

**Kardiale Auswirkungen einer Feinstaub Langzeitbelastung  
in einem Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Christina Velten geb. Steinwarz  
aus Bonn  
2016

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Georg Baumgarten
2. Gutachter: Jun.-Prof. Dr. Daniela Wenzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.10.2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin,  
Direktor: Professor Dr. med. A. Hoeft

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>10</b>
2.1	Umweltverschmutzung.....	10
2.2.1	Luft.....	10
2.2.2	Luftverunreinigung .....	11
2.2.3	Staub .....	12
2.3	Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	12
2.3.1	Herzinsuffizienz .....	14
2.4	Luftverschmutzung und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	16
2.4.1	Bedeutung von PM <sub>2,5</sub> und PM <sub>10</sub> für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	17
2.4.2	PM <sub>2,5</sub> und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	18
2.4.3	Chronische Feinstaubbelastung .....	19
2.5	Zielsetzung .....	20
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.1	Versuchstiere .....	21
3.2	Herzfunktion .....	23
3.2.1	Blutdruck .....	23
3.2.2	<i>In Vivo</i> Herzfunktion .....	23
3.2.3	Kardiomyozytäre Kontraktilität <i>in vitro</i> .....	25
3.3	Histologische Untersuchungen .....	28
3.3.1	Paraffineinbettung und Gewebsschnitte .....	29
3.3.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	29
3.3.3	Quantitative Auswertung der nukleären und zytoplasmatischen Flächen.....	31
3.3.4	Sirius Rot Kollagenfärbung .....	31
3.3.5	Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung .....	32
3.4	Western Blot.....	32
3.4.1	Einleitung.....	32
3.4.2	Proteinisolation für Western Blot.....	33
3.4.3	Durchführung des Western Blots .....	34

3.5	Polymerase Kettenreaktion .....	38
3.5.1	RNA Isolation .....	39
3.5.2	RNA-Konzentrationsmessung.....	39
3.5.2	cDNA Synthese .....	39
3.5.3	Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	40
3.6	Statistik .....	40
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
4.1	Feinstaubexposition verursacht einen Anstieg des Herzgewichtes .....	41
4.2	Auswirkungen von Feinstaubbelastung auf Herz- und Kreislauffunktion .....	41
4.3	Auswirkungen von Feinstaubbelastung auf die linksventrikuläre Struktur und Funktion.....	42
4.4	Feinstaubbelastung beeinflusst die kontraktile Reserve .....	43
4.5	Feinstaubbelastung hat keinen Einfluss auf den koronaren Blutfluss .....	44
4.6	Langzeit Feinstaubbelastung verursacht eine kardiomyozytäre Dysfunktion <i>in vitro</i> .....	45
4.7	Feinstaubbelastung führt zur Reduktion kardialer SERCA-2a Proteinexpression .....	46
4.8	Langzeit Feinstaubbelastung beeinflusst das Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma in Kardiomyozyten.....	47
4.9	Langzeit Feinstaubbelastung führt zu einem Anstieg der mRNA Expression kardialer Hypertrophiemarker .....	48
4.10	Langzeit PM <sub>2,5</sub> Belastung ist verbunden mit kardialer Kollagendeposition .....	49
4.11	Feinstaubbelastung verursacht einen Anstieg kardialer Kollagenexpression .....	50
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1	Bedeutung von Feinstaub für die kardiale Morbidität und Mortalität .....	52
5.2	Akute und Langzeitbelastung mit Feinstaub.....	54
5.3	Kardiale Auswirkungen einer neunmonatigen Feinstaubbelastung .....	55
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	57
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>

**9. Lebenslauf ..... 75**

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANP	atriales natriuretisches Peptid
CBFR	koronare Blutfluss Reserve
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen
EKG	Elektrokardiogramm
ECL	Enhanced Chemiluminescence Luminolreagenz
EGTA	Ethylen Glykol Tetraensäure
FS	fractional shortening
H	Wasserstoff
H&E	Haematoxylin und Eosin
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
LCA	linke Koronararterie
LV	linksventrikulär
LVESd	linksventrikuläre endsystolische Dimension
LVEDd	linksventrikuläre enddiastolische Dimension
LVHWS	Durchmesser linksventrikuläre Hinterwand während der Systole
LVHWD	Durchmesser linksventrikuläre Hinterwand während der Diastole
MEM	minimal essential Medium
MHC	myosin heavy chain
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
NO <sub>x</sub>	Stickoxide
NYHA	New York Heart Association



OASIS-1	Ohio Air Pollution Exposure System for Interrogation of Systemic Effects
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PW-Doppler	Pulse-Wave Doppler
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SO <sub>2</sub>	Sulfondioxid
WHO	World Health Organisation

## **2. Einleitung**

### **2.1 Umweltverschmutzung**

Umweltverschmutzung beschreibt die Belastung des natürlichen Lebensraumes mit Abfällen und Schadstoffen. Darüber hinaus wird jedoch auch die Einwirkung von Lärm und Licht auf die Umgebung als Umweltverschmutzung bewertet (Walker, 1964). Die Geschichte der Umweltverschmutzung oder Belastung der Umwelt ist eng mit der Entwicklung der menschlichen Zivilisation verbunden. Mit der Organisation menschlichen Zusammenlebens und der Entwicklung der Zivilisation veränderten sich das Ausmaß und die Ausbreitung der Umweltbelastung von einer regionalen bis hin zur globalen Umweltverschmutzung. Hierbei bedeutende Entwicklungsschritte waren die Nutzung des Feuers, die Weiterentwicklung der Landwirtschaft mit der Anlage von Monokulturen, der Städtebau und die Industrialisierung (Gassner et al., 1995; Bertollini et al., 1996). Erstmalige Erwähnung fand die Umweltverschmutzung im Rahmen der beginnenden Industrialisierung in der ersten Hälfte des 18. Jahrhunderts. Darüber hinaus traten im 20. Jahrhundert zusätzlich globale Umweltprobleme wie die Erderwärmung und die Schädigung der Ozonschicht auf. In der Bundesrepublik Deutschland gewann die Belastung der Umwelt durch Abfälle und Schadstoffe, die in besonderem Maße durch die zunehmende Industrialisierung entstanden, mit der offensichtlich werdenden Waldschädigung in den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts zunehmend an gesellschaftlichem und politischem Interesse. Allgemein kann Umweltbelastung nach dem Ort der Belastung in Bodenverschmutzung, Gewässerverschmutzung und Luftverschmutzung unterteilt werden.

#### **2.2.1 Luft**

Luft ist die allgemeine Bezeichnung für das in der Erdatmosphäre enthaltene Gasgemisch, dessen chemische Zusammensetzung kontinuierlichen örtlichen und zeitlichen Veränderungen unterliegt. Zum überwiegenden Teil besteht Luft aus den beiden Gasen Stickstoff (N, 78,08 Vol %) und Sauerstoff (O<sub>2</sub>, 20,95 Vol %). Darüber hinaus enthaltene Bestandteile sind Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>, 0,04 Vol %), Edelgase (0,93 Vol %) und Wasserstoff (H). Weiterhin ist die Luft zu unterschiedlichen Teilen, in Erdnähe zunehmend, mit Wasser (H<sub>2</sub>O) gesättigt. Der Mensch atmet täglich ca. 30 m<sup>3</sup> Luft und dessen Reinheit ist eine Grundvoraussetzung für die Gesundheit des

Menschen und seiner Umgebung inklusive der Tier- und Pflanzenwelt. In dicht besiedelten Gebieten, sogenannten Ballungszentren, kommt es zu einer zunehmenden Verunreinigung der Luft, welche als Luftverschmutzung bezeichnet wird. Die bedeutendsten Verursacher dieser Verunreinigung der Umgebungsluft sind Industrie, Haushalt, Landwirtschaft und Verkehr (Gassner und Spuhler, 1995; Bertollini et al., 1996). Luftverschmutzung ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung zahlreicher Erkrankungen. Nach aktuellen Schätzungen der „World Health Organisation“ (WHO) waren im Jahr 2012 bis zu 7 Millionen Todesfälle auf die Folgeschäden verunreinigter Luft zurückzuführen. Im Vergleich zu vorangegangenen Schätzungen der WHO hat sich die Anzahl der durch Luftverschmutzung verursachten Todesfälle in den vergangenen Jahren verdoppelt und stellt demnach das größte umweltbedingte Gesundheitsrisiko dar. Nach Angaben der WHO könnte eine Reduktion der Luftverschmutzung und Verbesserung der Luftqualität dazu beitragen, den vorzeitigen Tod von Millionen Menschen zu verhindern (WHO, 2014b, Ezzati et al., 2003, 2015, 2014).

### **2.2.2 Luftverunreinigung**

Die Luft unterliegt in ihrer Zusammensetzung zahlreichen Einflüssen. Eine Veränderung ihrer natürlichen Zusammensetzung wird als Luftverunreinigung oder Luftverschmutzung bezeichnet. Verunreinigungen oder Verschmutzungen werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen inklusive Ozon, Kohlenstoffmonoxid (CO), Sulfondioxid (SO<sub>2</sub>), Stickoxiden (NO<sub>x</sub>), Flüssigkeiten und Feststoffe verursacht. Die Feststoffe oder auch Partikel werden ihrem Durchmesser entsprechend eingeteilt. Partikel bestehen aus einer festen und einer flüssigen Komponente und leiten sich von Abgasen, Straßenstaub, Waldbränden, Windstürmen, Vulkanausbrüchen, Landwirtschaft und Salzwassersprühnebel her. Größe, Oberfläche und chemische Zusammensetzung bestimmt das von den Partikeln ausgehende Gesundheitsrisiko. Luftverschmutzung beinhaltet sowohl Feststoffe als auch Gase. Partikel und Gase stellen ein Gesundheitsrisiko dar. Überwältigende epidemiologische Daten belegen die Bedeutung der Feststoffe für die Entstehung einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen (Johannson et al., 2015, Araujo et al., 2008). Das alleinige Vorkommen von Feststoffen ist marginal, da Gase und gasartige Verbindungen wie Aldehyde und polyzyklische Kohlenwasserstoffe ständig wechseln und mit Feststoffen interagieren.

Viele dieser Bestandteile aus der Flüssig-Gasphase binden an der Oberfläche von Feststoffen und diese an weitere Feststoffe. In vorangegangenen Untersuchungen konnte anhand von Röntgen-Fluoreszenzanalysen eine sehr hohe Konzentration von Metallen in der Luft des in der vorliegenden Arbeit verwendeten „Ohio Air Pollution Exposure System for Interrogation of Systemic Effects“ (OASIS-1) Systems nachgewiesen werden (Sun et al., 2005). Die Ergebnisse belegten überproportional hohe Eisen- und Zinkkonzentrationen in der Umgebungsluft. Die gemessenen Werte lagen jedoch im Bereich der in anderen westlichen Industrieregionen regelhaft vorkommenden Konzentrationen.

### **2.2.3 Staub**

Staub ist der Sammelbegriff aller festen in der Luft befindlichen organischen und anorganischen schwebenden Partikel. Aufgrund der gesundheitlichen Bedeutung der Partikelgröße erfolgt eine entsprechende Unterteilung des Staubs in Grobstaub ( $>10\ \mu\text{m}$ ), Feinstaub ( $0,1\text{-}10\ \mu\text{m}$ ) und Ultrafeinstaub ( $<0,1\ \mu\text{m}$ ) (Cassee et al., 2013).

Grobstaub mit einem Durchmesser von über  $10\ \mu\text{m}$  wird im Respirationstrakt gefiltert und gelangt somit nicht in die Lunge. Im Gegensatz zum Grobstaub gelangt Feinstaub mit einer Partikelgröße zwischen  $2,5$  und  $10\ \mu\text{m}$  zwar bis tief in die Lunge, ist jedoch nicht „alveolengängig“, und kann somit nicht durch die Alveolarmembran in das Blut aufgenommen werden. Feinstaub mit einer Partikelgröße von  $<2,5\ \mu\text{m}$  ist alveolengängig und kann daher in das Blut gelangen und mit dem Blutstrom im Körper verteilt werden. Aus diesem Grund ist der Anteil von Feinstaub mit einem Durchmesser  $<2,5\ \mu\text{m}$  von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen (Kim et al., 2015).

## **2.3 Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind von enormer sozioökonomischer Relevanz und stellen laut Veröffentlichungen des Statistischen Bundesamtes die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar (Böhm, 2009). Im Jahr 2008 war nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) der Tod von 17 Millionen Menschen auf eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zurückzuführen. Dies entsprach etwa 30 % aller Todesfälle weltweit. Schätzungen zufolge soll diese Zahl bis zum Jahr 2030 auf 25

Millionen Todesfälle ansteigen. Obwohl besonders Menschen in westlichen Industrienationen von Herz-Kreislauf-assoziierten Erkrankungen betroffen sind, treten über 80 % der weltweiten Todesfälle in Entwicklungsländern auf (WHO, 2006, WHO, 2010). Für Herz-Kreislauf-Erkrankungen besteht keine einheitliche Definition, jedoch zeichnen sich alle diesem Formenkreis zugerechneten Erkrankungen durch einen chronischen teilweise über Jahrzehnte andauernden progressiven Verlauf aus, der sich auf dem Boden von Risikofaktoren entwickelt.

Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen laut dem ICD-System im weitesten Sinne folgende Erkrankungen:

- Akutes rheumatisches Fieber
- Chronisch rheumatische Herzkrankheit
- Hypertonie
- Ischämische Herzkrankheit
- Pulmonale Herzkrankheiten und Krankheiten des Lungenkreislaufes
- Zerebrovaskuläre Krankheiten
- Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren
- Krankheiten der Venen und Lymphgefäße

Von den oben erwähnten Pathologien stellt die Hypertonie den wichtigsten Risikofaktor bezüglich der Entstehung zum Tode führender Erkrankungen dar. Im Jahre 2002 war eine Hypertonie für etwa ein Viertel aller Todesfälle in der westlichen Welt mitverantwortlich. Mit einer Prävalenz von 55 % ist die Inzidenz der Hypertonie in Deutschland doppelt so hoch wie in anderen westlichen Industrienationen (Prugger et al., 2006).

Eine zur Verdeutlichung der Relevanz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen herangezogene Untersuchung ist die sogenannte „Framingham-Studie“. Hierbei handelt es sich um eine Längsschnittuntersuchung der Bevölkerung des Ortes Framingham in Massachusetts, in der die Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen über mehrere Jahrzehnte hinweg erfasst und Risikofaktoren beleuchtet wurden. Vier Fünftel der in der Studie untersuchten Patienten, bei denen eine linksventrikuläre (LV) Hypertrophie

diagnostiziert wurde, waren innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 14 Jahre verstorben (Kannel et al., 1969).

Eine Herzmuskelhypertrophie ist definiert als Zunahme der Muskelmasse bei gleichbleibender Anzahl von Kardiomyozyten. Sie entwickelt sich meist auf dem Boden einer Hypertonie und beschreibt die gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl unterschiedlicher Herzerkrankungen. Bei physiologischen kardialen Beanspruchungen, bedingt durch Wachstum, Schwangerschaft oder sportliche Belastung, kann es zur Ausbildung einer physiologischen Herzmuskelhypertrophie kommen.

Im Gegensatz zur physiologischen Belastung bedingten Hypertrophie entsteht eine pathologische Hypertrophie durch Klappenvitien, neurohumorale Überbeanspruchung und dadurch bedingter Volumenbelastung oder durch eine Veränderung in der Zusammensetzung kardialer kontraktile Proteine (Berenji et al., 2005).

Bei starker physiologischer Beanspruchung entsteht eine physiologische Hypertrophie, im Rahmen derer das Herzgewicht bis auf 500 g ansteigen kann (Kasikcioglu, 2011). Während sich eine physiologische Hypertrophie auf dem Boden einer intermittierenden kardialen Beanspruchung entwickelt, besteht bei der Pathogenese einer pathologischen Hypertrophie eine kontinuierliche Belastung des Herzens. Bedingt durch die kontinuierliche kardiale Belastung kann das Herzgewicht auf bis zu 1000 g ansteigen. Dieser Anstieg des Herzgewichtes entsteht im Rahmen einer kontinuierlichen und pathologischen Belastung durch kardiale Umbauprozesse. Diese, als kardiales Remodeling bezeichneten Prozesse, beinhalten einen Umbau des Bindegewebes mit Kollagendeposition, welche eine interstitielle Fibrose zur Folge haben. Kardiales Remodeling und interstitielle Kollagendeposition und Fibrose sind morphologische Veränderungen, welche die gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl unterschiedlicher Herzerkrankungen darstellen (Mariani et al., 2006).

### **2.3.1 Herzinsuffizienz**

Klinisch manifestiert sich eine Herzinsuffizienz durch Leistungsminderung, Dyspnoe und eine Flüssigkeitsretention mit Ödembildung, aufgrund einer kardialen Funktionseinschränkung. Basierend auf dem Bereich der Funktionseinschränkung kann zwischen einer Linksherzinsuffizienz, einer Rechtsherzinsuffizienz und einer Globalherzinsuffizienz unterschieden werden. Darüber hinaus kann anhand der Zeitdauer der Entstehung zwischen einer chronischen Herzinsuffizienz oder einer durch ein

plötzliches Ereignis, wie z. B. Herzinfarkt, Lungenembolie oder Herzrhythmusstörungen akut auftretenden Herzinsuffizienz unterschieden werden. Eine der für den Grad der Funktionseinschränkung gängigsten Klassifikationen der Herzinsuffizienz ist die der New York Heart Association (NYHA). Die Zuordnung in unterschiedliche Stadien richtet sich hierbei alleinig nach dem Grad der klinischen Symptome und der daraus für den Patienten resultierenden Belastungseinschränkung.

**Tab. 1:** Einteilung der Herzinsuffizienz nach Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) 1994.

NYHA Stadium I	Herzschwäche bei leichter Alltagsbelastung, keine unangemessene Erschöpfung, Atemnot oder Herzrhythmusstörungen.
NYHA Stadium II	Gewöhnliche körperliche Alltagsbelastung wie Treppensteigen führen zu Dyspnoe oder Herzrhythmusstörungen
NYHA Stadium III	Eine geringe körperliche Belastung verursacht eine starke körperliche Erschöpfung, Atemnot oder Herzrhythmusstörungen
NYHA Stadium IV	Klinische Zeichen der Herzinsuffizienz bereits in Ruhe, ohne körperliche Beanspruchung

Eine Einteilung basierend auf der Symptomatik die der Patient zeigt hat jedoch zur Folge, dass in der NYHA-Klassifikation unter einer asymptotischen Herzinsuffizienz (NYHA I) auch jene Patienten eingeordnet werden, die erst unter medikamentöser Therapie wieder symptomfrei werden.

Aktuell existiert kein allgemeingültiges pathophysiologisches Modell, das eine chronische Herzinsuffizienz ausreichend beschreibt. Bekannt sind allerdings einige pathophysiologische Mechanismen, die Teil des komplexen Entstehungsmechanismus des Syndroms der „chronischen Herzinsuffizienz“ sind und damit die Grundlage unterschiedlicher Interventionsansätze bilden (Braunwald, 2013, Catalucci et al., 2008).

Allgemein entsteht eine chronische Herzinsuffizienz durch eine kardiale Druck- bzw. Volumenbelastung oder den Verlust von funktionsfähigem Herzmuskelgewebe und

dadurch bedingten myokardialen Schädigung. Die daraus bedingte Verminderung der linksventrikulären Funktion aktiviert Gegenregulationsmechanismen, die zwar kurzfristig das Herzminutenvolumen verbessern, jedoch langfristig zur weiteren myokardialen Zellschädigung und einer Progression der Herzinsuffizienz führen (Catalucci, Latronico, 2008).

Die aktuellen Therapiekonzepte zielen daher auf die Prävention der schädlichen Folgen und die Linderung der Symptome einer verminderten linksventrikulären Leistungsfähigkeit ab.

Zu den bisher bekannten Gegenregulationsmechanismen gehört z. B. die Aktivierung des sympathoadrenergen Systems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Pharmakologische Therapieansätze bestehen daher aus ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Hemmern, Beta-Rezeptorenblockern und Aldosteron-Antagonisten (Konstantinou et al., 2013, Hoppe et al., 2005).

## **2.4 Luftverschmutzung und Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Die gesundheitsschädigenden Auswirkungen von Staub gewinnen weltweit zunehmend an politischem Interesse (2006). Die pulmonalen Konsequenzen einer Staubbelastung wie eine chronische Inflammation, Bronchitis, oder die Entwicklung chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen (COPD) sind ausreichend beschrieben (Yoda et al., 2014, Cai et al., 2014). Weiterhin belegen epidemiologische Daten einen Zusammenhang zwischen Staubbelastung und der Exazerbation einer vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankung (Verrier et al., 2002, Atkinson et al., 2014). Ebenfalls ist eine Exposition mit erhöhten Staubkonzentrationen ursächlich für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei nicht vorerkrankten Personen (Miller et al., 2007). Auf diesen epidemiologischen Beobachtungen basierend konnten klinische und experimentelle Studien einen Zusammenhang zwischen sowohl kurzzeitiger als auch langzeitiger Belastung mit unterschiedlichen Stäuben und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität nachweisen (Brook et al., 2004, Brook et al., 2010, Peters et al., 2001).

Der Zusammenhang zwischen Luftverschmutzung und der Entstehung unterschiedlicher Lungenerkrankungen ist ausgiebig belegt (Johannson, Balmes, 2015, Gordon et al., 2014, Guarnieri et al., 2014). Die hierfür verantwortlichen Mechanismen konnten bereits umfangreich beschrieben werden. Obwohl neuere epidemiologische Unter-



suchungen eine Korrelation zwischen Luftverschmutzung und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen belegen, konnten die hierfür verantwortlichen Mechanismen nicht abschließend nachgewiesen werden.

#### **2.4.1 Bedeutung von PM<sub>2,5</sub> und PM<sub>10</sub> für Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

In den vergangenen 20 Jahren haben epidemiologische Studien den Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Staubgrößen und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht (Lu et al., 2015). In diesen Studien wurde zwischen den kurzzeitigen und langzeitigen Auswirkungen von Luftverschmutzung im Bezug auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen unterschieden. Hier konnte nachgewiesen werden, dass Feinstaub mit einer Größe unter 2,5 µm (PM<sub>2,5</sub>) eine größere Korrelation mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen zeigt als Staub mit einer Partikelgröße von 10 µm (PM<sub>10</sub>). Darüber hinaus stehen größere Partikel jedoch im Zusammenhang mit der Exazerbation von Lungenerkrankungen wie Asthma. Nach Angaben der WHO war Luftverschmutzung 2012 für den Tod von insgesamt etwa 7 Millionen Menschen mitverantwortlich. Diese 7 Millionen Todesfälle lassen sich unterteilen in 3,7 Millionen Todesfälle, die auf den Einfluss von Luftverschmutzung außerhalb von Gebäuden zurückzuführen waren und 4,3 Millionen Todesfälle, die infolge von verschmutzter Innenraumluft zustande kamen. Die 3,7 Millionen Todesfälle verursacht durch die Auswirkungen verschmutzter Luft außerhalb von Gebäuden sind damit für 6,7 % aller weltweiten Todesfälle verantwortlich (2015, WHO, 2014a, Kuehn, 2014).

Eine Verunreinigung der Umgebungsluft kann jedoch nicht als unmittelbare Todesursache angesehen werden. Unmittelbare Todesursache bei den in diese WHO Statistik eingeflossenen Daten waren sogenannte „Volkskrankheiten“, wie z. B. ischämische Herzerkrankungen, Schlaganfälle, chronische Atemwegserkrankungen und bösartige Neubildungen. Diese erwähnten Erkrankungen zählen jedoch auch unabhängig von einer Belastung mit verunreinigter Luft weltweit zu den am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen. Darüber hinaus konnte bislang nicht der Nachweis erbracht werden, dass einzelne Personen an den unmittelbaren Folgen von Luftverschmutzung verstorben sind, vielmehr wurde in diesen Untersuchungen lediglich die Häufigkeit bestimmter Todesursachen in das Verhältnis zu den gemessenen Schadstoffkonzentrationen gesetzt. Von den 3,7 Millionen durch

Außenluftverschmutzung verursachten Todesfälle waren 6 % auf ein Lungenkarzinom, 11 % auf eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung, 3 % auf eine respiratorische Infektion, 40 % auf Apoplexie und 40 % auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen (Kuehn, 2014, WHO, 2014a).

Basierend auf in Ballungszentren gewonnenen epidemiologischen Daten konnte ein mittelbarer Zusammenhang zwischen  $PM_{2,5}$  Exposition und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität nachgewiesen werden. Epidemiologische Daten, die zwischen 1974 und 1990 in 6 amerikanischen Städten erhoben wurden, konnten nachweisen, dass das mit einer  $PM_{2,5}$  Exposition assoziierte kardiovaskuläre Todesrisiko sich alle  $10\mu g/m^3$  erhöht (Laden et al., 2006). Weitere epidemiologische Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen Luftverschmutzung und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Für eine kurzzeitige Exposition mit einer erhöhten Schwebeteilchenkonzentration konnten Auswirkungen auf die Herz- und Kreislauffunktion nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass eine Feinstaub Langzeitbelastung zu einem stärkeren Anstieg des kardiovaskulären Risikos im Vergleich zur kurzzeitigen Belastung führt (Brook, Rajagopalan, 2010).

#### **2.4.2 $PM_{2,5}$ und Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Zahlreiche epidemiologische Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen Feinstaub ( $PM_{2,5}$ ) Exposition und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. In einer Studie, bei der 500.000 Erwachsene über einen 16 jährigen Beobachtungszeitraum nachverfolgt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass bei einem Anstieg der  $PM_{2,5}$  Konzentration um  $10,5 \mu g/m^3$  die Risiken der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und eines Herz- Kreislaufstillstands um 8-18 % ansteigen (Pope et al., 2015). Bei kardiovaskulär vorerkrankten Personen erhöht eine akute  $PM_{2,5}$  Belastung das Risiko für das Auftreten von Herzinfarkten, Schlaganfällen, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz innerhalb von Stunden bis Tagen (Pope et al., 2006, Peters, Dockery, 2001). Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass eine  $PM_{2,5}$  Langzeitbelastung über eine Dauer von mehreren Monaten und Jahren das Risiko für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zu einem größeren Ausmaß erhöht als kurzzeitige Belastungen (Brook, Rajagopalan, 2010). Darüber hinaus konnten bei einer Langzeit-

belastung auch schädliche Auswirkungen unabhängig von bereits existierenden Erkrankungen nachgewiesen werden (Brook, Rajagopalan, 2010).

Ein akuter, kurzzeitiger Anstieg der  $PM_{2,5}$  Konzentration um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  führt zu einem Anstieg der kardiovaskulär bedingten Mortalität um 1 %, während eine Langzeitexposition mit chronisch erhöhten Konzentrationen von  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  zu einem mehr als 10%igen Anstieg führt. Diese Beobachtungen untermauern die Hypothese, dass eine Akkumulation der  $PM_{2,5}$  Exposition über eine längere Zeitspanne stärkere Auswirkungen auf das eventuelle Risiko der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen hat, als eine kurzzeitige Belastung.

### **2.4.3 Chronische Feinstaubbelastung**

Epidemiologische Daten belegen die Bedeutung einer Feinstaubexposition als Risikofaktor für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Brook, 2007). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass eine Feinstaub Langzeitbelastung einen größeren Risikofaktor darstellt als kurzzeitige Belastungen (Brook, Rajagopalan, 2010). Eine kumulative Exposition hat das potentielle Risiko nicht nur der akuten Verschlechterung einer bereits vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankung, sondern auch fundamentale Auswirkungen für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen in bisher nicht vorgeschädigten Organismen. Luftverschmutzung wirkt auf den Organismus während des gesamten Lebens ein. Von besonderer Bedeutung ist eine chronische Exposition über einen bedeutenden Zeitraum der gesamten Lebensdauer. Eine Vielzahl experimenteller Studien hat die Auswirkungen einer  $PM_{2,5}$  Belastung im Bezug auf die Beeinflussung einer Anfälligkeit und Progression von Atherosklerose, Inflammation und Bluthochdruck untersucht (Sun et al., 2005; Araujo et al., 2008; Kunzli et al., 2010). Obwohl diese Untersuchungen als chronische Exposition angesehen werden, betragen die in diesen Studien verwendeten Expositionsdauern zwischen zehn und zwölf Wochen. Die Auswirkung einer chronischen Feinstaubbelastung, die über einen bedeutenden Anteil der gesamten Lebenszeit auf einen Organismus einwirkt, wurde bisher nicht untersucht.

## **2.5 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der kardialen Langzeiteffekte einer chronischen Feinstaubexposition über etwa die Hälfte der Lebenszeit einer Maus. Wir untersuchten, ob eine chronische Feinstaubbelastung in Abwesenheit zusätzlicher Risikofaktoren und ohne vorbestehende kardiovaskuläre Erkrankungen nachweisbare kardiale Auswirkungen hat. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die durch chronische Feinstaubbelastung verursachten Veränderungen der kardialen Funktion und Struktur vergleichbar sind mit den durch andere bekannte, protrahiert auf das Herz einwirkenden Risikofaktoren wie Hypertonie oder Diabetes mellitus verursachten pathologischen Veränderungen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden männliche Mäuse der Zuchtlinie C57BL/6 verwendet. Die von Harlan erworbenen Versuchstiere wurden im Alter von 8 Wochen für die Zeitdauer von 9 Monaten einer Umgebungsluft angereichert mit Partikeln der Größe  $2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) ausgesetzt. Während des gesamten Versuchszeitraumes waren die Mäuse in einem vollklimatisierten Container der Ohio State University in Columbus, Ohio untergebracht. Eine Anreicherung von  $\text{PM}_{2,5}$  aus der Umgebungsluft erfolgte mittels eines Schwebstoff-Konzentrations-Anreicherungssystems „Ohio Air Pollution Exposure System for Interrogation of Systemic Effects“ (OASIS-1), welches für Langzeitstudien modifiziert wurde. Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus entsprechend der aktuell gültigen FELASA-Richtlinien und Universitäts interner Standards gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Ein Tierversuchsantrag wurde gestellt und durch die örtlichen Behörden (Institutional Animal Care and use Committee (IACUC) der Ohio State University, Columbus, Ohio) genehmigt. Die mittleren wöchentlichen Partikelkonzentrationen der gefilterten Luft (FL) und der mit Feinstaub ( $\text{PM}_{2,5}$ ) angereicherten Luft wurden bestimmt und sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Basierend auf den wöchentlich gemessenen Feinstaubwerten resultiert eine mittlere tägliche Konzentration von Partikeln mit einem Durchmesser von weniger als  $2,5 \mu\text{m}$  in der Umgebungsluft von  $10,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  während des Versuchszeitraumes. Die mittlere tägliche  $\text{PM}_{2,5}$  Konzentration in der Versuchskammer war mit  $85,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  etwa 7,8 fach höher als in der Umgebungsluft. Die Luft, der die Kontrolltiere während des Versuches ausgesetzt waren, wurde mittels eines hocheffizienten Partikelfilters (Pall Life Sciences, East Hills, New York), welcher in den Lufteinlass des Containers eingesetzt war, um alle Partikel aus der Luft zu filtern, von Feinstaub befreit (FL). Da die Mäuse während des neunmonatigen Experimentes jeweils für sechs Stunden pro Tag, sechs Tage pro Woche der jeweiligen  $\text{PM}_{2,5}$  oder Filter Luft (FL) Umgebung ausgesetzt wurden resultiert hieraus mit  $15,2 \pm 0,91 \mu\text{g}/\text{m}^3$  eine mittlere  $\text{PM}_{2,5}$  Konzentration nah am jährlichen Durchschnitt für Nordamerika von  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Johnson et al., 2005).

**Tab. 2:** Wöchentliche Feinstaubkonzentrationen der FL und PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäuse während des neunmonatigen Versuchszeitraumes.

Zeit (Wochen)	FL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	PM <sub>2,5</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
1	13,71	95,22
2	7,30	56,00
3	6,18	41,96
4	4,27	32,25
5	11,20	113,65
6	11,09	123,27
7	7,71	16,90
8	10,54	56,55
9	9,73	54,73
10	8,95	83,20
11	14,03	129,20
12	14,06	72,50
13	10,97	72,13
14	6,32	42,69
15	14,12	126,85
16	6,84	48,44
17	18,74	150,45
18	15,94	134,13
19	12,01	140,22
20	10,39	89,52
21	11,14	112,17
22	10,77	82,49
23	12,62	107,00
24	5,54	67,94
25	10,77	82,49
26	12,62	128,79
27	5,54	27,00
28	6,06	39,41
29	9,18	39,41
30	8,46	42,93
31	10,31	62,97
32	10,28	60,20
33	8,46	72,19
34	9,67	66,49
35	16,34	138,60
36	2,63	20,37
37	20,38	266,37
38	9,79	86,86
39	18,91	142,12

## **3.2 Herzfunktion**

### **3.2.1 Blutdruck**

Nach neunmonatiger Exposition mit PM<sub>2,5</sub> oder gefilterter Luft (FL), beginnend im Alter von 8 Wochen, wurden der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck mittels eines nicht invasiven Schwanz Manschetten Manometers (Visitech IITC model 129 System, Visitech Systems, Apex, North Carolina) gemessen. Zur Reduktion stressbedingter Auswirkungen auf die Kreislauffunktion während der Messungen, erfolgte zunächst eine Gewöhnung der Mäuse an das Untersuchungsverfahren. Hierzu durchliefen die Tiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen das Prozedere ohne Erfassung von Daten. Zur weiteren Minimierung der verfahrensassoziierten Blutdruckeffekte wurden von den ersten durchgeführten Messungen 10 Messungen verworfen. Im Anschluss erfolgten 10 weitere Messungen. Die hierbei gewonnenen Werte wurden gemittelt und die Mittelwerte analysiert. Systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Für jedes Tier wurden die gewonnenen Werte der einzelnen Tage gemittelt und als durchschnittlicher Wert bestimmt.

### **3.2.2 *In Vivo* Herzfunktion**

Die kardiale Funktion der Versuchstiere wurde nach neunmonatiger Exposition mit PM<sub>2,5</sub> oder FL echokardiographisch erfasst. Mittels eines VisualSonics Vevo 2100 mit einem 40 MHz transducer (Visualsonics, Toronto, Ontario) wurde ein Herzultraschall durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse zunächst in eine Narkosekammer gegeben und mittels 2 % Isoflurane (2-chloro-2-(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane) in 100 % Sauerstoff narkotisiert. Nach Einsetzen der Narkose wurden die Tiere auf eine gewärmte Arbeitsplatte überführt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit 1,0 % Isoflurane in 100 % O<sub>2</sub>, welches über eine Nasenmaske appliziert wurde.

Um potentielle kardiodepressive Auswirkungen einer zu tiefen Narkose zu verhindern, erfolgte die kontinuierliche Ableitung eines EKG zur Sicherstellung einer ausreichenden Herzfrequenz und eine entsprechende Anpassung der Isoflurane-konzentration bei zu tiefer oder nicht ausreichend tiefer Narkose. Zur EKG Ableitung wurden die Extremitäten vorsichtig an mit Gel (Signa Gel, Parker Labs, Fairfield, New Jersey) beschichteten Elektroden befestigt. Alle echokardiographischen

Untersuchungen wurden bei einer Herzfrequenz von über 500 Schlägen pro Minute durchgeführt. Statistische Auswertungen zeigten keinen signifikanten Unterschied der Herzfrequenz zwischen den PM<sub>2.5</sub> und FL exponierten Mäusen. Eine kontinuierliche Temperaturmessung erfolgte durch ein rektal eingeführtes Thermometer. Anhand der gemessenen Körperkerntemperatur erfolgte die automatische Temperaturanpassung der Arbeitsplatte, so dass eine konstante Körperkerntemperatur von 37 °C während der Messungen aufrecht erhalten wurde. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde vor den Ultraschalluntersuchungen das Fell der Mäuse mittels Nair Enthaarungscreme (Church & Dwight Co., Princeton, New Jersey) vom Thorax entfernt.

Anschließend wurde vorgewärmtes Ultraschallgel (Aquasonic, Parker Labs, Fairfield, New Jersey) auf den Brustkorb gegeben und ein 15 MHz Ultraschallkopf, optimiert für Nagetiere, in parasternaler Orientierung zur Erfassung der kurzen Herzachse platziert. Der linke Ventrikel wurde im M-Mode Verfahren dargestellt und die Herzaktion für die Dauer von acht Sekunden aufgezeichnet. Die linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Dimensionen (LVESd und LVEDd), sowie der Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand während der Systole, als auch während der Diastole (LVHWs und LVHWd) wurden gemessen. Zur Analyse wurden jeweils aus jeder Aufzeichnung fünf Herzaktionen und drei Messungen pro Tier gemittelt. Die Datenerfassung erfolgte anhand der von der „American Society for Echocardiography“ empfohlenen „leading-edge“ Technik (Quinones et al., 2002). Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte durch einen zur Gruppenzugehörigkeit verblindeten Untersucher. Aus den gemessenen Parametern LVESd und LVEDd wurden die linksventrikuläre Verkürzung (fractional shortening, FS) mittels der Gleichung  $\%FS = ((LVEDd - LVESd) / LVEDd * 100)$  berechnet.

Anschließend wurde der Schallkopf in eine subkostale Position bewegt. Hierdurch konnte die Trikuspidalklappe im Vierkammerblick dargestellt werden. Nach Aufsuchen des Vierkammerblicks wurde der Doppler in die Klappenebene gebracht und im Bereich der Mitralklappe platziert. Mittels Pulsdoppler wurde der Fluss über der Mitralklappe dargestellt und die beiden Flußspitzen E und A, welche die passive (E) und aktive (A) Füllung des linken Ventrikels repräsentieren, erfasst. Zur Bestimmung der linksventrikulären diastolischen Funktion wurde das E/A Verhältnis berechnet.

Der koronare Blutfluss und die koronare Flussreserve wurden nach der Methode von Hartley et al. ermittelt (Hartley et al., 2007). Hierzu wurde vom Vierkammerblick aus, in gleichbleibendem Winkel wie zur Bestimmung des linksventrikulären atrioventrikulären



Flusses, der Ultraschallkopf etwas näher zur Thoraxoberfläche bewegt. Unter Farbdoppler Erfassung erfolgte das Aufsuchen der linken Koronararterie (LCA). Aufgrund der dilatatorischen Wirkung von Isoflurane auf die Koronargefäße und zur Vergleichbarkeit der zu erfassenden Daten wurde nach Darstellung der LCA die IsofluraneKonzentration auf 1,0 % eingestellt. Zur Einstellung eines stabilen Konzentrationsgleichgewichtes wurden diese Einstellungen für eine Dauer von fünf Minuten belassen bevor weitere Messungen erfolgten. Anschließend wurde der Messbereich der Probe auf 0,5 mm eingestellt, auf dem Abgang der LCA platziert und der Basiswert des koronaren Blutflusses gemessen. Drei voneinander unabhängige Messungen wurden erfasst und der errechnete Mittelwert als Wert der entsprechenden Maus bestimmt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung des koronaren Blutflusses bei maximaler Dilatation. Hierzu wurde zunächst eine Schwanzvene punktiert, über die den Mäusen 140 µg/kg/min Adenosin intravenös (i.v.) kontinuierlich appliziert wurde. Die maximale Hyperämie wurde nach ca. einer Minute erreicht. Drei Messungen des koronaren Blutflusses wurden bei maximaler Hyperämie erfasst, analysiert und der Mittelwert bestimmt. Die koronare Blutfluss Reserve (CBFR) wurde mittels folgender Gleichung von Wikstrom und Mitarbeitern errechnet (Wikstrom et al., 2008):

$$CBFR = CBF_{hyperemia} / CBF_{baseline}$$

Die Erhebung und Auswertungen aller echokardiographischen Daten erfolgte durch einen zur Gruppenzugehörigkeit verblindeten Untersucher.

### 3.2.3 Kardiomyozytäre Kontraktilität *in vitro*

Die Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten wurde nach einer von Norby et al. (Norby et al., 2002) beschriebenen und von Wold et al. (Wold et al., 2007) modifizierten, enzymatischen Methode durchgeführt. Vor der Organentnahme erfolgte zur Hemmung der Blutgerinnung die Applikation von 2500 IE/100 g Körpergewicht Heparin i.p.. Im Anschluss an eine fünfminütige Inkubationszeit wurde das Versuchstier mittels einer Pentobarbital Überdosierung (50 mg/kg) getötet. Nach Ausbleiben einer Reaktion auf einen Schmerzreiz erfolgte mittels eines V-förmigen Schnitts in Höhe des Manubrium sterni bis kurz unterhalb des Rippenbogens eine

mediane Laparotomie. Anschließend wurden die Rippen beidseits in der Axillarlinie und der Thorax in Höhe des Manubrium sterni durchtrennt. Daraufhin konnte der knöcherne Thorax abgenommen werden. Nachfolgend wurden das Herz und die großen Gefäße identifiziert und zügig entnommen. Das Präparat wurde in eine eisgekühlte  $\text{Ca}^{2+}$  freie Tyrodelösung überführt. In der Tyrodelösung wurden das Perikard und Bindegewebsreste vom Herzen abpräpariert und die Aorta identifiziert. Nach Entfernung von Perikard und Bindegewebsresten erfolgte die Kanülierung der Aorta und Fixierung der Kanüle mittels eines Mersilenefadens. Daraufhin wurde das Herz mittels einer Pumpe unter einem konstanten Perfusionsdruck mit einer Flussrate von 4ml/min, einer Temperatur von 37 °C und  $\text{O}_2$  begasten Lösungen retrograd perfundiert. Zunächst erfolgte eine Perfusion mit einem Standard Krebs Perfusions Puffer (Tabelle 3) für die Dauer von fünf Minuten.

**Tab. 3:** Krebs Perfusionspuffer. Nach Entnahme des Herzens erfolgte die Kanülierung der Aorta und eine retrograde Perfusion des Herzens mit einer Flussrate von 4 ml/min für eine Dauer von 5 Minuten bei 37 °C.

Stoff	Menge
NaCl	113 mmol
KCl	4,7 mmol
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6 mmol
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,6 mmol
$\text{MgSO}_4$	1,2 mmol
$\text{NaHCO}_3$	12 mmol
$\text{KHCO}_3$	10 mmol
HEPES	10 mmol
Taurin	30 mmol
Phenol rot	0,032 mmol

pH 7,4

Anschließend wurde das Herz für die Dauer von fünf Minuten mit einer hochkaliumhaltigen Lösung (12.5  $\mu\text{M}$ ) und im weiteren für die Dauer von sechs bis zehn Minuten mittels einer mit 0,4 mg/ml trypsinhaltigen Kaliumlösung perfundiert. Die

Auswaschung des Trypsins erfolgte durch die Perfusion mittels einer hochkaliumhaltigen Lösung für zwei bis drei Minuten. Anschließend erfolgte die Perfusion mittels einer 0,375 mg/ml kollagenasehaltigen und hochkaliumhaltigen Lösung für die Dauer von zehn bis fünfzehn Minuten.

Im Anschluss an die Perfusion wurde das Herz von der Langendorff Apparatur abgenommen und in eine mit Präparationslösung (50ml Krebs Lösung in 10 % fetalem Kalbs Serum und 12.5  $\mu\text{Mol}$   $\text{CaCl}_2$ ) gefüllte Petrischale überführt. In der Präparationslösung wurden die verbliebenen Gefäße inklusive Bindegewebe, sowie der rechte Ventrikel und die Vorhöfe vom linken Ventrikel abpräpariert.

Der isolierte linke Ventrikel wurde mechanisch mittels einer sterilen Klinge in Präparationstyrode zerkleinert. Durch zweiminütiges auf- und abpipettieren wurden Kardiomyozyten aus den mechanisch zerkleinerten Ventrikelstücken herausgelöst. Zur Entfernung größerer Stücke wurde die Zellsuspension durch eine Nylon-Gaze (Maschenweite: 100  $\mu\text{m}$ ) gefiltert. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer aufsteigenden Kalziumionenkonzentration (150  $\mu\text{l}$  10 mmol  $\text{CaCl}_2$ , 300  $\mu\text{L}$  10 mmol  $\text{CaCl}_2$ , 90  $\mu\text{L}$  100 mmol  $\text{CaCl}_2$  und 150  $\mu\text{l}$  100 mmol  $\text{CaCl}_2$ ) für eine Dauer von jeweils 4 Minuten inkubiert.

Zur weiteren Aufreinigung und zur Entfernung grober Gewebereste wurde die Zellsuspension für die Dauer von 1,5 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet in einem minimal essential Medium (MEM) bestehend aus Hanks' Salz und L-glutamine (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, California), 5 % fetales Kalbsserum (FCS, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, New Jersey), 10 mmol 2,3-butanedione monoxime (BDM, Sigma St.Louis, Missouri), 100 U/ml Penizillin (Sigma, St.Louis, Missouri), 1.8 mmol  $\text{CaCl}_2$  und 2 mmol L-Glutamin (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, California) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine mit Laminin beschichtete Kammer gegeben und bis zur Durchführung der Kontraktilitätsmessungen für die Dauer von einer Stunde bei 37 °C inkubiert und mit  $\text{O}_2$  begast. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium vor den Kontraktilitätsmessungen durch neues minimal Essential Medium ersetzt. Für die anschließenden elektrophysiologischen Messungen wurden lediglich Isolationen verwendet, die eine Ausbeute an stäbchenförmigen Myozyten von mehr als 60 % aufwiesen.

### 3.3 Histologische Untersuchungen

Zur Gewinnung der histologischen Präparate erfolgte nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition die Tötung der Versuchstiere mittels Pentobarbitalüberdosierung (50 mg/kg). Nach Ausbleiben einer Schmerzreaktion wurde wie oben beschrieben eine mediane Laparotomie durchgeführt. Anschließend wurden die Rippen beidseits in der Axillarlinie und der Thorax in Höhe des Manubrium sterni durchtrennt. Daraufhin konnte der Thorax abgenommen und das Herz freipräpariert werden. Anschließend wurde der linke Vorhof punktiert und mit einer 8 °C gekühlten kardioplegen Lösung (Tabelle 4) für die Dauer von zehn Minuten mit einem Druck von 25 cmH<sub>2</sub>O perfundiert. Im Anschluss wurde das Herz entnommen und in eine 8 °C gekühlte kardioplege Lösung (Tabelle 4) überführt. Hier wurden das Perikard und Bindegewebsreste vom Herzen abpräpariert und Blutreste ausgewaschen. Anschließend wurde das Herz für zwölf bis fünfzehn Stunden in 3,7%igem Zink-Formalin (z-fix, Anatech, LTD, BattleCreek, Michigan) fixiert und bis zur Paraffineinbettung in 75%igem Ethanol gelagert.

**Tab. 4:** Zusammensetzung der kardioplegen Lösung. Nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition erfolgte die Kanülierung des linken Vorhofes und eine zehnmünütige Perfusion des Herzens mit der kardioplegen Lösung bei einem Druck von 25 cmH<sub>2</sub>O zur Auswaschung von Blutresten.

Stoff	Menge	Hersteller
NaCl	4 g	EM Science, Gibbstown, NJ
NaHCO <sub>3</sub>	1 g	Sigma, St.Louis, MO
Glukose	4 g	Sigma, St.Louis, MO
2,3-Butandion Monoxim	100 µl	Sigma, St.Louis, MO
Ethylenglykol Tetraessigsäure	1,7 ml	Sigma, St.Louis, MO
Nifedipin	50 µl	Sigma, St.Louis, MO
Heparin	10000 IE	APP, Los Angeles, CA
KCL	3,73 g	EMD Darmstadt Germany

in 1 l NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, Illioni)

### **3.3.1 Paraffineinbettung und Gewebeschnitte**

Die fixierten Mäuseherzen wurden in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen von 70 % bis 100 % in mehreren Schritten dehydriert und anschließend mit Paraffin infiltriert und eingebettet. Bis zur Weiterverarbeitung und Anfertigung der Gewebeschnitte wurden die eingebetteten Präparate in einem Kühlschrank bei 4 °C gelagert. In der Folge wurden die Herzen mit einem Mikrotom axial von der Herzbasis bis zur Herzspitze geschnitten. Die 5 µm dicken Präparate wurden auf Objektträger aufgezogen und für eine Dauer von 16 h in einem Trockenschrank bei 42 °C getrocknet. Die Papillarebene wurde aufgesucht und für alle folgenden Versuche Schnitte aus diesem Bereich verwendet.

### **3.3.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die HE Färbung der axial geschnittenen Herzpräparate erfolgte in mehreren Schritten nach einer Methode von Carson et al. (Carson et al., 1996):

1. 3x dreiminütige Deparaffinierung der Präparate in Dimethylbenzol Lösung (Xylo) (VWR Int., West Chester, Pennsylvania)
2. Rehydrieren der Präparate mittels absteigender Konzentrationen Ethanol. (3x 100 %, 3x 95 %, 2x 75 %). Diese Arbeitsschritte wurden jeweils 15 fach wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Reinigung in deionisiertem Wasser.
3. Färben in Harris Hämatoxylin (Tabelle 5, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) für zwei Minuten

**Tab. 5:** Zusammensetzung des Hämatoxylins

Stoff	Menge	Hersteller
Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ )	0,04 g	VWR Int., Randor, PA
Eisenhämatoxili nach Weigert	0,2 g	Sigma, St.Louis, MO
Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ )	0,04 g	VWR Int., Randor, PA
Chloralhydrat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$ )	10 g	VWR Int., Randor, PA
Zitronensäure ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	0,2 g	VWR Int., Randor, PA
Kalialaun ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	10 g	VWR Int., Randor, PA

In 200ml Aqua dest. und darin 2 ml Hämalaunlösung nach Mayer (VWR Int., Randor, Pennsylvania).

4. Eosin-Gegenfärbung und Dehydrieren der Präparate:

- 15x 95 % Ethanol (EtOH; je 2x)
- 1x Salzsäure-EtOH Gemisch (1 % HCl in 70 % EtOH; EMD Millipore, Bellerica, Massachusetts)
- 15x di- $\text{H}_2\text{O}$
- 15x 0,25 % Ammoniumhydroxid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ; Fisher, Waltham, Massachusetts)
- 15x di- $\text{H}_2\text{O}$
- 15x Eosin (EMD Millipore, Bellerica, Massachusetts)
- 15x 95 % EtOH (2x)
- 15x 100 % EtOH (3x)
- 15x Dimethylbenzol Lösung (3x; Xylene, EMD Millipore, Bellerica, Massachusetts),

5. Aufkleben eines Deckglases (Micro Cover glas, VWR Scientific, West Chester, Pennsylvania) mit Klebstoff auf Dimethylbenzolbasis (Cytoseal XYL, Richard Allen Scientific, Kalmazoo, Michigan)

6. Trocknen für die Dauer von zwei Stunden.

### **3.3.3 Quantitative Auswertung der nukleären und zytoplasmatischen Flächen**

Die quantitative Bestimmung der nukleären und zytoplasmatischen Anteile erfolgte anhand der H&E gefärbten Präparate. Die quantitative Auswertung wurde in jeweils zehn Bereichen in vier aufeinanderfolgenden Schnitten durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate unter dem Mikroskop (Zeiss Axioscope mit Spot I Digitalkamera, Jena, Deutschland) unter gleichen optischen Einstellungen abgelichtet und die Bilder mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms gespeichert. Der nukleäre und zytoplasmatische Bereich wurde quantifiziert und als Verhältnis nukleär zu zytoplasmatisch ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}$ ) angegeben. Alle Auswertungen erfolgten durch einen im Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit verblindeten Untersucher.

### **3.3.4 Sirius Rot Kollagenfärbung**

Die Sirius Rot Färbung erfolgte nach einem Protokoll von Junqueira (Junqueira et al., 1978). Zur Herstellung 0,1%ige Sirius Rot Lösung wurde 0,1 g "direct red 80" (Aldrich Chemical Company, Wisconsin) auf 100 ml 100%iger Pikrinsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) verdünnt und für die Dauer von fünf bis zehn Minuten einwirken gelassen. Durch die Reaktion mit Sirius Rot wird Kollagen rot, das restliche Gewebe gelb angefärbt. Unter polarisiertem Licht lassen sich die unterschiedlichen Kollagene farblich voneinander unterscheiden. Kollagen I emittiert hierbei Licht im roten Frequenzbereich, Kollagen III im gelben (Junqueira, Cossermelli, 1978).

Die Färbung der Präparate erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. 3x dreiminütige Deparaffinisierung der Präparate in Dimethylbenzol Lösung (Xylol) (VWR Int., West Chester, Pennsylvania)
2. Rehydrieren der Präparate mittels absteigender Konzentrationen Ethanol (3x 100 %, 3x 95 %, 2x 75 %). Diese Arbeitsschritte wurden jeweils 15 fach wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Reinigung in deionisiertem Wasser.
3. Sirius Rot Färbung für zehn Minuten,
4. Dehydrieren der Präparate:
  - 15x di-H<sub>2</sub>O
  - 15x 70 % EtOH
  - 15x 95 % EtOH (2x)
  - 15x 100 % EtOH (3x)
  - 15x Dimethylbenzol Lösung (3x),
5. Deckglasbeschichtung und Trocknung (siehe 3.3.1) der Präparate

### **3.3.5 Quantitative Auswertung der Kollagenfärbung**

Anhand der planimetrischen Quantifikation der Sirius-rot gefärbten Fläche wurde der myokardiale Kollagengehalt erfasst. Die quantitative Bestimmung des Kollagengehaltes erfolgte in jeweils zehn Bereichen in vier aufeinanderfolgenden Schnitten. Hierfür wurden die Präparate unter dem Mikroskop (Zeiss Axioscope mit Spot I Digitalkamera, Jena, Deutschland) unter gleichen optischen Einstellungen abgelichtet und die Bilder mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms gespeichert. Die rot gefärbte Fläche wurde unter Verwendung von Image Software (Image Pro Plus 4.0; Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland) automatisch bestimmt.

## **3.4 Western Blot**

### **3.4.1 Einleitung**

Der „Western Blot“ ist eine molekularbiologische Technik zur Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine aus einem Proteingemisch. Zur Identifizierung der Proteine erfolgt zunächst die Homogenisierung des zu untersuchenden Gewebes.



Nach Homogenisierung erfolgt die Isolation der Proteine. Anschließend werden die Proteine bedingt durch ihre Größe und elektrische Ladung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgt der Transfer aus dem Gel auf eine Membran, auf der sie durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Durch die Inkubation mittels einer Luminolreagenz kann das zu bestimmende Protein auf einem Röntgenfilm visualisiert werden. Anschließend erfolgt die quantitative densitometrische Bestimmung der Proteinbanden mittels eines Auswertungsprogrammes.

### **3.4.2 Proteinisolation für Western Blot**

Alle die Proteinisolation beinhaltenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Weiterhin wurden ausschließlich gekühlte Reagenzien verwendet. Zu Beginn des Versuchs wurde ein HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer, bestehend aus 50 mmol NaCl, 1 mmol  $\text{MgCl}_2$ , 2 mmol EGTA (Ethylen Glykol Tetraensäure), 0,1 % TritonX-100, 0,1 % Natriumdesoxychloresäure, 10 mmol Natriumpyrophosphat, 10 mmol Natriumfluorid, 1 mmol Natrium orthovanadat, 0,5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, pH 7,4, hergestellt. Diesem Puffer wurden im Anschluss die Proteinaseinhibitoren 1 mmol PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Antipain, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin und 0,023 TIU/ml Aprotinin hinzugegeben. Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  konservierten Mäuseherzen wurden in ein mit 500  $\mu\text{l}$  Pufferlösung gefülltes Plastikröhrchen überführt. Zusätzlich wurde eine Metallkugel in das Gefäß gegeben. Die Proben wurden anschließend für die Dauer von einer Minute bei einer Frequenz von 30.000 mittels eines TissueLyser II (Quiagen, Valencia, California) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in 2 ml Plastikröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und für die Dauer von zehn Minuten bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 12.000 rpm zentrifugiert (5424 Zentrifuge, Eppendorf, Hauppauge, New York). Der Überstand enthielt die aus den Herzen isolierten Proteine und wurde in neue 2 ml Plastikröhrchen pipettiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels eines FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California) gemessen.

### 3.4.3 Durchführung des Western Blots

Der Western Blot gliedert sich in vier Abschnitte:

- a) Bestimmung der Proteinkonzentrationen und Probenherstellung
- b) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)
- c) Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen
- d) Detektion der Proteine mit Antikörpern

a) Die Proteinkonzentrationen wurden mittels eines Pierce BCA-Assay ermittelt (Life Technologies, Carlsbad, California). Dieser Assay kombiniert die Biuret-Reaktion (Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Protein unter alkalischem pH) mit der Bindung von BCA und  $\text{Cu}^{1+}$  zu einem stabilen, photometrisch messbaren Komplex. Das Pierce Kit enthält zwei Lösungen, Lösung A (BCA) und Lösung B (4 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), die zur Herstellung eines Reaktionsgemisches im Verhältnis 50:1 verwendet wurden. Zur Durchführung der Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurden diese sowie die vom Händler vorgegebenen Standardkonzentrationen aus Rinderserumalbumin, auf Eis langsam aufgetaut und ein Nullwert bestehend aus RIPA-Puffer vorbereitet. In Mikrotiterplatten wurden zu je 1 ml Reaktionslösung jeweils 2  $\mu\text{l}$  der zu messenden Probe hinzugefügt. Hierbei wurden aus jeder Probe zwei Ansätze hergestellt und später die Proteinkonzentration anhand der Mittelwerte bestimmt. Nach 30 minütiger Inkubation der Probenansätze bei 37 °C erfolgte die Messung mit einem Photometer FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California) bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm gegen den verwendeten RIPA-Puffer als Leerwert. Anhand der Eich- und Standardkurve aus dem Rinderserumalbumin bekannter Konzentrationen von [1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25 und 0.125] konnten die Proteinkonzentrationen der zu testenden Proben bestimmt werden. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes [ $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ] ( $E$ =Extinktion,  $\epsilon$ =molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ],  $c$ =Stoffkonzentration [M],  $d$ =durchstrahlte Schichtdicke [cm]) wurden aus der Extinktion unter der Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentrationen errechnet.

Zur weiteren Verarbeitung wurden aus den einzelnen Proben Lösungen mit gleicher Konzentration hergestellt. Mittels der vorher bestimmten Proteinkonzentrationen wurde die ausgerechnete Menge des Herzlysates jeweils mit HEPES Puffer auf 20  $\mu\text{l}$  verdünnt. Die fertig hergestellten Proben mit den Proteinaseinhibitoren 1 mmol PMSF

(Phenylmethylsulfonylfluorid), 10 µg/ml Antipain, 10 µg/ml Leupeptin und 0,023 TIU/ml Aprotinin wurden hinzugegeben, gemischt und fünf Minuten auf 95 °C erhitzt.

b) Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Bei diesem Verfahren wird nach dem Protokoll von Laemmli (Tabelle 6) ein aus einem Sammel- und einem Trenngel bestehendes diskontinuierliches Gelsystem hergestellt (Laemmli, 1970). Im Sammelgel fokussieren die Proteine in einer schmalen Bande. Anschließend erfolgt im Trenngel die Auftrennung der Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht. In der vorliegenden Arbeit wurden je nach Proteingröße 7,5%ige oder 10%ige Gele verwendet. Für die vertikale Elektrophorese der Proteine wurde das Mini-Protean®-System (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Der Aufbau und die Ausstattung der Gelapparatur erfolgten nach Herstellerangaben. Die Proben-Puffer-Gemische, sowie ein als Größenstandard dienender Marker (Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad, München, Deutschland), wurden mit Western Blot Spitzen in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 135 V für 1,5 Stunden in der mit Laufpuffer (Tabelle 7) gefüllten Blot Apparatur. Die Molekulargewichte wurden anhand des Vergleiches der Laufstrecke der Proteine zu der eines Molekulargewichts-Standards ermittelt.

**Tab. 6:** Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel zur Auftrennung von Proteingemischen durch Elektrophorese nach Größe und Ladung.

	Sammelgel 5 %	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %
Aqua bidest.	5,7 ml	9,7 ml	8,1 ml
0,5 M TRIS pH 6,8	2,5 ml		
1,5 M TRIS pH 8,8		5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	100 µl	200 µl	200 µl
Acrylamid/Bis	1,7 ml	5,0 ml	6,6 ml
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	50 µl	100 µl	100 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	10 µl	10 µl	10 µl

**Tab. 7:** Zusammensetzung des Laufpuffers für die SDS-PAGE

	1 l Laufpuffer (5-fach konzentriert)
Trisbase	15 g
Glycin	72 g
SDS (sodium dodecyl sulfate)	5 g

c) Anschließend erfolgte die Elution der durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld (Towbin et al., 1979) und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C Membran, Amersham, United Kingdom). Nach Äquilibration der Nitrozellulosemembran für zehn Minuten in Transferpuffer (Tabelle 8) wurde der Sandwich-Blot zusammengesetzt. Hierbei wurde auf die Vermeidung von Luftblasen geachtet. Hier wurden das Gel und die darauf liegende Nitrozellulosemembran zwischen „Whatman“ Filterpapieren und zwei Schwammkissen in ein entsprechendes Blotmodul eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet befand. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 100 mA für über Dauer von achtzehn Stunden.

d) Um den Erfolg des Proteintransfers und die Gleichmäßigkeit der aufgetragenen Proteinmengen zu überprüfen, wurde im Anschluss an den Blot die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Rot-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) angefärbt. Hierzu wurden die Membranen für 2 Minuten in eine Ponceau-Rot-Lösung eingetaucht und im Anschluss in destilliertem H<sub>2</sub>O entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zum Vorschein kamen. Zusätzlich wurde die Lage der nunmehr sichtbaren Molekulargewichtsmarker mit einem Bleistift markiert. Im Anschluss wurde die Membran für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierlösung (Tabelle 9) auf einem Schüttler (Boekel, Feasterville, Pennsylvania) inkubiert. Die in der Blockierlösung enthaltene Milch führte zur Blockierung der freien Bindungsstellen der Membran, so dass eine Bindung der Antikörper während der anschließenden Reaktion ausschließlich am Epitop ihres spezifischen Antigens erfolgen konnte. Eine einstündige Inkubation der Membran mit dem jeweiligen unmarkierten, spezifischen Erstantikörper, welcher gegen die Struktur des jeweils zu detektierenden Proteins gerichtet war erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Boekel, Feasterville, Pennsylvania). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Erstantikörper verwendet: SERCA2a

ATPase (Biomol, SA-209, Plymouth Meeting, Pennsylvania),  $\alpha$ -MHC (Genway, 20-272-191956, San Diego, California),  $\beta$ -MHC (Santa Cruz, sc71575, Santa Cruz, California), collagen I (Abcam, ab292, Cambridge, Massachusetts) und collagen III (EMD Millipore, 234189, Billerica, Massachusetts). Die Membranen wurden mit dem jeweiligen Antikörper für die Dauer von achtzehn Stunden über Nacht bei einer Temperatur von  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurde der Antikörperüberschuss mit Waschlösung I ausgewaschen (1 x fünf Minuten, 1 x zehn Minuten und 1 x fünfzehn Minuten). Die Erstantikörper, die nach Inkubation an die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Antigene gebunden waren, wurden in einem zweiten Schritt durch einen Spezies-spezifischen Zweitantikörper, an den das Enzym Peroxidase kovalent gekoppelt war, erkannt. Durch Inkubation mit Luminolreagenz in späteren Schritten konnte dieses Enzym und somit der gesamte Immunkomplex bzw. das zu untersuchende Protein visualisiert werden. Als Zweitantikörper wurde hier, je nach Erstantikörper entweder der Peroxidase-gekoppelte polyklonale Ziege-Anti-Hase-Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), oder der monoklonale Anti-Maus-Antikörper (Oncogene Science, Cambridge, Massachusetts) benutzt, der jeweils vorher 1:10000 mit Waschlösung I verdünnt worden war. Es folgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden Zweitantikörper für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde der ungebundene Antikörper durch ein erneutes gründliches Waschen wieder entfernt (1 x fünf Minuten, 1 x zehn Minuten und 1 x fünfzehn Minuten). Die Membran wurde anschließend mit Kimwipes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) vorsichtig getrocknet und für eine Minute mit 5 ml ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Luminolreagenz (ECL Western Blotting Detection je 2,5 ml Enhancer und Developer; GE Healthcare, United Kingdom) bedeckt in einer flachen Schale geschüttelt. Diese sehr sensitive Reagenz zeigt bei der katalytischen Umsetzung durch die Peroxidase eine Chemolumineszenz, mit der Röntgenfilme belichtet werden können. Nach der einminütigen Einwirkzeit wurde die Membran erneut sorgfältig mittels Kimwipes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) getrocknet und zwischen zwei transparenten Plastikfolien in eine Filmkassette (Fisher Biotech Autoradiography Cassette, Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire) gelegt. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film<sup>®</sup>, Tokio, Japan) auf der Membran platziert. Das bei der nun durch die Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol emittierte Licht schwärzt den der Membran aufliegenden Röntgenfilm korrespondierend zur Stärke und Lage der Proteinbande. Um das bestmögliche

Verhältnis von Sensitivität und Auflösung/Hintergrund zu erreichen, wurden Filme mit unterschiedlichen Zeiten (5, 15, 30, 60 Sekunden) belichtet. Diese wurden im Anschluss an die jeweilige Expositionszeit in einem Röntgenapparat entwickelt. Die densitometrische Quantifizierung der markierten Proteinbanden erfolgte unter Verwendung eines Auswertungsprogrammes (Molecular Dynamics, Sunnydale, California).

**Tab. 8:** Zusammensetzung des Western Blot Transferpuffers

	<b>1 l Transferpuffer</b>
Trisbase	3,028 g
Glycin	14,419 g
Methanol	200 ml

**Tab. 9:** Zusammensetzung der Western Blot Blockier- und Waschlösungen

	<b>1 l Blockierlösung</b>	<b>1 l Waschlösung I</b>	<b>1 l Waschlösung II</b>
1 x PBS	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
Milchpulver (5 %)	50 g	10 g	10 g
Tween 20 (0,1 %)	1.000 µl	1.000 µl	3.000 µl

### 3.5 Polymerase Kettenreaktion

Die Analyse der im Rahmen einer kardialen Hypertrophie und Fibrose involvierten Gene erfolgte mittels der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Eine PCR ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen. Die aus dem Gewebe isolierte RNA muss also zunächst mit Hilfe von RNA abhängigen DNA Polymerasen in DNA umgeschrieben werden. Diese cDNA kann nun mittels einer herkömmlichen Taq- Polymerase amplifiziert werden. Bei der Polymerase Kettenreaktion handelt es sich um eine in den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts etablierte Technik zur DNA-Analytik. Hierbei wird der jeweils zu untersuchende Genabschnitt exponentiell amplifiziert und quantifiziert. Zur Amplifikation werden nach Auftrennung des Doppelstranges durch Erhitzen die beiden Einzelstränge mittels spezifischer Primer markiert. Weiterhin werden einem

Reaktionsgemisch das hitzestabile Enzym Polymerase und ausreichend Nukleinsäuren für die entsprechende Amplifikation zugeführt. Vom jeweils spezifischen Primer ausgehend katalysiert die Polymerase die Replikation der Sequenz. Nach Abkühlung des Reaktionsgemischs erfolgt nach erneuter Erhitzung und Trennung des DNA Doppelstranges eine weitere Amplifikation, so dass es bei jedem Zyklus zu einer  $2^n$ -fachen Vermehrung der initial vorliegenden DNA Menge kommt. Die Durchführung der beschriebenen PCR Versuche erfolgte unter Mitarbeit von Herrn Dr. Matthew Gorr.

### **3.5.1 RNA Isolation**

Zur Isolation der für die RT-PCR benötigten RNA wurden die nach Entnahme gefrorenen Herzen in TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) überführt und homogenisiert. Bei TRIzol handelt es sich um ein gebrauchsfertiges einphasiges Reagenz, bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, welches während der Homogenisierung von Gewebe die Integrität der RNA erhält und gleichzeitig Zellbestandteile lysiert. Nach der Homogenisierung erfolgte die Isolation der kardialen mRNA mittels eines RNeasy mini Kit (Qiagen, Valencia, California) nach Herstelleranweisungen.

### **3.5.2 RNA-Konzentrationsmessung**

Die Bestimmung der aus einer Probe isolierten RNA Menge erfolgte mittels Spektralanalyse NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts). Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, mit dem man mittels spezifischer Absorption des zu bestimmenden Moleküls dessen Konzentration bestimmen kann. Ausgehend von der hierbei bestimmten RNA Konzentration konnten die Proben so verdünnt werden, dass identische RNA-Mengen für die weiteren Schritte verwendet wurden.

### **3.5.2 cDNA Synthese**

Die Synthese der für die PCR benötigten cDNA erfolgte nach RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung mittels eines Maxima first-strand cDNA Synthese Kit für

RT-qPCR (Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts).

Hierbei wurden zuerst jeweils 25 µl der gewonnenen RNA mit 25 µl Mastermix in einem 0,2 ml PCR Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) vermischt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription in einem Thermal Cycler (Biometra UNO-Thermoblock, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland).

### **3.5.3 Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaction**

Eine quantitative RT-PCR erfolgte mittels eines Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific Fermentas, Glen Burnie, Maryland) entsprechend der Herstellerangaben und einem Mastercycler egradient *Realplex* real-time PCR System (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Eine PCR wurde mittel RT2 SYBR Green qPCR Mastermix mit ROX und RT2 miRNA qPCR assay primer Sets (SA Biosciences, Frederick, Maryland) durchgeführt.

### **3.6 Statistik**

Alle Daten wurden als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels zweiseitigem Student's t-test analysiert. Ein Unterschied von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Feinstaubexposition verursacht einen Anstieg des Herzgewichtes

Zur Erfassung der kardialen Auswirkungen einer Feinstaub Langzeitbelastung wurden nach neun Monaten die Herz- und Körpergewichte der mit PM<sub>2,5</sub> oder FL exponierten Mäuse ermittelt. Am Ende des Untersuchungszeitraumes waren die Körpergewichte der PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäuse nicht signifikant verändert im Vergleich zu FL exponierten Kontrolltieren (Tabelle 10). Im Gegensatz dazu führte eine neunmonatige Feinstaubbelastung zu einem Anstieg des Herzgewichtes. Post mortem Untersuchungen belegten einen signifikanten Anstieg, sowohl des absoluten Herzgewichtes (8,8 %), als auch des zum Körpergewicht normalisierten Herzgewichtes bei PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäusen im Vergleich zu FL exponierten Kontrolltieren (Tabelle 10).

**Tab. 10:** Herz und Körpergewichte elf Monate alter C57/BL6 Mäuse nach neunmonatiger Exposition mit Feinstaub (PM<sub>2,5</sub>) oder gefilterter Luft (FL).

	FL	PM <sub>2,5</sub>	P	n
Körpergewicht (g)	30,6 (±0,3)	29,7 (±0,4)	0,103	FL=10; PM=9
Herzgewicht (mg)	124,0 (±2,4)	138, (±3,7)	0,014	FL=5; PM=5
Herz-/Körpergewicht (mg/g)	4,16 (±0,16)	4,54 (±0,11)	0,037	FL=5; PM=4

### 4.2 Auswirkungen von Feinstaubbelastung auf Herz- und Kreislauffunktion

Eine neunmonatige Feinstaubbelastung hatte Auswirkungen auf Herzfrequenz und Blutdruck. Blutdruckmessungen zeigten erhöhte systolische, diastolische, und mittlere arterielle Blutdruckwerte, sowie eine erhöhte Herzfrequenz bei PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäusen im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu war der Pulsdruck bei den PM<sub>2,5</sub> exponierten Tieren signifikant erniedrigt im Vergleich zu Kontrolltieren (Tabelle 11). Die Echokardiographischen Daten wurden von einem, im Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit verblindeten Mitglied der Arbeitsgruppe von Professor Wold erfasst. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Autorin (Christina Velten).

**Tab 11:** Herzfrequenz, systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck, sowie Pulsdruck elf Monate alter C57/BL6 Mäuse nach neunmonatiger Exposition mit Feinstaub (PM<sub>2,5</sub>) oder gefilterter Luft (FL).

	FL	PM <sub>2,5</sub>	p	n
Herzfrequenz (min)	352,5 (±4,4)	379,4 (±6,3)	0,008	FL=10; PM=9
Systolischer Blutdruck (mmHg)	103,6 (±1,4)	112,2 (±1,9)	0,0015	FL=10; PM=9
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	76,17 (±0,5)	86,9 (±1,8)	<0,0001	FL=10; PM=9
Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)	86,6 (±0,6)	96,3 (±1,4)	<0,0001	FL=10; PM=9
Pulsdruck (mmHg)	29,9 (±1,5)	24,1 (±1,3)	<0,01	FL=10; PM=9

#### 4.3 Auswirkungen von Feinstaubbelastung auf die linksventrikuläre Struktur und Funktion

Feinstaubbelastung führte zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des linken Ventrikels. Echokardiographische Untersuchungen zeigten einen Umbau des linken Ventrikels, gekennzeichnet durch einen Anstieg sowohl der linksventrikulären endsystolischen Dimension (LVESd) als auch der linksventrikulären enddiastolischen Dimension (LVEDd) bei PM<sub>2,5</sub> behandelten Mäuse im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren nach neunmonatiger Exposition. Der Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand war während der Systole (LVHWs) bei mit PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäusen reduziert im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu unterschied sich der diastolische Durchmesser der linksventrikulären Hinterwand (LVHWD) nicht zwischen den Gruppen (Tabelle 12).

Diese Veränderungen waren vergesellschaftet mit einer verminderten systolischen Funktion, belegt durch eine reduzierte Verkürzungsfraction (fractional shortening, FS) bei den PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäusen im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren. Weiterhin kam es zu einer Veränderung des Blutflusses über der Mitralklappe. Im Pulse-Wave Doppler (PW-Doppler) konnte eine Erniedrigung des Verhältnisses

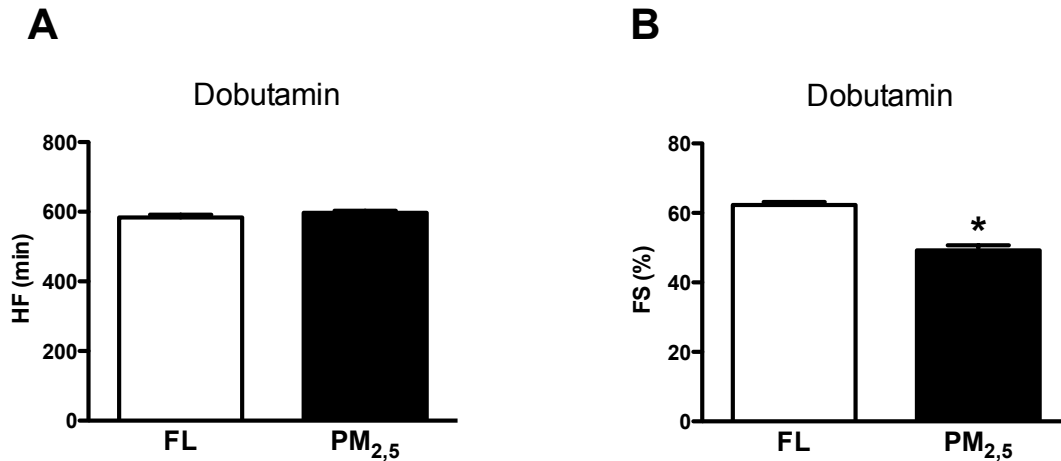
zwischen früher und später linksventrikulärer Füllung (mitral E/A ratio) bei PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäusen im Vergleich zur FL behandelten Kontrolltieren gemessen werden (Tabelle 12).

**Tab. 12:** Echokardiographische Untersuchungen elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger Feinstaubexposition. Linksventrikuläre endsystolische Dimension (LVESd), linksventrikuläre enddiastolische Dimension (LVEDd), linksventrikuläre Hinterwand in Diastole (LVHWd), linksventrikuläre Hinterwand in Systole (LVHWs), Verkürzungsfraction (FS) und das Verhältnis des früh- und spätdiastolischen Blutflusses über der Mitralklappe (Mitral E/A ratio) in Feinstaub (PM<sub>2,5</sub>) oder gefilterter Luft (FL) exponierten Mäusen.

	FL	PM <sub>2,5</sub>	P	n
LVESd, mm	2,56 (±0,10)	2,85 (±0,1)	0,038	FL=10; PM=9
LVEDd mm	4,25 (±0,10)	3,95 (±0,06)	0,0319	FL=10; PM=9
LVHWd mm	0,73 (±0,01)	0,69 (±0,03)	0,2494	FL=10; PM=9
LVHWs mm	1,28 (±0,02)	1,00 (±0,04)	<0,0001	FL=10; PM=9
FS %	39,83 (±1,37)	27,92 (±1,30)	<0,0001	FL=10; PM=9
Mitral E/A ratio	1,95 (±0,05)	1,52 (±0,07)	<0,0001	FL=9; PM=8

#### 4.4 Feinstaubbelastung beeinflusst die kontraktile Reserve

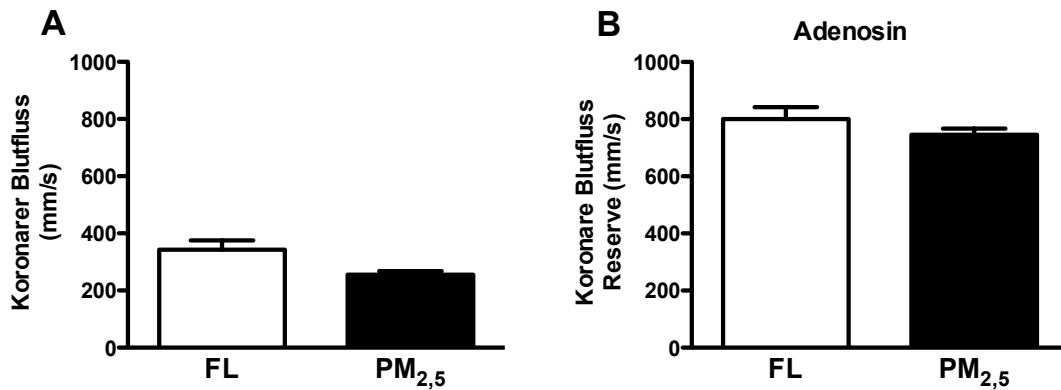
Eine chronische systolische Dysfunktion führt häufig über eine Desensibilisierung adrenerger  $\beta$ -Rezeptoren zu einer reduzierten Sensitivität gegenüber Katecholaminen. Nach neunmonatiger Feinstaubbelastung untersuchten wir die kardiale Antwort auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation und erfassten die kontraktile Reserve zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit des Herzens. PM<sub>2,5</sub> und FL exponierte Mäuse reagierten auf eine Applikation von Dobutamin (3,65  $\mu$ g/kg) mit einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zu Ruhewerten. Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht zu erfassen. Echokardiographische Untersuchungen zeigten eine reduzierte linksventrikuläre Verkürzungsfraction nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei den PM<sub>2,5</sub> exponierten Mäusen im Vergleich zu FL Kontrolltieren (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Echokardiographische Untersuchungen elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger Feinstaubexposition. Herzfrequenz (HF) und linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (FS) nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mittels Dobutamin. Daten wurden analysiert mittels Student *t* test und als  $MW \pm SD$  dargestellt.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.  $n=9-10$

#### 4.5 Feinstaubbelastung hat keinen Einfluss auf den koronaren Blutfluss

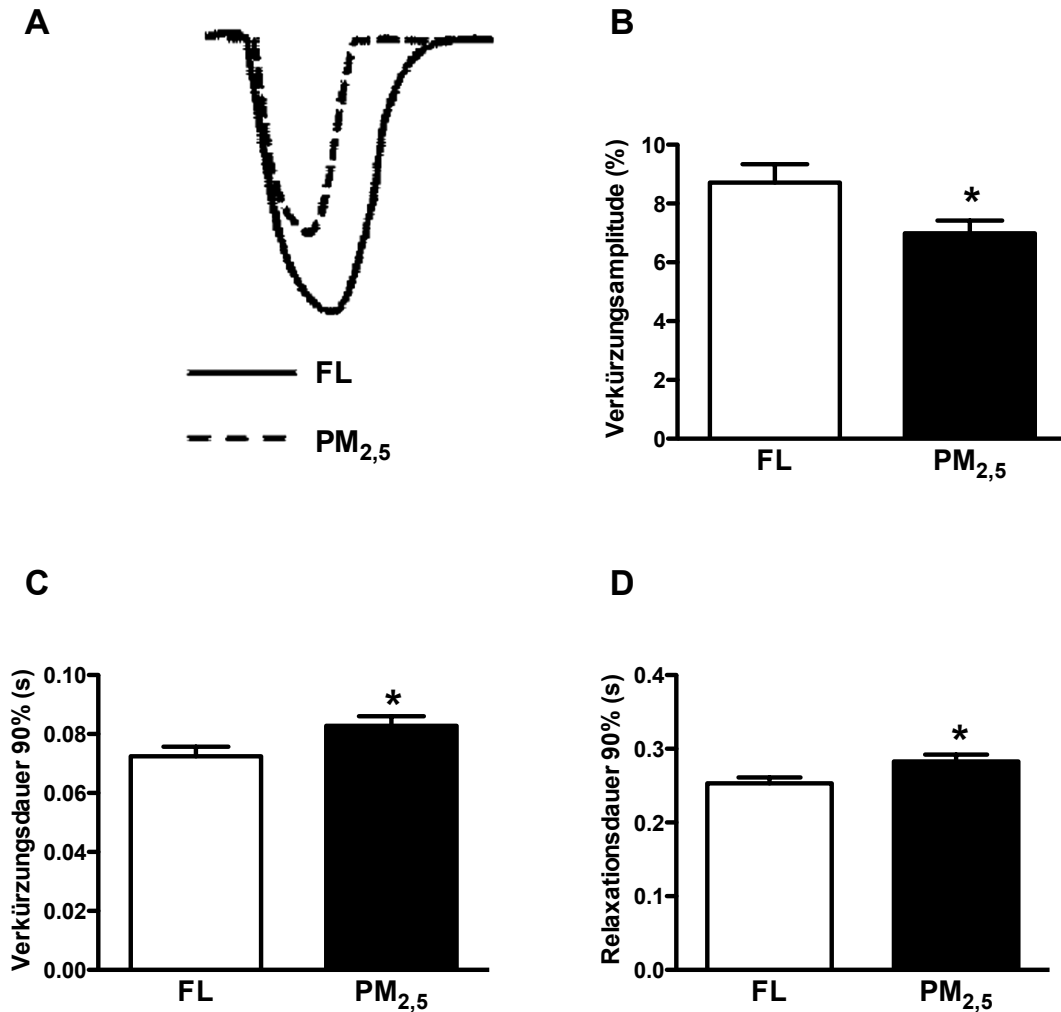
Kardiale Hypertrophie und linksventrikuläres Remodeling sind häufig mit Veränderungen des koronaren Blutflusses und der koronaren Reserve vergesellschaftet. Zur Erfassung der Auswirkungen einer Feinstaub Langzeitbelastung wurde nach neunmonatiger Exposition mittels PW-Doppler der koronare Blutfluss gemessen. Der koronare Blutfluss unterschied sich nicht zwischen  $PM_{2,5}$  und FL behandelten Mäusen. Darüber hinaus erfassten wir die koronare Reserve nach koronarer Dilatation mittels Adenosin ( $150 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ).  $PM_{2,5}$  und FL exponierte Mäuse reagierten auf die Adenosin induzierte koronare Vasodilatation mit einem Anstieg der koronaren Durchblutung. Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht zu erfassen (Abbildung 2).



**Abb. 2:** Koronarer Blutfluss (A) und koronare Blutflussreserve (B) nach Adenosin induzierter koronarer Dilatation. n=9-10 Mäusen nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. Daten wurden analysiert mittels Student *t* test und als MW±SD dargestellt. p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

#### 4.6 Langzeit Feinstaubbelastung verursacht eine kardiomyozytäre Dysfunktion *in vitro*

Zur Bestimmung der Auswirkungen einer Langzeit Feinstaubbelastung auf die kardiomyozytäre Kontraktilität führten wir Kontraktilitätsuntersuchungen an isolierten einzelnen Kardiomyozyten durch (Abbildung 3A). Nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> Belastung wiesen isolierte Kardiomyozyten eine signifikant reduzierte maximale Verkürzungsamplitude im Vergleich zu aus FL exponierten Kontrolltieren isolierten Kardiomyozyten auf (Abbildung 3B). Einhergehend mit dieser Reduktion der *in vitro* Kontraktilität imponierte sowohl ein Anstieg der Verkürzungsdauer bis 90 % der Maximalverkürzung, als auch der Relaxationsdauer bis 90 % Maximalrelaxation in PM<sub>2,5</sub> belasteten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildungen 3C und D). Diese Ergebnisse weisen auf eine offensichtliche *in vitro* Dysfunktion auf myozytärer Ebene hin und bestätigen die oben beschriebenen *in vivo* Ergebnisse.

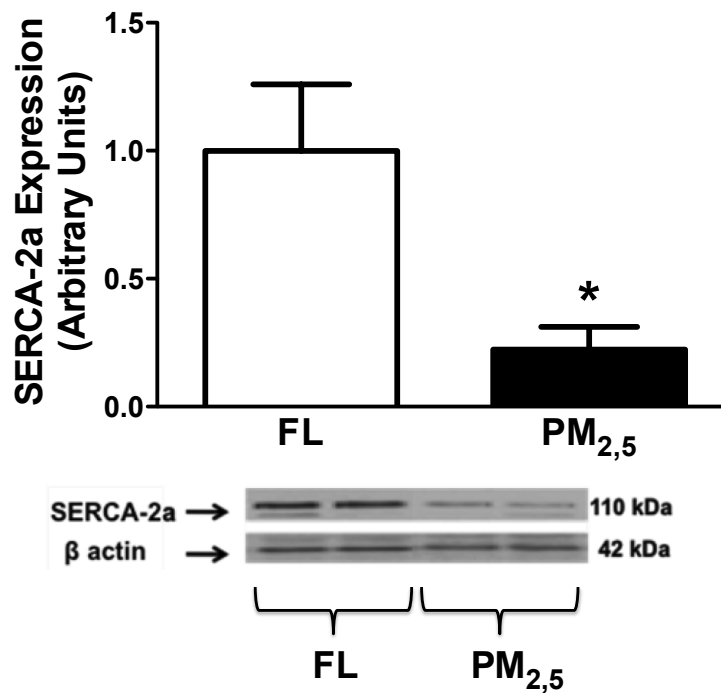


**Abb. 3:** *In vitro* Kontraktilitätsmessungen isolierter Kardiomyozyten aus elf Monate alten Mäusen nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. A: representative Kontraktion einer isolierten Kardiomyozyte aus PM<sub>2,5</sub> oder FL exponierten Mäusen. Statistische Analysen der Verkürzungsamplitude (B), Verkürzungsdauer (C) und Relaxationsdauer (D). n=20-30 Kardiomyozyten isoliert aus 3-4 Mäusen nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. Daten wurden analysiert mittels Student *t* test und als MW±SD dargestellt. p<0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

#### 4.7 Feinstaubbelastung führt zur Reduktion kardialer SERCA-2a Proteinexpression

Eine Herzinsuffizienz ist häufig mit Veränderungen von Kalziumkonzentrationen, bedingt durch eine veränderte Expression von Kalziumtransportproteinen, verbunden. Zur Erfassung der Bedeutung einer neunmonatigen Feinstaubbelastung für die Expression von Kalziumtransportproteinen isolierten wir Proteine aus den Herzen elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. PM<sub>2,5</sub> exponierte

Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der kardialen SERCA-2a Proteinkonzentrationen im Vergleich zu FL exponierten Kontrolltieren (Abbildung4). Diese Ergebnisse sind hinweisend auf eine reduzierte Wiederaufnahme von Kalzium nach Kontraktion in das Sarkoplasmatische Retikulum.

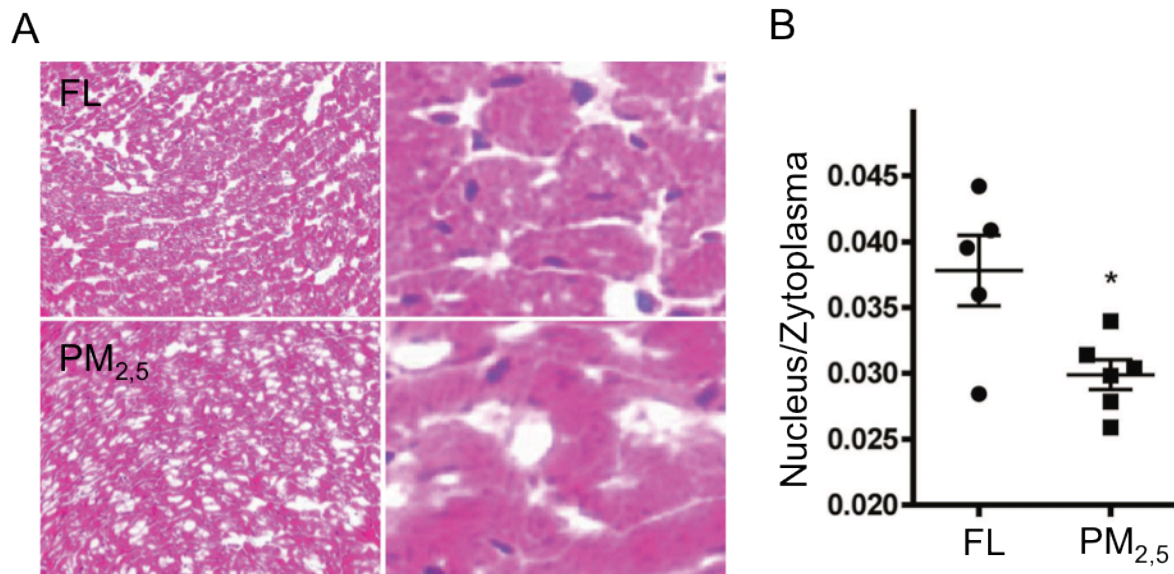


**Abb. 4:** Quantifikation kardiale SERCA-2a Proteinexpression elf Monate alter Mäuse, sowie repräsentativer Westernblot nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test, n=5-6, p<0,05.

#### 4.8 Langzeit Feinstaubbelastung beeinflusst das Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma in Kardiomyozyten

Kardiale Funktionseinschränkungen sind häufig vergesellschaftet mit einer Hypertrophie des Herzmuskels. Hierbei verändern sich die Zellkerne der Kardiomyozyten, wodurch es zu einer Veränderung des Verhältnisses von Nukleus zu Zytoplasma kommt. Zur Erfassung der kardialen Auswirkungen einer Langzeitbelastung mit Feinstaub färbten wir die Herzen von Mäusen nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition mit Hämatoxylin und Eosin zur Erfassung der Kern- und Plasmaflächen (Abbildung 5A). Planimeterische Untersuchungen zur Analysen der Kern-Plasmarelation zeigten eine 20,9 % Reduktion des Verhältnisses von Kern zu

Zytoplasma bei  $PM_{2,5}$  exponierten Mäusen im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren (Abbildung 5B). Die histologischen Präparate wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Professor Wold mit Haematoxylin und Eosin (Abbildung 5A) sowie Sirius-rot (Abbildung 7A) gefärbt. Die Vorbereitung der Organe zur Histologischen Aufarbeitung und die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte durch die Autorin (Frau Christina Velten).

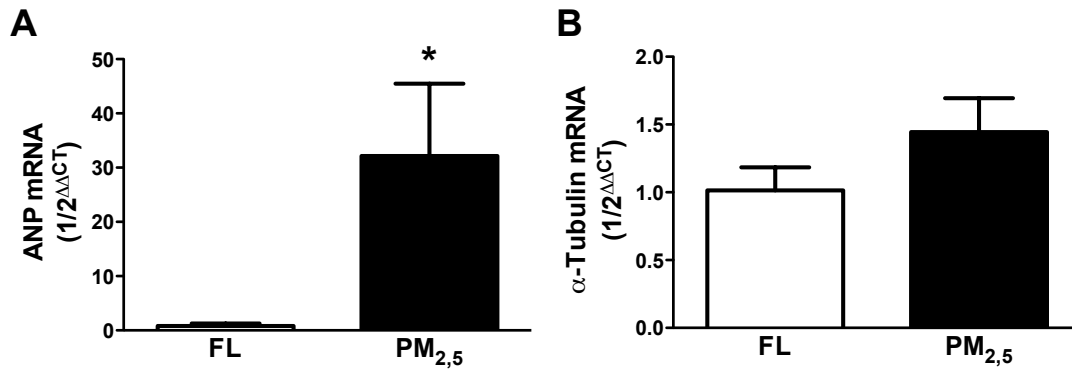


**Abb. 5:** Haematoxylin und Eosin gefärbte histologische Präparate von elf Monate alten Mäusen nach neunmonatiger  $PM_{2,5}$  oder FL Exposition. A: representative histologische Präparate  $PM_{2,5}$  oder FL exponierten Mäusen. B: Quantifikation des Nucleus Zytoplasma Verhältnisses. Die Daten wurden mittels Student t-Test analysiert,  $n=5-6$ ,  $p<0,05$ .

#### 4.9 Langzeit Feinstaubbelastung führt zu einem Anstieg der mRNA Expression kardialer Hypertrophiemarker

In experimentellen Modellen kardialer Hypertrophie wird häufig ein Anstieg des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) oder  $\alpha$ -Tubulin beobachtet. Zur Erfassung der Auswirkungen einer Feinpartikel Langzeitbelastung auf die Expression kardialer Hypertrophiemarker wurde bei Mäusen nach neunmonatiger  $PM_{2,5}$  oder FL Exposition die mRNA Expression von ANP und  $\alpha$ -Tubulin mittels rqPCR gemessen.  $PM_{2,5}$  exponierte Mäuse zeigten im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren einen Anstieg der ANP mRNA Expression (Abbildung 6A). Im Gegensatz dazu zeigte die  $\alpha$ -Tubulin mRNA Expression zwischen  $PM_{2,5}$  und FL exponierten Mäusen keinen Unterschied (Abbildung 6B).

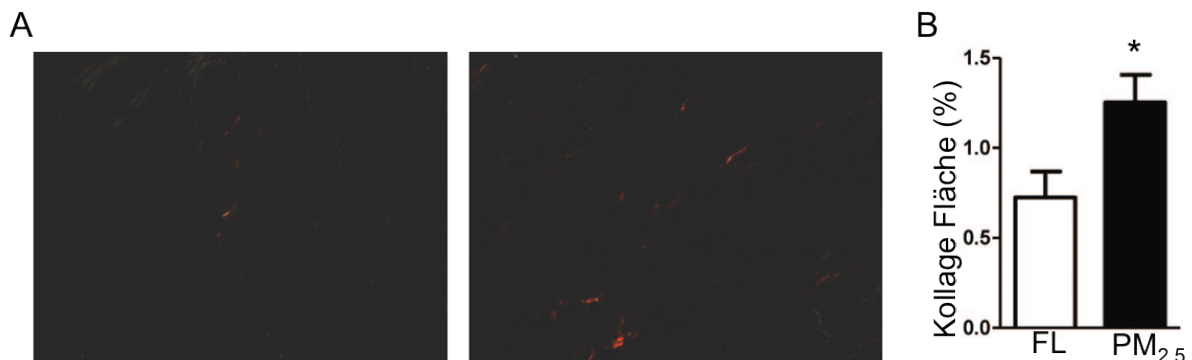




**Abb. 6:** Kardiale ANP (A) und  $\alpha$ -Tubulin (B) mRNA Expression elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Student t-Test, n=5-6, p<0,05.

#### 4.10 Langzeit PM<sub>2,5</sub> Belastung ist verbunden mit kardialer Kollagendeposition

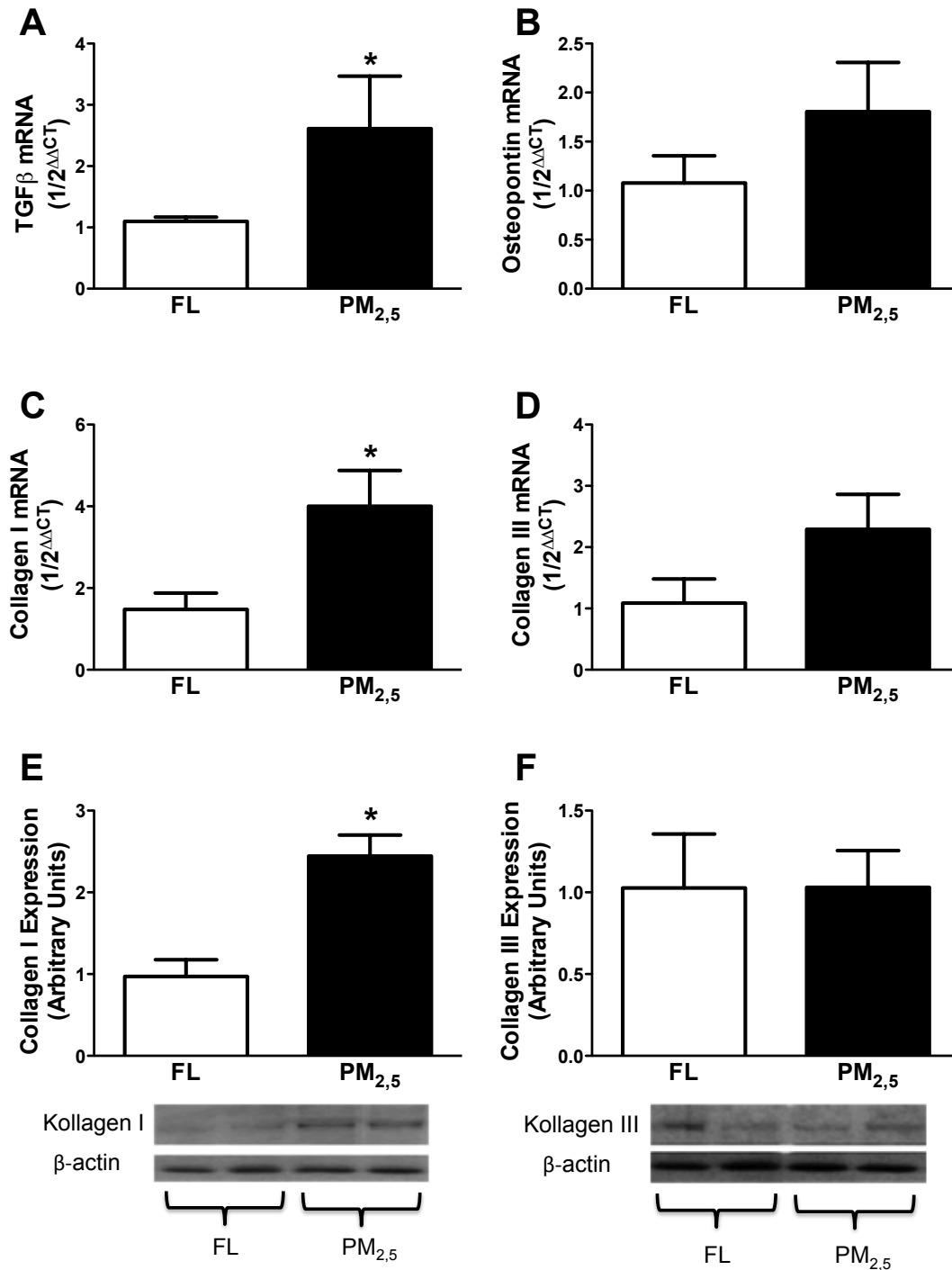
Kardiale Hypertrophie ist häufig vergesellschaftet mit einem Umbau des Myokards und Kollagendeposition. Zur Erfassung der myokardialen Auswirkungen einer neunmonatigen Feinstaubbelastung färbten wir in Paraffin eingebettete histologische Schnitte auf Höhe der Papillarebene zum Nachweis einer Kollagendeposition mittels Sirius rot (Abbildung 7A). Die kardiale Kollagendeposition wurde anhand der Picrosirius rot gefärbten Fläche quantifiziert. Die Picrosirius rot gefärbte Fläche in PM<sub>2,5</sub> belasteten Mäusen war signifikant erhöht (166 %) im Vergleich zu FL exponierten Tieren (Abbildung 7B).



**Abb. 7:** Kardiale Kollagendeposition elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. A: Representative histologische Sirius-rot gefärbte Schnitte. B: Quantitative Analysen der Sirius-rot gefärbten Fläche. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test, n=5-6, p<0,05.

#### **4.11 Feinstaubbelastung verursacht einen Anstieg kardialer Kollagenexpression**

Eine Kollagendeposition basiert häufig auf einer transienten Transkription fibrotischer Gene und anschließender Kollagenexpression. Zur Beschreibung der Bedeutung einer neunmonatigen Feinstaubbelastung für die Expression fibrotischer Gene und Kollagenexpression isolierten wir mRNA und Proteine aus den Herzen elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. PM<sub>2,5</sub> exponierte Mäuse zeigten einen Anstieg der kardialen TGF- $\beta$  und Kollagen I mRNA Expression, sowie einen Anstieg der Kollagen I Proteinexpression im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren. Die Osteopontin und Kollagen III mRNA Transkription, sowie Kollagen III Proteinexpression PM<sub>2,5</sub> exponierter Mäuse waren nicht verändert im Vergleich zu FL behandelten Kontrolltieren (Abbildung 8).



**Abb. 8:** Kardiale TGF-β (A), Osteopontin (B), Kollagen I (C), Kollagen III (D) mRNA Transkription, sowie Repräsentative Western Blots und Quantifikation der Kollagen I (E) und Kollagen III (F) Proteinexpression elf Monate alter Mäuse nach neunmonatiger PM<sub>2,5</sub> oder FL Exposition. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student t-Test, n=5-6, p<0,05.

## **5. Diskussion**

Eine große Anzahl epidemiologischer Untersuchungen belegt die gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Luftverschmutzung auf den Menschen. Im Besonderen ist die Bedeutung verunreinigter Umgebungsluft im Bezug auf die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowohl durch epidemiologische Daten wie auch durch experimentelle Untersuchungen belegt und allgemein anerkannt (Vos et al., 2015). Luftverschmutzung entsteht durch eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen. Von den Luftverschmutzung verursachenden Stoffen wird dem Staub eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugesprochen. Staub wird nach der Größe seiner Partikel in groben, feinen und ultrafeinen Staub eingeteilt. Die Bedeutung der unterschiedlichen Partikelgrößen für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist nicht abschließend geklärt. Darüber hinaus ist die Bedeutung der Zeitdauer einer Staubexposition auf den Menschen im Bezug auf die Entstehung und Verschlimmerung vorbestehender kardiovaskulärer Erkrankungen nicht ausführlich beschrieben.

Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war es, die kardialen Auswirkungen einer Langzeitbelastung mit Feinstaub zu beschreiben und die für eine sich entwickelnde kardiale Dysfunktion verantwortlichen Mechanismen näher zu charakterisieren.

### **5.1 Bedeutung von Feinstaub für die kardiale Morbidität und Mortalität**

Zahlreiche wissenschaftliche Studien aus Nordamerika und Europa konnten den Nachweis der gesundheitsschädlichen Auswirkungen einer verunreinigten Umgebungsluft auf den Menschen erbringen (Brook, Rajagopalan, 2010, Forouzanfar et al., 2015, Heroux et al., 2015). In diesem Zusammenhang wird der Belastung der Umgebungsluft durch Staub eine entscheidende Rolle zugesprochen (Forouzanfar, Alexander, 2015, Heroux, Anderson, 2015). Von den in der Umgebungsluft befindlichen Staubklassen scheinen die Feinstäube die stärksten negativen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit zu haben. Darüber hinaus belegen aktuelle epidemiologische Untersuchungen einen Zusammenhang erhöhter Feinstaubkonzentrationen mit kardiovaskulären Erkrankungen und kardiovaskulärer Mortalität (2015).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Feinstaubkonzentrationen liegen unter den Belastungsgrenzen, denen Menschen in vielen Teilen der Welt ausgesetzt sind (2015). Besonders in lateinamerikanischen, chinesischen und indischen Ballungszentren können die täglichen und jährlichen  $PM_{2,5}$  auf durchschnittliche Werte von 100 bis zu  $150 \mu\text{m}/\text{m}^3$  Luft ansteigen und liegen damit um das 10 bis 15 fache über den für Nordamerika und Europa üblichen Konzentrationen (Li et al., 2006, Hao et al., 2005, Liu et al., 2004).  $PM_{2,5}$  Konzentrationen in diesen Größenordnungen, wie sie in dicht besiedelten Regionen in Entwicklungsländern erreicht werden, können in der westlichen Welt nur unter experimentellen Bedingungen simuliert werden. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten  $PM_{2,5}$  Konzentrationen liefern die hier gewonnenen Ergebnisse zusätzliche Informationen zum Verständnis funktioneller Variablen mit ätiologischer, pathogenetischer und prognostischer Bedeutung. Das ubiquitäre Vorkommen von Luftverschmutzung bedingt dieses als einen bedeutenden Risikofaktor für die gesamte Bevölkerung. Daher haben aus einer sozioökonomischen Betrachtungsweise selbst ein Anstieg um geringe Mengen bedeutende Auswirkungen (Nawrot et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Feinstaubkonzentrationen lagen mit einem Durchschnitt von  $85,3 \mu\text{m}/\text{m}^3$  7,8 fach über den in der Umgebungsluft gemessenen Werten (2015). Die Konzentrationen mit denen die Mäuse während des Versuchszeitraumes exponiert waren liegen demnach über den für Nordamerika und Europa gewöhnlichen Werten, sind jedoch deutlich geringer als die in dicht besiedelten Regionen von Schwellenländern regelhaft gemessenen Konzentrationen. Darüber hinaus waren die Tiere in der hier vorliegenden Arbeit lediglich für eine Dauer von sechs Stunden pro Tag und sechs Tagen pro Woche der verwendeten Feinstaubkonzentration ausgesetzt, so dass die auf die Lebenszeit gemittelten Werte deutlich unter der in der Studie verwendeten Konzentrationen liegt und sich demnach deutlich näher an der in westlichen Industrienationen vorkommenden Belastung befindet. Die hier präsentierten Daten lassen jedoch nur vermuten, welche Auswirkungen eine Feinstaubbelastung, die doppelt so hoch ist und über die gesamte Tageszeit herrscht, im Bezug auf die kardiale Mortalität und Morbidität hat.

## 5.2 Akute und Langzeitbelastung mit Feinstaub

Zahlreiche *in vitro*, tierexperimentelle und epidemiologische Untersuchungen zeigen die gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Feinstaub auf. Aktuelle epidemiologische Untersuchungen belegen darüber hinaus, dass die in der Umwelt westlicher Industrienationen regelhaft vorkommenden Staubkonzentrationen Auswirkungen sowohl auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, als auch auf eine Exazerbation vorbestehender kardiovaskulärer Erkrankungen haben (Chen et al., 2008, Brook, Rajagopalan, 2010, Middleman, 2007). Unterschieden wird zwischen einer kurzzeitigen Feinstaubbelastung über eine Zeitdauer von wenigen Tagen und einer langandauernden chronischen Belastung über Monate und Jahre. Während kurzzeitige hohe Belastungen häufig in unmittelbarer Nähe zum Ort der Emission auftreten ist der Organismus einer Langzeitbelastung ubiquitär ausgesetzt.

Eine Vielzahl epidemiologischer Untersuchungen belegt die kardiovaskulären Auswirkungen einer kurzzeitigen Feinstaubexposition (Brook, Rajagopalan, 2010). In diesem Bezug wurde in Untersuchungen an älteren Menschen eine reduzierte Anpassung der Herzfrequenz auf Belastungssituationen beschrieben. Darüber hinaus konnte ein Anstieg der Häufigkeit von Krankenhauseinweisungen aufgrund von Hypertonie, Herzrhythmusstörungen, sowie eine Zunahme der Inzidenz des akuten Koronarsyndroms nachgewiesen werden. Weiterhin steigt die Inzidenz der kardiovaskulären Mortalität nach einer erhöhten Feinstaubbelastung nachweisbar an (Peters, Dockery, 2001, Pope, Muhlestein, 2006, Miller, Siscovick, 2007, Morris et al., 1995). Als hierfür mögliche Ursachen werden Entzündungsreaktionen, nervale Mechanismen und die direkte Auswirkung von über die Lunge in die Blutbahn aufgenommenen Partikeln verantwortlich gemacht (Brook, Rajagopalan, 2010, Peters, 2009, Peters et al., 1997). Zusätzlich kann die Herzleistung sekundär, aufgrund einer respiratorischen Verschlechterung, beeinträchtigt werden.

Aufgrund des hohen materiellen und zeitlichen Aufwandes existieren derzeit nur wenige Studien, die die Auswirkungen einer Langzeitbelastung mit Feinstaub untersuchen. In Kohorten und Fall Kontroll Studien konnte bei einem Anstieg der langjährigen Feinstaubexposition eine Zunahme der allgemeinen Sterblichkeit nachgewiesen werden (Pope, 2007). Da die Exposition mit allgegenwärtigem Feinstaub jedoch während der gesamten Lebensspanne auftritt und viele Individuen in industrialisierten Nationen erheblichen Konzentrationen ausgesetzt sind, ist die Durchführung von Langzeituntersuchungen von großer Bedeutung. Basierend auf

diesem Konzept einer integrierenden Exposition untermauern epidemiologische Daten die Theorie, dass eine langandauernde, chronische Exposition das Risiko für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen erhöht (Brook, Rajagopalan, 2010). Diese Theorie wird von der „Women’s Health Study“, welche eine Exposition über einen längeren Zeitraum von einigen Jahren untersucht, untermauert (Miller, Siscovick, 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnten eine kardiale Dysfunktion und pathophysiologische Adaptationsmechanismen, die auf eine myokardiale Dysfunktion hinweisen, nach einer neunmonatigen Exposition mit umweltrelevanten PM<sub>2,5</sub> Konzentrationen, was einer bedeutenden Lebensspanne der Maus entspricht, nachgewiesen werden.

### **5.3 Kardiale Auswirkungen einer neunmonatigen Feinstaubbelastung**

In der vorliegenden Arbeit konnte nach einer Langzeitbelastung mit umweltrelevanten PM<sub>2,5</sub> Konzentrationen über eine bedeutende Lebensspanne der Maus von neun Monaten eine kardiale Dysfunktion *in vitro* und *in vivo*, sowie pathophysiologischen Adaptationsmechanismen nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene repräsentieren die beschriebenen Veränderungen eine kardiale Hypertrophie, einen Austausch der Zusammensetzung kardialer kontraktiler Proteine, eine Expression profibrotischer Gene und eine Reduktion der für die Wiederaufnahme von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum nach stattgefundener Kontraktion verantwortlichen Proteine, hinweisend auf eine beginnende Herzinsuffizienz.

Blutdruckmessungen zeigten nach neunmonatiger Exposition mit Feinstaub einen erhöhten systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck. Diese beschriebenen Blutdruckveränderungen sind hinweisend auf eine beginnende Herzinsuffizienz. Typisch treten diese Veränderungen bei einer linksventrikulären Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion auf, welche wenn sie nicht behandelt wird in eine systolische Dysfunktion mit einem Verlust der kontraktilen Reserve übergehen kann. Darüber hinaus konnten wir den Nachweis einer kombinierten systolischen und diastolischen Dysfunktion, sowie fibrotische Veränderungen des linken Ventrikels und gesteigerter Genexpression der hauptstrukturellen Kollagene des Myokards nachweisen. Diese Veränderungen sind im Zusammenhang mit einer kardialen Hypertrophie als induzierende Stimuli beschrieben (Ying et al., 2009).

Die echokardiographisch gewonnenen Ergebnisse einer eingeschränkten kardialen Funktion und beginnender Herzinsuffizienz konnten in *in vitro* Untersuchungen an isolierten linksventrikulären Kardiomyozyten mit einer abnormen kontraktile Funktion und Relaxation auf zellulärer Ebene bestätigt werden.

Auf molekularer Ebene kommt es bei einer beginnenden Herzinsuffizienz zu charakteristischen Veränderungen mit Austausch der Konzentrationen kontraktile Proteine. In der vorliegenden Arbeit zeigte das linksventrikuläre Myokard einen abnormen Anstieg der  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) Proteinkonzentration nach neunmonatiger  $PM_{2,5}$  Exposition. Entwicklungsbedingt und durch hormonelle Faktoren wird die  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC Expression eng reguliert (Allen et al., 2001). Im Rahmen pathologischer Veränderungen, wie Herzinsuffizienz und linksventrikulärer Hypertrophie, ist ein Wechsel der dominanten  $\alpha$ -MHC zugunsten der  $\beta$ -MHC isoform nachgewiesen (Nadal-Ginard et al., 1989). Weiterhin ist im Rahmen eines experimentellen Herzversagens bei erwachsenen Mäusen ein Wechsel von der im gesunden Myokard dominierenden  $\alpha$ -MHC zugunsten der  $\beta$ -MHC Isoform beschrieben (Harada et al., 1999). Darüber hinaus wird ein Anstieg der  $\beta$ -MHC Expression als ein früher Marker einer beginnenden kardialen Hypertrophie angesehen. Obwohl die  $\beta$ -MHC Isoform im erwachsenen humanen Myokard exprimiert wird, können kleine Konzentrationsanstiege die Kontraktilität auf zellulärer Ebene signifikant beeinflussen (Stelzer et al., 2007). Im Vergleich zu  $\alpha$ -MHC weist die  $\beta$ -MHC Isoform eine geringere Adenosintriphosphat Aktivität und langsamere Kontraktionsgeschwindigkeit auf. Im Gegensatz dazu zeigt die  $\beta$ -MHC Isoform eine größere Energieeffizienz im Bezug auf die entwickelte Kraft (Krenz et al., 2004). Aufgrund dieser Beobachtungen lassen ein Wechsel der im adulten Herz dominierenden  $\alpha$ -MHC zur  $\beta$ -MHC Isoform eine Adaption mit größerer Effizienz zur besseren Energieausnutzung vermuten. Alternativ könnte die hier beschriebene Veränderung jedoch auch hinweisend für eine Progression der Schädigung sein. Daher könnte eine  $\beta$ -MHC induzierte Dysfunktion die energetisch günstigeren Verhältnisse und eine mögliche klinischen Verbesserungen überwiegen. Darüber hinaus ist übereinstimmend mit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen SERCA-2a Konzentrationsveränderung unabhängig von der Ätiologie eine reduzierte SERCA-2a Expression oder Aktivität bei allen Formen der Herzinsuffizienz beschrieben (Hasenfuss et al., 1994, Meyer et al., 1995).



#### 5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Bisherige tierexperimentelle Studien konnten die Effekte einer kurzzeitigen PM<sub>2,5</sub> Exposition auf das Myokard nachweisen. Bedingt durch eine Feinstaubexposition kam es zur myokardialen Generation von Sauerstoffradikalen, spontanen Herzrhythmusstörungen, Veränderungen des myokardialen Blutflusses und Veränderungen des koronaren Gefäßwiderstandes im Rahmen myokardialer Ischämien (Cozzi et al., 2006, Wellenius et al., 2004, Gurgueira et al., 2002, Bartoli et al., 2009). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine akute PM<sub>2,5</sub> Exposition einen Blutdruckanstieg verursacht (Brook et al., 2009). Weiterhin konnte eine Feinstaubexposition über eine Dauer von mehreren Wochen zu einer Sensitivierung vasokonstriktiver Substanzen, vermutlich über eine Reduktion von NO und einem Anstieg Kalzium sensitivierender Signaltransduktionswege inklusive Rho/ROCK, führen (Sun et al., 2008, Ying, Yue, 2009). Durch die Blockade des Rho/ROCK Signalweges kann die Entwicklung des durch Feinstaubexposition bedingten Blutdruckanstiegs in der Anwesenheit von Angiotensin II verhindert und eine sich entwickelnde kardiale Hypertrophie mit Kollagendeposition reduziert werden (Ying, Yue, 2009).

Die hier präsentierten Ergebnisse belegen, dass eine chronische Feinstaubbelastung über eine beträchtliche Lebensspanne bei Mäusen ungünstige kardiale Veränderungen und einen myokardialen Umbau verursacht. Wir konnten zeigen, dass eine neunmonatige PM<sub>2,5</sub> Exposition kardiale Veränderungen verursacht, die in einem Phänotyp resultieren, der vielfache Übereinstimmungen mit einer beginnenden Herzinsuffizienz aufweist.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Langzeitbelastung mit Feinstaub über eine bedeutende Lebensspanne als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz angesehen werden kann. In weiteren experimentellen Studien müssen Dosis- Wirkungskurven ermittelt werden, um Grenzwerte für Feinstaubkonzentrationen festzulegen. Darüber hinaus müssen Feinstaubkonzentrationen ermittelt werden, die keine schädlichen Auswirkungen auf das Herz und seine Funktion haben und keinen kardialen Umbau verursachen. Weiterhin müssen ebenfalls die Auswirkungen einer Langzeitbelastung mit Feinstaub auf andere Organsysteme untersucht und hier ebenfalls Grenzwerte ermittelt werden. Ebenfalls müssen weitere Mechanismen untersucht und beschrieben werden, über die

eine Feinstaubbelastung zur Kollagendeposition und kardialer Fibrose hinaus zu kardialen Schädigungen führen kann. Weiterhin ist der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Phänotyp einer beginnenden Herzinsuffizienz potentiell anfällig für weitere kardiale Insulte. Da die Auswirkungen einer akuten Feinstaubbelastung auf einen kardial vorgeschädigten Organismus ausreichend belegt sind, sollte ebenfalls experimentell untersucht werden, in wieweit eine Feinstaubbelastung in Kombination mit weiteren Risikofaktoren zur Verschlimmerung von Herz- Kreislaufkrankungen führen kann.

## 6. Zusammenfassung

Die schädlichen Auswirkungen von verunreinigter Luft sind allgemein akzeptiert, jedoch kann Luftverschmutzung nicht als direkte Todesursache angesehen werden. Aktuelle epidemiologische Untersuchungen belegen die Bedeutung erhöhter Feinstaubkonzentrationen nicht nur für die Progression, sondern auch für die Entstehung kardialer Erkrankungen. Für Ballungszentren konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter  $PM_{2,5}$  Exposition und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität nachgewiesen werden. Während in den meisten tierexperimentellen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen kurzzeitiger  $PM_{2,5}$  Exposition und kardialer Morbidität nachgewiesen werden konnte, beschreibt die hier vorliegende Arbeit eine myokardiale Dysfunktion nach einer Langzeit  $PM_{2,5}$  Exposition, die über eine bedeutende Lebensspanne der Maus durchgeführt wurde, ohne vorherige Prädisposition. Nach neunmonatiger  $PM_{2,5}$  Exposition konnten wir eine kardiale Dysfunktion, sowie pathophysiologische kardiomyozytäre Veränderungen nachweisen. Auf molekularer Ebene konnten wir eine veränderte Expression kontraktiler Proteine nach neunmonatiger  $PM_{2,5}$  Exposition nachweisen. Diese veränderte Expression kontraktiler Proteine sind pathognomonisch für eine kardiale Hypertrophie und sind bei einer Vielzahl unterschiedlicher kardialer Erkrankungen bei Menschen und Tieren nachzuweisen, die pathophysiologische Veränderungen im Sinne einer kardialen Hypertrophie induzieren. Darüber hinaus konnten wir eine vermehrte Expression pro-fibrotischer Gene, sowie einen kardialen Bindegewebsumbau im Sinne einer kardialen Fibrose, nachweisen. Weiterhin kam es zu einer reduzierten Kalziumwiederaufnahme nach myozytärer Kontraktion. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mechanismen sind übereinstimmend und für eine beginnende Herzinsuffizienz wegweisend.

Zusammenfassend konnten wir in der hier vorliegenden Arbeit den Nachweis erbringen, dass eine chronische Exposition mit physiologisch relevanten  $PM_{2,5}$  Konzentrationen über eine bedeutende Lebenszeitspanne kardiale Veränderungen im Sinne einer beginnenden Herzinsuffizienz verursacht. Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung für Luftverschmutzung als einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen.

## 7. Literaturverzeichnis

Allen DL, Leinwand LA. Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IIb or IId myosin heavy chains. *Dev Biol.* 2001; 229: 383-395

Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lulis AJ, Nel AE. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res.* 2008; 102: 589-596

Atkinson RW, Kang S, Anderson HR, Mills IC, Walton HA. Epidemiological time series studies of PM<sub>2.5</sub> and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2014; 69: 660-665

Bartoli CR, Wellenius GA, Coull BA, Akiyama I, Diaz EA, Lawrence J, Okabe K, Verrier RL, Godleski JJ. Concentrated ambient particles alter myocardial blood flow during acute ischemia in conscious canines. *Environ Health Perspect.* 2009; 117: 333-337

Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289: H8-H16

Bertollini R, Dora C, Krzyzanowski M, Stanners D. Environment and health 1, overview and main European issues. WHO Reg Publ Eur Ser. 1996; 68: 4-56

Böhm K, Tesch-Römer C, Ziese T. Gesundheit und Krankheit im Alter. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert-Koch-Institut. Berlin 2009.

Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail.* 2013; 1: 1-20

Brook RD. Is air pollution a cause of cardiovascular disease? Updated review and controversies. *Rev Environ Health.* 2007; 22: 115-137

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr., Tager I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 2004; 109: 2655-2671

Brook RD, Rajagopalan S. Particulate matter, air pollution, and blood pressure. *J Am Soc Hypertens*. 2009; 3: 332-350

Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC, Jr., Whitsel L, Kaufman JD. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121: 2331-2378

Cai Y, Schikowski T, Adam M, Buschka A, Carsin AE, Jacquemin B, Marcon A, Sanchez M, Vierkotter A, Al-Kanaani Z, Beelen R, Birk M, Brunekreef B, Cirach M, Clavel-Chapelon F, Declercq C, de Hoogh K, de Nazelle A, Ducret-Stich RE, Valeria Ferretti V, Forsberg B, Gerbase MW, Hardy R, Heinrich J, Hoek G, Jarvis D, Keidel D, Kuh D, Nieuwenhuijsen MJ, Ragettli MS, Ranzi A, Rochat T, Schindler C, Sugiri D, Temam S, Tsai MY, Varraso R, Kauffmann F, Kramer U, Sunyer J, Kunzli N, Probst-Hensch N, Hansell AL. Cross-sectional associations between air pollution and chronic bronchitis: an ESCAPE meta-analysis across five cohorts. *Thorax*. 2014; 69: 1005-1014

Carson KF, Wen DR, Li PX, Lana AM, Bailly C, Morton DL, Cochran AJ. Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol*. 1996; 20: 834-840

Cassee FR, Heroux ME, Gerlofs-Nijland ME, Kelly FJ. Particulate matter beyond mass: recent health evidence on the role of fractions, chemical constituents and sources of emission. *Inhal Toxicol*. 2013; 25: 802-812

Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G. Physiological myocardial hypertrophy: how and why? *Front Biosci*. 2008; 13: 312-324

Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health*. 2008; 23: 243-297

Cozzi E, Hazarika S, Stallings HW, 3rd, Cascio WE, Devlin RB, Lust RM, Wingard CJ, Van Scott MR. Ultrafine particulate matter exposure augments ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H894-903

Ezzati M, Hoorn SV, Rodgers A, Lopez AD, Mathers CD, Murray CJ. Estimates of global and regional potential health gains from reducing multiple major risk factors. *Lancet*. 2003; 362: 271-280

Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, Burnett R, Casey D, Coates MM, Cohen A, Delwiche K, Estep K, Frostad JJ, Kc A, Kyu HH, Moradi-Lakeh M, Ng M, Slepak EL, Thomas BA, Wagner J, Aasvang GM, Abbafati C, Ozgoren AA, Abd-Allah F, Abera SF, Aboyans V, Abraham B, Abraham JP, Abubakar I, Abu-Rmeileh NM, Aburto TC, Achoki T, Adelekan A, Adofo K, Adou AK, Adsuar JC, Afshin A, Agardh EE, Al Khabouri MJ, Al Lami FH, Alam SS, Alasfoor D, Albittar MI, Alegretti MA, Aleman AV, Alemu ZA, Alfonso-Cristancho R, Alhabib S, Ali R, Ali MK, Alla F, Allebeck P, Allen PJ, Alsharif U, Alvarez E, Alvis-Guzman N, Amankwaa AA, Amare AT, Ameh EA, Ameli O, Amini H, Ammar W, Anderson BO, Antonio CA, Anwari P, Cunningham SA, Arnlov J, Arsenijevic VS, Artaman A, Asghar RJ, Assadi R, Atkins LS, Atkinson C, Avila MA, Awuah B, Badawi A, Bahit MC, Bakfalouni T, Balakrishnan K, Balalla S, Balu RK, Banerjee A, Barber RM, Barker-Collo SL, Barquera S, Barregard L, Barrero LH, Barrientos-Gutierrez T, Basto-Abreu AC, Basu A, Basu S, Basulaiman MO, Ruvalcaba CB, Beardsley J, Bedi N, Bekele T, Bell ML, Benjet C, Bennett DA, Benzian H, Bernabe E, Beyene TJ, Bhala N, Bhalla A, Bhutta ZA, Bikbov B, Abdulhak AA, Blore JD, Blyth FM, Bohensky MA, Basara BB, Borges G, Bornstein NM, Bose D, Boufous S, Bourne RR, Brainin M, Brazinova A, Breitborde NJ, Brenner H, Briggs AD, Broday DM, Brooks PM, Bruce NG, Brugha TS, Brunekreef B, Buchbinder R, Bui LN, Bukhman G, Bulloch AG, Burch M, Burney PG, Campos-Nonato IR, Campuzano JC, Cantoral AJ, Caravanos J, Cardenas R, Cardis E, Carpenter DO, Caso V, Castaneda-Orjuela CA, Castro RE, Catala-Lopez F, Cavalleri F, Cavlin A, Chadha VK, Chang JC, Charlson FJ, Chen H, Chen W, Chen Z, Chiang PP, Chimed-Ochir O, Chowdhury R, Christophi CA, Chuang TW, Chugh SS, Cirillo M, Classen TK, Colistro V, Colomar M, Colquhoun SM, Contreras AG, Cooper C, Cooperrider K, Cooper LT, Coresh J, Courville KJ, Criqui MH, Cuevas-Nasu L, Damsere-Derry J, Danawi H, Dandona L, Dandona R, Dargan PI, Davis A, Davitoiu DV, Dayama A, de Castro EF, De la Cruz-Gongora V, De Leo D, de Lima G, Degenhardt L, Del Pozo-Cruz B, Dellavalle RP, Deribe K, Derrett S, Jarlais DC, Dessalegn M, deVeber GA, Devries KM, Dharmaratne SD, Dherani MK, Dicker D, Ding EL, Dokova K, Dorsey ER, Driscoll TR, Duan L, Durrani AM, Ebel BE, Ellenbogen RG, Elshrek YM, Endres M, Ermakov SP, Erskine HE, Eshrati B, Esteghamati A,

Fahimi S, Faraon EJ, Farzadfar F, Fay DF, Feigin VL, Feigl AB, Fereshtehnejad SM, Ferrari AJ, Ferri CP, Flaxman AD, Fleming TD, Foigt N, Foreman KJ, Paleo UF, Franklin RC, Gabbe B, Gaffikin L, Gakidou E, Gamkrelidze A, Gankpe FG, Gansevoort RT, Garcia-Guerra FA, Gasana E, Geleijnse JM, Gessner BD, Gething P, Gibney KB, Gillum RF, Ginawi IA, Giroud M, Giussani G, Goenka S, Goginashvili K, Dantes HG, Gona P, de Cosio TG, Gonzalez-Castell D, Gotay CC, Goto A, Gouda HN, Guerrant RL, Gughani HC, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Gutierrez RA, Hafezi-Nejad N, Hagan H, Hagstromer M, Halasa YA, Hamadeh RR, Hammami M, Hankey GJ, Hao Y, Harb HL, Haregu TN, Haro JM, Havmoeller R, Hay SI, Hedayati MT, Heredia-Pi IB, Hernandez L, Heuton KR, Heydarpour P, Hajar M, Hoek HW, Hoffman HJ, Hornberger JC, Hosgood HD, Hoy DG, Hsairi M, Hu G, Hu H, Huang C, Huang JJ, Hubbell BJ, Huiart L, Hussein A, Iannarone ML, Iburg KM, Idrisov BT, Ikeda N, Innos K, Inoue M, Islami F, Ismayilova S, Jacobsen KH, Jansen HA, Jarvis DL, Jassal SK, Jauregui A, Jayaraman S, Jeemon P, Jensen PN, Jha V, Jiang F, Jiang G, Jiang Y, Jonas JB, Juel K, Kan H, Roseline SS, Karam NE, Karch A, Karema CK, Karthikeyan G, Kaul A, Kawakami N, Kazi DS, Kemp AH, Kengne AP, Keren A, Khader YS, Khalifa SE, Khan EA, Khang YH, Khatibzadeh S, Khonelidze I, Kieling C, Kim D, Kim S, Kim Y, Kimokoti RW, Kinfu Y, Kinge JM, Kissela BM, Kivipelto M, Knibbs LD, Knudsen AK, Kokubo Y, Kose MR, Kosen S, Kraemer A, Kravchenko M, Krishnaswami S, Kromhout H, Ku T, Defo BK, Bicer BK, Kuipers EJ, Kulkarni C, Kulkarni VS, Kumar GA, Kwan GF, Lai T, Balaji AL, Laloo R, Lallukka T, Lam H, Lan Q, Lansingh VC, Larson HJ, Larsson A, Laryea DO, Lavados PM, Lawrynowicz AE, Leasher JL, Lee JT, Leigh J, Leung R, Levi M, Li Y, Liang J, Liang X, Lim SS, Lindsay MP, Lipshultz SE, Liu S, Liu Y, Lloyd BK, Logroscino G, London SJ, Lopez N, Lortet-Tieulent J, Lotufo PA, Lozano R, Lunevicius R, Ma J, Ma S, Machado VM, MacIntyre MF, Magis-Rodriguez C, Mahdi AA, Majdan M, Malekzadeh R, Mangalam S, Mapoma CC, Marape M, Marcenes W, Margolis DJ, Margono C, Marks GB, Martin RV, Marzan MB, Mashal MT, Masiye F, Mason-Jones AJ, Matsushita K, Matzopoulos R, Mayosi BM, Mazorodze TT, McKay AC, McKee M, McLain A, Meaney PA, Medina C, Mehndiratta MM, Mejia-Rodriguez F, Mekonnen W, Melaku YA, Meltzer M, Memish ZA, Mendoza W, Mensah GA, Meretoja A, Mhimbira FA, Micha R, Miller TR, Mills EJ, Misganaw A, Mishra S, Ibrahim NM, Mohammad KA, Mokdad AH, Mola GL, Monasta L, Hernandez JC, Montico M, Moore AR, Morawska L, Mori R, Moschandreas J, Moturi WN, Mozaffarian D, Mueller UO, Mukaigawara M, Mullany EC, Murthy KS, Naghavi M, Nahas Z, Naheed A, Naidoo KS, Naldi L, Nand D,

Nangia V, Narayan KV, Nash D, Neal B, Nejjari C, Neupane SP, Newton CR, Ngalesoni FN, de Dieu Ngirabega J, Nguyen G, Nguyen NT, Nieuwenhuijsen MJ, Nisar MI, Nogueira JR, Nolla JM, Nolte S, Norheim OF, Norman RE, Norrving B, Nyakarahuka L, Oh IH, Ohkubo T, Olusanya BO, Omer SB, Opio JN, Orozco R, Pagcatipunan RS, Jr., Pain AW, Pandian JD, Panelo CI, Papachristou C, Park EK, Parry CD, Caicedo AJ, Patten SB, Paul VK, Pavlin BI, Pearce N, Pedraza LS, Pedroza A, Stokic LP, Pekericli A, Pereira DM, Perez-Padilla R, Perez-Ruiz F, Perico N, Perry SA, Pervaiz A, Pesudovs K, Peterson CB, Petzold M, Phillips MR, Phua HP, Plass D, Poenaru D, Polanczyk GV, Polinder S, Pond CD, Pope CA, Pope D, Popova S, Pourmalek F, Powles J, Prabhakaran D, Prasad NM, Qato DM, Quezada AD, Quistberg DA, Racape L, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman SU, Raju M, Rakovac I, Rana SM, Rao M, Razavi H, Reddy KS, Refaat AH, Rehm J, Remuzzi G, Ribeiro AL, Riccio PM, Richardson L, Riederer A, Robinson M, Roca A, Rodriguez A, Rojas-Rueda D, Romieu I, Ronfani L, Room R, Roy N, Ruhago GM, Rushton L, Sabin N, Sacco RL, Saha S, Sahathevan R, Sahraian MA, Salomon JA, Salvo D, Sampson UK, Sanabria JR, Sanchez LM, Sanchez-Pimienta TG, Sanchez-Riera L, Sandar L, Santos IS, Sapkota A, Satpathy M, Saunders JE, Sawhney M, Saylan MI, Scarborough P, Schmidt JC, Schneider IJ, Schottker B, Schwebel DC, Scott JG, Seedat S, Sepanlou SG, Serdar B, Servan-Mori EE, Shaddick G, Shahrzad S, Levy TS, Shangguan S, She J, Sheikhabaei S, Shibuya K, Shin HH, Shinohara Y, Shiri R, Shishani K, Shiue I, Sigfusdottir ID, Silberberg DH, Simard EP, Sindi S, Singh A, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Sliwa K, Soljak M, Soneji S, Soreide K, Soshnikov S, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Stapelberg NJ, Stathopoulou V, Steckling N, Stein DJ, Stein MB, Stephens N, Stockl H, Straif K, Stroumpoulis K, Sturua L, Sunguya BF, Swaminathan S, Swaroop M, Sykes BL, Tabb KM, Takahashi K, Talongwa RT, Tandon N, Tanne D, Tanner M, Tavakkoli M, Te Ao BJ, Teixeira CM, Tellez Rojo MM, Terkawi AS, Texcalac-Sangrador JL, Thackway SV, Thomson B, Thorne-Lyman AL, Thrift AG, Thurston GD, Tillmann T, Tobollik M, Tonelli M, Topouzis F, Towbin JA, Toyoshima H, Traebert J, Tran BX, Trasande L, Trillini M, Trujillo U, Dimbuene ZT, Tsilimbaris M, Tuzcu EM, Uchendu US, Ukwaja KN, Uzun SB, van de Vijver S, Van Dingenen R, van Gool CH, van Os J, Varakin YY, Vasankari TJ, Vasconcelos AM, Vavilala MS, Veerman LJ, Velasquez-Melendez G, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Villalpando S, Violante FS, Vlassov VV, Vollset SE, Wagner GR, Waller SG, Wallin MT, Wan X, Wang H, Wang J, Wang L, Wang W, Wang Y, Warouw



TS, Watts CH, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Werdecker A, Wessells KR, Westerman R, Whiteford HA, Wilkinson JD, Williams HC, Williams TN, Woldeyohannes SM, Wolfe CD, Wong JQ, Woolf AD, Wright JL, Wurtz B, Xu G, Yan LL, Yang G, Yano Y, Ye P, Yenesew M, Yentur GK, Yip P, Yonemoto N, Yoon SJ, Younis MZ, Younoussi Z, Yu C, Zaki ME, Zhao Y, Zheng Y, Zhou M, Zhu J, Zhu S, Zou X, Zunt JR, Lopez AD, Vos T, Murray CJ. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015:

Gassner M, Spuhler T. [Why do farmers die more often from lung diseases?]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1995; 125: 667-675

Gordon SB, Bruce NG, Grigg J, Hibberd PL, Kurmi OP, Lam KB, Mortimer K, Asante KP, Balakrishnan K, Balmes J, Bar-Zeev N, Bates MN, Breysse PN, Buist S, Chen Z, Havens D, Jack D, Jindal S, Kan H, Mehta S, Moschovis P, Naeher L, Patel A, Perez-Padilla R, Pope D, Rylance J, Semple S, Martin WJ, 2nd. Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. *Lancet Respir Med*. 2014; 2: 823-860

Guarnieri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet*. 2014; 383: 1581-1592

Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect*. 2002; 110: 749-755

Hao J, Wang L. Improving urban air quality in China: Beijing case study. *J Air Waste Manag Assoc*. 2005; 55: 1298-1305

Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation*. 1999; 100: 2093-2099

Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, Michael LH, Entman ML, Taffet GE. Effects of isoflurane on coronary blood flow velocity in young, old and ApoE(-/-) mice measured by Doppler ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2007; 33: 512-521

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 1994; 75: 434-442

Heroux ME, Anderson HR, Atkinson R, Brunekreef B, Cohen A, Forastiere F, Hurley F, Katsouyanni K, Krewski D, Krzyzanowski M, Kunzli N, Mills I, Querol X, Ostro B, Walton H. Quantifying the health impacts of ambient air pollutants: recommendations of a WHO/Europe project. *Int J Public Health.* 2015; 60: 619-627

Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol.* 2005; 94: 488-509

Johannson KA, Balmes JR, Collard HR. Air pollution exposure: a novel environmental risk factor for interstitial lung disease? *Chest.* 2015; 147: 1161-1167

Johnson PR, Graham JJ. Fine particulate matter national ambient air quality standards: public health impact on populations in the northeastern United States. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 1140-1147

Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978; 41: 267-274

Kannel WB, Gordon T, Offutt D. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann Intern Med.* 1969; 71: 89-105

Kasikcioglu E. The incognita of the known: the athlete's heart syndrome. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2011; 11: 351-359

Kim KH, Kabir E, Kabir S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int.* 2015; 74: 136-143

Konstantinou DM, Chatzizisis YS, Giannoglou GD. Pathophysiology-based novel pharmacotherapy for heart failure with preserved ejection fraction. *Pharmacol Ther.* 2013; 140: 156-166

Krenz M, Robbins J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44: 2390-2397

Kuehn BM. WHO: More than 7 million air pollution deaths each year. *Jama*. 2014; 311: 1486

Kunzli N, Jerrett M, Garcia-Esteban R, Basagana X, Beckermann B, Gilliland F, Medina M, Peters J, Hodis HN, Mack WJ. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. *PLoS One*. 2010; 5: e9096

Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 667-672

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685

Li TT, Bai YH, Liu ZR, Liu JF, Zhang GS, Li JL. Air quality in passenger cars of the ground railway transit system in Beijing, China. *Sci Total Environ*. 2006; 367: 89-95

Liu Y, Chen R, Shen X, Mao X. Wintertime indoor air levels of PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1</sub> at public places and their contributions to TSP. *Environ Int*. 2004; 30: 189-197

Lu F, Xu D, Cheng Y, Dong S, Guo C, Jiang X, Zheng X. Systematic review and meta-analysis of the adverse health effects of ambient PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> pollution in the Chinese population. *Environ Res*. 2015; 136: 196-204

Mariani JA, Gould PA, Broughton A, Kaye DM. Cardiac resynchronisation therapy for heart failure. *Intern Med J*. 2006; 36: 114-123

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 92: 778-784

Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, Kaufman JD. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*. 2007; 356: 447-458

Mittleman MA. Air pollution, exercise, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2007; 357: 1147-1149

Morris RD, Naumova EN, Munasinghe RL. Ambient air pollution and hospitalization for congestive heart failure among elderly people in seven large US cities. *Am J Public Health.* 1995; 85: 1361-1365

Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1693-1700

Nawrot TS, Perez L, Kunzli N, Munters E, Nemery B. Public health importance of triggers of myocardial infarction: a comparative risk assessment. *Lancet.* 2011; 377: 732-740

Norby FL, Wold LE, Duan J, Hintz KK, Ren J. IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283: E658-666

Peters A. Air quality and cardiovascular health: smoke and pollution matter. *Circulation.* 2009; 120: 924-927

Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 103: 2810-2815

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

Pope CA, 3rd. Mortality effects of longer term exposures to fine particulate air pollution: review of recent epidemiological evidence. *Inhal Toxicol.* 2007; 19 Suppl 1: 33-38

Pope CA, 3rd, Muhlestein JB, May HT, Renlund DG, Anderson JL, Horne BD. Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. *Circulation.* 2006; 114: 2443-2448

Pope CA, 3rd, Turner MC, Burnett RT, Jerrett M, Gapstur SM, Diver WR, Krewski D, Brook RD. Relationships between fine particulate air pollution, cardiometabolic disorders, and cardiovascular mortality. *Circ Res.* 2015; 116: 108-115

Prugger C, Heuschmann PU, Keil U. [Epidemiology of hypertension in Germany and worldwide]. *Herz*. 2006; 31: 287-293

Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002; 15: 167-184

Stelzer JE, Brickson SL, Locher MR, Moss RL. Role of myosin heavy chain composition in the stretch activation response of rat myocardium. *J Physiol*. 2007; 579: 161-173

Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *Jama*. 2005; 294: 3003-3010

Sun Q, Yue P, Ying Z, Cardounel AJ, Brook RD, Devlin R, Hwang JS, Zweier JL, Chen LC, Rajagopalan S. Air pollution exposure potentiates hypertension through reactive oxygen species-mediated activation of Rho/ROCK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 1760-1766

Verrier RL, Mittleman MA, Stone PH. Air pollution: an insidious and pervasive component of cardiac risk. *Circulation*. 2002; 106: 890-892

Walker B, Jr. Environmental Health: An Old Problem with a New Look. *J Natl Med Assoc*. 1964; 56: 237-243

Wellenius GA, Batalha JR, Diaz EA, Lawrence J, Coull BA, Katz T, Verrier RL, Godleski JJ. Cardiac effects of carbon monoxide and ambient particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol Sci*. 2004; 80: 367-376

Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, Charlson F, Davis A, Degenhardt L, Dicker D, Duan L, Erskine H, Feigin VL, Ferrari AJ, Fitzmaurice C, Fleming T, Graetz N, Guinovart C, Haagsma J, Hansen GM, Hanson SW, Heuton KR, Higashi H, Kassebaum N, Kyu H, Laurie E, Liang X, Lofgren K, Lozano R, MacIntyre MF, Moradi-Lakeh M, Naghavi M, Nguyen G, Odell S, Ortblad K, Roberts DA, Roth GA, Sandar L, Serina PT, Stanaway JD, Steiner C, Thomas B, Vollset SE, Whiteford

H, Wolock TM, Ye P, Zhou M, Ávila MA, Aasvang GM, Abbafati C, Abbasoglu Ozgoren A, Abd-Allah F, Abdel Aziz MI, Abera SF, Aboyans V, Abraham JP, Abraham B, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NM, Aburto TC, Achoki T, Ackerman IN, Adelekan A, Ademi Z, Adou AK, Adsuar JC, Arnlov J, Agardh EE, Al Khabouri MJ, Alam SS, Alasfoor D, Albittar MI, Alegretti MA, Aleman AV, Alemu ZA, Alfonso-Cristancho R, Alhabib S, Ali R, Alla F, Allebeck P, Allen PJ, AlMazroa MA, Alsharif U, Alvarez E, Alvis-Guzman N, Ameli O, Amini H, Ammar W, Anderson BO, Anderson HR, Antonio CA, Anwari P, Apfel H, Arsenijevic VS, Artaman A, Asghar RJ, Assadi R, Atkins LS, Atkinson C, Badawi A, Bahit MC, Bakfalouni T, Balakrishnan K, Balalla S, Banerjee A, Barker-Collo SL, Barquera S, Barregard L, Barrero LH, Basu S, Basu A, Baxter A, Beardsley J, Bedi N, Beghi E, Bekele T, Bell ML, Benjet C, Bennett DA, Bensenor IM, Benzian H, Bernabe E, Beyene TJ, Bhala N, Bhalla A, Bhutta Z, Bienhoff K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Blore JD, Blyth FM, Bohensky MA, Bora Basara B, Borges G, Bornstein NM, Bose D, Boufous S, Bourne RR, Boyers LN, Brainin M, Brauer M, Brayne CE, Brazinova A, Breitborde NJ, Brenner H, Briggs AD, Brooks PM, Brown J, Brugha TS, Buchbinder R, Buckle GC, Bukhman G, Bulloch AG, Burch M, Burnett R, Cardenas R, Cabral NL, Campos Nonato IR, Campuzano JC, Carapetis JR, Carpenter DO, Caso V, Castaneda-Orjuela CA, Catala-Lopez F, Chadha VK, Chang JC, Chen H, Chen W, Chiang PP, Chimed-Ochir O, Chowdhury R, Christensen H, Christophi CA, Chugh SS, Cirillo M, Coggeshall M, Cohen A, Colistro V, Colquhoun SM, Contreras AG, Cooper LT, Cooper C, Cooperrider K, Coresh J, Cortinovis M, Criqui MH, Crump JA, Cuevas-Nasu L, Dandona R, Dandona L, Dansereau E, Dantes HG, Dargan PI, Davey G, Davitoiu DV, Dayama A, De la Cruz-Gongora V, de la Vega SF, De Leo D, del Pozo-Cruz B, Dellavalle RP, Deribe K, Derrett S, Des Jarlais DC, Dessalegn M, deVeber GA, Dharmaratne SD, Diaz-Torne C, Ding EL, Dokova K, Dorsey ER, Driscoll TR, Duber H, Durrani AM, Edmond KM, Ellenbogen RG, Endres M, Ermakov SP, Eshrati B, Esteghamati A, Estep K, Fahimi S, Farzadfar F, Fay DF, Felson DT, Fereshtehnejad SM, Fernandes JG, Ferri CP, Flaxman A, Foigt N, Foreman KJ, Fowkes FG, Franklin RC, Furst T, Futran ND, Gabbe BJ, Gankpe FG, Garcia-Guerra FA, Geleijnse JM, Gessner BD, Gibney KB, Gillum RF, Ginawi IA, Giroud M, Giussani G, Goenka S, Goginashvili K, Gona P, Gonzalez de Cosio T, Gosselin RA, Gotay CC, Goto A, Gouda HN, Guerrant RL, Gughani HC, Gunnell D, Gupta R, Gupta R, Gutierrez RA, Hafezi-Nejad N, Hagan H, Halasa Y, Hamadeh RR, Hamavid H, Hammami M, Hankey GJ, Hao Y, Harb HL, Haro JM, Havmoeller R, Hay

RJ, Hay S, Hedayati MT, Heredia Pi IB, Heydarpour P, Hajar M, Hoek HW, Hoffman HJ, Hornberger JC, Hosgood HD, Hossain M, Hotez PJ, Hoy DG, Hsairi M, Hu H, Hu G, Huang JJ, Huang C, Huiart L, Hussein A, Iannarone M, Iburg KM, Innos K, Inoue M, Jacobsen KH, Jassal SK, Jeemon P, Jensen PN, Jha V, Jiang G, Jiang Y, Jonas JB, Joseph J, Juel K, Kan H, Karch A, Karimkhani C, Karthikeyan G, Katz R, Kaul A, Kawakami N, Kazi DS, Kemp AH, Kengne AP, Khader YS, Khalifa SE, Khan EA, Khan G, Khang YH, Khonelidze I, Kieling C, Kim D, Kim S, Kimokoti RW, Kinfu Y, Kinge JM, Kissela BM, Kivipelto M, Knibbs L, Knudsen AK, Kokubo Y, Kosen S, Kramer A, Kravchenko M, Krishnamurthi RV, Krishnaswami S, Kuate Defo B, Kucuk Bicer B, Kuipers EJ, Kulkarni VS, Kumar K, Kumar GA, Kwan GF, Lai T, Lalloo R, Lam H, Lan Q, Lansingh VC, Larson H, Larsson A, Lawrynowicz AE, Leasher JL, Lee JT, Leigh J, Leung R, Levi M, Li B, Li Y, Li Y, Liang J, Lim S, Lin HH, Lind M, Lindsay MP, Lipshultz SE, Liu S, Lloyd BK, Lockett Ohno S, Logroscino G, Looker KJ, Lopez AD, Lopez-Olmedo N, Lortet-Tieulent J, Lotufo PA, Low N, Lucas RM, Lunevicius R, Lyons RA, Ma J, Ma S, Mackay MT, Majdan M, Malekzadeh R, Mapoma CC, Marcenes W, March LM, Margono C, Marks GB, Marzan MB, Masci JR, Mason-Jones AJ, Matzopoulos RG, Mayosi BM, Mazorodze TT, McGill NW, McGrath JJ, McKee M, McLain A, McMahon BJ, Meaney PA, Mehndiratta MM, Mejia-Rodriguez F, Mekonnen W, Melaku YA, Meltzer M, Memish ZA, Mensah G, Meretoja A, Mhimbira FA, Micha R, Miller TR, Mills EJ, Mitchell PB, Mock CN, Moffitt TE, Mohamed Ibrahim N, Mohammad KA, Mokdad AH, Mola GL, Monasta L, Montico M, Montine TJ, Moore AR, Moran AE, Morawska L, Mori R, Moschandreas J, Moturi WN, Moyer M, Mozaffarian D, Mueller UO, Mukaigawara M, Murdoch ME, Murray J, Murthy KS, Naghavi P, Nahas Z, Naheed A, Naidoo KS, Naldi L, Nand D, Nangia V, Narayan KM, Nash D, Nejjari C, Neupane SP, Newman LM, Newton CR, Ng M, Ngalesoni FN, Nhung NT, Nisar MI, Nolte S, Norheim OF, Norman RE, Norrving B, Nyakarahuka L, Oh IH, Ohkubo T, Omer SB, Opio JN, Ortiz A, Pandian JD, Panelo CI, Papachristou C, Park EK, Parry CD, Caicedo AJ, Patten SB, Paul VK, Pavlin BI, Pearce N, Pedraza LS, Pellegrini CA, Pereira DM, Perez-Ruiz FP, Perico N, Pervaiz A, Pesudovs K, Peterson CB, Petzold M, Phillips MR, Phillips D, Phillips B, Piel FB, Plass D, Poenaru D, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA, Popova S, Poulton RG, Pourmalek F, Prabhakaran D, Prasad NM, Qato D, Quistberg DA, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman Su, Raju M, Rakovac I, Rana SM, Razavi H, Refaat A, Rehm J, Remuzzi G, Resnikoff S, Ribeiro AL, Riccio PM, Richardson L, Richardus JH, Riederer AM, Robinson M, Roca

A, Rodriguez A, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Rothenbacher D, Roy N, Ruhago GM, Sabin N, Sacco RL, Ksoreide K, Saha S, Sahathevan R, Sahraian MA, Sampson U, Sanabria JR, Sanchez-Riera L, Santos IS, Satpathy M, Saunders JE, Sawhney M, Saylan MI, Scarborough P, Schoettker B, Schneider IJ, Schwebel DC, Scott JG, Seedat S, Sepanlou SG, Serdar B, Servan-Mori EE, Shackelford K, Shaheen A, Shahrzad S, Shamah Levy T, Shangguan S, She J, Sheikhbahaei S, Shepard DS, Shi P, Shibuya K, Shinohara Y, Shiri R, Shishani K, Shiue I, Shrimme MG, Sigfusdottir ID, Silberberg DH, Simard EP, Sindi S, Singh JA, Singh L, Skirbekk V, Sliwa K, Soljak M, Soneji S, Soshnikov SS, Speyer P, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Stoeckl H, Stathopoulou VK, Steckling N, Stein MB, Stein DJ, Steiner TJ, Stewart A, Stork E, Stovner LJ, Stroumpoulis K, Sturua L, Sunguya BF, Swaroop M, Sykes BL, Tabb KM, Takahashi K, Tan F, Tandon N, Tanne D, Tanner M, Tavakkoli M, Taylor HR, Te Ao BJ, Temesgen AM, Ten Have M, Tenkorang EY, Terkawi AS, Theadom AM, Thomas E, Thorne-Lyman AL, Thrift AG, Tleyjeh IM, Tonelli M, Topouzis F, Towbin JA, Toyoshima H, Traebert J, Tran BX, Trasande L, Trillini M, Truelsen T, Trujillo U, Tsilimbaris M, Tuzcu EM, Ukwaja KN, Undurraga EA, Uzun SB, van Brakel WH, van de Vijver S, Van Dingenen R, van Gool CH, Varakin YY, Vasankari TJ, Vavilala MS, Veerman LJ, Velasquez-Melendez G, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Villalpando S, Violante FS, Vlassov VV, Waller S, Wallin MT, Wan X, Wang L, Wang J, Wang Y, Warouw TS, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Werdecker A, Wessells KR, Westerman R, Wilkinson JD, Williams HC, Williams TN, Woldeyohannes SM, Wolfe CD, Wong JQ, Wong H, Woolf AD, Wright JL, Wurtz B, Xu G, Yang G, Yano Y, Yenesew MA, Yentur GK, Yip P, Yonemoto N, Yoon SJ, Younis M, Yu C, Kim KY, Zaki Mel S, Zhang Y, Zhao Z, Zhao Y, Zhu J, Zonies D, Zunt JR, Salomon JA, Murray CJ. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 386:743-800.

WHO's global air-quality guidelines. *Lancet*. 2006; 368: 1302

WHO. World Health Statistics. 2010.

WHO. 7 million premature deaths annually linked to air pollution. In: Organization WH, editor. Geneva: WHO; 2014a.



WHO. Burden of disease from Household Air Pollution for 2012. In: WHO, editor.: WHO; 2014b.

Wikstrom J, Gronros J, Gan LM. Adenosine induces dilation of epicardial coronary arteries in mice: relationship between coronary flow velocity reserve and coronary flow reserve in vivo using transthoracic echocardiography. *Ultrasound Med Biol*. 2008; 34: 1053-1062

Wold LE, Ren J. Mechanical measurement of contractile function of isolated ventricular myocytes. *Methods Mol Med*. 2007; 139: 263-270

Ying Z, Yue P, Xu X, Zhong M, Sun Q, Mikolaj M, Wang A, Brook RD, Chen LC, Rajagopalan S. Air pollution and cardiac remodeling: a role for RhoA/Rho-kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H1540-1550

Yoda Y, Otani N, Sakurai S, Shima M. Acute effects of summer air pollution on pulmonary function and airway inflammation in healthy young women. *J Epidemiol*. 2014; 24: 312-320

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Im Einzelnen möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Loren Wold bedanken, dass er mich in sein Labor aufgenommen und mir dieses Thema zur Verfügung gestellt hat. Ich danke ihm für die gute Anleitung und wissenschaftliche Betreuung während dieser Zeit und dass er mir die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt hat.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Steve Allen, der mir und meiner Familie während unseres gesamten USA-Aufenthaltes mit Rat und Tat zur Seite stand, und aus diesem Grunde einen relevanten Teil zum Gelingen dieses Projektes beigetragen hat.

Herrn Professor Dr. Georg Baumgarten danke ich herzlich, dass er sich mir und der Betreuung dieser Arbeit in Deutschland angenommen hat. Vielen Dank für die Zeit, die guten Ratschläge aber auch für die kritischen Worte.

Darüber hinaus danke ich meinen ehemaligen Kollegen Dr. Matthew Gorr, Dane Youtz, Andrew MacMillan und den gesamten Mitarbeitern von Professor Wold, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben und mit denen ich eine erlebnisreiche und sehr produktive Zeit verbringen durfte.

Ein großes Dankeschön geht an Lars Gauglitz, der sich, zwecks Korrekturlesen, durch diese Seiten gearbeitet hat.

Schließlich danke ich von Herzen meinem Mann Markus für die liebevolle Unterstützung, die ständige Motivation, die große Hilfe bei dieser Arbeit und natürlich ebenfalls für das Korrekturlesen derselben.