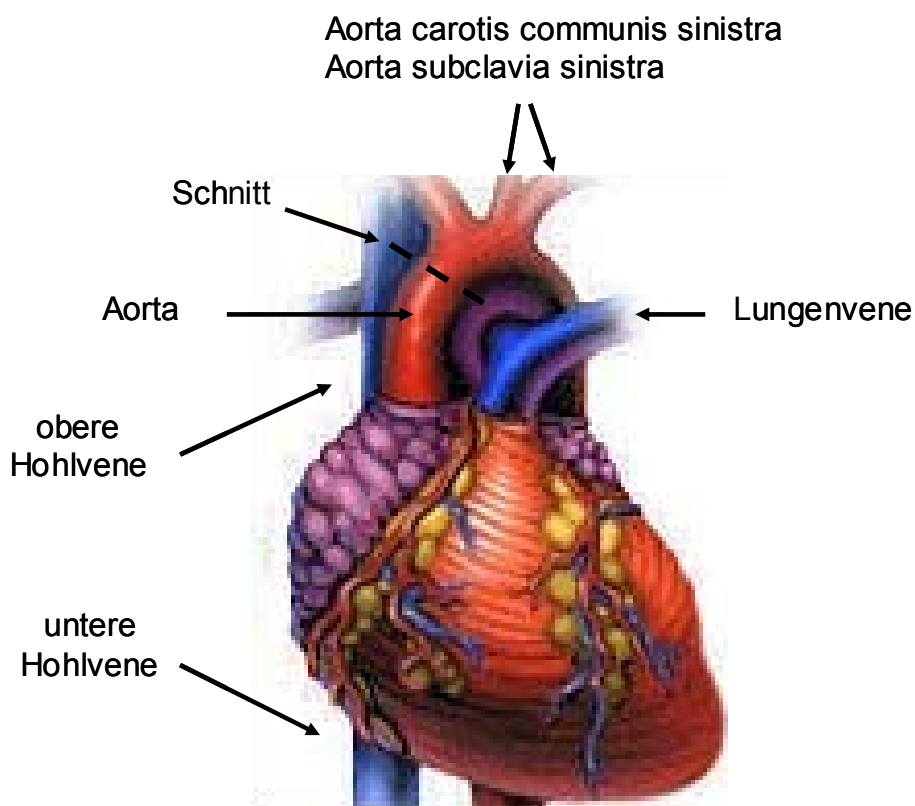


Abb. 40: Für eine Präparation wichtige Adern am Herzen; Schnitt für Kanülenansatz an die Aorta
[© 2005, Deutscher Apotheker Verlag]

Abschließend wird die Kanüle mit dem Herzen so gedreht, dass die Lungenvene (V. pulmonalis) nach hinten zeigt. Dadurch liegen von vorne gesehen die rechte Herzseite links und die linke Herzseite rechts. Die EKG-Elektroden werden analog der Einthofenableitung angelegt. Die Elektrode für den „rechten Arm“ wird an die linke Herzseite knapp unter dem Vorhof angelegt, die Elektrode für den „linken Arm“ analog an die rechte Herzseite.

Die Elektrode für den „linken Fuß“ kommt an die Herzspitze (Apex cordis). Die Referenzelektrode kommt in den Flüssigkeitsstrom über dem Herzen.

In der nachfolgenden Abbildung ist ein präpariertes und an der Langendorff-Apparatur angebrachtes isoliertes Herz mit den Elektrodenhalterungen und den EKG-Elektroden zu sehen. Links im Bild sind die beiden Ventile zum Wechseln der verschiedenen Perfusionslösungen und im Hintergrund das temperierte Wasserbad.

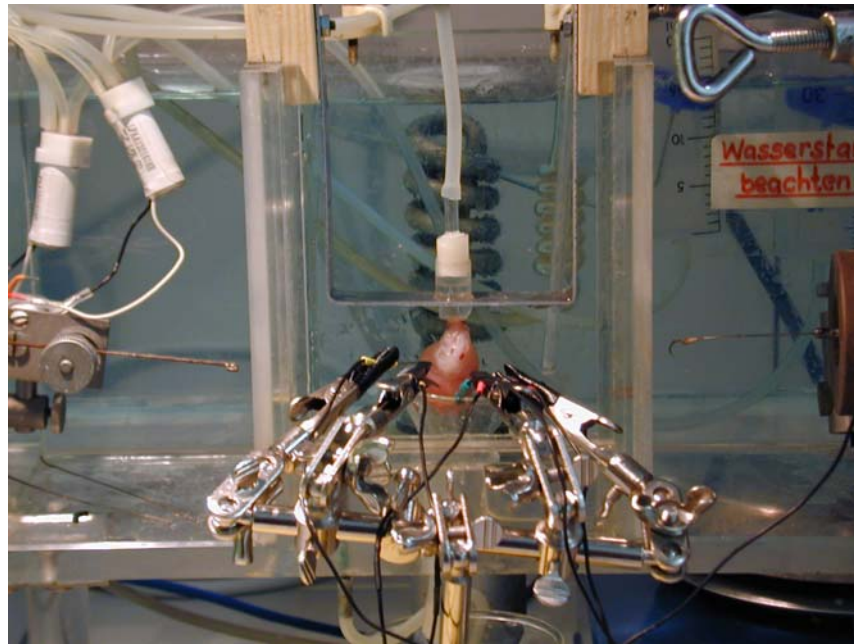
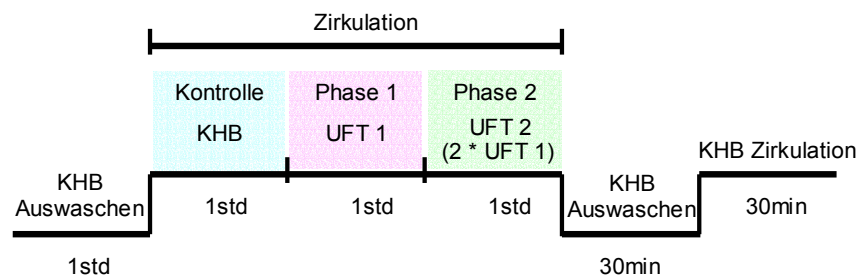


Abb. 41: Langendorff-Apparatur mit schlagendem Herzen

6.5. Modellsystem Langendorff-Herz

Die Langendorff-Apparatur, benannt nach Oskar Langendorff [Langendorff O. 1895] ermöglicht es, Untersuchungen am isolierten Herzen durchzuführen. Das Herz wird entgegen der normalen Strömungsrichtung durch die Aorta mit gewärmter und sauerstoffgesättigter Perfusionslösung durchströmt (retrograde perfused). Da die Herzkranzgefäße an der Basis der Aorta ansetzen, wird sichergestellt, dass der Herzmuskel in natürlicher Richtung versorgt wird.

6.5.1. Versuchsablauf



KHB enthält 1% BSA

Abb. 42: Schema des Versuchablaufs

Ein Experiment dauert 5 Stunden (Abb. 42). Zuerst wird das Herz mit Perfusionslösung eine Stunde lang durchspült, um Reste von Blut und Stresshormonen auszuspülen, und das Perfusat verworfen. Anschließend beginnt die Zirkulationsphase. In dieser stabilisiert sich das Herz innerhalb von etwa 45 Minuten, d.h. die Herzfrequenz und das EKG werden gleichmäßig. Diese erste Phase der Zirkulation, auch „Kontrolle“ genannt, wird als Referenz für alle anderen Phasen verwendet. Danach wird das Herz mit ultrafeinen Teilchen der Konzentration UFT 1 für eine Stunde durchströmt, anschließend für eine weitere Stunde mit der doppelten Teilchenkonzentration. Nach der Inkubation mit den Partikeln wird das Herz mit teilchenfreier Lösung durchströmt, um die UFT auszuwaschen. Während der ersten halben Stunde des Auswaschens wird das Perfusat verworfen. Anschließend wird der Puffer wieder rezirkuliert. Es wird geprüft, in wieweit die Veränderungen der Herzfrequenz und des EKGs innerhalb von 30 min reversibel sind.

Die Abbildungen 43 a bis f zeigen die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen an ultrafeinen Teilchen in der Zirkulationsphase. Dabei werden die Diagramme nach der Konzentration, die in der ersten Stunde (UFT 1) eingesetzt wurde, benannt. UFT 2 war immer die doppelte Konzentration von UFT 1. Jedes dieser Experimente wurde sechsmal wiederholt.

Partikelkonzentrations-Zeit Profil der Experimente

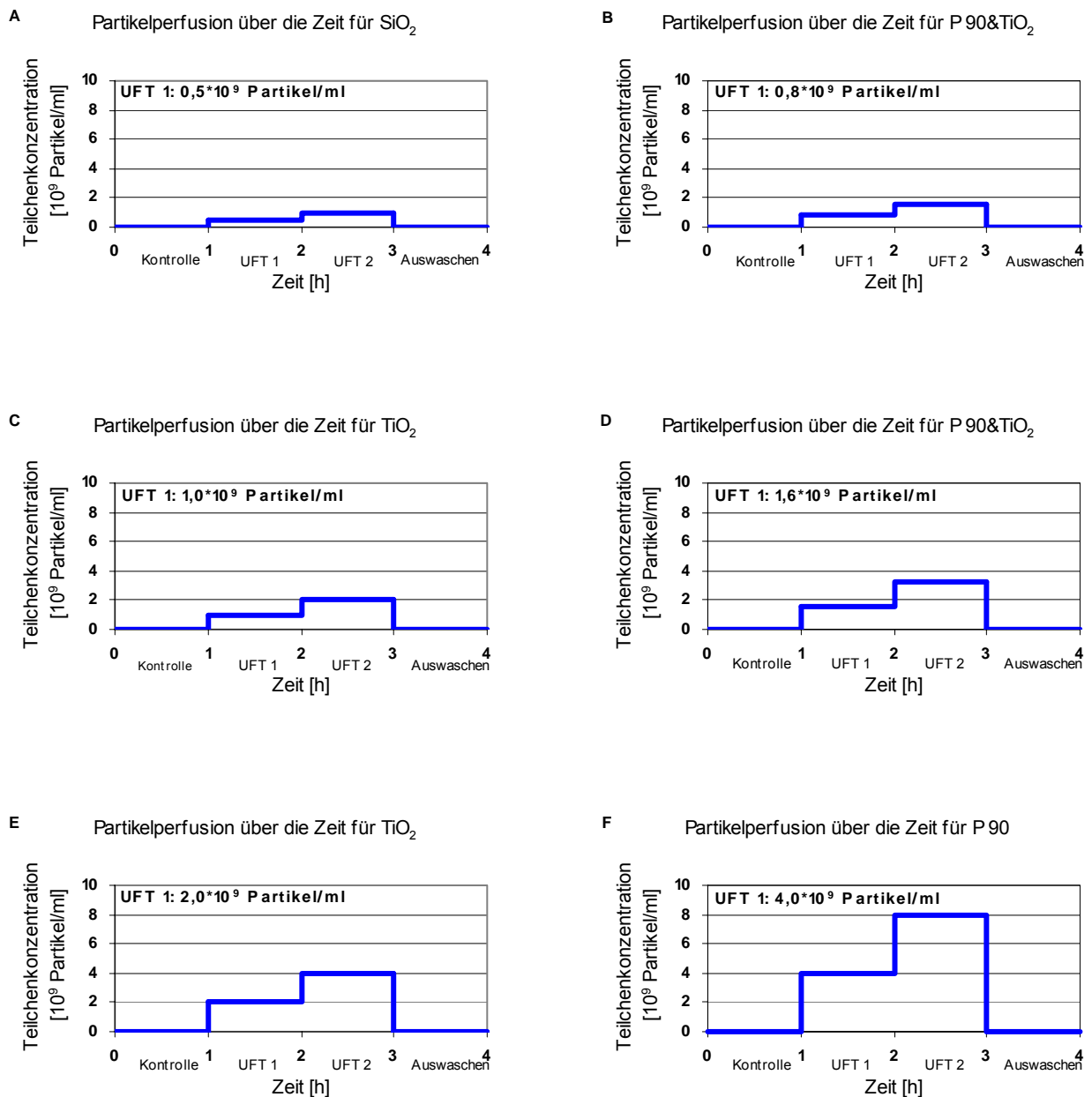


Abb. 43 a-f: Teilchenkonzentrationen während der Zirkulationsphase

Zu Beginn der Experimente wurde in Kontrollversuchen festgestellt, dass eine Versuchsdauer von 5 Stunden möglich ist, da während dieses Zeitraums das Herz stabil schlug und nicht geschädigt wurde. Die Amplitude des EKG-Signals sank um etwa 30 %, die Frequenz blieb stabil.

Bei längeren Versuchszeiten kommt es zu einem stetigen Verlust der Herzleistung, daher können keine verlässlichen Daten gewonnen werden. Generell kann man, abhängig von der Präparationsqualität, mit einem Verlust der Kontraktilität des Herzens von 5-10 %/h rechnen [Sutherland F. et al. 2000]. Um Langendorff-Experimente auch über einen längeren Zeitraum stabil durchführen zu können, müssten Erythrozyten zur besseren Herzversorgung zugesetzt werden.

Während der Herzentnahme wurden aus dem Meerschweinchen zwei Aliquota Blut von circa 1,5 ml entnommen. Aus diesen Proben wurde später die Katecholaminkonzentration im Tier vor dem Experiment bestimmt. Da nicht bekannt war, ob ein sich bildender Blutkuchen die Extraktion der Katecholamine behindert, wurde zu einer Probe Heparin zugegeben. Danach wurden beide Aliquota in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Während des Experiments wurden am Ende eines jeden Versuchsabschnitts Aliquota von 1,5 ml aus der Perfusionslösung entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Später wurde der Katecholamingehalt dieser Proben bestimmt.

Am Ende des Experimentes wurde das Herz abgenommen, mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit dem Herzmaterial soll später ein „gene expression profiling“ durchgeführt werden. Alle Proben und das Herz werden in einem – 80 °C Kühlschrank gelagert.

6.6. Analyse von Katecholaminen aus Blut und Perfusionslösungen

Die Analyse wurde mit dem Recipe Kit „Clinrep Katecholamine im Plasma“ (Recipe München/Deutschland) als Festphasenextraktion durchgeführt [Koller M. 1988]. Dazu wurden die Proben wie folgt aufbereitet:

Probenvorbereitung:

Perfusionslösungen:

Die während des Experiments an der Langendorff-Apparatur gesammelten Proben werden auf Eis aufgetaut. Dies bedeutet die gefrorenen Proben in einen flüssigen Zustand zu überführen, ohne dass diese selber nennenswert über 0 °C erwärmt werden. Es werden 1 ml Probe, 200 µl Interner Standard (IS, 3,4-Dihydroxybenzylamin) und 100 µl Natriumdisulfit (0,5g/l) in Aufbereitungssäulen, die mit Aluminiumoxid gefüllt sind, gegeben und für zehn Minuten gevortext. Der Inhalt wird abgesaugt und die Säulen werden dreimal mit Waschlösung (Washing Buffer/Recipe) gereinigt. Die Flüssigkeitsreste werden anschließend für 2 min bei 1500 g abzentrifugiert. Danach wird die Säule mit 200 µl Elutionspuffer (Elution Buffer/Recipe) für 1 min. gevortext. Mit 1500 g wird das Eluat dann zwei Minuten lang abzentrifugiert. 150 bis 180 µl werden in ein Probenröhrchen übertragen, ohne dabei evtl. vorhandene Pellets zu berühren oder mit zu übertragen

Blutproben:

Von den Blutproben werden nur 500 µl genommen und mit 1,1 ml TRIS, 200 µl IS und 200 µl Natriumdisulfit (0,5g/l) aufgefüllt. Bei der Aufarbeitung von Gesamtblut sind trotzdem einige Unterschiede zu Perfusionsproben zu beachten.

Folgende Änderungen sollte man bei den Blutproben im Gegensatz zu den Perfusionsproben durchführen:

Nicht heparinisierte Proben sollten außerhalb der Säule gemischt und vor dem Auftragen auf die Aufbereitungssäule zentrifugiert werden, um die festen Blutbestandteile abzutrennen. Anschließend können die Proben wie Plasma-Proben behandelt werden.

Zusätzlich sollten die Blutproben fünfmal gewaschen werden.

Anschließend können die Proben stabil bei - 80 °C gelagert und später mittels HPLC analysiert werden.

Analyse:

Für die Analyse wurde die HPLC-Anlage Dionex-IC (Dionex/Basel) verwendet. Das eingesetzte Laufmittel (mobile Phase/Recipe) wurde mit einer Dionex GP 40 Pumpe im geschlossenen Kreislauf gepumpt. Bei Verunreinigung der mobilen Phase („unruhige“ Basislinie) wurde diese komplett erneuert. Ein Vorfilter (Porengröße 3 µm) diente als mechanischer Schutz der Säule vor Verschmutzung. Als Säule wurde eine „phased reverse“ Säule (Recipe/München) verwendet.

Die Katecholaminbestimmung wurde mittels eines elektrochemischen Detektors durchgeführt. Dieser hat gegenüber anderen Detektortypen die Fähigkeit einen weiten Bereich sogenannter nicht chromophorer Moleküle mit einer sehr guten Sensitivität und Selektivität detektieren zu können. Außerdem liefert die elektrochemische Detektion eine beträchtliche Verbesserung bezüglich Sensitivität und Selektivität gegenüber UV-Absorption bei Aminen und hydroxy-substituierten Aromaten wie es die Katecholamine sind.

Zur Messung von Katecholaminen wurde ein elektrochemischer Detektor (Dionex Ionenchromatograph ED 40/Dionex) benutzt, welcher mit einer amperometrischen Zelle ausgestattet war. Als amperometrische Zelle wurde eine elektrochemische Miniatur-Durchflusszelle verwendet, die folgende drei Elektroden beinhaltet: Arbeitselektrode aus Glassy Carbon, Counter-Titanium-Elektrode (Teil des Zellkörpers) und eine kombinierte pH- Silber/Silberchlorid-Elektrode als Referenzelektrode. Aus der Höhe der Strompeaks und der Retentionszeit können die Katecholamine identifiziert und quantifiziert werden.

Für eine einzelne Messung wurden 50µl der Probe in die HPLC injiziert.

Diese Messungen wurden dankenswerter Weise von Dr. A. Stocker, Arbeitsgruppe Prof. Schramm, des Instituts für Ökologische Chemie der GSF durchgeführt.

7. Literaturverzeichnis

Akita M., Ishii K., Kuwahara M., and Tsubone H.: *Power spectral analysis of heart rate variability for assessments of diurnal variation of autonomic nervous activity in guinea pigs*, Exp. Anim. **51 (1)** (2002) 1-7

Bagate K., Meiring JJ., Gerlofs-Nijland M., Cassee F., Wiegand H., Osornio-Vargas A., Borm P.: *Ambient particulate matter affects cardiac recovery in a langendorff ischemia model*, Inhalation Toxicology **18 (9)** 633-643 (2006)

Brown JS., Zeman KL., and Bennett WD.: *Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. **166 (9)** (2002) 1240-1247

Brunauer S., Emmett PH., Teller E.: *Adsorption of gases in multimolecular layers*, J. Am. Chem. Soc. **60 (2)** (1938) 309-319

Cordula: *Anatomie des Herzens*, www.altenpflegeschueler.de

Csapo G.: *Konventionelle und intrakardiale Elektrokardiographie*, CIBA-GEIGY GmbH Wehr/Baden (1980)

Donaldson K., and MacNee W.: *Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10)*, Int. J. Hyg. Environ. Health **203 (5-6)** (2001) 411-415

Donaldson K., Stone V., Tran CL., Kreyling W., and Borm PJ.: *Nanotoxicology*, Occup. Environ. Med. **61 (9)** (2004) 727-728

Dye JA., Lehmann JR., McGee JK., Winsett DW., Ledbetter AD., Everitt JI., Ghio AJ., and Costa DL.: *Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats:*

coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents, Environ. Health Perspect. **109 (3)** (2001) 395-403

Falbe J., and Regitz M.: *Römpp Chemielexikon*, Thieme Stuttgart (1995)

Frey B., Heger G., Mayer C., Kiegler B., Stohr H., and Steurer G.: *Heart rate variability in isolated rabbit hearts*, Pacing Clin. Electrophysiol. **19 (11 Pt 2)** (1996) 1882-1885

Ghio AJ.: *Biological effects of Utah Valley ambient air particles in humans: a review*, J. Aerosol Med. **17 (2)** (2004) 157-164

Greim H., und Deml E.: *Toxikologie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim(1996)

Ibald-Mulli A., Wichmann HE., Kreyling W., and Peters A.: *Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles*, J. Aerosol Med. **15 (2)** (2002) 189-201

Jacob E., Rothe D., Schlögl R., Su S., Müller J.-O., Nießner R., Adelhelm C., Messerer A., Pöschl U., Müllen K., Simpson C., und Tomovic Z.: *Dieseruß: Mikrostruktur und Oxidationskinetik*, 24. Internationales Wiener Motorensymposium (2003)

Kreyling WG., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H., Oberdörster G., and 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 (20)** (2002) 1513-1530

Kaur S., Clark RDR., Walsh PT., Arnold SJ., Colvile RN., and Nieuwenhuijsen MJ.: *Exposure visualisation of ultrafine particle counts in a transport microenvironment*, Atmospheric Environment **40 (2)** (2006) 386-398

Khandoga A., Stampfl A., Takenaka S., Schulz H., Radykewicz R., Kreyling W., and Krombach F.: *Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo*, Circulation **109 (10)** (2004)

Koller M.: *Results for 74 substances tested for interference with determination of plasma catecholamines by "high-performance" liquid chromatography with electrochemical detection*, Clin Chem. **34 (5)** (1988) 947-949

Laden F., Schwartz J., Speizer F.E., and Dockery D.W.: *Reduction in fine particulate air pollution and mortality: extended follow-up of the Harvard Six Cities Study*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. **173** (2006) 667-672

Langendorff O.: *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*, Arch. Ges. Physiol. Mens. Tiere Pflügers **61** (1895) 291-332

Magari SR., Hauser R., Schwartz J., Williams PL., Smith TJ., and Christiani DC.: *Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution*, Circulation **104** (2001) 986-991

Malik M., Task Force of the European Society of Cardiology, the North American Society of Pacing Electrophysiology: *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use*, Circulation **93** (1996) 1043-1065

Milicevic G.: *Low to high frequency ratio of heart rate variability spectra fails to describe sympatho-vagal balance in cardiac patients*, Coll Antropol. **29 (1)** (2005) 295-300

Nemmar A., Vanbilloen H., Hoylaerts MF., Hoet PH., Verbruggen A., and Nemery B.: *Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. **164 (9)** (2001) 1665-1668

Oberdörster G.: *Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles*, Inhal. Toxicol. **8 (Suppl)** (1996) 73-89

Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., and Cox C.: *Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats*, J. Toxicol. Environ. Health A. **65 (20)** (2002) 1531-1543

Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H.; ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group: *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy*, Part. Fibre. Toxicol., **2 (8)** (2005)

Peters A., Wichmann HE., Tuch T., Heinrich J., and Heyder J.: *Respiratory Effects are associated with the number of ultrafine particles*, Am. J. Respir. Crit. Care Med. **155** (1997) 1376-1383

Peters A.: *Particulate matter and heart disease: evidence from epidemiological studies*, Toxicol. Appl. Pharmacol. **207 (2)** (2005) 477-482

Peters A., and MONICA/KORA-Studiengruppe: *Particles in outside air increase the risk of cardiovascular diseases*, Gesundheitswesen **67 (1)** (2005) 79-85

Pfender F., and Ziegler GM.: *Kissing Numbers, Sphere Packings, and Some Unexpected Proofs*, Notices of the AMS (2004)

Pope CA. 3rd: *Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley*, Am. J. Public Health **79 (5)** (1989) 623-628

Scheunert, Trautmann: *Lehrbuch der Veterinärphysiologie*, 7. Auflage; Verlag Paul Parey (1987)

Schuh H.: *Ignoranz vom Allerfeinsten*, DIE ZEIT **19** (2005)

Semmler M., Seitz J., Erbe F., Mayer P., Heyder J., Oberdörster G., and Kreyling WG.: *Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs*, Inhal. Toxicol. **16 (6-7)** (2004) 453-459

Stephenson T.: *Hit the street with your feet: why walking to work could result in lower levels of pollution*, Imperial College London **160** (2006)

Sutherland F., and Hearse DJ.: *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*, Pharmacol. Res. **41 (6)** (2000) 289-294

Tankersley C., Campen M., Bierman A., Flanders S., Broman K., and Rabold R.: *Particle effects on heart-rate regulation in senescent mice*, Inhalation Toxicology **16** (2004) 381-390

Thews G., Mutschler E., und Vaupel P.: *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*, 3. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1989)

Umweltbundesamt: *Hintergrundpapier zum Thema Staub/Feinstaub (PM)*, (2005)

WHO: *Wie der Feinstaub in der Luft die Gesundheit schädigt*, Faktenblatt EURO (2005)

Wichmann HE., and Peters A.: *Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure*, Philos. Trans. R. Soc. A **358** (2000) 2751-2769

Wittmaack K., Strigl M.: *Novel approach to identifying supersaturated metastable ambient aerosol particles*, Environ. Sci. Technol. **39 (21)** (2005) 8177-8184

Wold HE., Simkhovich BZ., Kleinman MT., Nordlie MA., Dow JS., Sioutas C., Kloner RA.: *In vivo and in vitro models to test the hypothesis of particle induced effects on cardiac function and Arrhythmias*, Cardiovascular Toxicology **6 (1)** 69-78 (2006)

Zwermann L.: *Kardiale "Delayed Rectifier" Kaliumkanäle: Bedeutung in humanem Myokard, Speziesunterschiede, transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz*, Dissertation LMU München: Medizinische Fakultät (2005)

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Germering den 21.06.2007